



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Doctorado en Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA). Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral, UNL-CONICET).

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias.*

Evaluación de la respuesta inmune innata frente a infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus*: Caracterización de linfocitos $\gamma\delta$ bovinos.

Autora: Carolina Engler

Directora: María Sol Renna

Codirectora: Celina Baravalle

Año: 2026

*La investigación es un viaje
donde la curiosidad marca el rumbo,
el esfuerzo mueve los pies
y el trabajo en equipo
hace posible llegar más lejos.*

Agradecimientos

A mi familia, por la paciencia y el apoyo incondicional, aun cuando mi carrera no siempre fue fácil de explicar. En especial a mi mamá, su amor y su confianza me acompañaron siempre y forman parte de este logro. Cada uno de los pasos que me trajeron hasta aquí, llevan su marca.

A Agustín, por ser un compañero incondicional. Gracias por cuidarme tanto a mí y a nuestros perrijos. Tengo mucha suerte de tenerte en mi vida.

A Sol, por haber confiado en mí y haberme abierto las puertas de este hermoso grupo de trabajo. Por guiarme desde mis inicios y enseñarme todo lo que sé. Por la dedicación y el compromiso con los que dirigió esta tesis, este trabajo está dedicado a ella.

A Celi, por ayudarme con mis dudas e inquietudes, por tu dedicación y por tus aportes tan valiosos a este trabajo. Por formarme y acompañarme en el ámbito de la docencia.

A Bibi, por ser un gran pilar de nuestro grupo de trabajo. Por contribuir a mi formación y por aportar tu experiencia para enriquecer esta tesis.

A Luis Calvino, por tus valiosos aportes que fortalecieron este trabajo.

A Sofi, por el apoyo, las charlas, las risas y el acompañamiento constante, dentro y fuera del laboratorio. Por crecer juntas, compartir esfuerzos y logros. Gracias por tu amistad incondicional.

A las amigas que me dejó el doctorado, a las que todavía siguen bancándome y a las que pasaron y dejaron una huella imborrable. Por la ayuda en la mesada, por acompañarme al campo y en la toma de muestras. Gracias por ser mis angelitos de la guarda, que aparecían para limpiar los tubos justo cuando más lo necesitaba.

A todos mis compañeros del ICiVet y del CMC, por las tantas horas de trabajo y protocolos compartidos. Gracias por el compañerismo y la convivencia diaria, por las charlas cotidianas y por hacer más llevadero este proceso.

A Hugo Ortega y a Natalia Salvetti, por permitirme ser parte de este gran equipo de trabajo y por estar siempre disponibles ante cualquier inquietud.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme la posibilidad de seguir formándome como profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por otorgar los subsidios necesarios para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A todos, de corazón... **¡MUCHAS GRACIAS!**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mastitis Bovina	2
1.2 Impacto económico y prevalencia de la enfermedad	3
1.3 Mastitis causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.4 Principales FV de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.4.1 Polisacáridos capsulares	6
1.4.2 Adhesinas	7
1.4.3 <i>Biofilm</i>	8
1.4.4 Genes de resistencia a los antibióticos	9
1.4.5 Toxinas	10
1.5 Mecanismos de defensa de la GM bovina.....	10
1.5.1 Respuesta inmune innata.....	12
1.5.2 Respuesta inmune adaptativa	14
1.6 Linfocitos $\gamma\delta$: características y funciones principales.....	16
1.6.1 Secreción de citoquinas	18
1.6.2 Función reguladora.....	18
1.6.3 Actividad citotóxica	19
1.6.4 Presentación de antígenos	20
1.6.5 Memoria inmunológica	20
1.7 Linfocitos $\gamma\delta$: rol en la defensa de la GM frente a <i>S. aureus</i>	20
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo General	25
2.2 Objetivos específicos.....	25

3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Objetivo específico 1: “Estudiar la activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ luego de la interacción <i>in vitro</i> de CMN con dos cepas de <i>S. aureus</i> diferenciadas por su genotipo y capacidad de adaptación a la GM; una de alta adaptación o P y otra de baja adaptación o NP”	27
3.1.1 Características diferenciales de las cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas.....	27
3.1.2 Cultivos microbiológicos y obtención de bacterias muertas por calor.....	28
3.1.3 Recuento del número de Unidades Formadoras de Colonia	29
3.1.4 Aislamiento de CMN de sangre periférica bovina	29
3.1.5 Purificación de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ mediante separación inmunomagnética	30
3.1.6 Ensayos de cultivo celular.....	31
3.1.7 Evaluación de la expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺	32
3.1.8 Análisis estadístico.....	36
Objetivo específico 2: “Estudiar el perfil de producción de citoquinas por parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos luego de la interacción <i>in vitro</i> con las cepas P y NP de <i>S. aureus</i> ” ..	36
3.2.1 Evaluación de la producción de IFN- γ , IL-17A y TNF- α mediante ELISA sándwich ..	36
3.2.2 Análisis estadístico.....	37
Objetivo específico 3: “Evaluar si existe comunicación cruzada (<i>cross-talk</i>) entre los linfocitos T $\gamma\delta$ y macrófagos bovinos infectados <i>in vitro</i> con las cepas P y NP de <i>S. aureus</i> ” ..	37
3.3.1 Ensayos de cultivo celular.....	37
3.3.2 Evaluación de la expresión proteica de CD80 y CMH-II en monocitos-macrófagos	37
3.3.3 Análisis estadístico.....	38
Objetivo específico 4: “Estudiar en un modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de <i>S. aureus</i> , la frecuencia, distribución y perfil de activación de las subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos” ..	39
3.4.1 Desarrollo del Modelo de Infección Intramamaria experimental.....	39
<i>Preparación del inóculo bacteriano</i>	39
<i>Animales e inoculación experimental</i>	39
<i>Monitoreo de la infección y toma de muestras de leche y sangre</i>	40
<i>Recuento de células somáticas, aislamientos microbiológicos y monitoreo de la infección intramamaria</i>	41

3.4.2 Aislamiento de leucocitos totales de sangre periférica.....	42
3.4.3 Citometría de Flujo.....	42
<i>Frecuencia de poblaciones de células inmunes sistémicas</i>	42
<i>Marcadores de activación y presentación antigénica en linfocitos Tγδ sistémicos</i>	44
3.4.4 Estudio de la población de linfocitos Tγδ a nivel local en la GM.....	45
3.4.5 Evaluación de la presencia de <i>S. aureus</i> intracelular a nivel local	46
3.4.6 Evaluación de los niveles de citoquinas en leche.....	46
3.4.7 Análisis estadístico.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1.1 Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos Tγδ WC1 ⁺ luego de la interacción <i>in vitro</i> de CMN con <i>S. aureus</i>	49
<i>CD25</i>	49
<i>CD62L</i>	50
<i>TLR2</i>	50
<i>CMH-II</i>	51
<i>CD80</i>	52
<i>CD86</i>	53
4.1.2 Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II y CD80 en linfocitos Tγδ WC1 ⁺ purificados luego de la interacción <i>in vitro</i> con <i>S. aureus</i>	54
<i>CD25</i>	54
<i>CD62L</i>	55
<i>TLR2</i>	56
<i>CMH-II</i>	57
<i>CD80</i>	58
4.2.1 Producción de citoquinas en la población de CMN totales, de linfocitos Tγδ WC1 ⁺ y de CMN Ø WC1 ⁺ luego del contacto <i>in vitro</i> con <i>S. aureus</i>	59
<i>IFN-γ</i>	59
<i>IL-17</i>	60
<i>TNF-α</i>	61

4.3.1. Expresión proteica de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos luego de la interacción <i>in vitro</i> de CMN y CMN $\emptyset$ WC1 ⁺ con <i>S. aureus</i>	62
<i>CD14</i>	63
<i>CMH-II</i>	64
<i>CD80</i>	65
4.4.1 Modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de <i>S. aureus</i>	67
<i>Monitoreo de la infección intramamaria y aislamientos microbiológicos</i>	67
<i>Recuento de células somáticas</i>	70
<i>Evaluación de la presencia de S. aureus intracelular a nivel local</i>	71
4.4.2 Frecuencia de poblaciones celulares inmunes sistémicas	72
4.4.3 Estudio de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ activados a nivel sistémico.....	74
4.4.4 Evaluación de marcadores relacionados con la función de presentación antigénica en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ sistémicos	76
<i>CD80</i>	76
<i>CD86</i>	77
<i>CMH-II</i>	79
4.4.5 Estudio de la población de linfocitos T $\gamma\delta$ a nivel local en la GM.....	81
4.4.6 Producción de citoquinas por ELISA.....	83
<i>IFN-γ</i>	83
<i>IL-17</i>	84
<i>IL-4</i>	85
5. DISCUSIÓN	87
Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺ luego de la interacción <i>in vitro</i> con <i>S. aureus</i>	88
Producción de IFN- γ , IL-17A y TNF- α luego de la interacción <i>in vitro</i> con <i>S. aureus</i>	93
Expresión proteica de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos luego de la interacción <i>in vitro</i> de CMN y CMN $\emptyset$ WC1 ⁺ con <i>S. aureus</i>	97
Modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de <i>S. aureus</i>	99
6. CONCLUSIONES	113
7. BIBLIOGRAFÍA.....	117

ABREVIATURAS

AD	Cuarto anterior derecho
AF	Alexa Fluor
<i>agr</i>	<i>Accessory gene regulator</i> (sistema regulador)
AIP	Autoinductor peptídico
AMS	Agar Manitol Salado
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Aloficocianina
bap	Proteína asociada a biofilm
BCG	Bacilo de <i>Calmette-Guérin</i>
<i>blaZ</i>	Gen que codifica la enzima beta-lactamasa
<i>cap</i>	Gen de la cápsula polisacárida
CC	Complejo clonal
CD	Cluster de diferenciación
CEM	Células epiteliales mamarias
CF	Citometría de flujo
<i>clf</i>	<i>Clumping factor</i>
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMN $\emptyset$ WC1 ⁺	Células mononucleares carentes de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 ⁺
CMN	Células mononucleares
Cna	Proteína de unión al colágeno
CPA	Células presentadoras de antígeno
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DCs	<i>Dendritic cells</i>
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Inmunoensayo enzimático

fib	Proteínas de unión al fibrinógeno
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMDV	<i>Foot and mouth disease virus</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FnBP	Proteínas de unión a la fibronectina
FV	Factores de virulencia
GM	Glándula mamaria
HVB-1	Herpesvirus bovino-1
ica	<i>Intercellular adhesion cluster</i> (operón ica)
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IIM	Infecciones intramamarias
IL	Interleuquina
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
LTA	Ácido lipoteicoico
LTfh	Linfocitos T foliculares
LTh	Linfocitos T <i>helper</i>
LTreg	Linfocitos T reguladores
LTSP	Leucocitos totales de sangre periférica
LT $\alpha\beta$	Linfocitos T alfa beta
LT $\gamma\delta$	Linfocitos T gamma delta
MAC-T	Línea epitelial alveolar mamaria bovina
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MDM	Macrófagos derivados de monocitos

MDP	Muramil dipéptido
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MLG	Modelo lineal generalizado
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
MOI	Multiplicidad de infección
MSCRAMM	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NAS	<i>Staphylococcus</i> no aureus (<i>non-aureus staphylococci</i>)
NK	Células asesinas naturales
NP	No persistentes
P	Persistente
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBP	Proteína de unión a penicilina
PC	Polisacáridos capsulares
PE	Ficoeritrina
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PGN	Peptidoglicano
PI	Cuarto posterior izquierdo
pi	Posterior a la infección
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
pre-i	Previo a la infección
PT	Pulsotipo
RCS	Recuento de células somáticas
RRPs	Receptores de reconocimiento de patrones
SCCmec	<i>Staphylococcal Chromosome Cassette mec</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos
SE	Enterotoxina estafilocócica

SFB	Suero bovino fetal
ST	Secuenciotipo
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSST-1	Toxina 1 del síndrome de shock tóxico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VSRB	Virus sincicial respiratorio bovino
WC1	<i>Workshop cluster 1</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mastitis bovina: causas, vías de infección y presentación clínica.	2
Figura 2. Principales factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	7
Figura 3. Representación esquemática de la GM bovina.	11
Figura 4. Esquema de los principales componentes de la respuesta inmune en la GM bovina.	16
Figura 5. Principales receptores y moléculas efectoras asociadas a los linfocitos $T\gamma\delta$	19
Figura 6. Esquema representativo del porcentaje de pureza de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ evaluado por CF.	31
Figura 7. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de la expresión de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ dentro de la población de CMN.	35
Figura 8. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizados para el análisis de la expresión de CD25, CD62L, TLR2 y CMH-II en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados.	34
Figura 9. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos.	38
Figura 10. Esquema general del modelo de desafío intramamario con <i>S. aureus</i>	40
Figura 11. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de las poblaciones de células inmunes de sangre periférica.	43
Figura 12. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de los marcadores de activación y de presentación antigénica en los linfocitos $T\gamma\delta$ sistémicos.	45
Figura 13. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan CD25 y B) IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	49
Figura 14. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan CD62L y B) IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	50
Figura 15. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan TLR2 y B) IFM de TLR2 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	51
Figura 16. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan CMH-II y B) IFM de CMH-II en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	52
Figura 17. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan CD80 y B) IFM de CD80 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	53
Figura 18. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ que expresan CD86 e B) IFM de CD86 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	54
Figura 19. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados que expresan CD25 y B) IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	55
Figura 20. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados que expresan CD62L y B) IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	56

Figura 21. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados que expresan TLR2 y B) IFM de TLR2 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	57
Figura 22. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados que expresan CMH-II y B) IFM de CMH-II en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	58
Figura 23. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados que expresan CD80 y B) IFM de CD80 en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	59
Figura 24. Índice de producción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> luego de 48 h de incubación.	60
Figura 25. Índice de producción de IL-17 en sobrenadantes de cultivos de CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> luego de 48 h de incubación..	61
Figura 26. Índice de producción de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con ambas cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> luego de 48 h de incubación.	62
Figura 27. Porcentaje de monocitos-macrófagos (células $CD14^+$) luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	63
Figura 28. Porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan la molécula del CMH-II luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).....	64
Figura 29. IFM de CMH-II en monocitos-macrófagos luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	65
Figura 30. Porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan CD80 luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	66
Figura 31. IFM de CD80 en monocitos-macrófagos luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ $WC1^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> o medio solamente (células basales).	67
Figura 32. Patrones de bandas representativos obtenidos mediante ADN digerido con <i>Sma</i> I y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> aisladas de leche durante diferentes periodos tras la exposición.....	70
Figura 33. RCS de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días).....	71
Figura 34. Microscopía óptica de citoespinos obtenidos a partir de muestras de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas (A) 806 (NP) y (B) 5011 (P) de <i>S. aureus</i>	72
Figura 35. Frecuencia de poblaciones celulares inmunes de sangre periférica. A) Porcentaje de células $CD14^+$, B) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$, C) Porcentaje de linfocitos $CD21^+$, D) Porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ y E) Porcentajes de linfocitos T $CD8^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días).....	73

Figura 36. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD25^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días) ..	74
Figura 37. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de $CD25$ en linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días).....	75
Figura 38. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD80^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días) ..	76
Figura 39. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de $CD80$ en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días)	77
Figura 40. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD86^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días)...	78
Figura 41. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de $CD86$ en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días)..	79
Figura 42. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CMH-II^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días) ..	80
Figura 43. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de $CMH-II$ en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días)..	81
Figura 44. Microfotografías representativas de citoespines de células de leche obtenidas de cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de <i>S. aureus</i> (animal 1, cuarto AD) al día 3 pi (A) y con la cepa 5011 de <i>S. aureus</i> (animal 5, cuarto PI) al día 21 pi (B).....	82
Figura 45. Concentración de $IFN\gamma$ (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días).....	84
Figura 46. Concentración de $IL-17$ (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días).	85
Figura 47. Concentración de $IL-4$ (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días)..	86
Figura 48. Resumen de la respuesta in vitro de los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ frente a <i>S. aureus</i>	115
Figura 49. Resumen de la respuesta in vivo de los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ frente a <i>S. aureus</i>	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas en este estudio.	28
Tabla 2. Anticuerpos y condiciones utilizados en los ensayos de cultivo celular.	32
Tabla 3. Anticuerpos monoclonales utilizados para evaluar la frecuencia de poblaciones de células inmunes mediante CF.....	42
Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para evaluar marcadores de activación y de presentación antigénica en linfocitos Tyδ sistémicos.....	44
Tabla 5: Aislamientos microbiológicos de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (NP) de <i>S. aureus</i> a diferentes tiempos post inoculación.	Error!
Bookmark not defined.	

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue caracterizar a la población de linfocitos T $\gamma\delta$ luego de la interacción *in vitro* de células mononucleares con dos cepas de *Staphylococcus aureus* diferenciadas genotípica y fenotípicamente, aisladas de infecciones intramamarias (IIM) persistentes (P) y no persistentes (NP); y examinar su rol *in vivo* en un modelo de IIM experimental.

Los estudios *in vitro* demostraron que los linfocitos T $\gamma\delta$ se activan tras el contacto con *S. aureus*, particularmente frente a la cepa 806 (NP), y que esta activación se potencia en presencia de otras poblaciones celulares. Asimismo, los linfocitos T $\gamma\delta$ contribuyen a la producción de IFN- γ e IL-17, mientras que TLR-2 no estaría involucrado en su activación. Además, los T $\gamma\delta$ modulan la activación de monocitos-macrófagos y la expresión de moléculas asociadas a la presentación antigénica de manera dependiente de la cepa.

En el modelo *in vivo*, la cepa 806 (NP) indujo una respuesta inflamatoria temprana y eficaz, asociada a cambios en la frecuencia y el estado de activación de los linfocitos T $\gamma\delta$, aumento de esta población en la leche y niveles elevados de IFN- γ e IL-17. En contraste, la cepa 5011 (P) mostró mayor capacidad para evadir estos mecanismos inmunes, favoreciendo el establecimiento de una infección persistente.

Estos resultados demuestran que los linfocitos T $\gamma\delta$ participan en la respuesta inmune frente a *S. aureus*, y que las características genotípicas y fenotípicas de las cepas influyen en su comportamiento funcional, aportando información relevante para el diseño de estrategias de control de la mastitis bovina.

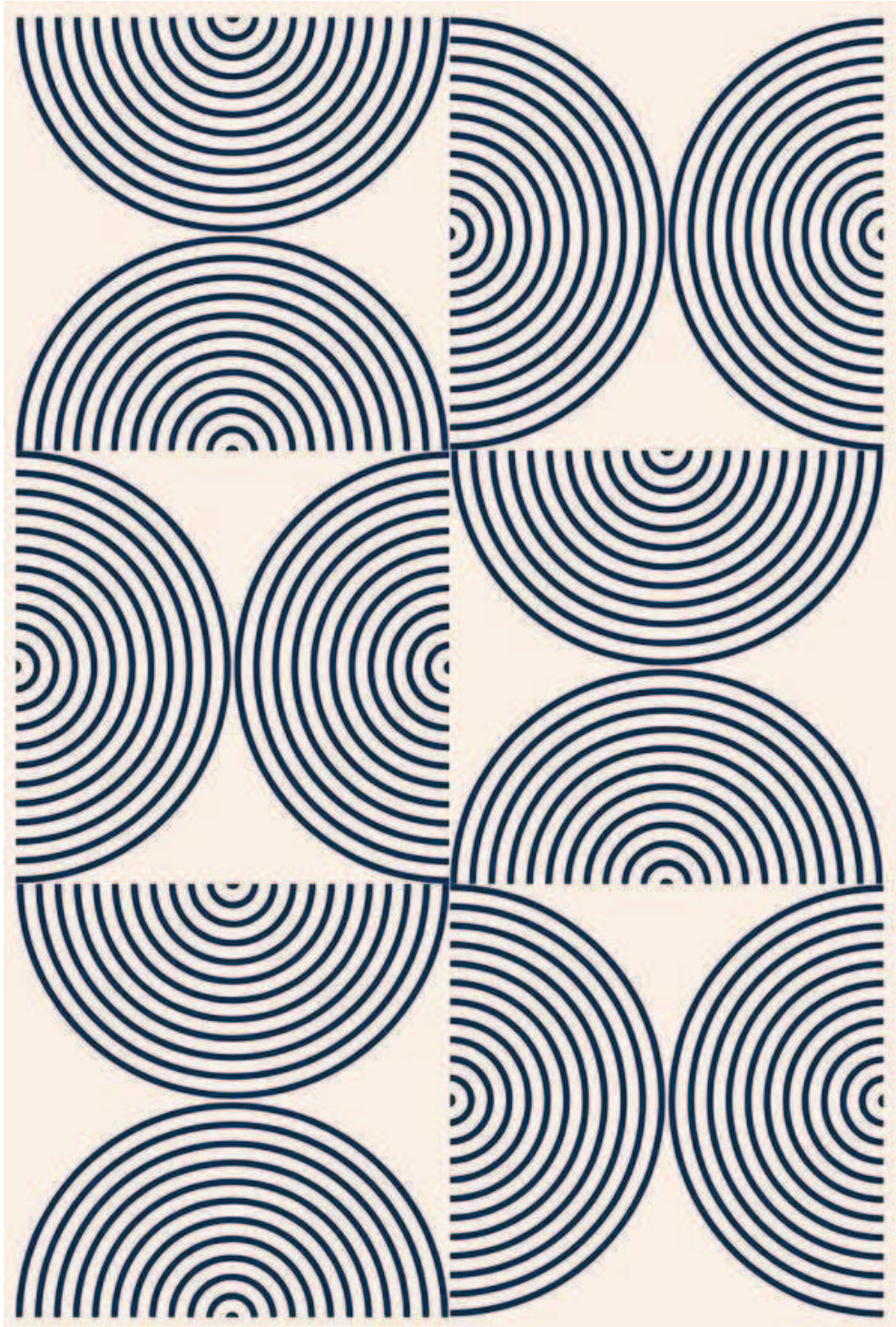
ABSTRACT

The aim of this thesis was to characterize the $\gamma\delta$ T lymphocyte population following the *in vitro* interaction of mononuclear cells with two *Staphylococcus aureus* strains differing in their genotypic and phenotypic characteristics and isolated from persistent (P) and non-persistent (NP) intramammary infections (IMI), and to examine their role *in vivo* in an experimental IMI model.

In vitro studies demonstrated that $\gamma\delta$ T lymphocytes become activated upon contact with *S. aureus*, particularly in response to strain 806 (NP), and that this activation is enhanced in the presence of other immune cell populations. Moreover, $\gamma\delta$ T lymphocytes contribute to IFN- γ and IL-17 production, whereas TLR-2 does not appear to be the main receptor involved in their activation. In addition, $\gamma\delta$ T cells modulate monocyte–macrophage activation and the expression of antigen presentation–associated molecules in a strain-dependent manner.

In the *in vivo* model, strain 806 (NP) induced an early and effective inflammatory response, which was associated with changes in the frequency and activation status of $\gamma\delta$ T lymphocytes, an increase in this population in milk, and elevated local levels of IFN- γ and IL-17. In contrast, strain 5011 (P) exhibited a greater capacity to evade these immune mechanisms, thereby promoting the establishment of a persistent infection.

Taken together, these results demonstrate that $\gamma\delta$ T lymphocytes participate in the immune response to *S. aureus*, and that the genotypic and phenotypic characteristics of the strains influence their functional behavior, providing relevant information for the design of strategies to control bovine mastitis.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mastitis Bovina

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria (GM), la cual puede originarse por factores infecciosos, mecánicos o tóxicos. La mayoría de los casos corresponde a infecciones intramamarias (IIM) causadas por bacterias patógenas que ingresan, se multiplican en el tejido mamario y liberan toxinas capaces de dañar el parénquima secretor. Estas toxinas, a su vez, desencadenan la respuesta inflamatoria del hospedador, cuyo objetivo es eliminar los microorganismos, neutralizar sus productos y reparar el tejido dañado (Zhao y Lacasse, 2008).

En función de la duración del proceso inflamatorio, la mastitis se clasifica como hiperaguda, aguda o crónica y en función de la severidad del proceso inflamatorio, como clínica (con signos de inflamación evidentes en la GM y alteraciones visibles en la leche) o subclínica (sin signos de inflamación en la GM ni alteraciones visibles en leche) (Figura 1). La forma subclínica, caracterizada por un aumento persistente en el recuento de células somáticas (RCS) y por reducciones sostenidas en la producción de leche, representa la principal causa de pérdidas económicas, debido a su curso prolongado y a que con frecuencia pasa inadvertida (Tommasoni *et al.*, 2023; Rasmussen *et al.*, 2024).

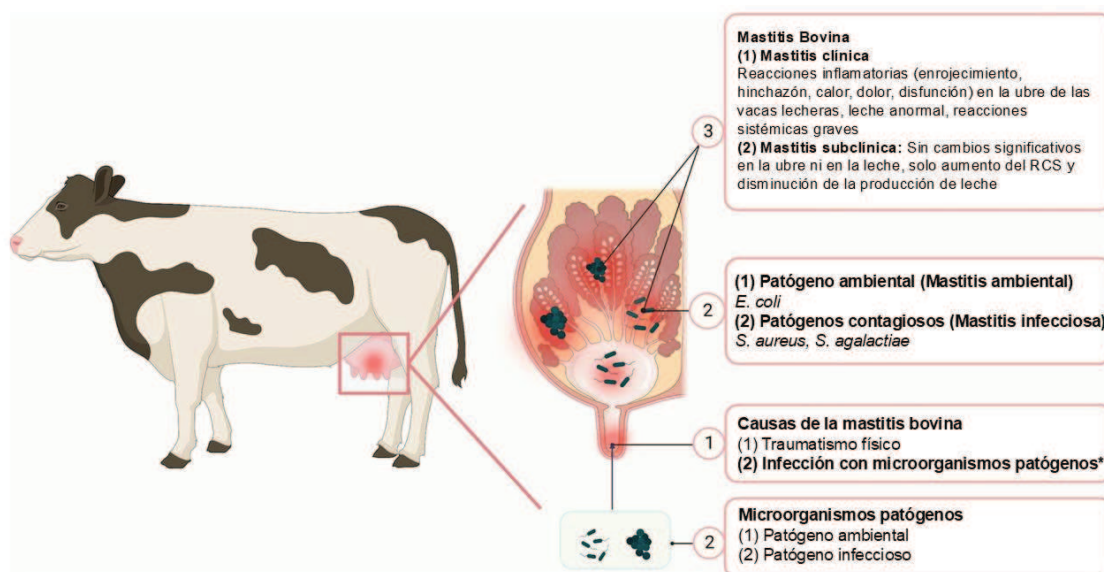


Figura 1. Mastitis bovina: causas, vías de infección y presentación clínica. Se ilustran (1) las principales causas de la mastitis bovina, incluyendo el traumatismo físico y la infección por microorganismos patógenos, así como la vía de entrada de estos agentes a través del canal del pezón. Se muestra (2) la colonización del parénquima alveolar por patógenos ambientales (por ejemplo, *Escherichia coli*) y patógenos infecciosos o contagiosos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*). Finalmente, se representan (3) las dos formas de presentación de la enfermedad: mastitis clínica, caracterizada por signos inflamatorios visibles (enrojecimiento, edema, hinchazón, dolor), alteraciones en la leche y posibles reacciones sistémicas, y mastitis subclínica, definida por la ausencia de signos visibles, el aumento del RCS y la disminución de la producción láctea. Adaptado de Li *et al.* (2023).

En función de los microorganismos capaces de causar IIM, se han identificado más de 140 especies. No obstante, cerca del 95% de los casos se atribuyen a bacterias patógenas que ingresan a la GM a través del canal del pezón (Zigo *et al.*, 2022). Las bacterias causantes de mastitis más prevalentes se pueden dividir en dos categorías:

- **Contagiosas o infecciosas:** sobreviven y se multiplican en la GM, facilitando la transmisión entre cuartos infectados y entre vacas, especialmente durante el ordeño. Los principales agentes son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y especies de *Mycoplasma* (Cobirka *et al.*, 2020).
- **Ambientales:** se encuentran en el entorno (camas, pisos, estiércol) y contaminan la GM bajo condiciones adversas. Entre los más relevantes se incluyen *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* y estafilococos no *aureus* (NAS) (Woudstra *et al.*, 2023) (Figura 1).

En las últimas décadas se ha logrado un progreso significativo en el control de la mastitis en Argentina, principalmente gracias a la implementación de protocolos de buenas prácticas de manejo en los tambos. Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad continúa siendo elevada (Dieser *et al.*, 2014; Calvino *et al.*, 2024). Considerando que la demanda mundial de leche sigue en aumento, las vacas lecheras mantienen un rol central en la nutrición humana y en la economía agrícola, lo que hace del control efectivo de la mastitis un factor clave para la sustentabilidad del sector lácteo (Smith *et al.*, 2022).

1.2 Impacto económico y prevalencia de la enfermedad

La mastitis bovina es una de las enfermedades más prevalentes y de mayor impacto económico en la industria láctea a nivel mundial. Esta patología genera pérdidas sustanciales asociadas a la disminución de la producción y de la calidad de la leche, el descarte de leche no apta para consumo, el aumento de los costos veterinarios y el sacrificio prematuro de los animales afectados (Ruegg, 2017).

Se estima que la reducción de la producción láctea representa alrededor del 70% del costo total de la enfermedad. La respuesta inflamatoria altera la estructura y función de los alvéolos y de las células secretoras de leche, ocasionando daños temporales o permanentes que reducen su capacidad productora (Zhao y Lacasse, 2008). Por otro lado, la barrera sangre-leche, integrada por el epitelio alveolar y sus uniones estrechas, el endotelio y la membrana basal, es fundamental para mantener los gradientes necesarios para la síntesis y retención de los componentes lácteos. Durante la inflamación, la disrupción de esta barrera favorece la fuga de la leche hacia la circulación sanguínea y compromete la función secretora, lo que se traduce en una disminución del volumen y en alteraciones de la calidad de la leche (Wellnitz y Bruckmaier, 2021).

Según diversos estudios, el costo medio de la mastitis oscila entre € 22 y 31 por vaca/año, mientras que el costo medio de su prevención varía entre € 3,56 y 24 por vaca/año (Halasa *et al.*, 2007; Soest *et al.*, 2016). En tambos lecheros de Argentina, el costo total de la mastitis, incluyendo las pérdidas económicas y los gastos en medidas de control y prevención, se estimó en $\geq$ \$US 1,00 por vaca en ordeño/día (Vissio *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que las pérdidas económicas dependen del patógeno involucrado. En particular, la mastitis causada por *S. aureus* detectada antes del pico de lactancia provoca una reducción del 7,1% en la producción lechera durante los 305 días de lactancia (equivalente a 2,3 kg/día). En cambio, cuando la IIM por *S. aureus* se diagnostica entre los días 54 y 120 de lactancia, la pérdida se reduce al 4,3% (1,4 kg/día), siendo este valor similar tanto en los casos de mastitis clínica como en los de mastitis subclínica (Heikkilä *et al.*, 2018).

En Argentina, a pesar del avance en el control de mastitis en los últimos 20 años, la prevalencia de la enfermedad sigue siendo elevada. En un estudio que incluyó muestras de 20.117 vacas en lactancia, pertenecientes a 112 tambos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, mostró que los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* con el 57%, *S. agalactiae* con el 29%; mientras que los miembros del grupo de *Streptococcus no-agalactiae* fueron hallados en el 12% de los animales. *Staphylococcus aureus* fue aislado casi en la totalidad de los rodeos analizados ($> 97\%$) (Signorini *et al.*, 2008). En otro estudio realizado sobre 2.296 vacas pertenecientes a 51 rodeos lecheros de la Provincia de Córdoba, el 54% de los animales presentó mastitis subclínica evidenciada por RCS $> 200.000/\text{ml}$. En estas muestras, los organismos patógenos más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) (52,1%), seguidos por *S. aureus* (21,3%), *Corynebacterium spp.* (5,2%), *S. agalactiae* (4,4%) y *S. dysgalactiae* (4,4%) (Dieser *et al.*, 2014). Si bien el número de estudios de prevalencia y distribución de patógenos aislados de mastitis ha disminuido en la última década en nuestro país, un informe más reciente realizado sobre un total de 2.294 muestras de mastitis clínicas y subclínicas provenientes de tambos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Buenos Aires durante los años 2018-2020, reportó desarrollo bacteriano en el 48% de las muestras. Los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron: SCN 11%, *S. aureus* 9%, *Streptococcus* ambientales (*S. uberis* y *S. dysgalactiae*) 10,6%, *S. agalactiae* 2,14% y *E. coli* 5%. Por otro lado, entre los patógenos menos frecuentes, se identificaron: levaduras 2%, *Trueperella pyogenes* 0,26%, *Prototheca spp.* 0,22% y *Nocardia* 0,04% (Neder *et al.*, 2021).

1.3 Mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*

Entre los patógenos causantes de mastitis bovina, *Staphylococcus aureus* se destaca por su capacidad de causar tanto cuadros subclínicos como clínicos, caracterizados por recurrencias y baja tasa de curación frente a los tratamientos antimicrobianos convencionales. Numerosos

estudios epidemiológicos han demostrado que *S. aureus* es con frecuencia el principal agente aislado en casos de mastitis subclínicas y clínicas en vacas lecheras, aunque su prevalencia varía según la región y el sistema de producción (Fesseha *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Las GM infectadas y la colonización extramamaria en animales lecheros son los principales reservorios de *S. aureus*, por lo cual, la transmisión de este patógeno entre vacas ocurre principalmente durante el ordeño (Zecconi *et al.*, 2006; Ster *et al.*, 2013). La ruta más común de invasión es a través del orificio y el canal del pezón, colonizando y/o aprovechando lesiones del mismo para posteriormente ingresar a la GM. La diseminación de la infección puede ocurrir a través de las manos contaminadas del ordeñador, el uso compartido de toallas para el lavado y secado de las GM, el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas durante los ordeños mecánicos y los insectos. Durante el ordeño, las fluctuaciones irregulares de vacío pueden forzar la entrada de las bacterias a través del canal del pezón, favoreciendo el establecimiento de nuevas IIM (Rainard *et al.*, 2018). Si bien *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, y que se manifiesta por elevados RCS en la leche, principalmente neutrófilos, y persistencia de las bacterias en la GM (Bardiau *et al.*, 2016; Rainard *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado, catalasa positivo y oxidasa negativo. Aunque tradicionalmente se lo ha considerado una bacteria extracelular, se ha demostrado que puede comportarse como un patógeno intracelular facultativo, dado que posee la habilidad de invadir y sobrevivir dentro de diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales mamarias (CEM), neutrófilos y macrófagos (Almeida *et al.*, 1996; Pereyra *et al.*, 2016; Rollin *et al.*, 2017; Sacco *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). Esta forma de vida intracelular puede favorecer la persistencia de *S. aureus* en la GM, al protegerlo de los tratamientos antimicrobianos y de las defensas inmunes del hospedador (Sendi y Proctor, 2009). Estas particulares características patogénicas determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas de control tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario (Andreotti *et al.*, 2017).

En estudios previos sobre IIM persistentes causadas por *S. aureus* se ha observado que las cepas que causan infecciones persistentes difieren de las que causan infecciones transitorias (Schukken *et al.*, 2011; Pereyra *et al.*, 2016, 2017) y es más probable que se transmitan y prevalezcan a través del rodeo debido a la ausencia de signos clínicos (Sakwinska *et al.*, 2011; Whelehan *et al.*, 2011). En este sentido, Sacco *et al.* (2020) demostraron que la capacidad de *S. aureus* de internalizarse, persistir e inducir apoptosis en CEM bovinas se asoció con las

características genéticas de las cepas y con la capacidad de las mismas de adaptarse al microambiente de la GM bovina. Dado que diferentes cepas de *S. aureus* utilizan estrategias de infección y supervivencia únicas, la respuesta inmune del hospedador también varía de acuerdo con la cepa infectante (Kim *et al.*, 2011; Pereyra *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2019).

1.4 Principales FV de *Staphylococcus aureus*

La capacidad de *S. aureus* de producir IIM se debe a sus múltiples factores de virulencia (FV), algunos de los cuales estarían relacionados con la severidad de la IIM que desarrollan en el hospedador (Bardiau *et al.*, 2014, 2016; Côté-Gravel y Malouin, 2019) (Figura 2). En las etapas tempranas de la infección, los FV que expresa *S. aureus* favorecen la adherencia e invasión a las células hospedadoras contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune y a la persistencia en el tejido. *Staphylococcus aureus* puede activar o suprimir la expresión de diferentes FV dependiendo de las circunstancias, dando como resultado diferentes fenotipos de la misma cepa bacteriana. De hecho, el cambio de fenotipo por alteraciones en la expresión de los FV es parte del proceso infeccioso que le permite a las bacterias ocultarse en las células hospedadoras (Tuchscher *et al.*, 2010). Entre los principales FV que utiliza *S. aureus* se pueden mencionar:

1.4.1 Polisacáridos capsulares

Los polisacáridos capsulares (PC) son moléculas de azúcares complejos que recubren la superficie de muchas bacterias (Figura 2). *Staphylococcus aureus* produce PC tanto *in vivo* como *in vitro* bajo condiciones definidas de cultivo (Salimena *et al.*, 2016). La encapsulación le permite la evasión del sistema inmune del hospedador, a través del enmascaramiento de las proteínas de superficie que contienen los antígenos típicos capaces de desencadenar una respuesta inmune protectora (Nanra *et al.*, 2013; Kuipers *et al.*, 2016). De este modo, los PC dificultan la eliminación de la bacteria e incrementan su habilidad para diseminarse y sobrevivir en el torrente sanguíneo y tejidos (O’Riordan y Lee, 2004). Los serotipos de polisacáridos capsulares 5 y 8 (PC5 y PC8) son los de mayor prevalencia en bovinos, estando asociados al 70-80% de los aislamientos (O’Riordan y Lee, 2004; Camussone *et al.*, 2012; Salimena *et al.*, 2016).

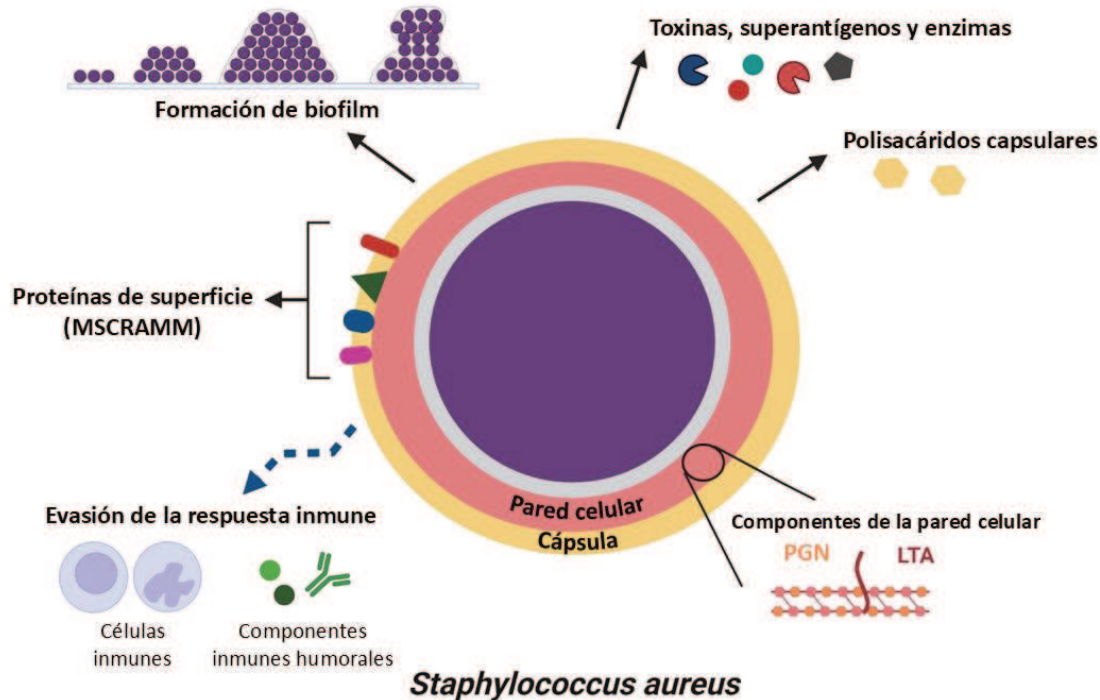


Figura 2. Principales factores de virulencia de *S. aureus*. Esquema representativo de los mecanismos que facilitan la colonización, persistencia y evasión inmune de *S. aureus*. La cápsula, compuesta por los polisacáridos capsulares (PC), protege a la bacteria frente a la fagocitosis y la acción de anticuerpos y antibióticos. La pared celular, que contiene peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA), es esencial para la integridad estructural y la interacción con el huésped. Las proteínas de superficie MSCRAMM facilitan la adhesión a tejidos y células del huésped. La bacteria produce toxinas, superantígenos y enzimas, contribuyendo al daño tisular y a la manipulación de la respuesta inmune. *Staphylococcus aureus* puede formar biofilm, lo que incrementa su persistencia y la resistencia frente a antibióticos. Finalmente, la bacteria evade la respuesta inmune tanto celular como humoral, interfiriendo con células inmunes (neutrófilos y macrófagos) y componentes humorales (anticuerpos y proteínas del complemento). Adaptado de Campos et al. (2022).

1.4.2 Adhesinas

Staphylococcus aureus utiliza proteínas de adhesión denominadas componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz adhesiva (MSCRAMM, del inglés *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) para adherirse a los tejidos del hospedador y establecer la infección (Goldmann y Medina, 2018). Estas proteínas permiten la unión específica a distintos componentes de la matriz extracelular, desempeñando un rol clave en las etapas iniciales de la colonización bacteriana. Asimismo, contribuyen a la persistencia del patógeno en el hospedador al facilitar la evasión de la respuesta inmune, lo que favorece el establecimiento de infecciones crónicas en la GM bovina (Goldmann y Medina, 2018). Entre ellas, las proteínas de unión al fibrinógeno (*fib*) y los factores de agregación o *clumping factors* (*clfA*, *clfB*), promueven la adherencia y la agregación bacteriana, mientras que las

proteínas de unión a la fibronectina (FnBP) facilitan la unión a la fibronectina, al fibrinógeno y a la elastina, favoreciendo la internalización de *S. aureus* en células epiteliales y endoteliales que normalmente no son fagocíticas. La adhesión a la fibronectina constituye un paso crítico en el establecimiento de la patogénesis de la mastitis bovina (Kot *et al.*, 2016). Por su parte, la proteína de unión al colágeno (*Cna*) media la interacción con el colágeno. En conjunto, estas interacciones no sólo incrementan la adherencia bacteriana, sino que también contribuyen al desarrollo de la infección por *S. aureus*, promoviendo la invasión a capas de tejido más profundas y, en última instancia, dificultando el tratamiento con antibióticos debido a la capacidad de las bacterias de evadir el sistema inmune y establecer reservorios intracelulares (Claes *et al.*, 2018; Speziale y Pietrocola, 2020).

1.4.3 Biofilm

Se denomina *biofilm* a una comunidad estructurada de microorganismos adheridos a una superficie y embebidos en una matriz extracelular autoproducida, compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Este modo de crecimiento produce alteraciones en la expresión génica y la producción de proteínas con respecto a las bacterias en estado planctónico. En el *biofilm*, las bacterias expresan proteínas específicas que les permiten mantenerse en comunidad, resistir condiciones de estrés y comunicarse entre sí (Parsek y Singh, 2003; Archer *et al.*, 2011; Kiedrowski y Horswill, 2011). Se ha documentado que la formación de *biofilm* es un importante FV de *S. aureus* que facilita la adherencia y colonización al epitelio de la GM y constituye un mecanismo clave de evasión de las defensas inmunes del hospedador y de los tratamientos antimicrobianos, contribuyendo al establecimiento de IIM persistentes en los bovinos (Pedersen *et al.*, 2021; Fidelis *et al.*, 2024). Numerosos genes de *S. aureus* han sido asociados con la capacidad de formación de *biofilm*, entre los cuales se destacan:

- Genes *ica* (*intercellular cluster adhesin*, en español, cluster de adhesión intercelular): operón compuesto por los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* y el gen represor *icaR*, que regulan la síntesis de polisacáridos intercelulares, componentes clave de la matriz del *biofilm* (O’Gara, 2007).

- Gen *bap*: codifica para la proteína de superficie bacteriana *bap* (*biofilm associated protein* o proteína asociada a *biofilm*). Esta proteína constituye un factor de adhesión de gran tamaño involucrado en la formación de *biofilm*, ya que facilita la adhesión de la bacteria tanto a superficies abióticas como a otras bacterias, y contribuyendo así a la cohesión estructural del *biofilm*. Se ha demostrado que *bap* participa en la colonización inicial del tejido mamario (Úbeda *et al.*, 2003; Cucarella *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2012). En este contexto, promueve la formación de agregados bacterianos capaces de permanecer adheridos a las CEM y de evadir la respuesta

inmune mediante el enmascaramiento de antígenos de superficie, lo que favorece la persistencia de *S. aureus* a largo plazo (Del Pozo *et al.*, 2007).

- Sistema *agr* (*accessory gene regulator* o gen regulador accesorio): constituye un sistema de regulación global en *S. aureus* que controla la expresión de múltiples genes de virulencia, incluidos aquellos que codifican toxinas, enzimas y factores de adhesión (Rossi *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023; Inagaki *et al.*, 2024). Este sistema es polimórfico y permite clasificar las cepas de *S. aureus* en cuatro grupos (AgrI, AgrII, AgrIII, y AgrIV) según las secuencias específicas de su autoinductor peptídico (AIP, molécula señal que las bacterias liberan para comunicarse), y de su receptor sensor AgrC (proteína que detecta este AIP de manera específica) (Mayville *et al.*, 1999; Shopsin *et al.*, 2003; Buzzola *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Pereyra *et al.* (2016) caracterizó cepas de *S. aureus* con diferentes patrones clonales y origen clínico, aisladas de IIM subclínicas persistentes y de IIM clínicas no persistentes. Dicho estudio demostró que la capacidad de producir *biofilm in vitro* y la ocurrencia de genes que codifican para proteínas de superficie (*clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *cna*) y formación de *biofilm* (*icaA*, *icaD*, *icaC*, *bap*) no se correlacionaron con el origen clínico de las cepas. Además, la capacidad de internalización de *S. aureus* en CEM varió con cada cepa de *S. aureus* en particular y las bacterias que lograron internalizarse sobre expresaron genes relacionados con la formación de *biofilm* en comparación con las que permanecieron en el sobrenadante del co-cultivo; particularmente genes que codifican para *icaD*.

1.4.4 Genes de resistencia a los antibióticos

Staphylococcus aureus es capaz de sobrevivir a la acción de los agentes antimicrobianos debido a la portación de múltiples genes de resistencia (Peacock y Paterson, 2015). La resistencia a la penicilina desarrollada por los estafilococos está mediada por dos mecanismos:

- por la secreción de una enzima β -lactamasa que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina, inactivando el antibiótico. Esta enzima está codificada por el gen *blaZ*, que puede localizarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Olsen *et al.* 2006; Öztürk *et al.* 2015).

- por la producción de una proteína de unión a penicilina modificada (PBP2A), proteína que sustituye a las PBP normales y tiene baja afinidad por las penicilinas y otros β -lactámicos. Está codificada por el gen *mecA*, incrustado en un elemento genético móvil en el cromosoma bacteriano llamado *Staphylococcus Chromosome Cassette mec* o SCCmec (Gong *et al.*, 2019).

