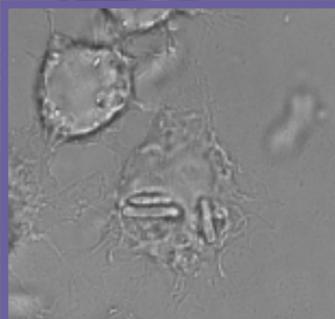


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
Microorganismos intestinales: estudio de Bacillus cereus en modelos de interacción con el hospedador

Ivanna Sabrina Rolny
Director: Dr. Pablo Fernando Pérez

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Microorganismos intestinales: estudio de
***Bacillus cereus* en modelos de interacción con**
el hospedador

Ivanna Sabrina Rolny

Director: Dr. Pablo Fernando Pérez

2013

EL PRESENTE TRABAJO,
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS (UNLP), FUE REALIZADO
EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
EN CRIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y EN LA CÁTEDRA DE
MICROBIOLOGÍA, BAJO LA
DIRECCIÓN DEL DR. PABLO F. PEREZ

A las personas que más quiero:

mis papás, mis hermanas

y Mariano

A mis abuelos

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata por la formación profesional otorgada y en especial al Departamento de Ciencias Biológicas por su apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

A la ANPCyT y al CONICET, por haberme otorgado las respectivas becas para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Cristina Añon y a la Dra. Noemí Zaritzky por abrirme las puertas del CIDCA y permitirme trabajar allí.

A la Dra. Graciela De Antoni, porque me brindó la posibilidad de iniciarme en este camino.

Al Dr. Pablo Pérez, mi director, por su estímulo, por el aporte de sus conocimientos, que nunca dudo en transmitirme y por el apoyo en todos estos años.

A la Dra. Jessica Minnaard. Jessi, gracias por acompañarme desde el inicio, inclusive antes de iniciar la tesis. Por haberme enseñado tantas cosas, por estar todas y cada una de las veces que te necesité, más allá del trabajo en el laboratorio. Por acompañarme en los experimentos. Gracias por escucharme siempre, y sobre todo por convertirme en mi amiga.

A la Dra. María Serradell y la Dra. Patricia Bolla. María y Patito, por acompañarme más allá del laboratorio, por las charlas interminables y los mates compartidos a lo largo de todos estos años, por ofrecerme su amistad.

A la Dra. Silvia Racedo. Sil, una parte muy importante de esta tesis fue gracias a tu participación. Gracias por enseñarme tantas cosas a nivel

profesional. Gracias por la amistad y por todos esos momentos fuera del laboratorio que compartimos.

A mis compañeros del CIDCA y de la Cátedra, porque me acompañaron a diario durante todos estos años y siempre que necesite algo de ellos estuvieron presentes. Porque es muy valioso trabajar con gente que uno disfruta ver también por fuera del ámbito laboral. A Fernando, Martín, Mica, Aye, Ale, Fer, Marina, Judith, Caro, Lucía, Luciana, Pablo, Analía, Grace, Patricio, Angela, Raúl y Robert. Gracias a todos por los buenos momentos compartidos.

A Puli, Esteban, Eli, Mauricio, Marcelo, Ceci y de nuevo a Jessi, María y Pato que me acompañan o acompañaron a diario en el laboratorio, y que hicieron del lugar de trabajo, un lugar increíble! Por estar en las buenas y en las malas. Gracias por todos esos momentos compartidos, y sí, también muchas gracias por la paciencia, sobre en este último tiempo.

A la gente de la cátedra de Microbiología, con quienes tengo la suerte de compartir muchas horas, dentro y fuera del laboratorio. Sobre todo gracias a Moni, Pity, Tere, Vane y Juan, por dejar de ser solo compañeros ocasionales, por esas charlas interminables, con muchos mates de por medio.

A Vanina Perez y Diana Lauff por la ayuda con las microscopías confocales. Por hacer que tantas horas compartidas no lo parezcan tanto.

A los chicos del Lysin porque siempre atendieron mis consultas y por incluirme como una más al grupo en los congresos compartidos. En especial a David por la ayuda en las RT-PCR y a Nico por las consultas de citometría atendidas.

A la Dra. Mariela Bollati, por recibirme en su laboratorio y permitirme realizar mi trabajo. A mis compañeras del IPMont, en especial a Inés y Jose, por hacerme sentir como una más en el laboratorio. Por ayudarme en los experimentos y análisis.

A la Dra. Eugenia Rodríguez y su grupo de trabajo por cedernos una gran cantidad de reactivos y conocimientos.

No quiero dejar de agradecer a tantos amigos por fuera del laboratorio y a mis suegros que de alguna manera, y a lo mejor sin saberlo, me ayudaron para llegar hasta acá.

No puedo dejar de emocionarme al llegar al punto de agradecimiento a mis padres, Mónica y José. Gracias! Porque sin sus sacrificios no podría haberme formado profesionalmente, porque siempre me apoyaron para seguir adelante, y aunque muchas veces no comprendieron mis horarios de laboratorio, siempre estuvieron a mi lado. Gracias por enseñarme todas las cosas que me ensañaron por fuera de lo profesional, gracias por su amor, por la paciencia y por el apoyo incondicional. Gracias por haberme dado dos hermanas. Los amo.

A mis hermanas, Nadia y Daiana. Gracias por todo lo compartido en la vida, por estar en las buenas y en las malas. Gracias por estar siempre!

A mi cuñadito Fran por el tiempo compartido, a Dai y Coco por el diseño de la tapa. A Na por ayudarme a ordenar la biblio.

A mis abuelos, Blanca, Ildemar, Bruno y Dirce, porque siempre me estimularon a seguir formándome. Por todos los años que compartimos, aunque nunca es suficiente el tiempo. Se que estarían orgullosos. Siempre los recuerdo y los llevo en mi corazón. Fueron, son y serán una parte mucho más que importante en mi vida.

A vos mi amor, por tu contención en todos estos años a mi lado. Por tu amor incondicional, por ser el amor de mi vida. Por que éste es también un logro tuyo. Por bancarte mis crisis. Por ayudarme y estar a mi lado día a día, en las buenas y en las malas. Te amo con todo mi corazón.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

<i>Bacillus cereus</i>	1
Microbiota intestinal: composición y funciones	6
Control de la microbiota intestinal	8
Microorganismos benéficos	11
BIBLIOGRAFÍA	15
OBJETIVOS	29

CAPÍTULO 1

INTERACCIÓN DE *BACILLUS CEREUS* CON CÉLULAS FAGOCÍTICAS MURINAS

INTRODUCCIÓN	31
MATERIALES Y METODOS	
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	39
Cepas de <i>Bacillus cereus</i>	39
Condiciones de crecimiento	40
Células eucariotas	
RAW264.7	40
Marcación de los microorganismos	41
Ensayo de infección en macrófagos	43
Cuantificación de la asociación por microscopía de fluorescencia	44
Análisis de la fagocitosis de <i>B. cereus</i> por citometría de flujo	45
Cinética de muerte de <i>B. cereus</i> en macrófagos peritoneales	46
Estudio de necrosis celular	46
Estudio de localización de <i>B. cereus</i> en compartimentos tardíos de la vía endocítica	
LAMP-1	47
Compartimentos ácidos	50
Estudio de localización de <i>B. cereus</i> en endosomas de reciclaje	51
Análisis de la expresión de MHC-II y CD86 en los macrófagos infectados	52
Análisis estadístico	52

RESULTADOS

Marcación de los microorganismos	53
Efecto del agregado de azul tripán	54
Asociación de <i>B. cereus</i> con células fagocíticas	55
Fagocitosis por citometría de flujo	57
Efecto de la infección con <i>B. cereus</i> sobre la viabilidad de los macrófagos peritoneales	60
Viabilidad de <i>B. cereus</i> dentro de macrófagos	62
Localización de <i>B. cereus</i> en diferentes compartimentos celulares	63
Localización de <i>B. cereus</i> en compartimentos tardíos de la vía endocítica.	64
Localización de <i>B. cereus</i> en compartimentos ácidos.	68
Estudio de endosomas de la vía de reciclaje	77
Expresión de MHC-II y CD86 en la superficie de macrófagos	79

DISCUSIÓN	81
------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	93
---------------------	----

CAPÍTULO 2

EFFECTOS DE OTROS MICROORGANISMOS SOBRE LA INTERACCIÓN DE *B. CEREUS* CON CÉLULAS EUCARIOTAS

INTRODUCCIÓN	103
---------------------	-----

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	107
Cepas	107
Condiciones de crecimiento	108
Células eucariotas	109
RAW264.7	109
HT-29	109
HT-29 (NF- κ B-GFP)	110
Células Dendríticas	110
Opsonización de los microorganismos	111
Marcación de los microorganismos	111
Ensayo de infección en macrófagos	112

Cuantificación de bacterias asociadas a los macrófagos por microscopía	113
Ensayo de fagocitosis por citometría de flujo	114
Expresión de marcadores de la superficie celular	115
Evaluación de la activación del factor de transcripción de NF- κ B en células HT-29	116
Asociación de <i>Bacillus cereus</i> a las células HT-29	117
Estudio de la respuesta ante la infección en un sistema de co-cultivo de células eucarióticas	118
Caracterización de las células dendríticas por citometría de flujo	120
Análisis de interacción de <i>B. cereus</i> con enterocitos y CD	122
Medición de citoquinas	122
Análisis estadístico	124
RESULTADOS	
Marcación de los microorganismos	125
Interacción de lactobacilos y bifidobacterias con macrófagos	
Ensayos de microscopía	126
Ensayos por citometría de flujo	128
Expresión de moléculas coestimuladoras	131
Evaluación de la activación del factor de transcripción NF- κ B por <i>B. cereus</i> y <i>Lactobacillus</i> en células HT-29	132
Asociación de <i>Bacillus cereus</i> a las células HT-29 y expresión de IL-8	135
Análisis de la respuesta generada por la infección en co-cultivos de células epiteliales intestinales y células dendríticas	
Caracterización de las células dendríticas por citometría de flujo y análisis de marcadores de superficie	138
Análisis de adhesión de <i>B. cereus</i> a células epiteliales y dendríticas	140
Medición de citoquinas	141
DISCUSIÓN	145
BIBLIOGRAFÍA	155

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON *BACILLUS CEREUS*

INTRODUCCIÓN	165
MATERIALES Y MÉTODOS	
Animales empleados	173
Cepa y condiciones de crecimiento	173
Infección con <i>B. cereus</i> B10502	174
Determinación de los efectos de la infección en la estructura histológica	175
Determinación de células productoras de mucus	177
Estudio del acceso de <i>B. cereus</i> a diferentes tejidos	177
Localización de <i>B. cereus</i>	177
Caracterización de poblaciones celulares en respuesta a la infección	
Obtención de las poblaciones celulares	180
Caracterización de diferentes poblaciones celulares	181
Análisis por citometría de flujo	182
Estudio de citoquinas en la infección con <i>B. cereus</i> B10502	184
Análisis estadístico	185
RESULTADOS	
Infección con <i>B. cereus</i>	187
Efectos macroscópicos de la infección con <i>B. cereus</i>	187
Efectos de la infección en la estructura histológica	189
Células caliciformes	190
Análisis de localización de <i>B. cereus</i>	192
Efecto de la infección sobre el balance de poblaciones celulares	194
Estudio de células CD4+ y CD8+	194
Estudio de células B220+ y de la expresión de MHC	196
Expresión de MHC-II en la población macrofágica	198
Estudio de la población de células dendríticas y de la expresión de CD86	202
Estudio de la expresión de citoquinas por RT-PCR	204
DISCUSIÓN	207

BIBLIOGRAFIA 221

CONCLUSIONES GENERALES 227

APÉNDICE 229

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
BHIG	Caldo cerebro-corazón adicionado con glucosa
CD	Célula dendrítica
Ces	Cereulide
CF	Citometría de flujo
CFDA-SE	5(6) succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína
CPA	Célula presentadora de antígeno
CytK	Citotoxina K de <i>Bacillus cereus</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimum Essentials medium
FSC	Foward Scatter
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
HBL	Hemolisina BL de <i>Bacillus cereus</i>
HIyII	Hemolisina II de <i>Bacillus cereus</i>
hs	Horas
IL	Interleuquina
INF- γ	Interferon- γ
LLO	Listeriolisina O
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAMPs	Microbe-associated molecular patterns
MDI	Multiplicidad de infección
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Min	Minutos
ml	Mililitro
MQ	Macrófagos
MRS	Caldo de Man, Rogosa y Sharpe
ND	No determinado
NF- κ B	Factor nuclear kappa B

Apéndice

NHE	Enterotoxina no hemolítica de <i>Bacillus cereus</i>
NHEA	Componente A de la NHE
NK	Célula natural killer
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos
NRLs	Receptor tipo Nod
PAMPs	Pathogen-associated-molecular patterns
p/p	Peso en peso
p/v	Peso en volúmen
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PLC	Fosfolipasa C
PP	Placas de Peyer
PRRs	Pattern recognition receptors
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Side Scatter
TLRs	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UFC	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volúmen en volúmen
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro

Introducción general

INTRODUCCIÓN GENERAL

BACILLUS CEREUS

El grupo *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus sensu lato*) contiene siete especies relacionadas: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus (sensu stricto)*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephannensis* y *Bacillus medusa* (Bavykin *et al*, 2004). La homogeneidad del grupo en cuanto a pruebas bioquímicas y características fenotípicas, y la transferencia horizontal de información genética hacen muy difícil la identificación. Muchas características (o ciertos marcadores) de este grupo se hallan codificadas en plásmidos (Sergeev *et al*, 2006; Helgason *et al*, 2000; Cardazzo *et al*, 2008; Kolsto *et al*, 2009). Cualquier movimiento de este elemento genético, ya sea la pérdida o adquisición del mismo, hace indistinguible las especies del grupo (Slamti y Lereclus, 2005). Algunos autores como Helgason y colaboradores, sostienen que son una misma especie, siendo *B. cereus* la más antigua de todas (Helgason *et al*, 2000).

Bacillus cereus (sensu stricto) es un bacilo largo Gram positivo, catalasa positivo, puede encontrarse suelto o formando cadenas, y es móvil por flagelos peritricos. Esporula rápidamente en condiciones normales y la germinación es altamente dependiente de adecuadas condiciones ambientales (Kotiranta *et al.*, 2000). Puede desarrollar aeróbicamente y crece en un amplio rango de temperaturas que abarca desde los 10°C y alcanza los 55°C. Esta característica explica el desarrollo de *B. cereus* en temperaturas de refrigeración. Ambas formas del microorganismo, la forma vegetativa y la esporulada, se encuentran en un amplio rango de ambientes. Es un microorganismo que no posee requerimientos nutricionales complejos, lo que hace posible encontrarlo en diversos lugares, como en tierra, aguas naturales y vegetación. También lo podemos hallar en varios tipos de alimentos, sobre todo cereales y derivados, leche, alimentos secos, especias, productos cárneos y vegetales

(Kramer y Gilbert, 1992). Por otro lado, *Bacillus cereus*, es habitante de la microbiota intestinal de muchos invertebrados, y aunque no sea muy frecuente, si las bacterias comienzan a multiplicarse rápidamente, se pueden producir infecciones en el hospedador, ya sea en vertebrados como en invertebrados (Jensen *et al*, 2003).

Este microorganismo constituye un grave problema para la industria alimentaria ya que los esporos, además de la resistencia que ofrecen al calor y a las radiaciones ionizantes, tienen propiedades hidrofóbicas que les permiten adherirse a distintas superficies inanimadas, muy comunes en las líneas de producción (Husmark y Rönner, 1990; Wiencek *et al*, 1991). Además la formación de biofilm protege a los esporos y formas vegetativas de la acción de agentes desinfectantes (Stenfors Arnesen *et al*, 2008).

Bacillus cereus esta implicado en patologías tanto intestinales como no intestinales. En lo que respecta a las extraintestinales, se incluyen las endoftalmitis (Beecher y Wong, 1994¹; Moyer *et al*, 2008; Durand, 2013), endocarditis (Thomas *et al*, 2012, Barraud *et al*, 2012), osteomielitis, infecciones en la cavidad oral (Kotiranta *et al*, 1998), septicemias, peritonitis, neumonia y meningitis (Rowan *et al*, 2001, Lede *et al*, 2011; Wright *et al*, 2011; Miyata *et al*, 2013). En el caso de las endoftalmitis, es capaz de producir el desprendimiento de la retina y necrosis, provocando una pérdida de la visión permanente (Beecher *et al*, 1995; Callegan *et al*, 2007; Novosad *et al*, 2011). Estas infecciones no intestinales se dan principalmente en pacientes inmunocomprometidos, adictos o pacientes en convalecencia de una cirugía (Rasko *et al*, 2005; Slamti y Lereclus, 2005; Schoeni y Lee Wong, 2005; Bottone, 2010). Dos tipos de síndromes se atribuyen al consumo de alimentos, el síndrome diarreico y el síndrome emético. El síndrome emético se asocia al consumo de alimentos como el arroz, leche y derivados, pastas y fórmulas infantiles (Szabo *et al*, 1991) y presenta un cuadro similar al de la intoxicación con *Staphylococcus aureus* (Schraft y Griffiths, 2006). Se identificó en 1970 asociado al consumo de arroz frito (Gilbert *et al*, 1974), luego, en 1995 se aisló la toxina emética, y fue llamada cereulide. La misma se encuentra estrechamente relacionada a la valinomicina (Agata *et al*, 1995). Este cuadro se caracteriza por un proceso rápido de náuseas y

vómitos (ocasionalmente diarreas) que se inician entre los 30 minutos y las 5 horas luego de ingerido el alimento contaminado, la duración del cuadro esta entre las 6 y 24 horas (Stenfors Arnesen *et al*, 2008). El alimento debería contener entre 10^5 y 10^8 células por gramo de alimento para que se produzca el cuadro clínico.

El síndrome diarreico se describió en detalle, por primera vez, por Hauge (1955) quien evaluó un brote de gastroenteritis debida al consumo de postre de vainilla en un hospital; este postre contenía un alto número de *B. cereus* (más de 10^8 UFC/ml). El síndrome se produce por la ingestión de microorganismos contenidos en productos lácteos, vegetales o carnes. Los esporos ingeridos con los alimentos germinan en el intestino delgado y, durante la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, se producen los factores extracelulares entre los que se encuentran las enterotoxinas causantes del síndrome diarreico (Griffiths, 2010). Los períodos de incubación en este caso, se encuentran entre las 8 y 16 horas, y se resuelven entre las 12 y 24 horas (Kramer y Gilbert, 1992). Se pueden presentar nauseas, pero es muy raro que se produzca el vómito. Varios factores extracelulares intervienen en el cuadro y por eso es importante un estudio integral de los mismos. Sumado a estos datos, hay investigaciones que demuestran que las células vegetativas son capaces de resistir las condiciones ácidas del estómago (Wijnands *et al*, 2009); esto aumentaría aún más las probabilidades de que *B. cereus* acceda al intestino. La dosis de infección se encuentra entre las 10^5 y 10^8 células o esporos, pero se sabe que con dosis de 10^3 células se han producido enfermedades (Kramer y Gilbert, 1992). Por otro lado, se ha tenido en cuenta a la capacidad de adhesión al enterocito como factor de virulencia (Andersson *et al*, 1998; Rowan *et al*, 2001; Minnaard *et al*, 2004)

La patogénesis del síndrome diarreico, se asoció por primera vez a una enterotoxina en 1972 (Spira y Goepfert, 1972) usando un sistema de asa ligada en conejo. Sumado a estos ensayos biológicos, los ensayos sobre líneas de cultivo celular como células CHO (Buchanan y Schultz, 1994), Caco-2 (Minnaard *et al* 2001, Minnaard *et al* 2004, Minnaard *et al* 2007; Minnaard *et al* 2013; Ramarao y Lereclus, 2006; Didier *et al*, 2012) y McCoy (Jackson, 1993) entre otras, son muy

utilizados al momento de estudiar la toxicidad de cepas de *B. cereus*. Las toxinas asociadas al cuadro se nombran en la tabla 2.

La afección cursa generalmente de forma benigna, con diarreas acuosas sin evidencia de invasión de los tejidos o leucocitos en la materia fecal, sin embargo, puede resultar severa en niños de corta edad y en ancianos (Beecher y Wong, 1994²). El cuadro diarreico suele autolimitarse, y en casos severos puede necesitarse la reposición de líquidos. En el caso del cuadro emético, pueden encontrarse episodios más severos de enfermedad. Mahler y colaboradores describieron el caso de un joven de 17 años de edad que presentó síntomas del cuadro emético por *B. cereus* y luego murió por falla renal (Mahler *et al*, 1997).

Tabla 1. Toxinas relacionadas con *B. cereus*. En la tabla se resumen algunas características de enterotoxinas y la toxina emética. Entre paréntesis se detalla el tamaño de las proteínas en kDa.

Toxina	Características	Referencia
Hemolisina BL (HBL)	Enterotoxina de tres componentes: B (38,0), L ₁ (38,5) y L ₂ (43,2) asociada a diarrea y a infecciones necróticas	Beecher y Wong, 1994 ² Beecher y Wong, 1997 Fagerlund <i>et al</i> , 2010 Esbelin <i>et al</i> , 2012
Enterotoxina no hemolítica (NHE)	Enterotoxina de tres componentes: NheA (41,0), NheB (39,8) NheC (36,5).	Lund y Granum, 1996 Granum <i>et al</i> , 1999 Fagerlund <i>et al</i> , 2010 Didier <i>et al</i> , 2012
<i>B. cereus</i> enterotoxina T (BcET)	Enterotoxina. Único componente (41). La bibliografía indica que esta proteína no produce diarreas ^a .	Agata <i>et al</i> , 1995 a. Choma y Granum, 2002
<i>B. cereus</i> enterotoxina (EntFM)	Enterotoxina. Único componente (45) ^a . También llamada CpwFM ^b . Es una peptidasa de la pared celular	a. Asano <i>et al</i> , 1997 b. Tran <i>et al</i> , 2010
Enterotoxina S	Enterotoxina (45). Su gen, entS, contiene una identidad en la secuencia de 97% con entFM.	Ghelardi <i>et al</i> , 2002

Citolisina K (CytK)	Enterotoxina. Único componente (34). Relacionada con enteritis necrótica. Similar a las proteínas formadoras de poro presentes en <i>S. aureus</i> y <i>C. perfringens</i>	Lund <i>et al</i> , 2000 Fagerlund <i>et al</i> , 2010
Hemolisinas	Hemolisina II ^{b,d} , Hemolisina III formadora de poros transmembrana ^c y Hemolisina IV ^c con fuerte efecto sobre la membrana plasmática ^d .	a. Shinagawa <i>et al</i> , 1991 b. Baida y Kuzmin, 1996 c. Beecher y Wong, 2000 d. Sineva <i>et al</i> , 2012
Cereolisina O	Citolisina tiol activada que se une al colesterol. Hemolisina sensible al calor.	Alouf, 2000 Henderson <i>et al</i> , 1999 Brillard and Lereclus, 2007
Fosfolipasa C	Se conocen tres. Fosfatidilinositol, Fosfatidilcolina y esfingomielinasa.	Granum y Nissen, 1993 Beecher <i>et al</i> , 1995 Beecher y Wong, 2000 Cronin y Wilkinson, 2008 Oda <i>et al</i> , 2010
Proteasas	Con roles que podrían estar asociados a las patologías no intestinales.	Kotiranta <i>et al</i> , 2000
Cereulide	Toxina asociada al síndrome emético (1,2)	Agata <i>et al</i> , 1995 Andersson <i>et al</i> , 2007 Takeno <i>et al</i> , 2012
InhA1	Metaloproteasa bacteriana (73) componente del exosporium. Interviene en la liberación del espora de los macrófagos	Ramarao y Lereclus, 2006
IIsA	Es una proteína de superficie rica en leucina que regula la adquisición de hierro	Daou <i>et al</i> , 2009
Certhrax	Es una mono-ADP-ribosiltransferasa homóloga	Visschedyk <i>et al</i> , 2012

La actividad toxigénica de *B. cereus*, se ha estudiado a través de variadas

metodologías. Existen métodos inmunoquímicos comerciales como el RPLA (del inglés: reverse passive latex agglutination) de Oxoid que reacciona con la subunidad L₂ del complejo HBL, y bajo el formato de un ELISA, el kit BDE (del inglés: *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin) de TECRA que detecta la proteína NheA que es parte del complejo NHE. Para la determinación directa en alimentos de las toxinas NHE y HBL Merck dispone de Duopath® *Cereus* Enterotoxins. La confirmación final de que una cepa resulte enterotoxigénica, se puede obtener usando un ensayo de citotoxicidad sobre líneas celulares eucarióticas como se mencionó previamente. También se han utilizado ensayos de hemaglutinación (Gorina, 1975), y PCR (Mäntynen y Lindström, 1998).

Microbiota intestinal: composición y funciones

La comunidad microbiana intestinal del humano es compleja y la componen al menos 1000 especies bacterianas diferentes. Se ha estimado que la microbiota del tracto gastrointestinal es de 10 veces el número de células del cuerpo, llegando a pesar entre 1 y 2 kilos (Neish, 2009; Blaser y Musser, 2001). La composición de esta microbiota varía entre individuos, sin embargo permanece estable por largos períodos en cada sujeto (Day y Sherman, 1998; Yoshioka et al., 1983). Cerca del 80 % de las especies que se encuentran distribuidas a lo largo del tracto digestivo, no son cultivables (Hooper y Gordon, 2001), esto dejó de ser un inconveniente para la clasificación microbiana, principalmente sobre los microorganismos intestinales, gracias a la implementación de los métodos moleculares. Los métodos moleculares permitieron ganar conocimiento sobre la diversidad de la comunidad microbiana intestinal, incluso permitieron la identificación de nuevas especies bacterianas (Eckburg *et al.*, 2005).

En la boca, se encuentran grandes cantidades de bacterias aerobias Gram (+), disminuyendo de manera importante en el estómago dada la acidez gástrica. Las bacterias dominantes tanto en estómago como en duodeno son microorganismos anaerobios facultativos tales como *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus*

spp. y *Streptococcus* spp. La microbiota más abundante se encuentra en el colon, siendo los géneros predominantes anaerobios estrictos tales como *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. y *Bacteroides* spp., y en menor proporción anaerobios facultativos *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli* y *Lactobacillus* spp. (Eckburg *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2005; Young y Huffman, 2003). Una importante proporción de la microbiota intestinal se halla formada por bacterias potencialmente patógenas para el hospedador (Figura 1).

