



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

**EFFECTO DE UNA SUSPENSIÓN INTRAMAMARIA DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSC) SOBRE LA EXPRESIÓN
DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN VAQUILLAS
HOLSTEIN**

Sofía Valentina Sepúlveda Orellana

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

PROFESOR GUÍA: OSCAR ALEJANDRO PERALTA TRONCOSO

Universidad de Chile

FONDEF IDeA ID15110129

SANTIAGO, CHILE

2019



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

**EFFECTO DE UNA SUSPENSIÓN INTRAMAMARIA DE CÉLULAS
TRONCALES MESENQUIMÁTICAS (MSC) SOBRE LA EXPRESIÓN
DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN VAQUILLAS
HOLSTEIN**

Sofía Valentina Sepúlveda Orellana

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

Nota Final:

Profesor Guía: Óscar Peralta Troncoso

Profesor Corrector: Mario Duchens Arancibia

Profesor Corrector: Alejandro Escobar Álvarez

SANTIAGO, CHILE

2019

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
Características y propiedades terapéuticas de las MSC	6
Propiedades inmunogénicas de las MSC y respuesta inmune en trasplantes	8
Potencial utilización de MSC para el tratamiento de mastitis bovina	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Evaluación clínica de los animales	12
Obtención de tejido adiposo fetal bovino	12
Cultivo, aislamiento e inoculación intramamaria de las MSC	13
Análisis de perfil bioquímico sanguíneo	14
Aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBL)	14
Análisis de PCR cuantitativo	15
Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre constantes fisiológicas en vaquillas Holstein	18
Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre niveles de variables de perfil bioquímico sanguíneo en vaquillas Holstein	20

Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en PBL de vaquillas Holstein	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para Q-PCR.....	16
Tabla 2. Constantes fisiológicas de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.	18
Tabla 3. Temperatura superficial de cuartos mamarios de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.	19
Tabla 4. Variables del perfil bioquímico sanguíneo de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles sanguíneos de proteínas plasmáticas totales, fibrinógeno y globulinas en vaquillas tratadas con dos dosis de MSC separadas por 10 días.....	20
Figura 2. Expresión relativa de mRNA de marcadores proinflamatorios en PBL de vaquillas tratadas con dos dosis de MSC separadas por 10 días	23
Figura 3. Inoculación de MSC en uno de los cuartos mamarios de vaquilla en estudio	32

RESUMEN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC, del inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells) son células estromales multipotentes que están presentes en todos los tejidos fetales y adultos. Cuentan con propiedades inmunomoduladoras, angiogénicas y antibacterianas que las hacen una potencial herramienta terapéutica para el tratamiento de diversas patologías. Su utilización para el tratamiento de enfermedades que afectan a equinos y caninos ha sido ampliamente reportada, sin embargo, existen escasos estudios sobre su potencial uso terapéutico en la especie bovina. Esto a pesar de que existen numerosas patologías que afectan la eficiencia productiva en esta especie las cuales podrían ser tratadas mediante el uso de MSC, como es el caso de la mastitis. El objetivo del presente estudio fue evaluar la seguridad de una potencial terapia de MSC para el tratamiento de la mastitis, mediante la determinación del efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal bovino, sobre variables fisiológicas incluyendo perfil bioquímico sanguíneo y la expresión de citoquinas proinflamatorias en linfocitos de sangre periférica (PBL) bovinos. Vaquillas Holstein (N=6) clínicamente sanas pertenecientes a una lechería comercial fueron seleccionadas e inoculadas los días 0 y 10 con una suspensión de $2,5 \times 10^7$ de MSC suspendidas en 3 mL de Ringer Lactato en dos cuartos mamarios seleccionados al azar. Los dos cuartos mamarios restantes fueron inoculados con 3 mL de Ringer Lactato como control. El efecto de la inoculación de MSC fue evaluado sobre constantes fisiológicas y variables clínicas de la ubre. Cada cinco días se colectaron muestras de sangre para análisis de perfil bioquímico, determinación de fibrinógeno y aislamiento de PBL. La expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas asociadas a rechazo inmune IL-2, IFN- γ , TNF- α , CCL-2, CCL-5 y CXCL3 fue cuantificada mediante PCR cuantitativo (Q-PCR) en PBL. No se evidenciaron cambios en constantes fisiológicas ni en las variables evaluadas en la glándula mamaria con la excepción de secreción láctea en una de las vaquillas. Los valores de termografía de los cuartos mamarios estuvieron bajo el intervalo referencial esperado y no hubo diferencia ($P > 0,05$) entre los cuartos inoculados con MSC y los inoculados con PBS. Los niveles sanguíneos de variables del perfil bioquímico y de la expresión de mRNA de citoquinas proinflamatorias no fueron distintos ($P > 0,05$) durante los días de estudio. Los análisis realizados indican que la administración

intramamaria de dos dosis de MSC en vaquillas Holstein no generó cambios en las variables analizadas. Adicionalmente, los resultados indican que una potencial terapia para la mastitis bovina utilizando MSC podría ser segura, sin embargo, es necesario evaluar su efectividad en vacas con mastitis.

Palabras clave: Células troncales mesenquimáticas, inmunoevasión, inmunomodulación, vaquillas, rechazo inmune.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent stromal cells that are present in all fetal and adult tissues. MSC possess immunomodulatory, angiogenic and antibacterial properties which make them a potential tool for the treatment of diverse pathologies. The use of MSC for the treatment of pathologies affecting equines and canine has been widely reported, however; few studies have described the therapeutic potential of MSC in the bovine specie. There are numerous pathologies that affect the productive efficiency of cattle, such as mastitis, which may be treated with MSC. The aim of the present study, was to evaluate the safety of a potential MSC therapy for the treatment of mastitis by determination of the effect of the intramammary administration of two doses of allogeneic MSCs derived from fetal bovine adipose tissue on physiological variables including clinical features, biochemical profile and the expression of proinflammatory cytokines in bovine peripheral blood lymphocytes (PBL). Clinically healthy Holstein heifers (N=6) from a commercial dairy farm were selected and inoculated on days 0 and 10 with a suspension of $2,5 \times 10^7$ MSC suspended in 3 mL of Ringer Lactate in two mammary quarters randomly selected. The remaining two mammary quarters were inoculated with 3 mL of Ringer Lactate as control. The effect of MSC was evaluated on physiological constants and clinical variables of the udder. Blood samples were collected every five days for analysis of biochemical profile, determination of fibrinogen and isolation of PBL. The expression of proinflammatory cytokines and chemokines associated with immune rejection IL-2, IFN- γ , TNF- γ , CCL-2, CCL-5 and CXCL3 was determined by quantitative PCR (Q-PCR) in PBL. There were no changes in physiological constants or in the udder with the exception of milk secretion in one of the heifers, the thermography values of quarters were below the expected referential interval and there was no difference ($P > 0.05$) between the quarters inoculated with MSC compared to

those inoculated with PBS. The levels of the biochemical profile and mRNA of proinflammatory cytokines were not different ($P>0.05$) during the study. The analyzes indicate that the intramammary administration of two doses of MSC in Holstein heifers did not generate changes in the variables analyzed. Data generated in the present study indicated that a potential therapy for bovine mastitis based on MSC is safe; however, the effectiveness of this therapy require further evaluation in cows with mastitis.

