



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS
VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
INTRAMAMARIA DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSC) BOVINAS SOBRE LA
ACTIVACIÓN LINFOCITARIA EN VAQUILLAS HOLSTEIN**

Isadora Aranza Muñoz San Martín

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: OSCAR ALEJANDRO PERALTA TRONCOSO
FONDEF ID15110129
SANTIAGO, CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS
VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
INTRAMAMARIA DE UNA SUSPENSIÓN DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSC) BOVINAS SOBRE LA
ACTIVACIÓN LINFOCITARIA EN VAQUILLAS HOLSTEIN**

Isadora Aranza Muñoz San Martín

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal.

Nota final

Prof. Guía
Profesor Corrector
Profesor Corrector

PROFESOR GUÍA: OSCAR ALEJANDRO PERALTA TRONCOSO
FONDEF ID15110129
SANTIAGO, CHILE
2018

ÍNDICE DE CAPITULOS

ABSTRACT.....	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
Células troncales mesenquimáticas	7
Propiedades terapéuticas de las MSC en injurias y enfermedades	7
Inmunogenicidad e inmunoevasión de las MSC.....	9
Activación linfocitaria como respuesta inmune a las MSC.....	10
Potencial terapéutico de MSC en mastitis bovina	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Animales y lugar de estudio.....	14
Obtención y cultivo de MSC-TA.....	14
Aislamiento de linfocitos de sangre periférica	16
Síntesis de cDNA y PCR cuantitativo	16
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	20
Determinación de variables clínicas y de la ubre en vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria	20
Determinación de variables hematológicas en vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria	22
Determinación de la expresión génica de marcadores de activación linfocitaria en PBL de vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria	23
DISCUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de partidores utilizados análisis de Q-PCR	17
Tabla 2. Valores promedio de variables clínicas durante 20 días de estudio en vaquillas Holstein tratadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10.	21
Tabla 3. Valores de la termografía de los cuartos mamarios durante 20 días de estudio en vaquillas Holstein tratadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10.	21
Tabla 4. Variables hematológicas evaluadas cada 5 días en vaquillas Holstein tratadas con MSC-TA por vía intramamaria los días experimentales 0 y 10.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recuento de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en vaquillas Holstein tratadas con dos dosis intramamarias de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA.....	22
Figura 2. Niveles de mRNA de CD4, CD8, CD25, CD69 Y CD62L en PBL de vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10.....	24

ANEXOS

Anexo 1. Administración de MSC-TA vía canal del pezón en vaquillas Holstein clínicamente sanas..	38
Anexo 2. Formación de nube de células mononucleares de sangre periférica.	39

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells located in a variety of tissues including bone marrow and adipose, that possess the ability to differentiate towards mesodermal cell lineages. Its therapeutic potential is mainly based on their low immunogenicity, as well as their immunomodulatory, antibacterial and regenerative properties. Thus, MSC are currently considered a therapeutic option in multiple pathologies that affect both humans and animals. In the case of the bovine specie, few studies have described the potential of MSC for therapeutic application, despite the fact that dairy cattle suffer multiple pathologies that impact productive performance including mastitis. The objective of this study was to evaluate the safety of the intramammary administration of two doses of MSC derived from fetal bovine adipose tissue (MSC-TA), in healthy Holstein heifers. Each dose of 2.5×10^7 MSC-TA was administered in two quarters on days 0 and 10 of a total of 20 experimental days. The effect of the administration of MSC was evaluated on heifers (N=6) clinical variables including cutaneous temperature, firmness and signs of pain in the inoculated quarters. To evaluate a possible response by the immune system, hematological parameters were determined on days 0, 5, 10, 15 and 20 of the study. In addition, a potential lymphocyte activation process was analyzed on days 0, 5, 10, 15 and 20 of the study by determining the gene expression of markers of helper CD4+ and cytotoxic CD8+ T cells, and lymphocyte activation markers CD69 (early activation marker), CD25 (subunit of interleukin 2 receptor), and CD62L (L-selectin, peripheral lymph node adhesion marker) in peripheral blood lymphocytes (PBL). The clinical parameters evaluated in heifers showed no alterations associated to the administration of MSC-TA on the days of the study. No changes were detected in the mammary gland condition or differences ($P > 0.05$) in the skin temperatures of the treated quarters. The hematological parameters were not different ($P > 0.05$) between days of the study. In addition, no differences were detected ($P > 0.05$) in the gene expression levels of CD4+, CD8+, CD69, CD25 or CD62L during the study. In conclusion, the results obtained in the

present study indicated that intramammary administration of two doses of $2,5 \times 10^7$ MSC-TA allogenic separated by 10 days in Holstein heifers did not generate clinical or hematological changes, or changes in the expression of activation markers in PBL. This data suggests that a potential therapy for mastitis using MSC-TA could be safe, however, further studies are necessary to determine the effectiveness of this therapy in cows with mastitis.

Key words: MSC, Holstein heifers, lymphocyte activation.

RESUMEN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC) se encuentran en una variedad de tejidos incluyendo médula ósea y tejido adiposo y poseen capacidad de diferenciación hacia linajes celulares mesodérmicos. Su potencial terapéutico se basa principalmente en su baja inmunogenicidad y sus propiedades de inmunomodulación, antibacterianas y regenerativas. Estas capacidades han convertido a las MSC en una opción terapéutica para el tratamiento de múltiples patologías tanto en humanos como en animales. En el caso de la especie bovina, existen escasos estudios que describen su potencial aplicación terapéutica, a pesar de que el ganado bovino lechero está expuesto a múltiples patologías de alto impacto productivo como la mastitis. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la seguridad de la administración de dos dosis de MSC, derivadas de tejido adiposo (MSC-TA) fetal bovino, por vía intramamaria en vaquillas Holstein sanas. Para esto se administraron dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC-TA en dos cuartos mamarios, los días 0 y 10 de un total de 20 días experimentales. Se evaluó el efecto de la administración de MSC-TA sobre variables clínicas en vaquillas (N=6) que incluyeron temperatura cutánea, volumen, firmeza y signos de dolor en la ubre. Para evaluar una posible respuesta inmune se realizó la evaluación de parámetros hematológicos los días 0, 5, 10, 15 y 20 del estudio. Además, se analizó los días 0, 5, 10, 15 y 20 del estudio un potencial proceso de activación linfocitaria, mediante determinación de la expresión génica de marcadores de linfocitos T helper CD4+ y T citotóxicos CD8+ y marcadores de activación linfocitaria CD69 (activación temprana), CD25 (subunidad del receptor de interleuquina 2) y CD62L (L-selectina, marcador de adhesión a linfonodos periféricos) en linfocitos de sangre periférica (PBL). Los parámetros clínicos evaluados en las vaquillas no presentaron alteraciones atribuibles a la administración con MSC-TA los días del estudio. No se detectaron cambios en la condición de la glándula mamaria ni diferencias ($P>0,05$) en las temperaturas de los cuartos tratados durante los días del estudio. Los parámetros hematológicos no mostraron una variación

($P > 0,05$) a lo largo de los días de estudio. Tampoco se detectó una diferencia ($P > 0,05$) en la expresión génica de CD4+, CD8+, CD69, CD25 o CD62L durante los días de estudio. En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten indicar que la administración intramamaria en dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC-TA alogénicas separadas por 10 días, no genera cambios clínicos, hematológicos ni en la expresión de marcadores de activación linfocitaria en PBL de vaquillas Holstein. Por lo tanto, una potencial terapia para mastitis utilizando MSC-TA podría ser segura, sin embargo, es necesario evaluar si efecto en vacas con mastitis.