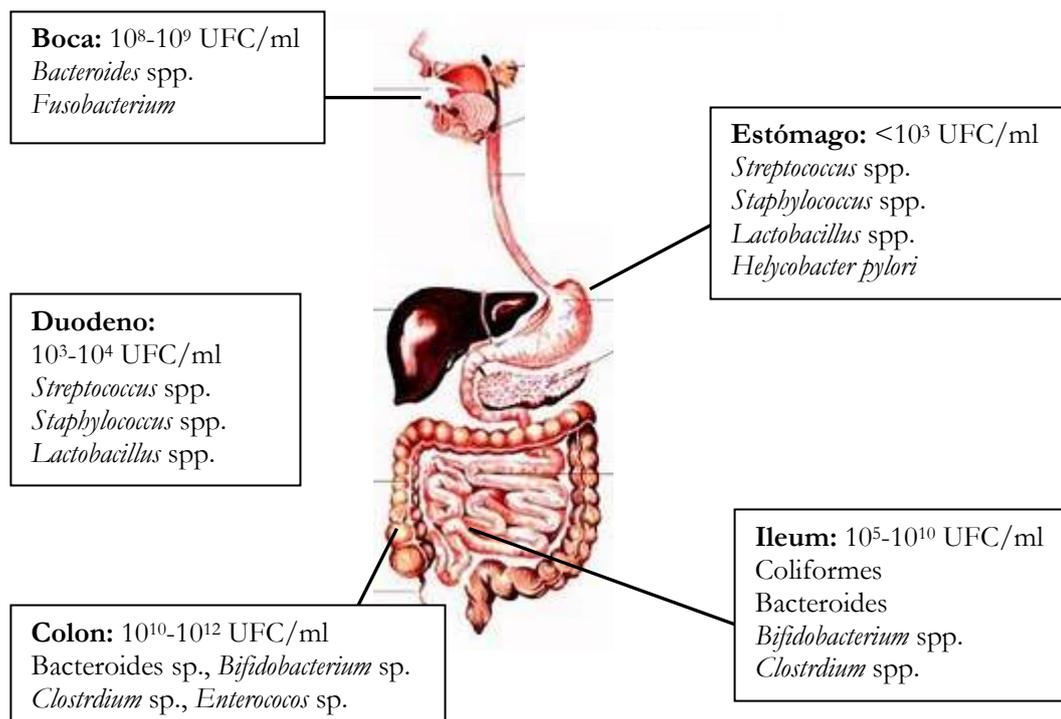


Figura 1. Distribución de microorganismos en el tracto gastrointestinal adulto. (Adaptado de Young y Huffman, 2003)

Una de las funciones de la microbiota intestinal es la de aumentar la eficiencia digestiva del hospedador, ayudando a metabolizar glicanos, degradando polisacáridos dietarios y sintetizando proteínas. Los microorganismos también proveen señales para el desarrollo intestinal, como por ejemplo la maduración de células epiteliales y el desarrollo de linfocitos. Otra función substancial de estos microorganismos es la de proteger al huésped de infecciones por patógenos. Dos factores contribuyen a esta característica, el efecto barrera, que se puede lograr a

través de inhibiciones y de interferencias en la adhesión del patógeno y el efecto modulador, a través del cual, los microorganismos simbióticos estimulan la respuesta inmune contra los patógenos (Hopper y Macpherson, 2010).

Control de la microbiota intestinal

Una estrategia para mantener la homeostasis es minimizar el contacto entre las bacterias del lumen y la superficie de las células epiteliales. Esto se logra usando distintas barreras.

Las células caliciformes, son células epiteliales especializadas que secretan mucinas. Las mucinas forman una capa de gel viscoso llamado mucus que se extiende más de 150 μm de la superficie del epitelio intestinal, formando dos estructuras diferentes (Figura 2). Las bacterias abundan en la capa más externa de mucus, no siendo así en la más interna.

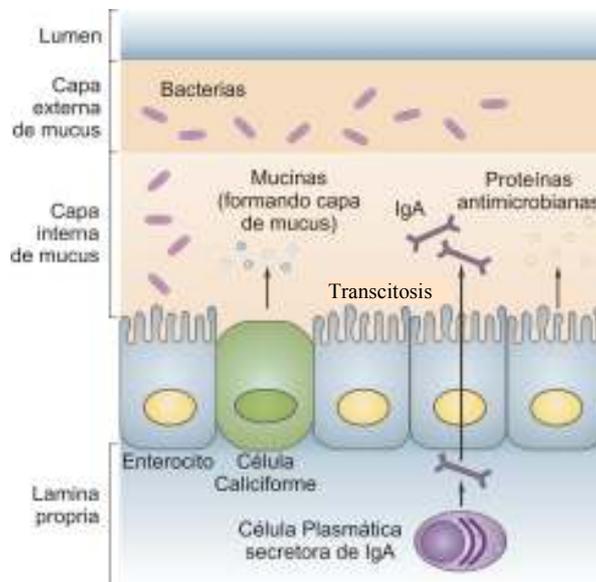


Figura 2: Mecanismos que limitan la interacción de las bacterias con el epitelio. En la figura se pueden ver las células caliciformes, que secretan mucinas; los enterocitos, que también pueden secretar proteínas antimicrobianas; células plasmáticas, que secretan IgA. (Adaptado de Hooper y Macpherson, 2010)

La capa más interna resulta resistente a la penetración bacteriana, limitando el contacto directo entre las bacterias y las células epiteliales. Algunos patógenos han desarrollado mecanismos mediante los cuales pueden penetrar las capas de mucus y alcanzar el epitelio. Por ejemplo, el *Helicobacter pylori*, si bien alcanza la capa de mucus gracias a su movilidad, facilita su llegada al mucus a través de una disminución de la viscosidad del mucus que lo rodea por medio de un aumento del pH, facilitando así su llegada a la pared estomacal. *Salmonella* sp. y *Campylobacter jejuni*, penetran en el mucus intestinal por movilidad.

La secreción de péptidos antimicrobianos está a cargo de las células intestinales epiteliales, incluyendo enterocitos, células caliciformes y células de Paneth. La expresión de estos péptidos antimicrobianos está regulada por diferentes mecanismos como la activación de receptores de reconocimiento de patrones de reconocimiento o por activación de NOD2.

Las defensinas, que son proteínas antimicrobianas, permanecen retenidas en la capa mucosa (Meyer-Hoffert *et al.*, 2008; Mumy y McComick, 2005). Muchos patógenos intestinales han desarrollado mecanismos de resistencia para evadir estas proteínas. *Listeria monocytogenes* desacetila su propio peptidoglicano, evitando de esta manera el ataque por la lisozima, una enzima secretada por las células epiteliales que degrada la pared celular bacteriana (Boneca *et al.* 2007).

La secreción de IgA limita la asociación de las bacterias con la superficie celular del epitelio intestinal y dificulta la entrada de las bacterias endógenas a través del epitelio. La IgA específica para bacterias intestinales, se produce con la ayuda de células dendríticas que detectan a las bacterias del lumen. Estas células dendríticas, envían las señales apropiadas a los linfocitos B y T que se encuentran en las placas de Peyer, de esta manera se induce a los linfocitos B para que los mismos se diferencien a células plasmáticas productoras de la IgA adecuada (Figura 2). La IgA pasa a través de la monocapa de células epiteliales al lumen por transcitosis, donde se une a las bacterias limitando su asociación con el epitelio y previniendo el paso de las mismas por el tejido del huésped. (Macpherson *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2004; Brandtzaeg, 2009; Hooper *et al.*, 2012)

Pese a que el mucus, las proteínas antimicrobianas y la IgA secretoria trabajan en conjunto para proteger a la barrera de células epiteliales intestinales del contacto directo con las bacterias, el gran número de bacterias intestinales lleva a pensar que un ocasional paso de las bacterias es inevitable. Es por esto que es necesario un reconocimiento y ataque inmediato de estos microorganismos que cruzan la barrera epitelial por parte del sistema inmune intestinal.

Las bacterias comensales que pasan la barrera epitelial, son rápidamente fagocitadas y eliminadas por los macrófagos de la *lamina propria*. Estos macrófagos se encuentran en gran número en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y se hallan en contacto con el epitelio (Lee *et al.*, 1985). La evasión de este mecanismo de defensa, ya sea por escapatoria o supresión de la fagocitosis, es frecuentemente usada por los patógenos intestinales. Ejemplos de estos patógenos son la *Salmonella* sp., *M. tuberculosis* y *Shigella* sp. que inhiben los mecanismos microbicidas de los macrófagos, permitiendo a estos patógenos sobrevivir y replicarse en los tejidos del huésped. Las células fagocíticas alojadas en la mucosa cumplen un rol importante en el mantenimiento de las relaciones simbióticas con la microbiota, ayudando en la restauración de la integridad física de la barrera epitelial luego de los daños.

El sistema inmune adaptativo, en particular el compartimento de mucosas, esta profundamente modelado por la presencia de la microbiota comensal intestinal. Esto incluye el incremento del tamaño y número de los centros germinales en las placas de Peyer (Shroff *et al.*, 1995) y en el número de células plasmáticas productoras de IgA (Benveniste *et al.*, 1971). De los tejidos linfoides de mucosas, el asociado al tracto gastrointestinal es uno de los cuales contiene el mayor número de linfocitos, además de ser uno de los más caracterizados.

En un adulto, la mucosa intestinal contiene el 80 % de las células B activadas del cuerpo (Brandtzaeg, 2009). A este tejido linfoide, se lo suele encontrar nombrado como GALT, de su nombre en inglés, Gut-Associated Lymphoid Tissue. Anatómicamente, se puede dividir en dos compartimentos,

GALT organizado, que es el inductor de la respuesta inmunitaria intestinal; y GALT difuso, que es el efector de la respuesta.

El GALT organizado, esta constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. Son los responsables de capturar los antígenos lumenales y promover la respuesta inmunitaria.

El GALT difuso, esta integrado por poblaciones de linfocitos dispersos en el entramado epitelial o en la *lamina propria*. Las células inmunitarias se diferencian y ejercen su función.

Las placas de Peyer, son agregados de folículos linfoides principalmente ubicados en el intestino delgado, donde se encuentran las células M. Las células M (del inglés, *microfold*) son capaces de censar antígenos y microorganismos y pasarlos al dominio subepitelial por transcitosis. Estas células poseen una baja secreción de mucinas y presentan una superficie apical y basolateral modificada respecto al resto de las células del epitelio intestinal (Neutra *et al*, 1996; Artis, 2008). En las Placas de Peyer también se encuentran folículos y centros germinales de células B, que se encuentran rodeados por áreas que contienen predominantemente células T. En el GALT también encontramos sitios efectores, principalmente en la *lamina propria* de las vellosidades intestinales. Los linfocitos que se encuentran en la *lamina propria* son principalmente células plasmáticas secretoras de IgA y células T de memoria (Nagler-Anderson, 2001, Brandtzaeg, 2009).

Microorganismos benéficos

Hace más de 100 años, Elie Metchnikoff sugirió que parte de esta microbiota tenía propiedades benéficas para la fisiología del epitelio intestinal y para la salud del hospedador (Metchnikoff, 1907). Al mismo tiempo, Henry Tissier, un pediatra francés, observó que los niños con diarrea, tenían en sus heces

microorganismos con una peculiar morfología, la forma de Y, y el número de los mismos era bajo, sin embargo, estas bacterias eran abundantes en los niños sanos (Tissier, 1906). Estos trabajos fueron los primeros en sugerir el uso de bacterias como probióticos (del griego “*pro bios*”, por la vida), aunque el uso de la palabra probióticos comenzó en 1960 para referirse a las sustancias producidas por algunos microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly y Stillwell, 1965). La referencia del término probiótico, fue cambiando a lo largo de los años, la definición más reciente, aunque probablemente no la última, es “microorganismos vivos, que al ser consumidos en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso en el huésped” (Guarner y Schaafsma, 1998).

El rol de las bacterias probióticas en la salud, se vincula con el mejoramiento nutricional de los alimentos que lo contienen, como por ejemplo la liberación de aminoácidos y vitaminas, relacionadas con la prevención de ciertos tipos de cáncer (Fernandes *et al.*, 1987; O’Sullivan *et al.*, 1992) y con el control de los niveles de colesterol en sangre (Lin, 2003). También son conocidos los beneficios de estos microorganismos frente a algunas infecciones intestinales (Fernández *et al.*, 1987). Las bacterias probióticas pueden proteger el intestino también de otras maneras: por competencia de la adhesión al epitelio intestinal con los microorganismos patógenos, reforzando las uniones estrechas entre los enterocitos, modulando la producción de mucus, inducción de defensinas e IgA, mejorando la respuesta inmune de la mucosa frente a los patógenos (Winkler *et al.*, 2007; O’Flaherty *et al.*, 2010).

Varios científicos han demostrado que algunos microorganismos inactivados, e incluso sus componentes celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso en la salud (Ouweland *et al.*, 1998, Isolauri *et al.*, 2002), por lo que todos estos hallazgos deberán considerarse en futuras revisiones del concepto de probiótico.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los probióticos son microorganismos que promueven la salud de quienes los ingieren, y para que puedan considerarse como tales es necesario que cumplan una serie de

características. Entre estas se incluyen, su origen, la tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal, las cepas deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, para garantizar que lleguen viables al intestino, para esto es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares, y que sean capaces de colonizar el intestino del huésped, para esto, deben de ser capaces de colonizar el intestino y adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos.

En lo que se refiere al origen de las cepas, se requeriría ser de origen humano, ya que parecería, que las cepas aisladas de seres humanos sanos van a presentar una mayor facilidad para permanecer en el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”). Sin embargo, también se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.

BIBLIOGRAFÍA

Agata N, Ohta M, Mori M and Isobe M. 1995. A Novel Dodecadeptide, Cereulide, Is An Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol. Lett. 129: 17-20.

Alouf JE. 2000. Bacterial Protein Toxins. Chapter 1 in Bacterial Toxins. Methods and Protocols. Vol. 145 in Methods in Molecular Biology. Ed. by Otto Holst, Humana Press.

Andersson A, Granum P, and Rönner U. 1998. The Adhesion of *Bacillus cereus* Spores To Epithelial Cells Might Be An Additional Virulence Mechanism. Intern. J Food Microb. 39: 93-99.

Andersson MA, Hakulinen P, Honkalampi-Hämäläinen U, Hoornstra D, Lhuguenot JC, Mäki-Paakkanen J, Savolainen M, Severin I, Stamatati AL, Turco L, Weber A, von Wright A, Zucco F, Salkinoja-Salonen M. 2007 Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. Toxicon. 49:351-67

Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of comensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. Nature reviews Immunology. 8: 411-420.

Asano SI; Nukumizu Y; Bando H; Ilzuka T y Yamamoto T. 1997. Cloning of Novel Enterotoxin Genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Applied Env. Microb. 63: 1054-1057.

Baida GE y Kuzmin NP. 1995. Mechanism Of Action of Hemolysin III From *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta 1284: 122-124.

Barraud O, Hidri N, Ly K, Pichon N, Manea P, Ploy MC, Garnier F. 2012. Pacemaker-associated *Bacillus cereus* endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74:313-5.

Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariev V, Kelly JJ, Jackman J, Stahl DA, Cherni A. 2004. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J Clin Microbiol.* Aug; 42:3711-30.

Beecher D and Wong A. 1997. Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*: Hemolytic Analysis of Component Interactions and a Model For Its Characteristic Paradoxical Zone Phenomenon. *The J. of Biol. Chemistry.* 273: 233-239.

Beecher DJ and Lee Wong AC. 1994¹. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1646-1651.

Beecher DJ and Lee Wong AC. 1994². Improved Purification and Characterization of Hemolysin BL, A Hemolytic Dermonecrotic Vascular Permeability Factor from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 62: 980-986.

Beecher DJ and Wong ACL. 2000. Cooperative, Synergistic And Antagonistic Haemolytic Interactions Between Haemolysin BL, Phosphatidylcholine Phospholipase C And Sphingomyelinase From *Bacillus cereus*. *Microb.* 146: 3033-3039.

Beecher, D. J.; Pulido, J. S.; Barney, N. P. and Lee Wong, A. C. 1995. Extracellular Virulence Factors In *Bacillus cereus* Endophthalmitis: Methods And Implication of Involvement Of Hemolysin BL. *Infect. Immun.* 63: 632-639.

Benveniste J, Lespinats G, Salomon J. 1971. Serum and secretory IgA in axenic and holoxenic mice. *J Immunol.* 107:1656-62.

Blaser MJ, Musser JM. 2001. Bacterial polymorphisms and disease in humans. *J Clin Invest.* 107:391-2.

Boneca IG, Dussurget O, Cabanes D, Nahori MA, Sousa S, Lecuit M, Psylinakis E, Bouriotis V, Hugot JP, Giovannini M, Coyle A, Bertin J, Namane A, Rousselle JC, Cayet N, Prévost MC, Balloy V, Chignard M, Philpott DJ, Cossart P, Girardin SE. 2007. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 997–1002.

Bottone EJ. 2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 23: 382-398

Brandtzaeg P. 2009. Mucosal Immunity: Induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 70: 505-515.

Brillard J and Lereclus D. 2007. Characterization Of A Small PlcR-Regulated Gene Co-Expressed With Cereolysin O. *BMC Microb.* 7:52-60.

Buchanan RL, Schultz FJ. 1994. Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Lett Appl Microbiol.* Nov;19:353-6.

Callegan MC, Gilmore MS, Gregory M, Ramadan RT, Wiskur BJ, et al. 2007. Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interaction. *Prog Retin Eye Res* 26: 189–203.

Cardazzo, B.; Negrisola, E.; Carraro, L.; Alberghini, L.; Patarnello, T. y Giaccone, V. 2008. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. *Applied And Environmental Microbiology*. 74: 850–860

Choma C, Granum PE. 2002. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. *FEMS Microbiol Lett*. 217:115-9.

Cronin UP, Wilkinson MG. Monitoring growth phase-related changes in phosphatidylcholine-specific phospholipase C production, adhesion properties and physiology of *Bacillus cereus* vegetative cells. 2008. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35:1695-703.

Daou N, Buisson C, Gohar M, Vidic J, Bierne H, Kallassy M, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. 2009. IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS Pathog*. 5:e1000675.

Day A, Sherman PM. 1998. Normal intestinal flora: pathobiology and clinical relevance. *Internal Seminary on Pediatrics Gastroenteral Nutrition*. 7: 2–7.

Didier A, Dietrich R, Gruber S, Bock S, Moravek M, Nakamura T, Lindbäck T, Granum PE, Märklbauer E. 2012. Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components. *Infect Immun*. 80:832-8

Durand ML. Endophthalmitis. 2013. *Clin Microbiol Infect*. 19:227-34. doi: 10.1111/1469-0691.12118.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308: 1635-8.

Esbelin J, Jouanneau Y, Duport C. 2012. *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiol*. 12:125

Fagerlund A, Lindbäck T, Granum PE. . 2010 *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol*. 10:304. doi: 10.1186/1471-2180-10-304

Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Rev*. 46: 343-356.

Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S. Barsotti, C.; Baggiani, A. and Senesi, S. 2002. Identification And Characterization of Toxigenic *Bacillus cereus* Isolates Responsible For Two Food-Poisoning Outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett*. 208: 129-134.

Gilbert RJ, Stringer MF, Peace TC. 1974. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *J Hyg (Lond)*. Dec; 73:433-44.

Gorina LG; Fluer FS; Olovnikov AM y Ezepeuk YV. 1975. Use Of The Aggregate-Hemagglutination Technique For Determining Exo-Enterotoxin of *Bacillus cereus*. 29: 201-204.

Granum PE and Nissen H. 1993. Sphingomyelinase Is Part Of The 'Enterotoxin Complex' Produced By *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett*. 110: 97-100.

Granum PE, O'Sullivan K, Lund T 1999. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 1999 Aug 15; 177(2):225-9.

Griffiths MW. 2010. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. En Pathogens toxins in foods. Challenges and interventions. Ed: Vijay K. Juneja y John N. Sofos. Cap 1.

Guarner F, Schaafsma GJ. 1998: Probiotics. Int J Food Microbiol, 39: 237-238.

Helgason, E.; Økstad, O. A.; Caugant, D. A.; Johansen, H. A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I. y Kolstø, A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- one species on the basis of genetic evidence. Applied and Environmental Microbiology. 66:2627–2630.

Henderson B; Wilson M; McNab R y Lax A. 1999. Bacterial Proteins Toxins. Chapter 7 in Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease. Ed: John Wiley and Sons, UK, p.: 273-310.

Hooper LV y Gordon JI. 2001. Commensal host–bacteria relationships in the gut. Science. 292, 1115–1118.

Hooper LV y Macpherson AJ. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol. 10:159-169.

Hooper LV; Littman DR; Macpherson AJ. 2012. Interaction between the microbiota and the Immune System. Science. 336: 1268-1273.

Husmark, U. and Rønner U. 1990. Forces Involved In Adhesion of *Bacillus cereus* Spores To Solid Surfaces Under Different Environmental Conditions, J. of Applied Bacteriology. 69: 557-562.

Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. 2002. Probiotics – a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*. 50: 54-59.

Jackson SG. 1993. Rapid Screening Test for Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus* J Clin Microbiol. April; 31: 972–974

Jensen, G. B.; Hansen, B. M.; Eilenberg, J. and Mahillon, J. 2003. The Hidden Lifestyles of *Bacillus cereus* and Relatives. *Environm. Microbiology*. 5: 631-640.

Kolstø AB, Tourasse NJ, Økstad OA. 2009. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol*. 63:451-76.

Kotiranta A; Haapasalo M; Kirsti K; Kerosuo E; Olsen I; Sorsa T; Meurman J; and Lounatmaa K. 1998. Surface Structure, Hydrophobicity, Phagocytosis, and Adherence to Matrix Proteins of *Bacillus cereus* Cells With And Without The Crystalline Surface Protein Layer. *Infection and Immunity*. 66: 4895- 4902

Kotiranta A; Lounatmaa K and Haapasalo, M. 2000. Epidemiology and Patogénesis of *Bacillus cereus*. *Infections. Microbes and Infection*. 2: 189-198.

Kramer JM y Gilbert RJ. *Bacillus cereus* Gastroenteritis. Chapter 6 in Food Poisoning. Handbook of Natural Toxins. Volume 7. Ed. by A. T. Tu. Marcel Dekker, Inc. NY, 1992. p. 119-153.

Lede I; Vlaar A; Roosendaal R; Geerlings S and Spanjaard L. 2011. Fatal Outcome of *Bacillus cereus* septicaemia. *Neth J M*. 69: 514-516

Lee SH, Starkey PM, Gordon S. 1985. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J. Exp. Med*. 161, 475–489.

Ley, R. E., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124: 837–848.

Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147: 747-748.

Lin DC. 2003. Probiotics as functional foods. *Nutr Clin Pract*. Dec;18(6):497-506.

Lund T; De Buyser ML and Granum PE. 2000. A New Cytotoxin From *Bacillus cereus* That May Cause Necrotic Enteritis. *Mol. Microbiol*. 38: 254-261.

Lund T, Granum PE. 1996. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett*. 141:151-6.

Macpherson A J; Gatto D; Sainsbury E; Harriman GR; Hengartner H; Zinkernagel RM. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288 (5474):2222–2226.

Mahler H; Pasi A; Kramer JM; Schulte P; Scoging AC; Bar W; Krähenbühl S. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med*. 336:1142-8.

Mäntynen V and Lindström K. 1998. A Rapid PCR-Based DNA Test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. May; 64: 1634–1639.

Metchnikoff E (1907): *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London: 161-183.

Meyer-Hoffert, U. Hornef MW, Henriques-Normark B, Axelsson LG, Midtvedt T, Pütsep K, Andersson M. 2008. Secreted enteric antimicrobial activity localizes to the mucus surface layer. *Gut*. 57:764-71.

Minnaard J, Delfederico L, Vasseur V, Hollmann A, Rolny I, Semorile L and Pérez PF. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 197-206.

Minnaard J, Humen M and Pérez P. 2001. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cell. *J Food Prot.* 64:1535-1541.

Minnaard J, Lievin-Le Moal V, Coconnier M, Servin A and Pérez P. 2004. Disassembly of F-Actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiates human intestinal caco-2 cells. *Infect. Immun.* 72:3106-3112.

Minnaard J, Rolny IS and Pérez PF. 2013. Interaction between *Bacillus cereus* and cultured human enterocytes: effect of calcium, cell differentiation and bacterial extracellular factors. *J. Food Protection*. En prensa.

Miyata J, Tasaka S, Miyazaki M, Yoshida S, Naoki K, Sayama K, Asano K, Fujiwara H, Ohkusu K, Hasegawa N, Betsuyaku T. 2013. *Bacillus cereus* necrotizing pneumonia in a patient with nephrotic syndrome. *Intern Med.* 52:101-4.

Moyer AL; Ramadan RT; Thurman J; Burroughs A and Callegan MC. 2008. *Bacillus cereus* Induces Permeability of an In Vitro Blood-Retina Barrier. *Infection and Immunity.* 76: 1358–1367.

Mummy, KL y McCormick BA. 2005. Events at the Host-Microbial interface of the gastrointestinal tract II. Role of the intestinal epithelium in patogen-induced inflammation. *Am J Physiol Liver Physiol* 288: G854-G859.

Nagler-Anderson C. 2001. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol*. 1: 59-67.

Neish AS. 2009. Microbes in Gastrointestinal Health and Disease *Gastroenterology*. January; 136(1): 65–80.

Neutra MR, Frey A, y Kraehenbuhl JP. 1996. Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*. 86: 345–348.

Novosad BD, Astley RA, Callegan MC. 2011. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 in experimental *Bacillus cereus* endophthalmitis. *PLoS One*. 6: e28619

O'Sullivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, Collins JK 1992. Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci Technol*. 3: 309-314.

Oda M, Takahashi M, Matsuno T, Uoo K, Nagahama M, Sakurai J. 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta*. 1798:1073-80

O'Flaherty S, Saulnier DM, Pot B, Versalovic J. 2010. How can probiotics and prebiotics impact mucosal immunity? *Gut Microbes*. 1:293-300. Epub 2010 Jul 7.

Ouwehand AC, Salminen S. 1998The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J*. 8: 749-758.

Ramarao, N. and Lereclus, D. 2006. Adhesion and Cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to Epithelial Cells Are FlhA and PlcR Dependent, Respectively. *Microbes and Infection*. 8: 1483-1491.

Rasko D; Altherr M; Han C; and Ravel J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* Group of Organisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 29:303-329.

Rowan N; Deans K; Anderson J; Gemmell C; Hunter I and Chaithong T. 2001. Putative Virulence Factor Expression by Clinical and Food Isolates of *Bacillus spp.* After Growth in Reconstituted Infant Milk Formulae. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3873-3881.

Schoeni JL and Lee Wong AC. 2005. *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins *Journal of Food Protection*, 68: 636–648.

Schraft H and Griffiths MW. 2006. Chapter 15: *Bacillus cereus* gastroenteritis In *Foodborne and intoxications* (3ed). Edited by Hans P. Riemann and Dean O. Cliver.

Sergeev, N.; Distler, M.; Vargas, M.; Chizhikov, V.; Herold, K.; Rasooly, A. 2006. Microarray Analysis of *Bacillus cereus* Group Virulence Factors. *J. Microbiological Methods*. 65: 488-502.

Shinagawa K; Ichikawa K; Matsusaka N; Sugii, S. 1991. Purification And Some Properties of a *Bacillus cereus* Mouse Lethal Toxin. *J. Vet. Med. Sci*. 53: 469-474.

Shroff KE, Meslin K, y Cebra JJ. 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect Immun*. 63: 3904–3913.

Sineva E, Shadrin A, Rodikova EA, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Protsenko AS, Mayorov SG, Galaktionova DY, Magelky E, Solonin AS. 2012. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin_II_via global regulator Fur. J Bacteriol. 194:3327-35

Slamti, L. and Lereclus, D. 2005. Specificity and Polymorphism of the Plc-R-PapR Quorum-Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. J. Bacteriology. 187: 1182-1187

Spira WM and Goepfert JM. 1972. *Bacillus cereus*-Induced Fluid Accumulation in Rabbit Ileal Loops. Appl Microbiol. 24: 341-348.

