

Evaluación de la actividad gelatinolítica de metaloproteasas de la matriz en secreciones mamarias de vacas sanas y crónicamente infectadas por *Staphylococcus aureus*

Chervaz, V.¹; Andreotti, C.²; Pereyra, E.^{1,2}; Renna, M.S.²; Baravalle, C.²; Calvino, L.³; Dallard, B.^{1,2}

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

victoriachervaz@hotmail.com.ar

La mastitis bovina es uno de los mayores factores limitantes a la rentabilidad de la producción lechera en el mundo. Si bien la mastitis es causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno contagioso más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero. *Staphylococcus aureus* posee la habilidad de invadir y sobrevivir dentro de células fagocíticas y epiteliales mamarias, lo cual lo protegería de la respuesta humoral del huésped y del tratamiento con antibióticos. Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales, tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario.

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.

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas 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. Las MMPs abarcan al menos 25 enzimas proteolíticas relacionadas, las cuales se subdividen en 5 grupos de acuerdo a sus propiedades funcionales y estructurales: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, tipo de membrana (MT-MMP) y un último grupo conformado por componentes proteicos heterogéneos. Las MMPs más estudiadas son las gelatinasas MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B). Las MMPs juegan un papel importante en la inflamación persistente que ocurre en los casos de mastitis recurrente, siendo la inhibición de estas enzimas una posible estrategia terapéutica. La inflamación puede causar un desequilibrio en las funciones fisiológicas de las MMPs, lo que lleva a una disminución en la producción y calidad de la leche.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad gelatinolítica correspondiente a MMP-2 y MMP-9 en secreciones mamarias provenientes de vacas sanas y crónicamente infectadas por *S. aureus* durante la involución activa.

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 los cuartos mamarios. Se utilizaron cuartos mamarios libres de IIM (n=9) y cuartos con IIM crónicas por *S. aureus* (n=9). 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 secreción mamaria inmediatamente antes del secado (hora 0), a las 12 hs y al día 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 y 21 post secado (ps). La actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en secreción mamaria se determinó mediante zimografía en geles de poliacrilamida con el agregado de gelatina según la metodología empleada por Nagahata y col. (2011)¹. Las bandas generadas por la actividad gelatinolítica se analizaron por densitometría utilizando el software Image J (Institutos Nacionales de Salud, Maryland, EE.UU.). La actividad zimográfica se expresó como porcentaje de actividad referido al control positivo (marcador) (MMP-2 o MMP-9) sembrado simultáneamente en el mismo gel². Para determinar el efecto de la infección por *S. aureus* sobre los niveles de actividad de las MMPs en secreción mamaria, los datos obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR), utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows.

La actividad gelatinolítica de MMP-2 en secreción mamaria se vio significativamente influenciada por la IIM con *S. aureus* ($P=0,012$). Desde la hora 0 (pre secado) hasta el día 4 ps, no se observaron diferencias en los niveles de actividad de MMP-2 entre infectados y no infectados, detectándose bajos niveles de actividad para esta enzima. Tanto en secreciones mamarias de cuartos sanos como infectados, a partir del día 7 ps, los niveles de actividad de MMP-2 se incrementaron en forma gradual para alcanzar la máxima actividad al día 21 ps. En secreciones provenientes de cuartos infectados, la actividad gelatinolítica fue mayor en comparación con la detectada en secreciones de cuartos sanos al día 7 ($P<0,001$) y 14 ($P=0,006$) ps.

La actividad gelatinolítica de MMP-9 en secreción mamaria se vio significativamente influenciada por la IIM con *S. aureus* ($P=0,005$). En secreciones mamarias de cuartos sanos, no se observó actividad enzimática hasta el día 4 ps. En secreciones de cuartos infectados, si bien se observó actividad enzimática desde la hora 0 hasta el día 4 ps, los niveles fueron bajos. Tanto en secreciones mamarias de cuartos sanos como infectados, a partir del día 7 ps, los niveles de actividad de MMP-9 se incrementaron en forma gradual para alcanzar niveles máximos de actividad al día 21 ps. En secreciones provenientes de cuartos infectados la actividad gelatinolítica fue mayor en comparación con la detectada en secreciones de cuartos sanos al día 7 ($P=0,002$), 14 ($P=0,002$) y 21 ($P=0,022$) ps.

Se puede concluir que durante la involución normal de la GM bovina, la actividad gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 se incrementa en forma gradual a partir de la primera semana luego de la interrupción de la lactancia, alcanzando niveles elevados de actividad hacia la tercera semana ps, periodo que coincide con la máxima remodelación del tejido (involución activa). Por otra parte, la IIM crónica por *S. aureus* intensifica la actividad de estas enzimas gelatinolíticas, lo que podría causar una involución alterada del tejido mamario con la consecuente disminución de la producción de leche.

1-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. Journal of Veterinary Medical Science, 73, 885-894.

2-De Simone, E.; Perrone, G.; Caggiano, N.; Lastra, Y.; Rubatino, F.; Díaz, J.; Ferreto, A.; Montes de Oca, C.; Roldán, E.; Chiappe Barbará, M. (2015). Levels of cytokines and matrix metalloproteinases 2 and 9 in the synovial fluid of osteoarthritic horses treated with pamidronate. Journal of Equine Veterinary Science, 35, 57-583.