Keywords: Mesenchymal stem cells, immune evasion, immunomodulation, heifers, immune rejection.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales mesenquimáticas (MSC) son células multipotentes de morfología fibroblastoide, que tienen su origen en la capa germinal mesodérmica durante el desarrollo embrionario (Zomer *et al.*, 2015). Se caracterizan por su capacidad de auto-renovación o de división mitótica hacia células indiferenciadas y hacia células en estados más avanzados de diferenciación de linaje mesodérmico incluyendo osteocitos, condrocitos y adipocitos (Rohban y Pieber, 2017). Se ha reportado que las MSC cuentan con propiedades inmunomoduladoras, angiogénicas y antibacterianas (Xia *et al.*, 2016; Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017; Volarevic *et al.*, 2017). La propiedad inmunomoduladora, es mediada por moléculas como indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), interleuquina 6 (IL-6) e interleuquina 10 (IL-10), las cuales ejercen un rol supresor de la inmunidad innata y adaptativa (Volarevic *et al.*, 2017). Por su parte, el efecto angiogénico está mediado por la secreción de factores tróficos y de citoquinas quimioactivas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos beta ($FGF\beta$) y factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) (Xia *et al.*, 2016). El efecto antibacteriano es mediado por la acción de péptidos como defensina beta (BD), catelicidina, (CATHL) y hepcidina (HEP), los cuales mediante distintos mecanismos promueven la eliminación bacteriana (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). La capacidad terapéutica de las MSC también se basa en su bajo potencial de inmunogenicidad, el cual permite que estas células sean utilizadas como terapia alogénica (en individuos de la misma especie, pero antigénicamente distintos). Su baja inmunogenicidad induce una respuesta inmune tardía y de baja intensidad en el hospedero, la cual se origina en parte mediante el reconocimiento directo por los linfocitos T CD8 + o CD4 + del receptor de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II (Ryan *et al.*, 2005). Esto permite la activación de linfocitos T generando la liberación de diversas citoquinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL5 y CXCL3, las cuales median la infiltración intensa de macrófagos en el sitio de acción (Shipkova y Wieland, 2012). La baja inmunogenicidad exhibida por las MSC se debe principalmente a la baja expresión de MHC clase I y II (Zhang *et al.*, 2015). Además, las MSC retienen a las células dendríticas (DC) en un estado inmaduro y son capaces de suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias e incrementar la síntesis de factores antiinflamatorios (Fernández *et al.*, 2013).

En consecuencia, en el último tiempo se han generado muchas expectativas sobre el potencial uso terapéutico de las MSC para el tratamiento de patologías que afectan al humano y los animales. En cuanto al uso terapéutico de MSC en medicina veterinaria, se han reportado principalmente ensayos para el tratamiento de patologías que afectan a equinos y caninos (Smith, 2008; Spaas *et al.*, 2012). En el caso de la especie bovina, existen escasos reportes sobre la caracterización de MSC y la utilización de éstas con fines terapéuticos, a pesar de que el desarrollo de una terapia basada en MSC tiene un gran potencial para el tratamiento de una variedad de patologías que afectan al ganado bovino incluyendo la mastitis. La mastitis bovina se produce principalmente como consecuencia de la infección por agentes patógenos provocando inflamación, dolor y una baja en la producción y calidad de la leche (Duarte *et al.*, 2015). La mastitis genera las mayores pérdidas para la industria lechera mundial representando un 38% del costo total de todas las enfermedades que afectan al ganado bovino (Bradley, 2002; Duarte *et al.*, 2015). Actualmente, las alternativas terapéuticas se basan principalmente en terapias con antibióticos y su utilización se ha masificado debido a la gran incidencia de esta patología. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos tratamientos que permitan reducir o eliminar el uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis es de alto interés. En este sentido, el potencial desarrollo de una terapia basada en la utilización de MSC para el tratamiento de la mastitis puede generar un beneficio importante para la industria lechera. Sin embargo, inicialmente es fundamental evaluar la seguridad y especialmente el potencial rechazo inmune que una terapia de MSC alogénicas puede generar en el animal receptor. En consecuencia, el presente estudio propuso determinar el efecto de la administración vía intramamaria de dos dosis de MSC derivadas desde tejido adiposo fetal bovino, sobre la producción de las citoquinas proinflamatorias involucradas en el rechazo inmune: interleuquina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL-2), CCL-5 y CXCL3 en vaquillas Holstein.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características y propiedades terapéuticas de las MSC

Las MSC son células estromales multipotentes que están presentes en todos los tejidos y poseen capacidad de diferenciación hacia linajes celulares de origen principalmente mesodérmico (Samsonraj *et al.*, 2017). Las MSC pueden ser aisladas desde variados tejidos adultos o fetales que incluyen tejido adiposo, médula ósea, sangre del cordón umbilical, pulpa dental, placenta y músculo (Zomer *et al.*, 2015). Estas células fueron descritas por primera vez desde extractos de médula ósea como unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), con capacidad de proliferación y adherencia al plástico bajo condiciones *in vitro* (Lv *et al.*, 2014). Sin embargo, recientemente la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido criterios mínimos para la definición de cultivos de MSC humanas que incluyen: 1) capacidad de adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar; 2) expresión de marcadores mesenquimáticos CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II evaluado por citometría de flujo; y 3) capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipoblastos y condroblastos bajo condiciones *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado que las MSC son capaces de diferenciarse hacia tipos celulares no relacionados con su linaje original, proceso llamado transdiferenciación (DelaRosa *et al.*, 2012). El cultivo de las MSC bajo condiciones definidas con factores inductores específicos promueve su diferenciación hacia linajes celulares de las capas germinales embrionarias, como el ectodermo (neurogénico) y el endodérmico (hepatogénico) (Samsonraj *et al.*, 2017; Zomer *et al.*, 2015). No obstante, la diferenciación en tejidos no mesodérmicos sigue siendo controvertida debido a la falta de resultados *in vivo* (Samsonraj *et al.*, 2017; Zomer *et al.*, 2015).

Las MSC son consideradas herramientas con potencial uso en medicina regenerativa debido a su fácil aislamiento y a sus propiedades inmunomoduladoras, angiogénicas y antibacterianas (Zomer *et al.*, 2015). Las propiedades inmunomoduladoras ejercidas por las MSC se deben a que estas son capaces de modular la respuesta inmune innata y adaptativa por contacto directo o mediante efectos paracrinos de factores solubles comoIDO, IL-6, factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), prostaglandina E2 (PGE2) e IL-10 (Elman

et al., 2014; English, 2012). La modulación ejercida en el sistema inmune innato incluye el sistema del complemento, la señalización de los receptores Toll-like (TLR), los macrófagos, neutrófilos y las células dendríticas (English, 2012). Dentro de la respuesta inmune adaptativa, las MSC pueden inhibir directamente la función de los linfocitos T, desplazar el balance de linfocitos T helper (Th) e inducir la acción de linfocitos T reguladores (Tregs) (English, 2012).

La actividad antibacteriana de las MSC puede estar mediada a través de la modulación de moléculas pro y antiinflamatorias como interleuquina 17 (IL-17) e IDO generando una mayor actividad de fagocitos (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). Sin embargo, el principal potencial antibacteriano se basa en la secreción de péptidos antimicrobianos como BD, CATHL, HEP y LL-37 en humanos, los cuales perturban la integridad de la membrana bacteriana al inhibir la síntesis de proteínas y están implicadas en las vías que regulan la disponibilidad de hierro, elemento vital para el crecimiento bacteriano (Alcayaga-Miranda *et al.*, 2017). La actividad angiogénica de las MSC esta mediado por variados mecanismos, uno de ellos es la actividad paracrina en la cual se secretan factores tróficos como VEGF-A, FGF β y SDF-1 los cuales son vitales para para la integridad de las barreras y enlaces endoteliales (Xia *et al.*, 2016). Además, las MSC pueden funcionar como células perivasculares o pericitos que se acumulan alrededor de los vasos sanguíneos proporcionando soporte estructural constituyendo así un reservorio de células precursoras no diferenciadas para la regeneración de tejidos (Xia *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se ha demostrado que las MSC pueden ser guiadas hacia los tejidos lesionados, propiedad de migración conocida como homing (Baek *et al.*, 2011). Durante este proceso, están implicados varios factores de migración, uno de ellos es el SDF-1 (Fernández *et al.*, 2013). Estos factores son liberados desde el sitio de la lesión por diferentes fuentes celulares que incluyen células derivadas del tejido afectado (Fernández *et al.*, 2013). Cuando un tejido presenta una lesión tisular, esta se asocia con la activación de células inmunes e inflamatorias, no sólo con mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , radicales libres, quimioquinas y leucotrienos), macrófagos y neutrófilos, sino también con células inmunes adaptativas, que incluyen linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B, las cuales son reclutadas por factores de células dañadas (Ma *et al.*, 2014). Estas moléculas inflamatorias y células inmunes, junto con células endoteliales y fibroblastos, organizan cambios en el

microambiente que resultan en la movilización y diferenciación de MSC en el estroma y/o la sustitución de las células del tejido dañado (Ma *et al.*, 2014).