Stenfors Arnesen LP; Fagerlund A and Granum PE. 2008. From Soil To Gut: *Bacillus cereus* and Its Food Poisoning Toxins. FEMS Microbiol Rev. 32: 579-606.

Suzuki, K. , Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, Fagarasan S. 2004. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. Proc. Natl Acad Sci U S A. 101:1981-6.

Szabo RA, Speirs JI and Akhtar M. 1991. Cell Culture Detection and Conditions For Production of a *Bacillus cereus* Heat- Stable Toxin. J. Food Prot. 54: 272- 276.

Takeno A, Okamoto A, Tori K, Oshima K, Hirakawa H, Toh H, Agata N, Yamada K, Ogasawara N, Hayashi T, Shimizu T, Kuhara S, Hattori M, Ohta M. 2012. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* NC7401, which produces high levels of the emetic toxin cereulide. J Bacterial. 194:4767-8

Thomas, BS; Bankowski, MJ; and Laua, W.K. K. 2012. Native Valve *Bacillus cereus* Endocarditis in a Non-Intravenous-Drug-Abusing Patient. JCM. 50:519-521

Tissier H. 1906 Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. CR Soc Biol. 60: 359-361.

Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. 2010. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. J Bacteriol. 192:2638-42

Visschedyk D, Rochon A, Tempel W, Dimov S, Park HW, Merrill AR. 2012 Certhrax toxin, an anthrax-related ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*. J Biol Chem. 287:41089-102

Wiencek, K. M.; Klapes, N. A. and Foegeding, P. M. 1991. Adhesion of *Bacillus* Spores to Inanimate Materials: Effects Of Substratum And Spore Hydrophobicity. Biofouling. 3: 139-149.

Wijnands LM; Pielat A; Dufrenne JB; Zwietering MH and van Leusden FM. 2009. Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. Journal of Applied Microbiology. 106:258–267

Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeir J, Kraehenbuhl JP. 2007. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. J Nutr. 137 (3 Suppl 2):756S-772S.

Wright AM, Beres SB, Consamus EN, Long SW, Flores AR, Barrios R, Richter GS, Oh SY, Garufi G, Maier H, Drews AL, Stockbauer KE, Cernoch P, Schneewind O, Olsen RJ, Musser JM. 2011 Rapidly Progressive, Fatal, Inhalation Anthrax-like Infection in a Human: Case Report, Pathogen Genome Sequencing, Pathology, and Coordinated Response. Archives of Pathology & Laboratory Medicine: 135: 1447-1459.

Yoshioka H, Iseki K, Fujita K.1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*. 72:317-21.

Young RJ, Huffman S. 2003 Probiotic use in children. *Journal of Pediatrics Health Care*. 17: 277-283.

Objetivos

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos por los cuales los microorganismos intestinales interaccionan con las células del hospedador en especial en lo que respecta a aquellos eventos relacionados con su transporte dentro de células del sistema inmune y al antagonismo de los efectos de patógenos intestinales por microorganismos probióticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar qué tipo de interacciones se establecen entre *B. cereus* y células fagocíticas. Determinación del destino intracelular y la supervivencia de este microorganismo.

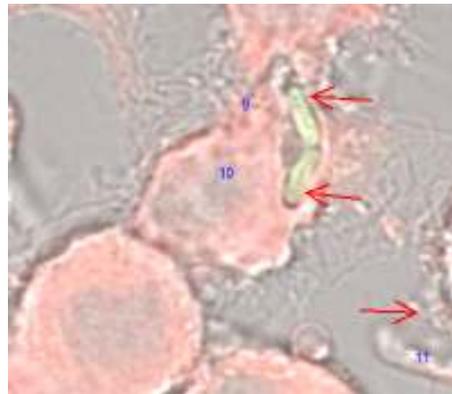
2. Establecer la capacidad de otros microorganismos de interferir en la interacción de *B. cereus* con células epiteliales y células dendríticas. Estudio de la respuesta generada sobre estas células.

3. Desarrollo de un modelo murino de infección con *B. cereus*.



Capítulo I

Interacción de *Bacillus cereus* con células fagocíticas murinas



INTRODUCCIÓN

Un importante lugar de interacción entre un microorganismo intestinal y el hospedador, esta constituido por las células epiteliales de la mucosa intestinal. Sin embargo, los patógenos son capaces de atravesar esta monocapa e interactuar directamente con células profesionales del sistema inmune. Tanto en la superficie de células epiteliales como fagocíticas, se producen receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés Pattern Recognition Receptors) que reconocen moléculas expresadas en la superficie de los microorganismos. Estas moléculas se nombraron en un principio, como “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP, del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns), pero al conocerse la expresión de los mismos sobre microorganismos no patógenos se los comenzó a llamar “patrones moleculares asociados a microorganismos” (MAMP, del inglés Microbe-Associated Molecular Patterns). Los MAMP, se encuentran altamente conservados en microorganismos de la misma clase, y esto permite que los mamíferos puedan reconocer casi la totalidad de los mismos con un bajo número de PRR (Palm y Medzhitov, 2009; Rhee, 2011).

Dos familias de receptores tienen un rol importante en la detección de los MAMP, los receptores del tipo Toll, y los receptores tipo NOD (de localización intracelular) (Winkler *et al*, 2007; Rosenstiel, 2013). En el caso de los receptores tipo Toll expresados sobre las células epiteliales, se sabe que las señales enviadas por los mismos, estimulan a los enterocitos a liberar citoquinas relacionadas con el reclutamiento de células dendríticas y neutrófilos, como así también a la liberación de ciertos productos antimicrobianos como las defensinas (Didierlaurent *et al.*, 2005; Hooper y Macpherson, 2010).

Los macrófagos tienen un papel muy importante en la respuesta inmune, contribuyen tanto en la eliminación del patógeno, como en la presentación de antígenos. La interacción de los microorganismos con las células fagocíticas involucra una variedad de receptores que detectan moléculas microbianas

directamente o a través de opsoninas. Luego de la unión del microorganismo a la célula fagocítica, ocurren una serie de eventos que permiten que el microorganismo sea internalizado. Estos pasos incluyen la invaginación de la membrana celular alrededor del microorganismo y la posterior maduración del fagosoma. Para que suceda la invaginación del microorganismo, debe ocurrir un remodelamiento de la actina de manera de permitir la elongación de pseudópodos. En este proceso, se encuentran involucrados los lípidos fosforilados como componentes de vías de señalización.

Los lípidos fosforilados están implicados en la regulación de la transducción de señales en la superficie de células eucarióticas, en la arquitectura del citoesqueleto, en la dinámica de las membranas y las funciones de transporte de las mismas (Di Paolo y De Camilli, 2006; Bohdanowicz *et al.*, 2010). La dinámica de los cambios de composición en los fosfolípidos de membrana define el estado de maduración del fagosoma. En los primeros momentos de formación del fagosoma, la membrana plasmática se encuentra transitoriamente enriquecida en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), luego disminuye su cantidad, desde la base del fagosoma, y comienza a incrementarse la cantidad de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃), que persiste inclusive luego del sellado del fagosoma. A tiempos tardíos, se acumula fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P). Este aumento resulta marcadamente notable en los fagosomas tempranos, pero al pasar a fagosomas tardíos se reemplazan por fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PI(3,5)P₂), que se mantiene en los lisosomas (Flannagan *et al.*, 2012).

En la maduración, el fagosoma no sólo va cambiando la composición de lípidos de su membrana, sino también la de proteínas (Desjardins *et al.*, 1994; Flannagan *et al.*, 2009) adquiriendo marcadores de membrana específicos a lo largo de estos pasos, donde se va fusionando secuencialmente con endosomas tempranos, tardíos y finalmente con lisosomas.

Inmediatamente luego de la internalización del patógeno, comienza la metamorfosis del fagosoma y empiezan a alterarse las propiedades bioquímicas del mismo. Tanto los cambios en la membrana como los cambios internos son

debidos a vesículas que van desde y/o hacia la vacuola; estos procesos son coordinados por las GTPasas Rab. Las proteínas Rab alternan su conformación entre una forma unida a GTP, la forma activa, y otra unida a GDP (Stenmark y Olkkonen, 2001). Una vez que se activan, estas proteínas se asocian a varias moléculas efectoras que se encuentran relacionadas, entre otras cosas, al tráfico vesicular, la fusión y fisión vesicular e inclusive, en la activación de otras proteínas Rab (Flannagan *et al* 2012). Los fagosomas tempranos adquieren Rab5 que, junto con la molécula efectora, el antígeno 1 de endosomas tempranos (EEA-1, del inglés Early Endosomal Antigen 1), coordinan el tráfico endocítico y son necesarios para la fusión del recientemente formado fagosoma con endosomas tempranos (Lowe *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2007; Flannagan *et al.*, 2009). Cabe resaltar que los fagosomas tempranos tienen un pH de entre 6,1 y 6,5 y que, además, no tienen una importante actividad hidrolítica.

El proceso de maduración se continúa con la generación del fagosoma tardío. Este fagosoma está caracterizado por un pH más ácido que el del estadio anterior. En el fagosoma tardío el pH varía entre 5,5 y 6,0 debido a un aumento de la entrada de protones por la ATPasa vacuolar (Faim y Grinstein, 2012); además esta enriquecido en proteasas y proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP, del inglés Lysosomal Associated Membrane Proteins) que provienen del complejo de Golgi o de la fusión con endosomas tardíos. Comienza a ser reemplazado el Rab5 por Rab7, que es un marcador característico de esta organela y se sabe que media el tráfico entre fagosomas y endosomas tardíos o lisosomas (Flannagan *et al.*, 2009; Faim y Grinstein, 2012).

En los fagosomas tardíos también se detecta la presencia del receptor de manosa 6 fosfato (M6PR, del inglés Mannose 6-Phosphate Receptor) y Rab9 entre otros (Vieira *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2012) (Tabla 1). Las proteínas LAMP están relacionadas al mantenimiento del bajo pH intralisosomal como también con la protección contra la autodigestión (Griffiths, 1996). Se ha demostrado que esta proteína, también resulta esencial en el reclutamiento de Rab7 y en la adquisición de las funciones microbicidas del fagosoma (Huynh *et al.*, 2007).

El proceso de maduración culmina con la formación del fagolisosoma, generado por fusión con lisosomas a través de procesos que involucran a Rab7; son organelas muy ácidas, con valores de pH de 4,5. Se caracteriza por su capacidad microbicida y degradativa. En su interior presentan enzimas hidrolíticas como la catepsina D, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), y proteínas y péptidos con propiedades antimicrobianas, entre otros. Esta organela, también se caracteriza por la presencia de LAMP-1 y la pérdida de PI(3)P y M6PR en su membrana (Vieira *et al.*, 2002; Flannagan *et al.*, 2012).

La figura A.I.1 presenta un esquema resumido del proceso de maduración de los fagosomas.

Estas diferentes características que se presentan a lo largo de la maduración del fagosoma, como lo son las diferentes proteínas expresadas en la superficie del fagosoma o la acidificación en el proceso de maduración, se utilizan como herramientas en el estudio de internalización de microorganismos por las células eucariotas a través de la vía endocítica (Tabla A.I.1).

Tabla A.I.1: Marcadores moleculares de las diferentes organelas de la vía endocítica. Tabla adaptada de Vieira *et al.*, 2002.

Organela	Marcadores	pH
Endosoma y fagosoma temprano	EEA1 Rab5 PI(3)P Transferrina	6,1 – 6,5
Endosoma y fagosoma tardío	Rab7 Rab9 Receptor de manosa 6 fosfato LAMP-1	5,5 – 6,0
Lisosoma y fagolisosoma	LAMP-1 Catepsina D	4,5 – 5,4

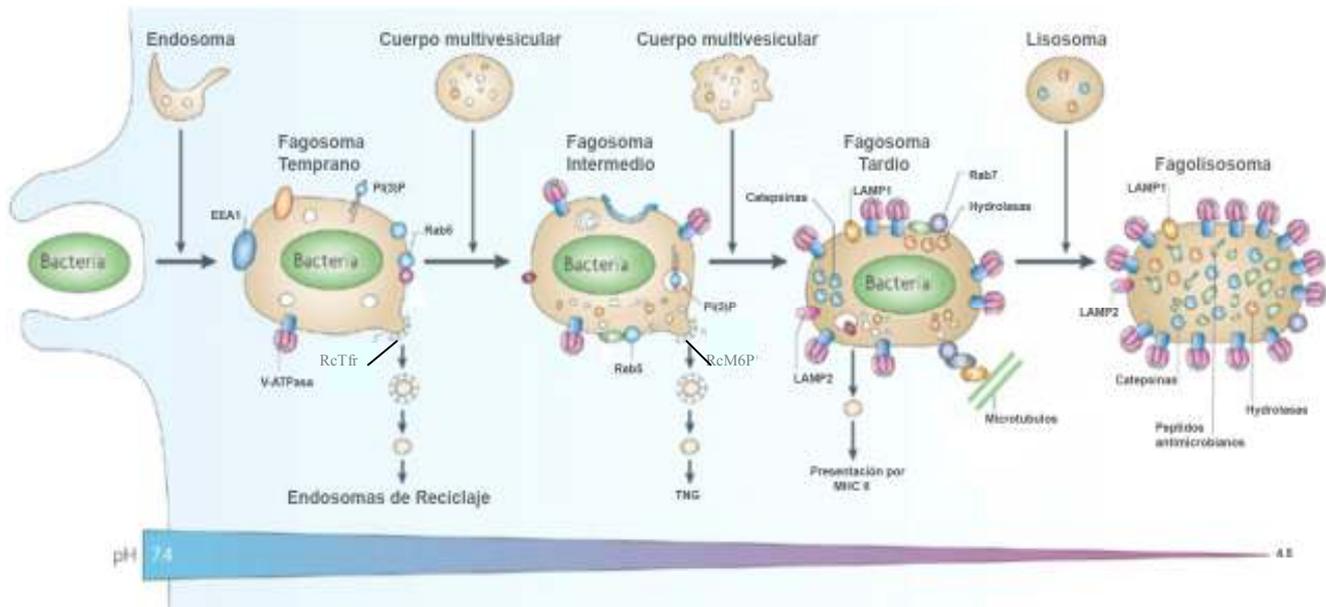


Figura A.I.1. Estados de maduración del fagosoma. Luego de la internalización de la bacteria, el fagosoma pasa por una serie de transformaciones secuenciales que resultan de la interacción con diferentes subcompartimentos de la vía endocítica. Se conocen diferentes estados de maduración llamados: fagosoma temprano, fagosoma intermedio, fagosoma tardío y fagolisosoma. En los pasos de maduración, el fagosoma va adquiriendo hidrolasas y se va acidificando debido al pasaje de protones por la bomba V-ATPasa. EEA1: antígeno 1 de endosomas tempranos; LAMP: proteínas de membrana asociadas a lisosomas; PI(3)P: fosfatidilinositol-3-fosfato; RcTrf: Receptor de transferrina; RcM6P: Receptor manosa 6 fosfato. (Figura adaptada de Flannagan *et al.*, 2009).

Una ruta alternativa de endocitosis es a través de endosomas de reciclaje. La internalización del hierro unido a la transferrina se hace por esta vía mediante los receptores de transferrina (Tfr, del inglés Transferrin receptor). La transferrina cargada de hierro se une a receptores de la superficie celular a pH neutro, y resulta internalizada vía endocitosis mediada por receptores; el hierro se libera en la célula y la apotransferrina (Transferrina sin hierro unido) queda unida al receptor, éste es finalmente reciclado a la superficie celular (Dautry-Varsat *et al.*, 1983) y en este camino confluyen con las vías de endosomas tempranos (Spiro *et al.*, 1996).

Los estudios de colocalización con transferrina, determinan si los microorganismos tienen acceso a la célula a través de endosomas de reciclaje y también se utilizan como una prueba de la naturaleza temprana de los endosomas en los cuales se encuentran esos microorganismos debido a que no llegan a lisosomas. Algunos microorganismos, como *Bordetella pertussis* (Lamberti *et al.*, 2008) y *Salmonella typhimurium* (Steele-Mortimer *et al.*, 1999) tienen acceso a estas vías para obtener nutrientes y sobrevivir dentro de la célula.

Los patógenos han desarrollado una gran variedad de estrategias para evitar ser reconocidos y/o fagocitados por las células fagocíticas profesionales (Aderem y Underhill 1999; Booth *et al.* 2001; Obermüller *et al.* 2002; Hume *et al.* 2002; Hume 2006). Obviamente, estos mecanismos, dependen del patógeno y pueden incluir el bloqueo o reprogramación de la generación del fagolisosoma, de escape del fagosoma, o la sobrevivencia en el medio lisosomal (Pieters 2001; Tavares *et al.* 2007; Goy *et al.* 2008; Lamberti *et al.* 2008; Fernández-Arenas *et al.* 2009; Lamberti *et al.*, 2010). Otras bacterias son resistentes a uno o varios factores antimicrobianos de los fagocitos o son capaces de degradarlos, y otros microorganismos expresan enzimas detoxificantes como la catalasa, que neutralizan especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno (Flannagan *et al.*, 2009).

Aunque varias bacterias usan uno o varios de los mecanismos de resistencia, sólo los integrantes de un grupo selecto son denominados “patógenos intracelulares profesionales” (Flannagan *et al.*, 2009). Entre ellos podemos mencionar *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Chlamydia trachomatis* (Flannagan *et al.*, 2012)

La infección con *Bacillus cereus* puede llevar a patologías intestinales con cuadros eméticos y diarreicos, y no intestinales, como endoftalmitis, endocarditis, septicemias, peritonitis, neumonías y meningitis (Kotiranta *et al.*, 2000; Bottone, 2010). En lo que se refiere a las afecciones del sistema gastrointestinal, el ingreso al huésped puede ser debido a una ingestión oral de esporas, que luego de pasar por el tracto digestivo germinan en el intestino y las bacterias vegetativas producen

diferentes factores extracelulares con actividad biológica (Beecher *et al.* 1995; Lund y Granum 1997; Beecher y Wong 2000; Toh *et al.*, 2004; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). La virulencia de este microorganismo podría estar relacionada no sólo a los factores extracelulares que presenta, sino también a la capacidad de adherirse, o incluso invadir, enterocitos (Andersson *et al.*, 1998; Minnaard *et al.*, 2004). En particular para las cepas estudiadas en esta tesis, se han analizado estas capacidades sobre células Caco-2, obteniéndose como resultado una invasión de las células para las cepas M2, T1 y 2 pero una ausencia de invasión para la cepa B10502 (Minnaard *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la diversidad en la actividad biológica, correlaciona con la presencia de secuencias específicas en el genoma bacteriano (Minnaard *et al.*, 2007).

La infección de enterocitos humanos en cultivo con células vegetativas de *B. cereus* lleva a una desorganización en el citoesqueleto (Minnaard *et al.*, 2004), y también a una disminución del valor de TEER (Minnaard *et al.*, 2013), indicando que la infección estaría afectando las uniones estrechas entre las células. Esto permitiría pensar que las regiones basolaterales de los enterocitos podrían estar involucradas en la invasión (Minnaard *et al.*, 2013).

Para profundizar los conocimientos sobre la infección de *B. cereus* se decidió estudiar la interacción de este microorganismo con células fagocíticas. En bibliografía se encuentran varios trabajos de interacción de *Bacillus* spp. con células fagocíticas, pero debido a la importancia epidemiológica, estos se centran en *B. anthracis* y sobre todo en sus esporas. La comprensión de la interacción de *B. cereus* con células fagocíticas resulta de importancia para completar el panorama de patogénesis de este microorganismo.

En este capítulo de tesis se utilizarán modelos de células fagocíticas murinas. Estos estudios permitirán avanzar en el conocimiento sobre la interacción del microorganismo con estas células y el destino intracelular de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Cepas de *Bacillus cereus*:

Para la realización de los ensayos, se utilizaron cuatro cepas de *Bacillus cereus* seleccionadas por sus diferentes características (tabla I.1).

Tabla I.1. Cepas de <i>B. cereus</i> utilizadas		
Cepa	Origen	Referencia
<i>B. cereus</i> B10502	Intoxicación alimentaria. Gentilmente provista por el Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires	Minnaard <i>et al.</i> , 2004.
<i>B. cereus</i> M2	Leche descremada en polvo, aislada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.	Minnaard <i>et al.</i> , 2001.
<i>B. cereus</i> 2	Fórmula infantil. Aislada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.	Minnaard <i>et al.</i> , 2001.
<i>B. cereus</i> T1	Intoxicación alimentaria. Gentilmente cedida por el Dr. R. Buchanan del <i>US Department of Agriculture, ARS Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, Philadelphia, USA.</i>	Buchanan y Schultz, 1992.

El cepario de *B. cereus* se realizó a partir de cultivos de 16 hs de cada cepa a 32°C en caldo BHI (Caldo Cerebro Corazón según sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion) (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, Francia) adicionado de glucosa al 0,1 % (p/v) (BHIG). La siembra de las cepas se realizó al 4 % (v/v) en 5 ml de caldo BHIG y se incubaron a 32°C con agitación durante 16 hs. Luego se centrifugaron 10 minutos a 900 g y los microorganismos se resuspendieron en caldo BHIG

adicionado de glicerol al 10 % (v/v) como crioprotector. El cepario obtenido se conservó a -80°C .

Condiciones de crecimiento:

Partiendo del cepario conservado a -80°C , las bacterias se inocularon en caldo BHIG (inóculo al 4 % (v/v)) y se incubaron durante 16 hs en agitación y a 32°C . Al cabo de este tiempo, se repicaron en medio BHIG (inóculo al 4 % (v/v)), y se incubaron a 32°C durante 3 hs con agitación, de manera de obtener cultivos en fase exponencial.

CÉLULAS EUCARIOTAS

Para la realización de los ensayos, se utilizaron macrófagos peritoneales asilados de ratón y la línea celular RAW264.7.

RAW264.7 (ATCC TIB-71): Es una línea celular de tipo macrofágico, generada a partir de ratones BALB/c, por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson, tiene capacidad fagocítica y son adherentes. Fueron adquiridas del banco de células del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata). Esta línea se cultivó en RPMI al cual se le agregan penicilina (1000 UI) y estreptomycinina (1000 ug/ml) (Life Technologies, Cergy, France), 2 g/l NaHCO_3 y se suplementa con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (PAA Laboratories, GMBH, Pasching, Austria) (SFB) inactivado por calor (56°C durante 30 min) (en adelante RPMI completo). Las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera con 5 % (v/v) CO_2 – 95 % (v/v) aire. La línea celular se mantuvo en nitrógeno líquido en viales de 1 ml de medio RPMI completo con 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector.

Macrófagos peritoneales: Ratones BALB/c hembras libres de patógenos específicos (SPF), de entre 6 y 8 semanas de edad, se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Los animales se trasladaron al bioterio de experimentación perteneciente a la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata. Los ratones se mantuvieron con agua y una dieta balanceada (Ganave, Alimentos Pilar SA, Argentina) *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación. El sacrificio de los ratones se realizó por inhalación de CO₂.

Los macrófagos peritoneales fueron obtenidos por lavados. Para ello, luego del sacrificio, se inyectaron en la cavidad peritoneal entre 5 a 10 ml de SFA fría (SFA: PBS adicionado con albúmina al 0,1 % y heparina al 0,3 % (Rivero L.A.C.E. S.R.L., Argentina) y se masajeó el abdomen de los ratones por aproximadamente 30 segundos. Se retiró la piel y se realizó un ojal en el peritoneo, luego se aspiró la SFA inyectada. Las células extraídas, se centrifugaron durante 10 min. a 500 g, se retiró el sobrenadante, se lavó con PBS adicionado al 2 % con SFB (PAA Laboratories, GMBH, Pasching, Austria), y se resuspendió en RPMI (Life Technologies, Cergy, France) suplementado al 10 % con SFB. Se contaron las células en cámara de Neubauer y se ajustó a la concentración deseada.

MARCACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Para la marcación de los microorganismos, se tomaron cultivos en fase exponencial y se centrifugaron 15 min. a 900 g. Se realizaron dos lavados con PBS, y luego se suspendieron los microorganismos en RPMI, para proceder a la marcación con 5(6) succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) (Invitrogen).

CFDA-SE es una molécula no polar que espontáneamente penetra la membrana celular y es convertida a la forma aniónica (CFSE) por las esterasas intracelulares, impidiendo que vuelva a pasar por la membrana. La CFSE se une a proteínas intracelulares resultando en una forma estable y retenida en el espacio intracelular (Figura I.1) (Wang *et al.*, 2005). La fluorescencia de las bacterias marcadas puede detectarse por citometría de flujo usando una excitación de 488 nm y detectando la misma en el canal FL1 (Fluorescencia verde)

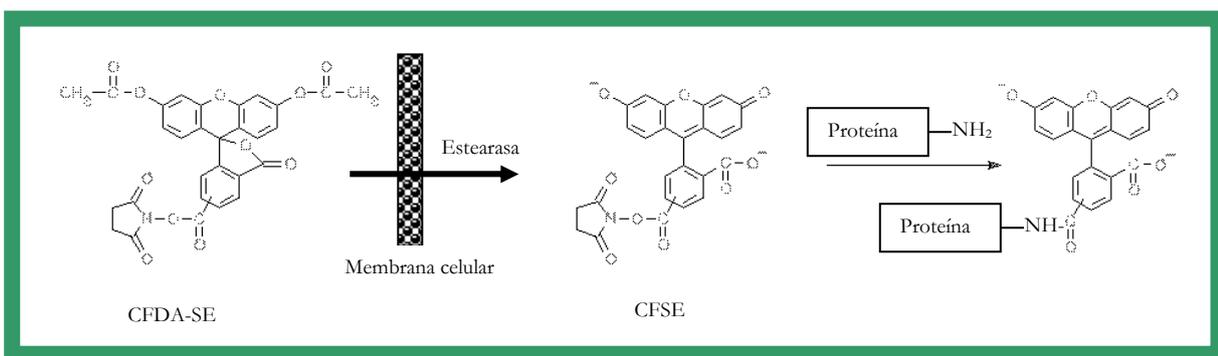


Figura I.1. Mecanismo de marcación celular de CFDA-SE. La CFDA-SE difunde pasivamente al interior celular, donde es convertida a su forma aniónica por la acción de esterasas citosólicas.

Para la marcación de los microorganismos se tomó el cultivo lavado y se resuspendieron las bacterias en RPMI, se agregó CFDA-SE en una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Pils *et al.*, 2006; Tuominen-Gustafsson *et al.*, 2006). Estas muestras se incubaron al abrigo de la luz y en agitación a 37°C durante 30 min. Luego de ese período de incubación, se lavaron los cultivos 3 veces con PBS para retirar todo el marcador en exceso. La CFDA-SE sólo marca células que tengan intacta sus envolturas celulares.

ENSAYO DE INFECCIÓN EN MACRÓFAGOS

Luego de lograr una correcta marcación de los microorganismos, se procedió al estudio de la interacción con sistemas de células fagocíticas. Se puso a punto un protocolo de fagocitosis con macrófagos peritoneales de ratón y se estudió la adhesión e internalización de los microorganismos, su sobrevivencia y el efecto sobre las células eucarióticas luego de la infección. Asimismo se analizó la viabilidad de los macrófagos utilizados, en las condiciones ensayadas de infección. En una siguiente etapa, se estudió el destino intracelular de las bacterias ingeridas utilizando diferentes marcadores.

