

## CARACTERIZACIÓN DE LAS CITOQUINAS INVOLUCRADAS EN LA LUTEOLISIS DEL CUERPO LÚTEO DE VACAS ABORTADAS POR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *NEOSPORA CANINUM*

Serrano-Pérez, B.<sup>1</sup>, Almería, S., Mur, R., Alabart J.L., López-Helguera, I., Garcia-Ispuerto, I., y López-Gatius, F.

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Lleida- Agrotecnio Center; Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida; bserrano@ca.udl.cat

### INTRODUCCIÓN

El cuerpo lúteo es una glándula endocrina efímera que regula la duración del ciclo éstrico y cuya presencia es crítica para el establecimiento y mantenimiento de la gestación (Sakumoto, 2016). En la vaca, células residentes luteales regulan la homeostasis interna, mediante la activación de poblaciones de linfocitos T que modulan los procesos luteotróficos mediante la secreción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10), o luteolíticas mediante citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) (Walusimbi y Pate, 2014). Recientes trabajos han mostrado como un ambiente uterino comprometido puede impactar negativamente sobre la función luteal, y aumentar el riesgo de aborto en animales gestantes (Dubey et al., 2006; Lüttgenau et al., 2016). Sin embargo, el ambiente creado por dichas células durante la luteolisis queda confinado al cuerpo lúteo y no se extiende al resto del ovario (Poole y Pate, 2012). *Neospora caninum* es un parásito intracelular obligado considerado una de las causas más importantes de aborto en ganado vacuno a nivel mundial (Dubey and Schares, 2011). Sin embargo, no se conocen las interacciones inmuno-endocrinas que tienen lugar en vacas infectadas por *N. caninum* durante la gestación que puedan relacionarse con los abortos. En estudios recientes, en novillas gestantes experimentalmente infectadas con *N. caninum* en el segundo trimestre de gestación, no se han observado efectos claros de la infección sobre la homeostasis del cuerpo lúteo. Sin embargo, se ha observado una correlación positiva entre la expresión de citoquinas T reguladoras (*IL10*) en células luteales, y de Th1 (*IFNG*) y Th2 (*IL4*) en tejidos luteales y placentarios de novillas que no abortaron, indicador del equilibrio inmunológico durante el transcurso de la infección (Serrano-Pérez et al., 2017). Para profundizar en los mecanismos inmuno-endocrinos asociados a la infección por *N. caninum*, el objetivo de este estudio fue caracterizar el patrón de citoquinas involucradas en la regresión del cuerpo lúteo de vacas que abortaron como consecuencia de la infección experimental por *N. caninum*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo de infección y la recogida de muestras se han descrito en Almería et al. (2016a) y aprobado por el comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad Autónoma de Barcelona (CEEAH.1426-08/02/2012) y la Universidad de Lleida (CEEA.06-01/12). Brevemente, 10 novillas frisonas sanas seronegativas a *N. caninum* se sincronizaron y se inseminaron artificialmente (IA). El diagnóstico de gestación se realizó los días 28-34 post IA mediante ecografía transrectal, y se confirmó la gestación a los días 90, 120, 150 mediante palpación rectal. La infección experimental se realizó en 6 animales el día 110 de gestación con 10<sup>7</sup> taquizoitos de la cepa Nc-Spain7, altamente patógena cedidos por el Dr. Ortega-Mora (SALUVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España). Se sacrificaron en total cuatro novillas controles y 6 novillas infectadas. Dos novillas infectadas abortaron los días 14 y 21 post-infección, respectivamente. Otra novilla infectada presentó un feto momificado en el momento del sacrificio, por lo que se excluyó del estudio. En el momento del sacrificio, 42 días post-infección, se extrajeron muestras de sangre para la determinación plasmática de progesterona (P4) y se tomaron muestras de los cuerpos lúteos (CL) presentes en los ovarios que se conservaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su extracción. La determinación plasmática de P4 se realizó mediante un kit ELISA diseñado para plasma bovino (Ridgeway Science, St. Briavels, Gloucestershire, RU) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La sensibilidad del análisis fue de 0,3 ng/ml. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los coeficientes de variación intra-análisis para los controles de 1 y 2 ng/ml fueron 6,4 y 4,8%, respectivamente. El procesado del ARN y la determinación de la expresión por PCR a tiempo real de citoquinas (*TNFA*, *IFN $\gamma$* , *IL4*, *IL10*) se realizó según lo descrito en Almería et al. (2014). Los cebadores empleados para la *IL8* se describen en Talbott et al., (2014). El ARN de los CL se extrajo