1.4.5 Toxinas

Las toxinas producidas por *S. aureus* actúan de manera sinérgica para potenciar su capacidad de infectar y causar daño al hospedador. Estas toxinas se dirigen a diversos componentes del sistema inmune y a estructuras celulares del hospedador, lo que permite a la bacteria establecer, mantener y propagar la infección (Tam y Torres, 2019). Además, promueven la invasión tisular mediante la disrupción de la adhesión célula-célula en la piel o por la inducción de la lisis celular, lo que abre vías para la penetración bacteriana en tejidos más profundos y favorece la descomposición de las barreras tisulares (Grumann *et al.* 2014). Asimismo, facilitan la evasión del sistema inmune, debido a que diversas toxinas pueden alterar las membranas celulares de diferentes células inmunes, tales como neutrófilos y macrófagos, causando su eliminación (Tam y Torres, 2019). Este mecanismo debilita la respuesta inmune del hospedador y contribuye a la persistencia de la bacteria.

La complejidad, diversidad y redundancia de los FV que posee *S. aureus* hacen necesario un enfoque multifactorial e integrado para el control y prevención de la mastitis bovina, que contemple tanto las estrategias de prevención y manejo en el tambo como el desarrollo de herramientas terapéuticas más eficaces.

1.5 Mecanismos de defensa de la GM bovina

El sistema inmune de la GM es diferente al de las demás mucosas. La GM cumple cuatro funciones principales: nutrición de la descendencia, transferencia de inmunidad pasiva mediante la secreción de inmunoglobulinas, reclutamiento de células inmunes y protección frente a patógenos. Sin comprometer la supervivencia de la progenie, la GM ha evolucionado para defenderse de las infecciones. Durante la lactancia, las GMs exudan un fluido nutritivo (leche) que se acumula en las cisternas, los conductos colectores y los alvéolos secretores antes de ser liberado durante la lactancia o el ordeño (Figura 3). Cuando se produce la colonización por microorganismos patógenos, preservar la función secretora constituye un problema fundamental, ya que la leche, por su alto contenido nutritivo, favorece el rápido crecimiento microbiano (Rainard *et al.* 2022).

La resistencia del hospedador frente a *S. aureus* depende de la estrecha coordinación entre los mecanismos de defensa innatos y adaptativos, los cuales deben interactuar de manera altamente integrada y sincronizada para proporcionar una defensa eficaz frente a los patógenos causantes de mastitis (Saleem *et al.*, 2024). A nivel local, en la GM bovina, los mecanismos de defensa incluyen una variedad de factores anatómicos, celulares y moleculares que participan tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa. Ambos sistemas interactúan de manera

complementaria en un intento de proporcionar protección frente a los microorganismos causantes de mastitis, como *S. aureus* (Sordillo, 2018).

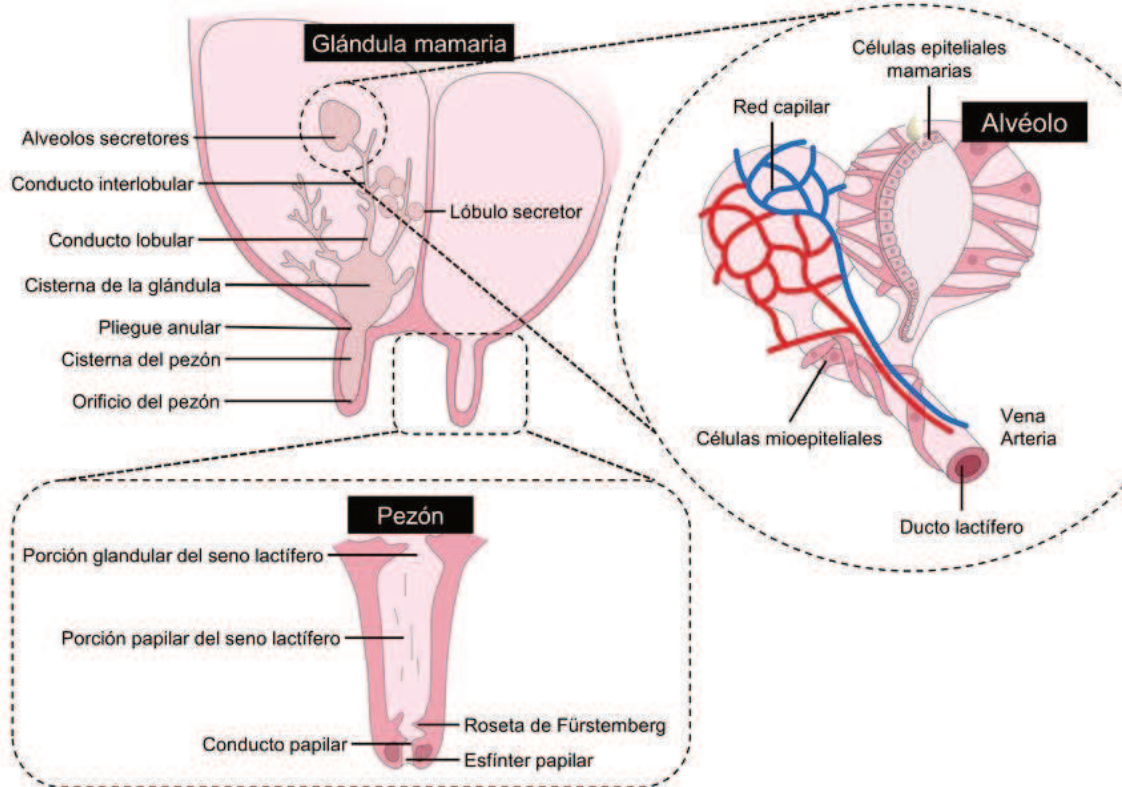


Figura 3. Representación esquemática de la GM bovina. A la izquierda se ilustran la estructura interna del pezón y la organización general de la glándula, incluyendo los conductos y los lóbulos secretores. A la derecha se detalla la morfología de un alvéolo mamario, donde se observan los vasos sanguíneos, las CEM y las células mioepiteliales. Tomado de Mota-Rojas et al. (2024).

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones microbianas. Una característica fundamental de este sistema es su activación rápida y dirigida hacia patrones moleculares asociados a patógenos de los microorganismos (PAMPs), los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), desencadenando así la respuesta inflamatoria. Las CEM y los leucocitos residentes actúan como células centinelas y liberan quimiocinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) desde la sangre hacia la GM, lo que se refleja en el incremento del RCS en la leche (Pyörälä, 2003; Aitken *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012). La leche, además, contiene numerosos componentes asociados a la inmunidad innata, como CEM, leucocitos, componentes del sistema complemento, citoquinas y quimiocinas, así como proteínas con actividad antimicrobiana y de secuestro de hierro (transferrina, lactoferrina, lisozima). Todos estos componentes contribuyen a atraer y potenciar la acción de las células efectoras y a eliminar los patógenos mediante una red celular y molecular altamente coordinada (Paape *et al.*, 2003; Ballou, 2012). En conjunto, la respuesta innata determina el establecimiento, la progresión y la gravedad de la infección, además de

condicionar la respuesta inmune adaptativa que se induce posteriormente (Aitken *et al.* 2011; Sordillo y Nickerson, 2017).

La respuesta inmune adaptativa, que se desarrolla días después de la infección, aporta especificidad y memoria inmunológica a través de la activación clonal de linfocitos B y T, y la producción de anticuerpos capaces de opsonizar y neutralizar al patógeno. En conjunto, la interacción entre ambas ramas del sistema inmune determina la resolución de la infección o, en caso de evasión por parte del patógeno, la cronicidad del proceso infeccioso y la recurrencia de la mastitis.

1.5.1 Respuesta inmune innata

Como se mencionó anteriormente, las defensas innatas contra los patógenos causantes de mastitis comprenden barreras anatómicas provistas por el canal del pezón, barreras celulares como los leucocitos de la leche y tejidos con sus receptores celulares y barreras solubles compuestas por una variedad de factores moleculares no celulares (Sordillo, 2018) (Figura 4).

El **canal del pezón** constituye la primera línea de defensa frente a los patógenos causantes de mastitis, ya que es la vía por la cual ingresan a la GM. Entre ordeños y durante el período seco, este canal se sella mediante un tapón de queratina derivado del revestimiento epitelial estratificado del canal. Esta barrera anatómica dificulta la penetración bacteriana y protege el compartimento intramamario (Rainard, 2005). La integridad del canal del pezón es esencial, ya que no solo delimita el ambiente intramamario, sino que también actúa como una barrera inmunológicamente activa: al detectar cambios en el ambiente luminal, el epitelio se comunica con células inmunitarias residentes y reclutadas, coordinando el reclutamiento y la activación de células y moléculas efectoras para hacer frente a las amenazas microbianas (Rainard *et al.*, 2022).

Si las bacterias son capaces de atravesar el esfínter del pezón y penetrar en el canal del mismo, la segunda línea de defensa consiste en las células del sistema inmune innato, como las CEM, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales o *natural killer* (NK) (Rainard, 2005).

Las **CEM**, se encuentran revistiendo el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos, y constituyen las primeras células que reconocen a los patógenos que ingresan a la GM (Rainard *et al.*, 2022). Estas células no sólo desempeñan una función física de barrera, gracias a la cohesión celular mediada por uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas, sino que también ejercen una función inmunológica activa. Esto es debido a que expresan RRP (principalmente *toll-like receptors*, TLR) y, frente a la estimulación bacteriana, secretan citocinas y quimioquinas que reclutan y activan leucocitos desde la sangre,

participando así en las primeras etapas de la IIM (Nguyen y Neville, 1998; Schukken *et al.*, 2011; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Dado que el microambiente de la GM lactante se renueva continuamente en grandes volúmenes, lo que favorece tanto la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos como la dilución y eliminación de agentes antimicrobianos, la integridad estructural y funcional del epitelio resulta decisiva para la defensa local (Rainard *et al.*, 2022).

Ante una infección, los **neutrófilos** abandonan rápidamente el torrente sanguíneo y migran hacia el foco infeccioso, donde pasan de representar el 5–25 % de las células somáticas a constituir hasta el 90 % durante la mastitis (Bradley y Green, 2005; De Jong *et al.*, 2019). Son el tipo celular predominante tanto en mastitis agudas (Leitner *et al.*, 2000) como en crónicas (Gonçalves 2017) y desempeñan un papel central en las defensas de la GM. Su movilización temprana es crucial para limitar la proliferación bacteriana y prevenir el desarrollo de una mastitis aguda (Wei *et al.*, 2019). Una vez en el tejido, los neutrófilos eliminan los patógenos principalmente mediante la fagocitosis. Dentro del fagolisosoma, el microorganismo es expuesto a dos sistemas citotóxicos: uno dependiente de la producción de especies reactivas del oxígeno (como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, hipoclorito) y otro independiente de los agentes oxidantes, mediado por la acción de péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. La activación de los neutrófilos también induce la liberación de mediadores lipídicos de la inflamación, que aumentan la permeabilidad vascular, favorecen el reclutamiento de diversas poblaciones celulares y activan células presentes en el foco inflamatorio, potenciando así la respuesta microbicida (Bank y Ansorge, 2001; Akers y Nickerson, 2011). Tras desempeñar su función efectora, los neutrófilos entran en apoptosis y son fagocitados por macrófagos, un proceso esencial para resolver la inflamación y limitar el daño tisular. En conjunto, el rápido reclutamiento y la potente actividad microbicida de los neutrófilos constituyen un pilar fundamental de la defensa temprana de la GM frente a las IIM (Schukken *et al.*, 2011).

Los **macrófagos** constituyen la población celular predominante en la leche de vacas sanas (Sarıkaya *et al.*, 2006). En la GM, actúan como células fagocíticas activas, capaces de ingerir bacterias, restos celulares y componentes de la leche (Sordillo y Nickerson, 1988). Además de su función microbicida y su rol en la limpieza tisular, los macrófagos desempeñan un papel esencial como células presentadoras de antígeno (CPA), procesando y presentando péptidos antigénicos a los linfocitos T. De manera complementaria, secretan mediadores que promueven la migración y la activación de otras poblaciones celulares, función clave en el desarrollo de la respuesta inmune innata de la GM (Sordillo y Streicher, 2002; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Las **células dendríticas** (DCs) son las CPA profesionales por excelencia, ya que son las únicas capaces de activar a los linfocitos T vírgenes o *naïve*. Constituyen un nexo fundamental entre la inmunidad innata y la adaptativa y cumplen un rol clave en la detección temprana de

microorganismos, la producción de citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria y la orientación de la respuesta adaptativa hacia perfiles protectores específicos. Su capacidad para discriminar entre señales de peligro y estímulos tolerogénicos las posiciona como reguladoras clave del equilibrio entre la respuesta inmune efectiva y la homeostasis tisular (Kratochvilova *et al.*, 2023).

Las **células asesinas naturales** (NK, *natural killer*) constituyen un componente esencial de la inmunidad innata, ya que poseen la capacidad de reconocer y eliminar células infectadas o alteradas sin necesidad de sensibilización previa. Estudios recientes han demostrado su infiltración en el tejido mamario durante infecciones por *E. coli*, donde contribuyen a la defensa mediante mecanismos citotóxicos y la producción de citocinas proinflamatorias. Además, las NK bovinas exhiben actividad antimicrobiana directa frente a bacterias, lo que resalta su papel en el control temprano de patógenos intramamarios (Sipka *et al.*, 2016).

Cuando las defensas innatas responden en forma adecuada, los patógenos son eliminados en un corto período de tiempo y la respuesta inflamatoria se resuelve rápidamente (Sordillo y Nickerson, 2017).

1.5.2 Respuesta inmune adaptativa

La iniciación y la regulación de la respuesta inmune adaptativa son fundamentales para la resolución de la infección. Si la bacteria invasora de la GM sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada, luego de un corto período de tiempo, por linfocitos T y B. 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 (Sordillo y Nickerson, 2017). En la leche, los linfocitos forman parte de las células somáticas y se dividen en linfocitos T, mediadores de la respuesta inmune celular, y linfocitos B, mediadores de la respuesta inmunidad humoral (productores de anticuerpos).

Los **linfocitos B** se diferencian en plasmocitos que secretan inmunoglobulinas específicas contra diversos antígenos, incluidos antígenos de *S. aureus* que pueden estar presentes en la GM. Los principales isotipos relevantes en la leche son IgG₁, IgG₂ e IgA. La IgG₁ es el isotipo predominante en GM sanas y facilita la fagocitosis mediada por macrófagos, mientras que IgG₂ se asocia más a un perfil inflamatorio y actúa como opsonina favoreciendo la fagocitosis por neutrófilos. Por su parte, la IgA actúa en las mucosas e inhibe la adhesión y multiplicación bacteriana (Boerhout *et al.*, 2018). Además de opsonizar a los microorganismos y favorecer su eliminación por los fagocitos, los anticuerpos pueden neutralizar proteínas liberadas por los patógenos, entre ellas, las secretadas por *S. aureus* durante la IIM, contribuyendo así a limitar su capacidad de persistencia (Ortines *et al.*, 2018; Rouha *et al.*, 2018). Finalmente, y a diferencia de

lo que ocurre con los linfocitos T, la proporción de linfocitos B se mantiene relativamente constante independientemente del estado de infección o de la etapa de lactancia (Bradley y Green, 2005).

Dentro de los **linfocitos T**, las dos poblaciones principales son los linfocitos T helper o colaboradores (LT CD4⁺) y los linfocitos T citotóxicos (LT CD8⁺). En la GM sana predominan los linfocitos T CD8⁺ (Ezzat Alnakip *et al.*, 2014), a diferencia de lo que ocurre en sangre periférica, donde la población mayoritaria es la de linfocitos T CD4⁺ (Asai *et al.*, 1998). Sin embargo, durante la fase aguda de infecciones por *S. aureus* o *E. coli* se ha descrito un incremento local de LT CD4⁺ (Grönlund *et al.*, 2006; Schukken *et al.*, 2011). Asimismo, se ha observado que la población de LT CD8⁺ presentes en la leche bovina también aumenta frente a infecciones por *S. aureus* y que estos linfocitos activados suprimen la respuesta proliferativa de los LT CD4⁺ a los antígenos de *S. aureus* (Park *et al.*, 1993). En conjunto, el equilibrio entre ambas poblaciones parece depender tanto del estado fisiológico de la GM como de la naturaleza del microorganismo invasor (Sordillo y Streicher, 2002; Schukken *et al.*, 2011).

Los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en 5 subpoblaciones funcionales: Th1, Th2, Th17, T reguladores (Treg) y T foliculares (Tfh), cada una se caracteriza por un perfil de secreción de citoquinas distintivo que condiciona su incumbencia en la respuesta inmune antiinfecciosa (Zhao *et al.*, 2015). Se ha demostrado que las subpoblaciones Th1 y Th17 son relevantes frente a las infecciones causadas por *S. aureus* (Murphy *et al.*, 2014). Durante las fases tempranas de la infección, células del sistema inmune innato, como macrófagos y CEMs, producen citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12p70, IL-18 y TNF- α), que promueven la diferenciación de LT CD4⁺ hacia fenotipos Th1 y Th17. Si bien estas respuestas contribuyen al control del patógeno, su activación excesiva puede provocar un daño significativo en los tejidos del hospedador (Côté-Gravel y Malouin, 2019).

La interacción entre el sistema inmune del hospedador y los patógenos causantes de mastitis es compleja, ya que ambos han logrado co-evolucionar desarrollando mecanismos para reconocerse, responder y adaptarse mutuamente. Los patógenos microbianos han desarrollado diversas estrategias para alterar y evadir las defensas del hospedador con el fin de sobrevivir. A su vez, el sistema inmune del hospedador dispone de un amplio repertorio de mecanismos para detectar, controlar o eliminar la amenaza microbiana (Thompson-Crispi *et al.*, 2014). En este contexto, la interacción patógeno-hospedador en las infecciones causadas por *S. aureus* constituye un proceso sumamente dinámico (Grosz *et al.*, 2014; Löffler *et al.*, 2014). De modo tal que, si se tiene en cuenta este último concepto, las estrategias terapéuticas actuales dirigidas al control de este patógeno deberían ser replanteadas y contempladas de una manera más integral, sin centrarse exclusivamente en la bacteria, sino también en la interacción con el hospedador.

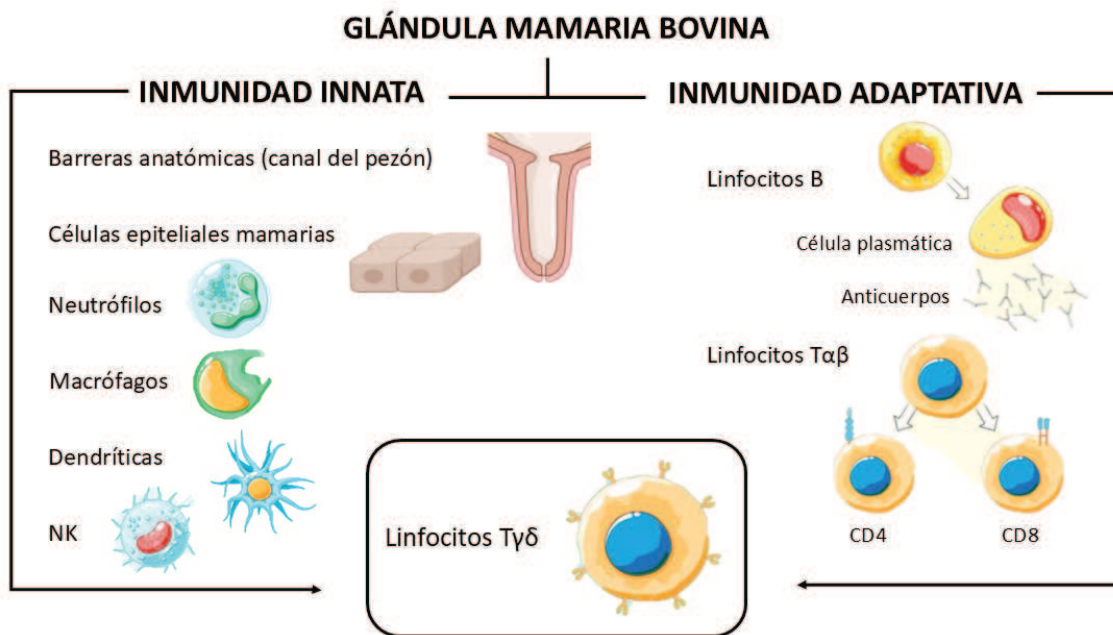


Figura 4. Esquema de los principales componentes de la respuesta inmune en la GM bovina. La inmunidad innata está conformada por las barreras anatómicas (canal del pezón), las CEM, neutrófilos, macrófagos, DCs y células NK. La inmunidad adaptativa incluye a los linfocitos B (y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos) y a los linfocitos T $\alpha\beta$ (CD4 y CD8). Los linfocitos T $\gamma\delta$, ubicados en la interfase entre ambos sistemas, participan en la regulación y modulación de la respuesta inmune que se induce en la GM.

1.6 Linfocitos T $\gamma\delta$: características y funciones principales

Los linfocitos T gamma delta (T $\gamma\delta$) constituyen un grupo de células T no convencionales innatas, cuyo receptor (TCR) está formado por las cadenas γ y δ y que se sitúan en la interfaz entre la inmunidad innata y adaptativa (Figura 4). A diferencia de los linfocitos T $\alpha\beta$ convencionales, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden activarse independientemente de los complejos formados por la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y el péptido. Se ha demostrado que esta población celular es capaz de reconocer y activarse frente a antígenos no peptídicos, aún en ausencia de una CPA, como así también directamente frente a PAMPs y a patrones moleculares asociados a daño (del inglés, DAMPs) (Guzman *et al.*, 2012; Dar *et al.*, 2014). Esto se debe a que los linfocitos T $\gamma\delta$ expresan moléculas accesorias y receptores que le permiten realizar sus funciones, entre ellos, los receptores tipo *Toll* (Dar *et al.*, 2014). El TCR de los linfocitos T $\gamma\delta$ presenta una diversidad más restringida en comparación con el TCR de los linfocitos T $\alpha\beta$, y esta característica sugiere una mayor afinidad por patrones moleculares compartidos por numerosos patógenos (de manera análoga al reconocimiento de patrones del sistema innato) en lugar de la alta especificidad típica de la inmunidad adaptativa. Gracias a esta capacidad de reconocer PAMPs o DAMPs, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden activarse con rapidez y actuar tempranamente frente a infecciones, mucho antes que los linfocitos T $\alpha\beta$ (Vantourout y

Hayday, 2013). Una vez activados, los linfocitos $T\gamma\delta$ producen grandes cantidades de citoquinas, como IFN- γ e IL-17, que resultan cruciales tanto para la activación de la inmunidad innata como para la modulación de la activación y diferenciación de los linfocitos $T\alpha\beta$ (Price y Hope, 2009). Además, se ha demostrado que poseen la capacidad de actuar como CPA, contribuyendo a la activación de los linfocitos $T\alpha\beta$ y reforzando de este modo la respuesta inmune adaptativa (Toka *et al.*, 2011; McGill *et al.*, 2014). En conjunto, estas propiedades posicionan a los linfocitos $T\gamma\delta$ como un nexo clave entre ambas ramas del sistema inmune, desempeñando un papel fundamental en la detección temprana de infecciones y en la orquestación de respuestas inmunes eficaces (Dar *et al.*, 2014).

La frecuencia de linfocitos $T\gamma\delta$ en circulación en humanos y en ratones es baja, generalmente representan entre el 5-10% de la población de linfocitos de sangre periférica. Por el contrario, los linfocitos $T\gamma\delta$ son significativamente más abundantes en los rumiantes, donde pueden llegar a constituir más del 70% de los linfocitos circulantes de sangre periférica en animales jóvenes (McGill *et al.*, 2014). Aunque se ha demostrado que la proporción de células $T\gamma\delta$ disminuye con la edad en el ganado (Rogers *et al.*, 2005), aún pueden comprender hasta el 30% de las células mononucleares (CMN) sanguíneas en animales adultos, lo que es comparable a la proporción de linfocitos $T\text{ CD8}^+$ y células $T\text{ CD4}^+$. En consecuencia, es esperable que los linfocitos $T\gamma\delta$ desempeñen un papel relevante en las respuestas inmunitarias protectoras frente a diversos patógenos, contribuyendo a su control e incluso a su eliminación (Baldwin *et al.*, 2020).

En bovinos, se han identificado subpoblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ en base a la expresión o no de la molécula WC1 (del inglés, *workshop cluster 1*), una glicoproteína de membrana que pertenece a la súper familia de los receptores basureros (del inglés, *scavenger receptors*) ricos en cisteína (McGill *et al.*, 2014). Las moléculas WC1 funcionan simultáneamente como correceptores activadores y como RRP, permitiendo el reconocimiento directo de moléculas microbianas y modulando la señalización del TCR (Herzig y Baldwin, 2009). Otros antígenos de superficie útiles para el estudio de estas células son CD8 y CD2, los cuales, junto con los miembros de la familia de WC1 definen subpoblaciones de linfocitos $T\gamma\delta$ funcionalmente distintas (Tuo *et al.*, 1999). Los linfocitos $T\gamma\delta\text{ WC1}^+$ no expresan los antígenos CD8 ni CD2 (son CD8^- , CD2^-) y representan la mayoría de los linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos en circulación, mientras que la mayoría de los linfocitos $T\gamma\delta\text{ WC1}^-$, que sí expresan CD8 y CD2 (CD8^+ , CD2^+), son más abundantes en tejidos tales como bazo, mucosa intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos (McGill *et al.*, 2014). Varios estudios realizados en estas poblaciones celulares, concluyeron que cuando los linfocitos $T\gamma\delta\text{ WC1}^+$ se activaron, proliferaron e indujeron una respuesta inflamatoria, la subpoblación WC1^- expresó genes anti-inflamatorios y genes relacionados con apoptosis,

quiescencia en los tejidos y tráfico hacia la mucosa, sugiriendo que esta subpoblación cumpliría un rol de vigilancia inmunológica (Hedges *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2003; Graff *et al.*, 2006).

Las funciones de los linfocitos $T\gamma\delta$ se orientan fundamentalmente a la protección de las superficies epiteliales. En rumiantes, como el ganado bovino, estas poblaciones adquieren particular relevancia en la defensa de la GM frente a IIM, donde contribuyen mediante diversas funciones, entre ellas:

1.6.1 Secreción de citoquinas

Las funciones de los linfocitos $T\gamma\delta$ se asocian principalmente con la capacidad de secretar quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias (Fikri *et al.*, 2001; Jutila *et al.*, 2008), lo que les confiere la capacidad para modular el microambiente de citoquinas que se produce durante una respuesta a un agente infeccioso, dirigiendo el tráfico de otras poblaciones leucocitarias a los sitios de infección y potenciando las funciones de los macrófagos, neutrófilos y otras poblaciones linfocitarias (Alvarez *et al.*, 2009; Hedges *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la respuesta de los linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos a la estimulación con citoquinas o con antígenos bacterianos se caracteriza por la producción de $IFN-\gamma$, IL-17 y $TNF-\alpha$ (McGill *et al.*, 2014; Dillen *et al.*, 2018) (Figura 5).

1.6.2 Función reguladora

En bovinos, los linfocitos $T\gamma\delta$ exhiben una función reguladora bien establecida. Estas células producen citoquinas inmunomoduladoras como IL-10 y $TGF-\beta$ y, en condiciones experimentales, pueden suprimir la proliferación específica e inespecífica de antígeno de linfocitos $T\ CD4^+$ y $CD8^+$ *in vitro* (Guzman *et al.*, 2014). Estos hallazgos destacan el rol dual de los $T\gamma\delta$, ya que además de mediar respuestas efectoras frente a patógenos, contribuyen a limitar la inflamación y prevenir el daño tisular excesivo. En rumiantes, los linfocitos $T\gamma\delta$ constituyen la principal población de células reguladoras, a diferencia de lo observado en humanos y ratones, donde esta función recae mayormente en linfocitos $T\ CD4^+$ reguladores (Hoek *et al.*, 2009; Albarrak *et al.*, 2018). Asimismo, se ha descrito que regulan el tráfico celular local al favorecer la afluencia de linfocitos y monocitos, limitando así la llegada de células inflamatorias que no contribuyen al control de la infección y pueden inducir daño tisular (Saleem *et al.*, 2024). La proporción de linfocitos $T\gamma\delta$ en los rumiantes es mayor en las secreciones y en el parénquima de la GM con respecto a los niveles en circulación, lo que sugiere una función de barrera funcional en el microambiente de las mucosas contra los patógenos bacterianos, donde actúan tanto en la contención de la infección como en la regulación de la inflamación (Machugh *et al.*, 1997; Paape *et al.*, 2000).

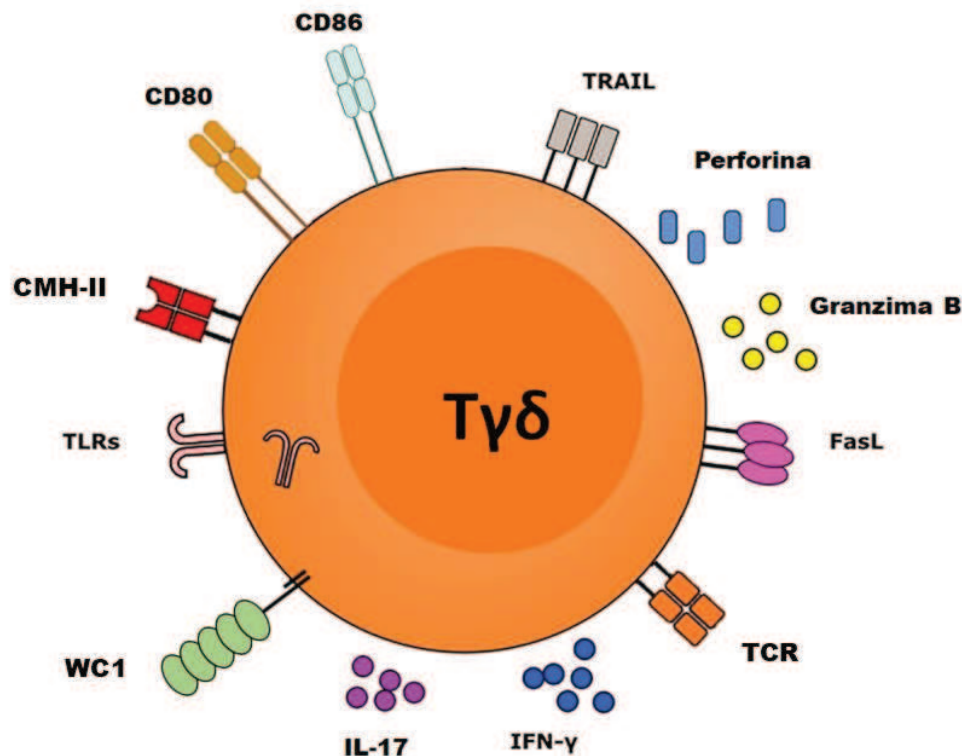


Figura 5. Principales receptores y moléculas efectoras asociadas a los linfocitos T $\gamma\delta$. Los linfocitos T $\gamma\delta$ expresan diversos receptores de superficie, entre ellos WC1, TCR, TLRs, que facilitan el reconocimiento de patógenos y la modulación de la respuesta inmune. Además, pueden expresar moléculas relacionadas con la presentación antigénica, tales como CD80, CD86 y CMH-II. Tras su activación, producen citoquinas como IL-17 e IFN- γ , y ejercen funciones citotóxicas a través de la producción de perforina, granzima B y FasL. Adaptado de Caron *et al.* (2021).

1.6.3 Actividad citotóxica

Se ha reportado que los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos poseen una importante función efectora, actuando como “células asesinas” y ejerciendo citotoxicidad directa a través de dos mecanismos diferentes, uno secretor y otro no secretor. El mecanismo secretor involucra la liberación de proteínas formadoras de poros (perforinas) que polimerizan sobre la membrana de la célula blanco dando origen a la formación de canales que permiten el ingreso de la granzima B, una serinproteasa capaz de desencadenar la muerte por apoptosis de la célula blanco (Endsley *et al.*, 2004). El mecanismo citolítico no secretor, involucra la interacción de estructuras de membrana como la dupla Fas/Fas-L. La unión de la molécula Fas sobre la célula blanco conduce a la activación intracelular de señales apoptóticas con la consecuente fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis (Alvarez *et al.*, 2009) (Figura 5).

1.6.4 Presentación de antígenos

Otra función relevante atribuida a esta población celular es su capacidad de actuar como CPA. Los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden expresar moléculas del CMH-II y coestimuladoras como CD80 y CD86, lo que les permite presentar péptidos antigénicos a los linfocitos $TCD4^+$ (Toka *et al.*, 2011; McGill *et al.*, 2014) (Figura 5).

1.6.5 Memoria inmunológica

En modelos murinos se ha demostrado que los linfocitos $T\gamma\delta$ constituyen una población funcionalmente heterogénea que incluye subgrupos con características tanto innatas como adaptativas (Schmolka *et al.*, 2013). Algunas subpoblaciones emigran del timo preprogramadas para secretar citoquinas específicas, mientras unas se diferencian en productoras de IFN- γ , asociadas a respuestas de tipo Th1 de carácter antimicrobiano, otras están destinadas a producir IL-17, vinculada con la inflamación temprana y el reclutamiento de neutrófilos. En contraste, un tercer grupo de linfocitos $T\gamma\delta$ mantiene un fenotipo con mayor plasticidad, cuya polarización depende de las señales presentes en la periferia. Estas células “adaptativas” pueden modificar su perfil efector en función del entorno de citoquinas y, además, desarrollar respuestas de memoria similares a las observadas en linfocitos $T\alpha\beta$ convencionales (Ribot y Silva-Santos, 2013; Schmolka *et al.*, 2013). En bovinos, existe evidencia funcional que respalda la capacidad de memoria de los linfocitos $T\gamma\delta$. Diversos estudios han demostrado que los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ pueden desarrollar respuestas con características de memoria inmunológica tras la exposición a distintos patógenos o vacunas. Blumerman *et al.* (2007) observaron que, luego de la inmunización con bacterinas inactivadas de *Leptospira* serovar *Hardjo*, los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ mantenían durante meses la capacidad de proliferar y producir citocinas en respuesta al antígeno cuando se las reestimulaba *in vitro*, indicando una respuesta de memoria. En concordancia, Hogg *et al.* (2009) demostraron que los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ también pueden generar respuestas específicas frente a antígenos micobacterianos. En animales previamente sensibilizados, estas células exhibieron una reactividad más rápida y robusta *in vivo* tras la infección con *Mycobacterium bovis*, evidenciando que la exposición previa condiciona una activación más eficiente ante el reencuentro con el patógeno.

1.7 Linfocitos $T\gamma\delta$: rol en la defensa de la GM frente a *S. aureus*

Como se mencionó anteriormente, dentro de la respuesta inmune innata los fagocitos macrófagos y neutrófilos son las células efectoras, mientras que las citoquinas liberadas por los linfocitos Th1/Th17 participan reclutando a estas células y activando sus mecanismos bactericidas, promoviendo de esta manera la muerte del microorganismo y el control del proceso infeccioso (Lin *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2014; Rainard *et al.*, 2018; Côté-Gravel y Malouin,

2019). Estudios previos han destacado la importancia de la IL-17 (citoquina clave en la respuesta inmune de tipo Th17) en la resistencia a la infección por *S. aureus* (Milner *et al.*, 2008; Ishigame *et al.*, 2009). A nivel local en la GM, luego de producirse el reconocimiento de *S. aureus*, ocurre un pasaje eficiente de leucocitos de sangre hacia los tejidos, participando activamente en el control del desarrollo de la bacteria y la progresión de la infección (Rainard *et al.* 2018). Los macrófagos liberan citoquinas que reclutan neutrófilos en grandes números, y ambas poblaciones celulares fagocitan y eliminan a los microorganismos invasores utilizando toda su maquinaria de muerte (Wellnitz y Bruckmaier, 2012; Côté-Gravel y Malouin, 2019). Quimioquinas tales como CXCL8, RANTES (CCL5) y MIP-1 α son también importantes para atraer leucocitos desde la sangre al sitio de la infección (Paape *et al.*, 2000; Nishimura, 2003) y junto con las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células del sistema inmune innato del hospedador, tales como IL-1, IL-6, IL-12 p70, IL-18, TNF- α e IL-23 condicionarían el desarrollo de la respuesta de tipo Th1 y Th17 por parte de los linfocitos T CD4 (Côté-Gravel y Malouin, 2019). En este contexto, la IL-17 desempeña un papel central en la defensa de la GM contra *S. aureus*. Si bien es producida principalmente por linfocitos Th17 (Park *et al.*, 2005), otras poblaciones como los linfocitos T *natural killer* (NKT) y las células T $\gamma\delta$ también constituyen fuentes tempranas de IL-17 durante la infección (Cua y Tato, 2010).

Está ampliamente demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden migrar desde el torrente sanguíneo a los tejidos periféricos en respuesta a una infección o inflamación, y su reclutamiento en las mucosas puede ser fundamental para el control temprano de patógenos como *S. aureus* (Faldyna *et al.*, 2006). Como se mencionó, estas células innatas son una fuente importante de IL-17, además de IFN- γ y TNF- α , citoquinas asociadas a respuestas protectoras frente a *S. aureus* (McGill *et al.*, 2014; Dillen *et al.*, 2018).

A pesar de la extensa investigación realizada sobre las células T $\gamma\delta$, su papel en la respuesta inmune frente a infecciones por *S. aureus* permanece aún sin esclarecer. En varios modelos murinos de infección por *S. aureus*, se ha demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta$ son una fuente importante de IL-17 (Cheng *et al.*, 2012; Maher *et al.*, 2013) e IFN γ y TNF α (Dillen *et al.*, 2018), las cuales participarían de la respuesta inmune protectora del hospedador. Jing *et al.* (2012) reportaron en un modelo murino de mastitis crónica por *S. aureus* que, a nivel local, la población de linfocitos T $\gamma\delta$ se activa rápidamente, se expande y produce altos niveles de IL-17. Estos autores plantean un rol importante de estos linfocitos T innatos, productores de IL-17, en mediar el proceso inflamatorio en la GM luego de la infección por *S. aureus*. Por otro lado, Murphy *et al.* (2014) reportaron que la población de linfocitos T $\gamma\delta$ son la principal fuente de IL-17 durante el curso de la infección peritoneal por *S. aureus*. Estos autores identificaron una población de linfocitos T $\gamma\delta$ de memoria que logró expandirse luego de la infección con *S. aureus* y producir

altos niveles de IL-17; lo cual dejó en evidencia la participación de estas células en el proceso de eliminación de la bacteria luego de una re-infección. No obstante, se requiere una mayor caracterización funcional para comprender su impacto en la resolución de la infección y su contribución a la eliminación del patógeno.

En bovinos, son escasos los estudios que describen la participación de los linfocitos $T\gamma\delta$ durante las IIM por *S. aureus*. Soltys y Quinn (1999) observaron un aumento en el número de estas células en la GM durante mastitis agudas causadas por infecciones estafilocócicas o estreptocócicas. Por el contrario, durante infecciones crónicas por *S. aureus* no se encontraron cambios en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ en leche, sin embargo, la expresión del antígeno de superficie WC1 se encontró disminuida en esta subpoblación (Riollet *et al.*, 2001). Estos autores sugieren que el rol de los linfocitos $T\gamma\delta$ continúa siendo incierto, aunque podrían estar actuando principalmente en el tejido mamario y no en la leche. En línea con esto, Faldyna *et al.* (2006) demostraron la presencia de linfocitos $T\gamma\delta$ en lavados de GM bovina antes y después de la IIM con un análogo sintético del muramil dipéptido, componente de la pared de bacterias Gram positivas. La estimulación con esta molécula, que simula una infección de la GM por estafilococos y/o estreptococos, indujo el reclutamiento de linfocitos $T\gamma\delta$, principalmente la subpoblación CD2⁻, en la GM bovina, lo que sugiere su participación en la fase inicial de la respuesta inflamatoria local. De manera concordante, en infecciones experimentales agudas por *S. aureus*, se ha detectado un aumento de linfocitos $T\gamma\delta$ en los lavados de la GM, lo que sugiere su participación en la respuesta inflamatoria temprana (Šustrová y Sláma, 2013). Por otra parte, Tucker *et al.*, no han observado cambios significativos en la frecuencia de estas células innatas en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados por *S. aureus*, en comparación con leche proveniente de cuartos controles sin infectar. Sin embargo, han reportado un aumento en el porcentaje de estas células que expresan CD25 (marcador de activación y componente esencial del receptor de alta afinidad para IL-2), así como un predominio del fenotipo de memoria CD45RO⁺CD62L⁺ (L-selectina, molécula de adhesión) tanto en leche como en sangre, y una subpoblación específica CD45RO⁺CD62L⁻ solo en la leche (Tucker *et al.*, 2023).

A pesar de su elevada frecuencia en bovinos, su capacidad de respuesta temprana y sus particulares características inmunológicas, la contribución específica de los linfocitos $T\gamma\delta$ a la inmunidad de la GM frente a *S. aureus* permanece aún sin esclarecer. En este contexto, el estudio y la caracterización de linfocitos $T\gamma\delta$ productores de citoquinas como IL-17, IFN- γ y TNF- α en la GM bovina adquieren especial relevancia, ya que permiten profundizar el conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune local y aportar bases para el diseño de estrategias vacunales orientadas a inducir una respuesta celular protectora frente a las IIM por *S. aureus*. Asimismo, resulta de interés analizar la interrelación entre el sistema inmune del hospedador y las

características diferenciales de las cepas infectantes. En este marco, el presente plan de trabajo se orientó a caracterizar esta población celular innata y analizar su participación en la respuesta inmune frente a cepas de *S. aureus* con diferente genotipo y capacidad de adaptación a la GM bovina (aisladas de IIM persistentes-P y no persistentes-NP).

En el marco de los antecedentes mencionados y considerando que aún se desconoce el rol de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos durante la IIM por *S. aureus*, la **hipótesis general planteada** para el presente plan de trabajo es que *“Durante la IIM por S. aureus, los linfocitos $T\gamma\delta$ potencian la respuesta inmune innata y producen citoquinas que condicionan el perfil de respuesta adaptativa hacia la respuesta de tipo $Th1/Th17$. Asimismo, esta respuesta varía en relación a las características genéticas de la cepa infectante y a la capacidad de adaptación de la misma a la GM bovina”*



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo general fue evaluar la respuesta inmune innata luego de la interacción *in vitro* de CMN con dos cepas de *S. aureus* de diferente genotipo y capacidad de adaptación a la GM bovina (aisladas de IIM P y NP), caracterizando a la población de linfocitos T $\gamma\delta$; y examinar su rol *in vivo* en un modelo de IIM experimental.

2.2 Objetivos específicos

Para llevar a cabo el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos luego de la interacción *in vitro* con dos cepas de *S. aureus* diferenciadas por su genotipo y capacidad de adaptación a la GM; una de alta adaptación o P y otra de baja adaptación o NP.
2. Estudiar el perfil de producción de citoquinas por parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos luego de la interacción *in vitro* con las cepas P y NP de *S. aureus*.
3. Evaluar si existe comunicación cruzada (*cross-talk*) entre los linfocitos T $\gamma\delta$ y macrófagos bovinos infectados *in vitro* con las cepas P y NP de *S. aureus*.
4. Estudiar en un modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de *S. aureus*, la frecuencia, distribución y perfil de activación de las subpoblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo específico 1: “Estudiar la activación de los linfocitos $T\gamma\delta$ luego de la interacción *in vitro* de CMN con dos cepas de *S. aureus* diferenciadas por su genotipo y capacidad de adaptación a la GM; una de alta adaptación o P y otra de baja adaptación o NP”.

3.1.1 Características diferenciales de las cepas de *S. aureus* utilizadas

Se utilizaron 2 cepas de *S. aureus* diferenciadas por sus características genéticas y por su capacidad de adaptación al ambiente de la GM bovina. Estas cepas fueron aisladas de muestras de leche provenientes de vacas Holando Argentino con mastitis subclínica pertenecientes a diferentes rodeos lecheros ubicados en la provincia de Santa Fe (Argentina) y fueron seleccionadas en estudios previos a partir de una colección de 300 aislamientos (Pereyra *et al.*, 2016, 2017; Sacco *et al.*, 2020). La mastitis se caracterizó como subclínica cuando los RCS fueron $> 250 \times 10^3$ células/ml y sin cambios macroscópicos en la leche. La Tabla 1 resume las características fenotípicas, genotípicas y funcionales de las cepas de *S. aureus* utilizadas en esta tesis. A continuación, se detallan las principales características de las 2 cepas de *S. aureus* seleccionadas:

Cepa 806: La cepa 806 de *S. aureus* se aisló solo una vez de un cuarto mamario y no se volvió a aislar luego del tratamiento estándar con antibióticos intramamarios durante seis muestreos mensuales consecutivos durante la lactancia. Esta cepa se consideró de baja adaptación a la GM bovina y se designó como no persistente (NP). La evaluación de las características fenotípicas de esta cepa determinó que es débil productora de *biofilm*, es sensible a la penicilina y posee baja capacidad de adherencia e internalización en una línea epitelial alveolar mamaria bovina (MAC-T, por sus siglas en inglés). Por ende, es una cepa mejor adaptada al ambiente extracelular (Pereyra *et al.*, 2016; Sacco *et al.*, 2020). Entre sus características genotípicas podemos mencionar que es *agr tipo II* y portadora de los genes *cap5*, *icaA*, *icaC*, *icaD* y secuenciotipo ST350 (Sacco *et al.*, 2020).

Cepa 5011: La cepa 5011 de *S. aureus* se aisló del mismo cuarto mamario en seis muestreos mensuales consecutivos durante la lactancia y se consideró altamente adaptada a la GM bovina designándose como persistente (P). Mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se confirmó que fue la misma cepa 5011 la que persistió en el cuarto mamario (Pereyra *et al.*, 2016; Sacco *et al.*, 2020). La evaluación de las características fenotípicas de esta cepa determinó que es fuerte productora de *biofilm*, es resistente a la penicilina y posee una alta capacidad de adherencia, internalización y persistencia intracelular en células MAC-T (Pereyra *et al.*, 2016; Sacco *et al.*, 2020). Por ende, es una cepa mejor adaptada al ambiente intracelular (Pereyra *et al.*, 2016). Entre sus características genotípicas podemos mencionar que es *agr tipo I* y portadora de

los genes *cap8*, *ica A*, *icaC*, *icaD*, *blaZ* y secuenciotipo CC188 (Pereyra *et al.*, 2016; Sacco *et al.*, 2020).

Tabla 1. Resumen de las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* utilizadas en este estudio.

Cepas de <i>S. aureus</i>	Clasificación de Biofilm	Tipo <i>agr</i>	Tipo de cápsula ^a	Genes de adhesión ^b	Genes asociados a Biofilm ^c	Gen de resistencia a penicilina ^d	PFGE	Perfil de hibridación
Cepa NP (806)	Débil	<i>agrII</i>	<i>cap5</i>	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbpA</i> , <i>fnbpB</i> (-), <i>fib</i> , <i>cna</i>	<i>icaA</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> (-)	<i>blaZ</i> (-)	D	ST350
Cepa P (5011)	Fuerte	<i>agrI</i>	<i>cap8</i>	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbpA</i> , <i>fnbpB</i> (-), <i>fib</i> , <i>cna</i>	<i>icaA</i> , <i>icaC</i> , <i>icaD</i> , <i>bap</i> (-)	<i>blaZ</i>	O	ST188 (CC188)

NP: no persistente. P: persistente. PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado.

^aPresencia de genes que codifican para la cápsula polisacárida, de tipo 5 y 8 (*cap5*, *cap8*).

^bPresencia de genes que codifican para el factor de aglutinación A y B (*clfA*, *clfB*); genes que codifican para las proteínas de unión a fibronectina A y B (*fnbpA*, *fnbpB*); gen que codifica la proteína de unión a fibrinógeno (*fib*); y gen que codifica la molécula de adhesión al colágeno (*cna*).