Para estos estudios, además, se puso a punto el ensayo de fagocitosis utilizando una línea celular macrofágica murina (RAW264.7). Este cambio fue necesario debido al número elevado de células necesarias para los ensayos, la implicancia ética de los ensayos con animales y la estabilidad que presenta el uso de una línea celular respecto a los macrófagos peritoneales.

Los ensayos de infección realizados con las cepas estudiadas de *B. cereus*, tanto en los experimentos con macrófagos peritoneales de animales de experimentación, como para el caso de la línea celular RAW264.7, fueron realizados en condiciones similares, en medio RPMI sólo adicionado con 2 g/l NaHCO₃ (en adelante RPMI Adhesión). Los microorganismos se dejaron interaccionar con las células fagocíticas durante 30 minutos, para permitir la adhesión y/o internalización, usando una multiplicidad de infección (MDI) de 20. Pasado este tiempo de incubación, según el ensayo realizado, se detuvo el experimento o se retiró el medio para reemplazarlo por un medio adicionado de antibiótico. De esta manera, cuando fue necesario un mayor tiempo de incubación, se dejó que la infección prosiguiera sin riesgo de que las bacterias extracelulares se multiplicaran. En cada ensayo, se detallan los protocolos usados.

CUANTIFICACIÓN DE LA ASOCIACIÓN POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los macrófagos peritoneales se infectaron con las cepas de *B. cereus* como se indicó previamente. Pasados los 30 minutos de infección, se procedió a la marcación con naranja de acridina, para lo cual, se tomaron 100 μ l de cada muestra y se colocaron en un dispositivo (Figura I.2) (Humen, 2009) para centrifugar las células sobre un portaobjeto circular. Las muestras se centrifugaron a 500 g por 5 minutos de manera tal que las células se depositen en los portaobjetos (vidrio de 1 cm^2 , Assistant, Alemania). Las muestras se transfirieron a placas de cultivo de 24 fosas para facilitar el manejo, se fijaron con etanol absoluto durante 5 minutos a 4°C, luego se lavaron dos veces con PBS y se agregaron 0,5 ml de naranja de acridina (0,5 μ g/ml en PBS) (Aldrich CHEM. Co., USA) incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, cada vidrio se lavó tres veces con PBS, y luego se montó invertido con glicerol-azida de sodio (Glicerol 50% v/v en PBS adicionado con 0,1% (p/v) de azida de sodio).

Las muestras se examinaron usando un microscopio de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland). Se analizaron un mínimo de 100 células por muestra. Las células unidas a al menos un microorganismo, fueron consideradas para el cálculo del porcentaje de asociación.

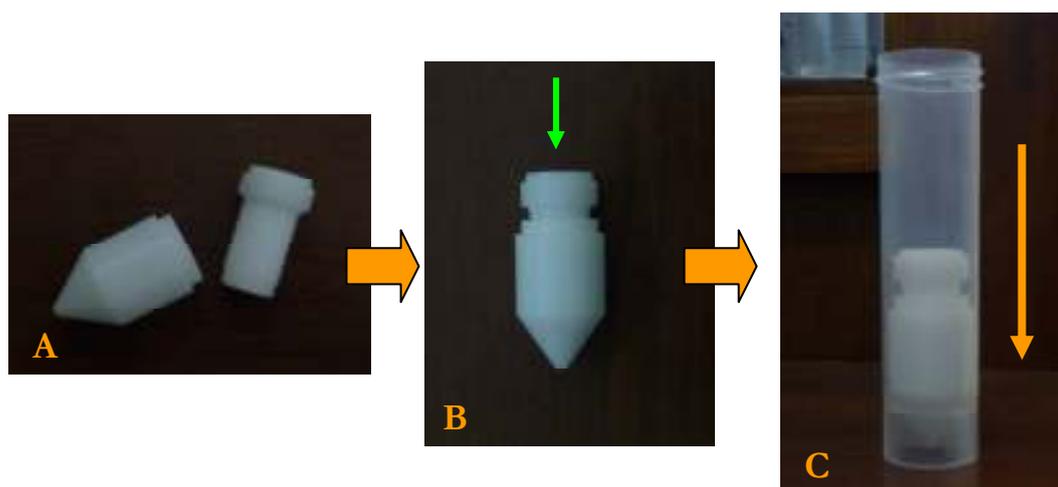


Figura I.2. Dispositivo para concentrar células sobre un portaobjeto circular. Se coloca un portaobjeto circular dentro de la base del dispositivo que se muestra en A, se cierra el dispositivo y se coloca en forma vertical. La muestra se coloca en la parte superior del dispositivo que posee un orificio, como indica la flecha verde de la figura B. Finalmente se coloca el dispositivo en un tubo contenedor (C) para colocarlo en la centrífuga y concentrar las células sobre el portaobjeto circular (Humen, 2009).

ANÁLISIS DE LA FAGOCITOSIS DE *B. CEREUS* POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para los ensayos de fagocitosis por parte de macrófagos peritoneales, se utilizaron las bacterias marcadas con CFDA-SE. Luego de la incubación a 37°C por 30 minutos como se indicó previamente, las muestras se colocaron sobre hielo para detener el proceso de fagocitosis. Para remover las bacterias que no se unieron a los macrófagos, se realizaron dos lavados con PBS frío y se pasaron las muestras a tubos de citometría (BD Biosciences). Se diferenciaron las bacterias internalizadas de las adheridas a la superficie celular, apantallando la fluorescencia de las bacterias no internalizadas con azul tripán (GIBCO Invitrogen Corporation, EEUU) diluido en PBS (Pils *et al.* 2006; Pollak *et al.* 2012). La concentración final alcanzada fue 0,2 % (p/v). Para esto a los tubos seleccionados para apantallar, les fueron agregados 0,5 ml de azul tripán por dos minutos y luego se los lavó dos veces con PBS. Se realizaron los análisis por citometría de flujo. La población macrofágica se localizó por marcación con F4/80 (anti-ratón F4/80 conjugado con

biotina y estreptavidina unida a ficoeritrina, ambos de eBioscience (USA). Se evaluó el porcentaje de microorganismos internalizados a los 30 minutos post-infección. En paralelo con los ensayos, se realizaron los controles correspondientes.

Los análisis se realizaron empleando un equipo FACScalibur Becton-Dickinson. Se adquirieron 10000 eventos para cada muestra.

CINÉTICA DE MUERTE DE *B. CEREBUS* EN MACRÓFAGOS PERITONEALES

Los macrófagos peritoneales se suspendieron en medio RPMI completo a razón de $1,5 \times 10^5$ células por tubo y se infectaron con las cepas de *B. cereus* en una MDI de 20. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C en estufa de CO₂ (5 % CO₂ – 95 % atmósfera de aire). Luego las células se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente y se reemplazó el medio por RPMI Adhesión adicionado de gentamicina (100 µg/ml) (Parafarm, Argentina) para eliminar las bacterias ubicadas extracelularmente. De esta manera se volvieron a incubar por distintos tiempos. Se retiraron de la estufa pasados 60, 90 y 120 minutos según correspondiera, de manera de tener puntos a los 90, 120 y 150 minutos post infección.

Luego de ser retiradas de la estufa, las células fagocíticas se lavaron dos veces con PBS, y se lisaron con agua destilada estéril mediante pasajes sucesivos (3 a 6) por agujas 22G. Las diluciones apropiadas de los lisados se plaquearon en agar nutritivo (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, Francia) y se incubaron por 16 horas a 32°C. De esta manera se determinó el número de bacterias viables intracelulares.

ESTUDIO DE NECROSIS CELULAR

Luego de la infección de los macrófagos peritoneales durante 30 minutos con bacterias marcadas con CFDA-SE siguiendo el protocolo indicado

previamente, las muestras se lavaron dos veces usando PBS adicionado de SFB al 2 % (v/v), se resuspendieron en 0,5 ml de PBS, y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. En un primer paso, las muestras se analizaron para determinar el porcentaje de células que interactúan con bacterias marcadas con CFDA-SE, las cuales son positivas para FL1 (fluorescencia verde). En un siguiente paso, a estos mismos tubos, se les agregó 50 µl de una solución de ioduro de propidio (IP) (10 µg/ml), para determinar el porcentaje de células positivas para la marcación con IP (FL2, fluorescencia roja) y también el porcentaje de células positivas para CFDA-SE y para IP a la vez (se brindan detalles del protocolo en los resultados del estudio de necrosis celular). Los análisis se realizaron para 10000 células por muestra (FACS, Becton-Dickinson y el software CellQuest). Aquellas células que resultaron positivas para IP (FL2) se consideraron necróticas, y si presentaban doble fluorescencia (FL1 y FL2), se consideraron células necróticas asociada a bacterias.

ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN DE *B. CEREUS* EN COMPARTIMENTOS TARDÍOS DE LA VÍA ENDOCÍTICA

- LAMP-1

Para este ensayo, se utilizó la línea celular RAW264.7, usando para el desarrollo de las mismas el medio RPMI completo. Las células se sembraron (2 x 10⁵ células/ml) en botellas de cultivo de 75 cm² (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania) y se incubaron a 37°C con CO₂ 5 % por 72 horas, hasta alcanzar un 80 % de confluencia. De esta manera se llegó a tener 1 x 10⁷ células/ml en cada botella con un contenido de 15 ml de medio de cultivo. Para proceder a la infección de los macrófagos, se retiró el medio de cultivo de las botellas y se reemplazó por RPMI Adhesión conteniendo las bacterias marcadas con CFDA-SE, en una cantidad que permitió llegar a una MDI de 20. Se mantuvo una botella

sin infectar para ser usada como control. Las botellas se colocaron en estufa gaseada (5 % CO₂) a 37°C por 30 minutos. Luego de este tiempo, se retiraron de la estufa y se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente, se agregó RPMI Adhesión con cloranfenicol (100 µg/ml) (Parafarm, Argentina) para prevenir el crecimiento de bacterias exocelulares, y se volvieron a incubar en estufa gaseada a 37°C por 60 minutos más. Pasado este tiempo de incubación, se realizaron exhaustivos lavados con PBS-albúmina 0,2 % (v/v) y se procedió a colectar las células. Las muestras se centrifugaron a 100 g por 5 minutos y luego se resuspendieron en 2 ml de buffer de homogenización (BH) (BH: 250 mM sacarosa, 0,1 % (v/v) gelatina, 0.5 mM EGTA, 1:1000 mezcla de inhibidores de proteasas (P8340-Sigma), pH=7.4) y se volvieron a centrifugar a 1800 g por otros 5 minutos.

Las células se resuspendieron en 400 µl de BH y se homogenizaron por pasajes sucesivos, entre 6 y 8 pasajes, a través de agujas 21G. Los homogenatos se diluyeron con BH llevando a 2 ml de volumen final. Para obtener las vacuolas, se sometió al sobrenadante a una centrifugación a 100 g por 5 minutos, y esta operación se repitió sobre el sobrenadante obtenido en cada paso, dos veces más.

A esta fracción obtenida, se la llamó fracción subcelular, en esta fracción se encuentran las vacuolas con los microorganismos (Steele-Mortimer *et al.*, 1999). Se tomaron 150 µl de la fracción subcelular y se adicionaron 7,5 µl de SFB inactivado (concentración final 5 %). Esta fracción fue incubada durante 30 minutos a 0°C con 10 µl del anticuerpo monoclonal anti-ratón LAMP-1 unido a ficoeritrina (PE) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en la concentración recomendada por el fabricante.

Las muestras se analizaron en un equipo FACScalibur Becton-Dickinson y usando el programa Cellquest software (Becton-Dickinson BD Biosciences). Las partículas que resultaron doblemente marcadas, se consideraron como vacuola LAMP (+) que contenían bacteria-CFDA-SE. Se analizaron 300000 eventos por muestra (Steele-Mortimer *et al.*, 1999). En la figura I.3 se muestra un esquema del protocolo descrito en este inciso.

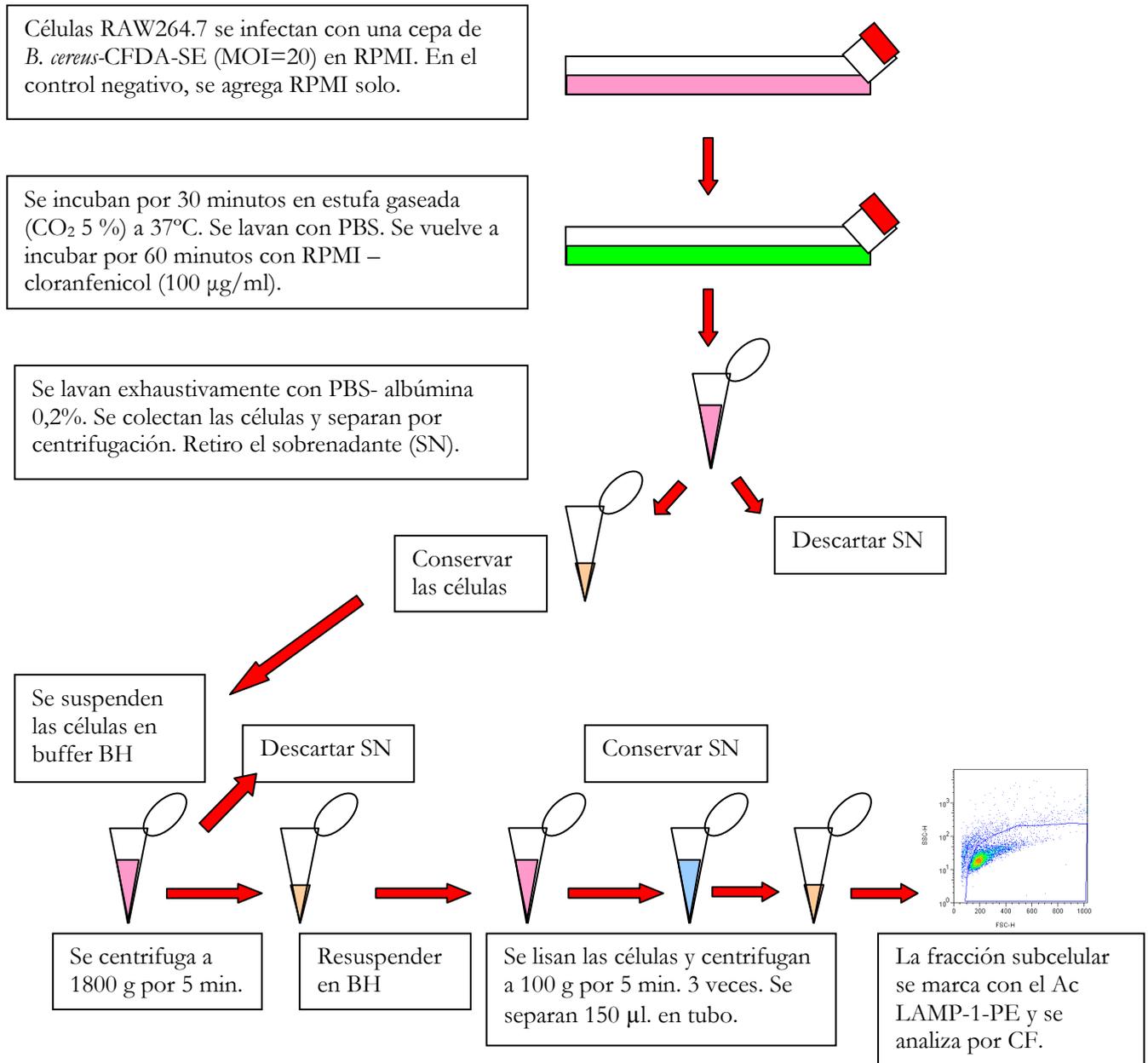


Figura I.3. Esquema del protocolo de marcación de vacuolas con LAMP-1. Se utilizaron células RAW264.7 sembradas en botellas de cultivo de 75 cm³. Se infectaron con las diferentes cepas de *B. cereus* y se dejó una botella sin infectar para utilizar como control. El protocolo de infección se detalla en el texto. Para el aislamiento de la fracción subcelular (FS) se utilizaron varios pasos de centrifugación como se indica en el texto y en la figura. Una vez obtenida la FS se procedió al marcado con el anticuerpo y se analizó por citometría de flujo.

- COMPARTIMENTOS ÁCIDOS

Para el ensayo de colocalización, se utilizó la línea celular RAW264.7, usando para el desarrollo de las mismas el medio RPMI adicionado con 10 % SFB inactivado. Las células fueron sembradas en placas de 24 fosas con vidrios (vidrios de 1 cm², Assistant, Alemania), dejándolas desarrollar por dos días para que la confluencia alcance el 80 %. Las células fueron lavadas dos veces con PBS.

Para la infección de los macrófagos, se utilizaron las bacterias marcadas con CFDA-SE en una MDI de 20. Se colocó en cada fosa una suspensión de bacterias marcadas en RPMI, dejando cada vez, una fosa sin infectar como control. Las células fueron incubadas por 30 minutos en estufa gaseada (5 % (v/v) CO₂).

Pasado este tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por RPMI adicionado con cloranfenicol (100 µg/ml) y se volvieron a incubar durante 30 o 60 minutos más. Luego, la placa se colocó sobre hielo para frenar el proceso de fagocitosis y se lavó dos veces cada fosa con PBS frío. Se retiró totalmente el líquido de las fosas y se procedió a la incubación con LysoTracker DND-99 (Molecular Probes) 200 nM preparado en RPMI, durante 5 minutos a 37 °C.

Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se procedió a la fijación con paraformaldehído (PFA) 3 % (p/v en PBS) para lo cual se dejó a 4°C durante una hora y en oscuridad. Luego se volvió a lavar la muestra y los vidrios fueron retirados de las placas y montados invertidos sobre un medio que evitó la pérdida de fluorescencia (DakoCytomation, EEUU). Las muestras se conservaron en heladera y oscuridad hasta su análisis.

Para la observación se utilizó un microscopio láser confocal (LEICA TCS SP5, Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland). El porcentaje de bacterias contenidas en fagosomas que colocalizan con una marca determinada fue calculado mediante la observación de al menos 50 bacterias internalizadas por muestra en campos seleccionados al azar.

Para la construcción de imágenes 3D se utilizó el software BITPLANE Imaris.

ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN DE *B. CEREBUS* EN ENDOSOMAS DE RECICLAJE

Los ensayos de fagocitosis se realizaron de la misma manera que en el punto “Estudio De Localización de *B. cereus* en Compartimentos Ácidos”, utilizando células RAW264.7 desarrolladas en placas de 24 fosas con vidrio e infectadas con las diferentes cepas de *B. cereus*-CFDA-SE. Pasados los tiempos de ensayos (30, 45, 60 y 90 minutos post-infección), las muestras se lavaron con PBS frío dos veces para frenar el proceso y retirar los microorganismos no unidos. Luego los macrófagos fueron incubados con RPMI suplementado con albúmina bovina al 1 % p/v (RPMI-BSA) durante 1 hora a 37°C para remover la transferrina de las células.

Pasado este tiempo se incubaron por 10 min a 4°C con transferrina marcada con Alexa-594 (Molecular Probes) en una concentración de 10 µg/ml en medio RPMI-BSA para permitir la captación de la transferrina por el macrófago. Transcurrido este tiempo, se incubaron por 5 min a 37°C con el propósito de que la transferrina sea internalizada. Finalmente se lavaron con medio RPMI-BSA incubándose durante 45 min a 37°C y se fijaron con paraformaldehído 3 % (p/v) durante 1 hora a 4°C. Se lavaron con PBS y se montaron invertidos sobre un medio que evitó la pérdida de fluorescencia (anti-fading mounting media, DakoCytomation, EEUU) para la observación por microscopía confocal (LEICA TCS SP5, Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Suiza). Las muestras se conservaron a 4°C y en la oscuridad hasta su análisis.

Los cálculos de colocación del microorganismo con transferrina se realizaron contando al menos 50 bacterias internalizadas en cada experimento.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MHCII Y CD86 EN LOS MACRÓFAGOS INFECTADOS

En estos ensayos se utilizaron células RAW264.7 sembradas en placas de 24 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania). Las células se infectaron con las cepas de *B. cereus* en estudio utilizando una MDI de 20. En estos ensayos, el tiempo de incubación de las células infectadas fue de 48 horas, a 37 °C y en una atmósfera de 5 % (v/v) CO₂ 95 % (v/v) aire. La fagocitosis se realizó en presencia de cloranfenicol (100 µg/ml) para prevenir el crecimiento de bacterias exocelulares.

Como controles positivos se usaron células incubadas en presencia de lipopolisacárido de *E. coli* (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU). Finalizada la incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS conteniendo 2 % (v/v) SBF e incubadas con el anticuerpo correspondiente durante 30 minutos a 4 °C protegidas de la luz. Se utilizaron, MHC-II anti-ratón conjugado a PE y CD86 (B7-2) anti-ratón conjugado a PE en las concentraciones indicadas por el fabricante (eBioscience, San Diego, EEUU). Luego de la marcación, las células fueron lavadas y analizadas por citometría de flujo. Se utilizó el programa CellQuest (BD Biosciences) para los análisis. La expresión de los marcadores de superficie fue calculada según la siguiente fórmula:

Índice de expresión (IE) = Porcentaje de células positivas x Intensidad media de Fluorescencia

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se hicieron usando un test de Student InfoStat software. (InfoStat, Version 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS**MARCACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS**

Las cepas analizadas se cultivaron y marcaron como se indicó en Materiales y Métodos. Suspensiones de los microorganismos marcados y sin marcar, fueron observados al microscopio de fluorescencia previamente a su análisis por citometría de flujo. Las mismas muestras fueron luego analizadas en un citómetro de flujo para evaluar la marcación. La figura I.4 muestra resultados representativos para estos ensayos. Las bacterias marcadas de verde se observan en la región de eventos (+) para FL1, que se correlaciona con la observación microscópica.

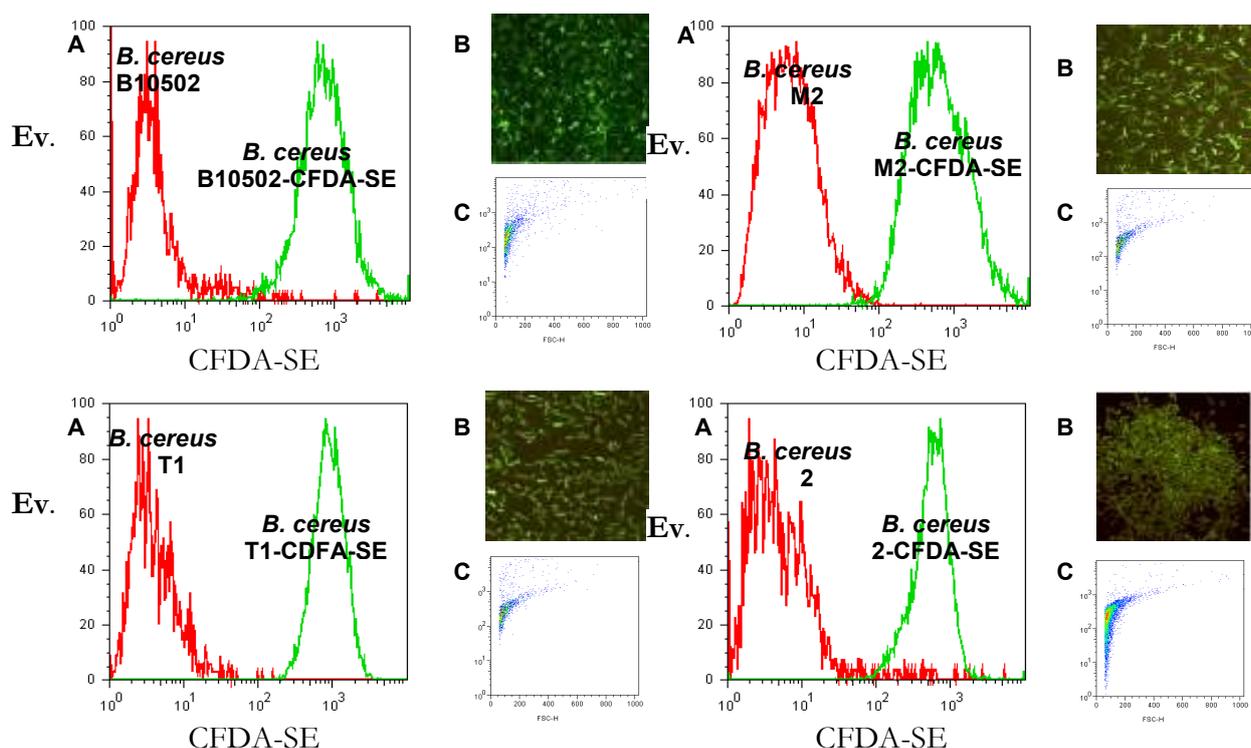


Figura I.4. Marcación de los microorganismos con CFDA-SE. A. Histogramas: Se representan los eventos (Ev.) *vs.* intensidad de fluorescencia verde (CFDA-SE). Se muestran histogramas de bacterias sin marcar (rojo) y marcadas (verde). Las muestras se analizaron por Citometría de Flujo. B. Microfotografías de fluorescencia de las diferentes cepas de *B. cereus* marcadas con CFDA-SE. C. Representa la población bacteriana adquirida por citometría de flujo en un gráfico SSC-H vs FSC-H.

Efecto del agregado de azul tripán

Para poder discriminar las bacterias adheridas de las internalizadas en los ensayos de fagocitosis, se utilizó la técnica del apantallamiento mediante azul tripán. Se realizaron ensayos de marcación con diferentes concentraciones de CFDA-SE a una concentración de bacterias de 5×10^6 UFC/ml. Evaluándose el apantallamiento de la marca usando azul tripán.

En la figura I.5 se muestran las curvas correspondientes a muestras de *B. cereus* B10502 con CFDA-SE con y sin apantallar con azul tripán. Se muestran los resultados de un experimento representativo. Entre las concentraciones 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ finales de CFDA-SE, se encontró la proporción más adecuada entre la fluorescencia de las bacterias y el apantallamiento de la marca. Al usar concentraciones menores del marcador, se pudo ver que la marcación de las bacterias era menos intensa.

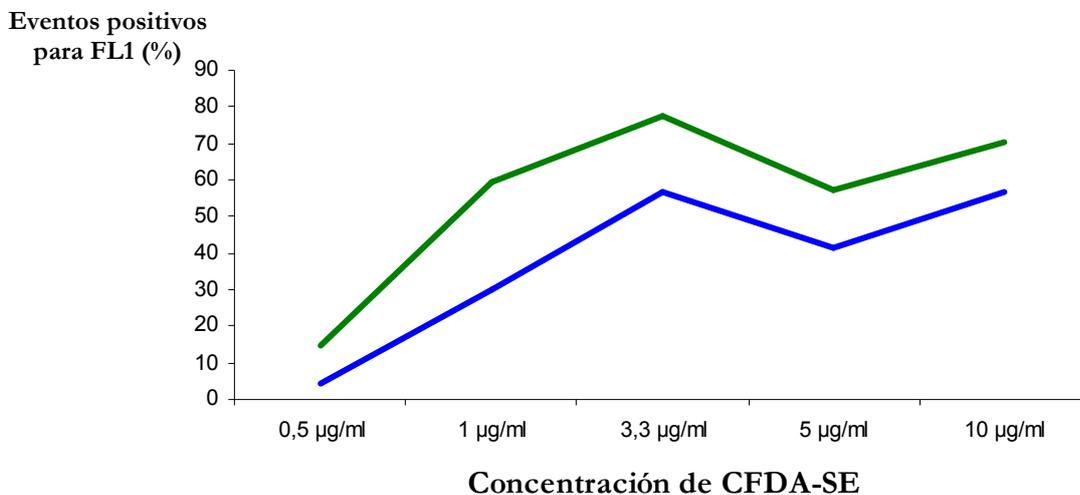


Figura I.5. Marcación de *B. cereus* con diferentes concentraciones de CFDA-SE. Mediante CF, se analizó el porcentaje de eventos positivos para FL1 (CFDA-SE) utilizando diferentes concentraciones para realizar la marcación de la bacteria *B. cereus* B10502. Se representa en línea verde el análisis de las bacterias marcadas y en línea azul el porcentaje de las bacterias marcadas y apantalladas con azul tripán.

