

Evaluación de la expresión de TLR2 e IL-1 α en glándula mamaria murina infectada experimentalmente con dos cepas de *Staphylococcus aureus* de origen bovino con características clínicas y genéticas diferenciales

Pereyra EAL^{1,2}, Duré A², Pastor RP¹, Godoy EC¹, Sbodio O¹, Calvino LF^{1,3}, Dallard BE^{1,2}
Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias¹, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral)², UNL-CONICET. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA)³. epereyra@fcv.unl.edu.ar

Título de proyecto: Rol de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* en la patogenia de la mastitis en un modelo murino. Proyecto financiado por la UNL. Convocatoria CAI+D PI-2011.

La mastitis bovina es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes del ganado vacuno que genera grandes pérdidas económicas a los productores y la industria láctea mundial. *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina como en otros países de gran desarrollo lechero. Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos elevados de células somáticas y persistencia de las bacterias en la glándula mamaria (GM). En la actualidad, el modelo de mastitis causada por *S. aureus* en ratón continúa siendo una herramienta adecuada para los trabajos de investigación que se centran en la patogénesis y control de las infecciones intramamarias (IIM) en bovinos².

El sistema de defensa de la GM contra los patógenos causantes de mastitis está mediado por factores inmunológicos innatos y adquiridos asociados a este tejido, que actúan en forma coordinada, siendo la eficiencia de estos mecanismos determinante de la resistencia a nuevas infecciones. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa durante las etapas tempranas de la interacción patógeno-hospedador y se inicia cuando receptores de reconocimiento de patrones (PRR), en la superficie o dentro de las células del hospedador, se unen a moléculas particulares de las bacterias, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los PRR son expresados por los leucocitos de la leche y por las células epiteliales que revisten la GM. Los receptores tipo *toll* (TLR) forman parte de los PRR, son proteínas estructuralmente relacionadas que reconocen diferentes PAMP e inducen la producción de factores secretados como citoquinas. Dentro de este grupo se encuentra TLR2 que ha sido identificado como el mayor receptor para PAMP de bacterias Gram positivas como peptidoglicanos y ácido lipoteicoico⁴.

El papel de las citoquinas y quimioquinas en la GM se ha estudiado intensamente en los últimos años. A pesar de su rol fundamental en la respuesta del hospedador a la infección, también pueden generar efectos deletéreos sobre el mismo. Por lo tanto, existe un fino balance entre los efectos positivos y negativos de las citoquinas en el hospedador, que está establecido por la maduración, cantidad y ubicación de su expresión. La IL-1 α , es una citoquina pro-inflamatoria, producida en grandes cantidades por queratinocitos y en menor medida por macrófagos, tiene efectos específicos quimiotácticos y activadores sobre células fagocíticas, además de otros tipos de células¹.

El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión génica de TLR2 e IL-1 α luego de la inoculación intramamaria (IM) experimental de dos cepas de *S. aureus* de origen bovino con características genéticas, clínicas y epidemiológicas diferenciales en GM de ratón. Por otra parte, se evaluó la localización celular específica de TLR2 por inmunohistoquímica (IHQ)

Para las inoculaciones experimentales en los ratones se utilizaron dos cepas de *S. aureus* de origen bovino que fueron seleccionadas según criterios clínicos y epidemiológicos, utilizando técnicas bacteriológicas tradicionales y técnicas de biología molecular que permitieron diferenciarlas genéticamente. La cepa A, aislada solo una vez durante la lactancia a partir de un animal con IIM clínica (cepa no persistente) y la cepa B de un animal con IIM crónica aislada durante toda la lactancia (cepa persistente). Ambas cepas presentaron patrones clonales diferentes luego de la tipificación por