mediante el protocolo Trizol (Invitrogen), se trató con DNAsas y se obtuvo ADN copia (cDNA) mediante transcripción reversa en presencia de iniciadores random con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La expresión de ARN mensajero para los genes *TNFA*, *IL8*, *IFN $\gamma$* , *IL4*, *IL10* y el gen de referencia *GAPDH* se determinó mediante PCR a tiempo real empleando sondas Taqman en un aparato de detección ABI PRISM™ 7700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). La cuantificación de los niveles de expresión génica de las citoquinas en los CL se realizó mediante el método comparativo 2- $\Delta\Delta$ Ct (ABI PRISM7700 sequence detection system, user bulletin #2). Los datos se analizaron estadísticamente mediante prueba de Kruskal-Wallis con el paquete SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). La significancia utilizada fue de  $P \leq 0.05$ .

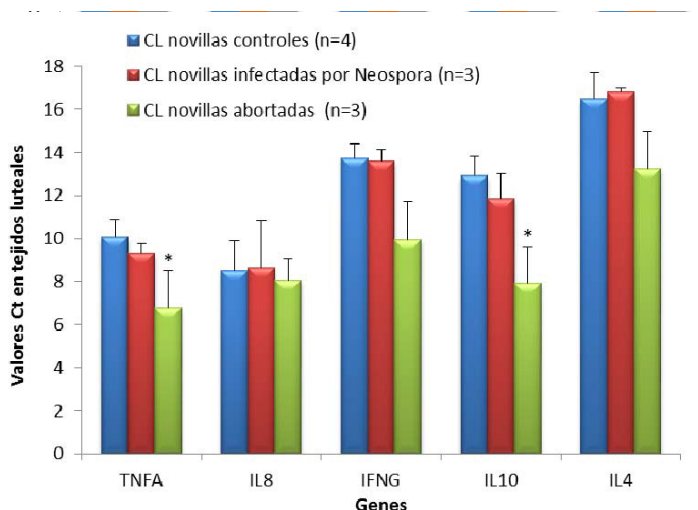
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron en total cuatro CL de las novillas control, tres CL de novillas infectadas con feto viable y tres CL de las novillas que abortaron, ya que una presentaba dos cuerpos lúteos en distinto grado de regresión en el momento del sacrificio. Los tejidos luteales del grupo control no alcanzaron los niveles umbral para la detección de la expresión de *IL4*. Cuando los niveles normalizados se compararon, se observaron niveles de expresión similares para *TNFA*, *IFNG*, *IL4*, *IL10* entre novillas controles e infectadas no abortadas (Serrano-Pérez et al., 2017). Sin embargo, las novillas que abortaron presentaron mayor expresión de *TNFA* ( $P=0,043$ ), *IL10* ( $P=0,034$ ), *IFNG* ( $P=0,055$ ) e *IL4* ( $P=0,095$ ), respecto a las novillas controles e infectadas con fetos viables en el momento del sacrificio. Está ampliamente descrito como las citoquinas proinflamatorias secretadas por las células inmunitarias del CL poseen la capacidad de inducir tanto la regresión funcional (disminución de la P4) como la regresión luteal estructural (muerte celular) (Hojo et al., 2010). Fruto de esta actividad, los niveles plasmáticos de P4 de las novillas abortadas se encontraban disminuidos respecto a las novillas gestantes ( $1,5 \pm 0,1$  ng/ml vs.  $12 \pm 2,9$  ng/ml). A pesar del papel de la *IL8* en el reclutamiento de neutrófilos durante la luteolisis, no se observaron diferencias entre grupos (Talbot et al., 2014). Por otro lado, la presencia de citoquinas antiinflamatorias podría ser debida a la actividad reguladora de estas citoquinas ante la presencia del parásito. Las novillas que abortaron presentaron menores niveles de citoquinas Th2 (*IL-4*) y Treg (*IL10*) en el momento del sacrificio respecto a las que no abortaron (Almería et al., 2016b). Posiblemente esto fue debido a la bajada de los niveles de expresión de citoquinas en los animales abortados unas semanas después del aborto (Almería et al., 2016b). Fruto de la cooperación de las respuestas Th1 y Th2 podría explicarse la rápida recuperación reproductiva observada en vacas abortadas en condiciones de granja (Santolaria et al., 2009). Los resultados de este estudio muestran cómo la regresión del cuerpo lúteo de novillas que abortaron como consecuencia de la infección experimental por *N. caninum* involucra tanto citoquinas proinflamatorias como antiinflamatorias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almería, S., Serrano-Pérez, B., Darwich, L., Araujo, R.N., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P. & Gasbarre, L.C. 2014. *Vet Parasitol.* 204:146-52.
- Almería, S., Serrano-Pérez, B., Darwich, L., Domingo, M., Mur-Navales, R., Regidor-Cerrillo, J., Cabezón, O., Pérez-Maillo, M., Lopez-Helguera, I., Fernández-Aguilar, X., Puig-Ribas, M., Ortega-Mora, L.M., García-Ispuerto, I., Dubey, J.P. & López-Gatius, F. 2016a. *Exp Parasitol.* 168:62-9.
- Almería, S., Serrano-Pérez, B., Darwich, L., Mur-Navales, R., García-Ispuerto, I., Cabezón, O. & López-Gatius, F. 2016b. *Vet Parasitol.* 227:138-42.
- Dubey, J.P., Schares, G. 2011. *Vet Parasitol.* 180:90-108.
- Dubey, J.P., Buxton, D. & Wouda, W. 2006. *J Comp Pathol.* 134:267-89.
- Hojo T., Oda, A., Lee S.H., Acosta, T.J. & Okuda K. 2010. *J Reprod Dev.* 56:515-9.
- Lüttgenau, J., Lingemann, B., Wellnitz, O., Hankele, A.K., Schmicke, M., Ulbrich, S.E., Bruckmaier, R.M. & Bollwein, H. 2016. *J Dairy Sci.* 99:6639-53.
- Poole, D.H., Pate, J.L. 2012. *Biol Reprod.* 86:29.
- Sakumoto, R. 2016. *Reprod Biol.* 16:182-8.
- Santolaria, P., López-Gatius, F., Yániz, J., García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Bech-Sabat, G., Serrano, B. & Almería, S. 2009. *Theriogenology.* 72:798-802.
- Serrano-Pérez, B., Almería, S., Mur-Navales, R., López-Helguera, I., García-Ispuerto, I., Alabart, J.L., Darwich, L. & López-Gatius, F. 2017. *Reprod Domest Anim.* doi: 10.1111/rda.12937.
- Talbot, H., Delaney, A., Zhang, P.,