Se realizaron diluciones de *B. cereus*, de forma tal de cubrir un rango de concentraciones de microorganismos y se procedió a la marcación de las bacterias con 5 µl de CFDA-SE (10 µg/ml final). Se apantalló la marca usando 500 µl de azul tripán (0,2% (p/v) final). Algunas muestras fueron lavadas con PBS antes de la fijación y otras directamente fijadas, usando PFA 1%. Se conservaron a 4°C y al abrigo de la luz hasta su análisis por citometría de flujo. El mejor apantallamiento para estas concentraciones de marcadores, se obtuvo con una concentración bacteriana de 5×10^6 UFC/ml. En la figura I.6 se muestran los histogramas obtenidos para dos concentraciones bacterias diferentes (5×10^6 UFC/ml y 5×10^7 UFC/ml). No se observaron diferencias entre las muestras lavadas y sin lavar.

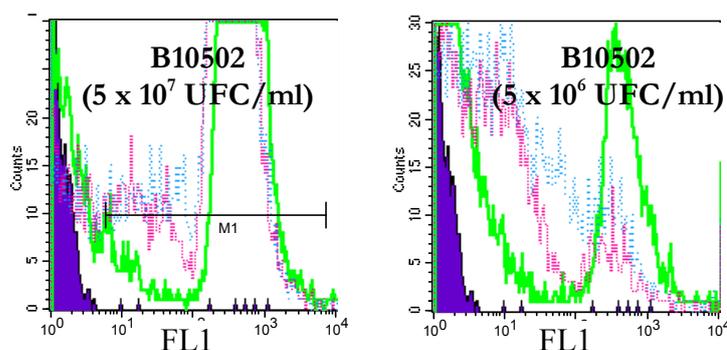


Figura I.6. Curvas de marcación para diferentes concentraciones de *B. cereus*. Se representan los histogramas en FL1 (fluorescencia verde) para la cepa B10502. El área violeta corresponde a la cepa sin marcar. Las líneas verdes corresponden a la bacteria marcada con CFDA-SE. Las líneas rosas corresponden a la cepa B10502 apantallada sin lavado y las líneas celestes con lavado. Se pudo ver un apantallamiento correcto al trabajar con la concentración microbiana de 5×10^6 UFC/ml.

ASOCIACIÓN DE *B. CEREUS* CON CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Se analizó la capacidad de interaccionar de *B. cereus* con los macrófagos. Se utilizaron macrófagos peritoneales aislados de ratón, los cuales fueron infectados con *B. cereus* B10502, 2, M2 y T1 usando una MDI de 20. Estas muestras se analizaron usando la técnica de tinción con naranja de acridina. Se evaluó el

porcentaje de macrófagos asociados al menos a una bacteria (bacterias adheridas o internalizadas), y se observaron diferentes patrones de interacción para las cepas en estudio. El mayor porcentaje de asociación lo presentó la cepa B10502 ($50,9 \pm 0,8$ %), siendo significativamente menor para el resto de las cepas ($p < 0,05$ o $p < 0,005$), M2 ($24,4 \pm 2,7$ %), 2 ($31,9 \pm 4,3$ %) y T1 ($20,0 \pm 2,1$ %) (Figura I.7).

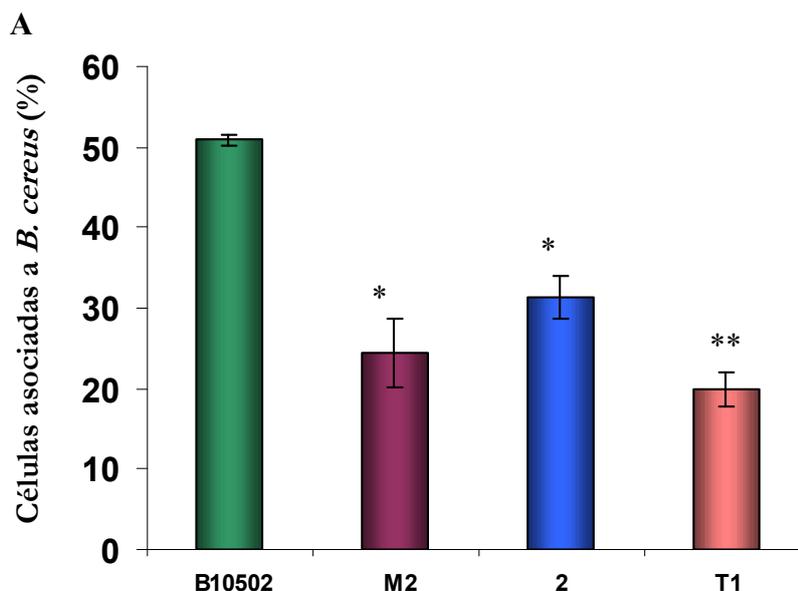


Figura I.7. Asociación de *B. cereus* con macrófagos peritoneales. Se representan los porcentajes de células asociadas a al menos una bacteria para las diferentes cepas. Se considero como positivo, células asociadas a al menos una bacteria. Los asteriscos representan una diferencia estadística significativa al comparar con los macrófagos infectados con la cepa B10502 (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$).

Como se muestra en la figura I.8, para la cepa *B. cereus* B10502 se observaron abundantes bacterias asociadas a cada célula, y lo mismo pudo observarse para la cepa M2 para la cual se vieron numerosas bacterias aglutinadas alrededor de los macrófagos. Para *B. cereus* 2, se observaron escasas bacterias asociadas por cada macrófago. En el caso de la cepa T1, fue notable la alteración en la morfología celular de los macrófagos luego de la interacción con la bacteria, se vieron bacterias asociadas a células en aparente proceso de lisis.

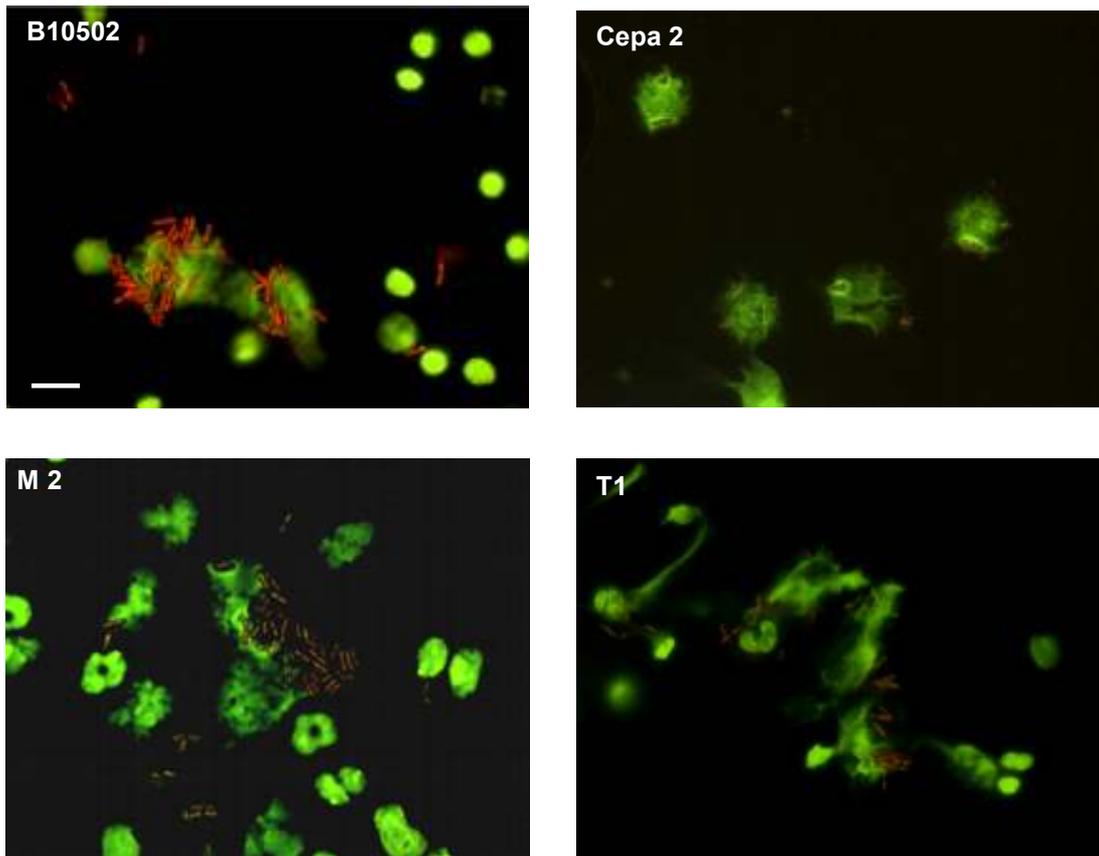


Figura I.8. Asociación de *B. cereus* con macrófagos peritoneales. Las microfotografías se tomaron de muestras de 30 min de infección que se colorearon con naranja de acridina. La barra blanca representa 10 μm .

FAGOCITOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para complementar el estudio de la capacidad de interaccionar de las cepas de *B. cereus* con los macrófagos peritoneales, se analizó la fagocitosis por citometría de flujo.

Para la realización de este estudio, la infección de los macrófagos peritoneales se realizó durante 30 minutos con las bacterias marcadas con CFDA-SE. Los análisis por citometría de flujo, requirieron la identificación previa de la población a analizar. Para esto, se analizaron los macrófagos sin infectar, marcados con F4/80 y se seleccionó la región de la población con expresión de este marcador. Una vez identificada esta población, los análisis se realizaron sobre los

eventos que pertenecían a esa región seleccionada. En la figura I.9 se representa la población que contiene macrófagos como la región R1, en un gráfico de SSC-H *vs.* FSC-H. Se analizó el porcentaje de células con bacterias internalizadas, usando apantallamiento con azul tripán. Estas células representan una región R2 que resulta ser positiva para FL1 en el gráfico FL1 *vs.* FSC-H (Figura I.9.B). Como control de células negativas para FL1, se analizaron muestras de células sin bacterias (MQ). En la figura I.9.C, se muestran las microfotografías de fluorescencia de bacterias marcadas con CFDA-SE que se hallan asociadas a los macrófagos. Las fotos fueron realizadas a partir de muestras de 30 minutos post-infección, sin apantallamiento con azul tripán. Los resultados muestran que el porcentaje de células asociadas a las células peritoneales fue significativamente mayor para las cepas de *B. cereus* B10502 ($36,3 \pm 3,8 \%$) y M2 ($22,0 \pm 7,0 \%$) comparado con las cepas 2 ($15,0 \pm 2,9 \%$) y T1 ($7,1 \pm 1,6 \%$). Los asteriscos en la figura I.10, representan diferencias significativas respecto a la cepa B10502 (* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$) (Figura I.9.B). Las microscopías de los ensayos de fagocitosis con bacterias marcadas con CFDA-SE mostraron patrones similares a los obtenidos con la tinción con naranja de acridina (Conf. Figuras I.8 y I.9.C).

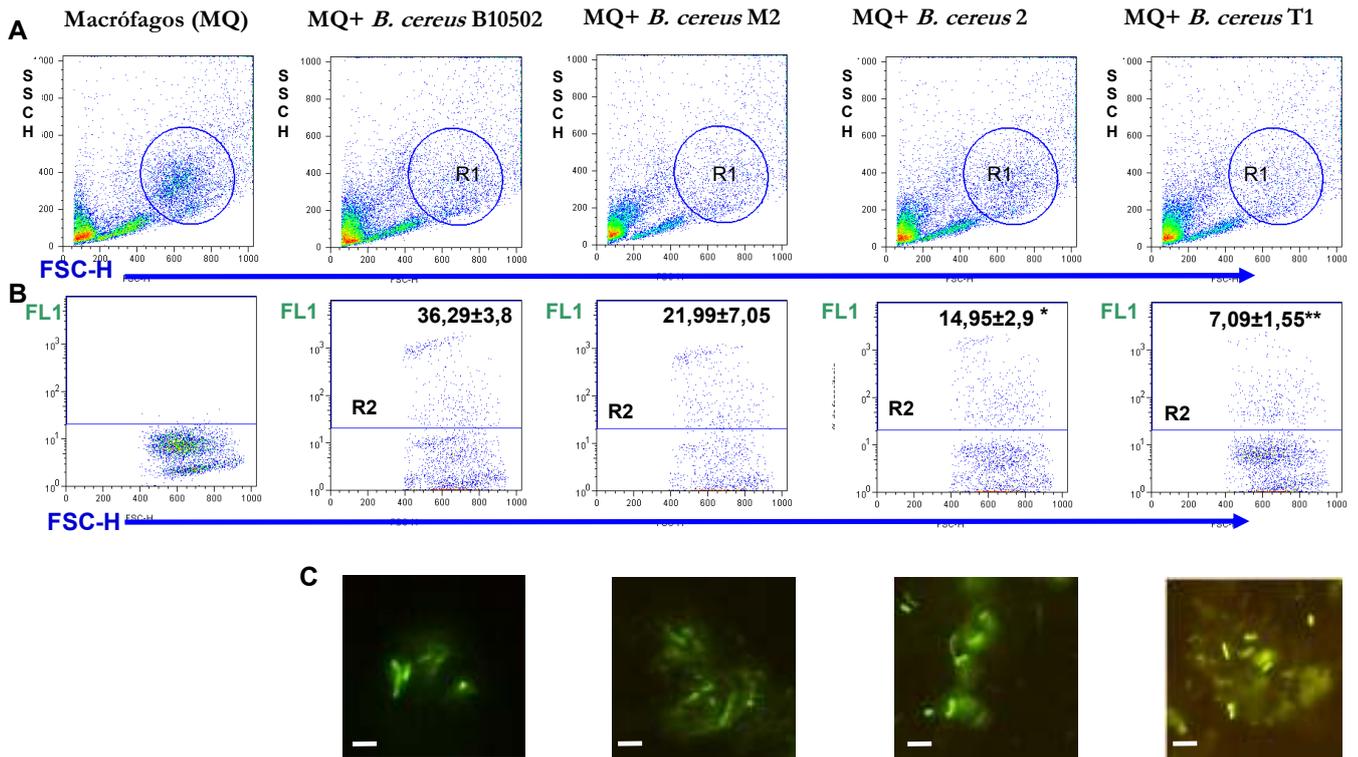


Figura I.9. Fagocitosis de *B. cereus* por macrófagos. Análisis para las distintas cepas de *B. cereus* luego de 30 min de infección de los macrófagos peritoneales. La fluorescencia de las bacterias exocelulares se apantalló con azul tripán. A. Gráfico SSC-H vs FSC-H, R1 representa la población de células fagocíticas; B. Sobre la población R1, se analizaron los eventos positivos para FL1. R2 representa la población de células con bacterias-CFDA-SE. Los resultados se expresaron como porcentajes de las células positivas para FL1 (eventos en R2). C. Microfotografías de fluorescencia de bacterias marcadas con CFDA-SE asociadas a los macrófagos (30 min post-incubación, sin apantallar). Las barras blancas representan 5 μ m.

El siguiente paso en nuestro estudio, fue evaluar el estado de los macrófagos luego de la infección y finalmente se decidió indagar sobre la sobrevivencia y el destino intracelular de los microorganismos una vez internalizados por las células fagocíticas.

EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *B. CEREBUS* SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES

Se analizó la viabilidad de los macrófagos luego de ser infectados durante 30 minutos con las distintas cepas de *B. cereus* marcadas con CFDA-SE. Para este estudio, la viabilidad celular fue analizada por marcación con Ioduro de Propidio (IP).

Luego de seleccionar la población a estudiar en un gráfico SSC-H *vs.* FSC-H, se realizaron los gráficos de FL1 (CFDA-SE) *vs.* FL2 (IP) para analizar el porcentaje de macrófagos necróticos. En la figura I.10, se muestran ejemplos del análisis realizado. Los eventos que resultaron positivos para ambas marcas (cuadrante superior derecho), representan a las células necróticas asociadas a las bacterias marcadas con CFDA-SE (IP (+) / CFDA-SE (+)). Los eventos situados en el cuadrante superior izquierdo, representan a las células necróticas que no se encuentran asociadas a las bacterias (IP (+) / CFDA-SE (-)).

Los cuadrantes inferiores se encuentran formados por las células no necróticas (IP (-)). El cuadrante inferior izquierdo (IP (-) / CFDA-SE (-)), representa las células negativas para ambas marcas, no se trata de células necróticas ni de células asociadas a bacterias. Por último, el cuadrante inferior derecho (IP (-) / CFDA-SE (+)) representa los macrófagos que se encuentran asociados a bacterias sin resultar afectados a los 30 minutos post infección. Como control se utilizaron los MQ sin infectar marcados con IP para evaluar el porcentaje de células fagocíticas necróticas basales, representadas como MQ + IP en la figura I.10.

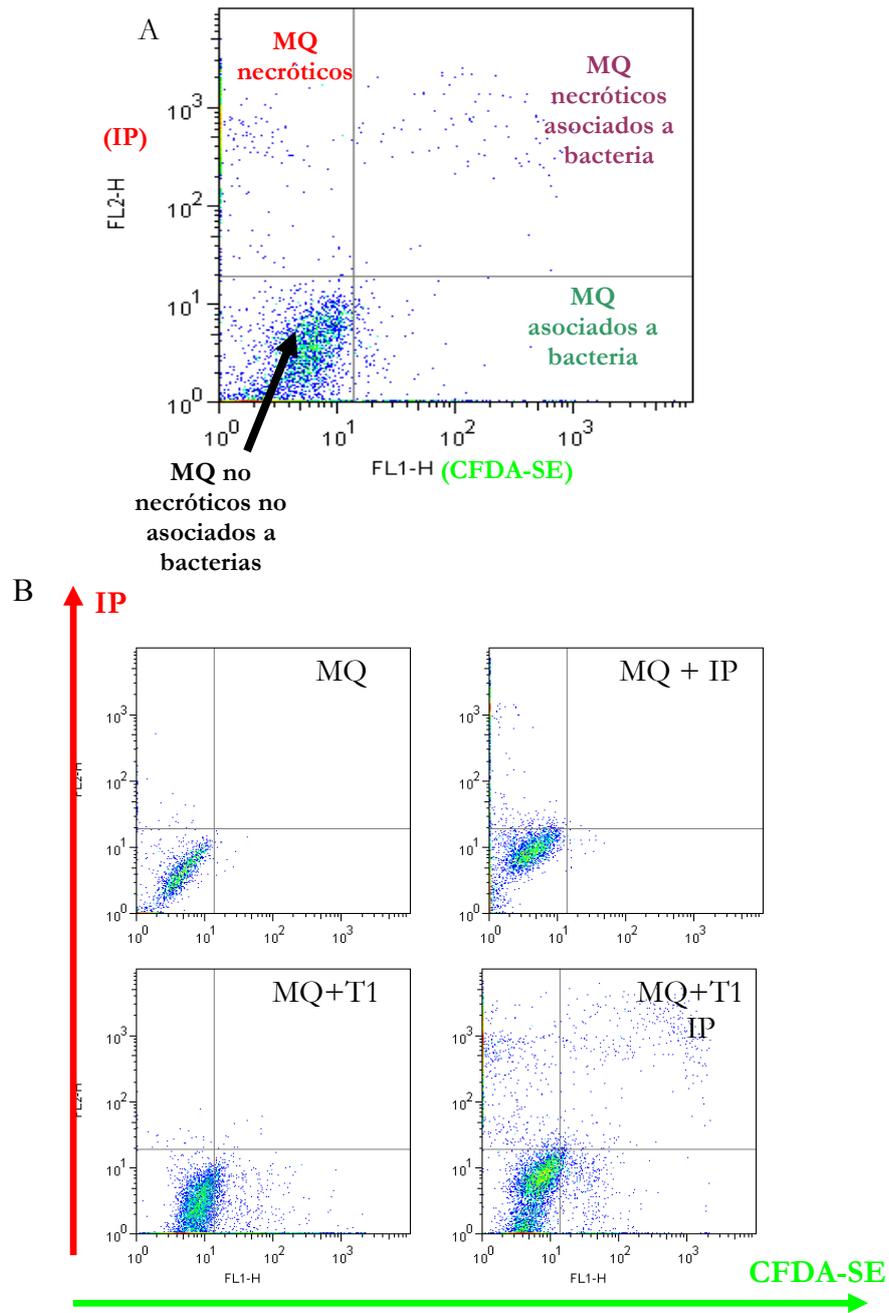


Figura I.10.A. Efecto de la infección con *B. cereus* sobre la necrosis de macrófagos. En la figura A se muestra en el gráfico de FL1 vs FL2 para los macrófagos (MQ) infectados con B10502-CFDA-SE y marcados luego con IP. Se representa el significado de cada cuadrante. En la figura B se presentan los gráficos para distintas muestras (infectadas o no con la cepa T1).

Los resultados obtenidos en cada uno de los análisis de los gráficos FL1 (CFDA-SE) vs FL2 (IP) se muestran en la tabla I.2. Se observa un mayor aumento de necrosis celular relacionada a las bacterias para la cepa T1 y el menor aumento se observa para las cepas M2 y B10502. La necrosis de células no asociadas a bacterias es similar para todas las cepas estudiadas.

Tabla I.2. Efecto de la infección con *B. cereus* sobre la necrosis de macrófagos. En la tabla se muestran los valores en porcentaje obtenidos luego de infectar o no los macrófagos con las diferentes cepas, y luego del agregado de IP.

Condiciones analizadas	Células necróticas no asociadas a bacterias (%)	Células necróticas asociadas a bacterias (%)	Células no necróticas asociadas a bacterias (%)
Sin infectar	11,50 ± 2,12	NA	NA
<i>B. cereus</i> B10502	22,81 ± 1,03	2,69 ± 0,35	15,31 ± 0,56
<i>B. cereus</i> M2	20,80 ± 1,65	3,32 ± 0,42	6,24 ± 0,42
<i>B. cereus</i> 2	21,35 ± 4,06	5,01 ± 0,83	12,83 ± 2,29
<i>B. cereus</i> T1	27,96 ± 5,33	5,87 ± 0,64	8,49 ± 2,84

NA: No se aplica

VIABILIDAD DE *B. CEREUS* DENTRO DE MACRÓFAGOS

Con el fin de determinar la posibilidad de supervivencia de *B. cereus* dentro de macrófagos peritoneales, se evaluó el número de bacterias intracelulares sobrevivientes luego de diferentes tiempos. Para esto se realizaron cinéticas de muerte para diferentes cepas mediante la siembra de lisados de macrófagos infectados en agar nutritivo luego de la interacción con *B. cereus*.

Se usaron macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c y se infectaron con las cepas B10502, 2, M2 y T1 usando una MDI de 20. Cada tubo contenía una cantidad de macrófagos de aproximadamente 8×10^5 células/ml.

A los 90 minutos post infección la cepa B10502 mostró un valor de microorganismos viables de $2,5 \pm 3,5$ UFC/ml y la cepa M2 mostró un valor de $27,5 \pm 2,12$ UFC/ml. Los valores de las cepas T1 y 2 fueron significativamente mayores (Figura I.11).

Pasados los 90 minutos de incubación, no se encontraron bacterias viables para ninguna de las cepas estudiadas.

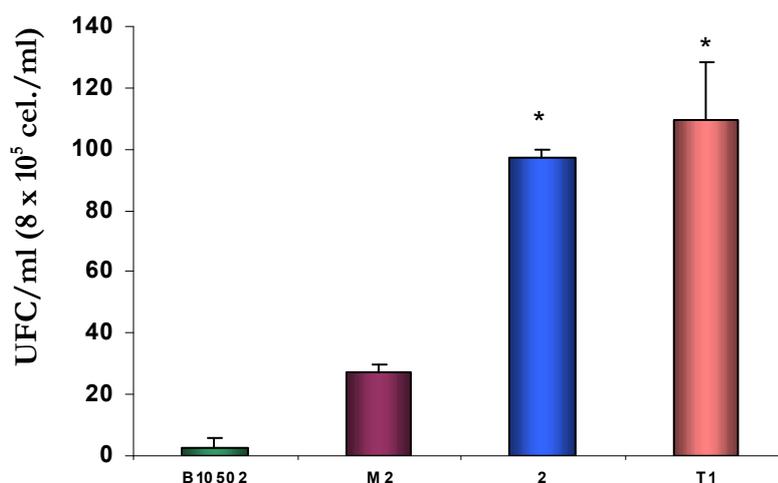


Figura I.11. Viabilidad de *B. cereus* dentro de macrófagos peritoneales (90 min post infección). Se muestran las cantidades de bacterias sobrevivientes en UFC/ml, cuando se infectaron 8×10^5 células con $1,6 \times 10^7$ bacterias. Los asteriscos representan una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) al comparar con los datos obtenidos para la infección con *B. cereus* B10502.

LOCALIZACIÓN DE *B. CEREUS* EN DIFERENTES COMPARTIMENTOS CELULARES

El paso siguiente en el estudio de la interacción de células fagocíticas con *B. cereus*, fue el estudio del destino intracelular de las diferentes cepas analizadas una vez que resultan fagocitadas.

Localización de *B. cereus* en compartimentos tardíos de la vía endocítica.

Para este ensayo se utilizaron células RAW264.7, las cuales fueron infectadas con las distintas cepas de *B. cereus* marcadas con CFDA-SE. Inicialmente se incubaron por 30 minutos a 37°C en estufa gaseada (5 % CO₂), luego las células fueron lavadas para remover los microorganismos no unidos y se volvieron a incubar por 60 minutos más a 37°C en presencia de cloranfenicol, para prevenir el crecimiento bacteriano. En un siguiente paso, las células fueron lisadas y se obtuvieron las vacuolas conteniendo *B. cereus* (BcCV), también se obtuvieron vacuolas de células no infectadas para utilizar como control.

La figura I.12 muestra los detalles del análisis realizado. Se procedió a localizar la población que corresponde a las vacuolas. Para esto, primeramente se analizaron bacterias solas (I.12.A) para localizar la zona correspondiente a bacterias no asociadas a vacuolas; de esta manera se pudo seleccionar la región R1 como la región de vacuolas en un gráfico SSC-H *vs* FSC-H. Para verificar R1 como la región de análisis de vacuolas, se adquirieron también vacuolas de macrófagos sin infectar (Figura I.12.B).