electroforesis en gel de campo pulsantes (PFGE). Se utilizaron ratones hembras preñadas de la cepa BALB/cJ de 6-8 semanas de edad provenientes del Centro de Medicina Comparada (ICIVET-Litoral). Los procedimientos con los animales se realizaron de acuerdo a las normas vigentes (NRC, 2011)³ y el protocolo fue analizado por el comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL. Cinco a siete días después del parto, las madres en lactancia fueron separadas de sus crías y anestesiadas. Se utilizaron 3 grupos de ratones que fueron inoculados en forma IM con las cepas A, B y solución fisiológica-SF (grupo control). Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos post inoculación (pi): 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216 y 264 hs. Las GM L4 y R4 fueron asépticamente diseccionadas y removidas. Una porción del tejido mamario fue fijada en formol bufferado al 4% para realizar IHQ indirecta utilizando un anticuerpo específico para identificar TLR2. Otra porción fue inmediatamente conservada a -80°C hasta su procesamiento para la realización de RT-PCR en tiempo real para cuantificar la expresión génica de TLR2 e IL-1 α .

La inmunomarcación con anti TLR2 se asoció a estructuras del parénquima mamario principalmente en el citoplasma apical de las células epiteliales que revisten los alvéolos y conductos mamarios. En las GM inoculadas con la cepa A y B de *S. aureus* se observó marcación intensa durante las primeras 48 hs pi, mientras que en las GM controles la marcación fue débil durante todos los periodos evaluados. La expresión de ARNm para TLR2 se vio influenciada por los tratamientos aplicados ($p < 0,001$) y por los diferentes tiempo pi ($p < 0,001$), observándose interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,001$). A las 6 hs pi la expresión génica de TLR2 fue mayor en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* con respecto a los inoculados con la cepa B y controles inoculados con SF ($p < 0,05$). A las 12 hs pi se observó un pico en la expresión génica de TLR2 en las GM inoculadas con las cepas A y B con respecto a los controles ($p < 0,05$). Desde las 24 hs pi y hasta los 120 hs pi se observó una disminución gradual en la expresión de TLR2 para ambas cepas evaluadas que fue mayor a la del grupo control ($p < 0,05$). A las 168, 216 y 264 hs pi no se observaron diferencias en la expresión de TLR2 entre los diferentes grupos evaluados.

La expresión de ARNm para IL-1 α se vio influenciada por los tratamientos aplicados ($p < 0,001$) y por los diferentes tiempos pi ($p < 0,001$), observándose interacción significativa entre ambos factores ($p < 0,001$). A las 6 hs pi se observó un aumento en la expresión de IL-1 α en las GM inoculadas con la cepa A que fue significativo con respecto a las inoculados con la cepa B y controles ($p < 0,05$). A las 12 hs pi la expresión de IL-1 α se incrementó en las GM inoculadas con las cepas A y B con respecto a las GM controles ($p < 0,05$), alcanzando la cepa A los mayores valores de expresión relativa. A las 24 hs pi la expresión de IL-1 α en las GM inoculadas con las cepas A y B fue mayor a la observada en las GM controles ($p < 0,05$) alcanzando un pico las 48 hs pi. A las 72 y 96 hs pi se observó una disminución creciente en la expresión de IL-1 α en las GM inoculadas con las cepas A y B aunque se mantuvo en niveles mayores a los observados en las GM controles ($p < 0,05$). A las 168 hs pi las GM inoculadas con la cepa B alcanzaron un nuevo pico en la expresión de IL-1 α difiriendo en forma significativa con las GM inoculadas con la cepa A y controles ($p < 0,05$). Esta expresión aumentada en las GM inoculadas con la cepa B se mantuvo hasta las 264 hs pi.

La expresión génica y proteica de los componentes de la respuesta inmune innata evaluados en GM murina luego de la infección IM experimental difirieron con cada cepa. Los resultados obtenidos indicarían que el genotipo de *S. aureus* y el origen clínico-epidemiológico de la cepa (persistente o no persistente) podrían direccionar la respuesta inmune del hospedador.

1. **Bannerman, D.** (2009) Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci*, 87, 10-25.
2. **Brouillette, E.; Malouin, F.** (2005) The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect*, 7, 560-568.
3. **National Research Council of the National Academies.** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth ed. ISBN: 978-0-309-15400-0, 2011.
4. **Takeda, K.; Akira, S.** (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.