

## XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores – UNL

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

**Andrea B. Duré**

Alumna Adscripta en Investigación. Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. ICIVET-LITORAL (UNL-CONICET). Tesinista de la Carrera de Licenciatura en Biotecnología de la FBCB-UNL.

Área: Ciencias de la Salud. Sub-área: Veterinaria

### INTRODUCCIÓN

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 bovinos (Brouillette y Malouin, 2005).

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 (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). 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 lipoteicoico (Takeda y Akira, 2005).

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 $\alpha$ , 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 células (Bannerman, 2009).

## OBJETIVO

El objetivo principal del trabajo fue evaluar la expresión génica de TLR2 e IL-1 $\alpha$  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 expresión proteica y localización celular específica de TLR2 por inmunohistoquímica (IHQ).

## MATERIALES Y MÉTODOS

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 (*National Research Council of the National Academies*, 2011) 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 las GM abdominales derecha (R4) e izquierda (L4) con 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de las cepas A (grupo 1) y B (grupo 2) de *S. aureus*. El grupo 3 fue inoculado con 100  $\mu$ l de solución fisiológica estéril (grupo control). Para la inoculación IM a través del conducto del pezón se utilizó una aguja 30G x 1/2 y una jeringa conteniendo  $1 \times 10^6$  UFC/glándula en un volumen final de 100  $\mu$ l. Dos horas posteriores a la infección, las madres retornaron con sus crías y permanecieron con ellas durante todo el experimento. 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 $\alpha$ .

La evaluación de la localización celular específica de TLR2 se realizó por IHQ (método streptavidina-peroxidasa) utilizando el anticuerpo primario policlonal anti-TLR2 (Genway). La semicuantificación de la expresión de dicha proteína se realizó mediante análisis digital de imágenes utilizando el programa Image Pro-Plus 3.0.1®. (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Para la evaluación de la expresión génica de TLR2 e IL-1 $\alpha$  se extrajo ARN total utilizando la metodología del reactivo Trizol. A partir de ellos se realizaron tratamientos con ADNasal para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. Posteriormente, se realizaron transcripciones reversa para la obtención de ADNc. A partir de cada uno de los ADNc obtenidos se llevaron a cabo qPCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos para TLR2 e IL-1 $\alpha$ . Como gen normalizador de la reacción se utilizó Beta Actina ( $\beta$ -actina) cuya expresión es constitutiva y estable en todos los estadios celulares y condiciones.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se optimizaron protocolos de PCR utilizando la tecnología SYBR Green I en un StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las mediciones fueron realizadas por duplicado y las eficiencias de las reacciones se evaluaron por medio de una curva estándar y calculadas usando el software StepOne v2.3 (Applied Biosystems). Estas curvas estándares se construyeron a partir de diluciones seriadas de un pool de ADNc. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos. Además, para confirmar la pureza de los productos se realizaron curvas de disociación. Los niveles de expresión de los genes se analizaron según el valor de su Ct (del inglés: *cycle threshold*). Dicho valor corresponde al ciclo en el que la señal de fluorescencia puede ser detectada como valor de corte. La cuantificación de los niveles de expresión de TLR2 e IL-1 $\alpha$  se realizó a través del método del 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001).

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó por ANOVA factorial que evalúa los efectos individuales de los tratamientos aplicados y del tiempo de muestreo así como de la interacción entre ambos factores, utilizando el programa SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc. ©). Para evaluar diferencias en la expresión TLR2 e IL-1 $\alpha$  luego de los diferentes tratamientos aplicados en cada punto del tiempo se realizó ANOVA simple y posteriormente se utilizó el test de comparaciones múltiples Duncan para identificar cuales grupos diferían entre sí en forma significativa. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

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. Los porcentajes de área inmunomarcada para TLR2 se vieron influenciados por los tratamientos aplicados ( $p < 0,001$ ) y por los diferentes tiempo pi ( $p < 0,001$ ), observándose interacción significativa entre ambos factores ( $p < 0,001$ ). Los porcentajes de inmunomarcación para TLR2 fueron mayores en las GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las GM controles durante todos los periodos evaluados ( $p < 0,05$ ), observándose los mayores porcentajes de expresión proteica a las 12, 24 y 48 hs pi.

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 solución fisiológica ( $p < 0,05$ ). 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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.

## CONCLUSIÓN

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.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Brouillette, E.; Malouin, F.**, 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect*, 7, 560-568.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D.**, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method Methods*, 25, 402-408.
- 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.
- Takeda, K.; Akira, S.**, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- Wellnitz, O.; Bruckmaier, R.M.**, 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J*, 192, 148-152.