

# DISTRIBUCIÓN DE LINFOCITOS CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ , CÉLULAS CD45RO, MACRÓFAGOS (CD14) Y CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD1B) EN LAS GLÁNDULAS ANEXAS AL APARATO REPRODUCTOR DE CARNEROS INOCULADOS CON *ACTINOBACILLUS SEMINIS*

Acosta Dibarrat Jorge\*, Buendía Alejandro, Tenorio G., Víctor, Suárez Güemes, Francisco y Tórtora Pérez, Jorge. 2007.  
Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina.

\*Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. [jpacosta00@yahoo.com](mailto:jpacosta00@yahoo.com)

Proyecto financiado por PAPITT-UNAM IN206101

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Infecciosas ovinos](#)

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la distribución y el número de células de respuesta inmune en el aparato reproductor de carneros inoculados con *Actinobacillus seminis* por dos vías. Se utilizaron 12 carneros de 1 año de edad, inoculados por vía intrauretral (IU) (n=4) y por vía intraepididimal en ambas colas (IE) (n=4) con *A. seminis* y cuatro controles inoculados en epidídimo con solución salina (CON). Los animales se sacrificaron a los 35 días posinoculación, se tomaron muestras de las glándulas anexas del aparato reproductor, para realizar estudios bacteriológicos y de inmunohistoquímica. Se determinó la presencia de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$  (WC1), células CD45RO, macrófagos (CD14) y células dendríticas (CD1b) Los animales del grupo IE desarrollaron epididimitis clínica. No se observaron lesiones en el grupo IU y dos de los CON desarrollaron pequeñas lesiones en epidídimos. Se observó infiltración linfoide intersticial en vesículas y ámpulas del conducto deferente de diversa intensidad en los grupos IU e IE. Se lograron aislamientos de *A. seminis* de las muestras de semen (85% de las muestras) y órganos del aparato reproductor del grupo IE, pero no se lograron aislamientos en el grupo IU. En los grupos IE e IU se presentaron aumentos de CD4, CD8, WC1, CD45RO y CD14, en vesículas y ámpulas. Las células dendríticas CD1b se presentaron únicamente en ámpulas y en vesículas con procesos inflamatorios. *A. seminis* desencadenó una respuesta inmune local en los grupos IE e IU. Existe diferente susceptibilidad a la infección en las glándulas anexas, atribuible a su diferente inmunobiología.

## INTRODUCCIÓN

La epididimitis de los carneros ha sido primordialmente asociada a infecciones por *Brucella ovis* y *Actinobacillus seminis* (Genetzky, 1995). La patogenia de la enfermedad causada por *A. seminis*, ha sido poco explorada, al igual que la presencia y distribución de las células de respuesta inmune en el aparato reproductor del carnero. El objetivo de este trabajo fue reproducir la epididimitis por *A. seminis* mediante inoculación intrauretral e intraepididimal y estudiar la respuesta inmune en las glándulas anexas, a través de la distribución de las células de linfocitos CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$ , macrófagos CD14, células dendríticas CD1b y células CD45RO.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 12 carneros machos de raza Pelibuey de un año de edad, sin alteraciones clínicas, provenientes de un rebaño sin antecedentes clínicos de la enfermedad. Se les realizó bacteriología de semen y serología para *A. seminis* y *B. ovis* y resultó negativa. Se formaron tres grupos de cuatro animales que se inocularon por vía intrauretral (IU), intraepididimal (IE) y control (CON), inoculados en la cola del epidídimo con solución salina. La cepa de referencia ATCC 15768 de *A. seminis* se sembró en agar sangre y se suspendió en SSF. Al inóculo se le realizó conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) resultando en un conteo  $2,3 \times 10^9$  UFC/ml.

La inoculación IU se llevó a cabo con de 2 ml de la suspensión bacteriana, previa ablación del proceso uretral bajo sedación, utilizando catéteres de sondeo uretral para gato. La inoculación por la vía IE se realizó en la cola del epidídimo previa limpieza y desinfección del escroto, con 1.5 ml de la suspensión bacteriana en la cola izquierda y 0.5 ml en la cola derecha. A los controles se les suministró 1.5 ml solución salina intrauretral e intraepididimal en el epidídimo derecho.

Los animales se sacrificaron a los 35 días posinoculación, obteniéndose las vesículas seminales, las ámpulas del conducto deferente, las glándulas bulbouretrales, uretra pélvica (que incluye próstata diseminada). En todos

los casos se tomaron muestras de las mismas regiones para realizar estudios de histopatología, inmunohistoquímica y bacteriología. Las muestras para inmunohistoquímica se incluyeron en criopreservador (OCT) y se congelaron con nitrógeno líquido. La inmunohistoquímica comenzó con la hidratación de los cortes con PBS por 10 min. Se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena 45 seg, posteriormente se bloqueó con suero caprino al 10% toda la noche. Se aplicaron los anticuerpos primarios (Cuadro 1), los cuales se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. El siguiente paso consistió en colocar el complejo Biotina-cabra anti ratón IgG (Lab. Zymed) 30 min., posteriormente se aplicó el complejo Streptoavidin-Peroxidase (Lab. Zymed) 15 min.; se utilizó como sustrato DAB (Lab. Zymed) que se aplicó hasta observar reacción (2 a 5 min) y se realizó la tinción de contraste con hematoxilina. Se deshidrataron, se aclararon y se montaron. Se utilizó un control de laminilla en el cual se sustituyó el anticuerpo primario por PBS. Se utilizaron como control positivo cortes de prepucio que presentaron marcas positivas para monoclonales utilizados. Se incluyó una de estas laminillas en cada una de las corridas. Entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS.

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS MONOCLONALES UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

Monoclonal	Especificidad	Expresión celular	Isotipo procedencia	Dilución	Laboratorio
CC15	WC1	Linfocitos $\gamma/\delta$	Sobrenadante	1:400	SEROTEC
17D1	CD4	Linfocitos cooperadores	Líquido ascítico	1:400	VMRD
CC63	CD8	Linfocitos citotóxicos	Sobrenadante	1:100	BIOSOURCE
GC44A	CD45RO	30% de mononucleares y granulocitos	Sobrenadante	1:500	VMRD
CC14	CD1b	Células dendríticas	Líquido ascítico	1:100	BIOSOURCE
VPM 65	CD14	Macrófagos, monocitos	Sobrenadante	1:30	BIOSOURCE

El conteo celular se realizó en 10 campos de 40 X 10 con un *software* de análisis de imágenes, Image Pro Plus 4.5. Se contaron las células presentes en la imagen proyectada por el programa y los promedios resultantes se expresaron en células por  $\text{mm}^2$ . Se buscaron diferencias entre grupos para cada glándula y para cada marcador utilizando la prueba de Kruskal-Wallis seguida de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa con  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2. y en la Figura 1. se resumen los promedios obtenidos por grupos. Puede observarse una mayor celularidad general en las ámpulas y vesículas seminales de los Grupos IU e IE, comparado con los controles. Las diferencias más importantes se presentaron en las ámpulas y en las vesículas seminales, donde coincidentemente se aisló *A. seminis*.

En las ámpulas del deferente del grupo IE se presentaron diferencias significativas con el grupo CON en CD4 ( $p=0.003$ ), CD8 ( $p=0.028$ ), CD45RO ( $p=0.005$ ), WC1 ( $P=0.007$ ) y CD14 ( $p=0.028$ ) pero no en CD1b aunque si se encontraron algunas células ( $5.5 \pm 6.4 \text{ mm}^2$ ). También se encontraron diferencias entre los grupos IU y CON, en CD8 ( $p=0.028$ ), WC1 ( $p=0.002$ ) y CD14 ( $p=0.003$ ), con tendencia en CD45RO ( $p=0.083$ ). No se encontraron diferencias significativas entre células en IU y IE.