Propiedades inmunogénicas de las MSC y respuesta inmune en trasplantes

La respuesta inmune de un hospedero a un tratamiento alogénico se caracteriza por una reacción celular dependiente de linfocitos y una reacción humoral mediada por anticuerpos (Shipkova y Wieland, 2012). Hay dos mecanismos que median la respuesta al rechazo, uno de ellos es el reconocimiento directo por los linfocitos T CD8 + o CD4 + del receptor del MHC de clase I y clase II de las moléculas donantes; y un segundo mecanismo es mediado por el reconocimiento por parte de los linfocitos T de péptidos del tejido alogénico presentados por los MHC del receptor (Ryan *et al.*, 2005). Una vez activados los linfocitos T mediante el mecanismo directo e indirecto, se genera la liberación de diversas citoquinas como IL-2, IFN- γ , y TNF- α , y quimioquinas como CCL2, CCL5 y CXCL3, mediando la infiltración intensa de macrófagos en el aloinjerto (Shipkova y Wieland, 2012). De forma paralela a lo anterior, IL-2 e IFN- γ son liberadas por células endoteliales que rodean al aloinjerto, las cuales son cruciales para la proliferación de linfocitos T y la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias (Shipkova y Wieland, 2012). Además, las células Natural Killer (NK) también se activan en respuesta a ligandos expresados por el aloinjerto, liberando citoquinas proinflamatorias que mejoran la respuesta de células T adaptativas (Shipkova y Wieland, 2012).

Dado lo anterior, se ha reportado que las MSC presentan propiedades inmunosupresoras y una baja inmunogenicidad lo cual contribuye a reducir la respuesta inmune frente a trasplantes alogénicos, propiedad conocida como inmunoevasión (Zhang *et al.*, 2015). El equilibrio entre la capacidad inmunosupresora y el potencial inmunogénico es el que determinará la capacidad de inmunoevasión de las MSC (Ankrum *et al.*, 2014). Las MSC logran evadir la respuesta inmune mediante distintos mecanismos, los cuales se sustentan en que las MSC expresan un bajo nivel de moléculas MHC clase I y la ausencia de expresión de MHC clase II y de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 Y CD86 (Zhang *et al.*, 2015). Adicionalmente, las MSC inhiben la actividad de linfocitos T, linfocitos B, células NK, células dendríticas, a través de los contactos entre las células y los factores solubles (Zhang *et al.*, 2015). Es importante mencionar que el MHC presenta varias funciones biológicas,

como la presentación antigénica donde juega un rol importante en la inmunobiología del trasplante, la formación del repertorio de células T y la autoinmunidad (López-Martínez *et al.*, 2005). En forma alternativa se ha propuesto que las MSC previenen indirectamente la respuesta de células T a través de la modulación de células dendríticas y su acción directa es mediante la evasión del reconocimiento por parte de células NK y de la activación de linfocitos T (Ma *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad de las MSC para inhibir la actividad de las células inmunes está dada por el entorno inflamatorio (Ma *et al.*, 2014; English, 2012). Es por esto que la presencia de interferón (IFN), TNF- α o IL-1 β es necesario para la activación de las MSC, y también para la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión, incluyendo ligandos de CXCR3, CCR5, moléculas de adhesión intercelular-1 (ICA-1) y molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) (Ma *et al.*, 2014; English, 2012). Lo anterior debido a que las MSC no son inmunosupresoras de forma espontánea y necesitan ser activadas para modular la respuesta inmune (Ma *et al.*, 2014; English, 2012). Por sus propiedades inmunogénicas e inmunoevasivas, las MSC afectan inmediatamente la respuesta inmune innata y adaptativa mediante mecanismos ya antes mencionados (Volarevic *et al.*, 2017). Es por esto que al inhibir la maduración y alterar el perfil de secreción de células dendríticas, se genera una disminución en la producción de IFN- γ proinflamatorio e IL-12 y una mayor producción de IL-10 antiinflamatoria, que conduce a la activación atenuada de las células T (Volarevic *et al.*, 2017).

Potencial utilización de MSC para el tratamiento de mastitis bovina

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria causada por la invasión y destrucción de la ubre causada principalmente por microorganismos patógenos (Mushtaq *et al.*, 2017). En la mayoría de los casos, la infección ocurre cuando las bacterias ingresan a la ubre a través del conducto del pezón y se multiplican causando inflamación con o sin signos clínicos (Pellegrino *et al.*, 2018). La mastitis es una de las enfermedades más costosas y complejas de la industria lechera, representando el 38% de los costos directos totales de las enfermedades de producción común (Bradley, 2002). El método de tratamiento más común disponible contra la mastitis bovina es la administración intramamaria o parenteral de antibióticos (Pellegrino *et al.*, 2018). Sin embargo, la utilización inadecuada de antibióticos ha sido asociada al aumento de la resistencia bacteriana y la presencia de antimicrobianos en

la leche (Mushtaq *et al.*, 2017). Estos factores han determinado que en el último tiempo se planteen nuevos enfoques alternativos de tratamiento para la mastitis (Mushtaq *et al.*, 2017). Considerando las propiedades antibacterianas y regenerativas que presentan las MSC, el desarrollo de una terapia basada en MSC para el tratamiento de la mastitis podría ser de gran utilidad. Sin embargo, previamente a la evaluación de la efectividad de una terapia de MSC contra la mastitis, es fundamental evaluar el potencial rechazo inmune basado en una terapia con MSC provenientes de un donante alogénico. Dado lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC bovinas fetales sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en linfocitos de vaquillas Holstein.

HIPÓTESIS

Dado el potencial de inmunoevasión de las MSC, la inoculación de dos dosis de MSC derivadas de tejido adiposo fetal bovino por vía del canal del pezón separadas por diez días, no inducirá cambios en el perfil bioquímico sanguíneo, ni en la expresión de citoquinas proinflamatorias en PBL de vaquillas Holstein tratadas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal sobre el perfil bioquímico sanguíneo y la expresión de citoquinas proinflamatorias en PBL de vaquillas Holstein.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal, sobre variables del perfil bioquímico sanguíneo de vaquillas Holstein.
2. Determinar el efecto de la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal, sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-2, IFN- γ , TNF- α , CCL-2, CCL-5 y CXCL3 en PBL de vaquillas Holstein.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación clínica de los animales

Se seleccionaron seis vaquillas de raza Holstein clínicamente sanas de aproximadamente 15 meses de edad, con un peso promedio de 450 kilos, pertenecientes a un plantel lechero ubicado en la localidad de Panquehue en la Región de Valparaíso. Los animales fueron alimentados con una ración en base a ensilaje de maíz y heno de alfalfa y fueron manejados en un sistema lechero intensivo. Las vaquillas fueron evaluadas clínicamente en forma diaria por un total de 20 días experimentales. El examen clínico consideró la determinación de la frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), frecuencia ruminal (Fr), temperatura rectal (T°) y determinación de la coloración de la mucosa oral. Además, se realizó un examen clínico de la glándula mamaria según escala previamente publicada, la cual fue modificada y consideró las variables firmeza (ausente, firme o muy firme), aumento de volumen (ausente, 1,5 veces o 2 veces), presencia de dolor (ausente o presente) en la ubre y secreción (ausente o presente) (Wenz *et al.*, 2006). También, se cuantificó la temperatura superficial de cada uno de los cuartos mamarios utilizando un termógrafo (Fluke VT02, Washington, EUA) con el objetivo de evidenciar cambios en la temperatura que pudiera asociarse con inflamación.