Palabras clave: MSC, vaquillas Holstein, activación linfocitaria.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC por sus siglas en inglés) son células multipotentes adultas con morfología fibroblastoide, que pueden ser aisladas desde diversos tejidos incluyendo médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo (Bianco *et al.*, 2009). Las MSC pueden diferenciarse hacia linajes celulares de origen mesodermal como osteocitos, condrocitos y adipocitos y también se ha descrito la capacidad *in vitro* de diferenciación hacia linajes celulares de origen endodérmico y ectodérmico (Kim y Cho, 2013; Bianco *et al.*, 2009; Cogle *et al.*, 2004). Adicionalmente a su capacidad de diferenciación, se ha reportado que las MSC poseen propiedades o efectos tróficos que incluyen inmunomodulación, capacidad regenerativa y capacidad antibacteriana (Gao *et al.*, 2016; Bruna *et al.*, 2016; Sutton *et al.*, 2015). Estas propiedades han generado expectativas sobre el potencial uso terapéutico de las MSC para el tratamiento de enfermedades que afectan a humanos y animales. Se ha reportado el uso en investigación de MSC en distintas especies animales como caballos y gatos (Kol *et al.*, 2015; Quimby *et al.*, 2013). Sin embargo, existen escasos reportes sobre la biología de las MSC en especies animales de uso productivo como el bovino, especialmente sobre su potencial aplicación para el tratamiento de patologías que afectan a esta especie. Lo anterior, a pesar de que recientemente se ha determinado que las MSC bovinas poseen un amplio potencial de diferenciación y propiedades terapéuticas incluyendo inmunomodulación, angiogénesis y capacidad antibacteriana (Huaman, 2017.; Cahuascano, 2017.; Dueñas *et al.*, 2014). En el caso del ganado bovino, una de las principales patologías que afectan a esta especie dentro de un rebaño lechero corresponde a la mastitis o inflamación de la glándula mamaria (Rollin *et al.*, 2015). La mastitis es una de las enfermedades de mayor prevalencia e impacto económico que afectan a la industria lechera a nivel mundial y se produce por el ingreso de microorganismos patógenos hacia la ubre (Bravo, 2009; NAHMS, 2007). En la actualidad, la mayoría de los tratamientos utilizados para el control de la mastitis se basan principalmente en el uso de antibióticos. Este tipo de terapia tiene, sin embargo, desventajas que se basan

principalmente en el potencial desarrollo de resistencia bacteriana (Pol y Ruegg, 2007). Adicionalmente, los antibióticos no inducen capacidad regenerativa en el tejido mamario. En consecuencia, el desarrollo de nuevos tratamientos para la mastitis es de importancia y considerando el potencial terapéutico de las MSC, es que el desarrollo de una terapia basada en el uso de MSC podría ser una alternativa interesante para el tratamiento de esta enfermedad. Para el desarrollo de una terapia basada en la utilización de MSC de origen alogénico, es fundamental previamente evaluar el potencial rechazo inmune que una terapia alogénica de MSC puede generar en el receptor. Un trasplante alogénico implica que el sistema inmune del receptor se enfrenta a células que poseen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que participan en la presentación de antígenos a linfocitos T (Ayala *et al.*, 2012). Al ser detectadas, las MSC aplicadas son susceptibles de ser reconocidas como extrañas y ser atacadas como consecuencia un rechazo al trasplante alogénicos (Ayala *et al.*, 2012). Este reconocimiento inmunogénico induce la activación de linfocitos T que desencadenan una respuesta inflamatoria y actividad citolítica (Barret *et al.*, 2003). Los linfocitos T helper (Th) (CD4 +) y T citotóxicos (CD8 +) interactuarán con los aloantígenos presentes en las células del injerto del donante, o sobre las células presentadoras de antígeno (APC) del receptor del trasplante (Shipkova y Wieland, 2011). Además, al ser activados, estos linfocitos expresarán algunas moléculas como el receptor de interleuquina 2 (CD25) fundamental para la proliferación y diferenciación de los linfocitos T (Ingulli 2010), el marcador de activación temprana CD69 que participa en la regulación de la distribución linfocitaria, (Ahn *et al.*, 2002) y disminuirá la expresión de L-Selectin (CD62L), que medía la adhesión de los linfocitos a linfonodos periféricos (Waters *et al.*, 2003).

Por lo tanto, considerando el potencial rechazo inmune a una terapia celular alogénica, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la administración intramamaria de una suspensión de MSC-TA bovinas sobre el perfil hematológico y la activación linfocitaria en vaquillas Holstein clínicamente sanas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Células troncales mesenquimáticas

Durante el desarrollo embrionario, las células troncales mesenquimáticas (MSC) se originan en el mesénquima embrionario derivado del mesodermo (Bianco *et al.*, 2009). Aunque las MSC fueron inicialmente descritas como células fibroblásticas derivadas de médula ósea y formadoras de colonias, posteriormente se han reportado poblaciones de MSC en diversos tejidos como adiposo, cordón umbilical, membrana sinovial, placenta, pulpa dental y sangre periférica (Wagner *et al.*, 2005). La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) ha establecido criterios mínimos que caracterizan a los cultivos de MSC y que incluyen 1) capacidad de adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar, 2) expresión de antígenos de superficie CD105, CD73, CD90 y ausencia de expresión de moléculas hematopoyéticas CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y 3) capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica bajo condiciones *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). En el caso de poblaciones de MSC humanas y también bovinas, se ha reportado que estas células poseen capacidad de transdiferenciación *in vitro*, es decir, potencial de diferenciación hacia linajes celulares de capas embrionarias distintas a la mesodérmica como la ectodérmica y la endodérmica (Kim y Cho, 2013; Dueñas *et al.*, 2014; Bianco *et al.*, 2009; Cogle *et al.*, 2004).

Propiedades terapéuticas de las MSC en injurias y enfermedades

La terapia con MSC implica el trasplante de células autólogas o alogénicas desde donantes de la misma especie a través de su administración local o sistémica (Quimby *et al.*, 2013). Actualmente, se han descrito diversas patologías en las que la aplicación terapéutica de MSC ha demostrado ser beneficiosa, como en osteogénesis imperfecta, enfermedad de injerto contra huésped e infarto al miocardio (Kim y Cho, 2013). En cada caso, la terapia con MSC apunta a aplicar efectos inmunomoduladores, angiogénicos y regenerativos con el objetivo de aumentar las probabilidades de recuperación. Desde la lesión tisular se secretan

factores celulares sintetizados por células apoptóticas, células necróticas y microvasculatura dañada que lleva a la activación de células inflamatorias como macrófagos y neutrófilos y al reclutamiento de linfocitos T CD4 +, T CD8 + y B hacia la zona de injuria (Ma *et al.*, 2014). Desde esta zona dañada se liberan además moléculas inflamatorias como interleuquina uno beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e interferón gama (IFN- γ) que junto a las células inmunes, endoteliales y fibroblastos orquestan cambios en el microambiente y estimulan la movilización y diferenciación de MSC en estroma y eventualmente el reemplazo de células de tejido dañadas (Ma *et al.*, 2014). Aunque los mecanismos por los cuales las MSC mejoran el daño tisular han sido objeto de debate, actualmente existen algunas hipótesis que explican el potencial terapéutico de estas células. Por una parte, su capacidad de auto-renovación, potencial de diferenciación multi-linaje y capacidad regenerativa, se basaría en la capacidad de producir citoquinas como factor de crecimiento fibroblástico (FGF) que estimula la proliferación queratinocítica y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la angiogénesis y metaloproteinasas de matriz que regulan las vías de señalización que controlan el crecimiento celular, la inflamación y la angiogénesis (Bruna *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2012). Por lo anterior, las MSC estimulan positivamente las funciones biológicas del tejido con efectos anti fibrótico, anti apoptóticos, proangiogénicos, y promoviendo la diferenciación y la supresión inmune de las células circundantes (Ishikawa *et al.*, 2012).

Las MSC pueden influir sobre las funciones de las células efectoras implicadas en la inmunidad innata y adaptativa (Krampera *et al.*, 2013). Existe un amplio consenso de que a pesar de que las MSC pueden provenir de diferentes fuentes tisulares, sus productos celulares probablemente comparten mecanismos fundamentales de acción que median sus funciones antiinflamatorias y de reparación de tejidos (Bruna *et al.*, 2016). Actualmente, diversos estudios han reportado factores solubles presentes en el microambiente inflamatorio como IFN γ , TNF α , IL-1 α o IL-1 β que modulan la actividad paracrina de las MSC induciendo la secreción de diversos factores solubles como indolamina 2,3 dioxigenasa

(IDO), interleuquina 6 (IL-6), factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), prostaglandina E2 (PGE₂) e interleuquina 10 (IL-10) que juegan un rol importante al suprimir la capacidad de respuesta de las células T (Huaman, 2017; Krampera *et al.*, 2013). Junto a lo anterior, existen estudios recientes que indican que las MSC ejercen fuertes efectos antimicrobianos a través de mecanismos indirectos y directos, parcialmente mediados por la secreción de péptidos y proteínas antimicrobianas (AMP) (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). En estudios *in vivo* se ha reportado que las MSC poseen capacidad de disminuir la carga bacteriana frente diversas enfermedades como neumonía, fibrosis quística, enfermedades inflamatorias intestinales y sepsis entre otros (Sutton *et al.*, 2015).

Inmunogenicidad e inmunoevasión de las MSC

El rechazo a injertos de tejidos u órganos es causado por el reconocimiento de moléculas del MHC alogénicas y mediado por los linfocitos T CD4 Y CD8 (Ayala *et al.*, 2012). Esto ocurre mediante dos vías diferentes, la vía indirecta que requiere el procesamiento de las moléculas MHC del donante por parte de las APC del receptor, y la vía directa de activación en la que se reconoce directamente en las APC del donante las moléculas del MHC alogénicas sin requerir el procesamiento del antígeno por las APC del receptor (Ayala *et al.*, 2012). En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que las MSC desempeñan un papel importante en la tolerancia a aloantígenos, sin generar linfocitos T aloreactivos ni incidencia de enfermedad injerto contra huésped (Ryan *et al.*, 2005). Esta capacidad de las MSC de evitar el rechazo inmune es conocida como inmunoevasión y se explica por su baja inmunogenicidad mediada por diversos mecanismos, basados inicialmente en la baja expresión de moléculas MHC-I y II y la carencia de moléculas coestimuladoras de la activación linfocitaria como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) (Ryan *et al.*, 2005). Ambos mecanismos son necesarios para la activación y función efectora de las células T y permiten evitar el reconocimiento de las células Natural Killer (NK) y la activación de linfocitos T (Ryan *et al.*, 2005). A lo anterior debe añadirse la capacidad de las MSC de interactuar con las células del sistema inmune, generando inmunomodulación

de la respuesta inmune innata y adaptativa, mediante la actividad de diversos factores solubles secretados por las MSC, que incluyen IDO; PGE2; TGF- β 1 y óxido nítrico (NO) (Gao *et al.*, 2016; Ankrum *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014). Estos factores inhiben la proliferación de linfocitos T y B; la activación de las células natural killer, la maduración y activación de las células dendríticas e inducen y regulan a los linfocitos T reguladores (Gao *et al.*, 2016).

Activación linfocitaria como respuesta inmune

La activación de las células T se puede dividir en tres fases que incluyen inducción, expansión y fase efectora (Barret *et al.*, 2003). Posterior al trasplante alogénico, las células T helper (Th) (CD4 +) y citotóxicas T (CD8 +) interactúan, en la fase de inducción, con aloantígenos presentes en las células del injerto del donante, o sobre las células presentadoras del antígeno del receptor del trasplante, a través de sus receptores de células T (TCR) (Shipkova y Wieland, 2011). Posteriormente, en la fase de expansión, las células T específicas proliferan en los nódulos linfáticos y finalmente en la fase efectora, las células T aloactivadas interactúan con sus antígenos afines en las células diana, causando citotoxicidad, destrucción celular y apoptosis (Shipkova y Wieland, 2011). Sin embargo, para que se produzca la activación linfocitaria, es necesario el tráfico de linfocitos a los nódulos linfáticos, procesos mediados por la expresión diferencial de múltiples moléculas de adhesión superficial (Waters *et al.*, 2003). En este grupo de moléculas se incluyen la L-Selectina (CD62L), que media la adhesión específica de los linfocitos T a las direccionales vasculares de los nódulos linfáticos periféricos, dirigiéndose así los linfocitos en reposo a áreas de concentración de antígeno dentro de los nódulos linfáticos en donde serán activados, tras su activación la expresión de CD62L se regula negativamente (Waters *et al.*, 2003). También se encuentra involucrada la molécula de superficie CD69 que es una de las moléculas de activación linfocitaria más temprana que se expresa con la estimulación de los linfocitos T (Ahn *et al.*, 2002). Las células T reguladoras (Treg) son consideradas mediadores esenciales de la tolerancia periférica al mantener la homeostasis inmunitaria,

prevenir la autoinmunidad y regular la inflamación (Ingulli, 2010). Las células T reguladoras CD4 + CD25 + (receptor de IL-2) se han identificado en muestras de sangre periférica de receptores de aloinjerto hepático tolerante y dentro de aloinjertos tolerados (Yoshizawa *et al.*, 2005). No obstante, CD25 puede ser utilizado tanto como marcador de regulación mostrando una expresión sostenida en las células T, como marcador de activación en las células T activadas recientemente (Ingulli, 2010).

Potencial terapéutico de MSC en mastitis bovina

La producción lechera en Chile y en el mundo es una parte importante de la industria de los alimentos, por lo que optimizar los procesos y minimizar los costos son aspectos fundamentales. Sin embargo, existen enfermedades que afectan al ganado lechero y que son de alto impacto en gran parte de las lecherías como es el caso de la mastitis o inflamación de la glándula mamaria (Bravo, 2009). Esta enfermedad alcanza tasas de 16,5% de mastitis clínica en planteles de Estados Unidos (NAHMS, 2007), mientras que en la zona sur de Chile se ha reportado una incidencia mensual de un 3,7% de mastitis clínica y una prevalencia de mastitis subclínica de 38,7% (Bravo, 2009). Los casos de mastitis generan una disminución de un 1,9% a un 18,4% de la producción por lactancia y una disminución en los ingresos de un 23,4% por lactancia solo en mastitis subclínica (Bravo, 2009). En cuanto a la mastitis clínica, se han calculado pérdidas de 444 dólares por vaca cuando se presenta durante los primeros 30 días de lactancia (Rollin *et al.*, 2015).

Actualmente, los tratamientos para la mastitis se basan principalmente en el uso de antibióticos, lo cual representa un 35% del total de antibióticos administrados en una producción lechera (Kayitsinga *et al.*, 2017). Sin embargo, existen patógenos causantes de mastitis como *S. aureus* que muestran bajas tasas de curación con diversos antibióticos (Wagner *et al.*, 2005). Por lo anterior y debido al riesgo que significa el uso indiscriminado de antibióticos en la resistencia bacteriana, es fundamental enfocar los esfuerzos en desarrollar nuevos tratamientos para la mastitis.

Debido a sus características terapéuticas, el uso de MSC como potencial tratamiento es una alternativa experimental, sin embargo, previamente a evaluar el potencial terapéutico contra la mastitis es importante evaluar su seguridad de utilización. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración intramamaria de una suspensión de MSC-TA bovinas sobre el perfil hematológico y la activación linfocitaria en vaquillas Holstein clínicamente sanas.