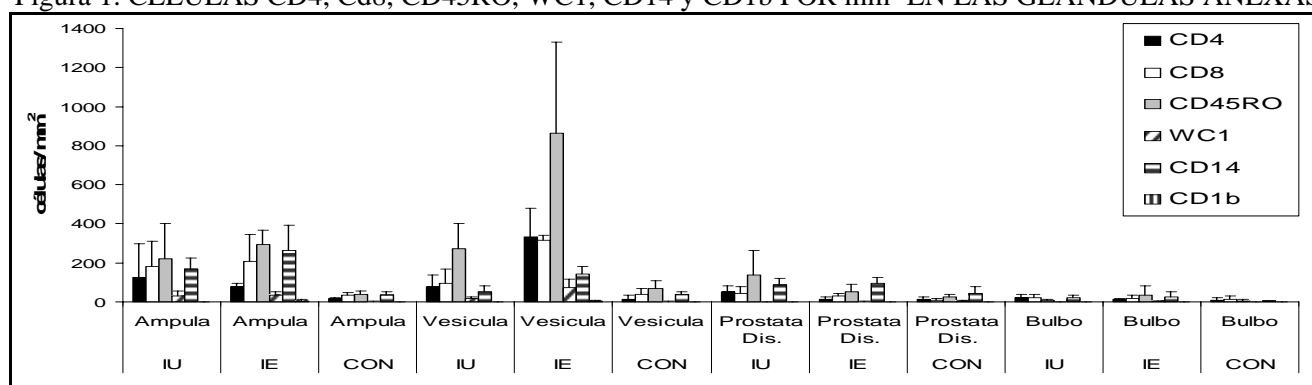
Cuadro 2 CÉLULAS CD4, CD8, CD45RO, WC1, CD14 Y CD1b POR mm <sup>2</sup> EN LAS GLÁNDULAS ANEXAS DEL APARATO REPRODUCTOR DE CARNEROS INOCULADOS CON <i>A. seminis</i>													
Glándula	Grupo	CD4		CD8		CD45RO		WC1		CD14		CD1b	
Ámpula	IU	124.1	± 173.1 <sup>e</sup>	180.4	± 132.0 <sup>a</sup>	222.0	± 178.9 <sup>e</sup>	31.9	± 25.4 <sup>a</sup>	166.5	± 59.9 <sup>a</sup>	0.0	± 0.0
	IE	76.3	± 18.9 <sup>a</sup>	205.4	± 141.3 <sup>a</sup>	295.2	± 73.0 <sup>a</sup>	33.3	± 19.8 <sup>a</sup>	263.4	± 129.4 <sup>a</sup>	5.5	± 6.4
	CON	16.7	± 4.5	33.3	± 15.7	40.3	± 15.9	1.4	± 2.8	33.3	± 19.5	0.0	± 0.0
Vesícula seminal	IU	78.0	± 60.2 <sup>b</sup>	93.0	± 75.7 <sup>b</sup>	274.3	± 125.5 <sup>b,c</sup>	19.4	± 7.1 <sup>ab</sup>	52.7	± 27.7 <sup>b</sup>	0.0	± 0.0
	IE	334.7	± 144.2 <sup>a</sup>	316.6	± 24.6 <sup>a</sup>	864.6	± 466.2 <sup>a</sup>	75.0	± 43.7 <sup>a</sup>	142.7	± 37.1 <sup>e</sup>	2.8	± 5.6
	CON	11.1	± 22.3	38.9	± 31.1	67.9	± 39.7	1.4	± 2.8	41.6	± 13.2	0.0	± 0.0
Próstata Diseminada	IU	52.7	± 28.2 <sup>e</sup>	41.5	± 34.7	140.3	± 121.8	0.0	± 0.0	86.1	± 35.3	0.0	± 0.0
	IE	13.9	± 11.5 <sup>f</sup>	30.5	± 14.7	51.4	± 38.9	1.4	± 3.2	97.2	± 29.4	0.0	± 0.0
	CON	14.8	± 11.5	7.4	± 8.5	27.8	± 11.1	3.7	± 6.4	42.6	± 36.1	0.0	± 0.0
Bulbo uretral	IU	23.6	± 15.9 <sup>e</sup>	19.5	± 19.2	8.3	± 5.5 <sup>b</sup>	0.0	± 0.0	22.2	± 12.0	0.0	± 0.0
	IE	12.5	± 5.3	18.0	± 18.3	36.0	± 45.3 <sup>a</sup>	5.5	± 0.0	27.8	± 23.5	0.0	± 0.0
	CON	9.7	± 11.5	11.1	± 18.7	4.2	± 8.4	0.0	± 0.0	2.8	± 3.2	0.0	± 0.0

IE intraepididimal, IU intrauretral, CON control<sup>a</sup> significancia comparado con el grupo CON p<0.05<sup>b</sup>, significancia comparado con el grupo IE p<0.05<sup>e</sup>, comparado en el grupo CON p<0.1, <sup>f</sup> comparado en el grupo IU p<0.1. media ± DS

En las vesículas seminales se presentaron diferencias entre los grupos IE y CON en CD4, CD8, WC1 y CD45RO (p=0.029) y tendencia en CD14 (p=0.057), estas diferencias también se mantuvieron entre los tratamientos IE e IU, haciéndose significativa incluso para el CD14 (p=0.029). Entre el CON e IU existió diferencia significativa en WC1 (p=0.029) y tendencia en CD45RO (p=0.57). En el grupo IE se encontraron escasas CD1b (2.8±5.6 mm<sup>2</sup>).