Obtención de tejido adiposo fetal bovino

Las MSC fueron obtenidas desde el tejido adiposo de fetos bovinos de aproximadamente 8 a 9 meses de gestación (n=9), derivados de una planta faenadora local. Los ejemplares fueron transportados al laboratorio Laciv (Laboratorio Centralizado de Investigación en Ciencias Veterinarias) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Previo a la extracción de tejido adiposo, se colectaron muestras sanguíneas por vía intracardiaca para detección de diarrea viral bovina (DVB), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), leptospirosis bovina, y brucelosis bovina. Las muestras de sangre se centrifugaron a 400 ref por 10 minutos y el suero sanguíneo obtenido fue almacenado a -20°C. Posteriormente las muestras de suero fueron enviadas al laboratorio pecuario del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su análisis mediante prueba de ELISA. Para los ensayos de inoculación de MSC en vaquillas, se utilizaron MSC obtenidas desde fetos libres de estas

enfermedades. El tejido adiposo fue aislado desde el omento fetal mediante incisión en la línea media abdominal y depositado en tubos de 50 mL conteniendo salina fosfato tamponada (PBS) suplementado con 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se colectaron pooles de tejido adiposo desde tres fetos por grupo experimental, utilizando tres grupos y un total de 9 fetos.

Cultivo, aislamiento e inoculación intramamaria de las MSC

El tejido adiposo fue aislado desde el omento fetal mediante extracción quirúrgica utilizando bisturí y pinzas estériles, obteniéndose muestras de tejido entre 0,2 y 0,5 cm² de longitud. Luego el tejido extraído fue lavado con solución PBS, para posteriormente ser fragmentado e incubado en solución salina tamponada de Hank (HBSS) (Hyclone laboratories, Utah, EUA) suplementada con 0,5% de colagenasa (Gibco, New York, EUA), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, en agitación constante a 38°C por 45 min para digestión enzimática. Posteriormente, la reacción fue detenida agregando medio de cultivo, el cual constó de DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa (Corning, Manassas, EUA), suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y un 10% de suero fetal bovino (SFB). Luego, el tejido fue filtrado en filtros con poros de 40 µm y centrifugado dos veces a 400 x g por 5 minutos utilizando medio de lavado, el cual consistió en DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa, suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina y un 10% de SFB. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en medio de expansión en frascos de cultivo celular de 175 cm².

Los cultivos de MSC derivadas de tejido adiposo fueron incubados a 38,5°C en una incubadora bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado en su totalidad cada 72 horas. Al alcanzar un 80 a 90 % de confluencia, se realizaron pasajes de MSC mediante remoción con tripsina/EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Un total de 2,5 x 10⁷ MSC fueron contadas utilizando un hemocitómetro y suspendidas en 3 mL de Ringer Lactato en jeringas de 10 mL. Los días experimentales 0 y 10 se inocularon suspensiones de 2,5 x 10⁷ MSC suspendidas en 3 mL de Ringer Lactato por vía del canal del pezón en dos cuartos mamarios por vaca seleccionados

aleatoriamente (Figura 3). En los restantes dos cuartos se administraron 3 mL de Ringer Lactato como control.

Análisis de perfil bioquímico sanguíneo

Se obtuvieron muestras de sangre desde cada una de las vaquillas los días 0, 5, 10, 15 y 20 desde la vena coccígea utilizando tubos vacutainer sin anticoagulante para análisis del perfil bioquímico sanguíneo y con citrato para determinación de fibrinógeno. Las muestras de sangre fueron analizadas en un laboratorio comercial (Laboratorio de Química Clínica Especializada) para determinación del perfil bioquímico sanguíneo considerando las variables proteínas totales (g/dL), albúmina (g/dL), globulinas (g/dL), índice A/G, colesterol (mg/dL), calcio (mg/dL), fósforo (mg/dL), glucosa (mg/dL), NUS (nitrógeno ureico sanguíneo) (mg/dL), creatinina (mg/dL), CK (creatinin fosfoquinasa) (U/L), AST (transaminasa oxaloacética) (U/L), GGT (gamma glutamil transferasa) (U/L), FA (fosfatasa alcalina) (U/L) y bilirrubina total (mg/dL). Además, se determinó el fibrinógeno (mg/dL) en sangre.

Aislamiento de linfocitos de sangre periférica (PBL)

Se recolectaron muestras sanguíneas utilizando tubos vacutainer con heparina los días 0, 5, 10, 15 y 20 para aislación del PBL. La sangre obtenida a partir de los animales se mezcló con solución PBS (pH 7,4 Corning, Manassas, EUA) en partes iguales en tubos de 50 mL para posteriormente agregar el mismo volumen de Histopaque (Sigma-Aldrich, Reino Unido) a temperatura ambiente. Luego, la suspensión se centrifugó a $900 \times g$ por 35 minutos y se procedió a extraer la nube donde se encuentran el PBL que fueron trasladadas a un nuevo tubo de 50 mL conteniendo 10 a 20 mL de solución PBS. Posteriormente, la solución fue centrifugada a $1100 \times g$ por 8 minutos descartando el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 5 mL de solución. El volumen fue aumentado con solución PBS hasta completar 14 mL y fue centrifugado a $800 \times g$ por 6 minutos. El pellet de células fue posteriormente resuspendido en 1 mL de medio RPMI (RPMI 1640 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) suplementado con 10% de SFB (Gibco, New York, EUA), 250 ug/mL de anfotericina B (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), 100 UI/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomina (Corning, Manassas, EUA)). El pellet fue sembrado en placas Petri de 100

cm² e incubado a 38,5°C bajo una atmosfera de 5% de CO₂ durante 2 horas con el fin de poder separar a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del PBL no adherente al plástico. Luego de 2 horas se removió el PBL y se centrifugó a 800 *x g* por 6 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante del PBL y se fijó el pellet con 1000 µL de buffer de lisis (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) suplementado con 20 µL de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Germany). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Análisis de PCR cuantitativo

Se cuantificaron los niveles de mRNA de IL-2, IFN- γ , TNF- α , CCL-2, CCL-5 y CXCL3 en PBL bovino mediante análisis de PCR cuantitativo (Tabla 1). El RNA total fue extraído de las células, utilizando un kit RNAeasy (Qiagen, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado utilizando un kit Qubit RNA HS (Life Technologies., NY, EUA). Para la remoción de DNA genómico se utilizó un kit DNase I (Thermo Scientific., MA, EUA). Para la reacción de transcripción reversa (RT) esta se llevó a cabo con un kit Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Agilent Technologies, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de amplificación del cDNA se utilizó un kit Brilliant SYBR Green Q-PCR Master mix (Stratagene, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada tubo de reacción contuvo 5 µL de Master mix, 1 µL de partidor forward, 1 µL de partidor reverse, 1 µL de muestra de cDNA y 2 µL H₂O libre de nucleasas para un volumen total de 10 µL. El análisis de los ciclos y la temperatura consistió en 1 ciclo de aumento de la temperatura hasta 95°C a una velocidad de 20°C/s por 10 min para la activación de la polimerasa, luego 40 ciclos de: 95°C por 30 s para la denaturación del cDNA y luego bajando la temperatura a 60°C a una velocidad de 20°C/s por 1 min para la amplificación registrando la fluorescencia cada 0,1°C. Para asegurar que los amplicones sean generados a partir de mRNA y no de la amplificación de DNA genómico, se incluyeron controles sin transcriptasa reversa (NRT). Los datos de Q-PCR obtenidos se analizaron mediante el método quantity comparando el Ct, respecto del Ct de los genes endógenos GAPDH y β -ACTINA.

