

Desarrollo de una estrategia terapéutica basada en combinaciones de sistemas poliméricos asociados a antibióticos para el tratamiento de infecciones intramamarias en bovinos

Año
2018

Directores del proyecto
Breser, Maria Laura

Equipo de investigación
Orellano, Maria Soledad; Conesa, Agustín; Saino, Veronica;
Falcón, Cristian Roberto y Bianco, Ismael

Alumnos participantes
Manzanelli, Franco y Tisera, Lucía

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

Breser, Maria L., [et al.] (2018). *Desarrollo de una estrategia terapéutica basada en combinaciones de sistemas poliméricos asociados a antibióticos para el tratamiento de infecciones intramamarias en bovinos*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

PROYECTO:

Desarrollo de una estrategia terapéutica basada en combinaciones de sistemas poliméricos asociados a antibióticos para el tratamiento de infecciones intramamarias en bovinos

DIRECTOR:

Breser Maria Laura

CO-DIRECTOR:

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Orellano, Maria Soledad

Conesa, Agustín

Saino; Veronica

Falcón, Cristian Roberto

Bianco, Ismael

ALUMNOS INTEGRANTES:

Manzanelli, Franco

Tisera, Lucía

1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO

Objetivo general:

El objetivo general del proyecto se focalizó en el estudio de una nueva estrategia terapéutica de administración intramamaria para ser utilizada en el periodo de secado.



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

INFORME

Durante este proyecto se ha trabajado con el polímero Quitosano (Qs), en forma nativa y nanoestructurada. Se ha trabajado en la obtención de nanopartículas de Qs (NPs-Qs), las cuales han sido sintetizadas a través del empleo de micelas inversas, un sistema supramolecular auto-ensamblado que permite utilizar estas micelas como nanoreactores. Durante el primer año del proyecto se ha llevado a cabo la síntesis, estandarización y caracterización de las condiciones de reacción de las NPs. Luego de la caracterización, se ha trabajado en el proceso de optimización y escalamiento a nivel laboratorio de la síntesis de NPs-Qs. En una segunda etapa, se ha evaluado la actividad antimicrobiana de las NPs-Qs en comparación con el Qs nativo. Para ello se han realizado ensayos en los que se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a 20 bacterias del género *Staphylococcus* aisladas de mastitis bovina de establecimientos lecheros de la región. En todos los casos se utilizaron cepas de referencia como control; en ensayos de CIM *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 43300; como control positivo y negativo de formación de biofilm *S. epidermidis* ATCC 35984 y *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente. Los ensayos fueron realizados de acuerdo a las normas y guías establecidas en el CLSI 2016.

Los ensayos realizados han mostraron que las NPs-Qs resultaron tener un efecto significativamente mejor en comparación con el Qs nativo ($P \leq 0,05$). Las NPs-Qs han mostrado un efecto bacteriostático en todos los aislamientos analizados entre 100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el Qs nativo fue de 800-1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El efecto bactericida de las NPs-Qs fue encontrado entre 200-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el Qs nativo fue en todos los casos fue mayor a 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, la CBM de las NPs-Qs fue encontrada entre 200-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para el Qs nativo resulto ser mayor a 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sugiriendo que las NPs-Qs además de inhibir el crecimiento, presentan una potente actividad bactericida frente a bacterias aisladas de mastitis bovina. Por otro lado, uno de los principales inconvenientes obtenidos en este objetivo fue la adquisición del polímero Poli-L-Lisina (PLL), que si bien se ha comprado y realizado todos los tramites de importación, el transporte del mismo al laboratorio ha tenido mucha demora, lo que ha generado que nos retrasemos las copolimerizaciones entre ellos.

En paralelo a la síntesis y optimización de las NPs-Qs, el grupo de trabajo propuesto ha desarrollado ensayos en los cuales se ha combinado Qs nativo [200 $\mu\text{g}/\text{mL}$] con diferentes concentraciones de cloxacilina (Clx), un antibiótico de la familia de la penicilina resistente a las β -lactamasas. Se ha propuesto la utilización de este antibiótico ya que el mismo es frecuentemente utilizado durante la terapia de secado.