En I.12.C se muestra que el análisis de las vacuolas obtenidas de macrófagos sin infectar marcadas con LAMP-1 unido a PE (FL2) no provocó la aparición de eventos en R2. Esta región se seleccionó para ubicar la doble marcación con CFDA-SE (FL1) y LAMP-1 (FL2). Las figuras I.12.D, I.12.E y I.12.F muestran ejemplos de gráficos para vacuolas aisladas de macrófagos infectados con la cepa M2 marcada con CFDA-SE. En la figura I.12.D se puede apreciar como aparecen eventos en la región R1 correspondiente a vacuolas. En la figura I.12.E se muestran eventos pertenecientes a R1, evaluados en un gráfico FL1 (CFDA-SE) *vs* FL2 (LAMP-1) que resultaron positivos para la marcación con LAMP-1. En R2 puede observarse eventos que resultaron positivos para CFDA-SE y eventos que resultaron positivos para ambas marcas; los eventos positivos para ambas marcas corresponden a vacuolas LAMP-1 positivas que además llevan asociadas bacterias-CFDA-SE (BcCV).

El análisis de los eventos que resultaron positivos para ambas marcas se realizó en un histograma para FL2 (LAMP-1) sobre la región que resulta de la intersección de R1 y R2, de manera de seleccionar solamente los eventos que resultaran positivos para ambos marcadores. Se muestra un ejemplo en la figura I.12.F que corresponde a vacuolas aisladas de macrófagos infectados con M2-CFDA-SE. De esta manera, los eventos seleccionados por M1 en el histograma, resultan ser las vacuolas conteniendo *B. cereus*-CFDA-SE positivas para LAMP-1.

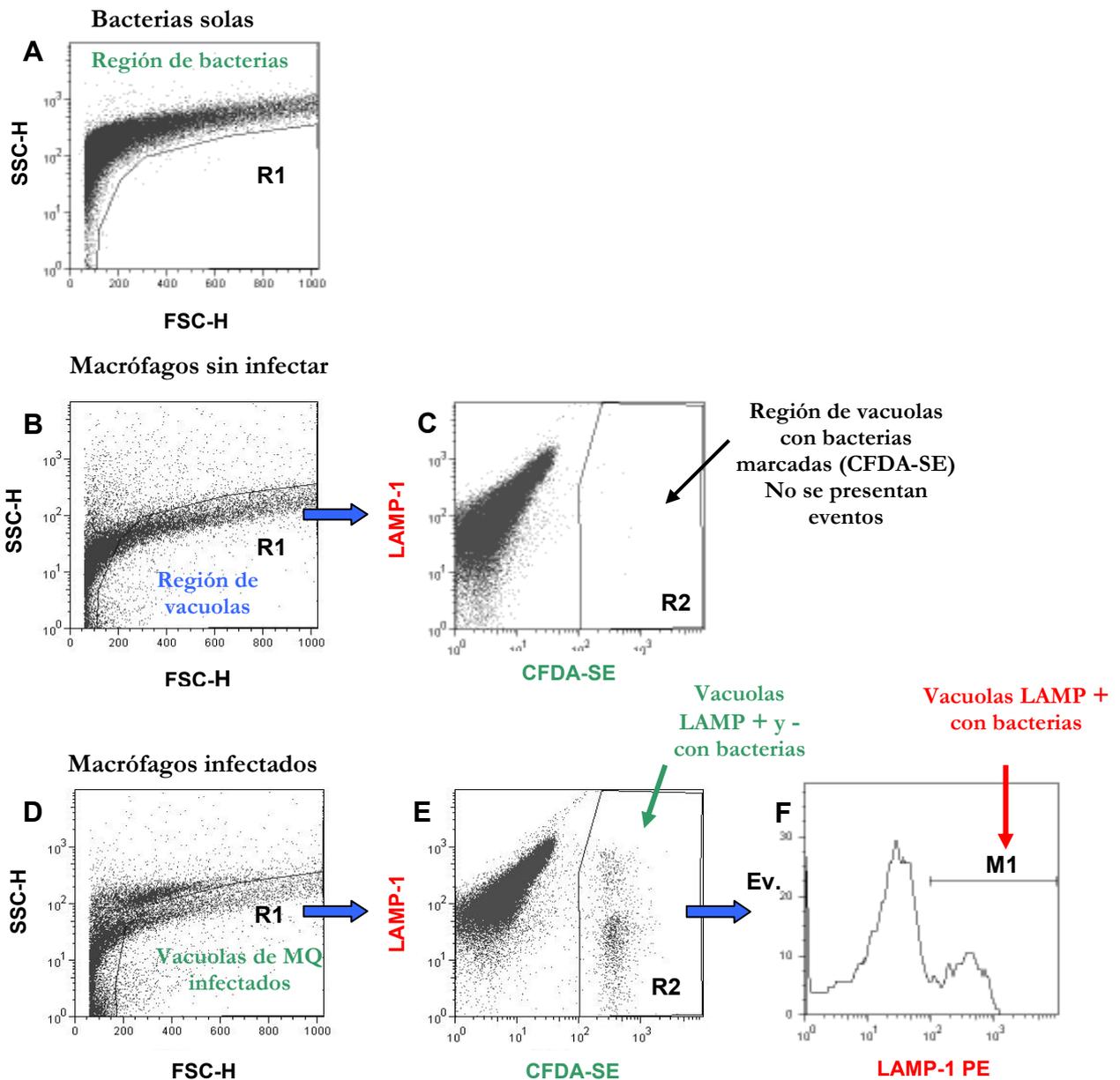


Figura I.12. Diagramas de citometría de flujo para vacuolas aisladas de RAW264.7. Ceba M2-CFDA-SE (A). Las vacuolas de macrófagos sin infectar ocupan la región R1 (B) y no hay eventos en R2 (C). Vacuolas aisladas de macrófagos infectados con *B. cereus* M2-CFDA-SE muestran eventos en la región R2 (CFDA-SE positivos) (D, E y F). Un histograma realizado sobre la región resultante de la intersección entre R1 y R2 muestra los eventos que resultan positivos para ambos marcadores a la vez (vacuolas positivas para LAMP-1 y que además tienen bacterias CFDA-SE (BcCV) (F).

Se determinaron los porcentajes de bacterias asociadas a compartimentos LAMP-1 positivos. Como se muestra en la tabla I.3, para la cepa M2 el valor fue significativamente más alto ($25,3 \pm 1,2 \%$ ($p < 0,05$)) que para las cepas B10502 y 2 ($11,6 \pm 1,4 \%$ y $10,9 \pm 5,4 \%$ respectivamente). Para la cepa T1, el daño celular ocurrido en los tiempos de infección ensayados, no permitió el aislamiento de una cantidad de BcCV adecuada para el análisis, si bien las células se encontraban adheridas al momento de finalizar la fagocitosis, en el caso de la cepa T1, se obtuvo un bajo número de vacuolas.

En la figura I.13 se representan los gráficos SSC-H vs FSC-H para la obtención de vacuolas de macrófagos sin infectar (MQ) y de macrófagos infectados con las diferentes cepas de *B. cereus*. Puede apreciarse como para los macrófagos infectados con la cepa T1, no aparecieron eventos dentro de la región R1 (región de vacuolas).

Tabla I.3. Presencia de *B. cereus* en compartimentos LAMP-1 positivos. Se muestran los porcentajes de vacuolas LAMP-1 (+)/ CFDA-SE (+) a los 90 minutos post infección. (* $p < 0,05$). ND: No determinado.

Cepa de <i>B. cereus</i>	Eventos LAMP-1 (+)/CFDA-SE (+)
B10502	$11,6 \pm 1,4$
M2	$25,3 \pm 1,2^*$
2	$10,9 \pm 5,4$
T1	ND

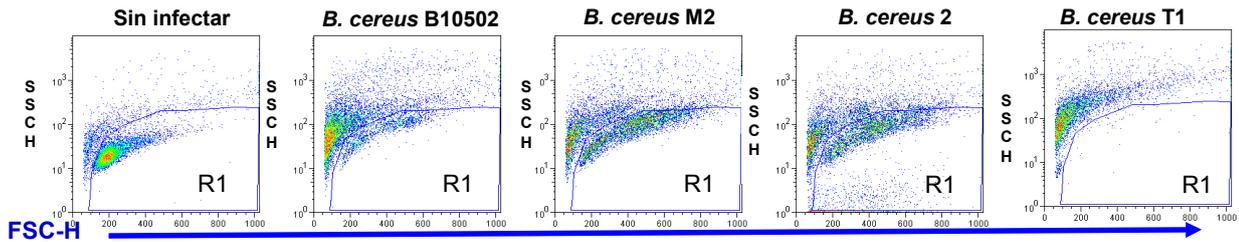


Figura I.13. Gráficos de análisis de vacuolas aisladas de RAW264.7. Se muestran los gráficos SSC- vs FSC-H para vacuolas de macrófagos sin infectar (MQ) y vacuolas aisladas de macrófagos infectados con las cepas de *B. cereus* marcada. Se muestra la población de vacuolas en R1, seleccionada como se explicó previamente en el texto.

Localización de *B. cereus* en compartimentos ácidos.

Para la determinación de la colocalización de las diferentes cepas de *B. cereus* con compartimentos lisosomales, se utilizó LysoTracker. Este marcador se acumula selectivamente en compartimentos de bajos pH, tales como los lisosomas. La sonda LysoTracker Red DND-99 consiste en un fluoróforo unido a una base débil que a pH neutro puede pasar libremente por las membranas celulares. Una vez protonada, se mantiene en las organelas ácidas (pH < 5,5 – 6).

Para esta determinación, se realizaron experimentos de fagocitosis con células RAW264.7 y las bacterias marcadas con CFDA-SE como se describió previamente. Los análisis microscópicos fueron realizados usando un microscopio confocal confocal (LEICA TCS SP5, Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Suiza). Se tomaron imágenes seriadas cada 0,3 μm . Los tiempos post-infección analizados fueron 45, 60 y 90 minutos.

En la figura I.14 se muestran ejemplos de las marcaciones con LysoTracker sobre macrófagos infectados con las diferentes cepas de *B. cereus* marcadas con CFDA-SE. Se muestran imágenes de un plano XY seleccionado donde pueden apreciarse algunas bacterias internalizadas rodeadas por zonas marcadas con LysoTracker. Estas imágenes corresponden a resultados obtenidos a los 60 minutos post-infección.

Para la evaluación de la internalización y la co-localización con el marcador, se analizaron las imágenes seriadas donde se puede apreciar que las bacterias que están co-localizando con Lysotracker se encuentran rodeadas por el mismo, asimismo, al evaluar la imagen en la zona de fluorescencia exclusiva del Lysotracker, se puede apreciar el espacio vacío que deja la bacteria rodeado por la marca intensa del marcador. Las marcas de Lysotracker alrededor del microorganismo pueden aparecer como discontinuas, según del plano XY considerado.

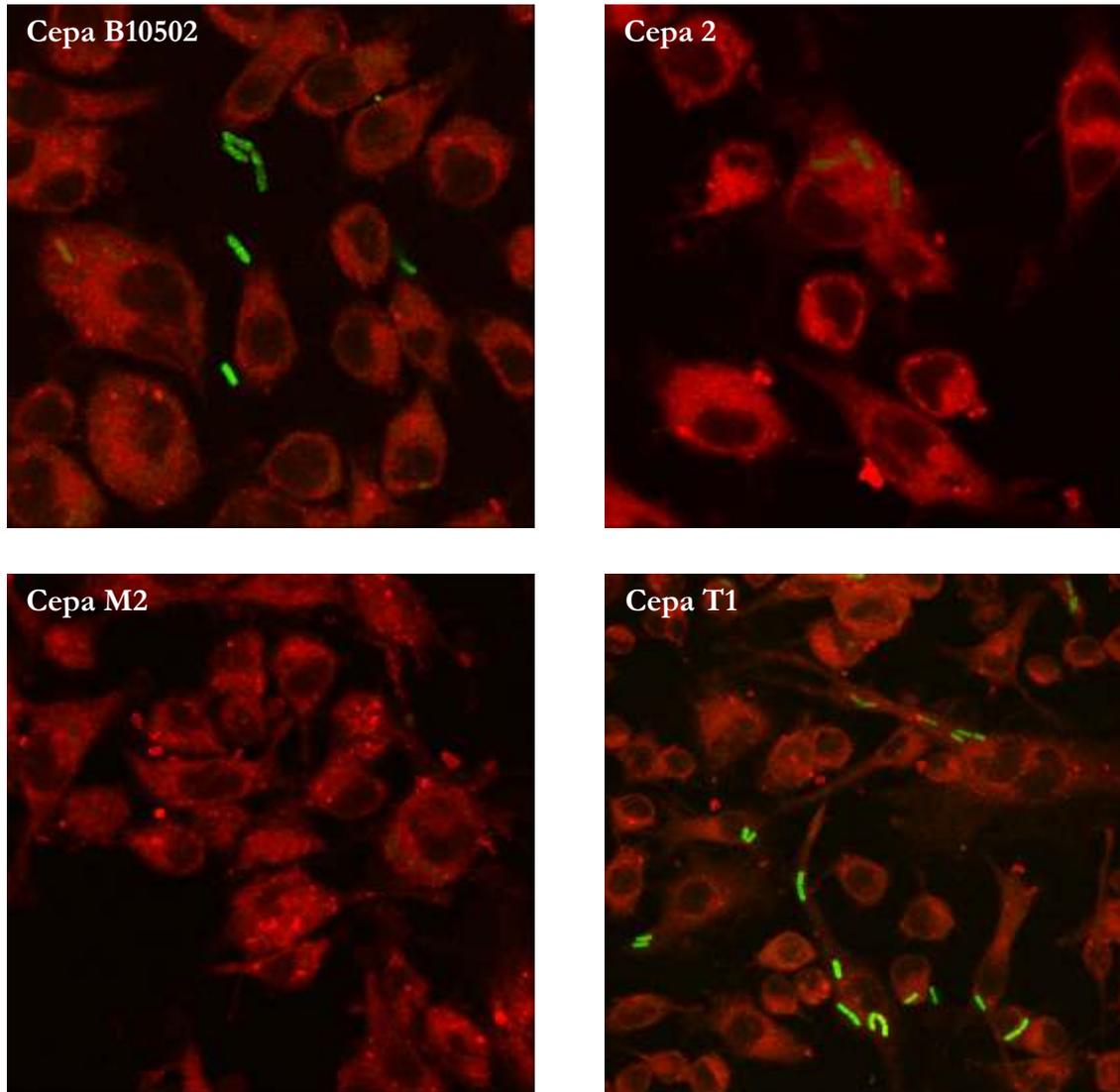
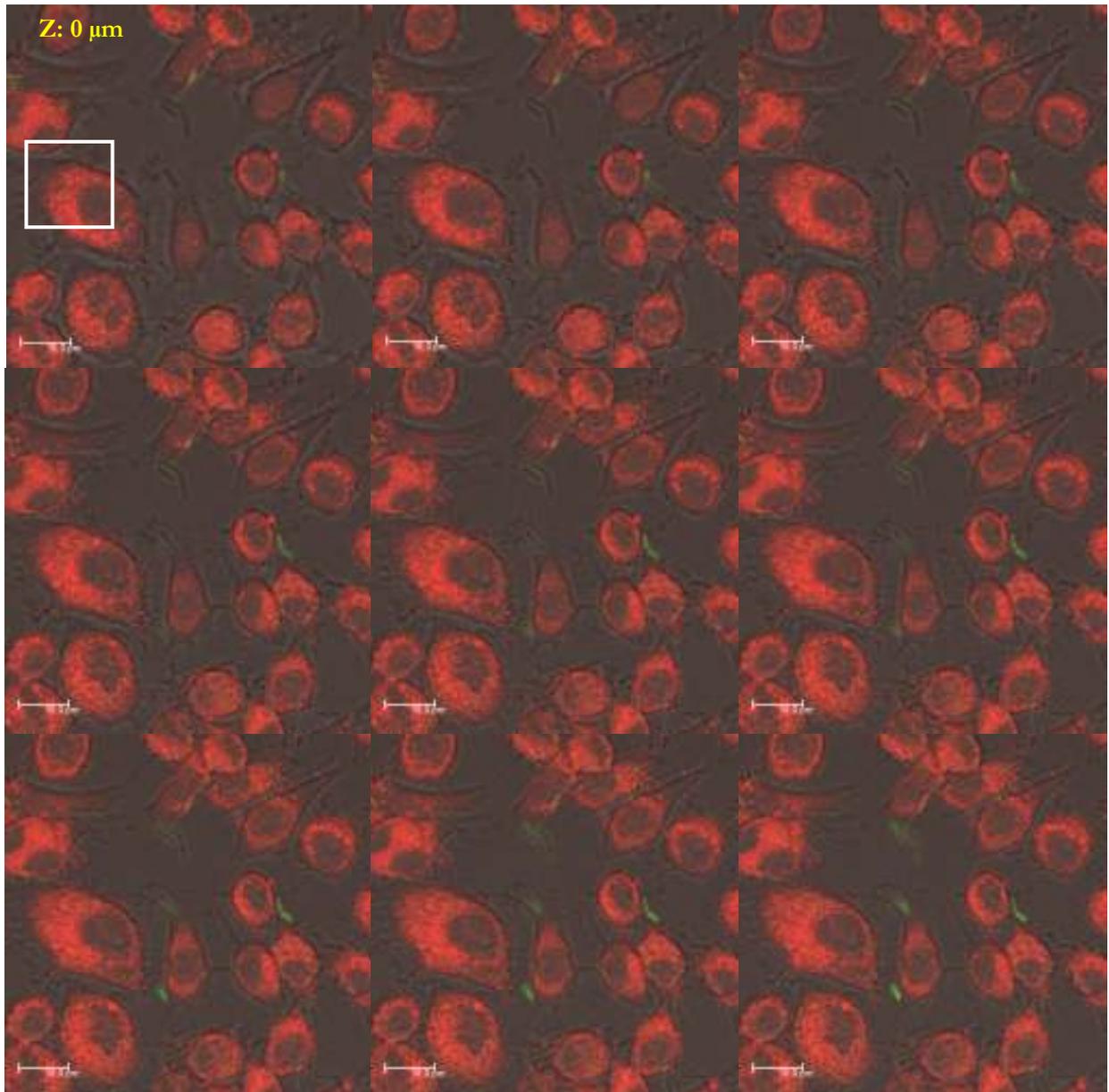


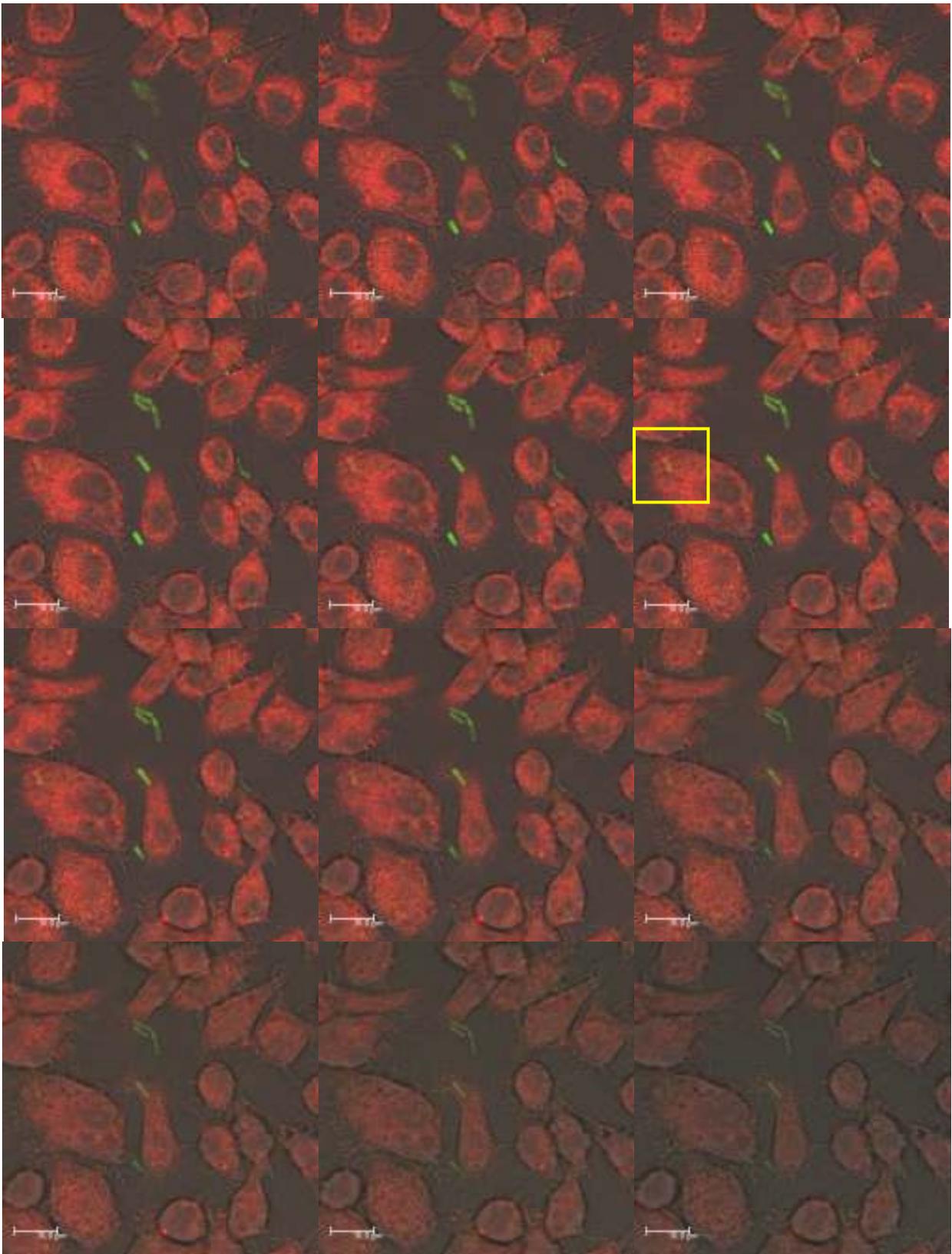
Figura I.14. Imágenes confocales de macrófagos (RAW264.7) infectados con *B. cereus*. Los macrófagos infectados con las cepas de *B. cereus*-CFDA-SE se marcaron con Lysotracker luego de 1 hora de infección. Las imágenes corresponden a fotografías de planos XY seleccionados para cada cepa.

En la figura I.15 se muestran una serie de imágenes de planos focales tomados cada $0,3 \mu\text{m}$ sobre el plano Z. La imagen corresponde a la cepa B10502-CFDA-SE luego de 60 minutos de infección usando la línea celular RAW264.7. Puede observarse, al ir recorriendo los distintos planos de la serie, que comienza a verse una bacteria internalizada (primera imagen, zona enmarcada en blanco). Esta bacteria ira apareciendo en los sucesivos planos XY. En la segunda serie de imágenes se señala el plano en el cual se aprecia la colocalización de la bacteria con

el marcador (recuadro amarillo). La colocalización se vio como una zona intensa de marca roja rodeando la bacteria verde.



continúa



continúa

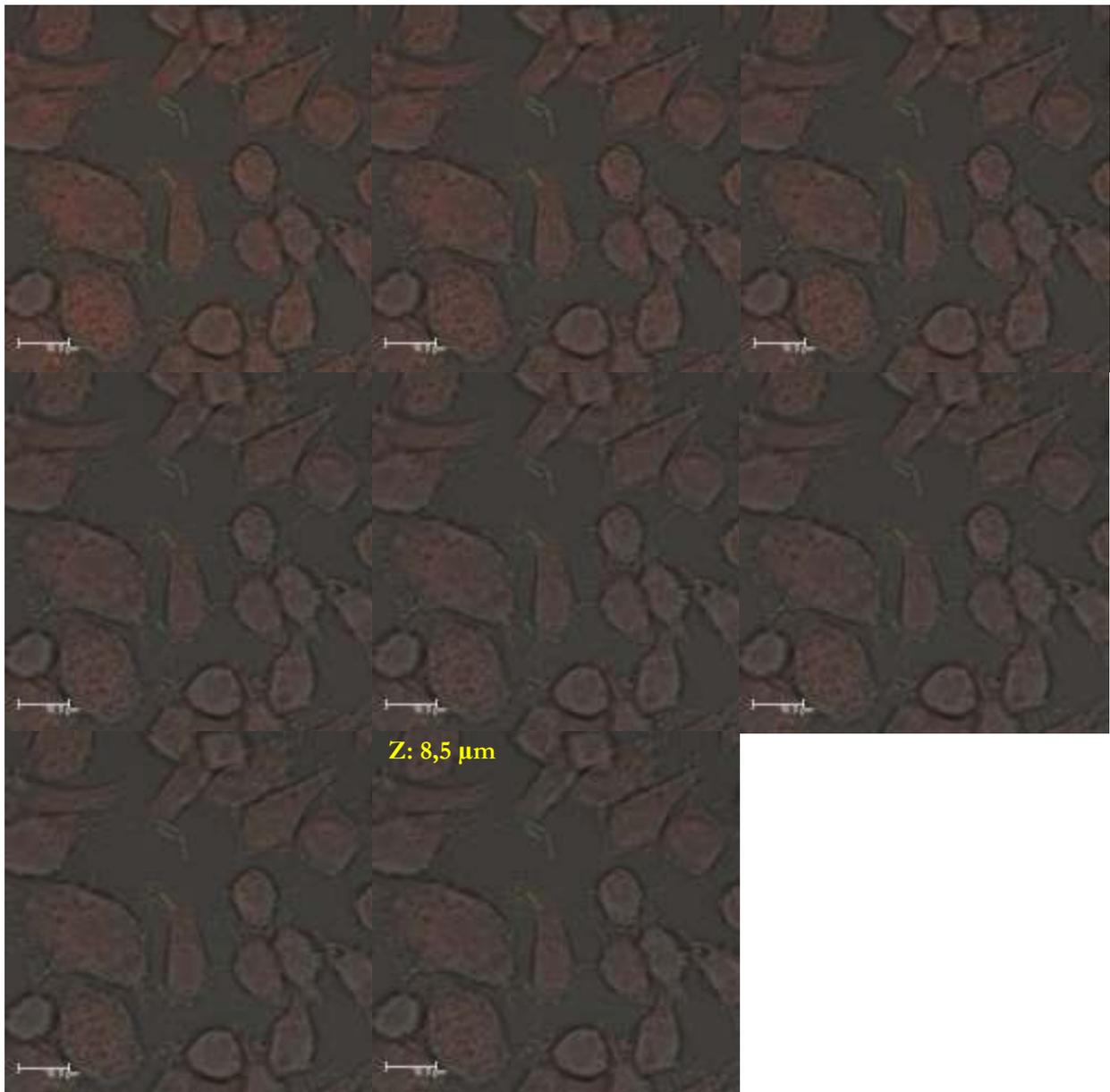


Figura I.15. Imágenes seriadas tomadas por microscopía confocal. Corresponde a la marcación de compartimentos ácidos en células RAW264.7 luego de la infección con *B. cereus* B10502-CFDA-SE, a los 60 min post infección. Las imágenes se realizaron cada 0,3 μm. La serie esta compuesta por 29 imágenes consecutivas de planos en Z. El recuadro amarillo resalta un plano con una bacteria internalizada rodeada por el marcador. La línea blanca representa 10 μm. Se detallan el Z inicial y final.

Debido al tamaño de la bacteria, la colocación con la marca no pudo hacerse por superposición de ambas fluorescencias.

