

EPIDIDIMITIS OVINA POR *Brucella ovis*: LESIONES GENITALES Y RESPUESTA INMUNE ANTIESPERMÁTICA.

Fernando Paolicchi *

INTRODUCCIÓN

La Epididimitis Ovina infecciosa es una enfermedad crónica, de transmisión venérea y distribución mundial en la cual la principal lesión es la epididimitis. Los agentes causantes del desarrollo de lesiones del epidídimo principalmente, pero también de testículos y glándulas accesorias del aparato genital son numerosos, aunque dos son las bacterias aisladas con mayor frecuencia, *Brucella ovis* y el grupo de Gram negativos pleomórficos *Histophilus-Haemophilus*². Desde 1952 en Nueva Zelandia y a partir de 1961 o durante la última década en Argentina^{7,11,13,19}, *B.ovis* ha sido identificada como la etiología responsable de infecciones genitales en carneros y problemas de infertilidad con pérdida de corderos, a pesar de que se han diagnosticado infecciones cruzadas con otras especies de *Brucella* en ovinos aisladas del semen de los carneros con epididimitis¹⁵. En este trabajo se revisan algunos aspectos inmunopatogénicos de la epididimitis y el desarrollo de una respuesta autoinmune en el tracto genital, asociada a la infección con *B.ovis* en carneros.

* M.V., MSc. Docente Investigador del Grupo de Sanidad Animal del Departamento de Producción

Animal de la Unidad Integrada Balcarce FCA UNMdP - EEA INTA, CC 276, (7620) Balcarce, Argentina.

Trabajo presentado en la 1ra. RAPAVE, Esperanza, Santa Fé.

ASPECTOS INMUNOPATOLÓGICOS

a- PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

La infección con *B.ovis* se produce a través de las membranas mucosas y a pesar de que no se ha definido claramente la vía de infección natural, ésta ha sido lograda por inoculación experimental conjuntival o prepucial con de inóculos de concentración definida ($3,5 \times 10^{10}$ UFC/ml)¹⁰ y por otras vías como la intratesticular o endovenosa, con semen infectado con *B.ovis*. Una vez ingresada al animal, *B.ovis* coloniza los linfonódulos regionales donde se multiplica activamente, durante 60 a 70 días circula en sangre produciendo bacteriemia, se ubica en órganos como hígado, riñón, bazo y finalmente en los genitales en forma crónica alrededor de los 30 días postinfección (dpi)¹. La infección vía conjuntival o prepucial produce los cambios patológicos macroscópicos más importantes, detectables en la porción caudal del epidídimo, pudiendo extenderse a otras regiones de éste órgano. Alteraciones en testículos y glándulas anexas se observan ocasionalmente, ya que generalmente son detectados ciertos cambios macroscópicos como mineralización y fibrosis¹¹. Frecuentemente, carneros infectados y que excretan *B.ovis* en el semen con alto contenido de células inflamatorias y títulos serológicos positivos por ELISA, no desarrollan lesiones detectables clínicamente por un período prolongado pos infección¹³.

No se conoce bien la razón por la cual la bacteria coloniza preferentemente el tejido epididimario, pero se ha asignado importancia a la presencia de eritritol, a la anatomía de los vasos sanguíneos y a una marcada adhesividad a la superficie celular de los epitelios que poseen las *Brucellas rugosas*³. Sin embargo, *B.ovis* también invade las ampollas de los conductos deferentes y las vesículas seminales, pudiendo extenderse a los testículos, glándulas bulbouretrales o próstata produciendo un cuadro histopatológico característico de estas infecciones genitales. A pesar de las lesiones

histológicas halladas en glándulas bulbouretrales y próstata, no ha sido exitoso el aislamiento de *B.ovis* en las mismas, durante el curso de infecciones experimentales de carneros excretores de la bacteria en semen. Este efecto podría ser atribuible a la presencia de numerosas células contenedoras de inmunoglobulinas tanto en glándulas bulbouretrales y en próstata (IgA) o en prepucio y uretra (IgG), lo que determinaría un efectivo mecanismo para evitar la colonización de bacterias patógenas que habitan el tracto reproductivo de los carneros⁴.