En base al objetivo general propuesto se evaluó el efecto antimicrobiano de las combinaciones de Qs y Clx sobre 7 diferentes aislamientos obtenidos de mastitis bovina crónica de la región, los cuales fueron refractarios a las terapias antibióticas



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

convencionales. Se ha definido como aislamiento de mastitis crónica a la bacteria encontrada luego de 3 muestreos realizados cada 15 días en el mismo cuarto de animales con mastitis clínica. Con el fin de determinar si los aislamientos crónicos presentaban resistencia antibiótica contra las principales drogas utilizadas en la clínica veterinaria, se realizó el antibiograma en disco para ampicilina, penicilina, cefoxitina, eritromicina, rifampicina y lincomicina. Encontramos que los aislamientos crónicos presentaron un 85% de resistencia a la penicilina, 71% a la eritromicina, 57% a la ampicilina, 57% a la lincomicina, 14% a la rifampicina, mientras que el 42% presentó metilicilina resistencia a través del uso de discos de cefoxitina.

En los últimos años, se ha descrito que el crecimiento bacteriano en biofilms o intracelular incrementa la resistencia antibiótica y reducen el reconocimiento del sistema inmune. Previamente en el laboratorio se había descrito que la totalidad de los aislamientos crónicos obtenidos en el estudio tenían la capacidad de crecer en biopelículas e infectar a una línea celular de epitelio mamario bovino (MAC-T). Con el objetivo de determinar si el crecimiento en forma de biofilms afecta la concentración de Clx necesario para eliminar a las bacterias. Se han llevado a cabo ensayos para determinar la CIM y CBM de Clx, frente a cultivos de crecimiento plañtónicos, biofilms preformados e infecciones intracelulares en la línea celular MAC-T. Hemos encontrado que la concentración de Clx necesaria para eliminar a las bacterias que crecen en forma de biofilms (16-128 veces) e intracelular(16-32 veces) fue mayor al necesario para atacar las bacterias en forma planctónicas. Los resultados obtenidos han demostrado que si bien los aislamientos crónicos presentan una elevada tasa de resistencia a los antibioticos mediante pruebas convencionales, éstas concentraciones son aún mayores si las bacterias se encuentran en otras formas de crecimiento no plañtónico.

Dada la elevada resistencia antibiótica encontrada en los aislamientos crónicos y la problemática que ésta acarrea para el tratamiento de los animales, surge la necesidad de generar una estrategia que logre incrementar la eficiencia de dicha terapia. Para ello se propuesto incorporar al uso de la terapia antibiótica convencional, el agregado de Qs, un polímero natural de amplio espectro antimicrobiano. Para llevar a cabo dicho objetivo, hemos evaluado el efecto antimicrobiano de la combinación del biopolímero Qs [200µg/mL] y Clx [diferentes concentraciones] sobre las diferentes formas de crecimiento bacteriano. El efecto de la terapia combinada sobre biofilms preformados fue llevada a cabo sobre la biomasa madura de bacterias. Para ello, se crecieron biofilms maduros de 24 h. los cuales fueron lavados (para extraer las células en suspensión) y luego cultivados en presencia de medio de cultivo (Control), Qs, diferentes concentraciones de Clx o frente a la combinación de Clx y Qs. Los biofilms tratados con las diferentes condiciones fueron mantenidos en estufa a 37°C durante 24 h. La evaluación de la viabilidad celular bacteriana, así como la biomasa del biofilms fue llevada a cabo sobre las bacterias que conforman dicha



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

biopelícula. Por otro lado el modelo de infección intracelular se realizó a MAC-T infectadas durante 2 horas con cada una de las bacterias ensayadas (en un índice de multiplicidad de infección de 10) para luego ser, lavadas e incubadas en presencia de las diferentes condiciones ensayadas. La evaluación de viabilidad bacteriana intracelular se realizó luego de lisar las células MAC-T y sembrar en placa de recuento 24 h después de agregado el tratamiento. Luego de realizados los ensayos, hemos encontrado que la combinación de Qs y Clx no solo reduce la concentración de antibiótico necesaria para eliminar bacterias en cultivos plantónicos (16-64 veces) y en biofilms preformados (4-16 veces), sino que también reduce la concentración de antibiótico necesaria para eliminar infecciones intracelulares (4-32 veces). Por otro lado se sabe que la cronicidad de las infecciones no solo depende de las características del agente microbiano sino también del sistema inmune del huésped. Por lo que, hemos evaluado las citoquinas proinflamatorias producidas por las células epiteliales mamarias bovinas luego de 24h de infección con los aislamientos crónicos en presencia de diferentes condiciones: medio (control), Qs, Clx o Clx+Qs. Las citoquinas bovinas proinflamatorias IL-1b e IL-6 fueron evaluadas mediante la técnica de ELISA. Si bien datos bibliográficos previos han sugerido que el Qs puede tener un efecto inmunoestimulante sobre diferentes tipos de epitelios, lo mismos sostienen que dicho efecto puede estar dado por una interacción electrostática sobre la densidad de la membrana de la célula eucariota, la cual podría reducir su umbral de activación. Los resultados obtenidos han mostrado que la incorporación de Qs no solo reduce la carga bacteriana en el interior celular, sino que estimula la producción de la IL-6. El incremento en esta citoquina in vivo podría ser de gran importancia para el reclutamiento y activación de células inmunes. Considerando que el diseño está orientado a una formulación de administración intramamaria, se han realizado experimentos con el fin de determinar si las combinaciones de Clx y Qs ensayadas presentan citotoxicidad sobre una línea celular de epitelio mamario bovino (MAC-T). Los estudios pertinentes sobre citotoxicidad son de suma importancia para la aceptación de los protocolos para la transferencia in vivo de la formulación propuesta. La viabilidad de las células MAC-T cultivada en presencia de medio (control), Qs, Clx o Qs + Clx durante 48 h fue evaluada por la técnica de reducción de sales de tetrazolio (técnica de MTT). Los resultados obtenidos no han mostrado diferencias entre la viabilidad y actividad metabólica luego de que las células fueran cultivadas en presencia del control o las diferentes condiciones ensayadas (Qs, ni de Clx y Clx + Qs), sugiriendo que las mismas podrían ser utilizadas dentro del tejido mamario. Los resultados obtenidos han demostrado que la combinación entre el antibiótico Clx y el polisacárido Qs mejoran significativamente la eficiencia terapéutica del antibiótico sobre diferentes formas de crecimiento bacteriano, sugiriendo que esta combinación podría un ser de gran interés terapéutico para las formulaciones orientadas al tratamiento y prevención de la mastitis bovina.



INFORME ACADÉMICO FINAL Proyectos de Investigación 2016-2017

2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA²

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

Considerando el significativo aporte que tiene la cuenca lechera de Villa María en la producción nacional; la importancia del proyecto está orientado a generar conocimiento tendiente a mejorar las terapias actuales con el fin de mejorar la sanidad del ganado y reducir las cuantiosas pérdidas económicas que esta patología genera en los productores y en la industria lechera. En base a los resultados obtenidos se están llevando a cabo diferentes conversaciones con compañías farmacéuticas de producción nacional de antibióticos destinados a la medicina veterinaria interesadas en el trabajo conjunto para el desarrollo de un producto tecnológico de éstas características.

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

Por su parte la directora del proyecto participa como miembro de la Comisión Coordinadora de los Laboratorios de Docencia e Investigación desde abril 2016- diciembre 2018. La misma tiene como objetivo elaborar normativas y protocolizar el funcionamiento y trabajo seguro dentro de los laboratorios de la UNVM. Comisión tiene vigencia desde abril del 2016. Res. N° 088/2016.

3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM

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