Para obtener más detalles para la determinación de la colocación, se realizaron análisis complementarios. Uno de esos análisis realizados sobre los planos focales, fue el estudio de la colocación vista desde los planos XZ e YZ, perpendiculares al plano XY (Figura I.16). En caso de co-localización los picos de mayor intensidad de ambos marcadores coincidieron en una misma distancia focal (Figura I.16).

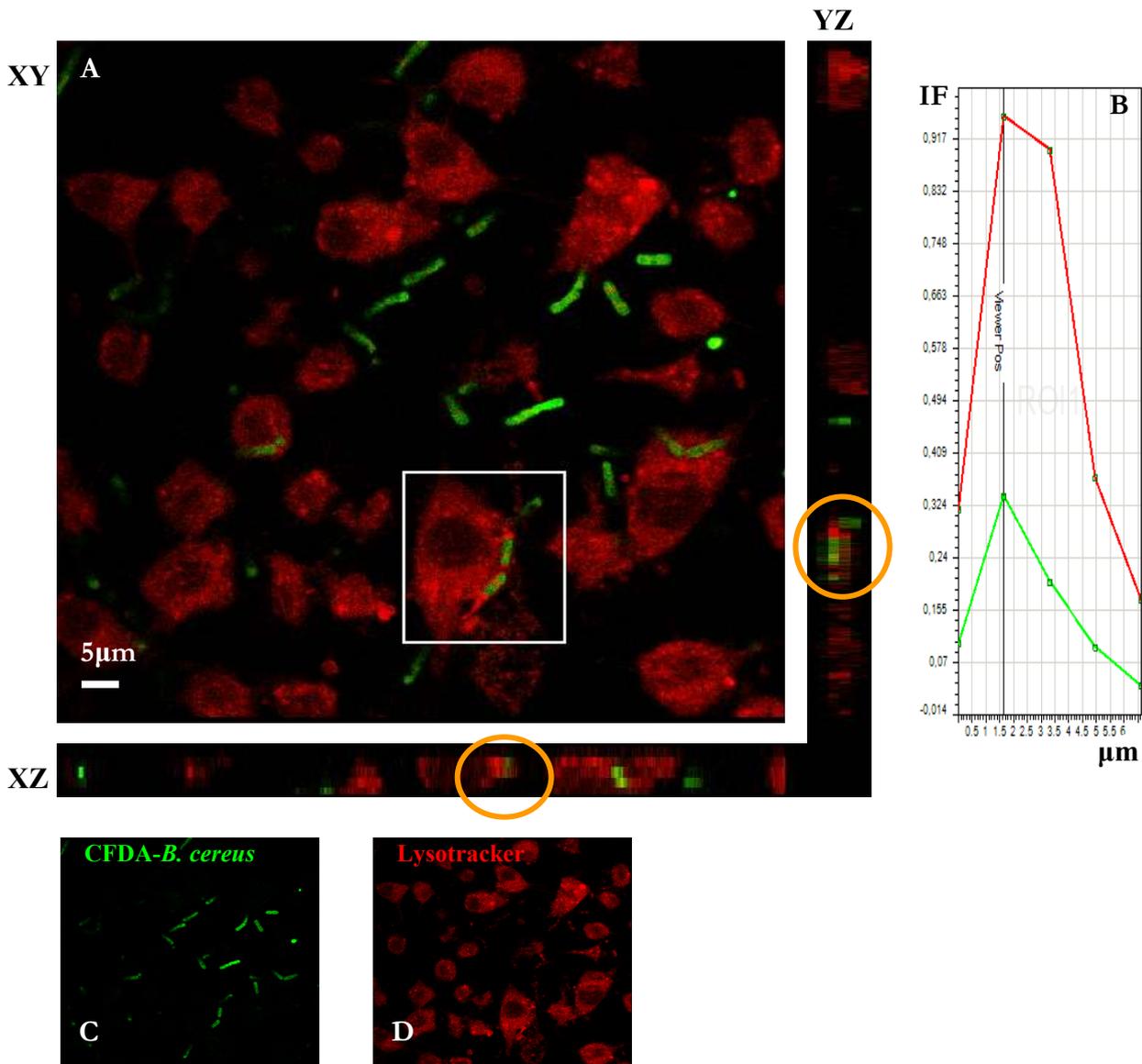


Figura I.16. Imagen confocal de *B. cereus* M2-CFDA-SE con compartimentos ácidos. Las imágenes corresponden a la marcación con Lysotracker de células RAW264.7 a los 60 minutos post infección con la cepa M2-CFDA-SE. Un corte en el plano XY (recuadro blanco), y en los planos XZ e YZ (círculos naranjas) muestra microorganismos internalizados (A). Se ven las intensidades de fluorescencia (IF) de bacteria-CFDA-SE (línea verde) y Lysotracker (línea roja). Las figuras C y D muestran las fluorescencias del microorganismo-CFDA-SE y el Lysotracker respectivamente

Las imágenes mostradas en la figura I.17 corresponden a una célula con dos bacterias internalizadas, una de ellas se encuentra colocalizando con el marcador de compartimentos ácido. Se puede notar la concentración aumentada del marcador rodeando la bacteria (indicado por un asterisco). La otra bacteria (indicada por triángulo) no presenta evidencia de colocalización.

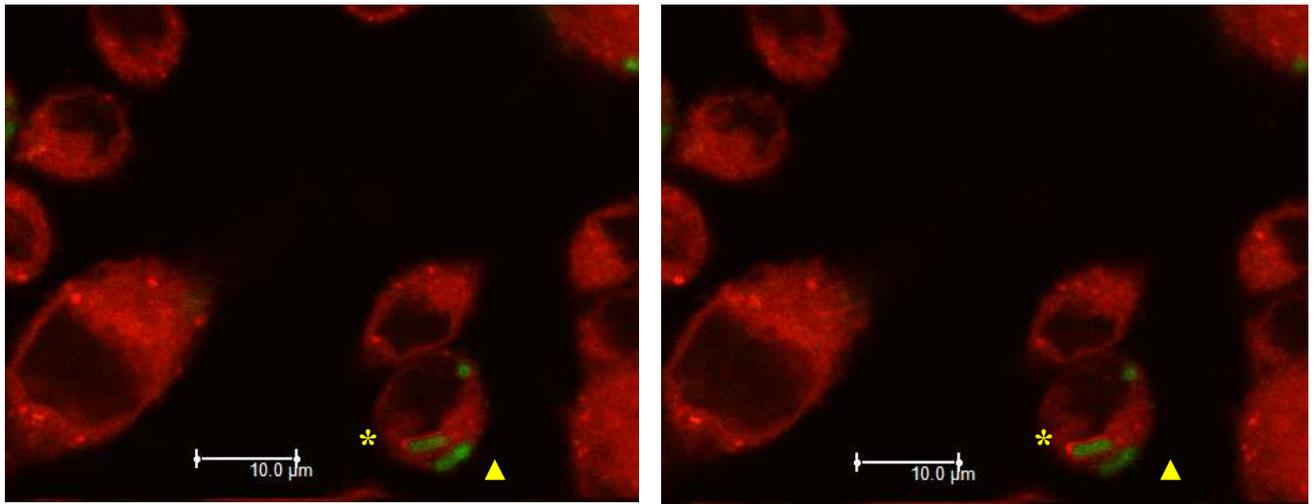


Figura I.17. Imágenes confocales de células RAW264.7 infectadas con *B. cereus* 2-CFDA-SE. En la foto pueden apreciarse dos microorganismos internalizados en una misma célula. Se puede ver que una de las bacterias se encuentra rodeada por el marcador de compartimentos ácidos (color rojo intenso) en ambas fotos (asterisco). La bacteria vecina no se encuentra colocalizando con el marcador (triángulo). Estas imágenes son de planos en Z consecutivos, en un tiempo de infección de 90 minutos.

Para lograr un análisis más completo de las imágenes se utilizó un programa que permitió realizar la reconstrucción de imágenes 3D, se muestra una imagen en la figura I.18. La imagen de la figura I.18 se construyó a partir de las imágenes confocales consecutivas mostradas en la figura I.15, que corresponde a una marcación con LysoTracker de células RAW264.7 infectadas con *B. cereus* B10502-CFDA-SE, por 60 min.

Con todos estos elementos se analizaron las imágenes confocales y se calcularon los porcentajes de colocalización a los diferentes tiempos de infección. En la figura se muestran los resultados en un gráfico (Figura I.19). La colocalización con compartimentos ácidos a los 60 min resultó mayor para las

cepas B10502 ($72,0 \pm 7,4 \%$) y M2 ($70,0 \pm 7,0 \%$) al comparar con la cepa 2 ($53,5 \pm 4,9 \%$) y la cepa T1 ($45,7 \pm 4,0 \%$) ($p < 0,05$). A los 90 min, los valores para la cepa M2 fueron los más altos ($85,2 \pm 8,7 \%$), difiriendo significativamente de los de la cepa 2 ($66,8 \pm 7,6 \%$) ($p < 0,05$), aunque sin diferencia significativa con la cepa B10502 ($75,8 \pm 5,8\%$) y la cepa T1 ($78,7 \pm 13,7$).

A los 45 min no se observó colocalización con el LysoTracker para ninguna de las cepas estudiadas.

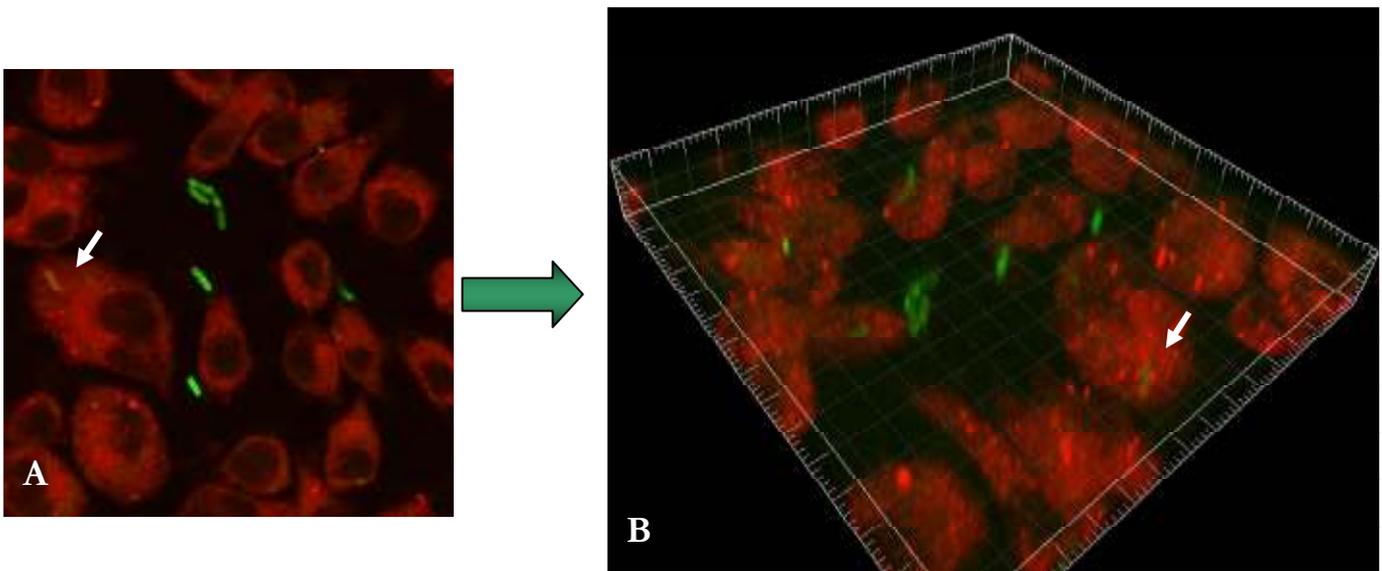


Figura I.18. Reconstrucción de imagen 3D de tinción con LysoTracker. Se muestra la colocalización de la cepa B10502-CFDA-SE de *B. cereus* con compartimentos ácidos en el plano XY (A). Esta serie de imágenes consecutivas, permitió la reconstrucción de una imagen 3D (B) (BITPLANE Imaris). Estas imágenes corresponden a un tiempo de post infección de 60 min utilizando células RAW264.7

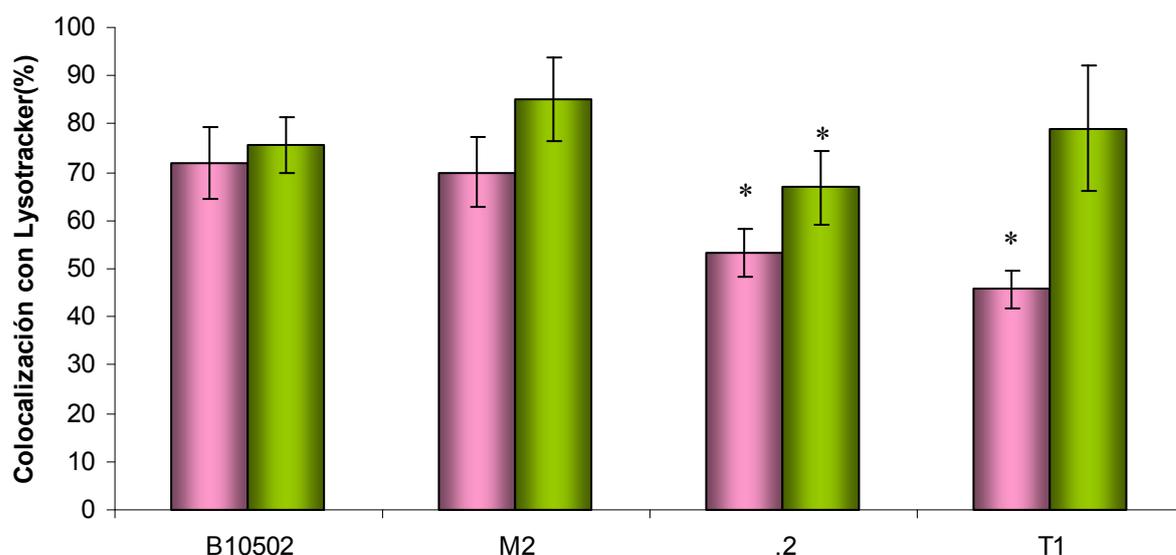


Figura I.19. Colocalización de *B. cereus* con LysoTracker. Luego de 60 y 90 min de infección de las células RAW264.7 con las diferentes cepas de *B. cereus*, se marcaron con LysoTracker y se calculó el porcentaje de colocalización de los microorganismos marcados con CFDA-SE por microscopía confocal. Los asteriscos representan una diferencia significativa (* $p < 0.05$) respecto a la cepa M2 para cada tiempo.

60 min post-infección
 90 min post-infección

Estudio de endosomas de la vía de reciclaje

En estos experimentos se utilizaron pulsos de transferrina marcada con un fluorocromo sobre los macrófagos infectados. Esta marcación se utiliza como modelo de reciclaje del receptor de transferrina. La transferrina cargada de hierro se une a receptores de la superficie celular a pH neutro, luego de esta unión, la transferrina resulta internalizada vía endocitosis mediada por receptores. Luego de pocos minutos, el complejo receptor-transferrina se mueve a un compartimento ácido no lisosomal, donde se pierde el hierro. La apotransferrina (transferrina sin hierro unido) unida al receptor y se dirige a la superficie celular (Dautry-Varsat et al, 1983). El receptor de transferrina resulta entonces un marcador de endosomas

tempranos debido a que no trafica por la vía lisosomal (Hashim *et al.*, 2000; Ibrahim-Granet *et al.*, 2003)

Para realizar este experimento se infectaron las células RAW264.7 con las distintas cepas de *B. cereus* marcadas con CFDA-SE. Pasados los diferentes tiempos de infección, los macrófagos fueron tratados con un pulso de transferrina marcada con Alexa-594.

Estos análisis aportaron información sobre la internalización de estos microorganismos a través de endosomas de reciclaje. Los estudios de colocalización se realizaron por microscopía confocal y la serie de análisis realizados fue similar a los efectuados para la colocalización del microorganismo con el marcador de compartimentos ácidos (Lysotracker). La figura I.20 muestra la reconstrucción de imágenes 3D. Se muestra la marcación en células RAW264.7 luego de la infección con la cepa B10502 y con la cepa 2, en distintos tiempos post infección.

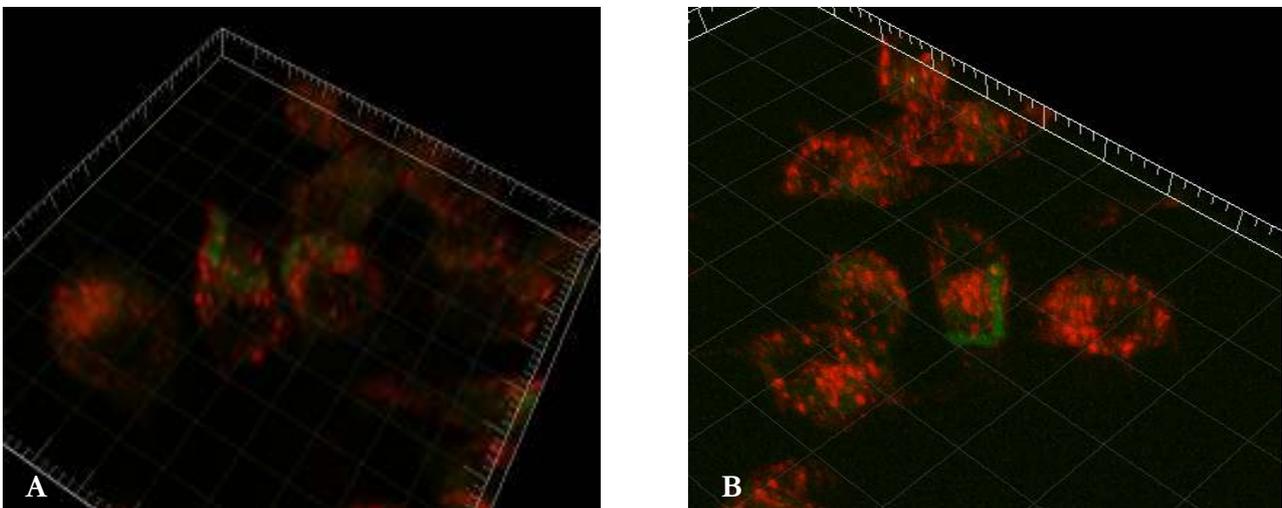


Figura I.20. Reconstrucción de imágenes 3D en la marcación con pulso de transferrina. Luego del ensayo de fagocitosis con células RAW usando *B. cereus* marcado con CFDA-SE, las macrófagos fueron tratados como se indica para el protocolo de marcación con transferrina. La imagen A pertenece a la fagocitosis de la cepa B10502 de *B. cereus* a un tiempo de post-infección de 60 min. La imagen B corresponde a la fagocitosis de la cepa 2 de *B. cereus* a los 45 min de infección.

Se observó que las marcas de transferrina en los endosomas de reciclaje eran muy abundantes en las células RAW264.7. Debido al importante tamaño de las bacterias analizadas pareció correcto tomar como efectiva la colocalización cuando se viera un contacto íntimo del microorganismo con estos endosomas. En caso contrario, estos microorganismos se consideraron como no colocalizados con la transferrina.

En los análisis ensayados con este modelo de infección no se vieron colocalizaciones de las cepas de *B. cereus* con los endosomas de reciclaje para los tiempos analizados. Es probable que se necesiten tiempos más cortos para el análisis de esta marca, ya que rápidamente se encuentra a los microorganismos colocalizando con marcadores de compartimentos tardíos.

EXPRESIÓN DE MHC-II Y CD86 EN LA SUPERFICIE DE MACRÓFAGOS

La expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras como el CD86, fue analizada sobre los macrófagos (RAW264.7) infectados por las diferentes cepas de *B. cereus* (a MDI de 20). Se pudo ver que la expresión de MHC-II tuvo un incremento significativo luego de 48 hs de incubación de los macrófagos con la cepa M2 (Índice de expresión (IE): $377,0 \pm 89,1$) al comparar con las otras cepas de *B. cereus* ($p < 0,005$). Los valores de IE obtenidos al incubar con el resto de las cepas fueron: para la cepa B10502 $104,2 \pm 41,9$; para la cepa 2 $96,5 \pm 50,8$ y para la cepa T1 $102,4 \pm 58,7$ (Figura 21 A).

La expresión de la molécula co-estimuladora CD86, no se vio afectada respecto al control. Este comportamiento fue el mismo para las cuatro cepas de *B. cereus*. Los valores de IE para la expresión de CD86 fueron: Control, $12229,8 \pm 376,2$; control positivo, $22938,4 \pm 953,7$; células incubadas con la cepa B10502, $12337,1 \pm 158,3$; con la cepa M2, $15325,6 \pm 1475,3$; con la cepa 2, $12114,8 \pm 2876,0$ y con la cepa T1, $11547,1 \pm 6110,6$ (Figura I.21). En ambos casos, el

control positivo de expresión de los marcadores fue la incubación de los macrófagos con LPS y como control basal se utilizaron células sin estimular.

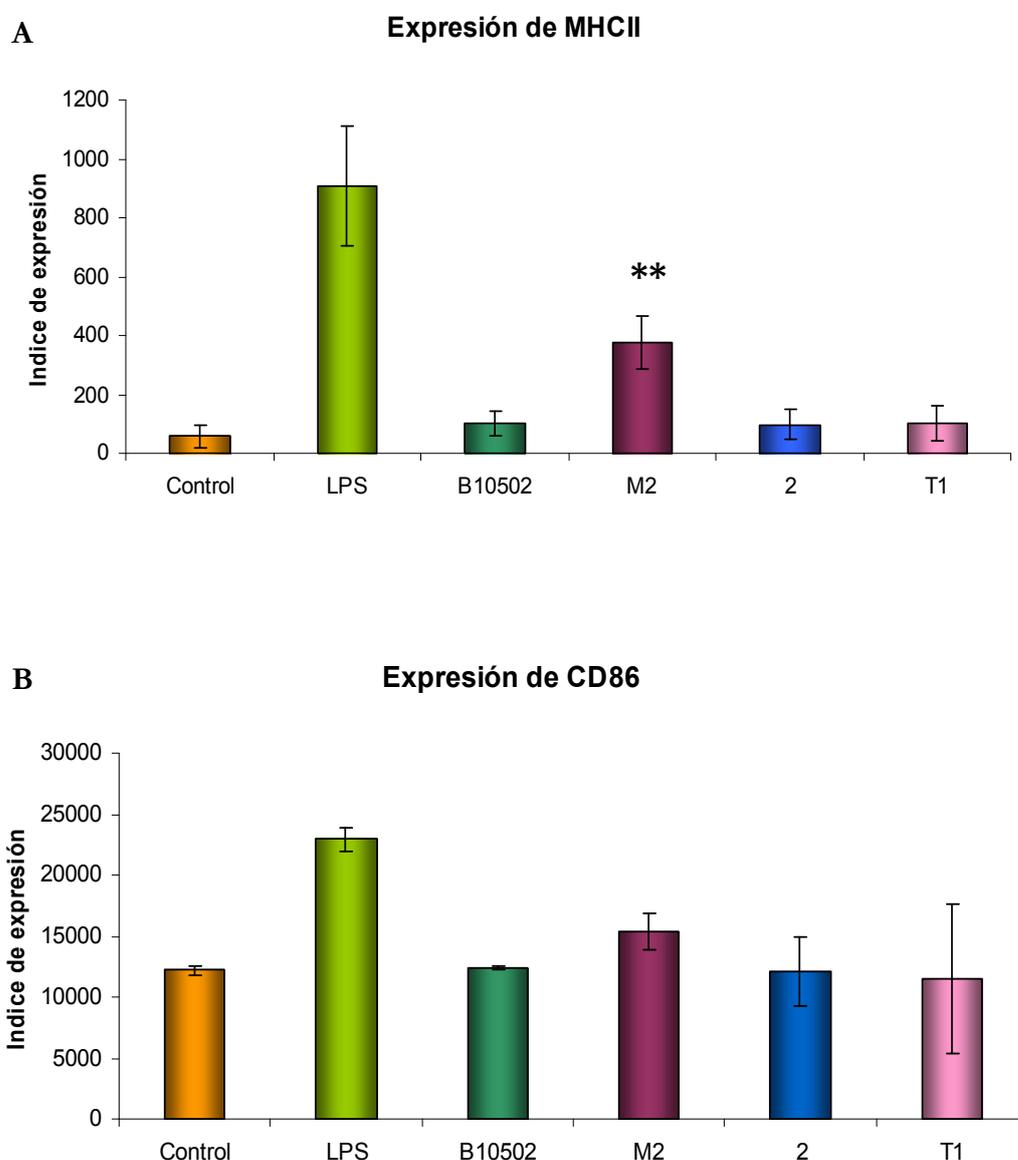


Figura I.21. Expresión de marcadores de superficie en células RAW264.7. Los macrófagos se incubaron con LPS o cepas de *B. cereus* durante 48 hs en presencia de cloranfenicol. La figura A muestra los valores de IE para la expresión de MHC-II en las diferentes condiciones analizadas. La figura B muestra los valores de IE para la expresión de la molécula coestimuladora CD86. Los asteriscos representan una diferencia significativa (** $p < 0.005$) para la cepa M2 respecto al control. IE (Índice de expresión): Porcentaje de células positivas x Intensidad media de fluorescencia.

DISCUSIÓN

Los macrófagos, están presentes en la mayoría de los tejidos del organismo y forman parte del sistema mononuclear fagocítico. Estas células constituyen unas de las principales líneas de defensa frente a los microorganismos patógenos, ya que poseen una elevada actividad fagocítica, un potente sistema microbicida y son eficientes para presentar antígenos e iniciar respuestas inmunes.

Se ha demostrado que los macrófagos están involucrados en la promoción de la germinación intracelular de bacterias esporuladas para lograr así eliminarlas (Guidi-Rontani *et al.*, 1999; Dixon *et al* 2000). Estos hechos se correlacionan con el rol propuesto de protección frente a la infección con esporos de *Bacillus* spp. (Dixon *et al* 2000; Guidi-Rontani *et al* 2001; Ireland y Hanna 2002; Pickering *et al* 2004; Tarasenko *et al* 2008). Si embargo, se ha visto en infecciones con *B. anthracis* (utilizando una cepa no capsulada), que un porcentaje de los esporos ingeridos por macrófagos que germinan dentro de la célula llegan a replicarse, capacidad dependiente de la multiplicidad de infección utilizada (Ruthel *et al.*, 2004).

Por otro lado, la sobrevivencia de los esporos fagocitados depende también del estado germinativo del espora (Gut *et al.*, 2011). Huang y colaboradores observaron que esporas de *B. subtilis* expresando LLO_{L461T} (LLO_{L461T}, derivado de listeriolisina O, una toxina formadora de grandes poros) fagocitadas por macrófagos, eran capaces de germinar y proliferar dentro del macrófago pero luego resultaban eliminadas (Huang *et al.*, 2008).

Estos antecedentes con diferentes especies de *Bacillus* resultan de interés, pero no se encuentran estudios publicados para *B. cereus*. Debe destacarse que el presente trabajo se focaliza en las células vegetativas, y no en esporos que es la aproximación tradicional de los estudios antes mencionados. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el grupo sobre la interacción de *B. cereus* con enterocitos humanos en cultivo (Minnaard *et al.*, 2001; Minnaard *et al.*, 2004), se

decidió indagar acerca de la actividad biológica de cepas de *B. cereus* en interacción con otros tipos celulares.