HIPÓTESIS

La administración intramamaria de dos dosis de MSC derivadas de tejido adiposo fetal bovino, separadas por diez días en vaquillas Holstein clínicamente sanas, no induce un rechazo inmunológico mediado por activación linfocitaria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal bovino, sobre parámetros hematológicos y de activación linfocitaria en sangre periférica de vaquillas Holstein clínicamente sanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto clínico y hematológico de la administración por vía intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal en vaquillas Holstein clínicamente sanas.
2. Determinar el efecto sobre la activación linfocitaria de la administración por vía intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal en vaquillas Holstein clínicamente sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y lugar de estudio

Se seleccionaron vaquillas de raza Holstein (N=6), clínicamente sanas de aproximadamente 15 meses de edad, con peso promedio de 445 kg, pertenecientes a una lechería comercial ubicada en la localidad de Panquehue en la Región de Valparaíso. Las vaquillas fueron mantenidas en un sistema de producción intensivo en confinamiento y alimentadas con ración total mezclada en base a ensilaje de maíz, heno de alfalfa y concentrado. Los animales fueron evaluados clínicamente en forma diaria durante 20 días experimentales. Se determinó la frecuencia cardíaca, respiratoria, ruminal, coloración de mucosas y temperatura rectal. Además, se colectaron muestras de sangre desde la vena coccígea los días 0, 5, 10, 15 y 20, utilizando tubos vacutainer para aislación de linfocitos y en tubos separados para análisis de hemograma. Los días experimentales 0 y 10 se administró por vía del canal del pezón una suspensión de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA en 3mL de Ringer Lactato en dos cuartos mamarios seleccionados aleatoriamente (Anexo 1). En los dos cuartos mamarios restantes se administró una solución de 3mL de Ringer Lactato como control. Las muestras de sangre fueron analizadas por un laboratorio comercial para hemograma que incluye morfología de eritrocitos, número de eritrocitos (células/mm³), porcentaje de hematocrito y hemoglobina (gr/dL), número de células mononucleares (células/mm³), conteo de plaquetas (células/mm³) y morfología de las plaquetas. La evaluación clínica de la glándula mamaria se basó en un método publicado previamente que incluye la observación de aumento de volumen, firmeza y signos de dolor y secreción láctea (Wenz *et al.*, 2006). Además, se cuantificó la temperatura de cada cuatro mamario utilizando un termógrafo portátil (Fluke VT02 Washington, USA).

Obtención y cultivo de MSC-TA

Las MSC fueron aisladas desde un pool de tejido adiposo derivado de fetos bovinos (N=9, último tercio de gestación). Los fetos bovinos fueron obtenidos desde una planta faenadora

y transportados en un contenedor térmico al laboratorio. Se extrajo una muestra intracardiaca de 10mL de sangre desde los fetos y se centrifugó a 400 rpm por 10 min para separar el suero. Las muestras de suero se enviaron al laboratorio del SAG para detección de diarrea viral bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina, leptospirosis y brucelosis. Solo fetos libres de estas enfermedades se utilizaron para aislamiento de MSC-TA. El tejido adiposo fetal se extrajo mediante una incisión en la línea media abdominal y extracción quirúrgica utilizando bisturí y pinzas estériles. Luego el tejido adiposo se lavó con solución tampón fosfato (PBS) pH 7,4 (Corning, Manassas, USA) y se seccionó utilizando un bisturí. Posteriormente el tejido fue incubado a 38°C por 45 min en agitación constante en medio de digestión compuesto por colagenasa 0,5% diluida en HBSS (Gibco, Nueva York, USA) (Hyclone, Utha, USA). La reacción enzimática fue detenida adicionando medio de expansión compuesto por DMEM con 4,5 gr/dL de glucosa y sin L-glutamina (Corning, Manassas, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, México), 500 µL de anfotericina B (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) y 500 µL de penicilina/estreptomicina (Corning) en una cantidad equivalente al medio de digestión. Posteriormente, el tejido fue filtrado utilizando poros de 40 µm y centrifugado dos veces a 400 x g por 5 min utilizando medio de lavado, el cual estaba compuesto por DMEM suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B (Biological Industries) 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (Corning). El sedimento fue resuspendido en medio de expansión y posteriormente traspasado a frascos de cultivo celular de 175 cm². Los cultivos de MSC derivadas de tejido adiposo fueron incubados a 38°C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de 48 horas, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante un cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia se realizaron pasajes de MSC mediante remoción con tripsina/EDTA, suplementado con 250 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

Aislamiento de linfocitos de sangre periférica

Los días experimentales 0, 5, 10, 15 y 20 se extrajeron muestras de sangre de las vaquillas de aproximadamente 10mL desde la vena coccígea utilizando tubos vacutainer con heparina. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio y la sangre fue mezclada con PBS (Corning) en partes iguales (1:1). Posteriormente, se agregó el mismo volumen de Histopaque (Sigma, Inglaterra) a temperatura ambiente y sobre esta solución se adicionó la sangre mezclada con PBS lentamente y sin mezclar. Posteriormente, la solución se centrifugó a 900 x g por 35 minutos, para lograr una separación en cuatro fases: 1) plasma con PBS, 2) nube de células mononucleares de sangre periférica, 3) solución Histopaque y 4) granulocitos y glóbulos rojos (Anexo 2) (Huaman, 2017). La nube de linfocitos de sangre periférica (PBL) fue extraída, mezclada con PBS y centrifugada a 1100 x g por ocho minutos. El pellet fue resuspendido en PBS y centrifugado a 800 x g por seis minutos. Finalmente, el nuevo pellet fue resuspendido en RPMI (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 250 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Corning). Posteriormente, el pellet de PBL fue sembrado en placas Petri con medio RPMI (Biological Industries) e incubado a 38,5°C con 5% de CO₂ durante dos horas. Para conservar el PBL, se removieron las células no adherentes al plástico y se centrifugaron a 800 x g con freno por seis minutos. El pellet de células fue fijado en buffer de lisis (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania) suplementado con 2-Mercaptoethanol (1:50, Sigma-Aldrich, Alemania). Una vez realizado el procedimiento las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Síntesis de cDNA y PCR cuantitativo

La purificación del RNA total desde PBL se realizó utilizando un kit de purificación de GeneJET (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación del RNA fue realizada mediante fluorimetría utilizando el kit Qubit RNA

BR Assay (Molecular probes, Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). La remoción del DNA genómico se llevó a cabo utilizando un kit DNase I (RNase-free) (Thermo Scientific) en un termociclador Step One (Scilogex, Connecticut, USA). Posteriormente se realizó la síntesis del cDNA utilizando el kit Affinity Script cDNA Synthesis de Agilent Technologies (Texas, Estados Unidos) en un termociclador Step One (Scilogex). Los partidores necesarios fueron diseñados utilizando la base de datos de NCBI para encontrar las secuencias nucleotídicas requeridas (NCBI, 2017). Posteriormente, se utilizó la herramienta de diseño de partidores del NCBI y se comprobó el funcionamiento de los partidores para Q-PCR utilizando el software de análisis de partidores de Premier Biosoft (Tabla 1). Los niveles de mRNA de los genes marcadores de activación linfocitaria CD4, CD8, CD25, CD62L y CD69 fueron cuantificados utilizando kit Brilliant II Sybr Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Texas, Estados Unidos) en un equipo PCR tiempo real (Illumina, San Diego, USA).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de partidores utilizados en análisis de Q-PCR

Gen		Secuencia Nucleotídica (5' - 3')	Amplicon (pb)
Genes endógenos			
GAPDH	Forward	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	104
	Reverse	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	
βACTIN	Forward	CGCACCACTGGTATTGTCAT	92
	Reverse	TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	

Genes de activación linfocitaria

CD4	Forward	TTCCTTCCCACCTCACCTTCG	132
	Reverse	ATCTTGTTACCTTCACCTCTC	
CD8	Forward	AAGGCATACCACAAGGGTTATC	102
	Reverse	CACAGCCAGGTTCTGAGAATAG	
CD25	Forward	GGAAAGCCCTAACACTGATGTA	95
	Reverse	AGAGGCTTGGAAAGGACTTATG	
CD62L	Forward	TACGAAAGGACGGAGCAAAG	100
	Reverse	GAGCATAATCCAGACCCACAG	
CD69	Forward	GGGTCCATTCAAGTTCCTATCC	97
	Reverse	TGTACTGGCCCACTGATAGA	

Análisis estadístico

Las variables del hemograma y los niveles de mRNA de CD4, CD8, CD25, CD62L y CD69 fueron analizados mediante la prueba de normalidad de Shapiro Wilks. Los efectos del día de tratamiento con MSC-TA fueron evaluados por ANOVA de una vía. Como variables independientes se evaluaron los días de tratamiento y como variables dependientes se evaluaron las variables del hemograma y los niveles de mRNA de CD4, CD8, CD25, CD62L y CD69. Las diferencias entre promedios para días de tratamiento fueron determinadas por medio del post test de Duncan. Las diferencias entre los valores de

termografía entre los cuartos tratamiento y control fueron comparadas mediante prueba de t de Student. Para todos los análisis se utilizó un valor de significancia ($P \leq 0.05$) y el software Info Stat (Córdoba, Argentina, 2008).

RESULTADOS

Determinación de variables clínicas y de la ubre en vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria

Se evaluaron variables clínicas sistémicas y mamarias en vaquillas Holstein tratadas con dos suspensiones de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA por vía intramamaria en dos cuartos los días experimentales 0 y 10. La coloración de la mucosa oral fue rosada pálida y se consideró normal en todas las vaquillas durante el estudio. Los valores de frecuencia cardiaca promedio el día 5 del estudio (D5, $90,3 \pm 7,2$) fueron mayores al intervalo de referencia (48-84) (Tabla 2). En tanto la frecuencia respiratoria promedio los días 5, 10, y 20 (D5, $55,5 \pm 4,4$; D10, $60,7 \pm 8,8$; D20, $51,3 \pm 5,5$) fue mayor al intervalo de referencia (26-50). Los valores de temperatura rectal promedio fueron considerados dentro de los rangos normales durante todo el estudio. Además, la frecuencia ruminal promedio los días 15 y 20 del estudio (D15, $3,7 \pm 0,3$; D20, $3,3 \pm 0,3$) fue mayor al intervalo de referencia (2-3). No se detectaron alteraciones en los parámetros clínicos evaluados en los cuartos mamaros incluyendo volumen, firmeza y signos de dolor. Se detectó secreción láctea en una de las vaquillas del estudio luego de la primera infusión con MSC-TA. Los valores de la termografía se encontraron dentro del límite máximo de temperatura ($34,1-37,9$ °C) para un cuarto mamario sano durante todo el estudio y no se detectaron variaciones estadísticamente significativas en el análisis de la termografía realizada en los cuartos tratados, a lo largo de los días del estudio (Tabla 3).

Tabla 2. Valores promedio de variables clínicas durante 20 días de estudio en vaquillas Holstein tratadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10.

Variable/día	0	5	10	15	20	*Int. Ref.
	MSC-TA		MSC-TA			
FC (latidos/minuto)	84,0 ± 3,1	90,3 ± 7,2	82,3 ± 7,1	71,7 ± 5,8	74,0 ± 2,0	48-84
FR (resp./minuto)	44,7 ± 3,7	55,5 ± 4,4	60,7 ± 8,8	44,0 ± 16	51,3 ± 5,5	26-50
TR (grados celsius)	38,9 ± 0,1	39,2 ± 0,1	39,3 ± 0,2	38,5 ± 0,4	38,9 ± 0,3	38,1-39,1
Fr (ciclos/2 min.)	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2-3

Valores: promedio ± error estándar.

Abreviación: Frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), temperatura rectal (TR), frecuencia ruminal (Fr), intervalo de referencia (Int.Ref).

(*Andersson *et al.*, 2007)

Tabla 3. Valores promedio de termografía de los cuartos mamarios durante 20 días de estudio en vaquillas Holstein tratadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10.

Variables/día	0	5	10	15	20	P	*Int. Ref.
	MSC-TA		MSC-TA				
Temp. CT(°C)	31,9±0,6	29,8±0,6	31,4±0,6	30,4±2,1	30,3±0,9	0,34	34,1-37,9
Temp.CC (°C)	31,1±0,7	30,9±0,5	31,8±0,6	29,6±2,1	30,8±0,8	0,57	34,1-37,9
Prueba de T (P)	0,38	0,19	0,64	0,79	0,70		

Valores: promedio ± error estándar.

Abreviación: Temperatura cuartos tratados (Temp. CT), temperatura cuartos control (Temp. CC), intervalo de referencia de temperatura en un cuarto sano (Int. Ref).

(*Metzner *et al.*, 2014)

Determinación de variables hematológicas en vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria

El efecto de la administración de dos dosis de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA por vía intramamaria separadas por 10 días, fue evaluado sobre variables hematológicas en vaquillas Holstein. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas desde sangre periférica y evaluadas por análisis hematológico los días 0, 5, 10, 15 y 20. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de leucocitos, linfocitos y neutrófilos entre los días experimentales analizados (Tabla 4). Sin embargo, tanto el recuento de leucocitos ($\bar{x}=20967$), como el conteo de linfocitos ($\bar{x}=12239$) y neutrófilos ($\bar{x}=8192$) se encontraron sobre el rango normal (leucocitos, 4000-12000; linfocitos, 2500-7500; neutrófilos, 600-4000 células por mm^3) desde antes de la infusión hasta el final del estudio (Figura 1).

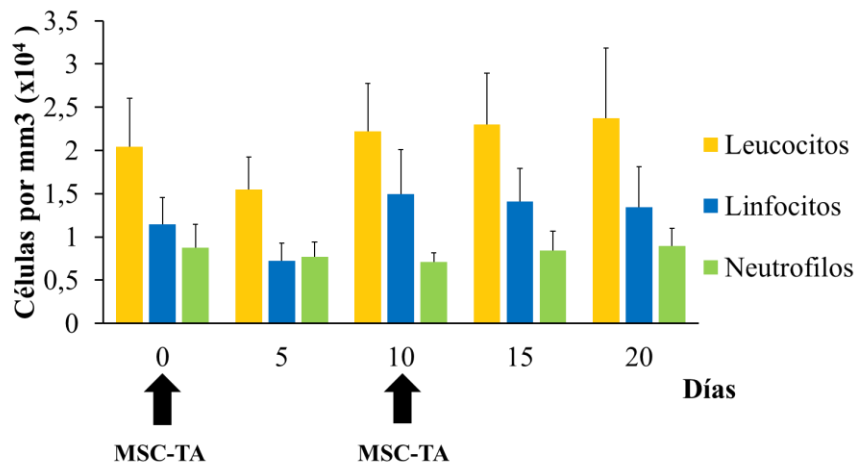


Figura 1. Recuento de leucocitos, linfocitos y neutrófilos en vaquillas Holstein tratadas con dos dosis intramamarias de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA. Los análisis fueron realizados cada 5 días por un total de 20 días y las MSC-TA fueron administradas los días 0 y 10 (flecha negra). No se detectaron diferencias ($P>0,05$) en los recuentos de leucocitos, linfocitos y neutrófilos durante los días del estudio.

Tabla 4. Variables hematológicas evaluadas cada 5 días en vaquillas Holstein tratadas con MSC-TA por vía intramamaria los días experimentales 0 y 10.

Valores: media \pm error estándar

Variable/día	0 MSC-TA	5	10 MSC-TA	15	20	P	*Int. Ref
Eritrocitos (mm ³) x10 ⁶	6,2 \pm 0,34	6,4 \pm 0,12	5,8 \pm 0,17	5,8 \pm 0,097	6,4 \pm 0,17	0,14	5,1–7,6
VGA (%)	29,1 \pm 1,7	29,6 \pm 0,5	26,8 \pm 1,0	29,1 \pm 0,3	29,4 \pm 0,7	0,50	22–33
Hemoglobina (g/dL)	10,2 \pm 0,5	10,2 \pm 0,2	9,2 \pm 0,4	10,1 \pm 0,1	10,2 \pm 0,2	0,12	8,5–12,2
Eosinófilos (mm ³)	145,7 \pm 74,5	510,2 \pm 171,2	106 \pm 67,3	417,5 \pm 181,1	270,7 \pm 136,3	0,16	0–900
Monocitos (mm ³)	97 \pm 97	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,40	0-800
Nº Plaquetas(mm ³) x10 ⁵	2,7 \pm 0,22	2,0 \pm 0,41	3,2 \pm 0,98	2,2 \pm 0,21	2,6 \pm 0,24	0,29	1,9-6,4

Abreviación: Hematocrito (VGA), intervalo de referencia (Int. Ref.)

(*George *et al.*, 2010)

Determinación de la expresión génica de marcadores de activación linfocitaria en PBL de vaquillas tratadas con MSC-TA por vía intramamaria

El potencial de activación linfocitaria en vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de $2,5 \times 10^7$ de MSC-TA fue determinado mediante la cuantificación de la expresión relativa de los genes de activación linfocitaria CD4, CD8, CD25, CD69 Y CD62L en PBL. Las muestras para Q-PCR fueron obtenidas desde PBL cada 5 días por un total de 20 días experimentales. Los niveles de mRNA de CD4 (\bar{x} =1,00), CD8 (\bar{x} =0,86), CD25 (\bar{x} =0,96), CD69 (\bar{x} =1,17) Y CD62L (\bar{x} =1,14) no fueron distintos ($P > 0,05$) entre los días experimentales evaluados (Figura 2).

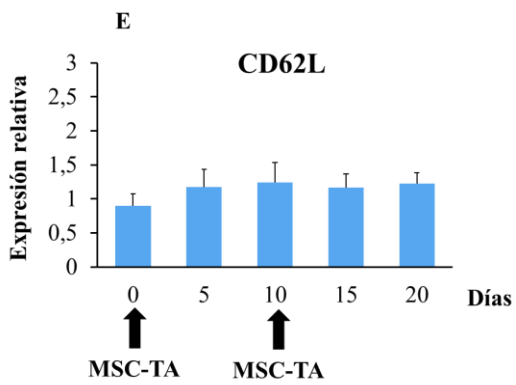
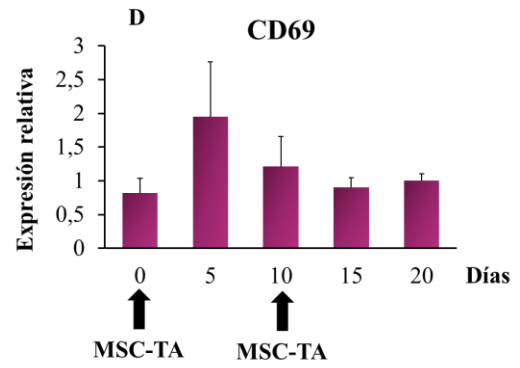
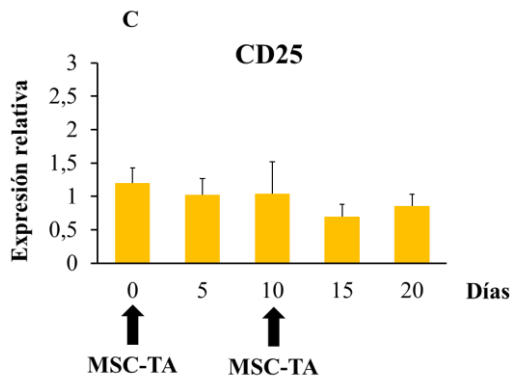
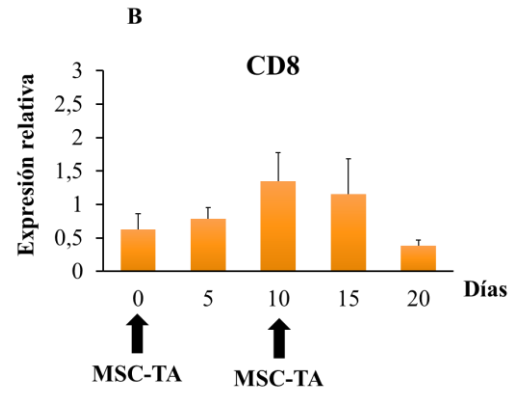
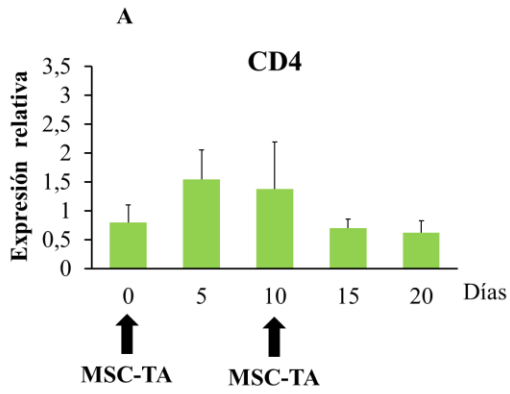


Figura 2. Niveles de mRNA de CD4, CD8, CD25, CD69 Y CD62L en PBL de vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de MSC-TA los días experimentales 0 y 10. Los análisis fueron realizados cada 5 días por un total de 20 días y las MSC-TA fueron administradas los días 0 y 10 (flecha negra). No se detectaron diferencias ($P < 0,05$) en los niveles de mRNA de los marcadores evaluados (A, CD4; B, CD8; C, CD25; D, CD69; E, CD62L) en los días evaluados.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC-TA alogénicas separadas por 10 días, sobre el perfil hematológico y la activación linfocitaria en vaquillas Holstein clínicamente sanas. Estos análisis fueron realizados con el objetivo de determinar la seguridad asociada a un potencial rechazo inmunológico de una terapia con MSC-TA para el tratamiento de la mastitis. Los efectos tróficos antibacterianos, inmunomoduladores y proangiogénicos de las MSC han potenciado su estudio con el fin de desarrollar terapias en humanos y animales (Sutton *et al.*, 2015; Bruna *et al.*, 2016). Sin embargo, antes de considerar su efectividad terapéutica es necesario determinar su seguridad y potencial rechazo inmune en animales sanos, especialmente en el caso de fuentes de MSC alogénicas.

Previamente se han reportado estudios de seguridad de terapias basadas en MSC alogénicas en la especie equina (Camargos *et al.* 2016; Ardanaz *et al.*, 2016; Kol *et al.* 2015). Sin embargo, a la fecha no se han encontrado reportes de ensayos de seguridad en bovinos, a pesar de la existencia de patologías de alto impacto que afectan a esta especie, como la mastitis. La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria que es inducida por agentes patógenos frecuentemente infectocontagiosos, que penetran en la ubre vía canal del pezón multiplicándose en el tejido mamario y dañando su estructura (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Esta patología se ha convertido en una de las enfermedades de mayor prevalencia e impacto económico que afectan a la industria lechera a nivel mundial (Rollin *et al.*, 2015; NAHMS, 2007). En la actualidad la mayoría de los tratamientos para el control de la mastitis se basan en el uso de antibióticos con la desventaja potencial del desarrollo de resistencia bacteriana (Pol y Ruegg, 2007). Además, este tipo de terapias no mejoran el daño que se produce en el tejido glandular como consecuencia del proceso infeccioso. Debido a esto, el estudio y desarrollo de nuevos tratamientos para la mastitis es de vital importancia y la terapia con MSC surge como una posible alternativa.

Durante los veinte días de estudio, cada vaquilla fue evaluada clínicamente y cada cuarto de la ubre (dos cuartos tratados con MSC-TA y dos cuartos tratados con el vehículo) fue evaluado según parámetros previamente reportados de aumento de volumen, firmeza y signos de dolor y secreción láctea (Wenz *et al.*, 2006). La temperatura rectal de las vaquillas se mantuvo dentro de los rangos de referencia para vacas sanas durante el periodo de estudio, sin embargo, las variables de frecuencia cardíaca, respiratoria y ruminal se encontraron levemente aumentadas sobre los intervalos de referencia algunos de los días del estudio. Este leve aumento de estas constantes puede atribuirse al traslado de los animales hacia el lugar donde se realizaron las evaluaciones clínicas y los manejos de alimentación, lo que pudo haber alterado transitoriamente dichos parámetros.

En cuanto a la evaluación de la glándula mamaria, no se detectaron cambios en la temperatura cutánea de los cuartos, mediante termografía y palpación. Tampoco se detectó dolor, aumento de volumen o aumento de la firmeza en las ubres. Estos resultados podrían indicar que la administración intramamaria de dos dosis de MSC-TA no generó cambios clínicos en la ubre asociados a rechazo inmunológico. Previamente se ha reportado que el ingreso de agentes inmunogénicos por vía intramamaria induce reconocimiento e inducción del sistema inmune innato al entrar en contacto con el revestimiento de las células epiteliales y leucocitos en la leche (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Esta respuesta innata se ve iniciada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y es facilitada por la acción del sistema del complemento, lactoferrina y lisozima, generando efectos tisulares como vasodilatación, aumento de volumen y temperatura (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). La ausencia de cambios clínicos en los cuartos inoculados con MSC-TA sugieren que la administración de MSC-TA no indujo cambios tisulares evidentes como consecuencia de la activación de la respuesta inmune.

Los valores de eritrocitos, VGA, hemoglobina y plaquetas fueron detectados dentro de los rangos normales durante el estudio y no fueron distintos estadísticamente entre los días muestreados. La respuesta al alotransplante puede generar desordenes hematológicos como citopenias o anemias que pueden presentarse como síntomas iniciales (Smith, 2010). La anemia puede estar asociada a efectos colaterales al alotransplante como ocurre en la incompatibilidad del grupo sanguíneo que lleva a la presencia de anticuerpos preformados en el plasma del donante o el manejo farmacológico de inmunosupresión que se induce antes de un trasplante (Smith, 2010). En el presente estudio se utilizaron MSC-TA sin la presencia de células sanguíneas y no se realizó un manejo farmacológico previo para inducir inmunosupresión. Como consecuencia, no se detectó presencia de anemia ni de alteraciones en los parámetros hematológicos de la serie roja. Los valores de la serie blanca sanguínea no fueron distintos entre los días muestreados durante el estudio. Sin embargo, los recuentos promedio de leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos fueron mayores a los intervalos de referencia de vacas sanas desde antes de iniciar las inoculaciones con MSC-TA. Recientemente, se han reportado cambios en los valores referenciales del hemograma en vacas Holstein en relación a los valores establecidos hace 44 años (George *et al.*, 2010). Estos cambios han significado aumentos en los valores referenciales posiblemente asociados al progreso genético de la raza, modificaciones del medio ambiente y dieta enfocados en aumentar la producción láctea. Como ejemplo se ha determinado que vacas seleccionadas para una mayor cantidad de proteína en la leche poseen un recuento mayor de leucocitos (George *et al.*, 2010). Adicionalmente, es importante considerar que los animales utilizados en este estudio correspondieron a vaquillas de quince meses de edad y que el conteo total de linfocitos tiende a ser mayor en animales jóvenes comparado con animales viejos (Jones y Allison, 2007).

En estudios anteriormente realizados en equinos, se ha reportado que administraciones endovenosas reiteradas (Kol *et al.* 2015) y trasplante intramuscular de MSC alogénicas

(Camargos *et al.* 2016) no han desencadenado cambios en los parámetros hematológicos. Sin embargo, en uno de estos estudios se detectó, mediante citometría de flujo, un aumento en la cantidad de linfocitos CD8+ circulantes en caballos inyectados con MSC de médula ósea, lo que implica que pueden existir respuestas inmunológicas sin evidenciarse cambios hematológico asociados (Kol *et al.* 2015). En el presente estudio no se realizaron evaluaciones de poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo (Kol *et al.* 2015; Pigott *et al.*, 2013). Alternativamente, la técnica de Q-PCR ha sido utilizada para la caracterización de niveles de mRNA de marcadores de superficie en poblaciones de linfocitos, ya que permite identificar cambios asociados a la activación linfocitaria (Mavropoulou *et al.*, 2016). Sin embargo, el análisis de la expresión génica mediante Q-PCR no es capaz de detectar cambios a nivel poblacional de linfocitos y adicionalmente solo detecta cambios a nivel de mRNA y no de proteína. A pesar de lo anterior, la variación en los niveles de mRNA de diferentes marcadores podría dar cuenta de un proceso de activación linfocitaria en vaquillas como consecuencia de la respuesta inmune asociada a la administración de MSC-TA alogénicas (Li *et al.*, 2014). En el presente estudio se evaluó la expresión génica de marcadores de células T-helper (CD4 +) y T-citotóxicas (CD8+), que se activan en un rechazo inmunológico a un trasplante alogénico, interactuando con aloantígenos presentes en las células del donante, o sobre las células presentadoras del antígeno del receptor (Shipkova y Wieland, 2011). También se evaluó el marcador de activación linfocitaria CD69, una de las moléculas de activación linfocitaria más temprana que se expresa con la estimulación de los linfocitos T (Ahn *et al.*, 2002). Se cuantificó la expresión de CD25 receptor de IL-2, citoquina fundamental en la estimulación y mantención de la activación linfocitaria (Ingulli, 2010). Además de esto se determinó la expresión de la molécula de adhesión superficial L-Selectina (CD62L), factor que participa en la migración de linfocitos hacia áreas de concentración de antígeno dentro de los nódulos linfáticos y que regula negativamente su activación (Waters *et al.*, 2003). Como resultado de nuestros análisis, no se detectó una variación significativa entre los niveles de

mRNA de los marcadores analizados después de la administración de dos dosis de MSC-TA alogénicas.

Es posible que la ausencia de respuesta inmune al efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC-TA en vaquillas, puede estar asociado a que la cantidad de células utilizada ($2,5 \times 10^7$ células) fue insuficiente para desencadenar dicha respuesta. Existen estudios anteriores en los que se han utilizado dosis similares de MSC derivadas de médula ósea, con el objetivo de evaluar su efecto a nivel intraarticular en caballos (Pigott *et al.*, 2013; Ardanaz *et al.*, 2016). Estos estudios han reportado que la administración de $2,5 \times 10^7$ MSC desencadenó una leve reacción inflamatoria local en las articulaciones tarso-crural y radio-carpal. Sin embargo, se ha reportado que la infusión intraarticular de una dosis más baja de MSC de médula ósea ($1,5 \times 10^7$) ha desencadenado una reacción local con una sinovitis mononuclear persistente en las articulaciones metacarpofalángicas (Pigott *et al.*, 2013). Las inyecciones endovenosas repetidas con $2,5 \times 10^7$ de MSC de médula ósea en equinos no desencadenan efectos clínicos adversos, pero inducen un aumento en las poblaciones de células T CD8+ en sangre periférica (Kol *et al.* 2015). A pesar de que en nuestro estudio no se realizó una determinación específica de las poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo, es posible que la ausencia de respuesta del sistema inmune esté relacionada con las características inmunoevasivas de las MSC-TA inoculadas. Se ha reportado que las MSC poseen una baja expresión de moléculas MHC-I y II y la carencia de moléculas coestimuladoras como B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) (Ryan *et al.*, 2005). En particular, estudios realizados en nuestro laboratorio han determinado que las MSC-TA bovinas expresan bajos niveles de mRNA de MHC-II en comparación con MSC de médula ósea (Huamán, 2017). Estas propiedades les confieren una baja inmunogenicidad ya que los linfocitos T requieren de estas moléculas y receptores para su activación y/o función efectora. Además, se ha reportado que las MSC poseen la capacidad de inmunomodular o inmunosuprimir la respuesta inmune innata y adaptativa (Gao *et al.*, 2016). Este mecanismo se produce principalmente por la secreción de diversos factores solubles como IL-10,

citoquina que diferencia células T al fenotipo T regulador (Ryan *et al.*, 2005). La prostaglandina E2 también es producida por las MSC e inhibe la maduración, activación y la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas y reprograma macrófagos para secretar IL-10 (Ma *et al.*, 2014). Por su parte, IDO, también secretado en MSC, inhibe la proliferación de linfocitos T y B (Gao *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha descrito que la capacidad de inmunoevasión de las MSC se explica por un equilibrio entre la actividad de factores inmunogénicos e inmunosupresores y el reconocimiento del sistema inmune por parte del hospedero (Ankrum *et al.*, 2014).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten indicar que la administración intramamaria de dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC-TA alogénicas, separadas por 10 días, en dos de los cuartos de la ubre en vaquillas Holstein no induce efectos clínicos ni alteraciones en la respuesta inmune. La ausencia en cambios clínicos se evidencia en la falta de alteraciones visibles en la glándula mamaria y en cambios asociados en el perfil hematológico. Por su parte, los niveles de expresión génica de marcadores de activación linfocitaria en PBL indican que las MSC-TA no inducen una respuesta inmune. Estos resultados indican que la aplicación de una terapia intramamaria en vaquillas es segura y no induce rechazo inmunológico, sin embargo, su efectividad en el tratamiento de mastitis debe ser evaluada en estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

AHN, J.; HAMILTON, M.; DAVIS W.; PARK, Y. 2002. Cloning of bovine CD69. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 88:43–48.

ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; KHOURY, M. 2017. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Frontiers in Immunology*. 8 (339): 1-15.

ANDERSSON, B.E.; JONASSON, H.; DETWEILER, D.K.; REECE, W.O. 2007. Guía de referencia. **In:** Manual Merck de Veterinaria. 6ª ed. Océano. Barcelona, España. Pp. 2546-2547.

ANKRUM, J.; FAIL, J.; KARP, J. 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*. 32 (3):252-260.

ARDANAZ, N.; VÁZQUEZ, F. J.; ROMERO, A.; REMACHA, A.; BARRACHINA, L.; SANZ, A.; RANERA, B.; VITORIA, A. 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research*. 12 (65): 1.9.

AYALA, M.; GONZÁLEZ, B.; LÓPEZ, A; GUANÍ, E. 2012. The Major Histocompatibility Complex in Transplantation. *Journal of Transplantation*. 2012: 1-7.

BARRET, A.; REZVANI, K.; SOLOMON, S.; DICKINSON, A.; WANG, X.; STARK, G.; CULLUP, H.; JARVIS, M.; MIDDLETON, P.; CHAO. 2003. New Developments in Allotransplant Immunology. *American Society of Hematology*. 2003 (1): 350-371.

BIANCO, P.; GEHRON, P.; SIMMONS, P. 2009. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* 2(4): 313–319.

BRAVO, K. 2009. Estudio de Incidencia y Prevalencia de Mastitis y su Impacto Económico en Lecherías de la X Región. Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 61 p.

BRUNA, F.; CONTADOR, D.; CONGET, P.; ERRANZ, B.; SOSSA, C.; ARANGO-RODRÍGUEZ, M. 2016. Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells: Age-Related Changes. *Stem Cells International* 2016:1-15.

CAHUASCANO, B. 2017. Determinación del Potencial Antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* de Células Madre Mesenquimáticas Derivadas de Médula Ósea y Tejido Adiposo Fetal Bovino. Tesis para Optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 67 p.

CAMARGOS, M.; D. CRUZ, F.; NOGUEIRA, C.; DOURADO, L.; MEDEIROS, C.; VASCONCELOS, V.; MAIA, L. 2016. Intramuscular Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Equine Umbilical Cord. *International Journal of Stem Cells*. 9 (2): 239-249.

COGLE, C.; YACHNIS, A.; LAYWELL, E.; ZANDER, D.; WINGARD, J.; STEINDLER, D.; SCOTT, E. 2004. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363: 1432-1437.

DOMINICI, M.; LR BLANC, K.; MULLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4): 315-317.

DUEÑAS, F.; BECERRA, V.; CORTES, Y.; VIDAL, S.; SÁENZ, L.; PALOMINO, J.; DE LOS REYES, M.; PERALTA, OA. 2014. Hepatogenic and neurogenic differentiation

of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Veterinary Research*. 154:1746-6148.

GAO, F.; CHIU, S.M.; MOTAN, D.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; JI, H.L.; TSE, H.F.; FU, Q.L.; LIAN, Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Disease*. 7:1-11.

GEORGE, J.; SPINES, J.; LANES, M. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Veterinary Clinical Pathology*. 39 (2):138-148.

HUAMAN, O. 2017. Evaluación del potencial de proliferación, inmunomodulación e inmunogenicidad in vitro de células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino. Proyecto de tesis para optar al Título de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Departamento de Fomento de la Producción Animal. 70 p.

INGULLI, E. 2010. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric Nephrology*. 25:61–74.

ISHIKAWA, H.; JO, J.; TABATA, I. 2012. Liver Anti-Fibrosis Therapy with Mesenchymal Stem Cells Secreting Hepatocyte Growth Factor. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 18(23): 2259-2272

JONES, M.; ALLISON, R. 2007. Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*. 23:377-402.

KAYITSINGA, J.; SCHEWE, R.; CONTRERAS, G.; ERSKINE, R. 2017. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *Journal of Dairy Science*. 100: 1388-1407.

KIM, N.; CHO, S. 2013. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean Journal of Internal Medicine.* 28:387-402.

KOL, A.; WOOD, J.; HOLT, D.; GILLETE, J.; BOHANNON-WORSLEY, L.; PUCHALSKI, S.; WALKER, N.; CLARK, K.; WATSON, J.; BORJESSON, D. 2015. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Research & Therapy* 6:1-9.

KRAMPERA, M.; GALIPEAU, J.; SHI, Y.; TARTE, K.; SENSEBE, L. 2013. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy. (ISCT) working proposal. *Cytherapy* 15: 1054-1061.

LI, M.; SUN, X.; KUANG, X.; LIAO, Y.; LI, H.; LUO, D. 2014. Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E₂, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β . *Clinical and Experimental Immunology.* 178: 516–524

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation* 21:216–225.

MAVROPOULOU, A.; GUAZZETTI, S.; BORGHETTI, P.; DE ANGELIS, E.; QUINTAVALLA, C. 2016. Cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with mitral valve disease. *The Veterinary Journal.* 7 p.

METZNER, M.; SAUTER-LOUIS, C.; SEEMUELLER, A.; PETZL, W.; KLEE, W. 2014. Infrared thermography of the udder surface of dairy cattle: Characteristics, methods, and correlation with rectal temperature. *The Veterinary Journal.* 199 (2014): 57–62.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. 2007. Dairy 2007: Part I: Reference of Dairy Cattle Health and Management in the United States. Pp. 83-85.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2017. Gene. [en línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>>. [consulta: 22-11-2017].

PIGOTT, J.; ISHIHARA, A.; WELLMAN, M.; RUSSELL, D.; BERTONE, A. 2013. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 156:99– 106.

POL, L.; RUEGG, P. 2007. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. *Journal of Dairy Science* 90(1): 262–273.

QUIMBY, J.; WEBB, T.; HABENICHT, L.; DOW, S. 2013. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Research & Therapy* 4(48):1-12.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K.; OVERTON, M. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: Aneconomic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*. 122: 257–264.

RYAN, J.; BARRY, F.; MURPHY, M.; MAHON, B. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*. 2 (8):1-11.

SHIPKOVA, M.; WIELAND, E. 2011. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. 413: 1338-1349.

SMITH, E. 2010. Hematologic Disorders after Solid Organ Transplantation. *American Society of Hematology*. 2010 (1):281-286.

SUTTON, M.; FLEATHER, D.; GHOSH, S.; WEINBERG, A.; HEECKEREN, R.; KAUR, S.; SADEGHI, Z.; HIJAZ, A.; REESE, J.; LAZARUS, H.; LENNON, D.; CAPLAN, A.; BONFIELD, T. 2015. Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment. *Stem Cells International*. 2016: 1-12.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWANGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*. 33: 1402–1416.

WATERS, W.; RAHNER T.; PALMER, M.; CHENG, D.; NONNECKE, J.; WHIPPLE, L. 2003. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on Activated Bovine T Cells. *Infection and Immunity*. 71 (1): 317-326.

WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The Veterinary Journal*. 192:148–152

WENZ, J.; GARRY, F.; BARRINGTON, G. 2006. Comparison of disease severity scoring systems. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 229:259-262.

YOSHIZAWA, A.; ITO, A.; LI, Y.; KOSHIBAT.; SAKAGUSHI, S.; WOOD, K.; TANAKA, K. 2005. The Roles of CD25 CD4 Regulatory T Cells in Operational Tolerance After Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 37: 37–39.

ANEXOS



Anexo 1. Administración de MSC-TA vía canal del pezón en vaquillas Holstein clínicamente sanas. Se realizó una desinfección del pezón previo a la introducción de la cánula y posterior a la aplicación de las MSC y retiro de la cánula se realizaron masajes ascendentes en el pezón.



Anexo 2. Formación de nube de células mononucleares de sangre periférica. Se obtuvo a partir de muestras de 10mL de sangre de vaquillas Holstein en estudio. Para la formación de la nube se mezclaron sangre periférica con PBS en partes iguales y se agregaron sobre el mismo volumen de Histopaque. Posteriormente, la solución se centrifugó para lograr una separación en fases.