^cPresencia de los genes de adhesión intercelular A, C y D (*icaA*, *icaC*, *icaD*) y del gen que codifica para la proteína asociada a biofilm (*bap*).

^dPresencia del gen que codifica la enzima beta-lactamasa (*blaZ*).

3.1.2 Cultivos microbiológicos y obtención de bacterias muertas por calor

Las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* seleccionadas se reactivaron a partir de crioviales congelados (-80 °C) mediante siembra en estrías en medio Columbia agar base y se incubaron por 24 h a 37°C en condiciones aeróbicas. A partir del cultivo en medio sólido, se levantaron tres colonias aisladas y de similar morfología y se homogeneizaron en 5 ml de Caldo Tripteína Soya. La suspensión se incubó 16 h a 37°C y agitación suave (150 rpm). A partir de este cultivo líquido, se realizó una dilución 1/100 y se incubó a 37°C por 2 h a 150 rpm de agitación, para lograr la fase de crecimiento exponencial. Finalizadas las 2 h de incubación, se le aplicó al cultivo un shock térmico, colocándolas en un baño de agua termostatzado a 80°C durante 1 h a fin de obtener bacterias muertas por calor para ser utilizadas posteriormente como estímulos en los ensayos de cultivo celular.

3.1.3 Recuento del número de Unidades Formadoras de Colonia

Para calcular la relación bacteria:célula o multiplicidad de infección (MOI) a utilizar en los ensayos de cultivo celular, se llevó a cabo la determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de cada cepa de *S. aureus* utilizada. Para esto, se realizaron diluciones seriadas en base 10 del cultivo líquido de 2 h de incubación y se sembraron en Agar Manitol Salado (AMS). Brevemente, se colocaron 90 µl de PBS estéril en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos y se realizaron las siguientes diluciones del cultivo líquido de 2 h de incubación: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} . Luego, se sembraron 20 µl de cada dilución por triplicado en placas de AMS y se incubaron por 24 h a 37°C, repitiendo el ensayo 3 veces. Finalmente, se contaron las colonias en la dilución correspondiente (aquellas que contenían entre 3 a 30-40 colonias como máximo) para calcular el número de UFC/ml según la siguiente fórmula (Cappuccino y Shermann 2014):

$$\frac{N^{\circ} \text{ UFC}}{\text{ml}} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{20 \text{ } \mu\text{l}} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

3.1.4 Aislamiento de CMN de sangre periférica bovina

Para el aislamiento de CMN de sangre periférica bovina se utilizaron terneras Holando Argentino de hasta cuatro meses de edad pertenecientes al tambo de la Escuela de Agricultura Ganadería y Granja (UNL). Se seleccionaron sobre la base de ausencia de enfermedades infecciosas y de hemogramas sanguíneos normales (Fielder, 2022). Una vez obtenida la muestra de sangre periférica por punción de la vena yugular, se procedió al enriquecimiento de CMN mediante centrifugación en gradiente de densidad según la metodología descripta (Skyberg *et al.*, 2011). Brevemente, la muestra de sangre periférica anticoagulada se diluyó al medio con PBS 1X estéril y se colocaron 9 ml de dicha dilución en un tubo con 3 ml de Ficoll-PaqueTM plus (Cytiva). Luego de centrifugar a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente (TA), se colectaron las CMN de la interfase entre la solución de Ficoll-PaqueTM y la suspensión que contenía a las células y se las trasladó a otro tubo con 5 ml de PBS 1X estéril. Después de centrifugar a 600 x g durante 10 min, el *pellet* obtenido se lavó una vez más con PBS 1X estéril y luego se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo RPMI-Suero bovino fetal (SBF) al 10%. Luego, las células obtenidas se contaron en cámara de Neubauer y se evaluó la viabilidad celular con solución de azul de tripán (Gibco). Todos los procedimientos 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 comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL según el Protocolo 373/17.

3.1.5 Purificación de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ mediante separación inmunomagnética

A partir de las CMN obtenidas, se puso a punto la purificación de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ mediante separación inmunomagnética empleando columnas de separación MS (Miltenyi Biotec) montadas en un campo magnético, siguiendo las instrucciones del fabricante y adaptando metodologías previamente descriptas (Toka *et al.* 2011). Brevemente, se resuspendieron 5×10^6 células en buffer de separación (PBS 1X + 0,5% albúmina sérica bovina + 0,2 mM EDTA, pH 7,2) y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-WC1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en una dilución final 1/400 durante 30 min. Luego de centrifugar a $400 \times g$ a 4°C durante 5 min, el pellet celular se resuspendió en buffer de separación y las células se incubaron con un Ac. anti-FITC conjugado a perlas magnéticas (MACS® MicroBeads) en una dilución final 1/10. Después de 30 min de incubación, se centrifugó a $400 \times g$ y 4°C durante 5 min y el pellet celular se resuspendió en buffer de separación. Para purificar a los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺, se hizo pasar la suspensión celular por una columna acoplada a un magneto, previo lavado de la misma con buffer de separación. Los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que se unieron a las perlas magnéticas quedaron retenidos por acción del campo magnético, mientras que las CMN remanentes, carentes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ (CMN $\emptyset$ WC1⁺), fueron recolectadas para ensayos posteriores. Luego de tres lavados, la columna se retiró del campo magnético para eluir con buffer de separación a los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que quedaron retenidos. Con el fin de mejorar la pureza de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺, se efectuó una segunda separación utilizando una columna adicional. Además, para incrementar el número total de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ obtenidos, el proceso de purificación se realizó por duplicado. El porcentaje de pureza de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ se evaluó mediante citometría de flujo (CF) utilizando el citómetro Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer A24860 (Life Technology) y empleando el software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA) para el análisis de los datos (Figura 6).

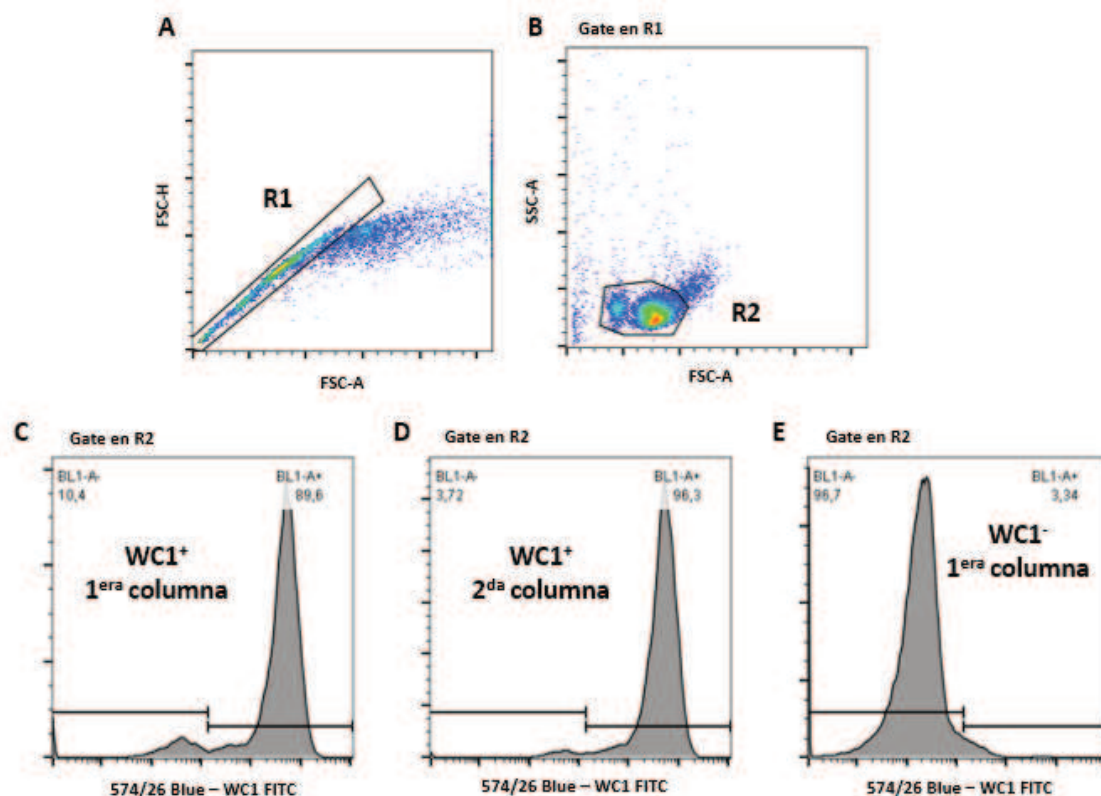


Figura 6. Esquema representativo del porcentaje de pureza de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ evaluado por CF. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de linfocitos (R2). C) Porcentaje de pureza de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ obtenido luego del paso por la primera columna de separación inmunomagnética. D) Porcentaje de pureza de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ luego del paso por la segunda columna de separación inmunomagnética. E) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ en la población de CMN $\emptyset$ $WC1^+$ luego del paso por la primera columna de separación inmunomagnética.

3.1.6 Ensayos de cultivo celular

Los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ purificados, la población total de CMN, y las CMN $\emptyset$ $WC1^+$, se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en medio RPMI (Gibco BRL) + suero fetal bovino-SFB 10% a 37°C -5% CO_2 . Cada población celular se incubó con medio solamente (células basales) o con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* inactivadas por calor (relación bacterias:células 10:1). Luego de 48 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X y tripsinizadas (Tripsina TRANS, AP Biotech) durante 5 min a 37°C , hasta que se despegaron de la superficie del pocillo. Luego de frenar la acción de la tripsina con PBS-SFB 10%, las células se colectaron en tubos eppendorf y se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD62L, del receptor innato TLR2, y de las moléculas asociadas a la presentación antigénica (CD80, CD86 y CMH-II). Estos marcadores se evaluaron por CF utilizando diversos Ac. en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ como se describe a continuación.

En paralelo, se colectaron los sobrenadantes de los cultivos y se almacenaron a -80°C para posteriormente evaluar los niveles de diferentes citoquinas secretadas al medio por ELISA.

Las condiciones de cultivo utilizadas en esta tesis fueron seleccionadas en base a ensayos preliminares de dosis-respuesta, en los que se evaluaron diferentes MOI (1:1 y 10:1), distintas condiciones bacterianas (bacterias inactivadas por calor o lisados bacterianos) y dos tiempos de co-cultivo (24 y 48 h). Estos ensayos mostraron que la combinación de una MOI 10:1 de bacterias inactivadas por calor durante 48 h produjo la mayor activación de los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$, demostrado por los porcentajes más elevados de marcadores de activación evaluados por CF. En base a estos resultados, los ensayos dirigidos a la evaluación de linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ se realizaron a las 48 h, mientras que la activación de macrófagos se evaluó a las 24 h, tiempo en el que se observaron respuestas tempranas consistentes de esta población celular. Por este motivo, dichas condiciones se emplearon en todos los ensayos posteriores.

3.1.7 Evaluación de la expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^{+}

Se analizó la expresión de CD25, CD62L, TLR2, CD80 y CMH-II en linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^{+} purificados y la expresión de CD25, CD62L, TLR2, CD80, CD86 y CMH-II en linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^{+} dentro de la población de CMN totales, empleando combinaciones apropiadas de anticuerpos específicos y fluorocromos para su posterior análisis. Cabe destacar que la evaluación de CD86 en linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ purificados no fue posible debido a la utilización de un sistema de marcación indirecta. En este caso, ambos anticuerpos primarios empleados (anti- WC1 y anti-CD86) fueron de origen murino, por lo que la detección mediante un anticuerpo secundario anti-mouse habría generado señal inespecífica y superpuesta, impidiendo la correcta discriminación de la expresión de CD86 en la población purificada. Los anticuerpos utilizados y las concentraciones de los mismos se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos y condiciones utilizados en los ensayos de cultivo celular.

Anticuerpos	Nombre (nº. cat.)	Clon	Fluoro-cromo	Dilución	Especificidad	Hospedador	Marca	Isotipo
WC1	MCA838F	CC15	FITC	1/100	Bovino	Ratón	Biorad	IgG2a
CD25	MCA2430PE	IL-A111	PE	1/25	Bovino	Ratón	Biorad	IgG1
CD62L	ab33277	FMC46	PE	1/50	Bovino	Ratón	Abcam	IgG2b
TLR2	HCA151A 647	AbD12 542	AF647	1/25	Bovino	Humano	Biorad	HuCAL Fab

CD80	MCA2436PE	IL-A159	PE	1/50	Bovino	Ratón	Biorad	IgG1
CMH-II	MCA2445A 647	IL-A21	AF647	1/800	Bovino	Ratón	Biorad	IgG2a
CD86	MA5-28448	IL-A190	-	1/400	Bovino	Ratón	Invitro-gen	IgG1
Anticuerpo Secundario	31981	-	APC	1/300	Anti-Mouse IgG	Cabra	Invitro-gen	Poli-clonal

Brevemente, las células colectadas en los ensayos de cultivo celular descriptos anteriormente se incubaron con los anticuerpos específicos para los diferentes marcadores de superficie celular en PBS-EDTA-SFB a 4 °C durante 30 min en oscuridad. Cada anticuerpo fue previamente titulado para determinar la concentración óptima de uso en los ensayos de CF. En el caso de CD86, se realizó una marcación indirecta, donde luego de la incubación con el anticuerpo primario, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario. Para evaluar viabilidad celular, las células fueron teñidas con el colorante de viabilidad eFluor™ 780 (ThermoFisher). Se utilizaron controles FMOs (del inglés *fluorescence minus one*), los cuales contenían todos los anticuerpos incluidos en la muestra excepto uno. Estos controles se emplearon para establecer el control negativo del detector correspondiente al anticuerpo omitido. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en fluido de enfoque para ser adquiridas en el citómetro de flujo. Los niveles de expresión de cada marcador en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺, evaluado por el parámetro de intensidad de fluorescencia media (IFM), y los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan cada marcador, fueron analizados utilizando el programa Flowjo (TreeStar, Ashland, OR, EEUU) siguiendo la estrategia de selección o *gating* que se presenta en las Figuras 7 y 8. Se realizaron 6 ensayos independientes.

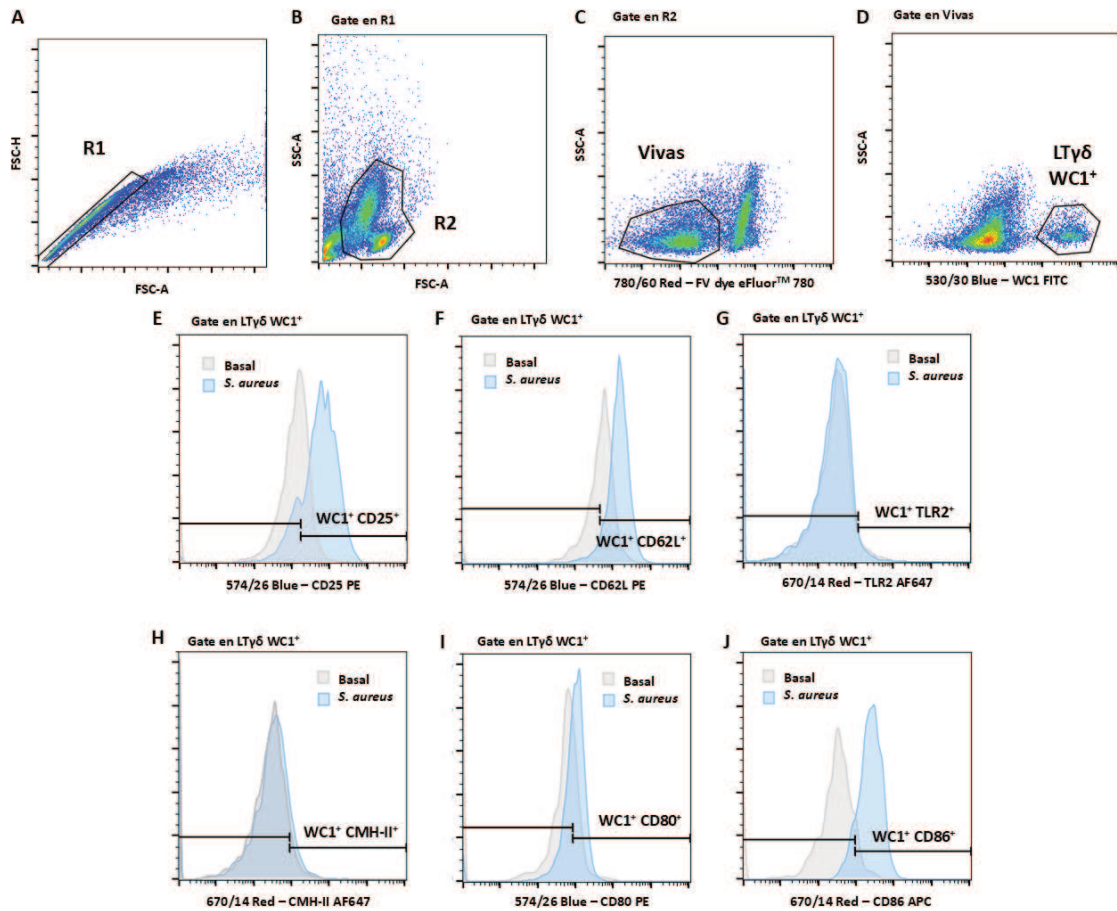


Figura 7. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de la expresión de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ dentro de la población de CMN. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de linfocitos (R2). C) Dot plot representativo de la selección de células viables (Vivas). D) Selección de la población de linfocitos $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$ WC1⁺). E) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD25. F) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD62L. G) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan TLR2. H) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CMH-II. I) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD80. J) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD86. En gris se observan los histogramas de muestras basales y en celeste los histogramas de muestras estimuladas con *S. aureus*.

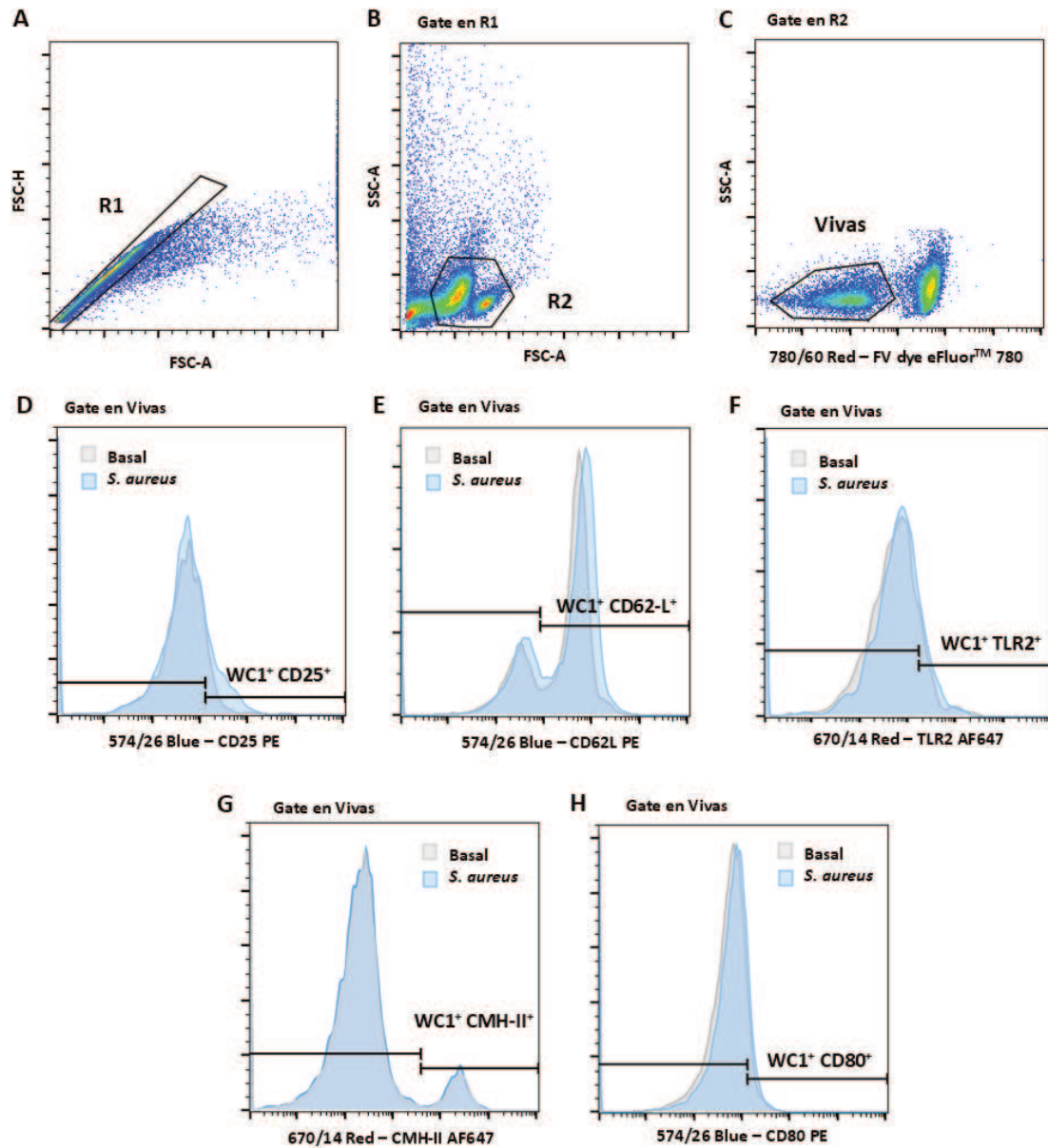


Figura 8. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizados para el análisis de la expresión de CD25, CD62L, TLR2 y CMH-II en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de linfocitos (R2). C) Dot plot representativo de la selección de células viables (Vivas). D) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD25. E) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD62L. F) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan TLR2. G) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CMH-II. H) Histograma representativo de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD80. En gris se observan los histogramas de muestras basales y en celeste los histogramas de muestras estimuladas con *S. aureus*.

3.1.8 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de las diferentes cepas de *S. aureus* sobre los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan determinado marcador, así como la densidad de expresión del mismo (evaluada como IFM), los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un modelo lineal generalizado (MLG) con función de enlace logarítmico o función de enlace identidad según corresponda. Se comprobaron normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas con los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se consideraron significativas las diferencias utilizando un valor de $p < 0,05$.

Objetivo específico 2: “Estudiar el perfil de producción de citoquinas por parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos luego de la interacción *in vitro* con las cepas P y NP de *S. aureus*”.

3.2.1 Evaluación de la producción de IFN- γ , IL-17A y TNF- α mediante ELISA sándwich

En los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a las diferentes condiciones experimentales (descriptas en el apartado 3.1.6 *Ensayos de cultivo celular*), se determinó la concentración de IFN γ , IL-17, TNF α , IL-10 e IL-4 mediante la técnica de ELISA sándwich, utilizando kits comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Mabtech). Brevemente, luego del sensibilizado de las placas con el anticuerpo de captura y del bloqueo de los sitios de unión libres, se incubaron los sobrenadantes de cultivo de todas las condiciones evaluadas a TA. Luego de sucesivos lavados, se incubó con el anticuerpo de detección específico. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron nuevos lavados y se adicionó el complejo estreptavidina-peroxidasa. La reacción fue evidenciada mediante la incubación con el sustrato-cromógeno TMB y luego detenida con solución de frenado (HCl 1N). En paralelo a la técnica aplicada a cada sobrenadante de cultivo, se realizó una curva estándar a partir de concentraciones conocidas de cada citoquina (IFN- γ : 2000 pg/ml, IL-17: 500 pg/ml, TNF- α : 30 ng/ml, IL-10: 7000 pg/ml e IL-4: 4000 pg/ml). Las absorbancias se midieron a 450 nm en un lector de ELISA (SPECTROstarNano). Las concentraciones de las citoquinas en cada muestra se determinaron por extrapolación a partir de las curvas estándar realizadas con IFN- γ , IL-17A, TNF- α , IL-10 e IL-4 recombinantes bovinas provistas en los kits y se expresaron en picogramos por mililitro (pg/ml), para todas las citoquinas excepto para el caso de TNF- α , que se expresó en nanogramos por mililitro (ng/ml). La producción de cada citoquina para cada sistema celular (CMN totales, linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN $\emptyset$ WC1⁺) se evaluó en 3 ensayos independientes, cada muestra se midió por duplicado (Beccaria *et al.*, 2018).

Con el fin de comparar la producción de estas citoquinas entre los tres sistemas celulares evaluados frente a un mismo estímulo y estudiar la posible contribución de la población de

linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ en la producción de citoquinas, se normalizaron los niveles de cada citoquina frente a su producción basal (índice).

3.2.2 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de cada cepa de *S. aureus* sobre los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los tres sistemas de cultivo evaluados (CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ y células WC1-), los datos obtenidos se analizaron mediante un modelo lineal generalizado (MLG) con función de enlace logarítmico o función de enlace identidad según corresponda. Se comprobaron normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas con los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se consideraron significativas las diferencias utilizando un valor de $p < 0,05$.

Objetivo específico 3: “Evaluar si existe comunicación cruzada (*cross-talk*) entre los linfocitos $T\gamma\delta$ y macrófagos bovinos infectados *in vitro* con las cepas P y NP de *S. aureus*”.

3.3.1 Ensayos de cultivo celular

La población de CMN totales y CMN $\emptyset$ WC1⁺, se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo en medio RPMI (Gibco BRL) + SFB 10% a 37°C-5% CO₂. Cada población celular fue incubada con medio solamente (células basales) o con el agregado de las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* muertas por calor (relación bacterias:células 10:1). Luego de 24 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X y tripsinizadas (Trypsina TRANS, AP Biotech) durante 10 min a 37°C, hasta que se despegaron de la superficie del pocillo. Luego de frenar la reacción con PBS-SFB 10%, las células se colectaron en tubos eppendorf para evaluar la expresión de los marcadores de superficie CD80 y CMH-II en la población de monocitos-macrófagos por CF como se describe a continuación.

3.3.2 Evaluación de la expresión proteica de CD80 y CMH-II en monocitos-macrófagos

Se analizó la expresión de CD80 y CMH-II en monocitos-macrófagos (células CD14⁺) empleando combinaciones apropiadas de anticuerpos específicos y fluoróforos para su posterior análisis. Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas de los mismos se detallan previamente en las Tablas 2 y 3. Las células colectadas se incubaron con los anticuerpos específicos para los diferentes marcadores de superficie celular en PBS-EDTA-SFB a 4 °C durante 30 min en oscuridad. Para evaluar viabilidad celular, las células fueron teñidas con el colorante de viabilidad eFluor™ 780 (ThermoFisher). Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en fluido de enfoque para ser adquiridas en el citómetro de flujo. Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowjo (TreeStar, Ashland, OR, EEUU) siguiendo la estrategia de selección o *gating* que se presenta en la Figura 9. Se realizaron 3 ensayos independientes.

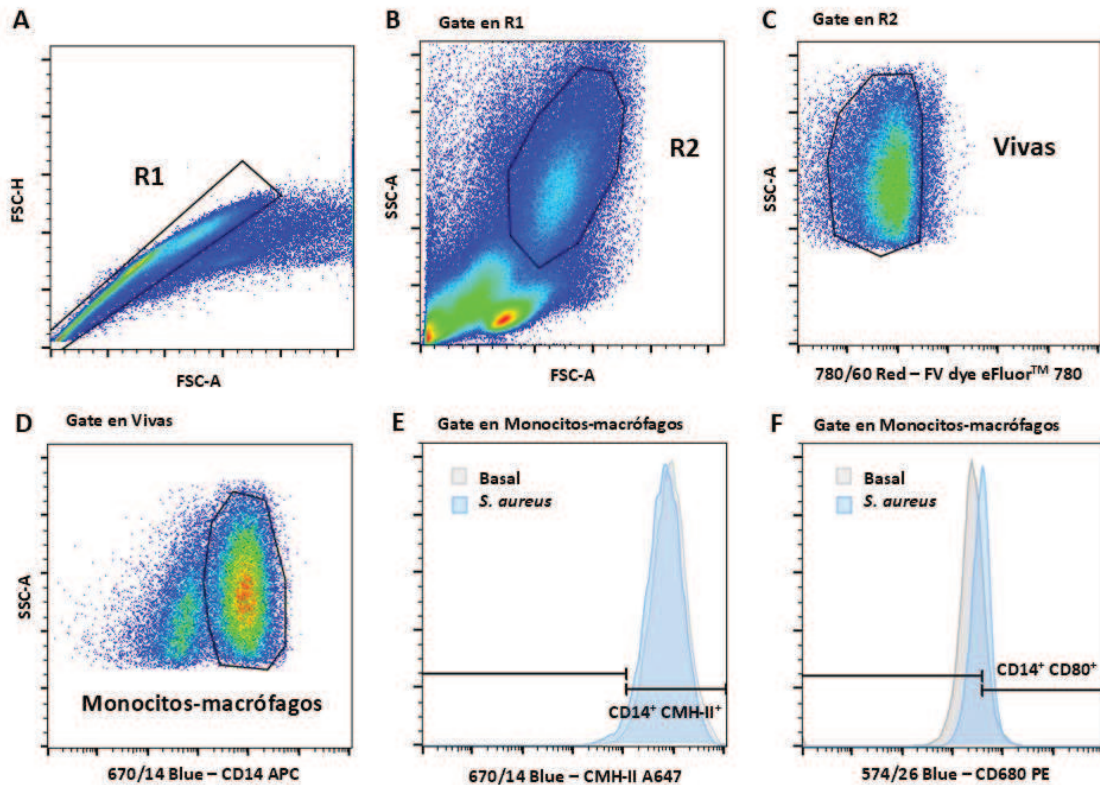


Figura 9. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de la expresión de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de monocitos-macrófagos (R2). C) Dot plot representativo de la selección de células viables (Vivas). D) Selección de la población de monocitos-macrófagos (células CD14⁺). E) Histograma representativo de monocitos-macrófagos que expresan CMH-II. F) Histograma representativo de monocitos-macrófagos que expresan CD80. En gris se observan los histogramas de muestras basales y en celeste los histogramas de muestras estimuladas con *S. aureus*.

3.3.3 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de las diferentes cepas de *S. aureus* sobre los porcentajes de monocitos-macrófagos que expresan los marcadores evaluados, así como sobre la densidad de expresión de dichos marcadores por monocito-macrófago (evaluada mediante la IFM), los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un MLG con función de enlace logarítmico o función de enlace identidad según corresponda. Además, se analizaron las diferencias entre CMN y CMN $\emptyset$ WC1⁺ mediante un MLG. Se comprobaron normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas con los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se consideraron significativas las diferencias utilizando un valor de $p < 0,05$.

Objetivo específico 4: “Estudiar en un modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de *S. aureus*, la frecuencia, distribución y perfil de activación de las subpoblaciones de linfocitos T γ δ bovinos”.

3.4.1 Desarrollo del Modelo de Infección Intramamaria experimental

Preparación del inóculo bacteriano

Previo al desafío intramamario, las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* fueron reactivadas y llevadas a la fase de crecimiento exponencial como se describió en el punto 3.1.2. Inmediatamente antes de la IIM, las bacterias se diluyeron en solución fisiológica libre de pirógenos hasta alcanzar una concentración aproximada de 250 UFC/ml.

Animales e inoculación experimental

Se utilizaron vacas Holando Argentino de segunda o tercera lactancia, pertenecientes al tambo de la Escuela de Agricultura Ganadería y Granja (UNL). Las vacas fueron seleccionadas sobre la base de ausencia de IIM por patógenos mayores y menores de la ubre, de acuerdo con procedimientos estándares (Oliver *et al.*, 2004) y de hemogramas sanguíneos normales. Para ello, se tomaron muestras de leche de los cuatro cuartos mamarios a los 21, 14, 7 y 2 días previos al desafío experimental para realizar cultivos microbiológicos y RCS. Las vacas pre seleccionadas no contaban con antecedentes de mastitis clínica y no habían recibido medicación antibiótica o antiinflamatoria cuarenta días antes del inicio del experimento. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron 12 animales con RCS inferiores a 200.000 cél/ml y cultivos microbiológicos negativos.

Las vacas seleccionadas fueron asignadas al azar en tres grupos experimentales de 4 animales cada uno. Cada animal recibió uno de los tres tratamientos en los cuartos anterior derecho (AD) y posterior izquierdo (PI). El grupo uno fue inoculado con 1 ml de una suspensión de la cepa 806 (NP) de *S. aureus* (~ 250 UFC/ml), el grupo dos con 1 ml de una suspensión de la cepa 5011 (P) de *S. aureus* (~ 250 UFC/ml) y el grupo tres con 1 ml de solución fisiológica estéril (grupo control). La inoculación intramamaria se realizó después del ordeño vespertino de la siguiente manera: se desinfectaron minuciosamente las puntas de los pezones con etanol al 70 % y, a continuación, se insertó una cánula de plástico estéril conectada a una jeringa desechable a través del canal del pezón. El inóculo depositado en la cisterna del pezón fue desplazado hacia la cisterna de la glándula, masajeando suavemente la base del pezón en dirección dorsal (Schukken *et al.*, 1999). Después de la inoculación el pezón fue sumergido en una solución antiséptica conteniendo 1% de yodo. Una alícuota de los inóculos bacterianos y de la solución fisiológica estéril fue utilizada para el recuento de bacterias viables, lo que permitió determinar el número de UFC/ml

real inoculado y para comprobar la esterilidad de la solución fisiológica, respectivamente. Todos los procedimientos 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 comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL según el Protocolo 373/17. En la Figura 9 se presenta una descripción esquemática del modelo de desafío intramamario.

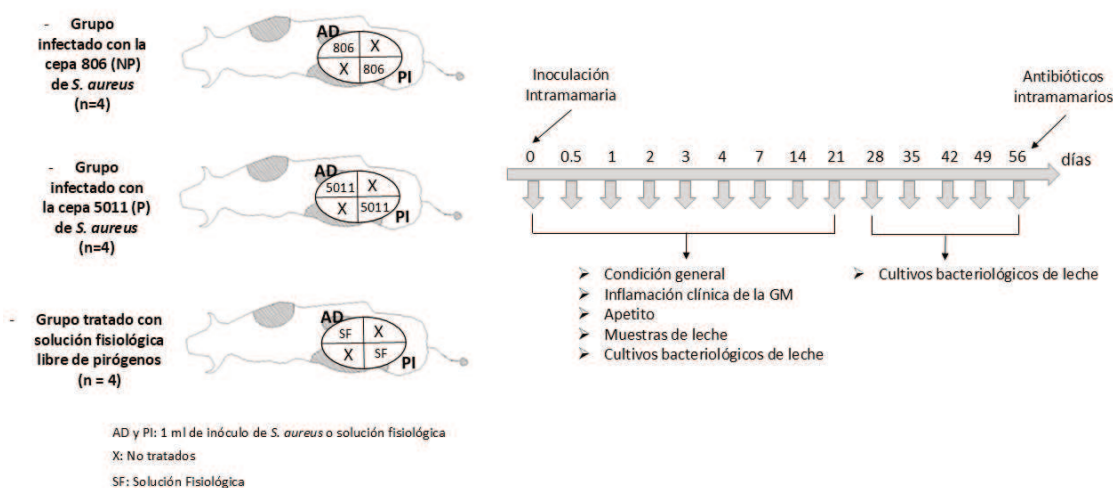


Figura 10. Esquema general del modelo de desafío intramamario con *S. aureus*. Dos de los cuatro cuartos mamarios de cada animal (anterior derecho-AD y posterior izquierdo-PI) fueron inoculados con 1 ml de la suspensión que contenía la cepa 806 de *S. aureus* (NP) (~400 UFC), la cepa 5011 de *S. aureus* (P) (~350 UFC), o con 1 ml de solución fisiológica (controles). Los animales fueron monitoreados diariamente hasta el día 21 post inoculación (pi), registrándose el estado corporal general, presencia de signos inflamatorios en la GM, apariencia macroscópica de la leche, el apetito y la producción de leche. Se tomaron muestras de leche de cada cuarto mamario inoculado, antes de la inoculación (tiempo 0) y a los 0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14 y 21 días pi. Finalizado este período, los cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* fueron nuevamente evaluados mediante cultivo bacteriano durante 5 semanas, a intervalos de 7 días (28, 35, 42, 49 y 56 días pi).

Monitoreo de la infección y toma de muestras de leche y sangre

Cada grupo de animales, inoculados con las cepas de *S. aureus* y controles, fue monitoreado diariamente hasta los 21 días post inoculación (pi) registrándose el estado general del animal, presencia de signos inflamatorios en las GM inoculadas (dolor, calor, rubor, hinchazón), apariencia macroscópica de la leche, apetito y producción de leche. Los signos inflamatorios locales y los cambios en la leche fueron evaluados siguiendo el esquema de puntaje o *score* propuesto por Middleton *et al.* (2004) donde: 0 = sin cambios macroscópicos en la leche ni signos inflamatorios en la GM, 1 = con cambios macroscópicos en la leche sin signos inflamatorios en

la GM, 2 = inflamación local de la GM acompañada de cambios macroscópicos en la leche, y 3 = mastitis clínica severa con síntomas sistémicos.

Se tomaron muestras de sangre de la vena mamaria craneal de todos los animales incluidos en el ensayo antes de realizar el desafío experimental (día 0, previo a la inoculación; pre-i), a los 0,5 días (12 h) y a los 1, 2, 3, 4, 7, 14 y 21 días pi. Además, se tomaron muestras de leche de cada cuarto mamario antes de realizar el desafío experimental (día 0, pre-i), a los 0,5 días (12 h) y a los 1, 2, 3, 4, 7, 14 y 21 días pi. Para las muestras de sangre, cada animal fue considerado una unidad experimental ($n = 4$), mientras que para las muestras de leche, cada cuarto mamario inoculado se consideró una unidad experimental ($n = 8$). Después del día 21 pi, se tomaron muestras de leche de los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 y 5011 de *S. aureus* durante 5 semanas a intervalos de 7 días para cultivos microbiológicos y de esta manera, poder monitorear el desarrollo de IIM crónicas. Finalizado el período total de observación (día 56), los animales infectados experimentalmente fueron tratados con antibióticos por vía intramamaria.

Recuento de células somáticas, aislamientos microbiológicos y monitoreo de la infección intramamaria

Las muestras de leche (10 μ l) de cada cuarto y de cada tiempo de muestreo se sembraron en placas de agar sangre suplementadas con 5% de sangre bovina y se incubaron durante 48 h a 37 °C bajo condiciones aeróbicas. Las placas se examinaron a las 24 h y 48 h para detectar desarrollo bacteriano. En los casos donde se observó desarrollo de colonias con doble hemólisis y morfología compatible con *S. aureus*, se realizó la caracterización fenotípica mediante pruebas bioquímicas estándares, como coloración de Gram, pruebas de catalasa, coagulasa, y siembra en agar manitol salado (Oliver *et al.*, 2004). La aparición de una sola colonia de *S. aureus* fue considerada como aislamiento positivo, siendo el límite de detección de 100 UFC/ml. Se realizaron los recuentos de UFC/ml de *S. aureus* en leche proveniente de los cuartos mamarios inmediatamente antes de la inoculación (día 0, pre-i) y en los días 0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 pi. Para confirmar que las colonias de *S. aureus* recuperadas después del desafío experimental correspondían a la misma cepa inoculada, se compararon los perfiles genotípicos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) de fragmentos de ADN cromosómico digeridos con SmaI, utilizando un sistema CHEF-DR II (BioRad Laboratories, CA, EE. UU.) y siguiendo la metodología descrita por Camussone *et al.* (2020). Para el RCS, las muestras de leche de cada cuarto y de cada tiempo de muestreo, fueron conservadas con azidiol (0,3%) a 4 °C y se analizaron en un plazo de 24 h. El RCS fue realizado por un laboratorio comercial (Laboratorio de la Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero (A.L.E.Co.L., Esperanza, Santa Fe) utilizando un contador automático (Somacount 300, Bentley Instruments, Minesotta, EE. UU.).

3.4.2 Aislamiento de leucocitos totales de sangre periférica

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas en el modelo de IIM experimental, se procedió al enriquecimiento de leucocitos totales de sangre periférica (LTSP) siguiendo la metodología previamente descrita por Beccaria *et al.* (2018). Brevemente, las muestras de sangre anticoagulada se centrifugaron a 680 x g por 15 min a 4 °C. Luego de la centrifugación, se eliminó el plasma de la capa superior, se resuspendió el paquete conteniendo los leucocitos totales y glóbulos rojos en buffer de lisis (0,15 M NH₄Cl, 1mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA disódica) hasta completar los 50 ml y se incubó durante 10 min a 4 °C para lograr la lisis completa de los glóbulos rojos. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 680 x g durante 10 min a 4 °C y se realizó una segunda lisis resuspendiendo el pellet celular en 10 ml de buffer de lisis durante 5 min a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó PBS 1X hasta completar los 50 ml, se centrifugó a 400 x g por 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 10 ml de RPMI/10% SFB. Las células viables se cuantificaron mediante la prueba de exclusión con azul tripán (Sigma) en una cámara de hemocitómetro de Neubauer y se usaron inmediatamente para los ensayos descritos a continuación (frecuencia de poblaciones de células inmunes sistémicas) o se almacenaron en nitrógeno líquido en medio de criopreservación (SFB y DMSO al 10%) hasta su posterior análisis (marcadores de activación y el perfil de presentación antigénica de los linfocitos Tγδ sistémicos).

3.4.3 Citometría de Flujo

Frecuencia de poblaciones de células inmunes sistémicas

La frecuencia de las poblaciones de células inmunes sistémicas se evaluó mediante CF. Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones se detallan en la Tabla 3. Brevemente, se incubaron LTSP (~1 x 10⁶ células) con anticuerpos específicos dirigidos contra diferentes marcadores de superficie en PBS-EDTA con SFB a 4 °C durante 30 min en oscuridad. Tras la incubación, las células se lavaron, se resuspendieron en fluido de enfoque y se adquirieron en el citómetro de flujo. El análisis de datos de cada población evaluada se realizó con el software FlowJo (TreeStar) utilizando la estrategia de selección o *gating* que se muestra en la Figura 11.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales utilizados para evaluar la frecuencia de poblaciones de células inmunes mediante CF.

Anticuerpos	Nombre (nº. cat.)	Clon	Fluorocromo	Dilución	Especificidad	Hospedador	Marca	Iso-tipo
CD14	301808	M5E2	APC	1/200	Reacción cruzada con Bovino	Ratón	Biolegend	IgG _{2a}
CD21	MCA1424 PE	CC21	PE	1/50	Bovino	Ratón	Biorad	IgG ₁
CD3	MCA1477 A647	CD3-12	AF647	1/25	Reacción cruzada con Bovino	Rata	Biorad	IgG ₁
CD4	MCA1653F	CC8	FITC	1/100	Bovino	Ratón	Biorad	IgG _{2a}
CD8	MCA1654 PE	CC58	PE	1/50	Bovino	Ratón	Biorad	IgG ₁
WC1	MCA838F	CC15	FITC	1/100	Bovino	Ratón	Biorad	IgG _{2a}

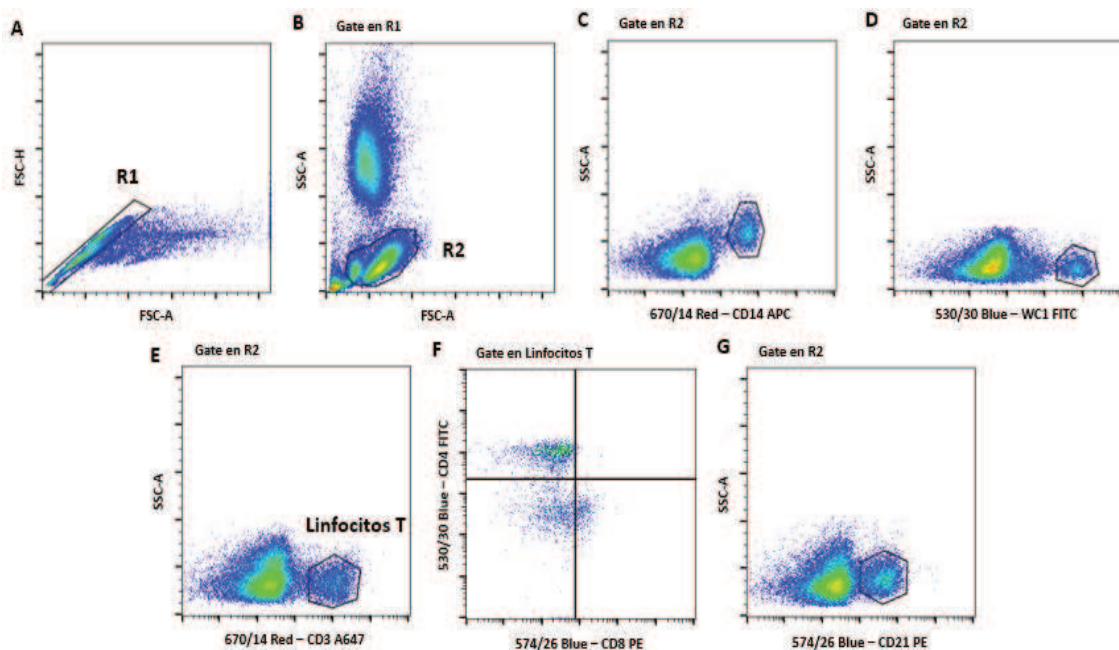


Figura 11. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de las poblaciones de células inmunes de sangre periférica. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de CMN (R2). C) Dot plot representativo de la selección de células CD14⁺ (monocitos-macrófagos). D) Dot plot representativo de la selección de células WC1⁺ (células T $\gamma\delta$). E) Dot plot representativo de la selección de células CD3⁺ (linfocitos T totales) a partir de la cual se realizó el análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8. F) Dot plot representativo que muestra la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ (linfocitos T helper) y T CD8⁺ (linfocitos T citotóxicos). G) Dot plot representativo que muestra de la selección de células CD21⁺ (linfocitos B).

Marcadores de activación y presentación antigénica en linfocitos $T\gamma\delta$ sistémicos

La caracterización de los marcadores de activación y de presentación antigénica en los linfocitos $T\gamma\delta$ sistémicos se realizó a partir de LTSP previamente criopreservados. Brevemente, los crioviales se descongelaron en baño de agua a 37 °C y las células se transfirieron a tubos con 5 ml de medio RPMI completo tibio. Luego de la centrifugación a 400 x g durante 5 min a TA, el pellet celular se resuspendió en 5 ml de medio RPMI completo atemperado. Las células viables se cuantificaron mediante la prueba de exclusión con azul tripán (Sigma) en una cámara de hemocitómetro de Neubauer. La marcación por CF se realizó según lo descrito previamente y los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 4. Las células muertas se identificaron utilizando el colorante de viabilidad fijable eFluor™ 780 (ThermoFisher). La estrategia de selección o gating utilizada se muestra en la Figura 12.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados para evaluar marcadores de activación y de presentación antigénica en linfocitos $T\gamma\delta$ sistémicos.