Los microorganismos que provocan infecciones venéreas, como *B.ovis*, se encuentran relativamente protegidos dentro del tracto genital ya que la internalización por fagocitosis dentro del retículo endoplásmico rugoso de células inflamatorias, ofrece la seguridad de que no serán destruidas dentro de los fagolisosomas, aunque de esa manera no se encuentren en fase replicativa. Ésta podría ser la razón por la que en ciertos casos se aísla *B.ovis* de carneros infectados a partir de tejidos libres de lesiones histológicas.

b- LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

La liberación de bacterias desde células fagocíticas y en contacto con los tejidos, provoca una fuerte respuesta serológica y celular, con el desarrollo de lesiones severas que conducen a la formación de granulomas espermáticos. Los eventos se inician con exudación serofibrinosa, acúmulo de linfocitos en áreas perivasculares y de células plasmáticas con desarrollo de hiperplasia del endotelio capilar. Posteriormente aparecen neutrófilos, especialmente en áreas donde se está produciendo espermostasia. El conducto epididimario presenta células desorganizadas, edema y vacuolización epitelial y comienzan a observarse linfocitos intraepiteliales. Algunas regiones del epitelio se degeneran y adquieren características hiperplásicas o de metaplasia escamosa para

finalmente culminar con la formación de áreas mayores papilomatosas o hiperplásicas que determinan los característicos “quistes intraepiteliales” que contienen neutrófilos y bacterias en su interior. En el intersticio se observa una progresiva fibrosis que complementa la distorsión tubular y por último, la ruptura del túbulo epididimario pone en contacto a los espermatozoides con células inflamatorias presentes en el intersticio desencadenando una respuesta antiespermática con un granuloma de sensibilización^{8,10,11} (Foto 1).

c- RESPUESTA ANTIESPERMÁTICA

Los espermatozoides son considerados antígenos propios, secuestrados y aislados del sistema inmunológico, a través de la barrera hematotesticular, tempranamente durante el desarrollo de la respuesta inmune. En contacto con células del sistema inmunológico maduro, pueden desencadenar fenómenos de autosensibilización espermática. También, los lipolisacáridos (LPS) de la pared de las *Brucellas* son capaces de inducir respuestas muy potentes que producen incrementos de IgG e IgM, estimulación del complemento y actividad adyuvante entre otras, siendo los antígenos inmunodominantes en *B.ovis* LPS (8-12kD) y OMP (29kD), entre otros. Esto tiene gran importancia en la regulación del tipo de respuesta inmune que genera tanto celular como humoral, ya que un granuloma de sensibilización como el observado en procesos infecciosos tales como epididimorquitis granulomatosa, es fundamental para el desencadenamiento de fenómenos de autosensibilización⁹.

En un reciente trabajo experimental, se inocularon vía intraconjuntival e intraprepucial dos grupos de carneros para estudiar la respuesta inmune específica y determinar la correlación entre ésta y la respuesta autoinmune antiespermática. En el 100% de los animales se detectó una alta respuesta serológica a *B.ovis* por fijación de

complemento, lesiones genitales macroscópicas e histológicas en un 70% de los animales y excreción intermitente de la bacteria con leucocitospermia y teratonecrospermia. También se determinó una reacción antiespermática específica, mediante detección de anticuerpos antiespermáticos e inhibición de la migración leucocitaria con antígeno testicular y espermático, concluyendo que es factible el desarrollo de la respuesta específica a la infección concomitante a una respuesta inmune antiespermática¹⁰. Por otro lado, la eliminación de la infección por *B.ovis* (desaparición de títulos serológicos y cultivos negativos de semen o tejidos genitales) mediante antibióticoterapia en los animales inoculados y con epididimitis crónica, determinó un prolongación o aumento en la respuesta antiespermática^{10,15} (Figuras a y b).

En experimentos de inoculación con antígeno de *B.ovis* o de otras bacterias como *Corynebacterium pseudotuberculosis* dentro de la región caudal del epidídimo, se indujeron lesiones macro e histológicas similares a las observadas en carneros infectados con *B.ovis*. En este estudio se determinó que existen dos tipos diferentes de respuesta inflamatoria testicular: a) un grupo de animales desarrolló orquitis intersticial linfoplasmocítica, atrofia sectorial tubular (Sólo Sértoli) e hiperplasia/hipertrofia de células de Leydig con hiperactividad esteroideogénica e incremento de testosterona circulante de 4 nmol/L a 10 nmol/L luego de 14 semanas posinfección, y b) otro grupo que desarrolló orquitis supurativa con presencia de neutrófilos, degeneración del epitelio germinal, leve infiltrado linfocitario sin modificaciones morfológicas de células de Leydig y que deprimió la función esteroideogénica de 6 nmol/L a 1 nmol/L en el mismo período¹⁶. En el primer grupo, la histopatología fue similar a las descritas en las orquiepididimitis autoinmunes en otras especies y la misma relación entre la respuesta inmunohistológica testicular y la esteroideogénica, ya ha sido observada por otros autores¹⁸ (Foto 2). También se ha demostrado que la producción esteroide está muy

incrementada en células de Leydig, cuando éstas se incuban con macrófagos testiculares obtenidos de medios de cultivo condicionados con LPS. Estos hallazgos evidencian la existencia de una comunicación paracrina entre células testiculares como células de Sértoli y de Leydig, células mioepiteliales, germinales y macrófagos intersticiales en contacto con antígenos del tipo LPS. Al respecto, se ha hipotetizado que existiría una regulación de este tipo entre células de Leydig y mastocitos intersticiales, ya que la destrucción específica de células de Leydig demuestra proliferación y maduración de mastocitos y de macrófagos testiculares^{5,20}.

En experimentos de infección intraprepucial e intraconjuntival con *B.ovis* en carneros adultos, se ha observado que los mastocitos conectivos principalmente testiculares y también de epidídimos y vesículas seminales, se encuentran aumentados en número y con tipos morfológicos “maduro” y “de transición”, mientras que ocasionalmente se observan los de tipo degranulados denominados “fantasma”. (Paolicchi, datos no publicados). Existen evidencias de la participación de mastocitos en el desarrollo y mantención de desórdenes testiculares, como infertilidad idiopática asociada a fibrosis peritubulares y alteraciones de la espermatogénesis, hipogonadismo, disfunción de la barrera hematotesticular o atrofia testicular⁶. Dentro de las alteraciones que produce la infección genital con *B.ovis* en carneros, se cuentan modificaciones en la composición de carbohidratos de los órganos que participan en la maduración, transporte y almacenamiento de espermatozoides. Estos glicoconjugados participan en la interacción espermática receptor-ligando y por lo tanto se ha postulado que tales alteraciones en los carbohidratos estarían involucradas en el desarrollo de infertilidad observada en carneros con epididimitis por *B.ovis*¹².

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados de los estudios efectuados entre infecciones del tracto reproductivo y respuesta antiespermática o de los tejidos genitales, indican que los mismos se relacionan debido a la exposición al sistema inmune de antígenos espermáticos como resultado del proceso inflamatorio. La presencia de severas lesiones histológicas de los tejidos genitales en los carneros infectados con *B.ovis*, indican un posible quiebre de la tolerancia del sistema inmune y una respuesta para desencadenar la autosensibilización espermática. La infección no necesariamente inicia un fenómeno autoinmune, pero es sabido que las infecciones del tracto genital están asociadas a inmunidad celular positiva, aumento de anticuerpos antiespermáticos en suero y plasma seminal, leucospermia y alteraciones espermáticas. La determinación de estas diferentes respuestas a la infección con bacterias como *B.ovis*, puede ser una importante herramienta en la determinación de infertilidad asociada a infecciones genitales.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Biberstein, E.L, McGowan, B., Olander, H. and Kennedy, P.,** 1964, Epididymitis in ram. Studies on pathogenesis. The Cornell Vet , Vol LIV,1: 27-41.
2. **Burgess, G.W.,** 1982, Ovine contagious epididymitis: a review. Vet Microbiol 7: 551-575.
3. **Detilleux, P.G., Deyoe, B.L. and Cheville, N.F.,** 1990, Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in vero cells: fluorescence and electron microscopy. Vet Pathol 27: 317-328.

4. **Foster, R.A., Ladds, P.W., Husband, A.J. and Hoffmann, D.**, 1988, Immunoglobulins and immunoglobulin-containing cells in the reproductive tracts of rams naturally infected with *Brucella ovis*. Aust Vet J, Vol 65, 2: 37-40.
5. **Gaytan, F., Bellido, C., Aceitero, J., Aguilar, E. and Sánchez Criado, J.E.**, 1990, Leydig cell involvement in the paracrine regulation of mast cells in the testicular interstitium of the rat. Biol of Reprod 43: 665-671.
6. **Heyn Salinas, R.**, 1992, Respuesta de mastocitos testículo epididimarios a distintos tratamientos hormonales en la rata adulta. Tesis M Sc Cs Biol, Fac Med, Univ Chile, 131 págs.
7. **Homse A., Casaro A., Campero C., Paolicchi F., Terzolo H.**, 1994, Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. Rev Med Vet, Vol 75, 4: 302-306.
8. **Ladds, P.W.**, 1985, The male genital systems. In: Pathology in domestic animals. Ed. KVF Jubb, PC Kennedy and N Palmer, Academic Press, Orlando, Vol 3, 410 p.
9. **Mazzolli, A. B., Kortebani, L.G., Paolicchi, F.A.**, 1992, Infección e inmunidad en el tracto genital masculino. IV Curso Int de Reprod Humana. Arequipa, Perú.
10. **Paolicchi, F.A., Casaro, A.P., Gimeno, E.J., Kortebani, G., Mazzolli, A.B.**, 2000, Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Rum Res, 36: 7-15.
11. **Paolicchi, F.A., Campero, C.M., Zamora, A.S., Cipolla, A.L., Casaro, A.P.**, 1991, Lesiones anatomopatológicas en genitales de carneros enviados a faena. Rev Med Vet, Vol 72, 4: 176-185.
12. **Paolicchi, F.A., Cipolla, A., Casaro, A., Massone, A., Itagaki, S. and Gimeno, E.**, 1995, Lectin histochemical study on the reproductive tract in normal and *Brucella ovis* infected rams. J Vet Med Sci, 57: 935-938.

- 13. Paolicchi, F.A., Cipolla, A., Vagnoni, L., Cobo, E., Vagnozzi, A., Ramondino, R., Silva Paulo, P., Vigliocco, A.,** 1999, Aislamiento de *Brucella ovis* del semen de carneros seropositivos al test de ELISA y clínicamente sanos. Rev. Arg. Microbiol.
- 14. Paolicchi, F.A., Terzolo, H.R. and Campero, C.M.,** 1993, Isolation of *Brucella suis* from the semen of a ram. Vet Rec 132:67.
- 15. Paolicchi, F.A., Lúquez, J.,** 1993, Efecto de oxitetraciclina de larga acción en el tratamiento de la infección con *Brucella ovis* en carneros. Avances en Cs Vet, Vol 8, 1: 33-37.
- 16. Paolicchi, F.A., Urquieta, B., Bustos O., E, Mazzolli, A.B.,** 1996, Histología testicular y nivel de testosterona en la orquitis infecciosa experimental. XV Panamerican Congress of Veterinary Sciences. Campo Grande, Brasil.
- 17. Rahaley, R.,** 1983, Studies on the development of brucellosis in rams. Abstract of dissertation. Kansas State Univ. 3 p.
- 18. Suescún, M., Calandra, R.O. and Lustig, L.,** 1994, Alterations of testicular function after induced autoimmune orchitis in rats. J Androl , Vol 15, 5: 442-448.
- 19. Szyfres, B. and Chappel, R.,** 1961, Comprobación bacteriológica de la epididimitis infecciosa ovina en la República Argentina. Rev Fac Cs Vet La Plata 3: 405-409.
- 20. Wang, J., Wreford, N.G.M., Lan, H.Y., Atkins, R. and Hedger, M.P.,** 1994, Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. Biol Reprod 51: 551-561.

Figuras a y b. Porcentaje de carneros seropositivos a las pruebas de fijación del complemento (FC) para *B.ovis* (título \geq 1:10) y anticuerpos antiespermáticos en suero (Asab) para ovinos (título \geq 1:8) en ocho animales después de la inoculación experimental conjuntival (Fig a) o prepucial (Fig b) con *B.ovis*, durante un período de 80 semanas. En la semana 50 pos inoculación fue administrado un tratamiento antibiótico en cuatro carneros en ambos grupos (a) y (b), para eliminar la infección bacteriana y mantener la respuesta autoinmune antiespermática en suero (adaptado de Paolicchi et al, Small Ruminant Research, 2000).