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para Q-PCR

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Amplificación (pb)
IL-2	GGGAACACAATGAAAGAAGTGAAG	GAGCTTGAGGTTCTCAGGATTT	87
IFN- γ	AACACAGGAGCTACCGATTTC	AAGCCACAGAGCAGTAAAG	96
TNF- α	GCCAACTCCCTCTGTTTATGT	GACACCTTGACCTCCTGAATAA	101
CCL-2	TCGCCTGCTGCTATACATTC	CACAGCCTCTTTAGGACACTT	98
CCL-5	CCTGCTGCTTTGCCTATATCT	GCGCTTCTTCCTGGTGATAA	116
CXCL-3	ACATAACCCAGTCCTGATTGTT	CACAGAGCCTGGCACTTTAT	102
β -ACTINA	CGCACCCTGGCATTGTCAT	TCCAAGGCGGACGTAGCAGAG	92
GAPDH	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	104

Análisis Estadístico

Los datos de temperatura cutánea de la ubre, perfil bioquímico sanguíneo y de los niveles de mRNA de IL-2, CCL2, CCL5, CXCL3, TNF- α , IFN- γ fueron analizados mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Posteriormente se realizó ANOVA de una vía para evaluar el efecto del tratamiento con MSC entre los días de estudio considerando como variable independiente los días de estudio y como variables dependientes variables del perfil bioquímico sanguíneo y niveles de mRNA de IL-2, CCL2, CCL5, CXCL3, TNF- α , IFN- γ . Las diferencias entre los promedios de las variables para cada día fueron determinadas por medio del post test de Duncan. Adicionalmente, los datos de temperatura cutánea de la ubre de los cuartos inoculados con MSC en comparación a los cuartos controles y entre los días evaluados fueron analizados con prueba de t de Student. Se utilizó un valor de significancia ($P < 0,05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Info Stat (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS

1. Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre constantes fisiológicas en vaquillas Holstein

El efecto de dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas administradas por vía intramamaria, separadas por diez días, fue inicialmente evaluado mediante determinación de las constantes fisiológicas en vaquillas Holstein (N=6). Se evaluó la FC, FR, Fr y T° rectal los días 0, 5, 10, 15 y 20 del ensayo. Los valores promedios de estas constantes se mantuvieron dentro de los intervalos referenciales, con la excepción de los valores de FR (días 5, 10 y 20) y Fr (días 15 y 20) (Tabla 2).

Tabla 2. Constantes fisiológicas de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.

Variables/Días	0	5	10	15	20	Int. Ref*
	MSC		MSC			
FC (latidos por minuto)	83,1 ± 2,4	83,8 ± 6,8	82,3 ± 7,1	71,7 ± 5,8	74 ± 2	48-84
FR (ciclos por minuto)	50,6 ± 6	57,6 ± 4,4	60,7 ± 8,8	44 ± 16	51,3 ± 5,5	26-50
Fr (movimiento en 2 minutos)	2,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2-3
T° (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

Valor promedio ± EE; Int. ref: Intervalo Referencial; *(Reece *et al.*, 2015)

Adicionalmente, se evaluó el efecto de dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC sobre variables clínicas de la glándula mamaria, según escala previamente descrita y modificada, que incluyen firmeza, aumento de volumen, presencia de dolor y presencia de secreción (Wenz *et al.*, 2006). No se encontraron cambios en estas variables con excepción de la presencia de secreción láctea detectada en una de las vaquillas posterior a la primera inoculación de MSC. También, se determinó la temperatura superficial de los cuartos tratados con MSC y no tratados utilizando termografía (Tabla 3). Los valores de termografía de los cuartos estuvieron por debajo del intervalo referencial esperado en animales sanos y los cuartos inoculados con MSC no fueron distintos ($P > 0,05$) comparado con los cuartos inoculados con PBS.

Tabla 3. Temperatura superficial de cuartos mamarios de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.

Cuartos/ Días	0 MSC	5	10 MSC	15	20	P	Int. ref *
MSC (C°)	$31,9 \pm 0,6$	$29,8 \pm 0,6$	$31,4 \pm 0,6$	$30,4 \pm 2,1$	$30,3 \pm 0,9$	0,35	34,1-37,7
Control (C°)	$31,1 \pm 0,7$	$30,9 \pm 0,5$	$31,8 \pm 0,6$	$29,6 \pm 2,1$	$30,8 \pm 0,8$	0,58	34,1-37,7
Prueba de T	0,93	0,89	0,95	0,9	0,91		

Valor promedio \pm EE; Int. Ref: Intervalo de referencia; *(Metzner *et al.*, 2014).

2. Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre niveles de variables de perfil bioquímico sanguíneo en vaquillas Holstein

La determinación del perfil bioquímico en muestras de sangre de las vaquillas tratadas con dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas, se realizó cada 5 días durante un periodo experimental de 20 días considerando el día 0 como control. Los niveles sanguíneos de PPT, fibrinógeno, y globulinas no fueron distintos ($P > 0,05$) al ser comparados entre los días de estudio (Figura 1). En forma similar, los niveles de albúmina, índice A/G, colesterol, calcio, fósforo, glucosa, NUS, creatinina, CK, AST, GGT, FA, bilirrubina total no fueron distintos ($P > 0,05$) al ser comparados entre los días de estudio (Tabla 4). Los niveles sanguíneos de todas las variables analizadas estuvieron dentro del intervalo referencial esperado para la especie, con la excepción de CK y FA las cuales se encontraron sobre lo esperado.

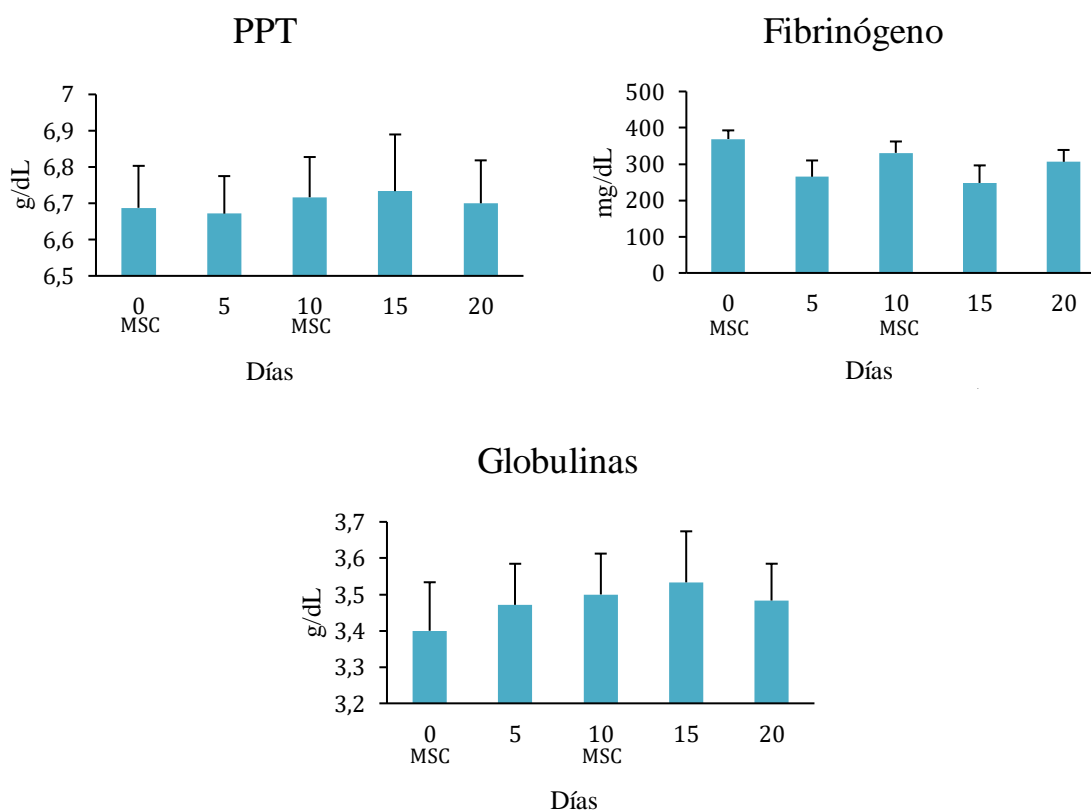


Figura 1. Niveles sanguíneos de proteínas plasmáticas totales, fibrinógeno y globulinas en vaquillas tratadas con dos dosis de MSC separadas por 10 días. Los niveles sanguíneos de proteínas plasmáticas totales, fibrinógeno y globulinas no mostraron diferencias

significativas ($P>0,05$) durante los 20 días experimentales (MSC indica día de inoculación de MSC).

Tabla 4. Variables del perfil bioquímico sanguíneo de vaquillas Holstein inoculadas por vía intramamaria con dos dosis de MSC separadas por 10 días.

Variables/ Días	0 MSC	5	10 MSC	15	20	P	Int. ref.*
Albúmina (g/dL)	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0	3,2 ± 0,1	0,79	2,9-4,9
Índice A/G	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0	0,9 ± 0	0,9 ± 0	0,9 ± 0	0,65	0,86-1,2
Colesterol (mg/dL)	95,4 ± 14,9	119,3 ± 7,4	107,7 ± 5,2	107,7 ± 6,9	110,5 ± 6,4	0,63	62-193
Calcio (mg/dL)	8,6 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,8 ± 0,2	0,72	8,4-11
Fósforo (mg/dL)	6,1 ± 0,2	6,8 ± 0,2	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,5	6,8 ± 0,6	0,49	4,3-7,8
Glucosa (mg/dL)	80,0 ± 2,7	75,0 ± 2,7	76,7 ± 13,9	76,7 ± 2,9	80,5 ± 1,3	0,06	42-82
NUS (mg/dL)	13,7 ± 1,2	13,4 ± 1	12,1 ± 1,9	12,1 ± 0,6	17,1 ± 7,4	0,52	7,8-25
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0	0,8 ± 0	0,34	0,6-1,8
CK total (U/L)	247,5 ± 26	220,9 ± 27,5	272 ± 51,6	273,7 ± 47,4	276,2 ± 52,3	0,65	14-107

AST (U/L)	72,8 ± 4,6	68,3 ± 3,7	72,0 ± 5,4	69,7 ± 7,4	64,2 ± 2,3	0,73	45-110
GGT (U/L)	21,9 ± 2,2	22,3 ± 1,5	21,9 ± 1,4	19,5 ± 3,3	22,7 ± 1,2	0,97	4,9-26
FA (U/L)	362 ± 49,2	375 ± 41,9	364,5 ± 38,6	347 ± 23,2	324 ± 30,5	0,85	18-153
Bilirrubina total (mg/dL)	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,06	0-0,8

Valor promedio ± EE; Int. ref: Intervalo referencial; * (Reece *et al.*, 2015)

3. Determinación del efecto de dos dosis intramamarias de MSC alogénicas sobre niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias en PBL de vaquillas Holstein

La determinación del efecto de la administración intramamaria de MSC sobre la expresión génica de citoquina proinflamatorias IL-2, CCL2, CCL5, CXCL3, TNF- α , IFN- γ en PBL de vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas, se realizó cada 5 días durante un periodo experimental de 20 días, considerando el día 0 como control. La expresión relativa de las citoquinas proinflamatorias no fue distinta ($P > 0,05$) al ser comparada entre los días de estudio (Figura 2).

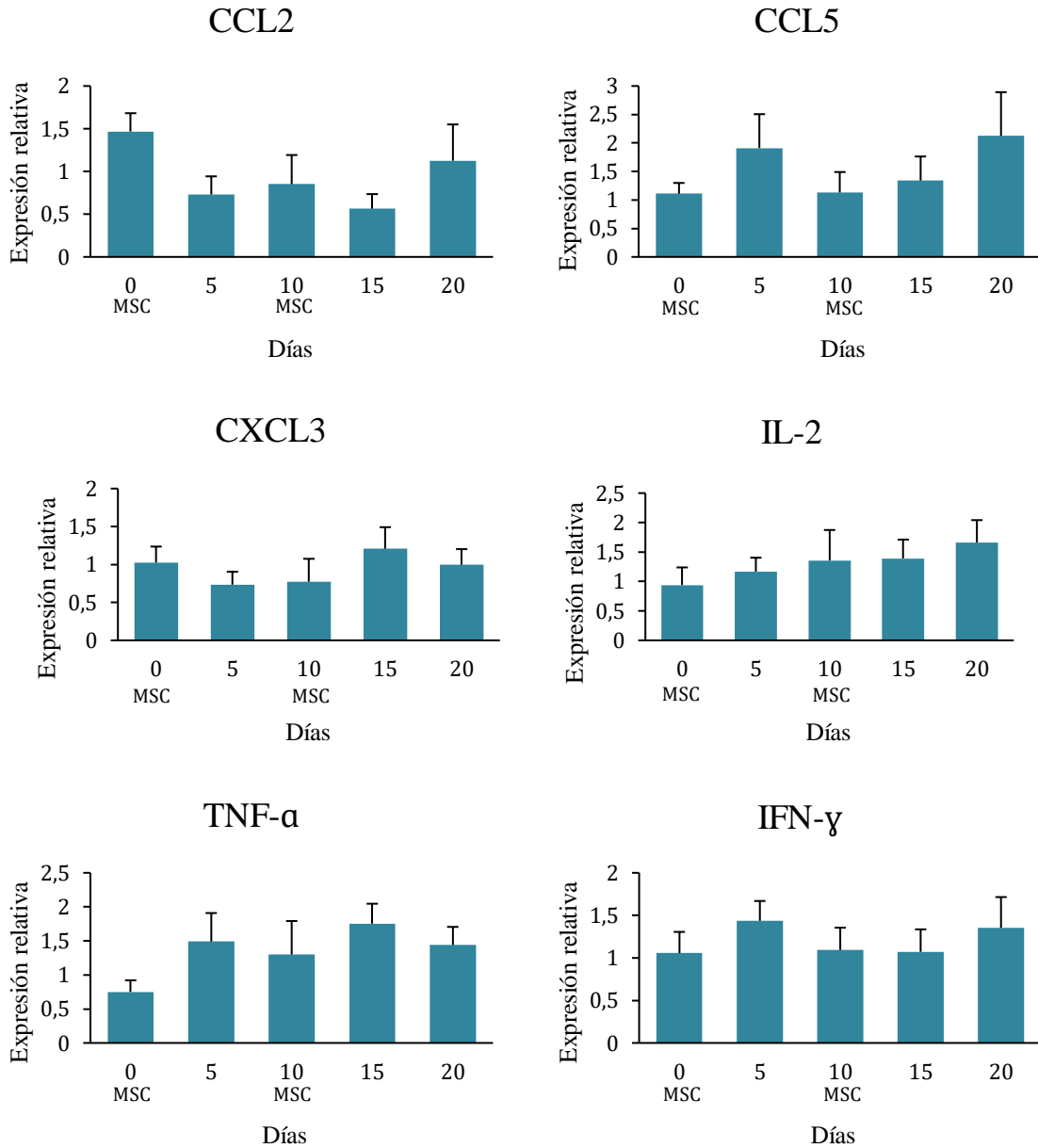


Figura 2. Expresión relativa de mRNA de marcadores proinflamatorios en PBL de vaquillas tratadas con dos dosis de MSC separadas por 10 días. Los niveles de mRNA de CCL2, CCL5, CXCL3, IL-2, TNF- α e IFN- γ no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) durante los 20 días experimentales (MSC indica día de inoculación de MSC).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó un ensayo de seguridad con el objetivo de determinar el efecto de la administración intramamaria de MSC alogénicas sobre variables del perfil bioquímico sanguíneo y sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-2, CCL2, CCL5, CXCL3, TNF- α , IFN- γ en vaquillas Holstein tratadas con dos dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas. La utilización de MSC como potencial terapia alternativa para diversas patologías se ha tornado de gran interés en la actualidad. El ganado bovino lechero se ve afectado por diversas enfermedades, como es el caso de la mastitis, la cual causa gran impacto económico en la industria lechera. El tratamiento más utilizado en la actualidad contra la mastitis bovina es la administración intramamaria o parenteral de antibióticos (Pellegrino *et al.*, 2018), sin embargo, dada la creciente presión mundial por reducir el uso de antimicrobianos en sistemas de producción animal, la generación de nuevos tratamientos para la mastitis se vuelve interesante de evaluar. Debido a las propiedades regenerativas, especialmente las capacidades inmunomoduladoras y antibacterianas, las MSC pueden convertirse en una base potencial para el desarrollo de un tratamiento que reemplace o complemente el uso de antibióticos en casos de mastitis.

En el presente estudio, las vaquillas inoculadas con MSC presentaron valores promedios para la mayoría de las constantes fisiológicas dentro de los intervalos referenciales esperados para la especie. Sin embargo, los valores de frecuencia respiratoria (días 5, 10 y 20) y frecuencia ruminal (días 15 y 20) estuvieron por sobre el intervalo referencial. Es probable que el aumento de ambas variables sea consecuencia del traslado de los animales al momento de realizar el examen clínico (Van Engen y Coetzee, 2018). El efecto de la administración intramamaria de las MSC fue evaluado en la glándula mamaria mediante escala modificada, basada en un estudio previo para vacas en lactancia (Wenz *et al.*, 2006). Esta escala sirvió de referencia para realizar una inspección sistemática de cada cuarto mamario y evidenciar cambios que pudieran ser sugerentes de un proceso inflamatorio. Posterior a la primera inoculación con MSC, se observó la presencia de secreción láctea en uno de los cuartos tratados de una de las vaquillas en estudio, sin embargo, esta secreción no fue detectada en las otras vaquillas por lo que no se puede asociar como consecuencia de la administración de las MSC.

Los valores promedio de temperatura superficial detectada por termografía no fueron distintos entre los cuartos inoculados y los controles ni entre los días analizados. A pesar de esto, los valores de temperatura superficial promedio se encontraron por debajo del rango reportado previamente, el cual varía entre 34,1°C y 37,7°C en animales sanos (Metzner *et al.*, 2014; Zaninelli *et al.*, 2018). Esta diferencia se puede atribuir a una subestimación de la temperatura debido a factores de interferencia del sistema infrarrojo como son la temperatura ambiental, la presencia de suciedad en la glándula o una mayor distancia del objetivo (Metzner *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que la técnica de termografía sea altamente dependiente del proceso de estandarización previo, bajo las condiciones ambientales y productivas locales. A pesar de que la sensibilidad y especificidad de la técnica pueden haber sido bajas para permitir el diagnóstico de procesos inflamatorios de baja intensidad de la glándula mamaria como el que puede producirse por la administración de MSC de origen alogénico, los datos entregados por la termografía permiten concluir que no existió un proceso inflamatorio detectable por este método en la glándula mamaria.

En el presente estudio, se determinó que los niveles de fibrinógeno, PPT y globulinas se registraron dentro del intervalo referencial según ha sido previamente reportado (Reece *et al.*, 2015). Se ha descrito que el incremento de fibrinógeno puede ser indicador de inflamación local o sistémica, ya que cuenta con la capacidad de unirse al receptor de integrina CD11b lo que resulta en una producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Davalos y Akassoglou, 2012). De la misma manera, el aumento de PPT y globulinas también se asocia a inflamación, ya que bajo esta condición aumenta la síntesis hepática inducida por la liberación de IL-6 (Davalos y Akassoglou, 2012). Sin embargo, los valores de estas variables se mantuvieron dentro de sus intervalos referenciales esperados para la especie, sugiriendo que las MSC no causaron un efecto en las vaquillas que estuviera asociado a un proceso inflamatorio. Adicionalmente, los niveles de albúmina, índice A/G, colesterol, calcio, fósforo, glucosa, NUS, creatinina, AST, GGT, y bilirrubina total tampoco se encontraron fuera del intervalo referencial esperado para esta especie, con la excepción de CK total y FA. Los valores de CK y FA se mantuvieron elevados desde el Día 0 y durante todo el estudio, lo que indica que el incremento registrado no tiene relación con la inoculación de MSC. Se ha descrito que los valores de ambas enzimas pueden verse incrementados por

factores fisiológicos como la edad ya que aumentan sus niveles por el aumento de la actividad osteoblástica ósea en el individuo (Haarhaus *et al.*, 2017; Baltusnikas *et al.*, 2015).

Los niveles de mRNA de las citoquinas proinflamatorias IL-2, CCL2, CCL5, CXCL3, TNF- α , IFN- γ no fueron distintos durante los días de estudio, indicando que no hubo activación de un proceso inflamatorio detectable mediante la cuantificación de la expresión de estas citoquinas. La ausencia de una respuesta inmune podría asociarse con las capacidades de inmunoevasión e inmunomodulación asociadas a las MSC (DelaRosa *et al.*, 2012). Estas propiedades permitirían que las MSC no sean reconocidas como un agente extraño ya que logran retener a las DC en estados inmaduros al expresar bajos niveles de MHC clase I, y no expresar MHC clase II (Zhang *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que las MSC inducen la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en macrófagos e inhiben a las células NK mediante factores solubles como el TGF β 1 y la PGE2, y suprimen la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-2 e IFN- γ (Ma *et al.*, 2014). En un estudio realizado en equinos se evaluó el efecto de tres dosis de $2,5 \times 10^7$ MSC alogénicas vía intravenosa inoculadas cada siete días y se determinó que no hubo cambios significativos en las concentraciones séricas de IL-6, IFN- γ , IL-17, TGF- β o TNF- α , lo que indica que no existió una respuesta inflamatoria sistémica asociada a la administración de MSC (Kol *et al.*, 2015). Lo anterior se asemeja a los resultados obtenidos en el presente estudio, sin embargo, en otros estudios se ha reportado que las MSC alogénicas presentan una baja inmunogenicidad y por lo tanto no son totalmente inmunoevasivas *in vivo*, ya que pueden inducir un rechazo inmune de baja intensidad (Ankrum *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). A pesar de esto, la capacidad de inmunogenicidad de las MSC es reducida por lo tanto les permitiría sobrevivir y funcionar por un breve periodo hasta ser detectadas y destruidas (Ankrum *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Un estudio realizado en ratones en donde fueron administradas MSC intramuscularmente para evaluar su sobrevivencia se evidenció que fueron detectables hasta 21 días posterior a la inoculación (Beegle *et al.*, 2015). Por lo tanto, los factores de rechazo inmune y sobrevivencia no deberían ser limitantes de la potencial vida útil y actividad terapéutica de las MSC en el tejido mamario.

Adicionalmente, la concentración de las MSC inoculadas puede afectar su capacidad de activar respuesta inmune, así como su efecto terapéutico. En un estudio realizado en humanos, en donde se comparó una dosis baja (1×10^7 células) y una dosis alta (10×10^7

células) como tratamiento de osteoartritis en rodillas, se determinó que ambas dosis lograron generar beneficio, aunque la dosis alta fue capaz de generar una mejoría a más largo plazo (doce meses) (Lamo-Espinosa *et al.*, 2016). Además, en un estudio realizado en equinos en donde se utilizaron $2,5 \times 10^7$ MSC inoculadas en articulaciones sanas se reportó que las MSC originaron un proceso inflamatorio transitorio el cual se resolvió diez días después sin necesidad de administración de fármacos antiinflamatorios (Ardanaz *et al.*, 2016). Por lo tanto, la utilización de una concentración de $2,5 \times 10^7$ MSC debería ser suficiente para poder generar una respuesta inflamatoria en los cuartos inoculados. Además, la inoculación de MSC se realizó de manera intramamaria, lo cual permitiría que lleguen directamente al tejido objetivo y que se genere una baja pérdida de MSC en comparación con inoculaciones intravenosas en las cuales pueden quedar retenidas en pequeños capilares pulmonares (Zhang *et al.*, 2015). La adherencia de las MSC a estos capilares se produce debido a su tamaño y a la expresión de moléculas de adhesión celular durante la migración, resultando en un tratamiento menos eficaz.

CONCLUSIÓN

Los análisis realizados indican que la administración intramamaria de dos dosis de MSC alogénicas derivadas de tejido adiposo fetal en vaquillas Holstein no generaron cambios en constantes clínicas sistémicas y de la glándula mamaria, así como de variables del perfil bioquímico y niveles de expresión génica de marcadores de citoquinas proinflamatorias en PBL. Es posible que la ausencia de respuesta inmune en el hospedero se deba a las propiedades inmunoevasivas e inmunomoduladoras de las MSC. Los resultados indican que una potencial terapia para la mastitis bovina utilizando MSC podría ser segura, sin embargo, es necesario evaluar su efectividad en vacas con mastitis.

BIBLIOGRAFÍA

ALCAYAGA-MIRANDA, F.; CUENCA, J.; KHOURY, M. 2017. Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: Current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Front Immunol.* 8: 1-15.

ANKRUM, J.; ONG, J.; KARP, J. 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 32:252-260.

ARDANAZ, N.; VÁSQUEZ, F.; ROMERO, A.; REMACHA, A.; BARRACHINA, L.; SANZ, A.; RANERA, B.; VITORIA, A. ALBAREDAS, J.; PRADES, M.; ZARAGOZA, P.; MARTÍN-BURRIEL, I.; RODELLAR, C. 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 Vet Res.* 12:1-9.

BAEK, S.; KANG, S.; RA, J. 2011. *In vitro* migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med.* 43: 596-603.

BALTUSNIKAS, J.; VENCKUNAS, T.; KILIKEVICIUS, A.; FOKIN, A.; RATKEVICIUS, A. 2015. Efflux of creatine kinase from isolated soleus muscle depends on age, sex and type of exercise in mice. *J Sports Sci Med.* 14:379-385.

BEEGLE, J.; LAKATOS, K.; KALOMOIRIS, S.; STEWART, H.; ISSEROFF, R.; NOLTA, J.; FIERRO, F. 2015. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cell.* 33:1818-1828.

BRADLEY, A. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet J.* 164:16-128.

DAVALOS, D.; AKASSOGLU, K. 2012. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol.* 34:43–62.

DELAROSA, O.; DALEMANS, W.; LOMBARD, E. 2012. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol.* 23:978-983.

DOMINICI, M.; LE BLANC, M.; MUELLER, 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* 8:315-317.

DUARTE, C.; FREITAS, P.; BEXIGA, R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J Vet Diagn Investig.* 27:665-672.

ELMAN, J.; LI, M.; WANG, F.; GIMBLE, J.; PAREKKADAN, B. 2014. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *Int J Inflamm.* 11:1-8.

ENGLISH, K. 2012. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol.* 2013:19–26.

FERNÁNDEZ, V.; ROMANIUK, M.; CHOI, H.; LABOVSKY, V.; OTAEGUI, J.; CHASSEING, N. 2013. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation.* 85:1-10.

HAARHAUS, M.; BRANDENBURG, V.; KALANTAR-ZADEH, K.; STENVINKELL, P.; MAGNUSSON, P. 2017. Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat Rev Nephrol.* 13:429-442.

KOL, A.; WOOD, J.; HOLT, D.; GILLETTE, 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 Res. Ther.* 6:1-9.

LAMO-ESPINOSA, J.; MORA, G.; BLANCO, J.; GRANERO, F.; NUNEZ, J.; SANCHEZ, C.; BONDÍAS, J.; AQUERRETAS, J.; ANDREU, E.; ORNILLAS, E.; VILLARÓN, E.; VALENTI, A.; SANCHEZ, F.; DEL CAÑIZOS, M.; VALENTI, J.; PRÓSPER, F. 2016. Intra-articular injection of two different doses of autologous bone marrow mesenchymal stem cells versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: multicenter randomized controlled clinical trial (phase I/II). *J Transl Med.* 14:1-9.

- LÓPEZ-MARTÍNEZ, A.; CHÁVEZ-MUÑOZ, C.; GRANADOS, J.** 2005. Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. *Rev Invest Clin.* 57:132-141.
- LV, F.; TUAN, R.; CHEUNG, K.; LEUNG, V.** 2014. The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32: 1408–1419.
- MA, S.; XIE, N.; LIL, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y.** 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014:216–225.
- 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. *Vet J.* 199:57–62.
- MUSHTAQ, S.; SHAH, A.; SHAH, A.; LONE, S.; HUSSAIN, A.; HASSAN, Q.; ALI, M.** 2017. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microb Pathog.* 114:357-361.
- PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; NATANAEL, B.; GOBELLI, D.; NADER-MACIAS, M.; BOGNI, C.** 2018. In Vitro characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 10: 1-11.
- REECE, W.; ERICKSON, H.; GOFF, J.; UEMURA, E.** 2015. *Duke's Physiology of Domestic Animals.* 13th ed. Wiley. Danvers, USA. 747 p.
- ROHBAN, R.; PIEBER, T.** 2017. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int.* 2017:1-16.
- RYAN, J.; BARRY, F.; MURPHY, M.; MAHON, B.** 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm.* 2: 1-11.
- SAMSONRAJ, R.; RAGHUNATH, M.; NURCOMBE, V.; HUI, J.; VAN WIJNEN, A.; COOL, S.** 2017. Concise Review: Multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017:1-13.
- SHIPKOVA, M.; WIELAND, E.** 2012. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta.* 412:1338-1349.

SMITH, R. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil.* 30:1752–1758.

SPAAS, J.; OOSTERLINCK, M.; BROECKX, S.; DUMOULIN, M.; SAUNDER, J.; VAN SOOM, A.; PILLE, F.; VAN DE WALLE, G. 2012. Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells. *Vlaams Diergen Tijds.* 81:11-15.

VAN ENGEN, N.; COETZEE, J. 2018. Effects of transportation on cattle health and production: a review. *Anim Health Res Rev.* 21:1-13.

VOLAREVIC, V.; GAZDIC, M.; MARKOVIC, B.; JOVICIC, N.; DJONOV, V.; ARSENIJEVIC, N. 2017. Mesenchymal stem cell-derived factors: Immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *IUBMB.* 43: 633–644.

WENZ, J.; GARRY, F.; BARRINGTON, G. 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *J Am Vet Med Assoc.* 229:259-262.

XIA, X.; TAO, Q.; MA, Q.; CHEN, H.; WANG, J.; YU, H. 2016. Growth hormone-releasing hormone and its analogues: Significance for MSCs-mediated angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2016:1-16.

ZANINELLI, M.; REDAELLI, V.; LUZI, F.; BRONCIO, V.; MITCHELL, M.; DELL'ORTO, V.; BONTEMPO, V.; CATTANEO, D.; SAVOINI, G. 2018. First evaluation of infrared thermography as a tool for the monitoring of udder health status in farms of dairy cows. *MDPI.* 18:1-12.

ZHANG, J.; HUANG, X.; WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, T.; WANG, Y.; HU, D. 2015. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther.* 6:1-7.

ZOMER, H.; VIDANE, A.; GONCALVES N.; AMBROSIO, C. 2015. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning.* 8:125–134.

ANEXOS



Figura 3. Inoculación de MSC en uno de los cuartos mamarios de vaquilla en estudio