Anticuerpos	Nombre (n°. cat.)	Clon	Fluorocromo	Dilución	Especificidad	Hospedador	Marca	Isotipo
WC1	MCA838F	CC15	FITC	1/100	Bovino	Ratón	Biorad	IgG _{2a}
CD25	MCA2430PE	IL-A111	PE	1/25	Bovino	Ratón	Biorad	IgG ₁
CMH-MHCII	MCA2445A647	IL-A21	AF647	1/800	Bovino	Ratón	Biorad	IgG _{2a}
CD80	MCA2436PE	IL-A159	PE	1/50	Bovino	Ratón	Biorad	IgG ₁
CD86	MA5-28448	IL-A190	-	1/400	Bovino	Ratón	Invitrogen	IgG ₁
Anticuerpo secundario	A-21036	-	AF700	1/300	Anti-Mouse IgG	Cabra	Invitrogen	Policlonal

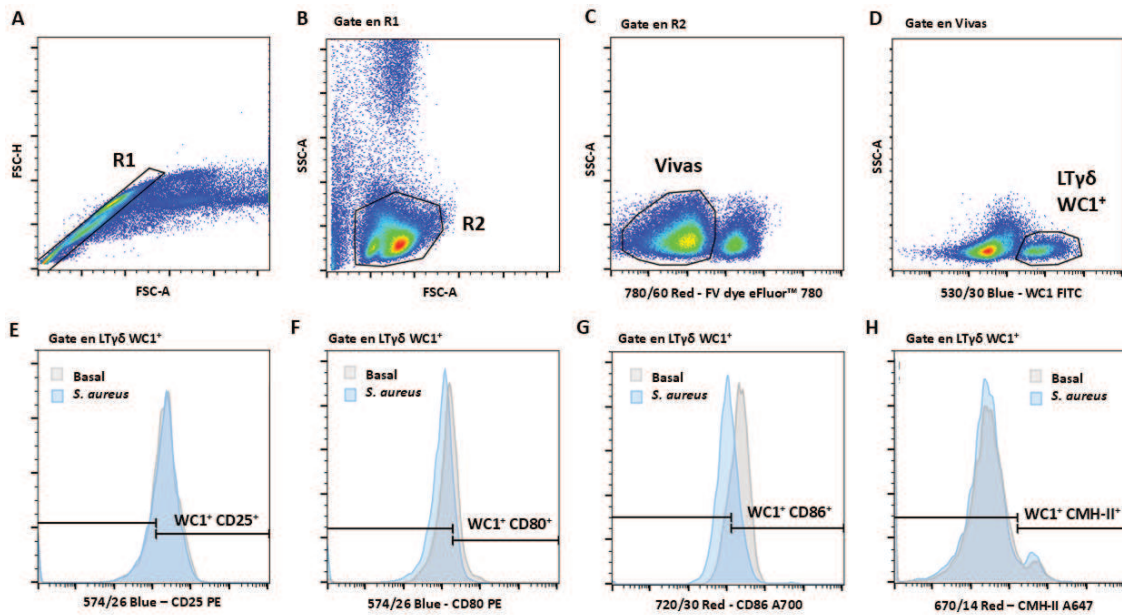


Figura 12. Gráficos representativos de la estrategia de gating utilizada para el análisis de los marcadores de activación y de presentación antigénica en los linfocitos $T\gamma\delta$ sistémicos. A) Selección de singletes o células individuales (R1). B) Selección de la población de CMN (R2). C) Dot plot representativo de la selección de células $WC1^+$ ($LT\gamma\delta$). D) Dot plot representativo de la selección de células vivas. E) Dot plot representativo de la frecuencia de $LT\gamma\delta WC1^+$ frente a células $CD25^+$. F) Dot plot representativo de la frecuencia de $LT\gamma\delta WC1^+$ frente a células $CD80^+$. G) Dot plot representativo de la frecuencia de $LT\gamma\delta WC1^+$ frente a células $CD86^+$. H) Dot plot representativo de la frecuencia de $LT\gamma\delta WC1^+$ frente a células $CMH-II^+$. En gris se observan los histogramas de muestras basales y en celeste los histogramas de muestras estimuladas con *S. aureus*.

3.4.4 Estudio de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ a nivel local en la GM

Se evaluó la frecuencia y distribución de los linfocitos $T\gamma\delta$ a nivel local en la GM. Para ello, se prepararon citoespines a partir de muestras de leche provenientes de los cuartos mamarios inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y con solución fisiológica (cuartos AD y PI) en los diferentes tiempos pre-i y pi. Las muestras de leche se desgrasaron mediante dos centrifugaciones a $600 \times g$ durante 10 min. El pellet celular se resuspendió en PBS 1X y 100 μ l de esta suspensión celular se citocentrifugó a $500 \times g$ durante 5 min utilizando una citocentrífuga Cyto Tek 2500 (Sakura), depositándose las células en portaobjetos limpios (Renna *et al.*, 2015; Engler *et al.*, 2022). Los portaobjetos obtenidos fueron almacenados a $-20^\circ C$ hasta su uso posterior.

Brevemente, una vez descongelados los portaobjetos fueron fijados durante 10 min en metanol frío. Luego de dos lavados con PBS 1X de 5 min cada uno, se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación con una solución de H_2O_2 en metanol durante 15 min. Se realizaron cuatro lavados más con PBS 1X y los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-bovine $\gamma\delta$ TCR1-N24 δ chain (Kingfisher Biotech) en una dilución 1/25 durante toda la noche a $4^\circ C$ en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron dos lavados con PBS 1X y

los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse (1/100) durante 30 min a TA. Luego de dos lavados con PBS 1X, los portaobjetos fueron incubados con streptavidina-peroxidasa durante 30 min a TA. Finalmente, se realizaron cuatro lavados con PBS 1X y se procedió a la incubación con la solución de cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) durante 3 min. Una vez revelados los portaobjetos, se realizaron dos lavados con agua de ósmosis de 5 min cada uno y se los contracoloró con hematoxilina (Biopur). Luego de dos lavados rápidos con agua de ósmosis, los portaobjetos se viraron en agua corriente. Por último, previo lavado rápido con agua de ósmosis, los portaobjetos se deshidrataron con soluciones de alcohol decreciente en agua y xilol y se montaron para su observación al microscopio. A partir de los preparados se tomaron imágenes empleando una cámara digital (Nikon DS-Fi2) montada en un microscopio (Nikon Eclipse Ci -L Ni) usando un objetivo de 40X y recorriendo todo el contenido celular del preparado. Se contaron todas las células de cada imagen y se obtuvo el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ (coloreadas con el color marrón dado por la tinción con DAB) y a partir del cual, junto con los resultados del RCS, se calculó el número de linfocitos $T\gamma\delta$ por mililitro de leche ($L T\gamma\delta/ml$).

3.4.5 Evaluación de la presencia de *S. aureus* intracelular a nivel local

Con el objetivo de detectar la presencia de *S. aureus* en el interior de las células de leche, se realizó la tinción de May-Grünwald-Giemsa en los citoespines obtenidos a partir de muestras de leche provenientes de cuartos mamarios con aislamiento microbiológico positivo, utilizando un kit comercial (Biopur). Brevemente, los portaobjetos se fijaron con metanol durante 5 min, se tiñeron durante 3 min en May-Grünwald y 1 min en agua destilada. Posteriormente, los portaobjetos fueron incubados en Giemsa (una gota por 1 ml de agua destilada) durante 15 min. Finalmente, los portaobjetos teñidos se examinaron mediante microscopía óptica para detectar la presencia de cocos teñidos en el interior de las células.

3.4.6 Evaluación de los niveles de citoquinas en leche

Las muestras de leche provenientes de cada cuarto mamario inoculado se desgrasaron mediante dos centrifugaciones (1500×g, 10 min; 20800×g, 30 min) a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los niveles de IL-17, IFN- γ , IL-4, TNF- α , TGF- β e IL-10 se determinaron mediante ensayos de ELISA sándwich utilizando kits comerciales, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1 y las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). Para la cuantificación, se realizó una curva estándar a partir de concentraciones conocidas de cada citoquina (IFN- γ : 2000 pg/ml, IL-17: 500 pg/ml, IL-4: 1000 pg/ml, TNF- α : 30 ng/ml, TGF- β : 5000 pg/ml e IL-10: 7000 pg/ml).

3.4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa SPSS 25.0 para Windows. Para determinar el efecto de la IIM con las diferentes cepas de *S. aureus* sobre las variables evaluadas, los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA de medidas repetidas (MRANOVA). Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Independientemente del resultado del MRANOVA, para cada punto del tiempo evaluado se realizó ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación múltiple de Duncan. Las diferencias entre el tiempo 0 (pre-i) y el resto de los tiempos de muestreo se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de comparación múltiple de Duncan. Se consideraron significativas las diferencias utilizando un valor de $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1.1 Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego de la interacción *in vitro* de CMN con *S. aureus*

CD25

Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan el marcador de activación CD25 ($T\gamma\delta$ WC1⁺ CD25⁺) luego del cultivo de CMN con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD25⁺ en cultivos de CMN basales ($p < 0,05$). En cambio, cuando CMN fueron incubados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, si bien se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD25⁺ respecto a los cultivos basales, esta diferencia no resultó significativa ($p > 0,05$) (Figura 13A).

Por otro lado, se observó un aumento significativo en la IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ cuando CMN fueron co-cultivadas con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con la IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de cultivos de CMN incubadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* y basales ($p < 0,05$) (Figura 13B).

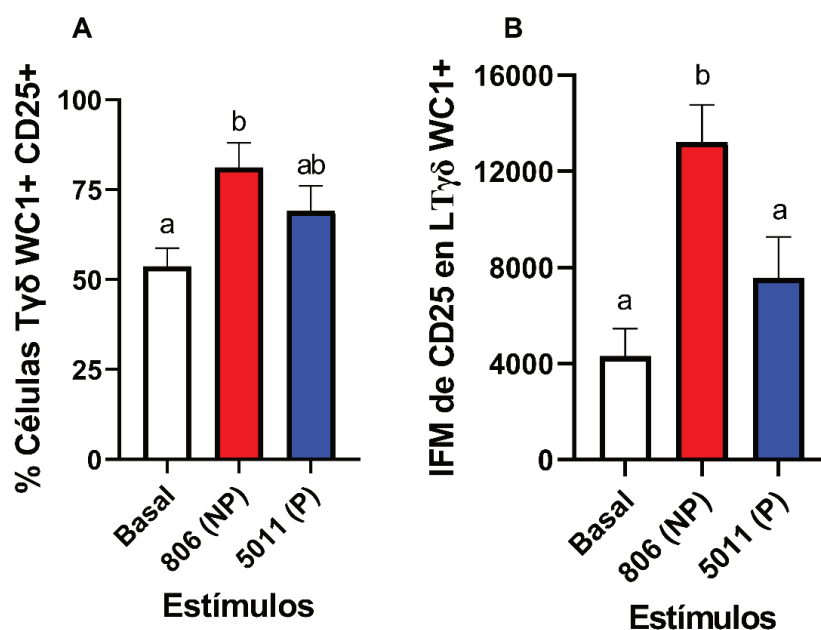


Figura 13. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD25 y B) IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CD62L

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan el marcador de activación CD62L ($T\gamma\delta$ WC1⁺ CD62L⁺) luego del cultivo de CMN con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos de CMN basales ($p>0,05$) (Figura 14A).

Por otro lado, se observó un aumento significativo en la IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de cultivos de CMN incubadas con ambas cepas de *S. aureus*, en comparación con la IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de cultivos basales ($p<0,05$). Además, cuando las CMN fueron co-cultivadas con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, la IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ fue mayor que la correspondiente en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de CMN co-cultivadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* ($p<0,05$) (Figura 14B).

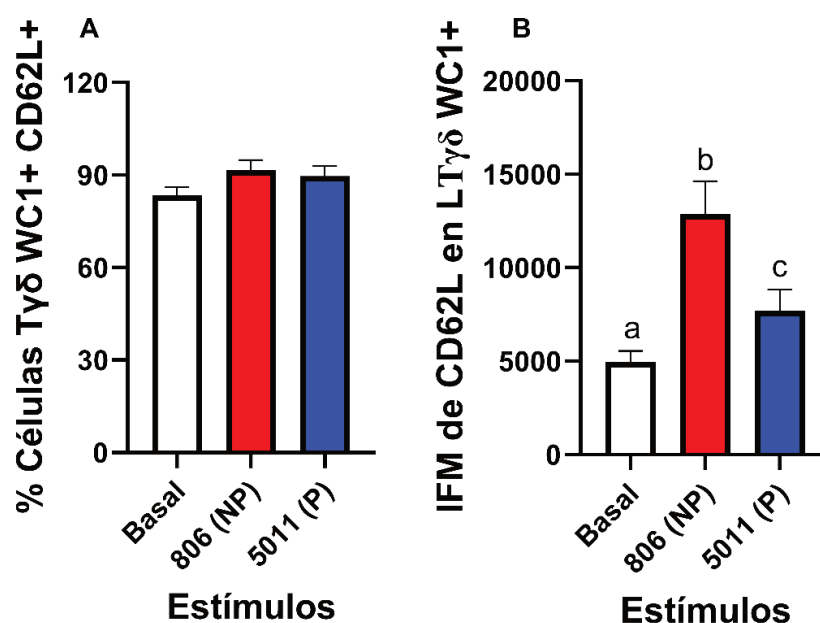


Figura 14. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD62L y B) IFM de CD62L en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p<0,05$).

TLR2

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan el receptor innato TLR2 ($T\gamma\delta$ WC1⁺ TLR2⁺) luego del cultivo de CMN con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos de CMN basales ($p>0,05$) (Figura 15A).

No se observaron diferencias significativas en la IFM de TLR2 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con los diferentes estímulos evaluados ($p>0,05$) (Figura 15B).

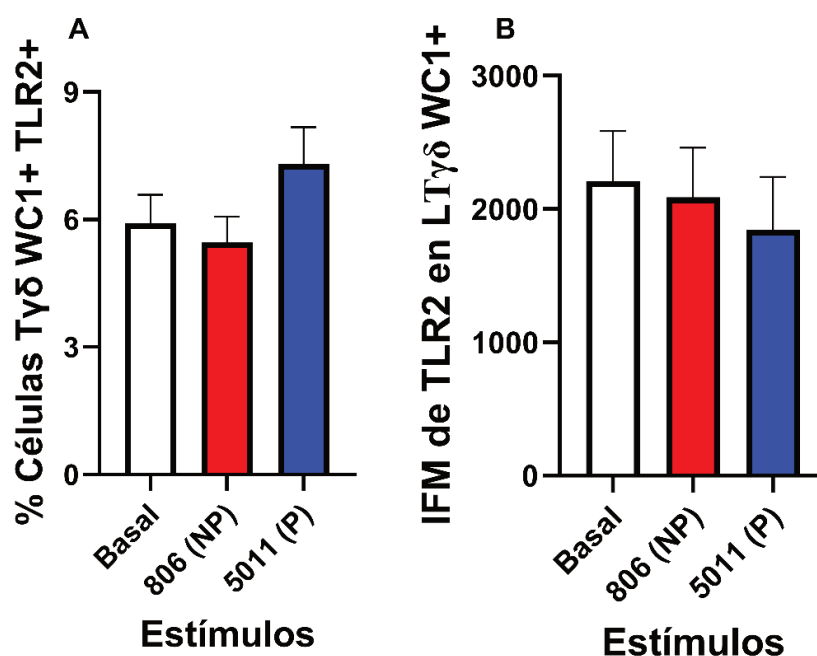


Figura 15. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan TLR2 y B) IFM de TLR2 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p<0,05$).

CMH-II

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan el marcador asociado a la presentación antigénica CMH-II ($T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺) luego del cultivo de CMN con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos de CMN basales ($p>0,05$) (Figura 16A).

No se observaron diferencias significativas en la IFM de CMH-II en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con los diferentes estímulos evaluados ($p>0,05$) (Figura 16B).

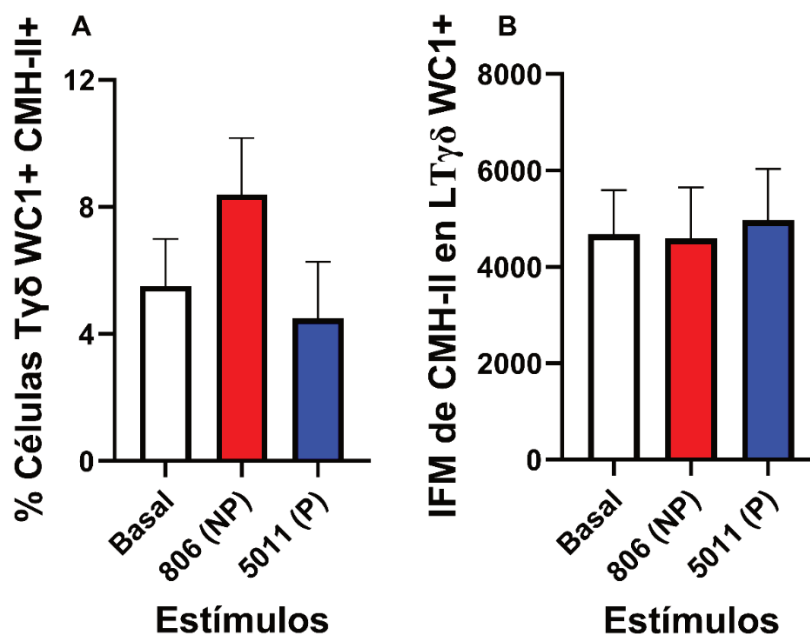


Figura 16. A) Porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ que expresan CMH-II y B) IFM de CMH-II en linfocitos Tγδ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CD80

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ que expresan la molécula coestimuladora CD80 (Tγδ WC1⁺ CD80⁺) luego del cultivo de CMN con ambas cepas de *S. aureus*, en comparación con el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD80⁺ en cultivos de CMN basales ($p < 0,05$). Además, cuando las CMN fueron co-cultivadas con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD80⁺ fue mayor comparado con el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD80⁺ provenientes de CMN co-cultivadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* ($p < 0,05$) (Figura 17A).

Por otro lado, se observó un aumento en la IFM de CD80 en linfocitos Tγδ WC1⁺ provenientes de CMN co-cultivadas con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con la IFM de CD80 en linfocitos Tγδ WC1⁺ provenientes de CMN basales ($p < 0,05$). Aunque la cepa 5011 (P) de *S. aureus* indujo un aumento en la IFM de CD80 en linfocitos Tγδ WC1⁺ respecto a los cultivos basales, esta diferencia no resultó significativa ($p > 0,05$) (Figura 17B).

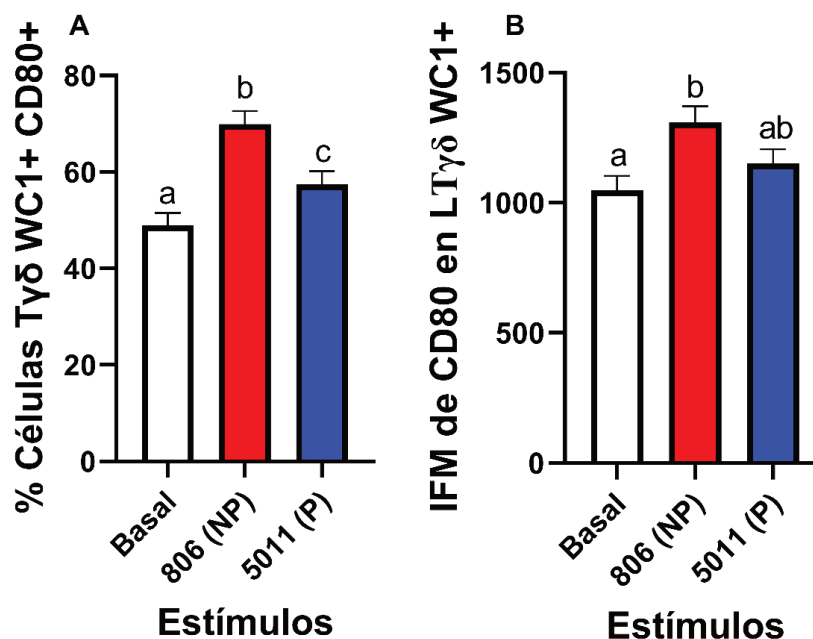


Figura 17. A) Porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ que expresan CD80 y B) IFM de CD80 en linfocitos Tγδ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CD86

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ que expresan la molécula coestimuladora CD86 (Tγδ WC1⁺ CD86⁺) luego del cultivo de CMN con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD86⁺ en cultivos de CMN basales ($p < 0,05$). En cambio, cuando CMN fueron co-cultivadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, si bien se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD86⁺ respecto a los cultivos basales, esta diferencia no resultó significativa ($p > 0,05$) (Figura 18A).

Por otro lado, no se observaron diferencias en la IFM de CD86 en linfocitos Tγδ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con los diferentes estímulos evaluados ($p > 0,05$) (Figura 18B).

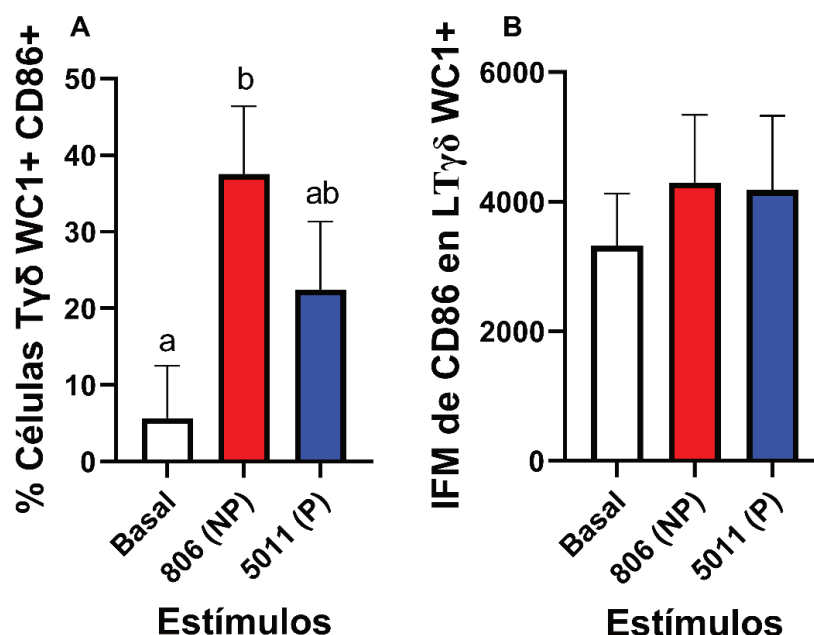


Figura 18. A) Porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ que expresan CD86 e B) IFM de CD86 en linfocitos Tγδ WC1⁺ luego del cultivo de CMN con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

4.1.2 Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II y CD80 en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados luego de la interacción *in vitro* con *S. aureus*.

CD25

Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados que expresan el marcador de activación CD25 (Tγδ WC1⁺ CD25⁺) tras la incubación con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con los porcentajes de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD25⁺ basales ($p < 0,05$). En cambio, cuando linfocitos Tγδ WC1⁺ fueron incubados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, si bien se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD25⁺ respecto al porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD25⁺ basales, esta diferencia no resultó significativa ($p > 0,05$) (Figura 19A).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la IFM de CD25 en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados luego del co-cultivo con ambas cepas de *S. aureus* en comparación con la IFM de CD25 correspondiente a linfocitos Tγδ WC1⁺ basales ($p > 0,05$) (Figura 19B).

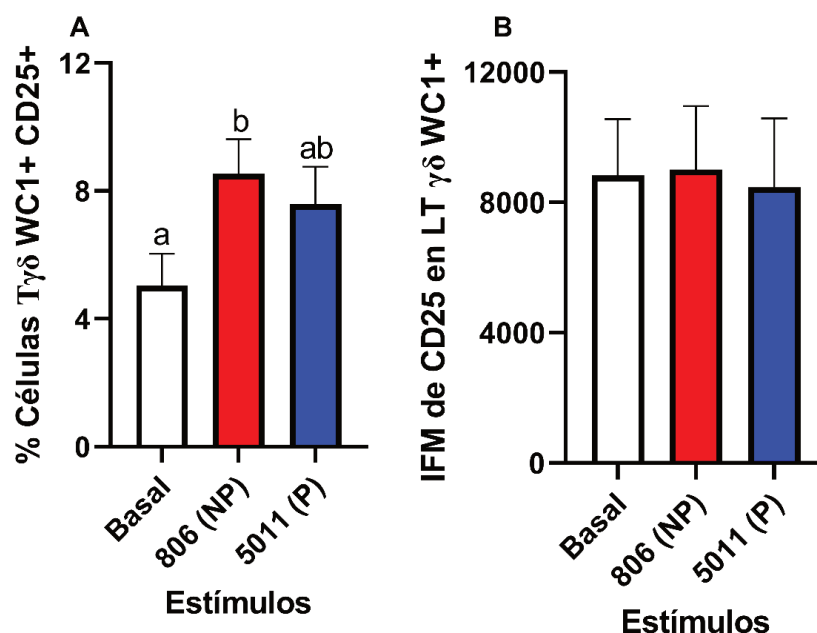


Figura 19. A) Porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados que expresan CD25 y B) IFM de CD25 en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media ± EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CD62L

Se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados que expresan el marcador de activación CD62L (Tγδ WC1⁺ CD62L⁺) tras la incubación con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, en comparación con los porcentajes de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD62L⁺ basales ($p < 0,05$). En cambio, cuando linfocitos Tγδ WC1⁺ fueron incubados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, si bien se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD62L⁺ respecto al porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ CD62L⁺ basales, esta diferencia no resultó ser significativa ($p > 0,05$) (Figura 20A).

Por otro lado, se observó un aumento significativo en la IFM de CD62L en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados luego de la incubación con ambas cepas de *S. aureus*, en comparación con la IFM de CD62L en linfocitos Tγδ WC1⁺ basales ($p < 0,05$) (Figura 20B).

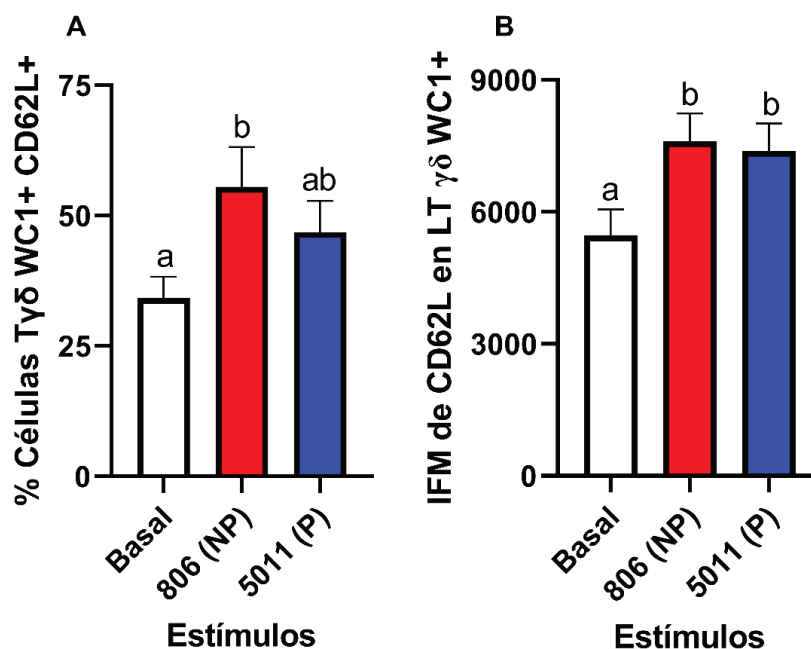


Figura 20. A) Porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados que expresan CD62L y B) IFM de CD62L en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

TLR2

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados que expresan el receptor innato TLR2 (Tγδ WC1⁺ TLR2⁺) tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 21A).

Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en la IFM de TLR2 en linfocitos Tγδ WC1⁺ purificados tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 21B).

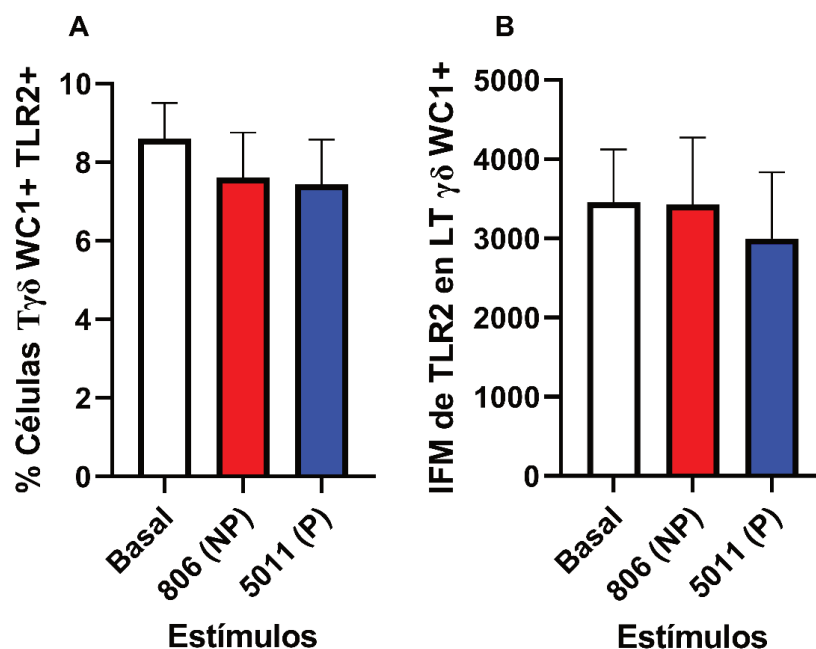


Figura 21. A) Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados que expresan TLR2 y B) IFM de TLR2 en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CMH-II

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados que expresan el marcador asociado a la presentación antigénica CMH-II (T $\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺) tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 22A).

No se observaron diferencias significativas en la IFM de CMH-II en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 22B).

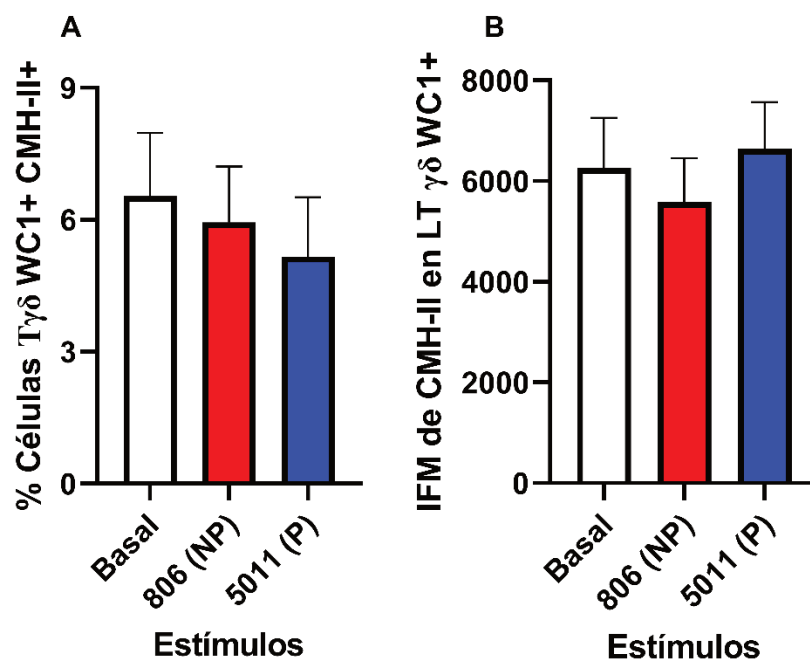


Figura 22. A) Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados que expresan CMH-II y B) IFM de CMH-II en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

CD80

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados que expresan la molécula coestimuladora CD80 (T $\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺) tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 23A).

No se observaron diferencias significativas en la IFM de CD80 en linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus* y cultivos basales ($p > 0,05$) (Figura 23B).

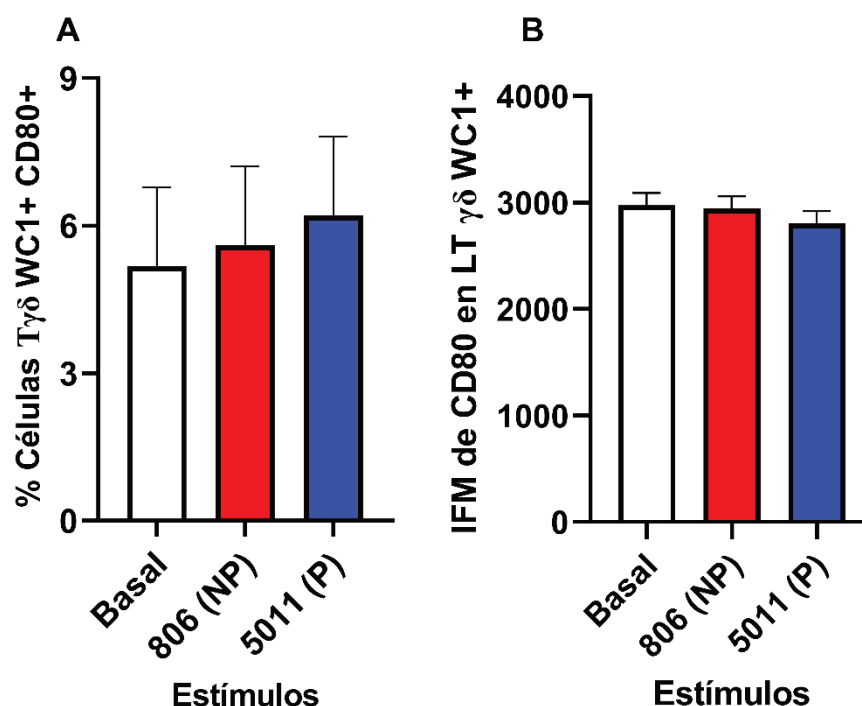


Figura 23. A) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados que expresan CD80 y B) IFM de CD80 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

4.2.1 Producción de citoquinas en la población de CMN totales, de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ y de CMN $\emptyset$ WC1⁺ luego del contacto *in vitro* con *S. aureus*

Se evaluaron los niveles de IFN- γ , IL-7A y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN $\emptyset$ WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* luego de 48 h de incubación mediante ELISA sandwich.

IFN- γ

Se observó un aumento en los niveles de IFN- γ en los cultivos de CMN totales en comparación con los niveles de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN $\emptyset$ WC1⁺, para cada cepa de *S. aureus* evaluada ($p < 0,05$). Es importante destacar que las mayores concentraciones de IFN- γ se observaron en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* (Figura 24).

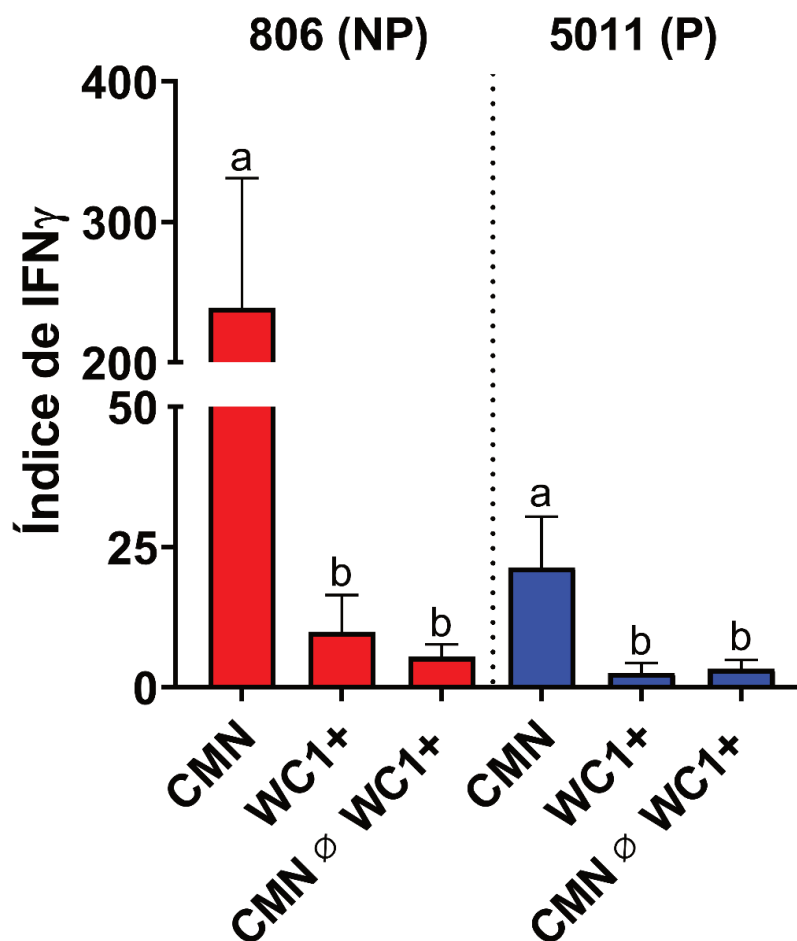


Figura 24. Índice de producción de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos de CMN totales, linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 $^{+}$ purificados y CMN $\emptyset$ WC1 $^{+}$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* luego de 48 h de incubación. Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

IL-17

Se observó un aumento en los niveles de IL-17 en los sobrenadantes de cultivos de CMN totales en comparación con los niveles de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1 $^{+}$ purificados y CMN $\emptyset$ WC1 $^{+}$, para cada cepa de *S. aureus* evaluada ($p < 0,05$). Es importante destacar que las mayores concentraciones de IL-17 se observaron en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* (Figura 25).

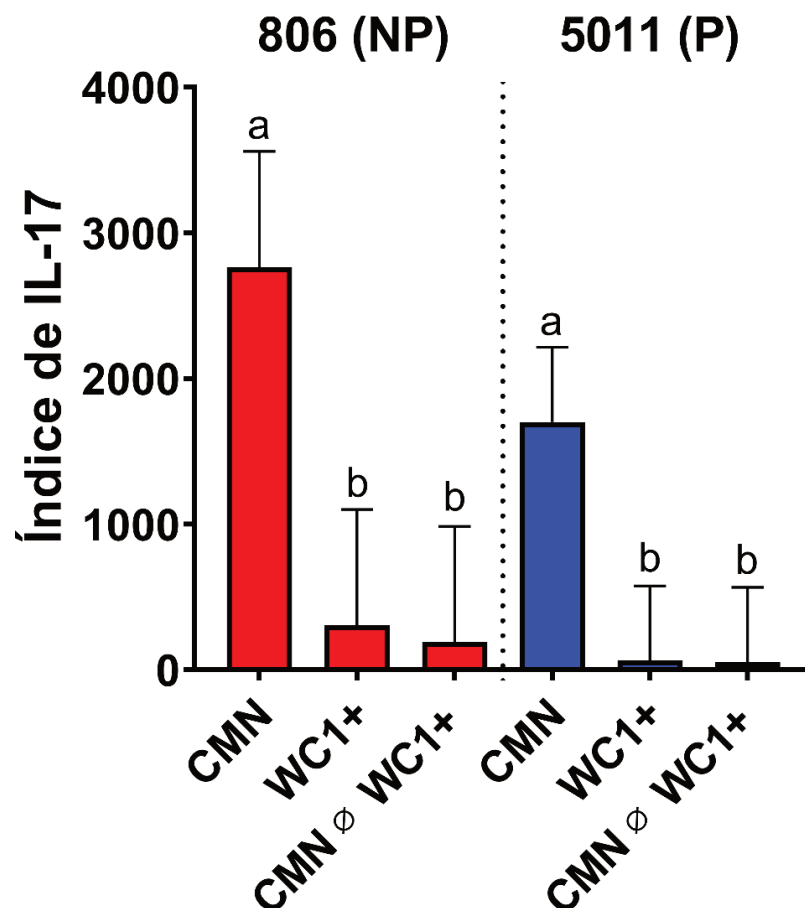


Figura 25. Índice de producción de IL-17 en sobrenadantes de cultivos de CMN totales, linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN Ø WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* luego de 48 h de incubación. Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

TNF- α

No se observaron diferencias significativas en los niveles de TNF- α entre los tres sistemas de cultivos para cada cepa de *S. aureus* evaluada ($p > 0,05$) (Figura 26).

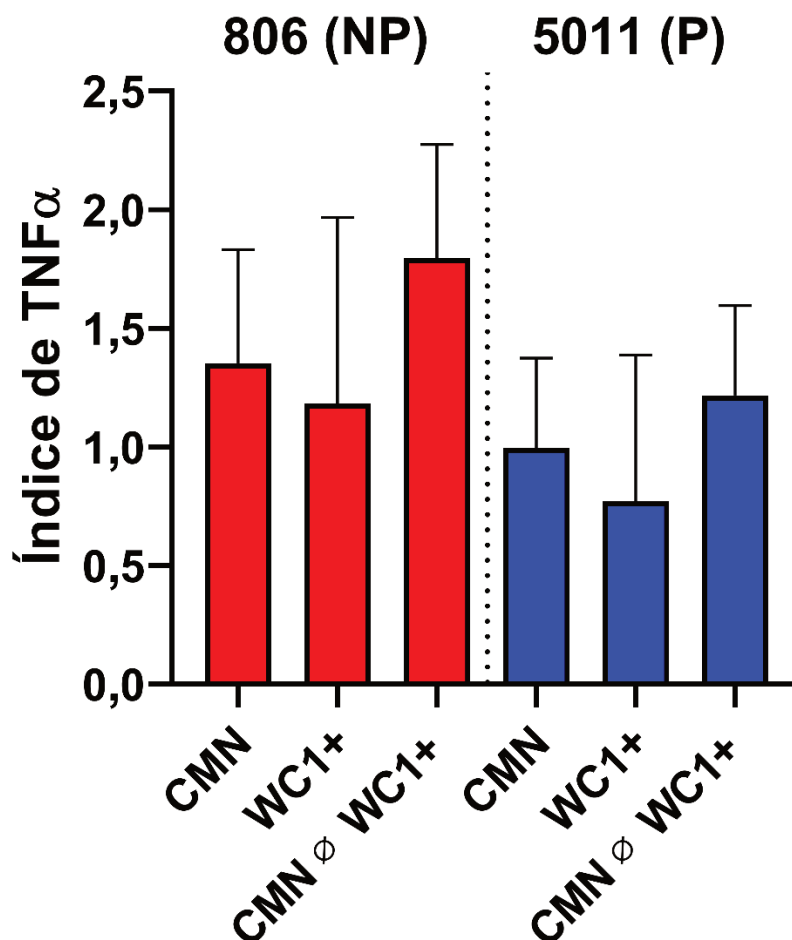


Figura 26. Índice de producción de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales, linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN Ø WC1⁺ con ambas cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* luego de 48 h de incubación. Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

Por último, la presencia de IL-4 e IL-10 no pudo detectarse en los sobrenadantes de cultivo de CMN totales, linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN Ø WC1⁺, dentro del rango de concentraciones evaluado, en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas.

4.3.1. Expresión proteica de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos luego de la interacción *in vitro* de CMN y CMN Ø WC1⁺ con *S. aureus*

Se evaluó el porcentaje de monocitos-macrófagos (células CD14⁺) y el porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan las moléculas asociadas a la función de presentación antigénica (CMH-II y CD80) luego de cultivar durante 24 h la población total de CMN y CMN Ø WC1⁺ en medio de cultivo solo (basal) o con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* inactivadas por calor. Se evaluó, además, el promedio de moléculas de cada uno de los marcadores que expresa cada monocito-macrófago, utilizando el parámetro de IFM.

CD14

Se observó una disminución en el porcentaje de monocitos-macrófagos luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con el porcentaje de monocitos-macrófagos en cultivos basales, tanto en los cultivos de CMN como en los cultivos de CMN $\emptyset$ WC1⁺ ($p < 0,05$) (Figura 27).

Por otro lado, se observó una disminución significativa en el porcentaje de monocitos-macrófagos en los cultivos de CMN $\emptyset$ WC1⁺ incubados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con los cultivos de CMN sometidos a las mismas condiciones experimentales ($p < 0,001$ y $p = 0,009$ respectivamente) (Figura 27).

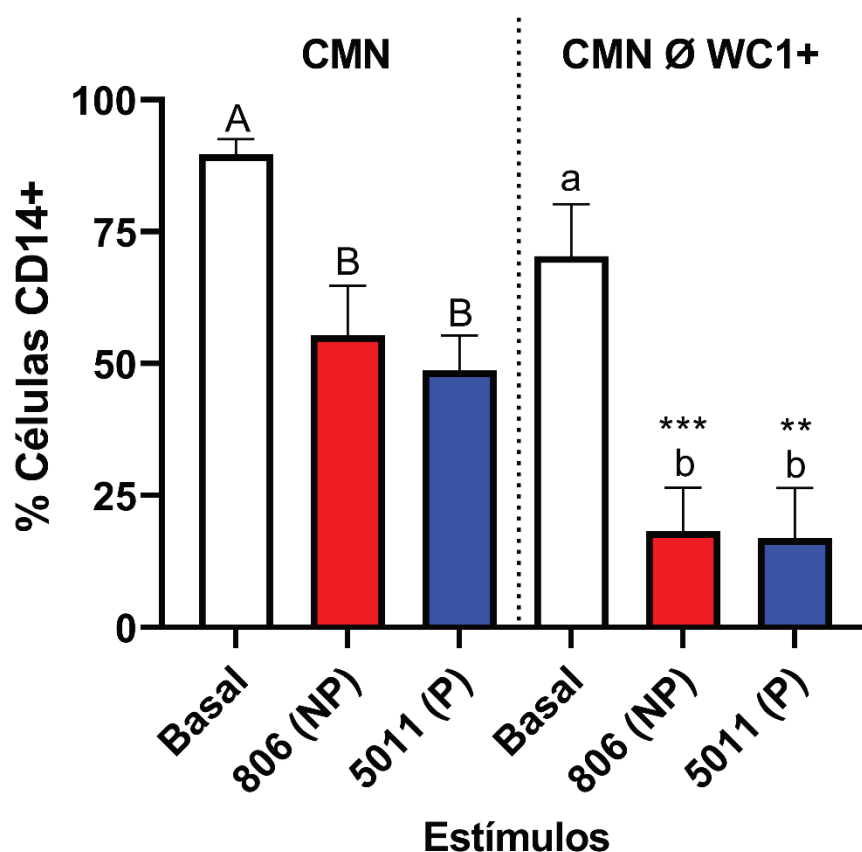


Figura 27. Porcentaje de monocitos-macrófagos (células CD14⁺) luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales para cada tipo celular ($p < 0,05$). Los asteriscos representan diferencias significativas entre los cultivos de CMN y de CMN $\emptyset$ WC1⁺ para cada condición experimental (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

CMH-II

No se observaron diferencias en el porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan el marcador asociado a la presentación antigénica CMH-II ($CD14^+$ CMH-II $^+$) luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y cultivos basales, tanto en los cultivos de CMN como en los cultivos de CMN $\emptyset$ WC1 $^+$ ($p > 0,05$) (Figura 28).

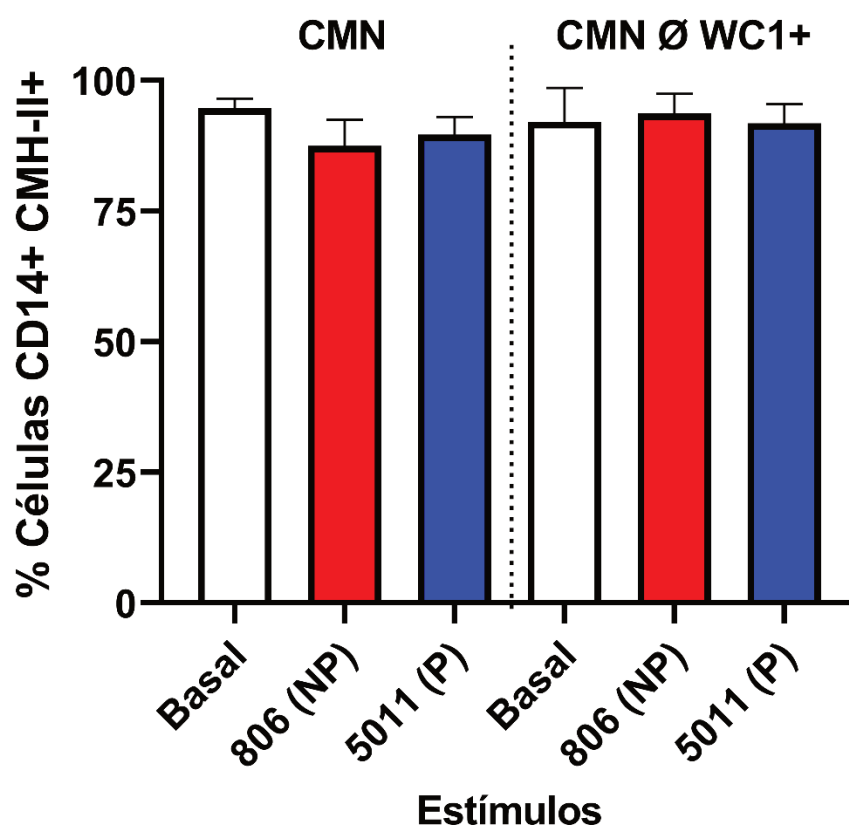


Figura 28. Porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan la molécula del CMH-II luego del cultivo de CMN y CMN $\emptyset$ WC1 $^+$ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado.

No se observaron diferencias en la IFM de CMH-II en monocitos-macrófagos luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y cultivos basales, tanto en los cultivos de CMN como en los cultivos de CMN $\emptyset$ WC1 $^+$ ($p > 0,05$) (Figura 29).

Sin embargo, se observó una disminución significativa en la IFM de CMH-II en monocitos-macrófagos de los cultivos de CMN $\emptyset$ WC1 $^+$ incubados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con los cultivos de CMN sometidos a la misma condición experimental ($p < 0,001$) (Figura 29).

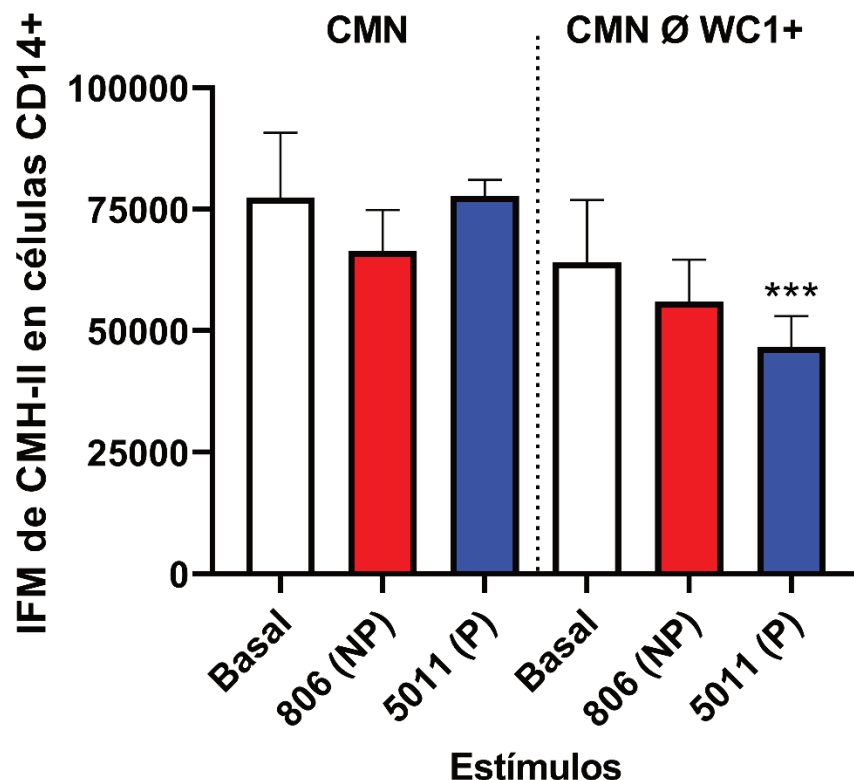


Figura 29. IFM de CMH-II en monocitos-macrófagos luego del cultivo de CMN y CMN Ø WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Los asteriscos representan diferencias significativas entre los cultivos de CMN y de CMN Ø WC1⁺ para cada condición experimental (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

CD80

Se observó un aumento en el porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan la molécula coestimuladora CD80 (CD14⁺ CD80⁺) luego del cultivo con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con el porcentaje de monocitos-macrófagos CD80⁺ en cultivos basales e incubados con la cepa 806 (NP), tanto en los cultivos de CMN como en los cultivos de CMN Ø WC1⁺ ($p < 0,05$) (Figura 30).

Por otro lado, el porcentaje de monocitos-macrófagos CD80⁺ fue mayor en los cultivos de CMN Ø WC1⁺ incubados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, así como en los cultivos basales de CMN Ø WC1⁺, en comparación con los cultivos de CMN en las mismas condiciones experimentales ($p < 0,001$; $p < 0,001$ y $p < 0,042$ respectivamente) (Figura 30).

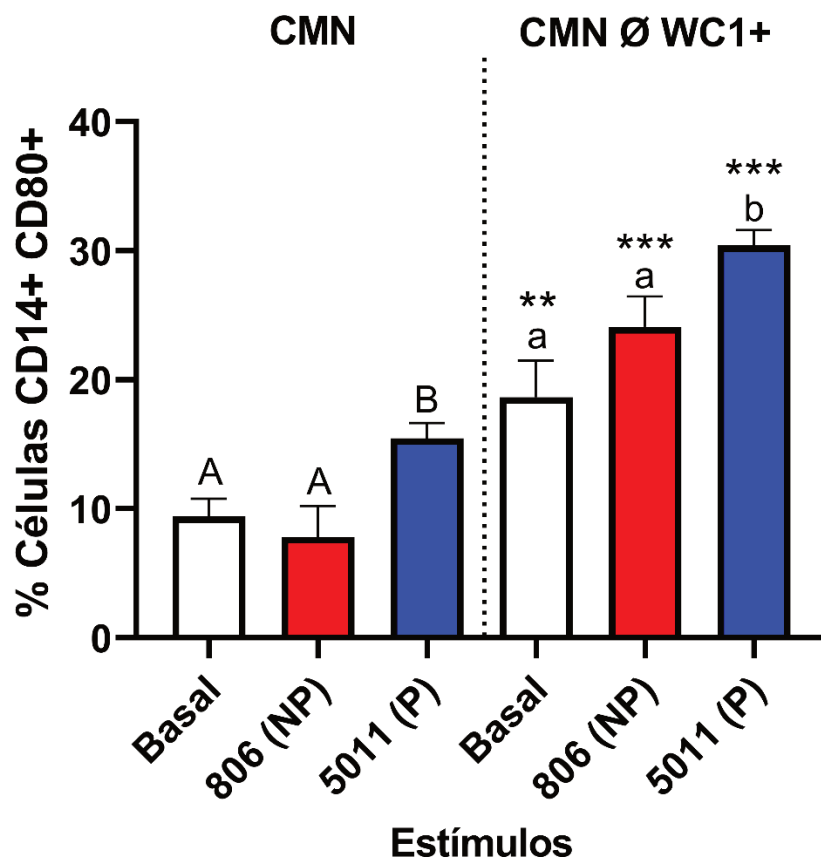


Figura 30. Porcentaje de monocitos-macrófagos que expresan CD80 luego del cultivo de CMN y CMN Ø WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales para cada tipo celular ($p < 0,05$). Los asteriscos representan diferencias significativas entre los cultivos de CMN y de CMN Ø WC1⁺ para cada condición experimental (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$).

No se observaron diferencias en la IFM de CD80 en monocitos-macrófagos luego del cultivo con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y cultivos basales, tanto en los cultivos de CMN como en los cultivos de CMN Ø WC1⁺ ($p > 0,05$) (Figura 31).

No se observaron diferencias en la IFM de CD80 en monocitos-macrófagos de los cultivos de CMN Ø WC1⁺ basales, en comparación con los cultivos de CMN en la misma condición experimental ($p > 0,005$) (Figura 31).

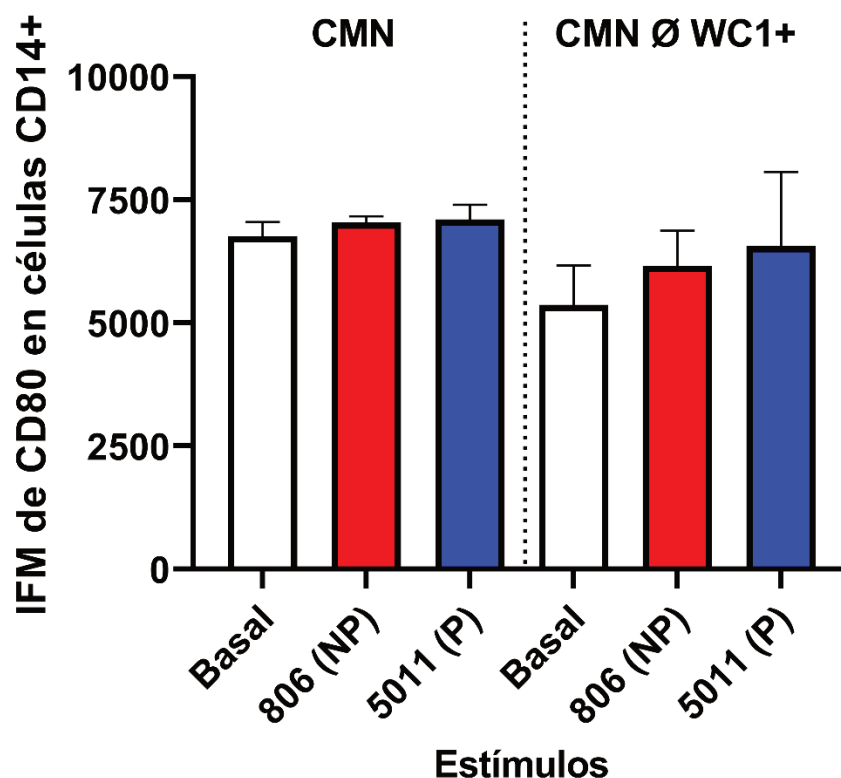


Figura 31. IFM de CD80 en monocitos-macrófagos luego del cultivo de CMN y CMN Ø WC1⁺ con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* o medio solamente (células basales). Las barras representan la media $\pm$ EEM para cada estímulo evaluado.

4.4.1 Modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de *S. aureus*

Monitoreo de la infección intramamaria y aislamientos microbiológicos

Los aislamientos e identificación bacteriana se realizaron a partir de muestras de leche provenientes de cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pi. Los resultados se detallan en la Tabla 5. En los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* se aislaron colonias de 3-4 mm de diámetro, amarillentas y con doble halo de hemólisis, compatibles con *S. aureus*.

En el cuarto AD del animal 1, se registraron aislamientos positivos al día 1 (5000 UFC/ml), día 2 (1500 UFC/ml) y día 3 (500 UFC/ml) pi. Luego, a los 4 y 7 días pi, el cultivo microbiológico fue negativo; mientras que a los 14 y 21 días pi se observó aislamiento positivo (100 y 300 UFC/ml, respectivamente). En estos últimos tiempos, la morfología de las colonias fue similar a la observada durante los primeros días pi. Las pruebas bioquímicas complementarias confirmaron la presencia de *S. aureus* en los cuartos mamarios inoculados, y el análisis por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) demostró que las colonias recuperadas correspondían a la misma cepa original inoculada (cepa 806) (Figura 32). En el mismo animal (animal 1), el cuarto PI

presentó aislamiento positivo a los días 1, 2 y 3 pi (1500, 500 y 500 UFC/ml, respectivamente). En el animal 2, solo se detectó aislamiento positivo en el cuarto AD al día 1 pi (300 UFC/ml). En los cuartos AD y PI del animal 3 no se obtuvieron aislamientos microbiológicos positivos en ninguno de los tiempos evaluados. En el animal 4, el cuarto AD mostro aislamiento positivo a los días 1 y 2 pi (300 y 1500 UFC/ml, respectivamente), mientras que el cuarto PI permaneció negativo durante todo el periodo de seguimiento. Es importante destacar que, entre el día 1 y 7 pi, tanto en los cuartos con aislamiento microbiológico positivo como en aquellos con aislamiento negativo, se observó un score 1 de mastitis, caracterizados por la presencia de pequeños grumos en la leche sin signos inflamatorios aparentes a la palpación de la GM (Tabla 5).

Por otro lado, el cultivo microbiológico de las muestras de leche obtenidas de cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* mostró desarrollo de colonias de 4-5 mm de diámetro, ligeramente amarillentas y con doble halo de hemólisis, compatibles con *S. aureus*, a los 14 días pi en todos los cuartos evaluados, con un recuento promedio de 360 UFC/ml. Además, se observó desarrollo de colonias al día 7 pi en el cuarto AD (250 UFC/ml) y en el cuarto PI (200 UFC/ml) del animal 5, así como a los 21 días pi en el cuarto PI (200 UFC/ml) del animal 6 y del animal 7 (100 UFC/ml). Las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *S. aureus* en todos los aislamientos y el análisis por PFGE corroboró que las colonias recuperadas correspondían a la misma cepa original (5011) inoculada (Figura 32). Es importante destacar que en los animales inoculados con la cepa 5011 (P), sólo se observó un score 1 de mastitis en dos cuartos PI de los animales 6 y 7 a los 14 d pi, caracterizados por pequeños grumos en la leche sin presencia de signos inflamatorios locales (Tabla 5).

Finalizado el ensayo (21 días pi), y con el objetivo de realizar un seguimiento de la IIM, se tomaron muestras de leche para cultivo microbiológico de los cuartos inoculados con las cepas de *S. aureus* 806 (NP) y 5011 (P) durante 5 semanas con intervalos de 7 días. No se detectó crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras tomadas de vacas inoculadas con la cepa 806 de *S. aureus* (NP). En contraste, en los animales inoculados con la cepa 5011 (P), se aislaron colonias de *S. aureus* del cuarto PI del animal 5 a los 28 y 42 días pi, del cuarto AD del animal 6 a los 28, 42 y 49 días pi y del cuarto PI del mismo animal a los 28, 35 y 56 días pi. En todos estos casos, los aislamientos se produjeron en ausencia de cambios macroscópicos en la leche o signos aparentes de inflamación, correspondiendo a un puntaje de mastitis 0. La identidad de los aislamientos fue confirmada mediante pruebas bioquímicas estándar y análisis por PGFE, confirmándose la identidad del pulsotipo original inoculado.

Tabla 5: Aislamientos microbiológicos de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (NP) de *S. aureus* a diferentes tiempos post inoculación.

Cepa (animal – cuarto inoculado)	Aislamientos Microbiológicos (UFC/ml) a diferentes tiempos post inoculación													
	0	0.5 d	1 d	2 d	3 d	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d
806 (NP) (Animal 1 AD)	(-) (0)	(-) (0)	5000 (1)	1500 (1)	500 (1)	(-) (1)	(-) (1)	100 (0)	300 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 1 PI)	(-) (0)	(-) (0)	1500 (1)	500 (1)	500 (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 2 AD)	(-) (0)	(-) (0)	300 (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 2 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 3 AD)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 3 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 4 AD)	(-) (0)	(-) (0)	300 (1)	1500 (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
806 (NP) (Animal 4 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (1)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 5 AD)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	250 (0)	380 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 5 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	200 (0)	320 (0)	(-) (0)	250 (0)	(-) (0)	100 (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 6 AD)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	400 (0)	(-) (0)	400 (0)	(-) (0)	250 (0)	100 (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 6 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	500 (1)	200 (0)	150 (0)	200 (0)	(-) (0)	(-) (0)	150 (0)
5011 (P) (Animal 7 AD)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	200 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 7 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	360 (1)	100 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 8 AD)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	340 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)
5011 (P) (Animal 8 PI)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	380 (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)	(-) (0)

AD: Anterior derecho. PI: Posterior izquierdo. (-) Aislamiento microbiológico negativo para *S. aureus*: Score (0) = sin cambios macroscópicos en leche ni signos inflamatorios en la glándula; Score (1) = con cambios macroscópicos en leche sin signos inflamatorios en la glándula (Middleton *et al.*, 2004).

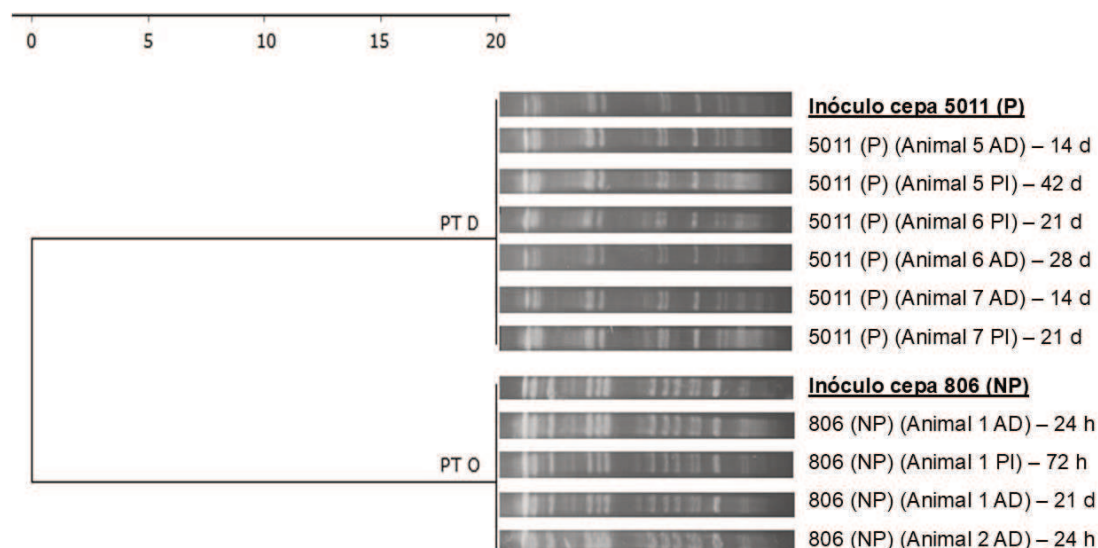


Figura 32. Patrones de bandas representativos obtenidos mediante ADN digerido con *SmaI* y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* aisladas de leche durante diferentes periodos tras la exposición. AD: Cuarto anterior derecho. PI: Cuarto posterior izquierdo. PT: Pulsotipo.

Finalmente, el cultivo microbiológico de las muestras de leche obtenidas de los cuartos mamarios de los 4 animales inoculados con solución fisiológica no evidenció desarrollo bacteriano ni cambios macroscópicos en la leche o signos de inflamación aparentes en ninguno de los tiempos de muestreos evaluados.

Recuento de células somáticas

Los resultados del RCS en leche para cada tiempo de muestreo en los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica se muestran en la figura 33. Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo ($p < 0,001$), encontrándose diferencias en el RCS entre cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011(P) de *S. aureus* y cuartos controles.

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) se observó un pico en el RCS al día 2 pi, alcanzando un promedio de $3,7 \times 10^6$ cél/ml que fue significativamente mayor al observado en cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) y cuartos controles ($p < 0,05$). Estos valores disminuyeron gradualmente hasta el día 7 pi, pero se mantuvieron superiores a los RCS de los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) y controles ($p < 0,05$). A partir del día 7 pi se produjo un marcado descenso en el RCS de los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* hasta llegar a valores basales al día 21 pi.

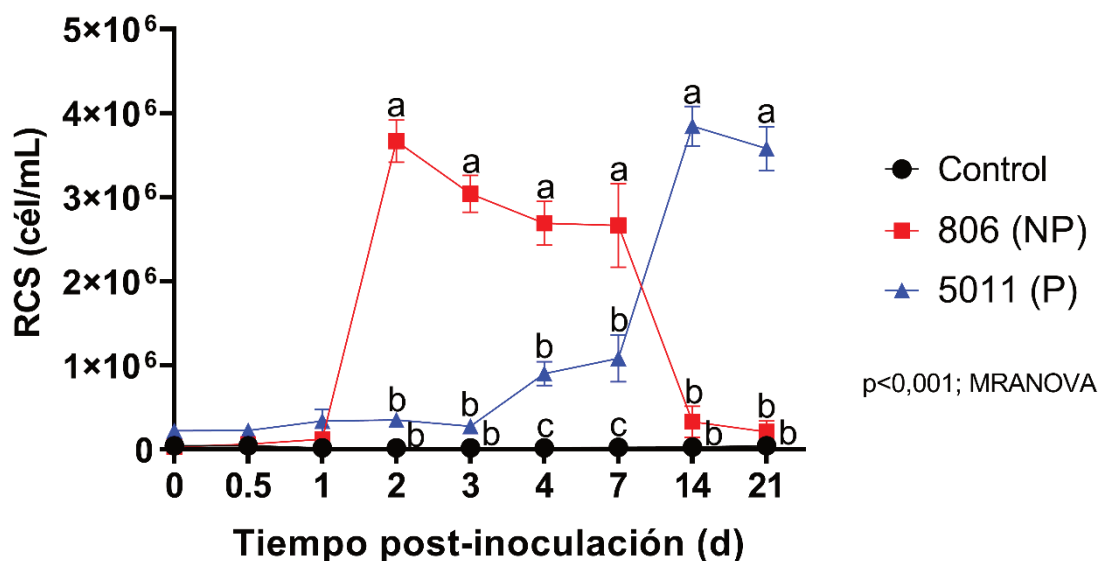


Figura 33. RCS de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ error estándar de la media (EEM). Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$.

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron variaciones en el RCS de leche hasta el día 3 pi. Al día 4 pi se observó un incremento en el RCS, el cual se mantuvo hasta el día 7 pi. Si bien estos valores fueron mayores que los RCS de leche provenientes de cuartos controles ($p < 0,05$), no lograron alcanzar los valores obtenidos en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. Al día 14 pi se alcanzaron los máximos valores en los RCS de leche provenientes de cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* ($3,8 \times 10^6$ cél/ml) y se mantuvieron elevados al día 21 pi ($p < 0,05$).

En los cuartos mamarios controles no se observaron variaciones en el RCS en leche durante los tiempos de muestreo evaluados (RCS promedio $3,06 \times 10^4$ células/ml).

Evaluación de la presencia de *S. aureus* intracelular a nivel local

Se evaluó la presencia de *S. aureus* en el interior de las células de leche en los citoespines obtenidos a partir de *pooles* de muestras leche. En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, se detectaron bacterias, con morfología de cocos, teñidas en el citoplasma de macrófagos de leche al día 2 pi (Figura 34A). En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se observó la presencia de bacterias, con morfología de cocos, teñidas en el citoplasma de macrófagos de leche al día 14 pi (Figura 34B).

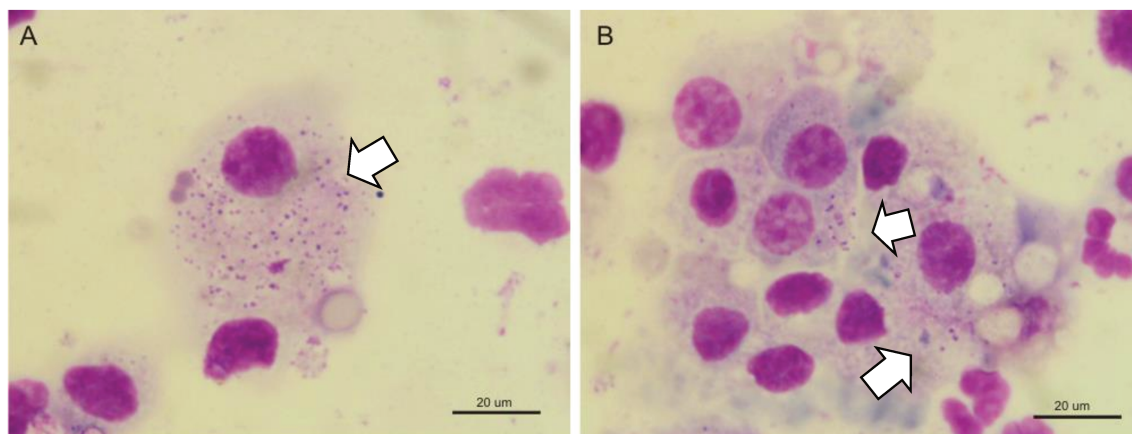


Figura 34. Microscopía óptica de citoespines obtenidos a partir de muestras de leche provenientes de cuartos mamarios inoculados con las cepas (A) 806 (NP) y (B) 5011 (P) de *S. aureus*. Las flechas indican bacterias (cocos) localizadas en el citoplasma de los macrófagos. Tinción de May-Grünwald Giemsa. Magnificación 1000x.

4.4.2 Frecuencia de poblaciones celulares inmunes sistémicas

Se evaluaron los porcentajes de células $CD14^+$ (monocitos-macrófagos), células $WC1^+$ (linfocitos T $\gamma\delta$), células $CD21^+$ (linfocitos B), células $CD3^+ CD4^+$ (linfocitos T $CD4$ colaboradores) y células $CD3^+ CD8^+$ (linfocitos T $CD8$ citotóxicos) en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica (Figura 35). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en ninguna de las poblaciones evaluadas ($p=0,895$ para monocitos-macrófagos; $p=0,184$ para linfocitos T $\gamma\delta$ $WC1^+$; $p=0,215$ para linfocitos B; $p=0,461$ para linfocitos T *helper* y $p=0,573$ para linfocitos T citotóxicos).

En relación de las células $CD14^+$ (Figura 35A), si bien en los animales inoculados con la cepa 806 de *S. aureus* (NP) se observó una disminución en el porcentaje de estas células a los días 1 y 2 pi, seguida de un aumento a los días 3 y 4 pi en comparación con los animales controles, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). De manera similar, en los animales inoculados con la cepa 5011 de *S. aureus* (P) se observó un aumento en el porcentaje de células $CD14^+$ a los días 2 y 4 pi en comparación con los animales controles, esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). En los animales controles, los porcentajes de células $CD14^+$ fueron similares durante todo el período de muestreo.

En cuanto a la población de linfocitos T $\gamma\delta$ $WC1^+$ (Figura 35B), en los animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* se observó un aumento significativo en el porcentaje de estas células innatas al día 0,5 (12 h) pi en comparación con los otros grupos experimentales ($p<0,05$). Si bien los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ $WC1^+$ comenzaron a disminuir al día 1 pi, se observó un porcentaje mayor de estas células innatas en los animales inoculados con la cepa 806 (NP) en

comparación con los animales control; sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p=0,059$). Desde el día 2 pi y hasta finalizado el ensayo, los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ fueron similares entre los tres grupos experimentales ($p>0,05$). En los animales control, los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ se mantuvieron similares durante todo el período de muestreo.

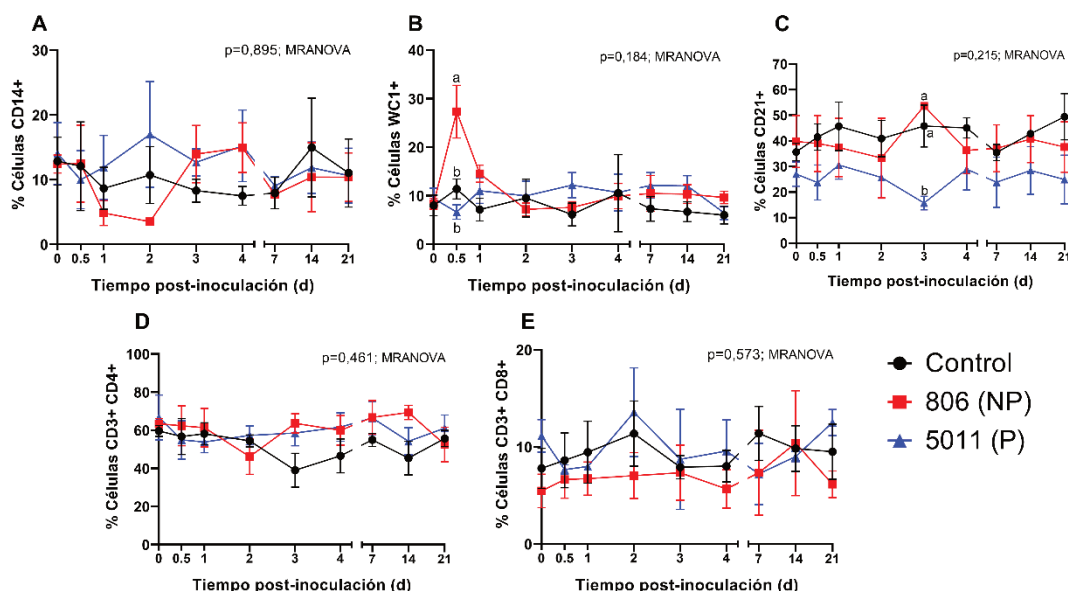


Figura 35. Frecuencia de poblaciones celulares inmunes de sangre periférica. A) Porcentaje de células CD14⁺, B) Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺, C) Porcentaje de linfocitos CD21⁺, D) Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y E) Porcentajes de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos infectados y control en el mismo punto temporal ($p<0,05$). Los puntos temporales donde no se especifican letras indican valores $p>0,05$.

En relación a los linfocitos B (Figura 35C), en los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, se observó una disminución significativa en el porcentaje de estas células al día 3 pi en comparación con los demás grupos experimentales ($p<0,05$). En cambio, en los animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* y en los animales control, los porcentajes de linfocitos B fueron similares durante todo el periodo de muestreo.

Respecto a los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de estas poblaciones celulares entre los diferentes grupos experimentales a lo largo del periodo de muestreo (Figuras 35D y 35E).

4.4.3 Estudio de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ activados a nivel sistémico

Con base en el análisis de las poblaciones de células inmunes sanguíneas, en esta tesis se profundizó el estudio de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ con el objetivo de evaluar su posible participación en la respuesta inmune frente a las infecciones por *S. aureus*.

Se evaluaron los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ activados (que expresan CD25) en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, y de animales controles a diferentes tiempos de muestreo (Figura 36). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo ($p=0,349$).

Si bien en los animales inoculados con ambas cepas de *S. aureus* se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ activados entre el día 0,5 y el día 3 pi, en comparación con los porcentajes de estas células innatas activadas en animales controles, estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$). En los animales del grupo control, el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ activados fue similar durante todo el período de estudio.

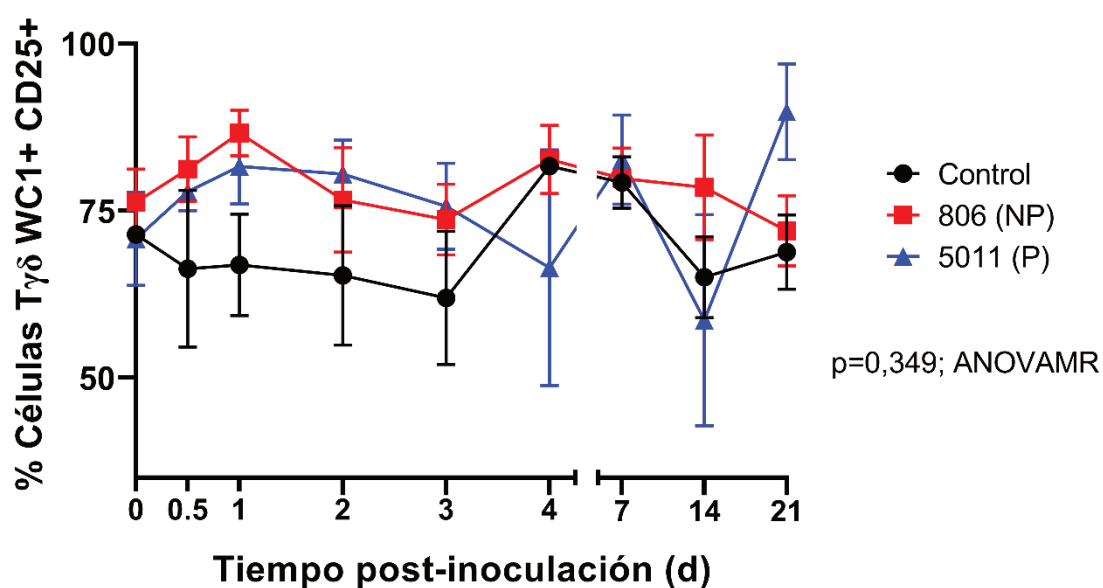


Figura 36. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD25⁺ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

Se evaluó expresión de CD25 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ mediante el análisis del parámetro de IFM, el cual brinda una estimación del nivel promedio de expresión de CD25 por linfocito. Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo sobre los valores

de IFM de CD25 en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ sistémicos provenientes de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, así como de animales controles a diferentes tiempos de muestreo ($p=0,032$) (Figura 37).

En los animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, se observó un aumento significativo de la IFM de CD25 en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ al día 1 pi en comparación con el grupo control ($p<0,05$). Aunque la IFM de CD25 en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ permaneció elevada el día 2 pi en estos animales en comparación con los animales controles, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,083$).

Por su parte, en los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se observó un aumento de la IFM de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ entre el día 0,5 (12 h) y 4 pi, en comparación con los animales controles, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). En los animales controles, los valores de IFM de CD25 en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ se mantuvieron similares durante todo el período de muestreo.

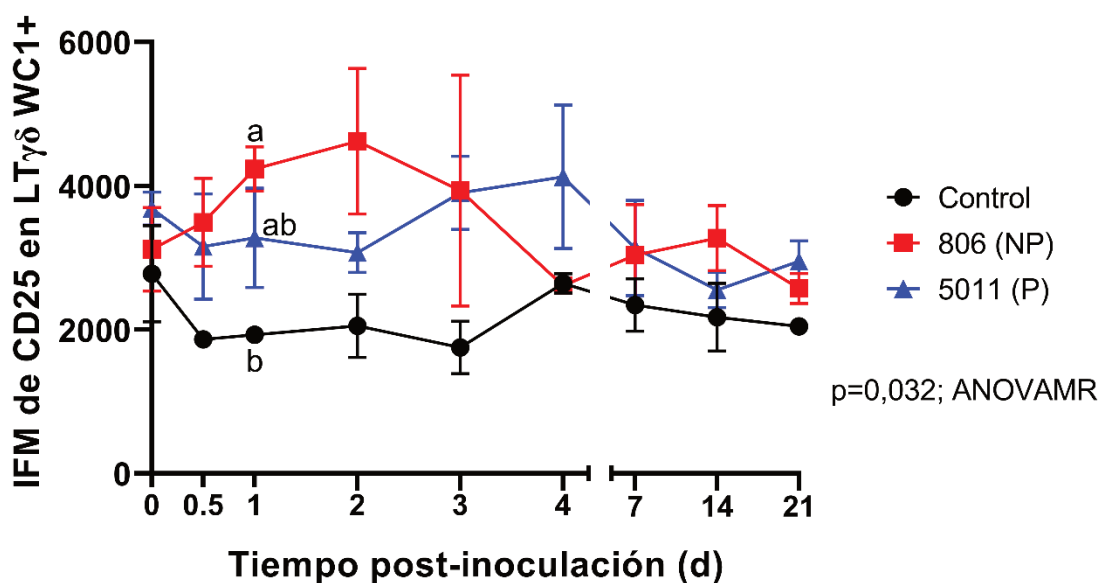


Figura 37. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD25 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

4.4.4 Evaluación de marcadores relacionados con la función de presentación antigénica en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ sistémicos

CD80

Se evaluó el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica que expresan la molécula coestimuladora CD80 (linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺) provenientes de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 38). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p=0,326$).

Adicionalmente, cuando se realizó un análisis (ANOVA) comparando únicamente el grupo experimental inoculado con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* a lo largo del tiempo, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ a partir del día 1 pi hasta el día 2 pi donde se observó el menor porcentaje de estas células en sangre periférica con respecto a su tiempo 0 (pre-i) ($p<0,05$). El día 3 pi el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ incrementó y se mantuvo constante hasta el día 21 pi ($p>0,05$).

En los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron variaciones que denoten estadísticas significativas en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ a lo largo de todos los tiempos de muestreo evaluados ($p>0,05$).

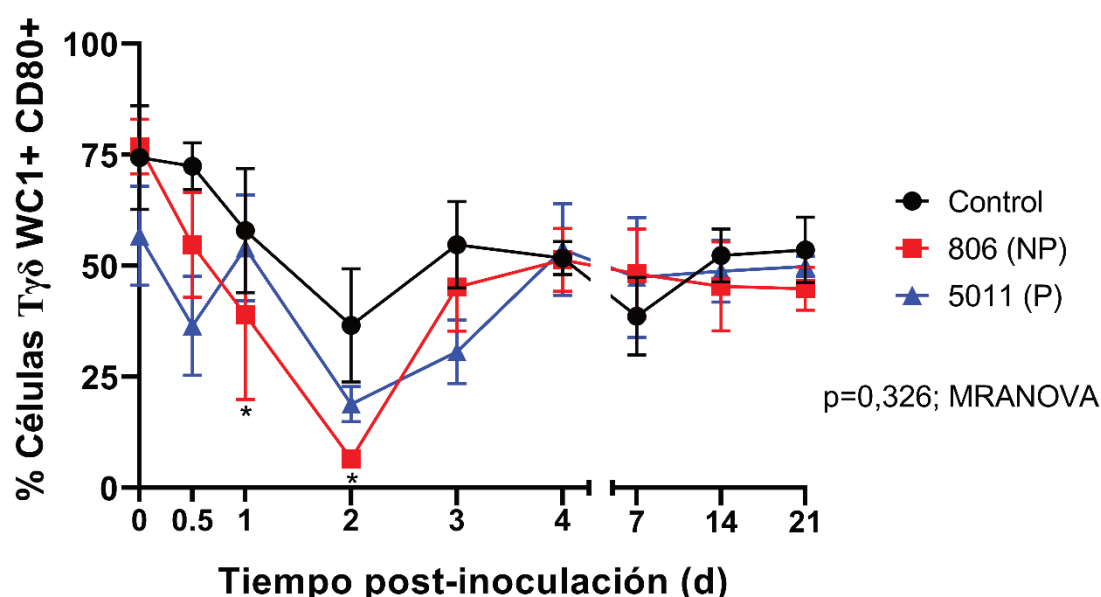


Figura 38. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las

líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$. *: diferencias significativas entre el tiempo 0 pre-i y el resto de los tiempos de muestreo para el grupo inoculado con la cepa 806 (NP) ($p < 0,05$).

Paralelamente, se evaluó la IFM de CD80 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 39). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo sobre los valores de IFM de CD80 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p = 0,735$). Sin embargo, el día 4 pi, la IFM de CD80 en los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ fue mayor en los animales inoculados con la cepa 5011 de *S. aureus* (P) en comparación con los inoculados con la cepa 806 de *S. aureus* (NP) ($p < 0,05$).

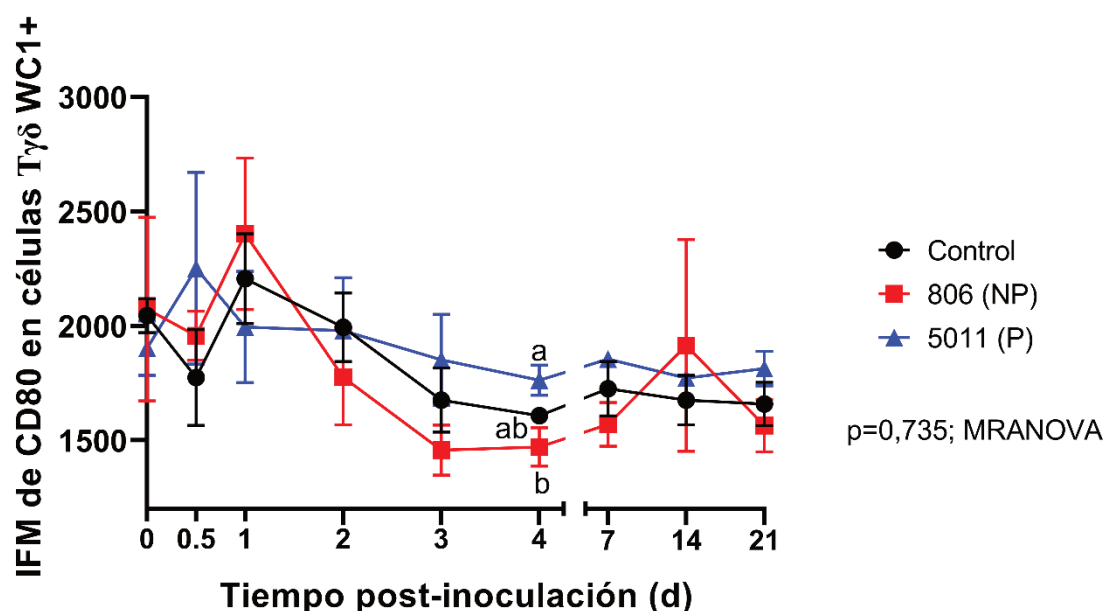


Figura 39. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD80 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$.

CD86

Se evaluó el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan la molécula coestimuladora CD86 (linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺CD86⁺) de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución

fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 40). Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD86^+$ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p<0,001$).

Dado que el ANOVA de medidas repetidas arrojó un valor de p estadística significativo ($p<0,001$), posteriormente se realizó un ANOVA por tiempo (día) para evaluar en qué momento del muestreo post infección se hallaron esas diferencias estadísticas.

En los animales inoculados con la cepa 806 (NP) los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD86^+$ sistémicos fueron similares a los porcentajes observados en el grupo control a lo largo del tiempo de muestreo ($p>0,05$).

En los animales inoculados con la cepa 5011 (P) se observó una disminución en el porcentaje de estas células innatas que expresan $CD86^+$ al día 21 pi con respecto a los demás grupos experimentales ($p<0,05$).

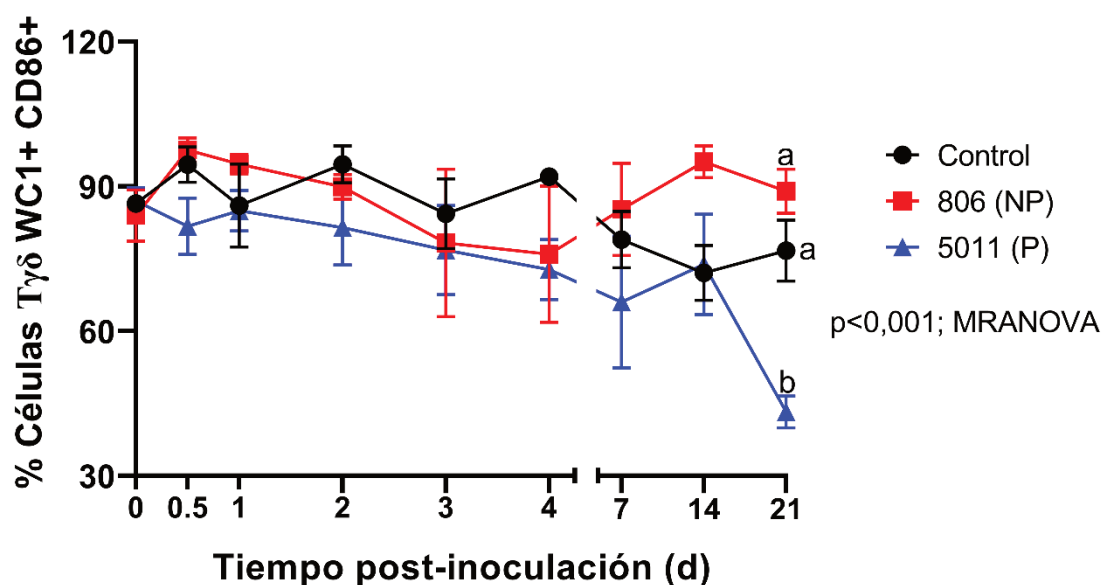


Figura 40. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ $CD86^+$ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

Paralelamente, se evaluó la IFM de $CD86$ en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 41). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo sobre los valores

de IFM de CD86 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p=0,293$). Sin embargo, el día 21 pi, la IFM de CD86 en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ fue mayor en los animales inoculados con la cepa 806 de *S. aureus* (NP) en comparación con los del grupo control ($p<0,05$).

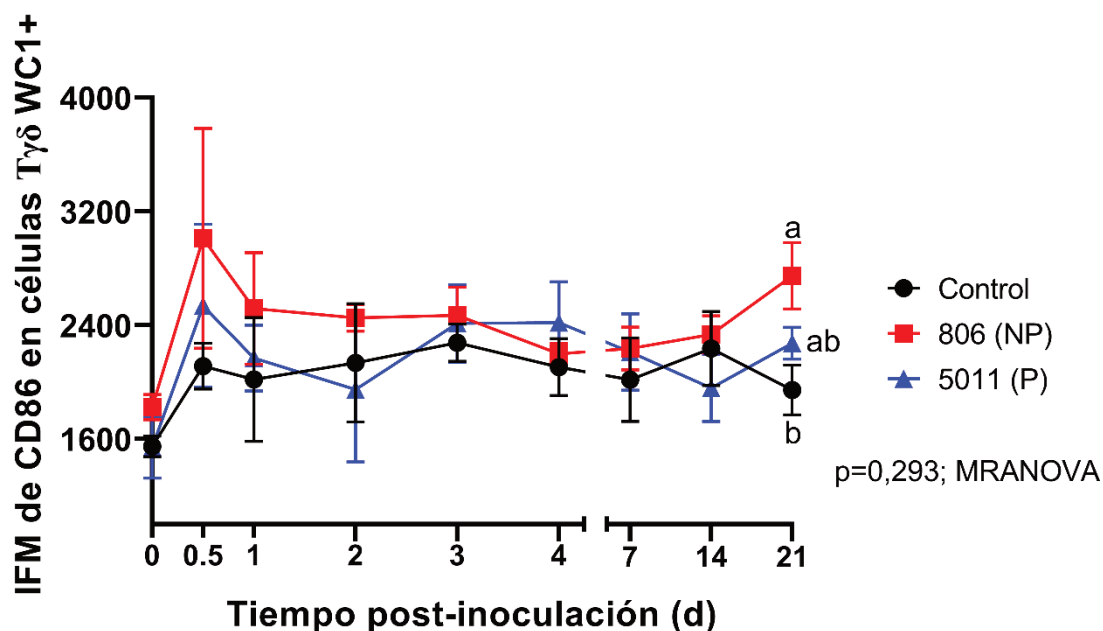


Figura 41. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD86 en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0,5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

CMH-II

Se evaluó el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CMH-II (linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺) de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 42). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p=0,891$).

Adicionalmente, cuando se realizó un análisis (ANOVA) comparando únicamente el grupo experimental inoculado con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* a lo largo del tiempo, se observó una disminución en los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺ a partir del día 2 pi hasta el día 21 pi con respecto a su tiempo 0 (pre-i) ($p<0,05$).

En los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron diferencias en los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺ a lo largo del tiempo de muestreo ($p>0,05$).

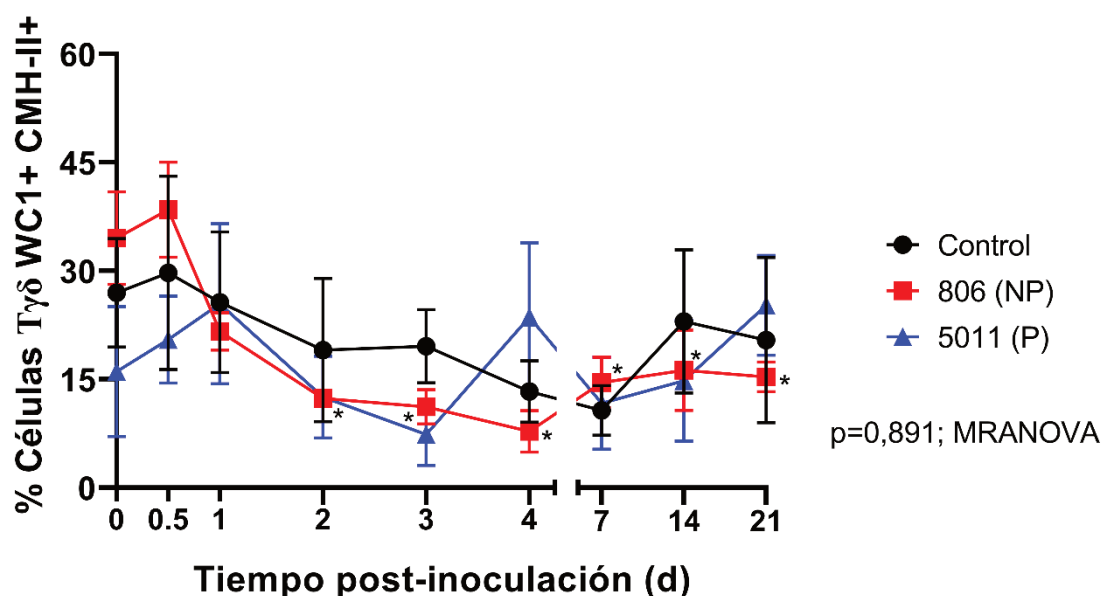


Figura 42. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺ en sangre periférica de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$. *: diferencias significativas entre el tiempo 0 pre-i y el resto de los tiempos de muestreo para el grupo inoculado con la cepa 806 (NP) ($p<0,05$).