En este capítulo se estudió la interacción de células vegetativas de *B. cereus* con células fagocíticas profesionales y sus vías de internalización en condiciones no opsónicas. Las cepas utilizadas poseen diferente origen y actividad biológica (Minnaard *et al.*, 2007).

La forma vegetativa es relevante en el contexto de infecciones intestinales ya que se ha postulado que la formación de factores extracelulares ocurre en el lumen intestinal (Andersson *et al.*, 1998; Stenfors Arneses *et al.*, 2008). Para comprender la virulencia de *B. cereus*, se deben tener en cuenta tanto los factores extracelulares que produce como la interacción directa con los enterocitos.

En el caso de las cepas estudiadas en esta tesis, se conoce que sus factores extracelulares afectan la morfología y viabilidad de enterocitos humanos en cultivo (Minnaard *et al.*, 2001; Minnaard *et al.*, 2004). Las cepas M2, 2 y T1 fueron capaces de provocar el desprendimiento de la monocapa de enterocitos y la necrosis de las células. Particularmente la cepa B10502 no provocó desprendimiento de la monocapa de enterocitos (células Caco-2) (cuando el sobrenadante provenía de cultivos de 16 hs a 32°C) pero si permitió la entrada de yoduro de propidio a las células, lo que indicaría una alteración en la membrana (Minnaard *et al.*, 2004).

Se sabe que la forma vegetativa de algunas de las cepas de *B. cereus* tienen la capacidad de unirse o inclusive invadir enterocitos y esto podría contribuir a su virulencia (Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007). Respecto a esta característica, las cepas T1, 2 y M2 resultaron capaces de adherirse o incluso invadir las células epiteliales, mientras que la cepa B10502 no fue capaz de invadir los enterocitos (Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007). Se muestran algunas características de las cepas estudiadas en la tabla I.4.

Tabla I.4. Características de las cepas utilizadas.

	<i>B. CEREUS</i> B10502	<i>B. CEREUS</i> M2	<i>B. CEREUS</i> 2	<i>B. CEREUS</i> T1
Origen	Intoxicación alimentaria (Minnaard et al., 2004)	Leche en polvo (Minnaard et al., 2001)	Leche maternizada (Minnaard et al., 2001)	Intoxicación alimentaria (Buchanan y Schultz, 1992)
Desprendimiento de enterocitos (1)	+	-	-	+
Modelo de desprendimiento (2)	ND	DB	DA	DA
Invasión de enterocitos (3)	No invade	Invade	Invade	Invade
Genes del Complejo nhe presentes (4)	nheA	nheB	nheB, nheC,	nheA, nheB, nheC
Genes del Complejo hbl presentes (4)	-	-	hblD	hblA, hblB, hblC, hblD
Otros genes presentes (4)	entFM, sph	entFM, sph piplC	entS, bceT sph	entS, entFM sph, piplC, bceT
BDE (5)	+	+	+	+
ces (6)	-	-	-	+
cytk (6)	+	-	+	+

- 1: Desprendimiento de enterocitos: Caco-2 infección de 3 h con 10⁸ UFC (Minnaard et al., 2007).
 2: Modelos de desprendimiento de células Caco-2 establecido con diferentes dosis de sobrenadante. Se realizaron modelos de dosis respuesta. DA: desprendimiento alto. DB: desprendimiento bajo. ND: Cepas que no desprenden (Minnaard et al., 2007).
 3: Invasión de enterocitos: Caco-2 (Minnaard et al., 2004)
 4: Análisis de genes asociados a factores de virulencia de *B. cereus* mediante PCR. (Minnaard et al., 2007)
 5: BDE (Bacillus diarrheal enterotoxina). Inmunoensayo (TECRA International Pty Ltd, Australia) Presencia de NheA con Tecra BDE kit (Tecra Diagnostics) (Minnaard, 2008)
 6: ces y cytk: Gentileza de Monika Ehling-Schulz (Food Microbiology Unit, Clinic for Ruminants, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria). Por multiplex PCR (Ehling-Schulz et al., 2006) La cepa T1 no fue analizada para estos dos genes. Sin det.: Sin determinar.
 7: Comunicación personal Dra Ana C. Lopez. UB-CIFEFI-FCAyF-UNLP

Teniendo en cuenta las diferencias en las características de las cepas y su actividad biológica frente a células epiteliales, se indagó acerca de la interacción con células fagocíticas profesionales en un modelo *in vitro* y un modelo *ex vivo* en condiciones no opsónicas.

En los ensayos realizados en este trabajo de tesis, se utilizaron las bacterias sin osonizar para el análisis de interacción con células fagocíticas. *B. cereus* es un microorganismo que no se encuentra considerado como intracelular, por lo cual si resulta internalizado por las células fagocíticas, será dirigido a compartimentos degradativos. Al no osonizar el microorganismo antes del ensayo de fagocitosis, esperaríamos tener menor direccionamiento a compartimentos lisosomales (Gordon *et al.*, 2000).

En los análisis de fagocitosis de microorganismos existen diferentes métodos para diferenciar un microorganismo internalizado de un microorganismo adherido a la superficie de la célula. Puede realizarse por recuentos en placa mediante un ensayo de protección con antibióticos (Minnaard *et al.*, 2004). Otra manera es utilizando la microscopía de fluorescencia, mediante marcación diferencial de los microorganismos internalizados respecto de los externos a la célula, utilizando anticuerpos específicos contra el microorganismo (Lamberti *et al.*, 2010). También puede lograrse, apantallando la fluorescencia de los microorganismos externos mediante el uso de un producto como cristal violeta o azul tripán (Pils *et al.*, 2006). El método de apantallamiento usando azul tripán es muy utilizado en los análisis de internalización de microorganismos, inclusive se lo ha utilizado para apantallar la fluorescencia de esporas de *B. anthracis* marcadas (Stojkovic *et al.*, 2008); los ensayos publicados varían en la concentración del azul tripán utilizada para el apantallamiento (Pils *et al.*, 2006; Pollak *et al.*, 2012).

En este trabajo de tesis, se utilizó el método de apantallamiento con azul tripán. Si bien puede ocurrir que el apantallamiento no sea absoluto, permitió visualizar diferentes grados de interacción.

Como primer paso en el estudio de los mecanismos de patogénesis, se analizó la asociación de los macrófagos con las diferentes cepas de *B. cereus* mediante microscopía de fluorescencia.

Se encontraron diferentes patrones de asociación entre los macrófagos peritoneales y las bacterias estudiadas. En las microscopías, la cepa B10502 fue la que mostró la mayor eficiencia en la asociación a los macrófagos, mientras que para las cepas 2 y M2 los valores encontrados fueron menores. Por otro lado la infección con la cepa T1 produjo daño celular, que se observó al analizar las muestras al microscopio. Los resultados de las asociaciones fueron concordantes con la fagocitosis analizada por citometría de flujo, donde se pudo ver una mayor actividad fagocítica contra la cepa B10502 y M2 al comparar con las cepas de *B. cereus* 2 y T1. En este punto resulta interesante resaltar lo obtenido con la tinción de yoduro de propidio, ya que se vio un aumento de necrosis celular relacionada a las bacterias para la cepa T1. La viabilidad de los macrófagos en la infección con las cepas B10502, M2 y 2 se encontró afectada de manera similar a los 30 minutos post infección.

Minnaard y colaboradores, determinaron mediante un análisis multivariado de los factores de virulencia realizado sobre *B. cereus*, que la cepa T1 pertenece a un cluster diferente al de las cepas B10502, M2 y 2, ya que la cepa T1 resultó positiva para todos los genes analizados, como se puede ver en la tabla I.4 (Minnaard *et al.*, 2007). Esto podría relacionarse con su comportamiento distintivo entre las cepas en estudio, respecto a la asociación y la fagocitosis.

Sin embargo, otras características, como el modelo de desprendimiento de enterocitos y la invasión resultaron similares para las cepas T1, 2 y M2 (Minnaard *et al.*, 2007). No se pudo establecer una correlación entre la presencia de ciertos genes y la actividad biológica (Minnaard *et al.*, 2007). Esto podría estar relacionado con la multiplicidad de factores que presenta *B. cereus*, sumado a que los resultados dependen del modelo celular utilizado.

Los resultados del presente trabajo muestran que la muerte de las cepas en estudio dentro de los fagocitos comienza a un tiempo corto luego de la infección.

Si bien para las cuatro cepas analizadas se pudo encontrar sobrevivientes a la fagocitosis a los 90 minutos post infección, las cepas T1 y 2 fueron capaces de persistir en compartimentos intracelulares en un mayor número que las otras dos cepas. Los otros tiempos analizados fueron 120 y 150 minutos post infección, y en estos tiempos no se encontraron microorganismos sobrevivientes para ninguna de las cepas estudiadas.

La supervivencia de las cepas B10502 y M2 resultó menor que para T1 y 2, lo cual puede relacionarse con el mayor porcentaje de fagocitosis que se apreció para las cepas B10502 y M2. Estos resultados podrían deberse a la presencia de diferentes factores de virulencia que finalmente determinan el destino de los microorganismos fagocitados (Minnaard *et al* 2001; Minnaard *et al* 2004; Minnaard *et al* 2007). De hecho, las cepas B10502 y M2 se encuentran cercanas en los análisis multivariados realizados por Minnaard y colaboradores (Minnaard *et al.*, 2007). Estudios recientes han demostrado que la esfingomielinasa juega un rol importante en la virulencia de *B. cereus* ya que disminuye la producción de H₂O₂ y la fagocitosis inducida por peptidoglicano en macrófagos de ratón (Oda *et al.*, 2012). Si bien todas las cepas estudiadas son portadoras del gen *spb* (Minnaard *et al.*, 2007), podrían tener diferencias en la expresión del mismo.

El análisis cuantitativo de marcadores endocíticos a través de citometría de flujo es una herramienta para el estudio de la maduración de los fagosomas (Hmama *et al.*, 2004). Es por esto que se decidió evaluar la colocalización de *B. cereus* con LAMP-1, un marcador de endosomas y lisosomas tardíos, usando citometría de flujo. La cantidad de LAMP-1 se ve incrementada a medida que el fagosoma pasa por diferentes estadios de maduración (Hostetter *et al.*, 2003).

Debido a la metodología utilizada para el análisis de colocalización con LAMP-1, fue necesario incrementar considerablemente el número de células a infectar. En este punto se aislaron vacuolas de las células y para lograr una significancia estadística por citometría de flujo, fue necesario analizar un elevado número de eventos por muestra (300000). Es por esto que los siguientes análisis

del destino intracelular de *B. cereus*-CFDA-SE se realizaron con esta línea y no con macrófagos peritoneales.

El mayor porcentaje de colocalización de las bacterias con LAMP-1, se obtuvo para la cepa M2. Para las cepas B10502 y 2 el porcentaje de colocalización fue menor. En el caso de la cepa T1, si bien las células estaban intactas al comienzo del procedimiento de extracción de vacuolas, una vez obtenida la fracción subcelular, no se pudieron adquirir eventos en las muestras provenientes de la infección con T1. Esto podría deberse a un artefacto relacionado con el daño celular que debilita a los macrófagos y que determine la lisis en el momento de aislar las vacuolas. Estos eventos podrían estar relacionados con los efectos citopáticos vistos sobre los macrófagos peritoneales infectados con T1 y están en concordancia con la alta actividad biológica encontrada para esta cepa (Minnaard *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos para la adquisición de LAMP-1 en las vacuolas asociadas a M2 y 2, se corresponden con los valores obtenidos para la muerte de estas cepas. La supervivencia de la cepa M2 fue menor que la de la cepa 2, lo cual se correlaciona con el alto número de eventos LAMP-1 (+) para M2.

En contraste, la supervivencia de la cepa M2 fue mayor que para la cepa B10502 aunque la ruta a vacuolas LAMP-1 positivas ocurra en menor medida para la cepa B10502 que para la cepa M2. Estos resultados podrían estar indicando que la cepa M2 resiste mejor las condiciones degradativas del fagosoma aunque por un tiempo limitado.

Para la cepa T1 se obtuvieron los menores valores de asociación y resultó pobremente fagocitada. Podríamos esperar que los altos valores de necrosis macrofágica vistos para la misma, estén relacionados a los factores secretados o derivados de lisis bacterianas, además del daño producido por la interacción de la bacteria con la célula.

La marcación de los macrófagos con LysoTracker, un marcador que se acumula selectivamente en compartimentos de bajos pH, se utilizó para cuantificar la colocalización de los fagosomas ácidos con las diferentes cepas de *B. cereus*

marcadas con CFDA-SE. A los 60 min post-infección, las cepas M2 y B10502 mostraron porcentajes de colocalización similares, sin embargo la cepa M2 alcanzó valores mayores a los 90 min post infección. Este comportamiento se correlaciona con los valores obtenidos para LAMP-1. En el caso de la cepa 2 y de la cepa T1, se vio un valor significativamente menor ($p < 0,05$) en el porcentaje de colocalización con Lysotracker a los 60 minutos comparando con M2.

A tiempos mayores (90 min) para la cepa 2 también se vieron valores menores de colocalización, esta diferencia fue significativa ($p < 0,05$) sólo al compararla con los valores alcanzados para M2. Estos datos se correlacionaron con los mayores valores de supervivencia obtenidos para las cepas 2 y T1 luego de la internalización lo cual estaría indicando un procesamiento más lento para las cepas 2 y T1 a través de la ruta lisosomal, lo que provocaría la mayor supervivencia observada a los 90 minutos.

Los resultados indicarían la existencia de diferentes cinéticas de procesamiento en los macrófagos para las distintas cepas de *B. cereus* estudiadas. Aunque *B. cereus* no es considerado un patógeno intracelular, algunas cepas parecen ser capaces de tener una cinética más lenta de procesamiento intracelular. Así se obtiene un comportamiento dependiente de cepa en lo que respecta a la sobrevivencia y la fagocitosis. Las cepas 2 y T1, parecen ser dirigidas más lentamente a los compartimentos degradativos que las cepas B10502 y M2. Esto pudo observarse en el mayor porcentaje de colocalización con Lysotracker para las cepas B10502 y M2 a los 60 minutos, y también en compartimentos LAMP-1 positivos para la cepa M2. Estos hallazgos estarían de acuerdo con la mayor capacidad de sobrevivir, aunque de manera limitada, luego de la fagocitosis para las cepas 2 y T1. Estas similitudes y diferencias entre las cepas se correlaciona con el análisis multivariado realizado por Minnaard y colaboradores, en donde las cepas B10502 y M2 resultan más cercanas entre ellas que de las otras dos cepas consideradas en este trabajo (Minnaard *et al.*, 2007).

Muchos microorganismos utilizan los compartimentos de la vía endocítica del reciclaje de receptor de transferrina para nutrirse del hierro presente en ellos y

lograr sobrevivir en las células que los ingieren. Esto se observó para *Coxiella burnetti* (Howe y Mallavia, 1999), *Salmonella typhimurium* (Steele-Mortimer *et al.*, 1999), *Mycobacterium tuberculosis* (Flannagan *et al.*, 2009), *Bordetella pertussis* (Lamberti *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos de la colocalización de *B. cereus*-CFDA-SE con transferrina, sugieren que las cepas evaluadas en este trabajo, irían rápidamente a compartimentos degradativos.

La expresión de MHCII en la superficie de los macrófagos sólo se vio incrementada en las células infectadas por la cepa M2. Si bien estos resultados se obtuvieron luego de 48 horas de contacto con las distintas cepas de *B. cereus*, apoyarían la idea de un comportamiento dependiente de cepa en las infecciones.

Como se dijo previamente, es conocido que los esporos de *B. anthracis* fagocitados por macrófagos, pueden germinar dentro de los mismos y activar la producción de diferentes proteínas. Además pueden liberar factores que lo ayuden a sobrevivir su pasaje por la vía endocítica; sin embargo llegan a ser eliminados. Entre los factores se encuentra la antrolisina O, una toxina formadora de grandes poros que se une a colesterol, que contribuye con la desestabilización de la membrana del fagosoma y le permite a la bacteria su pasaje al citosol (Tonello y Zornetta, 2012). Shannon y colaboradores, informaron un porcentaje de homología e identidad del 98 % entre antrolisina O y la cereolisina O de *B. cereus* (Shannon *et al.*, 2003).

Basándonos en el conocimiento previo de estas cepas (Minnaard *et al.*, 2001; Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007) y en los estudios realizados en el presente trabajo de tesis, podría considerarse la expresión de los factores dentro de la células como cepa-dependientes, y por ende, también la inducción de las cascadas de señales que se originen. De esta manera, si las cepas B10502, 2 y T1 expresaran citolisinas que le permitieran desestabilizar las membranas del fagosoma, en una forma diferente que M2 esto podría influenciar en su distinto procesamiento y expresión en el contexto de MHC-II. A su vez, esto podría explicar su comportamiento diferencial con los marcadores de la vía endocítica utilizados en este trabajo. Aunque no implicaría que el microorganismo pueda

pasar a citosol como se ha demostrado para *Listeria monocytogenes*. Los análisis de los marcadores endocíticos, permitieron encontrar porcentajes de colocalización de los microorganismos con los mismos, aunque para el porcentaje que no colocalizó con éstos, no fue determinado si se encontraban en otro compartimento o en compartimentos en diferente estadio de maduración.

En la tabla I.5, se muestran los resultados obtenidos en el presente capítulo.

Se observa que la cepa B10502 sobresale respecto a las otras cepas estudiadas dado que los valores de asociación de las células fagocíticas y el porcentaje de fagocitosis son significativamente mayores. En el estudio de sobrevida resaltan los valores de UFC/ml obtenidos para las cepas 2 y T1. Respecto a los análisis de colocalización con los diferentes marcadores de la vía endocítica los resultados muestran que la internalización en las células es diferente para distintas cepas.

Los resultados obtenidos sugieren que el curso de la infección con *B. cereus* podría depender no sólo de la expresión de los factores de virulencia y de la interacción con las células, sino también de la habilidad que presenten para interaccionar con de células fagocíticas.

Tabla I.5. Interacción de *B. cereus* con macrófagos, destino intracelular y expresión de marcadores.

	<i>B. CEREUS</i> B10502	<i>B. CEREUS</i> M2	<i>B. CEREUS</i> 2	<i>B. CEREUS</i> T1
Asociación (%)	50,9 ± 0,8	24,4 ± 2,7	31,9 ± 4,3	20,0 ± 2,1 Con daño celular
Fagocitosis	36,3 ± 3,8	22 ± 7,1	15 ± 2,9	7,1 ± 1,6
Sobrevida a 90 min (UFC/ml)	2,5 ± 3,5	27,5 ± 2,12	97 ± 3	190 ± 19
Colocalización con LAMP-1	11,6 ± 1,4	25,3 ± 1,2	10,9 ± 5,4	Sin determinar
Colocalización con LysoTracker a los 60 min (%)	72 ± 7,4	70 ± 7	53,5 ± 4,9	45,7 ± 4
Colocalización con LysoTracker a los 90 min (%)	75,8 ± 5,8	85,2 ± 8,7	66,8 ± 7,6	78,7 ± 13,7
MHCII	Sin aumento respecto al control	Incremento respecto al control	Sin aumento respecto al control	Sin aumento respecto al control
CD86	Sin aumento respecto al control	Sin aumento respecto al control	Sin aumento respecto al control	Sin aumento respecto al control

BIBLIOGRAFÍA

Aderem A. and Underhill D.M. 1999. Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623

Andersson A, Granum P, and Rønner U. 1998. The Adhesion of *Bacillus cereus* Spores To Epithelial Cells Might Be An Additional Virulence Mechanism. *Intern. J Food Microb.* 39: 93-99.

Beecher D.J., Schoeni J.L. and Wong. A. C. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Infect. Immun.* 63: 4423-4428.

Beecher D.J. and Lee Wong A.C. 2000. Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate, *Microbiology.* 146: 1371-1380

Bohdanowicz M., Cosío G., Backer J.M. and Grinstein S. 2010. Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. *J Cell Biol.* 191(5):999-1012. doi: 10.1083/jcb.201004005.

Booth J.W., Trimble W.S. and Grinstein S. 2001 .Membrane dynamics in phagocytosis, *Semin. Immunol.* 13, 357-364.

Bottone E.J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 23(2):382-98.

Buchanan R. L. and F. J. Schultz. 1992. Evaluation of the oxid BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. *J Food Prot.* 55:440-443.

Didierlaurent A., Simonet M. and Sirard J.C. 2005. Innate and acquired plasticity of the intestinal immune system. *Cell Mol Life Sci.* ;62(12):1285-7.

Di Paolo G. and De Camilli P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* Oct 12;443(7112):651-7.

Dixon T.C., Fadl A., Koehler T.M., Swanson J.A. and Hanna P.C. 2000. Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape, *Cell Microbiol.* 2, 453–463.

Ehling-Schulz M, Guinebretiere MH, Monthán A, Berge O, Fricker M, Svensson B. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 260(2):232-40

Fairn G.D. and Grinstein S. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 2012 Aug;33(8):397-405.

Fernández-Arenas E., Bleck C.K.E., Nombela C., Gil C., Griffiths G. and Diez-Orejas R. 2009. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol.* 11(4) 560–589

Flannagan R., Cosio G. and Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology.* (7) 355-366

Flannagan R., Jaumouill'e V. and Grinstein S. 2012. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 7:61–98

Gordon SB, Irving GR, Lawson RA, Lee ME, Read RC. 2000. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. *Infect Immun.* 68(4):2286-93.

Goy G., Croxatto A. and Greub G. 2008. *Waddlia chondrophila* enters and multiplies within human macrophages, *Microbes Infect.* 10: 556-562.

Griffiths G. 1996. On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma.* 95:37-58

Guidi-Rontani C., Weber-Levy M., Labruyère E. and Mock M. 1999. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol.* 31(1):9-17.

Guidi-Rontani C., Levy M., Ohayon H. and Mock M. 2001. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages, *Mol. Microbiol.* 42, 931–938.

Gut I.M., Tamilselvam B., Prouty A.M., Stojkovic B., Czeschin S., van der Donk W.A. and Blanke S.R. 2011. *Bacillus anthracis* spore interactions with mammalian cells: relationship between germination state and the outcome of in vitro. *BMC Microbiol.* ;11:46. doi: 10.1186/1471-2180-11-46.

Hashim .S, Mukherjee K., Raje M., Basu S.K. and Mukhopadhyay A. 2000. Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem.* 275(21):16281-8.

Hmama Z., Sendide K., Talal A., Garcia R., Dobos K. and Reiner N.E. 2004. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an $1\alpha,25$ - dihydroxyvitamin D3–phosphoinositide 3-kinase pathway. *Journal of Cell Science* 117, 2131-2139

Hooper LV, Macpherson AJ. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 10(3):159-69. doi: 10.1038/nri2710. Review.

Hostetter J., Steadham E., Haynes J., Bailey T and Cheville N 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*; 26(4):269-83.

Howe D. and Mallavia L.P. 1999. *Coxiella burnetii* infection increases transferrin receptors on J774A. 1 cells. *Infect Immun*. 67(7):3236-41.

Huang J.M., La Ragione R.M., Cooley W.A., Todryk S., Cutting S.M. 2008. Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine*. 26(48):6043-52. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.024. Epub 2008 Sep 20.

Hume D.A., Ross I.L., Himes R., S. Sasmono R.T., Wells C.A. and Ravasi T. 2002. The mononuclear phagocyte system revisited, *J. Leukoc. Biol*. 72:621-627.

Hume D.A. 2006. The mononuclear phagocyte system, *Curr. Opin. Immunol*. 18, 49-53.

Humen M. 2009. Interacción de *Giardias intestinalis* con el hospedador. Efecto antagónico de probióticos intestinales. Tesis doctoral. FCE-UNLP.

Huynh K.K., Eskelinen E., Scott C.C., Malevanets A., Saftig P. and Grinstein S. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal* 26: 313–32

Ibrahim-Granet O., Philippe B., Boleti H., Boisvieux-Ulrich E., Grenet D., Stern M. and Latgé J.P. 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun.* 71(2):891-903.

Ireland J. and Hanna P.C. 2002. Macrophage enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires gerS, *Infect. Immun.* 70 5870–5872.

Kotiranta A.; Lounatmaa K. and Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections, *Microbes Infect.* 2: 189-198.

Lamberti Y., Perez Vidakovics M.L., van der Pol L.W. and Rodriguez M.E. 2008. Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils, *Microb. Pathog.* 44, 501-511.

Lamberti Y.A., Alvarez Hayes J., Perez Vidakovics M.L., Harvill E.T. and Rodriguez ME. 2010. Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages. *Infect Immun.* 78(3): 907–913

Lawe D.C., Patki V., Heller-Harrison R., Lambright D. and Corvera S. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem.* 275(5):3699-705.

Minnaard J. 2008. *Bacillus cereus*: estudios *in vitro* de factores de virulencia relevantes en el contexto de infecciones intestinales. Tesis doctoral. FCE-UNLP

Minnaard J, Humen M and Pérez P. 2001. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cell. *J Food Prot.* 64:1535-1541.

Minnaard J., Lievin-Le Moal V., Coconnier M., Servin A., and Pérez P. 2004. Disassembly of F-Actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiates human intestinal caco-2 cells. *Infect. Immun.* 72:3106-3112.

Minnaard J., Delfederico L., Vasseur V., Hollmann A., Rolny I., Semorile L. and Pérez P.F. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 197-206.

Minnaard J., Rolny I. and Pérez P. 2013. Interaction between *Bacillus cereus* and cultured human enterocytes: Effect of calcium, cell differentiation and bacterial extracellular factors. *J Food Prot.* En prensa.

Oda M, Takahashi M, Matsuno T, Uoo K, Nagahama M, Sakurai J. 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta.* 1798:1073-80

Obermüller S., Kiecke C., von Figura K. and Höning S. 2002. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes, *J. Cell Sci.* 115, 185-194.

Palm N.W. and Medzhitov R. Pattern. 2009. Recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev.* 227:221-33

Pickering A.K., Osorio M., Lee G.M., Grippe V.K., Bray M., Merke T.J. 2004. Cytokine response to infection with *Bacillus anthracis* spores, *Infect. Immun.* 72 6382–6389.

Pieters J. 2001. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria, *Curr. Opin. Immunol.* 13, 37-44.

Pils S., Schmitter T., Neske F. and Hauck C.R. 2006. Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry, J. Immunol. Methods. 65 301–310.

Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A. and Baldi P.C. 2012. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. PLoS One. 7(11):e50214. doi: 10.1371/journal.pone.0050214. Epub

Rhee S.H. 2011. Basic and Translational Understandings of Microbial Recognition by Toll-Like Receptors in the Intestine. J Neurogastroenterol Motil, 17 No. 1

Rosenstiel P. 2013. Stories of love and hate: innate immunity and host-microbe crosstalk in the intestine. Curr Opin Gastroenterol. 29(2):125-32. doi: 10.1097/MOG.0b013e32835da2c7.

Ruthel G., Ribot W.J., Bavari S. and Hoover T.A. 2004. Time-lapse confocal imaging of development of *Bacillus anthracis* in macrophages. J Infect Dis. Apr 1;189(7):1313-6. .

Shannon JG, Ross CL, Koehler TM, Rest RF. 2003. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. Infect Immun. 71(6):3183-9.

Spiro D.J., Boll W., Kirchhausen T. and Wessling-Resnick M. 1996. