

Estudio in vitro de la respuesta inmune innata y la muerte celular en glándula mamaria bovina post-desafío con *Staphylococcus aureus* en modos de vida libre y en biopelículas

Año
2018

Directores del proyecto
Bohl, Luciana

Equipo de investigación
Isaac, Paula; Morgante, Carolina Andrea; Sodero, Sonia Gisela
y Correa, Silvia Graciela

Alumnos participantes
Lerda, Walter Ezequiel y Devani, Candelaria

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Bohl, L., [et al.] (2018). *Estudio in vitro de la respuesta inmune innata y la muerte celular en glándula mamaria bovina post-desafío con Staphylococcus aureus en modos de vida libre y biopelículas*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María





INFORME ACADÉMICO FINAL
Proyectos de Investigación 2016-2017

PROYECTO:

Estudio in vitro de la respuesta inmune innata y la muerte celular en glándula mamaria bovina post-desafío con *Staphylococcus aureus* en modos de vida libre y en biopelículas

DIRECTOR:

Luciana Bohl

CO-DIRECTOR:

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Isaac Paula, Morgante Carolina Andrea, Sodero Sonia Gisela, Correa Silvia Graciela

ALUMNOS INTEGRANTES:

Lerda Walter Ezequiel y Devani Candelaria

1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO

En esta línea de investigación en formación estamos abocados al estudio de uno de los agentes etiológicos más importantes en la mastitis bovina como es el *Staphylococcus aureus* (SA). Considerando que este microorganismo es capaz de establecerse en comunidades inmersas en una matriz de polisacáridos, conocidas como biofilms o biopelículas, nos propusimos “estudiar la respuesta inmune innata y la muerte celular de células bovinas frente a bacterias causantes de mastitis, incorporando en el modelo experimental la capacidad de formar biopelículas”. La base racional de este objetivo radica en que los antecedentes bibliográficos postulan que creciendo en biofilms, el patógeno es resistente a la acción del sistema inmune y al efecto de los antibióticos provocando



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

infecciones persistentes o crónicas. Sin embargo, pocos datos empíricos respaldan esta afirmación. Entonces, bajo este modelo experimental, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar la internalización, fagocitosis y supervivencia de SA V329 –cepa aislada de un animal con mastitis bovina subclínica fuertemente productora de biopelículas-, en modo planctónico o biofilms, en células epiteliales mamarias MAC-T y macrófagos bovinos BoMac (OEI).
- II. Evaluar la sobrevivencia de las células MAC-T y BoMac en cultivo luego de la infección con SA planctónico o biofilms, mediante el estudio de la muerte celular por apoptosis (OEII).
- III. Caracterizar la respuesta inmunológica innata desencadenada por estas células post-contacto con SA V329 planctónico o biofilm (OEIII).

Todos los objetivos han sido cumplimentados en gran parte y lo que no se ha realizado ha sido debido a dificultades metodológicas y/o económicas consignadas al final de la sección. Sin embargo, vale aclarar que algunas de las actividades propuestas siguen en curso y se espera tener los resultados en un futuro cercano para plasmarlos en una o dos publicaciones científicas en revistas internacionales con arbitraje.

Al momento de formular este proyecto se realizó una búsqueda bibliográfica de los abordajes experimentales utilizados por otros investigadores para estudiar las interacciones entre los biofilms bacterianos y las células eucariotas (hospedadoras) y se halló una gran diversidad de ellos. Por consiguiente, lo primero que se hizo fue medir una variable respuesta en las células epiteliales mamarias y en los macrófagos bovinos (internalización/fagocitosis respectivamente o invasión bacteriana) bajo tres metodologías descritas en la bibliografía. Por este motivo, el OEI se desarrolló en un tiempo mayor al previsto y se logró estudiar la internalización/fagocitosis de SA V329 en las células MAC-T y BoMac luego de 2 hs de co-cultivo a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias por célula. El resultado más interesante fue que utilizando uno de los tres modelos experimentales se halló que la invasión bacteriana al hospedador fue significativamente mayor cuando éste se infectó con cultivos de SA V329 planctónicos que en biofilm. Este resultado corrobora, en parte, los antecedentes que postulan que los biofilms bacterianos evaden la respuesta inmune ya que fueron menos fagocitados por los macrófagos. Luego de la ejecución de este OE se eligió una de las metodologías experimentales probadas en función a los resultados obtenidos.

Para evaluar la sobrevivencia de las células epiteliales mamarias en cultivo luego de la infección con SA planctónico o biofilms se utilizó primeramente la tinción vital con azul de tripán (OEII). No se encontraron diferencias significativas entre las células controles (no



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

infectadas) y aquellas co-cultivadas con SA V329 planctónico o biofilms durante 2, 4, 6 y 24 hs. Respecto específicamente a la muerte celular por apoptosis se evaluó en las células MAC-T estudiando la expresión génica relativa de dos moléculas reguladoras de este proceso. Los datos obtenidos revelaron que SA V329 en ambos modos de vida provocó disminución de la expresión del gen proapoptótico Bax y aumento de la expresión del antiapoptótico Bcl-2, siendo el efecto de la condición biofilm menor sobre Bcl-2 que el de la planctónica. Para completar este OE y concluir sobre la apoptosis nos encontramos evaluando la externalización de la fosfatidilserina, la actividad de las caspasas y la fragmentación nuclear por citometría de flujo en las células MAC-T co-cultivadas con SA V329 planctónico o biofilms. Cabe destacar que se cuenta con los reactivos para hacerlo y que se ha avanzado en la puesta a punto de dichas metodologías utilizando un control positivo de apoptosis.

La caracterización de la respuesta inmunológica innata desencadenada por las células MAC-T post-contacto con SA V329 planctónico o biofilm (OEIII) se ha llevado a cabo de acuerdo a lo previsto. Se halló que los cultivos planctónicos de SA V329 estimularon significativamente la expresión del receptor de reconocimiento TLR-2 en las células MAC-T a las 2 y 4 hs de co-cultivo mientras que los biofilms no produjeron esa respuesta. Con respecto a la producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6 se encontró que SA V329 estimuló significativamente la producción de IL-1 β en las células MAC-T de manera comparable en las condiciones planctónico y biofilm. En contraste, el comportamiento de la IL-6 varió en función al tiempo de co-cultivo y al modo de vida bacteriano. Específicamente, a las 2 hs de co-cultivo SA V329 indujo un aumento significativo de IL-6, que se mantuvo en la condición biofilm a las 4 hs de co-cultivo. A tiempos más prolongados de infección (6 y 24 hs) los niveles de IL-6 fueron comparables a los de las células MAC-T no infectadas. Finalmente, resultados preliminares sobre la expresión génica de otros mediadores de la respuesta inmune innata en las células MAC-T infectadas durante 4 hs con SA V320 WT muestran que las expresiones de NF κ B, IL8 y TNF α no se modificaron en función al estilo de vida bacteriano.

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento indican que SA V329 provenientes de biofilms invadieron menos las células MAC-T y BoMac que SA V329 en vida libre (2 hs de co-cultivo). Asimismo, la infección con SA V329 biofilm no estimuló la expresión de TLR2 en las células epiteliales mientras que los cultivos planctónicos si lo hicieron (2 y 4 hs). Los co-cultivos con las biopelículas provocaron mayor inducción de IL-6 y upregularon menos el gen anti-apoptótico Bcl-2 (4 hs) en comparación con el modo de vida planctónico. Mientras que las expresiones génicas de NF κ B, IL8 y TNF α no se modificaron en las células MAC-T como resultado de la infección con SA V320 en ambos estilos de vida bacteriano (4 hs).



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

Estos resultados aportan evidencias a favor de que la respuesta inmune innata del huésped no sería idéntica frente al mismo patógeno en función a su modo de vida.

En conclusión, luego de la ejecución del proyecto se ha logrado desarrollar, comparar y elegir una metodología de estudio adecuada para alcanzar los objetivos planteados.

Además, se obtuvieron resultados interesantes que conjuntamente con los que resta lograr darán luz sobre los mecanismos que los biofilms bacterianos utilizan para evadir la respuesta inmune. El conocimiento de estos procesos es indispensable para proponer nuevas terapias para la mastitis bovina o mejorar las existentes.

Por último quisiéramos dejar sentadas algunas limitaciones encontradas durante el desarrollo del proyecto que impidieron que lográsemos cumplir completamente las actividades propuestas inicialmente. No fue posible lograr el estudio de la respuesta inmune innata en los macrófagos bovinos debido a que estos no se activaron frente a conocidos inductores de la misma. Además, debido a la utilización de un sistema biológico complejo eucariota-procariota se halló gran variabilidad intra- e interexperimental, motivo por el cual los experimentos se realizaron más de tres veces para llegar a conclusiones confiables. Lo antedicho implicó destinar más tiempo que el previsto en la realización de las actividades. Finalmente, los fondos otorgados fueron insuficientes para solventar los costos de los reactivos necesarios para realizar los objetivos del proyecto completamente.

2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA

2.1. Describir vínculos generados desde el Programa/Proyecto con referencia a demandas del Sector Productivo.

Si bien este proyecto tiene como fin último aportar conocimiento que pueda ser utilizado para mejorar la producción lechera, en esta instancia generó conocimiento científico básico sobre la inmunidad de glándula mamaria bovina frente a infecciones con patógenos del género *Staphylococcus*. La comprensión de los mecanismos involucrados es indispensable para diseñar en forma racional estrategias de control más específicas y efectivas a futuro.

2.2. Describir vínculos que respondan a demandas internas de distintas áreas de la UNVM.



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

En respuesta a una demanda del sector institucional, se establecieron **vínculos con otros investigadores de la UNVM**. Concretamente, algunos integrantes de este proyecto colaboraron con otros grupos de investigación en el diseño y ejecución de experimentos, análisis de datos y presentación de éstos en reuniones científicas nacionales e internacionales.

Con la Lic. en Química María Soledad Orellano (grupo Dra. Porporatto) se realizaron experimentos para medir la viabilidad de líneas celulares bovinas tratadas con nanopartículas de quitosano utilizadas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Los resultados obtenidos se presentaron en la *LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)*, que se realizó del 16 al 19 de noviembre de 2016 en Mar del Plata y se publicaron en la revista Medicina (ANTIMICROBIAL AND CELL VIABILITY MEASUREMENT OF CHITOSAN NANOPARTICLES TO BE APPLIED AS THERAPY IN BOVINE MASTITIS. Orellano MS, **Bohl LP**, **Isaac P**, Breser ML, Falcone RD, Porporatto C. Medicina 76 (Supl. I): 228, ISSN 0025-7680 - ESN 1669-9106, 2016).

Con la Ing. en Tecnología de los Alimentos Noelia Vanden Braber (grupo Dra. Montenegro) se realizaron experimentos de espectrofotometría para determinar la actividad de las enzimas del sistema antioxidante superóxido dismutasa y catalasa en un modelo murino de colitis post-tratamiento con genisteína microencapsulada con quitosano. Los resultados obtenidos se presentaron en:

1. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* que se realizó en Córdoba del 2 al 4 de noviembre de 2016 (EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DE UN ADITIVO NUTRACÉUTICO A BASE DE QUERCETINA MICROENCAPSULADA EN QUITOSANO EN MODELO MURINO DE COLITIS. Vanden Braber NL, Novotny Núñez I, **Bohl LP**, Porporatto C, **Correa SG**, Montenegro MA)
2. *LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)* que se realizó del 16 al 19 de noviembre de 2016 en Mar del Plata. El trabajo presentado en la reunión de la SAIC se publicó en la revista Medicina (THE MICROENCAPSULATION OF THE FLAVONIOD GENISTEIN WITH SOLUBLE CHITOSAN ALLOWS EFFICIENT RELEASE IN COLON AND ATTENUATION OF OXIDATIVE STRESS DURING EXPERIMENTAL COLITIS. Vanden Braber NL, Novotny Núñez I, **Bohl LP**, Porporatto C, Montenegro MA, **Correa SG**. Medicina 76 (Supl. I): 315, ISSN 0025-7680 - ESN 1669-9106, 2016).

Finalmente, con el Méd. Vet. Agustín Conesa (grupo Dra. Porporatto) se evaluó la capacidad formadora de biofilm de *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de animales con mastitis bovina. Los resultados obtenidos se presentaron en el XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología/XIV Congreso Argentino de Microbiología, que se realizó en la ciudad de Rosario del 26 al 30 de noviembre de 2016 (FORMACIÓN DE BIOFILM POR DISTINTAS ESPECIES DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS AISLADOS DE ANIMALES CON MASTITIS BOVINA. Conesa, A; Raspanti, CG; **Bohl, LP**; **Isaac, P**; Felipe, V; Bonetto, CC; Bogni, CI; **Morgante, CA**; Odierno, L; Porporatto, C)

Asimismo, algunos integrantes del equipo formaron parte de otros Proyectos de Investigación BIANUALES 2016-2017 otorgados por el Instituto de Investigación (UNVM).

Prueba de algunas vinculaciones son los siguientes trabajos publicados durante el período de ejecución del proyecto:

COMMENSAL COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCUS FROM THE UDDER OF HEALTHY COWS INHIBITS BIOFILM FORMATION OF MASTITIS-RELATED PATHOGENS. **Isaac P**, **Bohl LP**, Breser ML, Orellano MS, Conesa A, Ferrero MA, Porporatto C. Veterinary Microbiology 207 (2017) 259–266. ISSN: 03781135.

COMBINED CALCITRIOL AND MENADIONE REDUCES EXPERIMENTAL MURINE TRIPLE NEGATIVE BREAST TUMOR. **Bohl L**, Guizzardi S, Rodríguez V, Hinrichsen L, Rozados V, Cremonezzi D, Tolosa de Talamoni N, Picotto G. Biomedicine & Pharmacotherapy. 94 (2017): 21-26. ISSN: 0753-3322.



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

CHITOSAN AND CLOXACILLIN COMBINATION IMPROVE ANTIBIOTIC EFFICACY AGAINST DIFFERENT LIFESTYLE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCUS ISOLATES FROM CHRONIC BOVINE MASTITIS. Bresler ML, Felipe V, **Bohl LP**, Orellano MS, **Isaac P**, Conesa A, Rivero VE, **Correa SG**, Bianco ID, Porporatto C. Scientific Reports 8 (2018): 5081. doi: 10.1038/s41598-018-23521-0. ISSN 2045-2322 (online).

Por otra parte, en respuesta a la necesidad de establecer criterios y realizar acciones relacionadas con la organización espacial los Laboratorios de Docencia e Investigación, con la adquisición y manejos de equipos, con la bioseguridad, con la utilización de los laboratorios por parte de los docentes, entre otras, se creó la Comisión Coordinadora de los Laboratorios de Docencia e Investigación por Res. N° 088/2016 del IAPCByA de la UNVM. La directora del Proyecto formó parte de esta Comisión participando de dos encuentros mensuales durante el año 2016. Las acciones concretas realizadas fueron numerosas, entre las cuales podemos destacar la realización de dos inducciones para cumplimentar con los requisitos de Seguridad e Higiene para el trabajo seguro en los laboratorios de carácter obligatorio. Dicha actividad fue dictada por personal de Higiene y Seguridad de la UNVM y dirigida al personal docente, alumnos e investigadores que realicen prácticas en el sector. Asimismo se estableció un organigrama de los laboratorios y responsables de cada una de esas áreas, se generó un protocolo de procedimiento para el descarte de residuos líquidos peligrosos, se gestionó la inscripción de la UNVM en la Secretaria de Ambiente de la provincia para descarte de residuos peligrosos, se establecieron cuestiones relacionadas a la limpieza del edificio, se generó el procedimiento "Ejecución de trabajos prácticos en los Laboratorios de la UNVM (PR.UNVM.001)", se controló el buen uso y el funcionamiento de equipos de laboratorio, entre otras.

Finalmente, las Dras. **Correa** y **Morgante** han ocupado cargos de gestión universitaria en las Universidades Nacionales de Villa María y de Córdoba.

3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM

AUTORIZO LA PUBLICACIÓN DE ESTE INFORME ACADÉMICO FINAL EN EL REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM: SI