En la próstata diseminada no se encontraron diferencias, salvo algunas tendencias en CD4. En las bulbouretrales se encontró diferencia entre IE y CON y entre IE e IU en WC1 (p=0.006 y p=0.029 respectivamente) y en CD14 entre IU y CON (p=0.042).

Figura 1. CÉLULAS CD4, Cd8, CD45RO, WC1, CD14 y CD1b POR mm<sup>2</sup> EN LAS GLÁNDULAS ANEXAS



En las vesículas seminales se encontraron acúmulos linfoides en la periferia de los acinos con presencia de CD8 y CD4. Los linfocitos CD4 se presentaron frecuentemente en el estroma conjuntivo de las glándulas y los CD8 en una relación más estrecha con la membrana basal de los acinos. Los CD45RO se presentaron en ambas posiciones y frecuentemente dentro de los acinos. La marcación CD14 se presentó en el estroma, sobre los macrófagos y en los endotelios

*A. seminis* desencadenó una fuerte respuesta inflamatoria en las glándulas anexas, principalmente vesículas seminales y ámpulas, con aumento significativo de linfocitos CD8, CD4, TCRγδ, CD14 y células CD45RO en los grupos IU e IE al momento del sacrificio (35 días posinoculación),

En relación al marcador WC1, una porción de los linfocitos TCR γδ lo expresan en su superficie. WC1 (*workshop cluster 1*) es una proteína de 215 Kda que constituye un receptor rico en cisteína y que podría tener como función la migración a tejidos específicos. Fue significativo el aumento de WC1 en las vesículas seminales, ámpulas, aunque menor en números absolutos que CD4 y CD8. El aumento también coincide con la presentación de muchas enfermedades inflamatorias o infecciosas (Baldwin *et al.*, 2000).

El antígeno leucocitario común CD45 tiene como función modular la transducción de la señal de activación de los linfocitos T, su isoforma CD45RO se presenta en las subclases de memoria de los linfocitos T CD4 y CD8 y también en monocitos, granulocitos y en las células mononucleares que presentan WC1, TCRγδ, CD4- y CD8- pero no en linfocitos B (Bembridge *et al.*, 1995). En este trabajo observamos el predominio de este marcador

todas las glándulas, pero para establecer que porcentaje de las células CD45RO son efectivamente linfocitos T CD4 o CD8 de memoria, sería necesario realizar una doble marcación.

El marcador CD1b es una glucoproteína de superficie presente en las células dendríticas a través de las cuáles, son capaces de presentar antígenos lipídicos y glicolipídicos a las células T (Rhind, 2001). En este trabajo solo se encontraron en forma escasa en ámpulas, vesículas y epidídimos, principalmente en el grupo IE, donde coincidió con un aumento significativo de los linfocitos TCR  $\gamma\delta$ .

El incremento notable que se presentó en los macrófagos en los grupos IU e IE, sugiere de manera principal su participación en la presentación de antígenos en el aparato reproductor en la infección con *A. seminis*. Las moléculas CD14 que se encuentran en la superficie de los macrófagos son capaces de reconocer al LPS solo u asociado con proteínas (Wright *et al.*, 1990).

Se concluye que:

a) *Actinobacillus seminis* provocó una respuesta inmune local caracterizada por la aumentada presencia de linfocitos CD4, CD8, TCR  $\gamma\delta$ , macrófagos, células CD45RO. b) La relación CD4/CD8 no mostró un claro predominio de uno de estos subtipos en los tejidos de donde se aisló *Actinobacillus seminis*. c) Las células dendríticas CD1b, resultaron escasas en el aparato reproductor, donde las funciones de presentación antigénica parecen ser realizadas por los macrófagos CD14, al menos en la infección por *Actinobacillus seminis*. d) La inmunobiología de las glándulas anexas puede ser la razón por la cual se presentan diferencias en su susceptibilidad a la infección por *Actinobacillus seminis*.

#### BIBLIOGRAFIA

- Baldwin CL, Sathiyaseelan T, Rocchi M, McKeever D, 2000, Res Vet Sci;69:176-180.  
Bembridge GP, MacHugh ND, McKeever D, Awino E, Sopp P, Collins RA, Gelder KI, Howard CJ, 1995, Immunology, 86:537-544.  
Genetzky RM, 1995, The Compendium Food Animal 1995;17:447-454  
Rhind SM, 2001, Vet Pathol, 38:611-619.  
Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC, 1990, Science, 249:1431-1433.

Volver a: [Infecciosas ovinos](#)