Paralelamente, se evaluó la IFM de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 43). No se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo sobre los valores de IFM de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ entre los grupos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y el grupo control ($p=0,260$).

Si bien el ANOVA de medidas repetidas no arrojó una p estadística significativa ($p=0,260$), cuando se realizó un ANOVA por tiempo (día) se observó un aumento en la IFM de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* al día 2 pi en comparación a los demás grupos experimentales ($p<0,05$). Durante el resto de los tiempos de muestreo, los valores de IFM de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ se mantuvieron similares a los valores observados en los demás grupos experimentales ($p>0,05$).

En los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron diferencias en la IFM de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ en comparación con los valores observados en los demás grupos experimentales a lo largo del tiempo de muestreo ($p>0,05$).

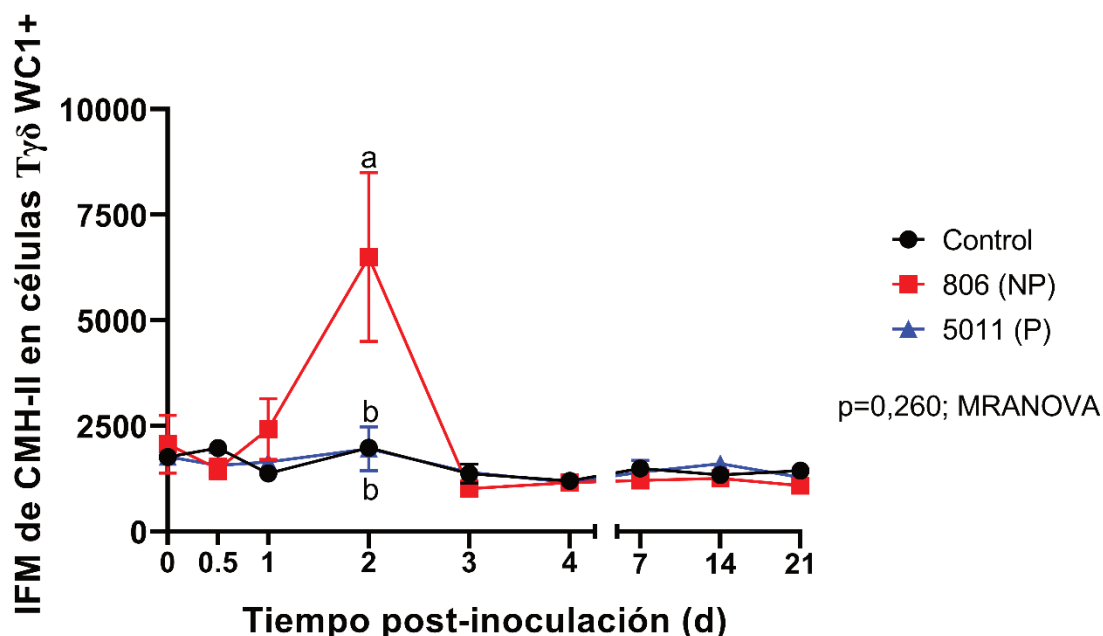


Figura 43. Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CMH-II en la población de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica proveniente de animales inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

4.4.5 Estudio de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ a nivel local en la GM

Se evaluó el número de linfocitos $T\gamma\delta$ /ml de leche proveniente de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo a partir del recuento de esta población celular en citoespines (Figura 44A y B). Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en el número de linfocitos $T\gamma\delta$ /ml de leche entre los cuartos inoculados con ambas cepas de *S. aureus* y los cuartos controles inoculados con solución fisiológica ($p=0,002$) (Figura 44C).

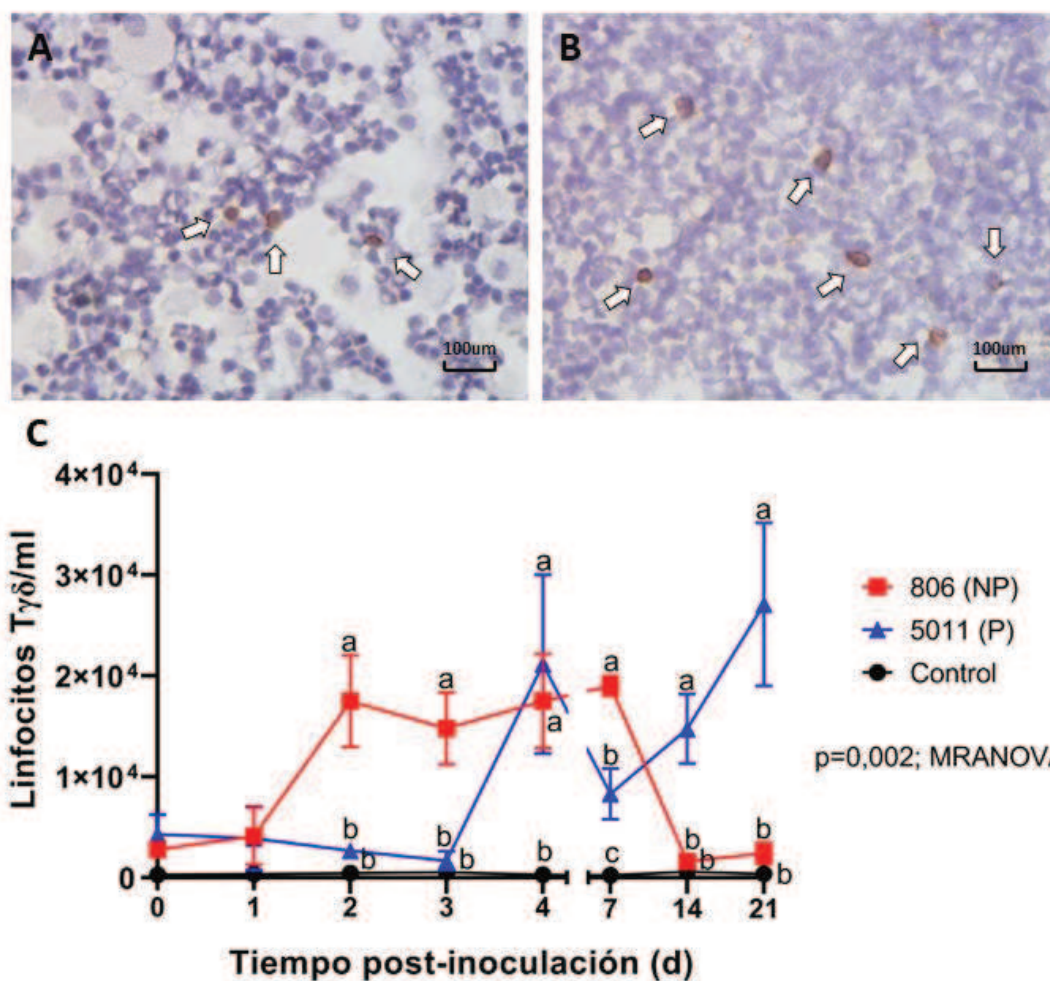


Figura 44. Microfotografías representativas de citoespines de células de leche obtenidas de cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* (animal 1, cuarto AD) al día 3 pi (A) y con la cepa 5011 de *S. aureus* (animal 5, cuarto PI) al día 21 pi (B). Las flechas indican los linfocitos Tγδ. Aumento: 600x. C) Número de linfocitos Tγδ (cél/ml) en muestras de leche provenientes de cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias ± EEM para cada grupo experimental evaluado. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los cuartos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$.

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* se observó un aumento en el número de linfocitos Tγδ/ml de leche a partir del día 2 pi con respecto a los demás grupos experimentales, este aumento se mantuvo hasta el día 7 pi ($p < 0,05$). Al día 14 pi el número de linfocitos Tγδ disminuyó a niveles basales y se mantuvo hasta el día 21 pi ($p > 0,05$).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron variaciones en el número de linfocitos Tγδ/ml de leche hasta el día 3 pi ($p > 0,05$). Sin embargo, al día 4 pi, se observó un aumento en el número de estas células innatas en leche con respecto al

grupo control ($p<0,05$). Al día 7 pi, el número de linfocitos $T\gamma\delta$ /ml de leche, disminuyó y fue menor que el observado en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP); no obstante, permaneció superior al de los cuartos controles ($p<0,05$). Al día 14 pi, el número de linfocitos $T\gamma\delta$ /ml de leche volvió a incrementarse y se mantuvo más elevado que en los cuartos controles ($p<0,05$), alcanzando valores similares a los observados en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. Este aumento se sostuvo hasta el día 21 pi, momento en el cual se registraron los máximos valores (~ 30.000 cél/ml), los cuales fueron superiores a los observados tanto en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* como en los cuartos controles ($p<0,05$).

4.4.6 Producción de citoquinas por ELISA

IFN- γ

Se evaluaron los niveles de IFN- γ en leche proveniente de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 45). En las muestras de leche provenientes de cuartos controles no se detectaron niveles de IFN- γ en ninguno de los tiempos evaluados.

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) si bien se observó un aumento en la concentración de IFN γ al día 1 pi, éste no fue significativo con respecto a los niveles obtenidos en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) ($p>0,05$). En el resto de los tiempos evaluados, los niveles de esta citoquina en leche se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del ensayo. Cuando se realizó un análisis comparando únicamente el grupo experimental inoculado con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* a lo largo del tiempo, se observó un aumento significativo el día 1 pi en comparación con el día 0 (pre-i) del mismo grupo experimental ($p<0,05$).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) se observaron concentraciones de IFN γ similares a las encontradas en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) en la mayoría de los tiempos evaluados, a excepción del día 21 pi donde se observó un aumento en los niveles de esta citoquina en comparación con los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) ($p<0,05$).

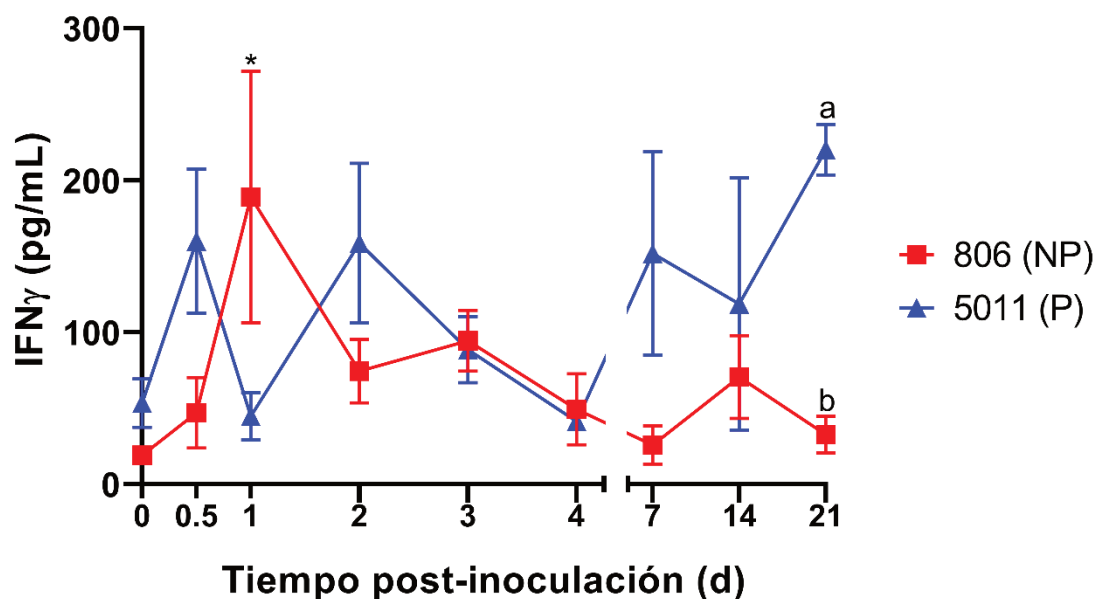


Figura 45. Concentración de IFN γ (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados con ambas cepas en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$. *: indica una diferencia significativa con el tiempo 0 (pre-i) en los cuartos inoculados con la cepa 806 de *S. aureus* (NP) ($p < 0,05$).

IL-17

Se evaluaron los niveles de IL-17 en leche proveniente de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 46). Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en los niveles de IL-17 entre cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011(P) de *S. aureus* y cuartos controles ($p = 0,003$).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* se observó un aumento gradual en los niveles de IL-17 en leche a partir del día 3 pi, alcanzándose las máximas concentraciones al día 7 pi. Este aumento al día 7 pi fue significativo con respecto a los valores detectados tanto en cuartos controles como en cuartos inoculados con la cepa 5011(P) ($p < 0,05$). Al día 14 pi, los niveles de IL-17 comenzaron a descender, sin embargo, fueron mayores a los observados en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) y cuartos controles ($p < 0,05$). Al día 21 pi los valores de IL-17 fueron similares a los encontrados en leches provenientes de cuartos controles.

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se observó un aumento en las concentraciones de IL-17 al día 1 pi en comparación a los valores detectados en leches

provenientes al resto de los grupos experimentales ($p < 0,05$). Al día 3 y 7 pi las concentraciones de IL-17 se mantuvieron elevadas con respecto a los niveles encontrados en leches de cuartos controles ($p < 0,05$). A partir del día 14 pi los niveles de IL-17 en cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* fueron similares a los encontrados en leches provenientes de cuartos controles.

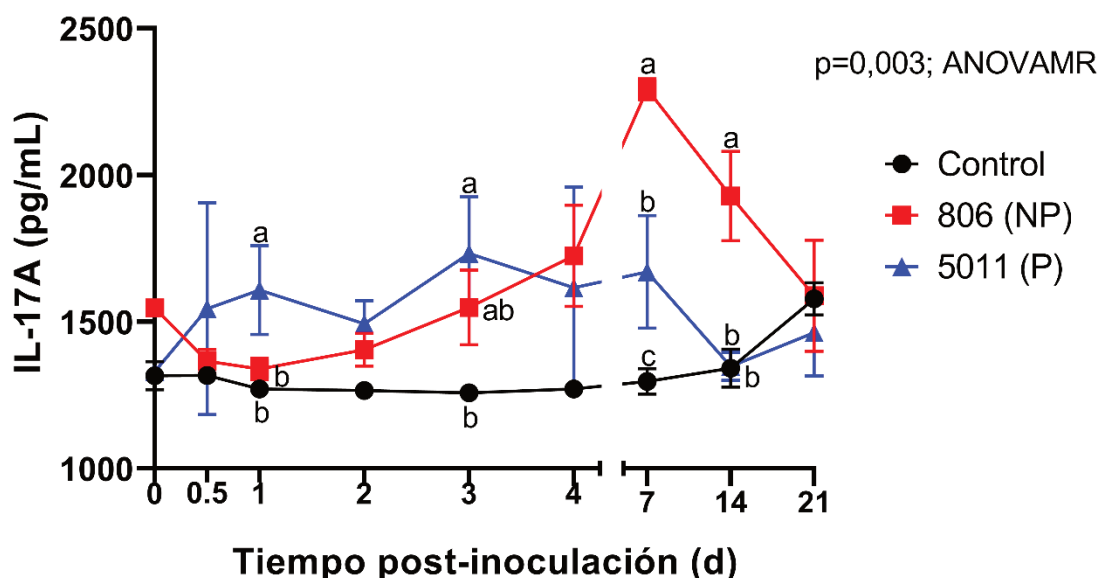


Figura 46. Concentración de IL-17 (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p < 0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p > 0,05$.

IL-4

Se evaluaron los niveles de IL-4 en leche proveniente de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo (Figura 47). Se observó un efecto significativo de la infección a lo largo del tiempo en los niveles de IL-4 entre cuartos inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y cuartos controles ($p < 0,001$).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* se observó un aumento en la concentración de IL-4 en leche al día 1 pi en comparación con los niveles detectados en leche de cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) y cuartos controles. A partir del día 2 y hasta el día 4 pi la concentración de IL-4 alcanzó niveles basales. Posteriormente, al día 7 pi se observó un segundo aumento en los niveles de esta citoquina que se mantuvo superior a los niveles

detectados en leche de cuartos provenientes de los dos grupos experimentales restantes hasta el día 21 pi ($p<0,05$).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se observó un aumento en los niveles de IL-4 en leche al día 1 pi en comparación con los valores detectados en leche de cuartos controles, sin embargo, este aumento no fue suficiente para alcanzar los niveles de IL-4 encontrados en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP). Al día 2 pi se observó una disminución en las concentraciones de IL-4 en leche de cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) en comparación a los niveles encontrados en los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) y cuartos controles. En el resto de los tiempos evaluados los niveles de esta citoquina en leche fueron similares a los encontrados en los cuartos de animales controles.

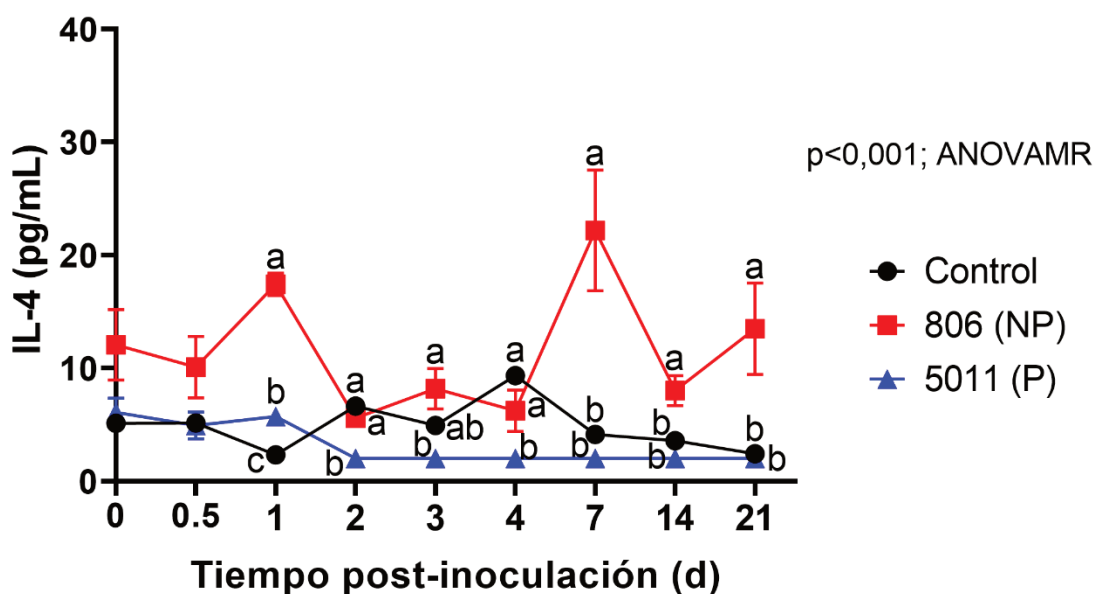


Figura 47. Concentración de IL-4 (pg/ml) en muestras de leche de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre-i (día 0) y pi (0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 días). Las líneas representan las medias $\pm$ EEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos infectados y el control en el mismo punto del tiempo ($p<0,05$). Los tiempos en los cuales no se especifican letras indican valores de $p>0,05$.

Además, se evaluaron los niveles de TNF- α , TGF- β e IL-10 en leche proveniente de cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus* y de cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica para cada tiempo de muestreo. Sin embargo, no fue posible realizar un análisis estadístico comparativo, dado que la detección de estas citoquinas en leche no fue homogénea para todos los grupos experimentales en todos los tiempos de muestreo.



5. DISCUSIÓN

Los linfocitos $\gamma\delta$ constituyen un nexo fundamental entre el sistema inmune innato y el adaptativo, y poseen el potencial para cumplir una amplia gama de funciones en la respuesta inmune frente a infecciones (Dar *et al.* 2014; Guerra-Maupome *et al.* 2019). Si bien el rol específico de estas células inmunes innatas frente a infecciones por *S. aureus* en la GM bovina permanece aún sin esclarecer, la evidencia disponible sugiere que los linfocitos $\gamma\delta$ poseen la capacidad no sólo de reconocer al microorganismo y activarse sino, además, de condicionar la respuesta inmune que se induce durante la infección. Asimismo, esta respuesta inducida estaría condicionada en relación a las características genéticas de la cepa infectante y a la capacidad de adaptación de la misma a la GM bovina.

En este contexto, en la presente tesis se propuso evaluar la activación de los linfocitos $\gamma\delta$ bovinos, su capacidad de producir y/o inducir la producción de citoquinas y su interacción con monocitos-macrófagos, luego del contacto *in vitro* con dos cepas de *S. aureus* de diferente genotipo y capacidad de adaptación a la GM bovina (aisladas de IIM P y NP) y examinar su rol *in vivo* en un modelo de IIM experimental.

Expresión proteica de CD25, CD62L, TLR2, CMH-II, CD80 y CD86 en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ luego de la interacción *in vitro* con *S. aureus*.

La IL-2 es un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación para los linfocitos T. La activación de los linfocitos T no sólo estimula la transcripción del gen de IL-2, la síntesis y secreción de la proteína, sino también, del receptor de alta afinidad para la IL-2 o CD25. Se ha demostrado que la expresión de este receptor es mínima en linfocitos T vírgenes y elevada en linfocitos T efectores, por lo que se considera un marcador de activación celular (Caruso *et al.*, 1997). Numerosos trabajos han evaluado la expresión de CD25 en linfocitos T *helper*, T citotóxicos y en linfocitos $\gamma\delta$ bovinos como indicador de activación frente a diferentes antígenos microbianos, incluyendo *Herpesvirus bovinum-1* (HVB-1) (Endsley *et al.*, 2002), *Mycoplasma bovis* (Vanden Bush y Rosenbusch, 2003), *virus sincicial respiratorio bovino* (VSRB) (Sandbulte y Roth, 2002), *M. bovis* (Waters *et al.*, 2003a; Waters *et al.*, 2003b; Nonnecke *et al.*, 2005) y frente a la estimulación con activadores policlonales (Nonnecke *et al.*, 1993; Franklin *et al.*, 1994). Sin embargo, son escasos los trabajos que evalúan la activación de poblaciones linfocitarias bovinas frente a *S. aureus* (Ferens *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 2023). En el presente trabajo, tanto en cultivos de CMN totales como en cultivos de linfocitos $\gamma\delta$ WC1 purificados, se observó un aumento del porcentaje de $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan CD25 tras el contacto *in vitro* con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. Asimismo, se observó un aumento en la densidad de expresión de este marcador de activación o IFM en los cultivos de CMN totales, luego del contacto con dicha cepa. En conjunto, estos resultados sugieren que los linfocitos $\gamma\delta$ poseen la capacidad de activarse directamente tras el contacto *in vitro* con *S. aureus* sin la necesidad de otras células para

realizarlo. No obstante, la activación de los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ se ve potenciada cuando estas células innatas se encuentran en contacto con otras células presentes en la población de CMN totales, lo que sugiere la importancia de la cooperación con otras células del sistema inmune. Esto se demuestra por los mayores porcentajes de expresión de CD25 en la población de linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ luego del cultivo de CMN en comparación con cultivos de linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ purificados.

En consonancia con nuestros resultados, Ferens *et al.* (1998) demostraron que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ bovinos, tanto CD2^+ como CD2^- , responden al estímulo de la enterotoxina estafilocócica C1 (SEC1) mediante el aumento de la expresión de CD25, lo que indica que estas células reconocen al superantígeno y se activan. Sin embargo, a diferencia de lo observado con subpoblaciones de linfocitos $\text{T}\alpha\beta$, esta inducción de CD25 en linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ no se tradujo en una proliferación efectiva ni en un aumento marcado de células blásticas, lo que llevó a los autores a proponer que la enterotoxina promueve en los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ un estado de activación parcial, caracterizado por la expresión de marcadores de activación, sin completar el programa funcional asociado a la expansión clonal (Ferens *et al.* 1998).

Por otro lado, al considerar otros patógenos, diversos estudios han demostrado que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ bovinos desempeñan un papel activo en la respuesta inmune frente a *M. bovis*. Smyth *et al.* (2001), observaron que en cultivos de CMN totales provenientes tanto de animales infectados con *M. bovis* como de animales sanos, los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ aumentan la expresión de CD25 luego del contacto *in vitro* con antígenos derivados de *M. bovis*. De manera similar, otros autores demostraron que linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ de sangre periférica bovina incrementan la expresión de los marcadores de activación CD25 y CMH-II tras el contacto *in vitro* con DCs infectadas con *M. bovis* (Price y Hope, 2009) o luego del contacto *in vitro* de CMN de sangre periférica, provenientes de animales vacunados con *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), y estimuladas con antígenos de *M. bovis* (Waters *et al.*, 2003b). En ambos trabajos, dicha activación se asoció con una elevada producción de $\text{IFN-}\gamma$.

Finalmente, las características genotípicas y fenotípicas de las cepas de *S. aureus* determinaron el comportamiento diferencial en la población de linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ . La cepa 806 (NP) de *S. aureus*, más adaptada al ambiente extracelular de la GM, promovió una mayor activación de estos linfocitos innatos en comparación con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, de alta adaptación al ambiente intracelular. En este sentido, las diferencias observadas en el presente trabajo, podrían estar relacionadas con la portación y/o expresión de determinados FV en las dos cepas de *S. aureus* evaluadas, lo que reforzaría la premisa de que la respuesta inmune inducida por *S. aureus* en el hospedador depende, en parte, de las características propias de la cepa infectante.

La extravasación y el tráfico de linfocitos a los sitios de inflamación están mediados por la expresión diferencial de múltiples moléculas de adhesión en la superficie de las células. La L-selectina (CD62-L), por ejemplo, media la adhesión específica a las adhesinas vasculares que irrigan los ganglios linfáticos periféricos y dirige los linfocitos vírgenes, los cuales se caracterizan por tener una elevada expresión de CD62-L, a áreas de alta concentración de antígeno dentro de los ganglios linfáticos (Bosworth *et al.*, 1993; Dailey, 1998). Tras la activación de los linfocitos, la expresión de CD62-L disminuye, mientras que la expresión de integrinas aumenta rápidamente. Estos cambios en la expresión de moléculas de adhesión, junto a cambios en la expresión de receptores de quimioquinas, como por ejemplo CCR7, favorecen el egreso de las células T efectoras fuera del tejido linfoide hacia los eferentes linfáticos y el regreso subsecuente a la circulación sanguínea (Abbas *et al.*, 2022). Los linfocitos $T\gamma\delta$ de rumiantes se caracterizan por tener mayores niveles de expresión de CD62-L en comparación con otras poblaciones linfocitarias, lo cual probablemente contribuye a su capacidad de recircular continuamente entre la sangre y los tejidos a través de la linfa, como se ha sugerido previamente (Young *et al.* 2000). Asimismo, la expresión de CD62-L se asocia negativamente con la activación celular, es decir que disminuye cuando la célula se activa (Vesosky *et al.*, 2003). En este trabajo, tanto en cultivos de CMN totales como en cultivos de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados, se observó un aumento en la densidad de expresión de CD62-L (IFM), en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ tras el contacto *in vitro* con ambas cepas de *S. aureus*. Además, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan el marcador de activación CD62-L únicamente en los cultivos de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados, luego del contacto con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. El aumento en la expresión de CD62-L podría indicar un cambio hacia un fenotipo recirculante o de memoria central (CD62-L⁺), en detrimento de un fenotipo efector migratorio (CD62-L⁻). Este perfil sugiere que los linfocitos $T\gamma\delta$ podrían estar siendo “preparados” para retornar a los órganos linfoides secundarios, favoreciendo su participación en la iniciación, modulación o regulación de la respuesta inmune. Por otra parte, la elevada expresión de CD62-L podría estar asociada a una función de inmunovigilancia, permitiendo a estas células innatas un monitoreo más eficiente de patógenos o señales de daño tisular a través de su mayor capacidad de recirculación. En este sentido, se ha demostrado que los linfocitos $T\gamma\delta$ de memoria contribuyen a una protección eficaz frente a *S. aureus* en modelos murinos (Lalor y McLoughlin, 2016), lo que refuerza la relevancia de profundizar el estudio de esta población celular en el ganado bovino. Por otro lado, los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con un estudio previo realizado en vacas lecheras de raza Prim’Holstein con mastitis subclínica crónica por *S. aureus*. En dicho trabajo se describió un predominio del fenotipo de memoria CD45RO⁺CD62L⁺ en linfocitos $T\gamma\delta$ tanto en leche como en sangre, así como la presencia de una subpoblación CD45RO⁺CD62L⁻ restringida a la leche (Tucker *et al.*, 2023). No obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de los observados por Waters *et al.* (2003a), quienes demostraron una disminución en la

expresión de CD62-L en los linfocitos $T\gamma\delta$ de sangre periférica provenientes de animales infectados con *M. bovis*, luego de la estimulación *in vitro* con una proteína purificada del microorganismo o con un activador policlonal, en comparación con linfocitos $T\gamma\delta$ no estimulados. Toka *et al.* (2011) observaron un comportamiento similar en linfocitos $T\gamma\delta$ provenientes de animales infectados con el virus de la fiebre aftosa (*Foot and mouth disease virus, FMDV*), los cuales reportaron una disminución en la expresión de CD62-L al día 2 pi, seguida de una rápida recuperación de la expresión de este marcador llegando a valores similares a los observados en linfocitos $T\gamma\delta$ previo a la infección. Los resultados obtenidos por estos autores indicarían una activación transitoria de los linfocitos $T\gamma\delta$ durante la infección aguda con *FMDV*, debido al rápido retorno a la expresión basal de CD62-L y a que la mayoría de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ circulantes mostraron este fenotipo. Además, los autores reportaron un aumento en la expresión de CD25 en esta población celular innata, correlacionado con el pico de viremia. Finalmente, la cinética de expresión de CD25 y CD62-L reflejó el estado de activación de los linfocitos $T\gamma\delta$, ya que estas células produjeron IFN- γ intracelularmente (Toka *et al.*, 2011). En conjunto, las diferencias encontradas en los trabajos expuestos y los reportados en la presente tesis ponen de manifiesto que la modulación en la expresión de CD62-L en linfocitos $T\gamma\delta$ depende del contexto infeccioso, del estadio de la respuesta inmune y de las características del patógeno involucrado. En este marco, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las diferencias observadas para cada cepa pueden deberse a las características genotípicas y fenotípicas de las mismas, incluyendo su repertorio de FV y su capacidad diferencial de modular la activación y el destino funcional de las células del sistema inmune innato, en especial de los linfocitos $T\gamma\delta$.

TLR2 desempeña un rol clave en el reconocimiento de estructuras de la pared celular de bacterias Gram positivas, como ácido lipoteicoico (LTA) y peptidoglicano (PGN), y es uno de los principales receptores involucrados en la respuesta inmune frente a *S. aureus* (Musilova *et al.*, 2019). Por otro lado, se conoce que los linfocitos $T\gamma\delta$ responden directamente a PAMPs gracias a la expresión de ciertos RRP's tales como los receptores tipo *Toll* y los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos), los cuales son capaces de activar a los linfocitos $T\gamma\delta$ independientemente de la señal dada por su TCR (Guerra-Maupome *et al.*, 2019). En este trabajo, tanto en cultivos de CMN totales como en cultivos de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ purificados, no se observaron diferencias ni en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan TLR2 ni en la densidad de expresión del mismo (IFM) luego del cultivo con ambas cepas de *S. aureus*. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la activación de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ no estaría asociada con una modulación en la expresión de TLR2, por lo tanto, este receptor no sería el principal mediador de la respuesta inducida por *S. aureus* en esta población celular. En concordancia con nuestros resultados, Hedges *et al.* (2005) demostraron que linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos purificados de sangre periférica se activaron directamente por el

contacto con LPS y PGN en ausencia de CPA, aumentando la expresión de genes que codifican para quimioquinas inflamatorias y de diversos genes de activación. Estos autores demostraron, además, que los linfocitos $T\gamma\delta$ activados expresan ARNm para varios TLRs, sin embargo, no encontraron diferencias significativas con los niveles de ARNm para estos receptores en las células control. Por otro lado, Kerns *et al.* (2009) demostraron que linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos purificados de CMN de sangre periférica expresan NOD2 y que luego de la estimulación con muramil dipéptido (MDP), constituyente de la pared celular de bacterias Gram positivas y negativas, se activan aumentando la expresión génica de CD25, entre otros genes evaluados. En el presente trabajo, considerando los resultados de activación celular evaluados mediante la expresión del receptor CD25, podría inferirse que otros RRP, como NOD2, no evaluados en este trabajo, estarían involucrados en la activación de esta población celular innata luego del contacto con *S. aureus*. No obstante, serán necesarios nuevos ensayos *in vitro* que permitan profundizar en los mecanismos de reconocimiento y activación de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ bovinos y esclarecer su interacción con el entorno celular durante la infección por *S. aureus*.

Los linfocitos $T\alpha\beta$ requieren al menos de dos señales complementarias para su activación, una señal antigénica, proporcionada por la presentación de péptidos a través de moléculas del CMH, y la señal coestimuladora, mediada por moléculas de superficie expresadas por las CPA. Las CPA clásicas, DCs, macrófagos y linfocitos B, expresan CMH de clase II que presenta antígenos exógenos a los linfocitos T CD4⁺, permitiendo el reconocimiento específico del antígeno. Para que la activación de los linfocitos T sea completa, se requiere la coestimulación a través del receptor CD28, que interactúa con las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en las CPA. La expresión de CD80/CD86 es nula o muy baja en células en reposo y se induce tras estímulos microbianos que activan RRP o por citoquinas proinflamatorias, especialmente IFN- γ , producidas durante las respuestas innatas (Abbas *et al.*, 2022). Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden actuar como CPA y así participar directamente en la iniciación y modulación de la respuesta inmune adaptativa (Guzman *et al.*, 2014; McGill *et al.*, 2014; Guerra-Maupome *et al.*, 2019). En el presente trabajo, tanto en cultivos de CMN totales como en cultivos de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1 purificados, no se observaron diferencias ni en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan la molécula CMH-II, ni en la densidad de expresión de esta molécula (IFM) luego del cultivo con ambas cepas de *S. aureus* con respecto a cultivos basales. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el contacto con *S. aureus* no sería suficiente para inducir o modular la expresión de la molécula del CMH-II en linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺. No obstante, se evidenciaron cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras evaluadas. En particular, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan la molécula coestimuladora CD80 únicamente en cultivos de CMN totales luego del contacto con ambas cepas de *S. aureus* con respecto a cultivos basales.

Asimismo, se observó, un aumento en la densidad de expresión (IFM) de CD80 en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ en cultivos de CMN totales luego del contacto con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* con respecto a cultivos basales. De manera concordante, también se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ que expresan la molécula coestimuladora CD86 únicamente en cultivos de CMN totales luego del contacto con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* con respecto a cultivos basales. En conjunto, estos resultados refuerzan la teoría de que la activación funcional de los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺, particularmente en lo que respecta a la expresión de moléculas coestimuladoras, se ve favorecida por la interacción con otras células inmunes presentes en la población de CMN totales. Si bien actualmente no existen estudios que describan el rol de los linfocitos $\gamma\delta$ bovinos como CPA en infecciones experimentales por *S. aureus*, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los reportados por Collins *et al.* (1998). Estos autores demostraron que linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinos purificados de sangre periférica fueron capaces de captar antígenos (ovoalbúmina o VSRB muerto por calor), procesarlos, aumentar la expresión de CMH-II, CD80 y CD86 e inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ específicos, demostrando el rol de esta población celular innata como CPA. De manera similar, Toka *et al.* (2011) demostraron que linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica provenientes de animales infectados con FMDV, incrementaron la expresión de CMH-II, CD80 y CD86, contribuyendo a la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺. Por su parte, Price y Hope (2009) demostraron un comportamiento similar en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ provenientes de sangre periférica que, luego del cultivo *in vitro* con BCG, incrementaron la expresión de CMH-II y de CD80. Estos autores también proponen una posible participación de estos linfocitos innatos en la presentación antigénica y activación de linfocitos T CD4⁺.

En este contexto, los resultados obtenidos en la presente tesis indican que los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinos podrían adquirir un perfil funcional compatible con un rol coestimulador en presencia de otras células inmunes, aunque no necesariamente mediante una regulación concomitante de CMH-II. Para confirmar de manera directa la capacidad de estas células para actuar como CPA durante la infección por *S. aureus*, serían necesarios futuros ensayos que permitan evaluar la capacidad de los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ de inducir la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ específicos.

Producción de IFN- γ , IL-17A y TNF- α luego de la interacción *in vitro* con *S. aureus*

Como se mencionó anteriormente, *S. aureus* no es exclusivamente una bacteria extracelular, sino que posee la capacidad de adaptarse al ambiente intracelular, lo que le permite persistir e incluso multiplicarse dentro de las células del hospedador (Lowy, 2000; Sacco *et al.* 2020; Calvino y Dallard, 2023). Mientras las bacterias residan dentro de los fagosomas de los macrófagos, su eliminación es promovida por las citoquinas producidas por los linfocitos

Th1/Th17, principalmente por el IFN- γ , que potencia la actividad microbicida de estas células (Paul, 2013; Bröker *et al.*, 2016). Por su parte, la IL-17 (citoquina clave en la respuesta inmune de tipo Th17) es sumamente importante en la resistencia frente a las infecciones por *S. aureus*, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos y el control temprano de la infección (Milner *et al.*, 2008; Ishigame *et al.*, 2009). Los linfocitos $\gamma\delta$ tienen la capacidad de secretar citoquinas inflamatorias como IFN- γ , IL-17 y TNF- α , dependiendo de los estímulos ambientales y/o de las señales que reciben (Guerra-Maupome *et al.*, 2019). En este contexto, el TNF- α actúa como un potente mediador proinflamatorio, promoviendo el reclutamiento de neutrófilos fagocíticos a los tejidos infectados y colaborando con IFN- γ en la polarización de respuestas de tipo Th1, particularmente relevantes frente a bacterias intracelulares (Guerra-Maupome *et al.*, 2019; Abbas *et al.*, 2022). En conjunto, estas citoquinas actúan de manera complementaria: IFN- γ potencia la capacidad microbicida de los macrófagos, IL-17 favorece el reclutamiento y activación de neutrófilos y TNF- α amplifica la respuesta inflamatoria local, contribuyendo al control de la infección (Guerra-Maupome *et al.*, 2019; Abbas *et al.*, 2022).

En el presente trabajo, la producción de cada citoquina fue normalizada en los diferentes sistemas de cultivos evaluados, con el objetivo de independizar los resultados del número de células sembradas en cada condición, considerando que la cantidad de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados constituyó el factor limitante. Se observó un aumento en los niveles de IFN- γ e IL-17 en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales en comparación con los niveles de estas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y CMN $\emptyset$ WC1⁺, para ambas cepas de *S. aureus* evaluadas. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de TNF- α entre los tres sistemas de cultivos para cada cepa de *S. aureus* evaluada. Estos resultados sugieren que la población de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ reconoce directamente a *S. aureus*, se activa y produce o induce a otras células del sistema inmune a producir IFN- γ e IL-17. Esto se evidencia debido a que, en ausencia de esta población celular innata, los niveles de dichas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de CMN $\emptyset$ WC1⁺ estimulados con ambas cepas de *S. aureus* fueron significativamente menores en comparación con aquellos en los que los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ están presentes. Sin embargo, nuevamente se observó que la activación de esta población celular innata se potencia en presencia de otras células del sistema inmune, dado que en los cultivos de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ purificados y enfrentados con *S. aureus*, la producción de ambas citoquinas evaluadas fue menor que en los cultivos de CMN totales. Esto refuerza la idea de que la función efectora de los linfocitos $\gamma\delta$ depende, en gran medida, de la interacción con otras células del sistema inmune y del microambiente inflamatorio.

En concordancia con nuestros resultados, Fikri *et al.* (2001), demostraron que linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinos purificados, cultivados en presencia de CPA e IL-2, se activan luego del contacto con los superantígenos de *S. aureus*, SEA, SEB y TSST-1, y producen ARNm que codifica para diversas citoquinas, entre ellas el IFN- γ . De manera similar, Price y Hope (2009) demostraron que la producción de IFN- γ por linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinos purificados aumenta significativamente luego del co-cultivo con DCs infectadas con *M. bovis*, en comparación a la producción de esta citoquina en cultivos de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ con *M. bovis* en ausencia de DCs. Estos autores atribuyeron la respuesta observada a la producción de IL-12 por parte de las DCs. De forma similar, cuando se cultivaron linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos purificados con antígenos derivados de micobacterias no fue posible detectar la presencia de IFN- γ en el medio, sin embargo, al cultivar los linfocitos T $\gamma\delta$ purificados con los mismos antígenos derivados de micobacterias en presencia de macrófagos e IL-2, la producción de IFN- γ aumentó significativamente (Vesosky *et al.*, 2004). En conjunto, estos trabajos respaldan la idea de que la activación plena de esta población celular innata requiere señales adicionales provenientes del entorno celular.

En relación con la producción de IL-17, los resultados obtenidos difieren parcialmente de lo reportado por Peckham *et al.* (2014). Estos autores demostraron que los linfocitos T $\gamma\delta$ purificados co-cultivados con *S. aureus* muerto por calor no producen IL-17, pero si lo hacen en presencia de IL-6/TGF- β 1. Un dato interesante a destacar es que, cuando a esos cultivos de linfocitos T $\gamma\delta$ purificados con *S. aureus* en presencia de IL-6/TGF- β 1 se les agrega IFN γ , los niveles de IL-17 disminuyen significativamente. Estos autores postulan la existencia de fenotipos de linfocitos T $\gamma\delta$ “polarizados” hacia la producción de IL-17 ($\gamma\delta$ 17) o de IFN γ ($\gamma\delta$ IFN γ). Por otro lado, los mismos autores demuestran que IL-17 regula negativamente la producción de IFN γ y viceversa. En el presente trabajo, los niveles de IL-17 detectados fueron superiores a los niveles de IFN γ en los tres sistemas evaluados, lo que podría sugerir un sesgo funcional hacia un fenotipo $\gamma\delta$ 17. Asimismo, nuestros resultados refuerzan la idea de que los linfocitos T $\gamma\delta$ podrían requerir señales adicionales proporcionadas por CPA y/o citoquinas exógenas, como IL-2 o IL-6, para alcanzar una activación funcional completa, tal como ha sido descrito en otros modelos de infección (Price *et al.*, 2006; Plattner y Hostetter, 2011; McGill *et al.*, 2014; 2016). En concordancia con esta interpretación, Pan *et al.* (2023) investigaron el rol de los linfocitos T $\gamma\delta$ y la citoquina IL-17A en un modelo murino de mastitis inducida por *S. aureus*. Durante las fases tempranas de la infección, observaron una rápida acumulación y activación de células T $\gamma\delta$ en la GM, identificándolas como la principal fuente de IL-17A. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la posibilidad de la existencia de un sesgo funcional $\gamma\delta$ 17 en nuestro sistema experimental y sugieren que señales microbianas y/o derivadas de CPA y del microambiente de citoquinas podrían dirigir dicha polarización. No obstante, esta hipótesis requiere ser confirmada mediante ensayos adicionales que evalúen directamente la polarización funcional de los linfocitos T $\gamma\delta$.

En relación con la producción de TNF- α , los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la población de linfocitos $\text{Ty}\delta \text{ WC1}^+$ no constituiría la principal fuente de esta citoquina en el modelo experimental evaluado, siendo probable que la producción de esta citoquina derive de otras poblaciones celulares presentes en las CMN, macrófagos o neutrófilos. Actualmente, no existen numerosos trabajos que demuestren de manera directa la producción de TNF α por linfocitos $\text{Ty}\delta$ bovinos tras el contacto con *S. aureus* o con antígenos derivados de este microorganismo. Yokomizo *et al.* (1995), demostraron que CMN totales bovinas se activan luego del contacto *in vitro* con superantígenos de *S. aureus* aumentando la producción IL-2, IFN- γ y TNF- α de manera dosis-dependiente, sin embargo, estos autores no atribuyeron dicha respuesta a una subpoblación linfocitaria específica. En línea con estos hallazgos, Fikri *et al.*, (2001) demostraron que linfocitos $\text{Ty}\delta \text{ WC1}^+$ bovinos purificados aumentan la expresión génica de TNF- α tras el co-cultivo con superantígenos de *S. aureus*, aunque esta respuesta solo se observó en presencia de CPA autólogas irradiadas o fijadas con glutaraldehído e IL-2, lo que sugiere que la activación de esta vía depende de señales accesorias adicionales. De manera similar, Rusk *et al.* (2017) demostraron que linfocitos $\text{Ty}\delta$ bovinos aumentan la expresión génica de TNF- α luego del co-cultivo con macrófagos infectados con *M. bovis*, reforzando la idea de que la producción de TNF- α por esta población celular requiere un contexto inmunológico complejo. En conjunto, la falta de significancia estadística en los niveles de TNF- α entre los sistemas de cultivo evaluados en esta tesis sugiere que esta citoquina podría producirse de manera constitutiva por diversas poblaciones celulares presentes en las CMN, o bien que los linfocitos $\text{Ty}\delta \text{ WC1}^+$ requieren señales adicionales, no reproducidas en este modelo *in vitro*, para contribuir de manera significativa a su producción.

La ausencia de detección de IL-10 e IL-4 sugiere que estas citoquinas no estarían involucradas en la la respuesta inmune que se induce durante las primeras horas del contacto con *S. aureus*, en ninguno de los tres sistemas evaluados, lo que es consistente con un perfil de respuesta predominantemente proinflamatorio. Estos resultados respaldan la idea de que la inmunidad innata de la GM se caracteriza por una respuesta inflamatoria temprana, mientras que los mediadores reguladores pueden presentar cinéticas diferentes o niveles de expresión por debajo del umbral de detección proteica (Rainard y Riollot, 2006). No obstante, la ausencia de señal proteica a las 48 h no excluye la posibilidad de una inducción transcripcional temprana ni la expresión de estas citoquinas en etapas más tardías de la respuesta inmune, para confirmarlo se deberán realizar nuevos ensayos.

Finalmente, es importante destacar que las mayores concentraciones de citoquinas se observaron en los sobrenadantes de los cultivos de CMN totales estimulados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. Esto refuerza la noción de que las características genotípicas y fenotípicas de las

cepas de *S. aureus* influyen en la activación de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺, debido a que la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, mejor adaptada al ambiente extracelular de la GM bovina, indujo *in vitro*, una mayor activación de estos linfocitos innatos y una mayor liberación de IFN- γ e IL-17 en comparación de la cepa 5011 (P) de *S. aureus*. La menor activación de los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ por parte de la cepa 5011 (P) podría explicar, en parte, su capacidad de persistencia intracelular.

Expresión proteica de CMH-II y CD80 en monocitos-macrófagos luego de la interacción *in vitro* de CMN y CMN $\emptyset$ WC1⁺ con *S. aureus*

La literatura describe un *cross-talk* bidireccional entre linfocitos $T\gamma\delta$ y macrófagos, relevante tanto para la inmunidad innata como para la activación de respuestas adaptativas (Chan *et al.*, 2022; Hu, 2024). En rumiantes, como el bovino, donde los linfocitos $T\gamma\delta$ representan una proporción elevada del compartimento linfocitario circulante, esta interacción podría adquirir un papel particularmente relevante en la regulación de la respuesta inmune frente a patógenos bacterianos.

CD14 es un correceptor clave en el reconocimiento de PAMPs, particularmente en la señalización mediada por TLRs. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que, tras la activación, los macrófagos pueden reducir la expresión de CD14 en superficie como consecuencia de procesos de internalización del receptor o de su liberación en forma soluble (Wright *et al.*, 1990; Landmann *et al.*, 1996). En este sentido, la disminución observada en el porcentaje de monocitos-macrófagos CD14⁺ luego del cultivo con ambas cepas de *S. aureus*, tanto en CMN totales como en CMN $\emptyset$ WC1⁺, podría reflejar un estado de activación y diferenciación funcional más que una pérdida real de esta población celular. Resultados previos han demostrado que linfocitos $T\gamma\delta$ humanos, al responder a metabolitos bacterianos (HMB-PP), establecen rápidamente un *cross-talk* con monocitos que induce su diferenciación hacia un fenotipo de CPA funcional, caracterizado por una pérdida temprana de CD14 y una elevada producción de citoquinas/quimioquinas inflamatorias (Eberl *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente estudio, la disminución de CD14 fue más marcada en los cultivos carentes de linfocitos $T\gamma\delta$ (CMN $\emptyset$ WC1⁺) que en cultivos de CMN totales, lo que sugiere que, en ausencia de esta población, los monocitos-macrófagos estarían más activados que en los cultivos de CMN totales.

En relación con la expresión de CMH-II, no se detectaron cambios significativos en el porcentaje ni en la densidad de expresión (IFM) de esta molécula en monocitos-macrófagos tras el cultivo con *S. aureus* respecto a los cultivos basales. No obstante, la ausencia de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ se asoció con una disminución significativa en la densidad de expresión de CMH-II (IFM) cuando CMN $\emptyset$ WC1⁺ fueron incubadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*. Estos resultados sugieren que los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ contribuirían al mantenimiento o potenciación de la

expresión de CMH-II, molécula relacionada con la capacidad de presentar antígenos de los monocitos-macrófagos, particularmente frente a cepas de *S. aureus* con alta capacidad de adaptación y persistencia en la GM.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que los linfocitos $T\gamma\delta$ modulan activamente la función macrofágica. Skyberg *et al.* (2011) observaron que la presencia de linfocitos $T\gamma\delta$ en co-cultivos con macrófagos bovinos infectados con *Brucella abortus* aumentó la capacidad microbicida de estos últimos de manera dependiente de $IFN-\gamma$. De forma similar, Baquero y Plattner (2015) evaluaron expresión de moléculas de activación, perfil de citoquinas y capacidad microbicida de macrófagos derivados de monocitos (MDM) cultivados con y sin el agregado de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ e infectados *in vitro* con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Estos autores reportaron que la presencia de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ moduló la activación de los macrófagos, alterando la expresión de moléculas de activación y de presentación antigénica. Estos autores, además, observaron que los linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ no solo potencian, sino que ajustan finamente la respuesta del macrófago frente a MAP.

Por otra parte, la incubación con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se asoció con un aumento en el porcentaje de monocitos-macrófagos $CD80^+$, tanto en cultivos de CMN totales como en aquellas carentes de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ (CMN $\emptyset$ $WC1^+$). Sin embargo, la ausencia de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ se relacionó con una mayor frecuencia de monocitos-macrófagos $CD80^+$, tanto en los cultivos basales como tras la incubación con ambas cepas de *S. aureus*. En conjunto, estos resultados indican que, si bien la cepa 5011 (P) promueve la expresión de CD80 en monocitos-macrófagos, la ausencia de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ se asocia con una activación coestimuladora exacerbada, lo que podría reflejar una respuesta menos regulada en comparación con cultivos que conservan estas células innatas. En este sentido, se ha demostrado que la señalización a través de CD80/CD86 contribuye activamente a la respuesta proinflamatoria inducida por *S. aureus*, participando en la amplificación de la respuesta innata (Parker, 2018). Estos antecedentes respaldan la interpretación de que el aumento de monocitos-macrófagos $CD80^+$ observado en ausencia de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ podría estar asociado a una respuesta inflamatoria exacerbada, carente de la modulación ejercida por estas células.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la ausencia de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ no impide la activación innata de los monocitos-macrófagos frente a *S. aureus*, como lo evidencia la disminución de CD14 y el aumento en la frecuencia de células $CD80^+$. Sin embargo, la reducción en la densidad de expresión de CMH-II observada exclusivamente en los cultivos carentes de linfocitos $T\gamma\delta$ $WC1^+$ incubados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* sugiere que esta población linfocitaria podría desempeñar un rol específico en el sostenimiento de la función presentadora de antígeno frente a cepas de *S. aureus* con mayor capacidad de adaptación a la GM y de evasión

de la respuesta inmune. De este modo, el impacto de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ sobre la respuesta de los monocitos-macrófagos no sería generalizado, sino dependiente de las características particulares de la cepa infectante. No obstante, serían necesarios ensayos funcionales adicionales que permitan confirmar si las diferencias observadas en la expresión de CMH-II se traducen efectivamente en cambios en la capacidad de presentación antigénica y en la activación de linfocitos T frente a cepas persistentes de *S. aureus*.

En concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*, los hallazgos derivados del modelo de IIM experimental, que se describen a continuación, refuerzan la idea de que la interacción entre *S. aureus* y las células del sistema inmune innato, incluidos los linfocitos $T\gamma\delta$, está fuertemente condicionada por la capacidad de cada cepa para adaptarse y persistir en el microambiente de la GM bovina.

Modelo bovino de IIM experimental con las cepas P y NP de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* pueden caracterizarse mediante métodos moleculares como la tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Enright *et al.*, 2000). Los tipos de secuencias (*sequence type*, ST) relacionadas se agrupan en linajes o complejos clonales (CC), los cuales presentan repertorios diferenciales de FV y elementos móviles. Estas diferencias podrían influir en la capacidad de adaptación al hospedador bovino, en la severidad clínica de la mastitis y en la evolución de la infección. En este sentido, diversos estudios *in vitro* sobre la interacción patógeno-hospedador han demostrado diferencias entre cepas de *S. aureus* en su capacidad para invadir y/o sobrevivir intracelularmente, así como para inducir la expresión de mediadores proinflamatorios en células mamarias bovinas (Zbinden *et al.*, 2014; Murphy *et al.*, 2019; Sacco *et al.*, 2020). De manera concordante, estudios previos en modelos experimentales de mastitis bovina, utilizando cepas de *S. aureus* pertenecientes a los principales linajes bovinos detectados en Irlanda (CC97 y CC151), demostraron una respuesta inmune diferencial del hospedador, indicando que el desenlace de la infección depende, al menos en parte, de la cepa involucrada (Niedziela *et al.*, 2020).

En el presente estudio se utilizó un modelo experimental de IIM bovina con el objetivo de comprender mejor la respuesta inmune inducida por cepas de *S. aureus* con diferentes características genéticas y capacidad de adaptación al ambiente de la GM. Se evaluaron dos cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis subclínica, caracterizadas mediante análisis de microarrays como linajes bovinos poco comunes. La cepa 806 (NP), perteneciente al ST350-MSSA, corresponde a un ST poco frecuente que ha sido aislado de humanos, perros, caballos, ciervos salvajes y vacas con mastitis (Monecke, S; datos no publicados). Por su parte, la cepa 5011 (P), perteneciente al CC188-MSSA, es considerada principalmente un linaje humano, aunque también ha sido detectada en bovinos (Monecke *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017). Cabe

destacar que ambos ST utilizados en este estudio han sido reportados previamente en leche de vaca en otros países, lo que refuerza su relevancia epidemiológica (Campos *et al.*, 2022).

En las últimas décadas, los modelos experimentales de IIM *in vivo* han sido ampliamente utilizados y constituyen una herramienta eficaz para investigar la respuesta inmune del hospedador frente a *S. aureus* (Schukken *et al.*, 1999; Shoshani *et al.*, 2000; Grönlund *et al.*, 2006; Petzl *et al.*, 2016; Dego *et al.*, 2020; Nagasawa *et al.*, 2021). Si bien las condiciones de los animales y los diseños experimentales varían entre los diferentes estudios, en general, las infecciones experimentales con *S. aureus* suelen inducir mastitis clínica leve o moderada, o bien mastitis subclínica, dependiendo principalmente de la concentración del inóculo y del sitio de inoculación (Bannerman *et al.*, 2004; Petzl *et al.*, 2008; Whelehan *et al.*, 2011). Estas infecciones desencadenan, por lo general, una respuesta inmune local moderada en la GM, sin afectación sistémica, y tienden a evolucionar hacia cuadros persistentes (Hensen *et al.*, 2000; Grönlund *et al.*, 2006). En este contexto, diversos estudios han demostrado que la cepa de *S. aureus* constituye un factor determinante en la presentación clínica, la magnitud de la respuesta inmune y la persistencia de la IIM (Vrieling *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2018; Niedziela *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos en el presente modelo experimental refuerzan esta noción, sugiriendo que las diferencias genotípicas y fenotípicas entre las cepas P y NP de *S. aureus* influyen de manera significativa en la respuesta inmune local inducida en la GM bovina, y podrían contribuir a explicar las diferencias en la respuesta inmune observadas en los ensayos posteriores.

Existen numerosos estudios de IIM experimentales en bovinos en los que se han utilizado diferentes cepas de *S. aureus* y concentraciones bacterianas, tales como ~40 UFC/ml (Bannerman *et al.*, 2004); ~300 UFC/ml (Roberson *et al.*, 1992); ~1000 UFC/5 ml (Kim *et al.*, 2011); ~2000 UFC/ml (Shoshani *et al.*, 2000) y 5×10^4 UFC/2 ml (Petzl *et al.*, 2016). Esto demuestra que los modelos experimentales de infección *in vivo* han sido extensamente probados y constituyen una herramienta efectiva para la investigación sobre la respuesta inmune del hospedador frente a diferentes patógenos causantes de mastitis bovina (Petzl *et al.*, 2018). En el presente estudio, se utilizaron dos cepas diferentes de *S. aureus*, inoculadas a una concentración de ~400 UFC/ml. La selección de esta dosis se basó en estudios previos en los que se observó que inoculando una baja cantidad de bacterias (~72 UFC de la cepa Newbould 305 de *S. aureus*) en vacas sanas en mitad de la lactancia, se logró establecer una IIM clínica leve en todos los cuartos inoculados (Bannerman *et al.*, 2004). Asimismo, se seleccionó esta concentración bacteriana para evitar sobrecargar el sistema inmune de la GM. Bajo estas condiciones experimentales, se logró inducir exitosamente la IIM en los cuartos inoculados con ambas cepas de *S. aureus*. El aislamiento de *S. aureus* a partir de la leche de los cuartos infectados presentó un patrón de eliminación intermitente y cíclica, previamente descrito para este patógeno (Sears *et al.*, 1990), dado que las bacterias no

se detectaron simultáneamente en todos los cuartos en un mismo momento de muestreo. En los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP), las bacterias se recuperaron de la leche entre el día 1 y 3 pi en la mitad de los cuartos. Sin embargo, durante este período se registró el mayor RCS en todos los cuartos, independientemente del estado bacteriológico, alcanzando un promedio de $3,7 \times 10^6$ células/ml al día 2 pi. El aislamiento bacteriológico negativo observado en cuatro de los ocho cuartos podría atribuirse a una rápida respuesta inmune innata que permitió la eliminación de la bacteria inoculada, o bien a la presencia de bacterias en la leche por debajo del límite de detección de la metodología utilizada (100 UFC/ml). A partir del día 28 pi y hasta el día 56 pi, esta cepa de *S. aureus* ya no se aisló en la leche de las vacas infectadas. Todos los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) desarrollaron mastitis clínica leve (score 1) entre 1 y 7 días pi, acompañado de un marcado aumento del RCS durante este período. Por el contrario, en los cuartos mamarios infectados con la cepa 5011 (P), la detección de bacterias en la leche se observó a partir del día 7 pi y se mantuvo hasta el día 56 pi en uno de los cuartos. Este hallazgo confirma la capacidad de esta cepa para adaptarse al microambiente de la GM y establecer una mastitis persistente, como en el caso de infección natural del cual fue aislada (Camussone *et al.*, 2020). En estos cuartos, solo se observaron pequeños grumos en la leche al día 14 pi, sin signos inflamatorios locales evidentes, coincidiendo con los valores más elevados de RCS. Nuestros resultados coinciden con estudios previos que han reportado RCS elevados incluso cuando no se aisló a *S. aureus* de la leche de las GMs infectadas con el mismo patógeno (Rivas *et al.*, 2000; Bannerman *et al.*, 2004). El hecho de que *S. aureus* no se aislara de manera constante en ninguna de las muestras posteriores a la inoculación temprana (0,5 días) con ambas cepas refleja el patrón cíclico de excreción bacteriana en la leche, ampliamente descrito para este patógeno (Sears *et al.*, 1990; Atalla *et al.*, 2009). En conjunto, estos hallazgos demuestran que, si bien ambas cepas de *S. aureus* fueron capaces de establecer una IIM, la cepa 806 (NP) indujo una respuesta inmune más rápida e intensa en las primeras etapas de la inoculación (1-3 días pi), la cual se extendió hasta el día 7 pi. En contraste, la cepa 5011 (P) mostró una multiplicación inicial más lenta, pero una mayor persistencia en la GM desde el día 7 pi hasta el final del estudio, probablemente debido a una mayor capacidad para evadir las defensas del hospedador y adaptarse al ambiente de la GM.

Las diferencias observadas en este estudio sobre la persistencia de las cepas de *S. aureus* en la GM podrían estar relacionadas con la presencia y expresión diferencial de determinados FV. En este sentido, Buzzola *et al.* (2007) demostraron, en un modelo experimental de mastitis en ratones, que las cepas de *S. aureus* pertenecientes a los *agr* tipo II y IV se eliminaban de la GM con mayor eficacia que aquellas clasificadas como *agr* I, lo que sugiere que este último grupo presenta una mayor capacidad de persistencia en el tejido mamario. En concordancia con estos hallazgos, en el presente estudio la cepa 806 (NP), clasificada como *agr* II, fue eliminada de la GM con mayor eficacia que la cepa 5011 (P) (*agr* I), la cual logró evadir la respuesta inmune del hospedador y

persistir en la GM hasta los 56 días pi. Estos resultados coinciden con investigaciones previas realizadas por el grupo de trabajo donde se desarrolla esta tesis (Pereyra *et al.*, 2017), en las que se evaluó la respuesta inmune inducida en la GM de ratones infectados con dos cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, con fenotipo, genotipo y capacidad de adaptación a la GM diferentes (P y NP). En dichas investigaciones, la cepa NP de *S. aureus* mostró una mayor capacidad de multiplicación en el tejido mamario durante las etapas tempranas de la infección, mientras que la cepa P presentó una replicación inicial más lenta, pero aumentó su capacidad de multiplicación a partir de las 120 h pi y hasta el final del estudio (11 días pi), evidenciando una mayor capacidad para evadir el sistema inmune y, por lo tanto, de persistir en la GM de ratón (Pereyra *et al.*, 2017). Además del tipo *agr*, otros FV, como el tipo de gen *cap* y la expresión del PC, también desempeñan un papel importante en la supervivencia intracelular de *S. aureus*. En este contexto, en estudios *in vitro* realizados con CEM bovinas, Bardiau *et al.* (2014) demostraron que los aislados pertenecientes al grupo *agr* II, positivos para *cap8* y que expresaban PC8, presentaban una menor capacidad de supervivencia intracelular en comparación con los aislados pertenecientes al grupo *agr* I que no expresaban ningún PC. En el presente estudio, si bien ambas cepas de *S. aureus* portaban genes *cap*, caracterizados previamente (Pereyra *et al.*, 2017), no se evaluó la expresión de PC5 o PC8 *in vitro*, por lo que no es posible establecer comparaciones directas con los resultados reportados por Bardiau *et al.* (2014). No obstante, estas observaciones refuerzan la hipótesis de que las diferencias genotípicas y fenotípicas entre cepas de *S. aureus* influyen de manera significativa en su capacidad de persistencia en la GM.

El contenido de células somáticas en la leche constituye un indicador clave del estado funcional y de la salud de la GM lactante (Li *et al.*, 2014). El RCS se ha utilizado durante décadas como un marcador indirecto de inflamación para el diagnóstico de mastitis bovina, basado principalmente en el incremento del número de células debido a la infiltración de neutrófilos que llegan a la leche como consecuencia de la inflamación (Schukken *et al.*, 2003). El RCS es un método rápido y relativamente sencillo de implementar, habiéndose convertido en un procedimiento rutinario de diagnóstico para determinar la calidad de leche en muchos países (Velásquez y Vega, 2012). La mastitis es uno de los factores de mayor influencia en el RCS de la leche (Harmon, 2001). Cuanto mayor es el grado de inflamación que presenta la glándula, aumenta el RCS, lo cual está asociado a una menor calidad y cantidad de leche producida (Bedolla y Ponce de León, 2008). El RCS proveniente de leche de cuartos mamarios libres de IIM es usualmente menor a 200.000 cél/ml y es frecuente observar animales que mantienen valores de recuento menores a 100.000 cél/ml. En desafíos experimentales con *S. aureus*, el tiempo de aparición de signos detectables de inflamación es variable, y depende tanto del tamaño del inóculo como de factores propios del animal, y puede limitarse a un aumento gradual del RCS durante las primeras 48–72 h horas post desafío, acompañado por el aislamiento concomitante de *S. aureus*

en la leche (Leitner *et al.*, 2000; Bannerman *et al.*, 2004; Petzl *et al.*, 2008; Whelehan *et al.*, 2011). En el presente estudio, la respuesta del RCS inducida por ambas cepas de *S. aureus* fue claramente diferencial y mostró variaciones con el tiempo. En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP), la respuesta inflamatoria fue más intensa y temprana, evidenciada por un pico de RCS al día 2 pi. En contraste, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) no se observaron variaciones en el RCS hasta el día 4 pi, alcanzando los valores máximos recién al día 14 pi; lo que indica una respuesta inflamatoria inicial más tardía y de menor magnitud. Este retraso en la respuesta inflamatoria inducida por la cepa 5011 (P), en comparación con la cepa 806 (NP), podría estar asociado con (1) una menor estimulación inicial de los macrófagos presentes en la GM para liberar citoquinas proinflamatorias y reclutar neutrófilos hacia ese sitio, minimizando la respuesta inflamatoria, y (2) una mayor capacidad de supervivencia intracelular. En concordancia con esta hipótesis, estudios *in vitro* previos (Sacco *et al.*, 2020), demostraron capacidades diferenciales de adherencia, internalización y persistencia intracelular entre ambas cepas de *S. aureus* en CEM bovinas; la cepa 5011 (P) mostró una mayor capacidad de adherencia/internalización y persistencia intracelular en células MAC-T, así como una mayor resistencia a los mecanismos microbicidas, en comparación con la cepa 806 (NP) (Sacco *et al.*, 2020). La internalización bacteriana podría conferir protección frente a los mecanismos efectores del sistema inmune, favoreciendo la persistencia a largo plazo en infecciones crónicas (Tuchscherer *et al.*, 2010). En este contexto, es posible que la inducción de una respuesta inflamatoria evidente, reflejada por el aumento notable del RCS en la leche a partir del día 4 pi, ocurriera una vez que la cepa 5011 (P) alcanzó un umbral mínimo necesario para ser reconocida por el sistema inmune innato. Si bien este retraso en la activación de la respuesta inmune podría estar relacionado con una mayor capacidad de esta cepa para invadir las células mamarias *in vitro*, el diseño experimental del presente estudio no permite confirmar esta hipótesis. En conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis en adición a los obtenidos por el grupo de trabajo en otros estudios, indican que las características genéticas y fenotípicas de las cepas de *S. aureus* se asocian con una respuesta inmune local diferencial, la cual condiciona el curso, la intensidad y la persistencia de la IIM.

Si bien el objetivo principal de este estudio fue caracterizar la población de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ durante la IIM por *S. aureus*, el análisis de las células inmunes circulantes también reveló cambios en la población de linfocitos B. En particular, se detectó una disminución transitoria de los linfocitos B en sangre periférica en las vacas inoculadas con la cepa 5011 (P) al día 3 pi, lo que sugiere una modulación de la respuesta humoral dependiente de la cepa infectante. Esta disminución podría reflejar la migración de los linfocitos B hacia la GM o hacia los tejidos linfoides secundarios, en el contexto de la activación de la respuesta inmune adaptativa, o bien podría ser una estrategia de evasión inmune que favorezca el establecimiento de infecciones persistentes. En estudios previos realizados en el mismo modelo de IIM por el grupo de trabajo,

se evaluó la respuesta humoral local y se observó un aumento significativo de IgG₂ en la leche de los cuartos inoculados con ambas cepas, 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con los cuartos controles, con valores más elevados en placas sensibilizadas con la cepa 5011 (P) (Engler *et al.*, 2022). Estos resultados indican que, si bien se desencadena una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral frente a ambas cepas de *S. aureus*, la misma no fue suficiente para eliminar la cepa más adaptada (P), lo que sugiere diferencias en la eficacia de la respuesta humoral en función del genotipo bacteriano. En consonancia con estos hallazgos, estudios previos reportaron un aumento de la proporción de linfocitos B en la leche de vacas con mastitis crónica por *S. aureus*, lo que respalda su participación en infecciones persistentes (Riollet *et al.*, 2001; Grönlund *et al.*, 2006). Por otro lado, al analizar la respuesta de IgG₁ en el mismo modelo experimental, se observó que los niveles de IgG₁ para ambas cepas (NP y P) fueron menores en placas sensibilizadas con la cepa 5011 (P) en comparación a los valores observados en las placas sensibilizadas con la cepa 806 (NP) (Engler *et al.*, 2022). En este contexto, la ausencia de alteraciones sistémicas detectables en la población de linfocitos B en las vacas infectadas con la cepa 806 (NP) es consistente con una respuesta predominantemente mediada por IgG₁, característica de infecciones menos persistentes (Boerhout *et al.*, 2018). En conjunto, estos hallazgos respaldan la idea de que el comportamiento de *S. aureus* durante la IIM es dependiente de la cepa, y que las diferencias en su capacidad de adaptación al microambiente de la GM influyen en su capacidad para desencadenar, modular y evadir la respuesta inmune del hospedador. Esta interacción diferencial condiciona el curso y la gravedad de la mastitis, así como la probabilidad de evolución hacia infecciones persistentes. No obstante, se requieren estudios adicionales que permitan profundizar en los mecanismos que regulan la migración, activación y función de los linfocitos B durante las IIM por *S. aureus*.

Existen amplias evidencias científicas que respaldan el papel de los linfocitos Tγδ en la respuesta inmune frente a infecciones causadas por bacterias intracelulares facultativas, tales como *M. bovis* (Price y Hope, 2009; McGill *et al.*, 2014; Guerra-Maupome *et al.*, 2019; Samuel *et al.*, 2024), MAP (Baquero *et al.* 2015; Krueger *et al.* 2016; Ludwig *et al.* 2019) y *Brucella abortus* (Skyberg *et al.*, 2011; Agnone *et al.*, 2019). Sin embargo, el rol de los linfocitos Tγδ en la respuesta inmune bovina frente a la IIM por diferentes cepas de *S. aureus* hasta el momento de realizar el presente trabajo de tesis no había sido estudiado. En este estudio, en animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, se observó un aumento transitorio en el porcentaje de linfocitos Tγδ WC1⁺ en sangre periférica a los 0,5 días pi, seguido de una disminución a niveles basales a los 2 días pi. Además, el análisis de la expresión de moléculas de superficie en estas células reveló un aumento en la densidad de expresión de CD25 (medida como IFM) al día 1 pi. En conjunto, estos resultados sugieren una migración temprana de los linfocitos Tγδ WC1⁺ desde la sangre hacia la GM durante las primeras etapas de la infección por *S. aureus*, e indican que las

células que migran podrían estar activadas *in vivo*. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos realizados en modelos de infección por otros patógenos. Buza *et al.* (2009) reportaron un aumento en la proporción de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ en sangre periférica tras la vacunación subcutánea con BCG de *M. bovis* en terneros, sugiriendo que estas células podrían actuar como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, contribuyendo a la defensa temprana frente a este patógeno (Buza *et al.*, 2009). En consonancia con estos hallazgos, Toka *et al.* (2011) reportaron un aumento en el porcentaje de linfocitos $\gamma\delta$ en sangre periférica a los 3 días p.i. con FMDV en terneros Holstein, acompañado de un aumento en la expresión de CD25 en la subpoblación de WC1⁺, lo que indica activación *in vivo* tras la infección viral. Asimismo, Amadori *et al.* (1995) demostraron que vaquillonas infectadas con HVB-1 presentaron un aumento de los linfocitos $\gamma\delta$ dentro de la población de CMN de sangre periférica durante los primeros días posteriores a la infección, lo que indica que estas células no solo responden rápidamente a las infecciones virales, sino que también pueden contribuir a la vigilancia inmunológica y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. En contraste con estos hallazgos, y a diferencia de lo observado en los animales inoculados con la cepa 806 (NP), en los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron cambios significativos en la frecuencia de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ ni en la densidad de expresión de CD25 en sangre periférica. Esta ausencia de activación sistémica podría estar relacionada con la mayor capacidad de esta cepa de *S. aureus* para evadir o modular la respuesta inmune del hospedador. En apoyo de esta hipótesis, estudios previos han demostrado que los secretomas de cepas de *S. aureus* con diferentes perfiles epidemiológicos inducen respuestas inmunes distintas. Addis *et al.* (2022) observaron que el secretoma de la cepa GTS/ST398, de baja prevalencia y asociada a infecciones esporádicas, incrementó el daño celular, la inflamación y redujo la viabilidad de las CMN de sangre periférica bovina. En contraste, el secretoma de la cepa GTB/ST8, adaptada al ganado bovino y de alta prevalencia en los rodeos, liberó selectivamente FV asociados al desarrollo y la persistencia de la infección, siendo capaz de evadir tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa humoral sin ejercer efectos citotóxicos sobre las CMN bovinas (Addis *et al.*, 2022). En conjunto, estos antecedentes concuerdan con los resultados obtenidos en la presente tesis y refuerzan la hipótesis de que las cepas de *S. aureus* con diferentes capacidades de adaptación a la GM bovina presentan comportamientos diferenciales para desencadenar, modular o evadir la respuesta inmune del hospedador, lo que influye en el curso y la gravedad de la infección.

Como eslabón crucial entre la inmunidad innata y la adaptativa, los linfocitos $\gamma\delta$ poseen la capacidad de presentar antígenos mediante la expresión de moléculas del CMH-II. En bovinos, se ha demostrado que estas células capturan antígenos y los presentan a los linfocitos T CD4⁺, induciendo así su activación y proliferación (Collins *et al.*, 1998). Asimismo, tras la estimulación con BCG de *M. bovis*, subpoblaciones específicas de linfocitos $\gamma\delta$ de sangre periférica expresan

de forma diferencial moléculas características de las CPA, como CMH-II y moléculas coestimuladoras, lo que sugiere un papel relevante de estos linfocitos innatos en la inducción de respuestas inmunes protectoras, especialmente en el contexto de la vacunación (Guzman *et al.*, 2012). Hasta el momento, no existe información que describa el papel de los linfocitos $\gamma\delta$ bovinos como CPA en infecciones experimentales por *S. aureus in vivo*. En el presente estudio, en animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, se observó una disminución en la frecuencia de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ CD80⁺ circulantes a los días 1 y 2 pi en comparación con los niveles basales (día 0, pre-i). Además, la densidad de expresión de CD80 (evaluada por IFM) en linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ fue menor en estos animales que en aquellos inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* al día 4 pi. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la población de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica experimenta cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras durante la fase temprana de la infección, lo que indica una posible activación y migración hacia la GM, donde podrían funcionar como CPA. De manera concordante, también se observó una disminución en la frecuencia de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ CMH-II⁺ en sangre periférica en animales inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* desde el día 2 hasta el 21 pi. No obstante, a pesar de esta disminución en el porcentaje celular, los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ aumentaron la densidad de expresión de CMH-II al día 2 pi. Estos resultados sugieren que, aunque una fracción de estas células podría estar migrando fuera de la circulación, aquellas que permanecen en sangre presentan un fenotipo activado, compatible con una mayor capacidad de presentación antigénica. En conjunto, estos resultados sugieren que los linfocitos $\gamma\delta$, que expresan y regulan marcadores asociados a las CPA, pueden migrar hacia la GM durante la fase inicial de la infección por *S. aureus* y contribuir a la inducción de la respuesta inmune adaptativa frente a este patógeno. Esta interpretación es consistente con los resultados de Toka *et al.* (2011), quienes demostraron que los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ de sangre periférica adquirieron la capacidad de procesar antígenos proteicos y aumentaron la expresión de CMH-II tras la infección por FMDV en terneros Holstein. Su estudio demostró que estas células se activaban rápidamente durante la fase aguda de la infección, contribuyendo a la respuesta inmune innata y sugiriendo un papel crucial en el control temprano de esta infección viral. En concordancia con nuestros resultados previos, la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, mejor adaptada al nicho extracelular de la GM, fue detectada tempranamente por el sistema inmune innato y desencadenó una respuesta eficaz que contribuyó a la eliminación del microorganismo de la leche. En esta respuesta, los linfocitos $\gamma\delta$ activados que migraron a la GM podrían haber contribuido a controlar la infección por *S. aureus*, actuando como CPA y promoviendo la inducción de una respuesta inmune celular específica. Por el contrario, en animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, solo se observó una disminución en la frecuencia de linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ CD86⁺ en sangre periférica a los 21 días pi. Este hallazgo coincide con nuestros resultados previos, donde se demostró que la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, mejor adaptada al nicho intracelular de la GM, ha desarrollado estrategias para

adaptarse y persistir en el ambiente de la GM, demostrado por los aislamientos bacterianos encontrados hasta los 56 días pi (Engler *et al.*, 2022). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la migración de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan marcadores de CPA a los 21 días pi podría no ser suficiente para resolver la infección, lo que indica que la cepa 5011 (P) posee mecanismos más eficaces para modular y evadir la respuesta inmune del hospedador. En consecuencia, si bien los datos obtenidos apoyan un rol potencial de los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ como CPA durante la infección por *S. aureus*, son necesarios estudios adicionales que incluyan ensayos funcionales específicos para confirmar esta función y dilucidar su contribución precisa al control de la infección por este microorganismo.

Está bien establecido que los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden migrar desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos en respuesta a una infección o inflamación. Su reclutamiento a la GM puede ser crucial para la contención temprana de patógenos como *S. aureus* (Wilson, 2003; Faldyna *et al.*, 2006). En el presente estudio, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, los niveles de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche aumentaron desde el día 2 hasta el día 7 pi, retornando a valores basales al día 14 pi. Estos resultados son consistentes con la evolución del RCS observado tras la infección con esta cepa de *S. aureus*, la cual indujo una mastitis clínica leve y desencadenó una respuesta inflamatoria rápida y eficaz, que finalmente condujo a la eliminación de las bacterias de la leche después del día 21 pi. En este contexto, el incremento transitorio de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche sugiere un posible papel de esta población celular innata en la resolución temprana del proceso infeccioso. En concordancia con estos resultados, Šustrová y Sláma (2013) reportaron una mayor proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ en lavados de la GM luego de una IIM experimental por *S. aureus*, lo que apoya su participación en la respuesta inflamatoria temprana. Asimismo, estudios que utilizaron la estimulación intramamaria con un análogo del dipéptido de muramilo demostraron un reclutamiento significativo de linfocitos T $\gamma\delta$ hacia la GM, lo que refuerza la hipótesis de que estas células desempeñan un papel clave en la respuesta inmune temprana frente a los patógenos causantes de mastitis (Faldyna *et al.*, 2006). En contraste, los animales inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* mostraron un aumento en la población de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche, sin cambios concomitantes en su frecuencia en sangre periférica, lo que sugiere una posible expansión o retención local de esta población en la GM. En estos animales, la población de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche aumentó a partir del día 4 pi, alcanzando sus niveles más altos al día 21 pi. Estos hallazgos fueron consistentes con la cinética del RCS observado tras la IIM con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, que indujo una mastitis subclínica persistente, caracterizada con una respuesta inflamatoria de menor intensidad y aparición más tardía que la inducida por la cepa 806 (NP), y que persistió durante el período de observación. El aumento local de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche de los animales infectados con la cepa 5011 (P) sugiere que, si bien estas células forman parte de la respuesta inmune inducida, su actividad no habría

sido suficiente para resolver la infección causada por esta cepa, lo que podría reflejar una mayor capacidad del patógeno para evadir o modular los mecanismos efectores del hospedador. En este sentido, nuestros hallazgos difieren de los reportados Tucker *et al.* (2023), quienes no observaron diferencias en la frecuencia de linfocitos $T\gamma\delta$ en leche de cuartos mamarios infectados por *S. aureus* en comparación con cuartos no infectados, en animales con mastitis subclínica crónica. Estas discrepancias podrían atribuirse a diferencias en la duración de la infección, el estado clínico de la mastitis y, fundamentalmente, a las características genotípicas y fenotípicas de las cepas involucradas, lo que pone de manifiesto el comportamiento variable de *S. aureus* y su capacidad diferencial para inducir respuestas inmunes en la GM bovina.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos $T\gamma\delta$ tienen la capacidad de producir varias citoquinas, incluyendo IL-17A e IFN- γ , que desempeñan un papel crucial tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa frente a *S. aureus* (Baldwin *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015; Steinbach *et al.*, 2016; Elnaggar *et al.*, 2018). En el presente estudio, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 de *S. aureus* (NP), las concentraciones de IL-17A aumentaron gradualmente, alcanzando un pico al día 7 pi y retornando a niveles basales al día 21 pi. En contraste, aunque los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 de *S. aureus* (P) también mostraron niveles elevados de IL-17A, el incremento fue levemente pronunciado que el observado con la cepa 806 (NP). Estos resultados son coherentes con estudios previos realizados en el mismo modelo de infección experimental, en los que se observó que la cepa 806 (NP) induce una respuesta inflamatoria robusta en comparación con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* (Engler *et al.*, 2022). En este contexto, el aumento de IL-17A coincidió temporalmente con picos de IL-1 β e IL-6, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva capaz de amplificar la respuesta inflamatoria local. Este entorno proinflamatorio podría favorecer el reclutamiento y la activación de neutrófilos en el sitio de la infección, contribuyendo potencialmente al control bacteriano y a la posterior resolución de la inflamación. Asimismo, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP), el aumento significativo de IL-17A al día 7 pi coincidió con un aumento de la proporción de linfocitos $T\gamma\delta$ locales, lo que sugiere que esta población celular podría constituir una fuente importante de IL-17 durante las fases tempranas de la infección. Sin embargo, otras poblaciones celulares, como las células Th17, también podrían contribuir a los niveles de IL-17A observados (Cunha *et al.*, 2019). Son necesario estudios adicionales para confirmar la fuente celular predominante de esta citoquina. En contraste, aunque la cepa 5011 (P) indujo un aumento en los niveles de IL-17A, este no pareció ser suficiente para establecer un entorno proinflamatorio eficaz, como lo evidencian los bajos niveles de otras citoquinas proinflamatorias detectadas previamente (Engler *et al.*, 2022). En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la cepa 5011 (P) ha desarrollado mecanismos que le

permiten modular o evadir la respuesta inmune del hospedador, favoreciendo su adaptación y persistencia en la GM y contribuyendo al establecimiento de una mastitis subclínica persistente.

Los interferones (IFN) son componentes claves de la respuesta inmune del hospedador frente a patógenos intracelulares, ya que desempeñan un papel central en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, y constituyen una de las citoquinas más estudiadas en la inmunidad bovina asociada a la mastitis (Pereyra *et al.*, 2014; Calvino y Dallard, 2023). En bovinos, se han reportado aumentos de IFN- γ en la leche en respuesta a la infección por *S. aureus*, con patrones que varían en función de la cepa infectante (Bannerman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). No obstante, la evidencia disponible es insuficiente para relacionar los niveles de IFN- γ con las interacciones tempranas patógeno-hospedador o con la persistencia bacteriana; su función podría estar más relacionada con la activación de las respuestas inmunitarias celulares en situaciones en las que los mecanismos innatos resultan insuficientes para eliminar el patógeno (Bannerman, 2009; Kim *et al.*, 2011). En el presente estudio, los niveles de IFN- γ fueron indetectables en las muestras de leche de los cuartos mamarios controles en todos los tiempos evaluados, lo cual concuerda con reportes previos que describen la ausencia de IFN- γ en leches de vacas sanas (Hisaeda *et al.*, 2001). No obstante, la expresión de IFN- γ difirió claramente entre los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (NP) y 5011 (P) de *S. aureus*, lo que indica una modulación dependiente de la cepa en la respuesta de IFN- γ . En particular, se observó un marcado aumento de los niveles de IFN- γ principalmente al día 21 pi en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, en comparación con los inoculadas con la cepa 806 (NP). Estos hallazgos coinciden con estudios previos que indican que las mayores concentraciones de IFN- γ se asocian con infecciones persistentes (Souza *et al.*, 2023). Esto sugiere que los niveles elevados de IFN- γ pueden reflejar un intento del hospedador de potenciar las respuestas inmunitarias celulares frente a patógenos que no han sido eliminados eficazmente por el sistema inmune innato (Bannerman *et al.*, 2004; Kauf *et al.*, 2007; Bannerman, 2009). Cabe destacar que el aumento de IFN- γ observado al día 21 pi coincidió con un aumento en la proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche, lo que sugiere que estas células podrían ser una fuente importante de esta citoquina a nivel local. Sin embargo, otras poblaciones celulares, como los linfocitos Th1 o los linfocitos T citotóxicos, también pueden contribuir a los niveles de IFN- γ observados (Schoenborn y Wilson, 2007; Ezzat Alnakip *et al.*, 2014). Asimismo, los mayores niveles de IFN- γ detectados en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) coincidieron con bajos niveles de IL-17, lo que podría explicarse por el efecto inhibitorio del IFN- γ sobre la polarización de las células Th17 y $\gamma\delta$ T17 (Peckham *et al.*, 2014). Por otro lado, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, se detectó un aumento transitorio de IFN- γ al día 1 pi, en comparación con el valor basal (D0, pre-i), lo cual coincide con los resultados de Bannerman *et al.* (2009). Este aumento no se acompañó de un incremento en la frecuencia de linfocitos T $\gamma\delta$ en la leche, lo que sugiere

que estas células probablemente no sean la principal fuente de esta citoquina en esta fase inicial de la infección. En consonancia con nuestros resultados, Kim *et al.* (2011) informaron que diferentes cepas de *S. aureus* influyen en las respuestas inmunitarias locales y sistémicas en vacas Holstein durante la IIM. Los niveles de IFN- γ tanto en suero como en leche variaron según la cepa infectante (Kim *et al.*, 2011). En conjunto, estos resultados refuerzan la noción de que distintas cepas de *S. aureus* inducen perfiles diferenciales de IFN- γ , reflejando estrategias divergentes de interacción con el sistema inmune del hospedador y contribuyendo a determinar el curso y la persistencia de la IIM.

La IL-4 es una citoquina pleiotrópica multifuncional producida principalmente por las células T activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Funcionalmente, la IL-4 es conocida por definir el perfil de respuesta de tipo Th2 de las células T CD4 y por regular procesos como la proliferación celular, la apoptosis y la expresión de numerosos genes en diversos tipos celulares (Luzina *et al.*, 2012). Si bien en bovinos los linfocitos $\gamma\delta$ se asocian preferentemente a perfiles productores de IFN- γ e IL-17 más que a respuestas de tipo Th2 clásicas, no puede descartarse que estas células innatas contribuyan indirectamente a la modulación del microambiente de la GM mediante interacción con otras poblaciones celulares, como linfocitos T CD4⁺, CPA, linfocitos B y macrófagos, influyendo así en la producción local de IL-4 por otras fuentes celulares. En el presente estudio, los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* mostraron un aumento significativo de IL-4 al día 1 pi, un segundo aumento al día 7 pi y niveles más altos que los demás grupos experimentales hasta el día 21 pi. Este patrón temporal coincide, en parte, con la cinética observada para los linfocitos $\gamma\delta$ en la leche, que aumentaron entre los días 2 y 7 pi, sugiriendo que la activación y el reclutamiento temprano de estas células podrían contribuir a la generación de un entorno inmunológico regulado, en el que la respuesta inflamatoria inicial es seguida por mecanismos de control y resolución. En este contexto, los linfocitos $\gamma\delta$ podrían actuar como moduladores tempranos de la respuesta inmune, favoreciendo indirectamente la activación de vías asociadas a IL-4 una vez establecido el control bacteriano. Resultados previos de nuestro grupo de investigación (Renna *et al.*, 2019) mostraron niveles significativamente más altos de IL-4 en las secreciones mamarias de cuartos con infección crónica por *S. aureus*, en comparación con los cuartos controles, a las 24 h post-secado, con una disminución hasta el día 14 y un retorno a niveles altos al día 21 de la involución. La IL-4 promueve la activación alternativa de los macrófagos hacia un perfil tolerogénico de tipo 2 (M2), caracterizado por funciones antiinflamatorias, producción de IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF)- β y participación en la cicatrización y en la reparación del tejido dañado (Mantovani *et al.* 2007). Hasta el momento, no existe evidencia directa sobre el papel de la IL-4 en la mastitis bovina por *S. aureus* (Alluwaimi *et al.*, 2003) y ningún estudio ha cuantificado la concentración de IL-4 en leche en una IIM bovina experimental por *S. aureus* hasta 21 días pi. En

el presente estudio, los niveles de IL-4 detectados en leche de los cuartos inoculados con la cepa 806 (NP) de *S. aureus* al día 1 pi, podrían reflejar un intento del sistema inmune del hospedador de contrarrestar el aumento concomitante de IFN- γ detectado en el mismo tiempo de muestreo. Sin embargo, este equilibrio no impidió el establecimiento de una respuesta inflamatoria eficaz, lo que sugiere que la IL-4 en este tiempo estaría actuando como un modulador y no como un inhibidor de la respuesta protectora. El segundo aumento de los niveles de IL-4 al día 7 pi coincidió con valores elevados de RCS en leche y con el incremento local de linfocitos T $\gamma\delta$, lo que podría interpretarse como un mecanismo orientado a limitar el daño tisular y favorecer la resolución de la inflamación inducida por *S. aureus*. Este fenómeno también se relaciona con el aumento en los niveles de IL-6 observado en este modelo, que alcanza su punto máximo al día 14 pi, sugiriendo una posible acción coordinada entre ambas citoquinas para modular el proceso inflamatorio (Engler *et al.*, 2022). Sin embargo, esta posible asociación debe ser confirmada mediante estudios funcionales adicionales. Por el contrario, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, sólo se observó un aumento transitorio en los niveles de IL-4 al día 1 pi, mientras que en los demás tiempos evaluados los niveles de esta citoquina fueron similares a los de los cuartos controles. Esta limitada inducción de IL-4, junto con la persistencia bacteriana y el aumento tardío de linfocitos T $\gamma\delta$ en leche, sugiere que la respuesta reguladora fue insuficiente o desfasada temporalmente, contribuyendo a la instauración de una infección subclínica persistente. En concordancia, Bochniarz *et al.* (2017), en un estudio con vacas Holstein-Friesian en lactancia, reportaron que la concentración de IL-4 era significativamente menor tanto en suero como en leche de las vacas con mastitis causada por estafilococos coagulasa-negativos, en comparación con las vacas sanas, lo que subraya la importancia del tipo y las características del patógeno en la respuesta inflamatoria desencadenada durante la mastitis. En conjunto, estos resultados indican que la IL-4 podría desempeñar un papel relevante en la modulación y resolución de la respuesta inflamatoria en la mastitis bovina, particularmente en infecciones causadas por cepas de *S. aureus* de baja adaptación a la GM. Asimismo, refuerzan la hipótesis de que los linfocitos T $\gamma\delta$, aunque no sean una fuente directa predominante de IL-4, participan activamente en la regulación del microambiente inmunológico de la GM de manera dependiente de la cepa infectante. Se requieren estudios adicionales, con mayor número de animales y abordajes funcionales, para dilucidar el papel específico de la IL-4 y su interacción con los linfocitos T $\gamma\delta$ durante la IIM por *S. aureus*.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede confirmar la hipótesis de que los linfocitos T $\gamma\delta$ se activan indirectamente frente al contacto con *S. aureus* y participan activamente en la modulación de la respuesta inmune, contribuyendo a la producción de citoquinas clave como IFN- γ e IL-17. Estas citoquinas condicionan el perfil de la respuesta adaptativa hacia la respuesta de tipo Th1/Th17. Asimismo, la magnitud y la cinética de esta respuesta están estrechamente

relacionadas con las características genéticas de la cepa infectante y su capacidad de adaptación a la GM bovina, evidenciándose una activación inmune más temprana y eficaz frente a la cepa 806 (NP) de *S. aureus*, de baja adaptación a la GM y asociada a IIM no persistentes.



6. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ bovinos WC1^+ participan en la respuesta inmune frente a *S. aureus*, patógeno causante de mastitis bovina. A partir de los resultados obtenidos *in vitro*, se concluye que estos linfocitos innatos son capaces de activarse directamente tras el contacto con *S. aureus*, como lo evidencia el aumento en la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD62L, particularmente luego del contacto con la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. No obstante, la activación de los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ se ve potenciada cuando estas células innatas están en contacto con otras células presentes en la población de CMN totales, lo que resalta la importancia de la cooperación con otras células del sistema inmune.

Asimismo, los resultados demuestran que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ , cuando se activan, producen o inducen a otras células a producir $\text{IFN}\gamma$ e IL-17, citoquinas involucradas en los perfiles de respuesta de tipo Th1 y Th17 que protegen frente a las infecciones por *S. aureus*. Esta inducción fue dependiente de la cepa evaluada, observándose una mayor producción de ambas citoquinas en respuesta a la cepa 806 (NP) de *S. aureus*. Esto se demuestra porque en ausencia de la población de linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ , los niveles de estas citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de CMN con ambas cepas de *S. aureus* fueron significativamente menores en comparación a cuando esta población está presente. En contraste, la ausencia de detección de las citoquinas IL-10 e IL-4 durante las primeras horas de contacto sugiere que estas citoquinas no estarían participando de la respuesta inmune que se induce tempranamente tras el contacto con ambas cepas de *S. aureus*, en ninguno de los tres sistemas evaluados.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que *Toll like Receptor 2* (TLR2) no sería el principal RRP involucrado en el reconocimiento de *S. aureus* por parte de los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ , lo que plantea la necesidad de futuros estudios orientados a identificar otros mecanismos de reconocimiento implicados en la activación de esta población celular.

Asimismo, los resultados *in vitro* indican que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ influyen en la activación de los monocitos-macrófagos frente a *S. aureus*, modulando la expresión de moléculas asociadas a la presentación antigénica de manera dependiente de la cepa. Estos resultados sugieren que los linfocitos $\text{T}\gamma\delta$ WC1^+ podrían participar indirectamente en la regulación del microambiente inflamatorio y en la activación de los monocitos-macrófagos, particularmente frente a cepas de *S. aureus* con mayor capacidad de persistencia en la GM bovina (Figura 48).

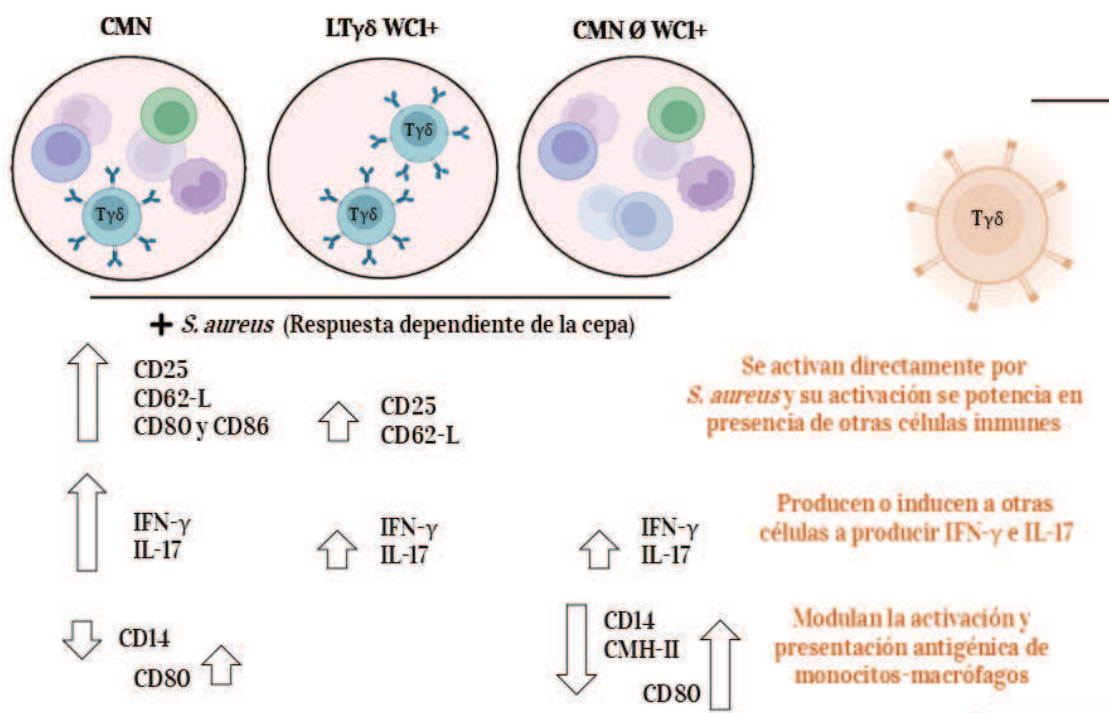


Figura 48. Resumen de la respuesta *in vitro* de los linfocitos $T\gamma\delta$ WCI^+ frente a *S. aureus*.

A partir del modelo de IIM *in vivo*, se concluye que el comportamiento de *S. aureus* depende marcadamente de la cepa infectante y de su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, lo que determina su adaptación y persistencia en el microambiente de la GM. La cepa 806 (NP) de *S. aureus*, mejor adaptada al nicho extracelular de la GM, indujo una IIM clínica leve, desencadenando una respuesta inflamatoria rápida y robusta, evidenciada por los elevados RCS y de citoquinas proinflamatorias, lográndose la cura bacteriológica luego del día 21 pi. Esta cepa fue detectada de manera temprana por parte de las células de la inmunidad innata y logró inducir una respuesta efectiva por parte del hospedador. En contraste, la cepa 5011 (P) de *S. aureus* fue capaz de inducir una IIM subclínica crónica o persistente, desencadenando una respuesta inflamatoria de menor intensidad y más tardía que la cepa 806 (NP), demostrado por los bajos RCS registrados hasta el día 4 pi y los bajos niveles de citoquinas detectados en leche. Es decir, que esta cepa ha desarrollado estrategias para adaptarse y sobrevivir en el ambiente de la GM y ha logrado desplegar mecanismos eficientes para evadir la respuesta inmune del hospedador.

Este estudio *in vivo* demuestra, además, que los linfocitos $T\gamma\delta$ participan en la IIM por *S. aureus*, migrando hacia la GM y/o aumentando en número a nivel local, regulando la expresión de moléculas asociadas a la función de CPA y liberando o promoviendo la liberación de IL-17 e IFN- γ , citoquinas clave en la respuesta inmune frente a *S. aureus*.

Finalmente, las características genotípicas y fenotípicas de las cepas de *S. aureus* influyen en el comportamiento funcional de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ y en la magnitud de la respuesta inmune inducida. En conjunto, estos hallazgos destacan la importancia de los linfocitos $T\gamma\delta$ en la respuesta inmune local frente a *S. aureus*. Además, proporcionan una base experimental para diseñar futuros ensayos dirigidos a evaluar su potencial como diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas o preventivas para el control de la mastitis bovina. No obstante, se requieren estudios adicionales para profundizar en la comprensión de las complejas interacciones entre *S. aureus* y el sistema inmune bovino, particularmente en relación con los mecanismos de activación y regulación de los linfocitos $T\gamma\delta$ durante la IIM por este patógeno. Los resultados de este estudio subrayan la importancia de considerar las características genotípicas y fenotípicas específicas de cada cepa de *S. aureus* al estudiar la patogénesis y al diseñar estrategias eficaces para el control de la mastitis bovina (Figura 49).

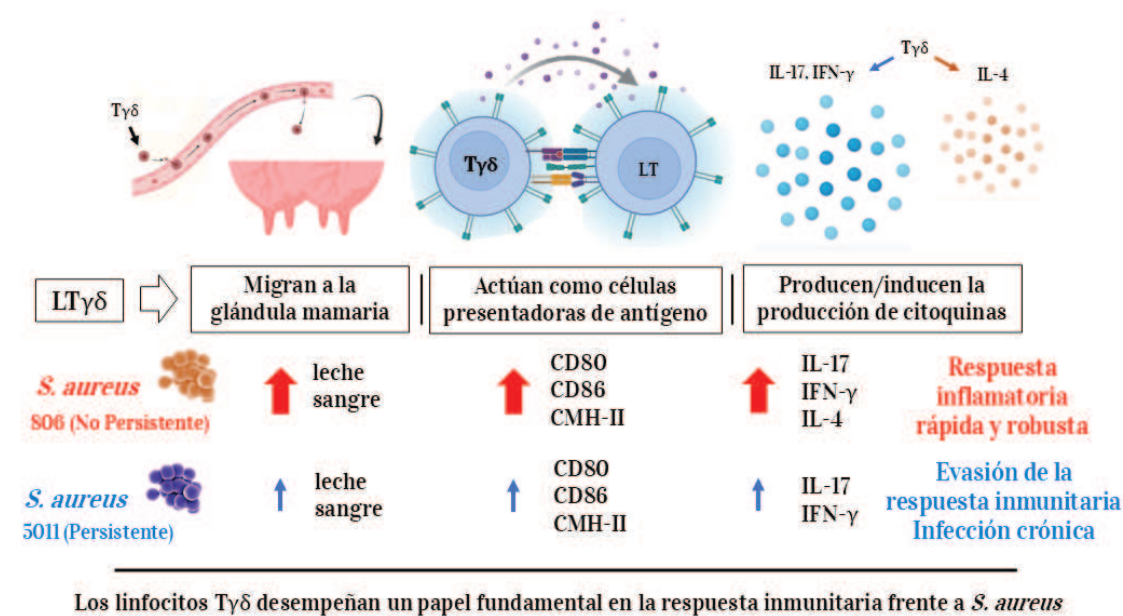


Figura 49. Resumen de la respuesta in vivo de los linfocitos $T\gamma\delta$ WC1⁺ frente a *S. aureus*.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. 2022. *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: Elsevier. 10^a ed.
- Addis MF, Pisanu S, Monistero V, Gazzola A, Penati M, Filipe J, Di Mauro S, Cremonesi P, Castiglioni B, Moroni P, Pagnozzi D, Tola S, Piccinini R. 2022. Comparative secretome analysis of *Staphylococcus aureus* strains with different within-herd intramammary infection prevalence. *Virulence*. 13: 174–190.
- Agnone A, La Manna MP, Vesco G, Gargano V, Macaluso G, Dieli F, Sireci G, Villari S. 2019. Analysis of interferon-gamma producing cells during infections by *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Brucella abortus* in cattle. *Vet Ital*. 55: 149–155.
- Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16: 291–304.
- Akers RM, Nickerson SC. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16: 275–289.
- Albarrak SM, Waters WR, Stabel JR, Hostetter JM. 2018. Evaluating the cytokine profile of the WC1⁺ $\gamma\delta$ T cell subset in the ileum of cattle with the subclinical and clinical forms of MAP infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 201: 26–31.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B*. 50: 105–111.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun*. 79: 1021–1026.
- Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2012. Short chain fatty acids decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet Microbiol*. 155: 324–331.
- Alvarez AJ, Endsley JJ, Werling D, Estes DM. 2009. WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells indirectly regulate chemokine production during *Mycobacterium bovis* infection in SCID-bo mice. *Transbound Emerg Dis*. 56: 275–284.
- Amadori M, Archetti IL, Verardi R, Berneri C. 1995. Role of a distinct population of bovine $\gamma\delta$ T cells in the immune response to viral agents. *Viral Immunol*. 8: 81–91.
- Andreotti CS, Baravalle C, Sacco SC, Lovato M, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvino LF, Dallard BE. 2017. Characterization of immune response in *Staphylococcus aureus*

- chronically infected bovine mammary glands during active involution. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 54: 51–60.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence.* 2: 445–459.
- Asai KI, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K. 1998. Variation in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions. *Vet Immunol Immunopathol.* 65: 51–61.
- Atalla H, Gyles C, Wilkie B, Leslie K, Mallard B. 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection with *Staphylococcus aureus* SCV. *Vet Microbiol.* 137: 326–334.
- Baldwin CL, Sathiyaseelan T, Naiman B, White AM, Brown R, Blumerman S, Rogers A, Black SJ. 2002. Activation of bovine peripheral blood $\gamma\delta$ T cells for cell division and IFN- γ production. *Vet Immunol Immunopathol.* 87: 251–259.
- Baldwin CL, Yirsaw A, Gillespie A, Le Page L, Zhang F, Damani-Yokota P, Telfer JC. 2020. $\gamma\delta$ T cells in livestock: Responses to pathogens and vaccine potential. *Transbound Emerg Dis.* 67(Suppl 2): 119–128.
- Ballou MA. 2012. Growth and development symposium: Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 90: 1610–1619.
- Bank U, Ansorge S. 2001. More than destructive: Neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. *J Leukoc Biol.* 69: 197–206.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 463–472.
- Bannerman DD. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci.* 87(Suppl 13): 10–25.
- Baquero MM, Plattner BL. 2015. Bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 170: 65–72.
- Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminiau B, Mainil JG. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet Microbiol.* 185: 1–6.

- Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 169: 74–79.
- Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE, Baravalle C. 2018. Panax ginseng extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophage phagocytic activity. *Microb Pathog.* 122: 63–72.
- Bedolla C, Ponce de León M. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET, Revista electrónica de Veterinaria.* 9: 1-26.
- Blumerman SL, Herzig CTA, Baldwin CL. 2007. WC1⁺ $\gamma\delta$ T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *Eur J Immunol.* 37: 1204–1216.
- Bochniarz M, Zdzisińska B, Wawron W, Szczubiał M, Dąbrowski R. 2017. Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci.* 100: 9674–9680.
- Boerhout EM, Koets AP, Mols-Vorstermans TGT, Nuijten PJM, Hoeijmakers MJH, Rutten VPMG, Bijlsma JJE. 2018. The antibody response in the bovine mammary gland is influenced by the adjuvant and the site of subcutaneous vaccination. *Vet Res.* 49: 1–10.
- Bosworth BT, Dowbenko D, Shuster DE, Harp JA. 1993. Bovine L-selectin: A peripheral lymphocyte homing receptor. *Vet Immunol Immunopathol.* 37: 201–215.
- Bradley A y Green M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In Pract.* 27(6): 310–315.
- Bröker BM, Mrochen D, Péton V. 2016. The T cell response to *Staphylococcus aureus*. *Pathogens.* 5: 31.
- Buza J, Kiros T, Zerihun A, Abraham I, Ameni G. 2009. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guérin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 130: 251–255.
- Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LPN, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvinho LF, Sordelli DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun.* 75: 886–891.
- Calvinho LF, Dallard BE. 2023a. Host immune response factors associated with *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infections. *CABI Rev.* 2023: 1–15.

- Calvinho LF, Chaves J, Pol M y Tirante L. 2024. Evolución del control de mastitis bovina en Argentina en los últimos 20 años. *Methodo Inves. Apl. a las Cienc. Biol.* 9: 8-18.
- Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, de Oliveira Mendes TA, Fitzgerald JR, de Oliveira Barros Ribon A. 2022. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. *BMC Vet Res.* 18: 1–16.
- Camussone CM, Molineri AI, Signorini ML, Neder VE, Vitulich CA, Calvinho LF. 2020. Risk factors of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in pre-partum dairy heifers under grazing conditions and molecular characterization of isolates from heifers and cows. *J Dairy Res.* 87: 82–88.
- Camussone CM, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I y Calvinho LF. 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Braz. J. Microbiol.* 43: 1010-1014.
- Cappuccino JG y Sherman N. 2005. *Microbiology: a laboratory manual*. Pearson Higher Ed. 10^a ed.
- Caron J, Ridgley LA y Bodman-Smith M. 2021. How to train your dragon: harnessing gamma delta T cells antiviral functions and trained immunity in a pandemic era. *Front Immunol.* 12: 666983.
- Caruso A, Licenziati S, Corulli M, Canaris AD, De Francesco MA, Fiorentini S, Peroni L, Fallacara F, Dima F, Balsari A, Turano A. 1997. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry.* 27: 71–76.
- Chan KF, Da J, Duarte G, Ostrowska S, Behren A. 2022. $\gamma\delta$ T cells in the tumor microenvironment: Interactions with other immune cells. *Front Immunol.* 13: 1-20.
- Chen Y, Ma Y, Ji Q, Yang X, Feng X, Yao R, Cheng X, Li T, Wang Y, Wang Z. 2021. Intracellular *Staphylococcus aureus* infection decreases milk protein synthesis by preventing amino acid uptake in bovine mammary epithelial cells. *Front Vet Sci.* 8: 1-14.
- Cheng P, Liu T, Zhou WY, Zhuang Y, Peng LS, Zhang JY, Yin ZN, Mao XH, Guo G, Shi Y, Zou QM. 2012. Role of $\gamma\delta$ T cells in host response against *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *BMC Immunol.* 13: 38.

- Claes J, Ditkowski B, Liesenborghs L, Veloso TR, Entenza JM, Moreillon P, Vanassche T, Verhamme P, Hoylaerts MF, Heying R. 2018. Assessment of the dual role of clumping factor A in *Staphylococcus aureus* adhesion to endothelium in absence and presence of plasma. *Thromb Haemost.* 118: 1230–1241.
- Cobirka M, Tancin V, Slama P. 2020. Epidemiology and classification of mastitis. *Animals.* 10: 1-17.
- Collins RA, Werling D, Duggan SE, Bland AP, Parsons KR, Howard CJ. 1998. Gamma delta T cells present antigen to CD4⁺ alpha beta T cells. *J Leukoc Biol.* 63: 707–714.
- Côté-Gravel J y Malouin F. 2019. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *J Dairy Sci.* 102: 4727–4740.
- Cua DJ, Tato CM. 2010. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 10: 479-489.
- Cucarella C, Tormo MÁ, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa Í, Penadés JR. 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72: 2177–2185.
- Cunha P, Le Vern Y, Gitton C, Germon P, Foucras G, Rainard P. 2019. Expansion, isolation and first characterization of bovine Th17 lymphocytes. *Sci Rep.* 9: 1–14.
- Dailey MO. 1998. Expression of T lymphocyte adhesion molecules: Regulation during antigen-induced T cell activation and differentiation. *Crit Rev Immunol.* 18: 153–184.
- Dar AA, Patil RS, Chiplunkar SV. 2014. Insights into the relationship between toll-like receptors and gamma delta T cell responses. *Front Immunol.* 5: 1-12.
- De Jong NW, Van Kessel KPM, Van Strijp JAG. 2019. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Gram-Positive Pathog.* 1: 618–639.
- Dego OK, Pacha PA, Gillespie BE, Pighetti GM. 2020. Experimental *Staphylococcus aureus* mastitis infection model by teat dipping in bacterial culture suspension in dairy cows. *Animals.* 10: 751.
- Del Pozo JL, Patel R. 2007. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* 82: 204–209.
- Dieser SA, Vissio C, Lasagno MC, Bogni CI, Larriestra AJ, Odierno LM. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pak Vet J.* 34: 124–126.

- Dillen CA, Pinsker BL, Marusina AI, Merleev AA, Farber ON, Liu H, Archer NK, Lee DB, Wang Y, Ortines RV, Lee SK, Marchitto MC, Cai SS, Ashbaugh AG, May LS, Holland SM, Freeman AF, Miller LG, Yeaman MR, Simon SI, Milner JD, Maverakis E, Miller LS. 2018. Clonally expanded $\gamma\delta$ T cells protect against *Staphylococcus aureus* skin reinfection. *J Clin Invest.* 128: 1026–1042.
- Eberl M, Roberts GW, Meuter S, Williams JD, Topley N. 2009. A rapid crosstalk of human $\gamma\delta$ T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections. *PLoS One.* 5: e1000308.
- Elnaggar MM, Abdellrazeq GS, Dassanayake RP, Fry LM, Hulubei V, Davis WC. 2018. Characterization of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell subsets expressing IL-17A in ruminants and swine. *Dev Comp Immunol.* 85: 115–124.
- Endsley JJ, Quade MJ, Terhaar B, Roth JA. 2002. BHV-1-specific CD4⁺, CD8⁺, and $\gamma\delta$ T cells in calves vaccinated with one dose of a modified live BHV-1 vaccine. *Viral Immunol.* 15: 385–393.
- Endsley JJ, Ridpath JF, Neill JD, Sandbulte MR, Roth JA. 2004. Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhea virus in calves with maternal antibody. *Viral Immunol.* 17: 13–23.
- Engler C, Renna MS, Beccaria C, Silvestrini P, Pirola SI, Pereyra EAL, Baravalle C, Camussone CM, Monecke S, Calvino LF, Dallard BE. 2022. Differential immune response to two *Staphylococcus aureus* strains with distinct adaptation genotypes after experimental intramammary infection of dairy cows. *Microb Pathog.* 172: 105789.
- Enright MC, Day NPI, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38: 1008–1015.
- Ezzat Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J Vet Med.* 2014: 1–31.
- Faldyna M, Leva L, Sladek Z, Rysanek D, Toman M. 2006. $\gamma\delta$ -TCR⁺ CD2⁻ lymphocytes are recruited into bovine mammary gland after stimulation. *Veterinarni Med.* 51: 258–264.
- Ferens WA, Davis WC, Hamilton MJO, Park YH, Deobald CF, Fox L, Bohach GA. 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66: 573–580.

- Fesseha H, Mathewos M, Aliye S, Wolde A. 2021. Study on prevalence of bovine mastitis and associated risk factors in dairy farms of Modjo Town and suburbs, Central Oromia, Ethiopia. *Vet. Med. Res. Rep.* 12: 271–283.
- Fidelis CE, Orsi AM, Freu G, Gonçalves JL, Santos MV do. 2024. Biofilm formation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine mastitis. *Vet. Sci.* 11: 1–10.
- Fielder SE. 2022. Hematology (Complete Blood Count) reference ranges. [Technical report]: 1–5.
- Fikri Y, Denis O, Pastoret PP, Nyabenda J. 2001. Purified bovine WC1+ $\gamma\delta$ T lymphocytes are activated by staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 superantigens: Proliferation response, TCR V γ profile and cytokines expression. *Immunol. Lett.* 77: 87–95.
- Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ. 1994. Proliferation and phenotype of bovine mononuclear leukocytes in cultures stimulated by pokeweed mitogen. *J. Dairy Sci.* 77: 3592–3600.
- Goldmann O y Medina E. 2018. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *Int. J. Med. Microbiol.* 308: 625–630.
- Gonçalves JL. 2017. Impact of subclinical mastitis on milk yield and economic return of dairy cows. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Gong R, Lee D, Lee J, Choi D, Kim GS, Lee S, Lee YS. 2019. Potentiating activity of rhein in targeting of resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 12: 8–13.
- Graff JC, Behnke M, Radke J, White M, Jutila MA. 2006. A comprehensive SAGE database for the analysis of $\gamma\delta$ T cells. *Int. Immunol.* 18: 613–626.
- Grönlund U, Johannisson A, Persson Waller K. 2006. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 80: 147–154.
- Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler AC, Schäfer D, Chatterjee SS, Geiger T, Wolz C, Ohlsen K, Otto M, Rudel T, Sinha B, Fraunholz M. 2014. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* 16: 451–465.
- Grumann D, Nübel U, Bröker BM. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infect. Genet. Evol.* 21: 583–592.

- Guerra-Maupome M, Slate JR, McGill JL. 2019. Gamma delta T cell function in ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 35: 453–469.
- Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C, Charleston B. 2014. Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J. Immunol.* 193: 208–222.
- Guzman E, Price S, Poulsom H, Hope J. 2012. Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148: 161–167.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Q.* 29: 18–31.
- Harmon RJ. 2001. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings (2001). *Nat Mastitis Counc Proc.* 3: 3–9.
- Hedges JF, Cockrell D, Jackiw L, Meissner N, Jutila MA. 2003. Differential mRNA expression in circulating $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. *J Leukoc Biol.* 73: 306–314.
- Hedges JF, Holderness J, Jutila MA. 2016. Adjuvant materials that enhance bovine $\gamma\delta$ T cell responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 181: 30–38.
- Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. 2005. Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol.* 174: 6045–6053.
- Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. 2018. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 101: 9493–9504.
- Hensen SM, Pavičić MJAM, Lohuis JACM, De Hoog JAM, Poutrel B. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci.* 83: 1966–1975.
- Herzig CTA y Baldwin CL. 2009. Genomic organization and classification of the bovine WC1 genes and expression by peripheral blood gamma delta T cells. *BMC Genomics.* 10: 1–20.
- Hisaeda K, Hagiwara K, Eguchi J, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. 2001. Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 63: 1009–1011.
- Hoek A, Rutten VPMG, Kool J, Arkesteijn GJA, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets AP. 2009. Subpopulations of bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells rather than CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet Res.* 40: 1–14.

- Hogg AE, Worth A, Beverley P, Howard CJ, Villarreal-Ramos B. 2009. The antigen-specific memory CD8⁺ T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8⁺γ/δTCR-CD45RO⁺ T-cell population. *Vaccine*. 27: 270–279.
- Hu W. 2024. Spatiotemporal orchestration of macrophage activation trajectories by Vγ4 T cells during skin wound healing. *iScience*. 27: 109545.
- Inagaki R, Koshiba A, Nasuno E, Kato N. 2024. Eliminating extracellular autoinducing peptide signals inhibits the *Staphylococcus aureus* quorum sensing agr system. *Biochem Biophys Res Commun*. 711: 149912.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*. 30: 108–119.
- Jing X, Cao D, Liu H, Wang X, Zhao X, Chen D. 2012. Pivotal role of IL-17-producing γδT cells in mouse chronic mastitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Asian J Anim Vet Adv*. 7: 1266–1278.
- Jutila MA, Holderness J, Graff JC, Hedges JF. 2008. Antigen-independent priming: A transitional response of bovine γδ T-cells to infection. *Anim Health Res Rev*. 9: 47–57.
- Kauf ACW, Rosenbusch RF, Paape MJ, Bannerman DD. 2007. Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection. *J Dairy Sci*. 90: 3336–3348.
- Kerns HMM, Jutila MA, Hedges JF. 2009. The distinct response of gammadelta T cells to the Nod2 agonist muramyl dipeptide. *Cell Immunol*. 257: 38–43.
- Kiedrowski MR, Horswill AR. 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci*. 1241(1): 104–121.
- Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C, Karrow N. 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*. 7: 51.
- Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K. 2016. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J Dairy Res*. 83: 228–235.
- Kratochvilova L, Venusova E, Hleba L, Kolesarova A, Zouharova M, Slama P. 2023. Are dendritic cells a potential tool for mastitis vaccine development? *I2*: e9839-e9839.

- Krueger LA, Beitz DC, Humphrey SB, Stabel JR. 2016. Gamma delta T cells are early responders to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in colostrum-replete Holstein calves. *J Dairy Sci.* 99: 9040–9050.
- Kuipers A, Stapels DAC, Weerwind LT, Ko YP, Ruyken M, Lee JC, van Kessel KPM, Rooijackers SHM. 2016. The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology.* 162: 1185–1194.
- Lalor SJ y McLoughlin RM. 2016. Memory $\gamma\delta$ T cells—Newly appreciated protagonists in infection and immunity. *Trends Immunol.* 37: 690–702.
- Landmann R, Knopf H, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. 1996. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 64: 1762–1769.
- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A. 2000. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B.* 47: 581–589.
- Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P. 2014. Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy science & Technology.* 94: 517–538.
- Li T, Lu H, Wang X, Gao Q, Dai Y, Shang J, Li M. 2017. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Front Cell Infect Microbiol.* 7: 1–10.
- Li X, Xu C, Liang B, Kastelic JP, Han B, Tong X y Gao J. 2023. Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Front. Vet. Sci.* 10: 1160350.
- Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, Fu Y, French SW, Edwards JE, Spellberg B. 2009. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog.* 5: e1000703.
- Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int J Med Microbiol.* 304: 170–176.
- Lowy FD. 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? *Trends Microbiol.* 8: 341–343.
- Ludwig L, Egan R, Baquero M, Mansz A, Plattner BL. 2019. WC1+ and WC1neg $\gamma\delta$ T lymphocytes in intestinal mucosa of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 216: 109919.
- Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. *J Leukoc Biol.* 92: 753–764.

- Machugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR, Orden JA, Davis WC. 1997. Identification of two distinct subsets of bovine $\gamma\delta$ T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*. 92: 340–345.
- Maher BM, Mulcahy ME, Murphy AG, Wilk M, Geoghegan JA, Lavelle EC, McLoughlin RM. 2013. NLRP3-driven interleukin 17 production by $\gamma\delta$ T cells controls infection outcomes during *Staphylococcus aureus* surgical site. *Infect. Immun.* 81: 4478–4489.
- Mantovani A, Sica A, Locati M. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37: 14–16.
- Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW. 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1218–1223.
- McGill JL, Rusk RA, Guerra-Maupome M, Briggs RE. 2016. Bovine gamma delta T cells contribute to exacerbated IL-17 production in response to co-infection with bovine RSV and *Mannheimia haemolytica*. *PloS one*. 11: e0151083.
- McGill JL, Sacco RE, Baldwin CL, Telfer JC, Palmer MV, Waters WR. 2014. The role of gamma delta T cells in immunity to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 159: 133–143.
- Meissner N, Radke J, Hedges JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abrahamsen M, Jutila MA. 2003. Serial analysis of gene expression in circulating $\gamma\delta$ T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J. Immunol.* 170: 356–364.
- Middleton JR, Hardin D, Steevens B, Randle R, Tyler JW. 2004. Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224: 419–423.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O’Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. 2008. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 452: 773–776.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O’Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan HL, Weber S, Ehrlich R. 2011. A field guide to pandemic,

- epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 6: e17936.
- Mota-Rojas D, Napolitano F, Chay-Canul A, Ghezzi M, Braghieri A, Domínguez-Oliva A y Barile VL. 2024. Anatomy and physiology of water Buffalo mammary glands: an anatomofunctional comparison with dairy cattle. *Animals*. 14: 1066.
- Murphy AG, O’Keeffe KM, Lalor SJ, Maher BM, Mills KHG, McLoughlin RM. 2014. *Staphylococcus aureus* infection of mice expands a population of memory $\gamma\delta$ T cells that are protective against subsequent infection. *J. Immunol*. 192: 3697–3708.
- Murphy MP, Niedziela DA, Leonard FC, Keane OM. 2019. The in vitro host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage. *Sci. Rep*. 9: 1-13.
- Musilova J, Mulcahy ME, Kuijk MM, McLoughlin RM, Bowie AG. 2019. Toll-like receptor 2-dependent endosomal signaling by *Staphylococcus aureus* in monocytes induces type I interferon and promotes intracellular survival. *J. Biol. Chem*. 294: 17031–17042.
- Nagasawa Y, Uchida I, Tanabe F, Hirose A, Sugawara K, Kiku Y, Iwata T, Kato C, Yamashita Y, Hayashi T. 2021. Intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus* increases IgA antibodies to iron-regulated surface determinant-A, -B, and -H in bovine milk. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 235: 110235.
- Nanra JS, Buitrago SM, Crawford S, Ng J, Fink PS, Hawkins J, Scully IL, McNeil LK, Aste-Améaga J, Cooper D, Jansen KU, Anderson AS. 2013. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum. Vaccin. Immunother*. 9: 480–487.
- Neder V, Calvino L, Vitulich C, Smulovitz A. 2021. Identificación de agentes patógenos causantes de mastitis bovina proveniente de diferentes provincias de Argentina. *I Congreso de Microbiología Veterinaria. Libro de resúmenes.*: 343–345.
- Nguyen DAD, Neville MC. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 3: 233–246.
- Niedziela DA, Murphy MP, Grant J, Keane OM, Leonard FC. 2020. Clinical presentation and immune characteristics in first-lactation Holstein-Friesian cows following intramammary infection with genotypically distinct *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci*. 103: 8453–8466.
- Nishimura T. 2003. Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. *Veterinary research*. 34: 3–10.

- Nonnecke BJ, Franklin ST, Reinhardt TA, Horst RL. 1993. In vitro modulation of proliferation and phenotype of resting and mitogen-stimulated bovine mononuclear leukocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 38: 75–89.
- Nonnecke BJ, Waters WR, Foote MR, Palmer MV, Miller BL, Johnson TE, Perry HB, Fowler MA. 2005. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin. *J. Dairy Sci.* 88: 195–200.
- O’Gara JP. 2007. *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 179–188.
- O’Riordan K y Lee JC. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 218–234.
- Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th ed. Verona: the National Mastitis Council. *Inc.*
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 450–460.
- Ortines RV, Liu H, Cheng LI, Cohen TS, Lawlor H, Gami A, Wang Y, Dillen CA, Archer ANK, Miller RJ, Ashbaugh AG, Pinsker BL, Marchitto MC, Tkaczyk C, Stover CK, Sellman BR, Miller LS. 2018. *Staphylococcus aureus*-infected wounds in nondiabetic and diabetic mice. *Infect. Immun.* 62: e02288-17.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54: 399–409.
- Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. 2015. Classification of beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PLoS One.* 10: 1–23.
- Paape M, Bannerman D, Zhao X, Lee JW. 2003. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34: 597–627.
- Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, Van Oostveldt K, Burvenich C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480: 259–277.
- Pan N, Xiu L, Xu Y, Bao X, Liang Y, Zhang H, Liu B, Feng Y, Guo H, Wu J, Li H, Ma C, Sheng S, Wang T, Wang X. 2023. Mammary $\gamma\delta$ T cells promote IL-17A-mediated immunity against

- Staphylococcus aureus*-induced mastitis in a microbiota-dependent manner. *iScience*. 26: 108453.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6: 1133–1141.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. 1993. Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36: 137–151.
- Parker D. 2018. Cytokine CD80/CD86 signaling contributes to the proinflammatory response of *Staphylococcus aureus* in the airway. *Cytokine*. 107: 130–136.
- Parsek MR, Singh PK. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 677–701.
- Paul WE. 2013. *Fundamental immunology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Peacock SJ y Paterson GK. 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84: 577–601.
- Peckham RK, Brill R, Foster DS, Bowen AL, Leigh JA, Coffey TJ, Flynn RJ. 2014a. Two distinct populations of bovine IL-17⁺ T cells can be induced and WC1+IL-17⁺ $\gamma\delta$ T cells are effective killers of protozoan parasites. *Sci. Rep.* 4: 5431.
- Pedersen RR, Krömker V, Bjarnsholt T, Dahl-Pedersen K, Buhl R, Jørgensen E. 2021. Biofilm research in bovine mastitis. *Front. Vet. Sci.* 8: 1–11.
- Pereyra EAL, Dallard BE, Calvino LF. 2014. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Rev. Argent. Microbiol.* 46: 363–375.
- Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi R, Calvino LF, Diez C, Dallard BE. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 183: 69–77.
- Pereyra EAL, Sacco SC, Duré A, Baravalle C, Renna MS, Andreotti CS, Monecke S, Calvino LF, Dallard BE. 2017. Immune response of *Staphylococcus aureus* strains in a mouse mastitis model is linked to adaptive capacity and genotypic profiles. *Vet. Microbiol.* 204: 64–76.

- Petzl W, Günther J, Mühlbauer K, Seyfert HM, Schuberth HJ, Hussen J, Sauter-Louis C, Hafner-Marx A, Zerbe H. 2016. Early transcriptional events in the udder and teat after intramammary *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* challenge. *Innate Immun.* 22: 294–304.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. 2018. Pathogen-specific responses in the bovine udder: models and immunoprophylactic concepts. *Res. Vet. Sci.* 116: 55–61.
- Petzl W, Zerbe H, Gunther J, Yang W, Seyfert HM, Nurnberg G, Schuberth HJ. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus*, triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 39: 18.
- Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2011: 214384.
- Price SJ y Hope JC. 2009. Enhanced secretion of interferon- γ by bovine $\gamma\delta$ T cells induced by coculture with *Mycobacterium bovis*-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology.* 126: 201–208.
- Price SJ, Sopp P, Howard CJ, Hope JC. 2006. WC1+ $\gamma\delta$ T cells from calves express high levels of interferon- γ in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunology.* 120: 57–65.
- Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34: 565–578.
- Rainard P, Foucras G, Martins RP. 2022. Adaptive cell-mediated immunity in the mammary gland of dairy ruminants. *Front Vet Sci.* 9: 1–19.
- Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G, Middleton JR. 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound. Emerg. Dis.* 65: 149–165.
- Rainard P, Riollot C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369–400.
- Rainard P. 2005. Tackling mastitis in dairy cows. *Nat. Biotechnol.* 23: 430–432.
- Rasmussen P, Barkema HW, Osei PP, Taylor J, Shaw AP, Conrady B, Chaters G, Muñoz V, Hall DC, Apenteng OO, Rushton J, Torgerson PR. 2024. Global losses due to dairy cattle diseases: a comorbidity-adjusted economic analysis. *J. Dairy Sci.* 107: 6945–6970.

- Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icely PA, Cejas H, Cano R, Correa SG, Sotomayor CE. 2015. *Candida albicans* up-regulates the Fas-L expression in liver natural killer and natural killer T cells. *Immunobiology*. 220: 1210–1218.
- Renna MS, Silvestrini P, Beccaria C, Velázquez NS, Baravalle C, Engler C, Pereyra EAL, Calvino LF, Dallard BE. 2019. Effects of chronic *Staphylococcus aureus* infection on immunological parameters and functionality of macrophages isolated from bovine mammary secretions. *Microb. Pathog.* 137: 103743.
- Ribot JC y Silva-Santos B. 2013. Differentiation and activation of $\gamma\delta$ T lymphocytes: focus on CD27 and CD28 costimulatory receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 785: 95–105.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84: 1077–1084.
- Rivas AL, Quimby FW, Coksaygan O, Olmstead L, Lein DH. 2000. Longitudinal evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Vet. Res.* 64: 232–237.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Besser TE. 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3217–3219.
- Rogers AN, VanBuren DG, Hedblom EE, Tilahun ME, Telfer JC, Baldwin CL. 2005. $\gamma\delta$ T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *J. Immunol.* 174: 3386–3393.
- Rollin G, Tan X, Tros F, Dupuis M, Nassif X, Charbit A, Coureuil M. 2017. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells: a matter of growth or persistence. *Front. Microbiol.* 8: 1–10.
- Rossi BF, Bonsaglia ECR, Pantoja JCF, Santos MV, Gonçalves JL, Fernandes Júnior A, Rall VLM. 2021. Short communication: Association between the accessory gene regulator (agr) group and the severity of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 104: 3564–3568.
- Rouha H, Weber S, Janesch P, Maierhofer B, Gross K, Doležilková I, Mirkina I, Visram ZC, Malafa S, Štulík L, Badarau A, Nagy E. 2018. Disarming *Staphylococcus aureus* from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. *Virulence*. 9: 231–247.
- Ruegg PL. 2017. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100: 10381–10397.

- Rusk RA, Palmer MV, Waters WR, McGill JL. 2017. Measuring bovine $\gamma\delta$ T cell function at the site of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 193–194: 38–49.
- Sacco SC, Velázquez NS, Renna MS, Beccaria C, Baravalle C, Pereyra EAL, Monecke S, Calvinho LF, Dallard BE. 2020. Capacity of two *Staphylococcus aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microb. Pathog.* 142: 104017.
- Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P. 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human–bovine host shift. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5908–5915.
- Saleem A, Saleem Bhat S, Omonijo FA, Ganai NA, Ibeagha-Awemu EM, Mudasir Ahmad S. 2024. Immunotherapy in mastitis: state of knowledge, research gaps and way forward. *Vet. Q.* 44: 1–23.
- Salimena APS, Lange CC, Camussone C, Signorini M, Calvinho LF, Brito MAVP, Borges CAV, Guimarães AS, Ribeiro JB, Mendonça LC, Piccoli RH. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet. Res. Commun.* 40: 97–106.
- Samuel BER, Diaz FE, Maina TW, Corbett RJ, Tuggle CK, McGill JL. 2024. Evidence of innate training in bovine $\gamma\delta$ T cells following subcutaneous BCG administration. *Front. Immunol.* 15: 1–13.
- Sandbulte MR y Roth JA. 2002. T-cell populations responsive to bovine respiratory syncytial virus in seronegative calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84: 111–123.
- Sarikaya H, Schlamberger G, Meyer HHD, Bruckmaier RM. 2006. Leukocyte populations and mRNA expression of inflammatory factors in quarter milk fractions at different somatic cell score levels in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 2479–2486.
- Schmolka N, Serre K, Grosso AR, Rei M, Pennington DJ, Gomes AQ, Silva-Santos B. 2013. Epigenetic and transcriptional signatures of stable versus plastic differentiation of proinflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat. Immunol.* 14: 1093–1100.
- Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96: 41–101.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DGE, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 270–289.

- Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA. 1999. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *J. Dairy Sci.* 82: 2393–2401.
- Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garison-Tikofsky L, Gonzalez RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34: 579–596.
- Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. 1990. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73: 2785–2799.
- Sendi P y Proctor RA. 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small-colony variants. *Trends Microbiol.* 17: 54–58.
- Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. 2003. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J. Clin. Microbiol.* 41: 456–459.
- Shoshani E, Leitner G, Hanochi B, Saran A, Shpigel NY, Berman A. 2000. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J. Dairy Res.* 67: 155–169.
- Signorini ML, Sequeira GJ, Bonazza JC, Dalla Santina R, Martí LE, Frizzo LS, Rosmini MR. 2008. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Rev. Cient.* 18: 207-217.
- Sipka A, Pomeroy B, Klaessig S, Schukken Y. 2016. Bovine natural killer cells are present in *Escherichia coli* infected mammary gland tissue and show antimicrobial activity in vitro. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 48: 54–60.
- Skyberg JA, Thornburg T, Rollins MC, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. 2011. Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. *PLoS One.* 6: e22417.
- Smith NW, Fletcher AJ, Hill JP, McNabb WC. 2022. Modeling the contribution of milk to global nutrition. *Front. Nutr.* 8: 1–7.
- Smyth AJ, Welsh MD, Girvin RM, Pollock JM. 2001. In vitro responsiveness of $\gamma\delta$ T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: predominant involvement of WC1(+) cells. *Infect. Immun.* 69: 89–96.
- Soest FJS Van, Santman-Berends IMG A, Lam TJGM, Hogeveen H. 2016. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *J. Dairy Sci.* 99: 8365–8374.

- Soltys J y Quinn MT. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* 67: 6293-6302.
- Sordillo LM. 2018. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34: 507–523.
- Sordillo SC y Nickerson LM. 2017. Modulation of the bovine mammary gland. *American Dairy Science Association. Large Dairy Herd Management. 2017: 907-920.*
- Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest. Prod. Sci.* 98: 89–99.
- Sordillo LM y Nickerson SC. 1988. Quantification and immunoglobulin classification of plasma cells in nonlactating bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 71: 84–91.
- Souza FN, Blagitiz MG, Penna CFA M, Della Libera AMMP, Heinemann MB, Cerqueira MMOP. 2012. Somatic cell count in small ruminants: friend or foe? *Small Rumin. Res.* 107: 65–75.
- Souza FN, Santos KR, Ferronato JA, Ramos Sanchez EM, Toledo-Silva B, Heinemann MB, De Vlieghe S, Della Libera AMMP. 2023. Bovine-associated staphylococci and mammaliicocci trigger T-lymphocyte proliferative response and cytokine production differently. *J. Dairy Sci.* 106: 2772–2783.
- Speziale P y Pietrocola G. 2020. The multivalent role of fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in host infections. *Front. Microbiol.* 11: 1–13.
- Steinbach S, Vordermeier HM, Jones GJ. 2016. CD4⁺ and $\gamma\delta$ T cells are the main producers of IL-22 and IL-17A in lymphocytes from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Sci. Rep.* 6: 1–10.
- Ster C, Allard M, Boulanger S, Boulet ML, Mulhbach J, Lafontaine DA, Marsault É, Lacasse P, Malouin F. 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci.* 96: 1000–1008.
- Šustrová T y Sláma P. 2013. The effect of *Staphylococcus aureus* bacteria to proportion of gamma delta T-lymphocytes from bovine mammary gland. *Mendelnet. 2013: 788–792.*
- Tam K y Torres VJ. 2019. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. Washington: ASM Press. 3rd ed.
- Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front. Immunol.* 5: 1–10.

- Toka FN, Kenney MA, Golde WT. 2011. Rapid and transient activation of $\gamma\delta$ T cells to IFN- γ production, NK cell-like killing, and antigen processing during acute virus infection. *J. Immunol.* 186: 4853–4861.
- Tommasoni C, Fiore E, Lisuzzo A, Ganesella M. 2023. Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. *Animals.* 13: 1–15.
- Tuchscherr L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B. 2010. *S. aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* 202: 1031–1040.
- Tucker N, Cunha P, Gilbert FB, Rambault M, Santos KR, Remot A, Germon P, Rainard P, Martins RP. 2023. Bovine blood and milk T-cell subsets in distinct states of activation and differentiation during subclinical *S. aureus* mastitis. *J. Reprod. Immunol.* 156: 103826.
- Tuo W, Estes DM, Brown WC. 1999. Comparative effects of interleukin-12 and interleukin-4 on cytokine responses by antigen-stimulated memory CD4⁺ T cells of cattle: IL-12 enhances IFN- γ production, whereas IL-4 has marginal effects on cytokine expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 19: 741–749.
- Úbeda C, Tormo MÁ, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa I, Penadés JR. 2003. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *S. aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* 49: 193–210.
- Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I. 2012. Bap, a biofilm matrix protein of *S. aureus*, prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog.* 8: e1002843.
- Vanden Bush TJ y Rosenbusch RF. 2003. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94: 23-33.
- Vantourout P y Hayday A. 2013. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 88–100.
- Velásquez V y Vega V. 2012. Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Rev. de Inv. Vet. del Perú.* 23: 65-71.
- Vesosky B, Turner OC, Turner J, Orme IM. 2003. Activation marker expression on bovine peripheral blood $\gamma\delta$ T cells during post-natal development and following vaccination with a commercial polyvalent viral vaccine. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 439–447.

- Vesosky B, Turner OC, Turner J, Orme IM. 2004. Gamma interferon production by bovine $\gamma\delta$ T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. *Infect. Immun.* 72: 4612–4618.
- Vissio C, Agüero D, Raspanti C, Odierno L, Larriestra A. 2015. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Arch. Med. Vet.* 47: 7–14.
- Vrieling M, Boerhout EM, Van Wigcheren GF, Koymans KJ, Mols-Vorstermans TG, De Haas CJC, Aerts PC, Daemen IJMM, Van Kessel KPM, Koets AP, Rutten VPMG, Nuijten PJM, Van Strijp JAG, Benedictus L. 2016. LukMF' is the major secreted leukocidin of bovine *S. aureus* and is produced in vivo during bovine mastitis. *Sci. Rep.* 6: 1–12.
- Wang K, Cha J, Liu K, Deng J, Yang B, Xu H, Wang J, Zhang L, Gu X, Huang C, Qu W. 2022. The prevalence of bovine mastitis-associated *S. aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: a meta-analysis. *Front. Vet. Sci.* 9: 1006676.
- Waters WR, Rahner TE, Palmer MV, Cheng D, Nonnecke BJ, Whipple DL. 2003a. Expression of L-selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infect. Immun.* 71: 317–326.
- Waters WR, Nonnecke BJ, Foote MR, Maue AC, Rahner IE, Palmer MV, Whipple DL, Horst RL, Estes DM. 2003b. *M. bovis* BCG vaccination of cattle: activation of bovine CD4⁺ and $\gamma\delta$ TCR⁺ cells and modulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Tuberculosis (Edinb).* 83: 287–297.
- Wei Z, Wang J, Wang Y, Wang C, Liu X, Han Z, Fu Y, Yang Z. 2019. Effects of neutrophil extracellular traps on bovine mammary epithelial cells in vitro. *Front. Immunol.* 10: 1–9.
- Wellnitz O y Bruckmaier RM. 2021. Invited review: The role of the blood–milk barrier and its manipulation for the efficacy of the mammary immune response and milk production. *J. Dairy Sci.* 104: 6376–6388.
- Wellnitz O y Bruckmaier RM. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192: 148–152.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. 2011. Experimental *S. aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140: 181–189.
- Wilson E, Hedges JF, Butcher EC, Briskin M y Jutila MA. 2003. Bovine $\gamma\delta$ T cell subsets express distinct patterns of chemokine responsiveness and adhesion molecules: a mechanism for tissue-specific $\gamma\delta$ T cell subset accumulation. *J. Immunol.* 169: 4970–4975.

- Wilson GJ, Tuffs SW, Wee BA, Seo KS, Park N, Connelley T, Guinane CM, Morrison WI, Fitzgerald JR. 2018. Bovine *S. aureus* superantigens stimulate the entire T cell repertoire of cattle. *Infect. Immun.* 86: e00350-18.
- Woudstra S, Wente N, Zhang Y, Leimbach S, Kirkeby C, Gussmann MK, Krömker V. 2023. Reservoirs of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. associated with intramammary infections of dairy cows. *Pathogens.* 12: 1–14.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Immunol.* 14: 1431–1433.
- Yang J, Bowring JZ, Krusche J, Lehmann E, Bejder BS, Silva SF, Bojer MS, Grunert T, Peschel A, Ingmer H. 2023. Cross-species communication via agr controls phage susceptibility in *S. aureus*. *Cell Rep.* 42: 113154.
- Yokomizo Y, Mori Y, Shimoji Y, Shimizu S, Sentsui H, Kodama M, Igarashi H. 1995. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by staphylococcal enterotoxins and TSST-1. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 299–305.
- Young AJ, Marston WL, Dudler L. 2000. Subset-specific regulation of the lymphatic exit of recirculating lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* 165: 3168–3174.
- Zbinden C, Stephan R, Johler S, Borel N, Bünter J, Bruckmaier RM, Wellnitz O. 2014. The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *S. aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PLoS One.* 9: e86634.
- Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. 2006. Role of several *S. aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40: 177–183.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl): 57–64.
- Zhao Y, Zhou M, Gao Y, Liu H, Yang W, Yue J, Chen D. 2015. Shifted T helper cell polarization in a murine *S. aureus* mastitis model. *PLoS One.* 10: e0133009.
- Zigo F, Farkasová Z, Vyrostková J, Regecová I, Ondrasovicová S, Vargová M, Sasáková N, Pecka-Kielb E, Bursová S, Kiss DS. 2022. Dairy cows' udder pathogens and occurrence of virulence factors in staphylococci. *Animals.* 12: 470.