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por MINECO (AGL2012-39830-C02-01/02). R. Mur-Navales disfruta de una beca FPI (BES-2013-063215).



**Figura 1.** Expresión génica de citoquinas TNFA, IL8, IFNG, IL10, IL4 (valores umbral del ciclo (Ct) normalizados) entre grupos (grupo control, novillas *N. caninum* infectadas no abortadas, novillas *N. caninum* infectadas abortadas) en tejidos lúteales 42 días post-infección. Cuanto mayor es el valor Ct normalizado, menor es el nivel de expresión. CL: Cuerpos lúteos. \*  $P < 0,05$

#### CHARACTERIZATION OF CITOKINES INVOLVED IN CORPUS LUTEUM LUTEOLYSIS IN ABORTING HEIFERS AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH *NEOSPORA CANINUM*

**ABSTRACT:** Corpus luteum (CL) is an ephemeral ovarian endocrine gland that regulates the length of the estrous cycle and is critical for the establishment and maintenance of pregnancy. Cells resident in the bovine CL regulate internal homeostasis, through activation of T-cell subsets that control secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. This study characterizes cytokine gene expression involved in corpus luteum luteolysis in dams suffering abortion after *N. caninum* experimental infection. Gene expression of Th1 (*IFNG*, *TNFA*), Th2 (*IL4*) and Treg (*IL10*) cytokines was examined by real time PCR using the TaqMan approach in control and infected animals dams after infection with the isolate Nc-Spain7 at 110 days of pregnancy and euthanasia 6 weeks after infection. Abortion was observed in two of six infected dams. Aborting dams presented upregulated expression of *TNFA* ( $P=0.043$ ), *IL10* ( $P=0.034$ ), *IFNG* ( $P=0.055$ , trend) and *IL4* ( $P=0.095$ , trend) in CL compared to controls and non-aborting infected dams. Inflammatory cytokines in CL have the capacity to induce both functional and structural luteal regression. As a consequence, these dams presented the lowest progesterone concentrations at euthanasia. However, upregulation of anti-inflammatory cytokines in CL suggest a cooperation between Th1 and Th2 responses in *N. caninum* infection.

**Keywords:** neosporosis, abortion, corpus luteum regression, heifers, immune response.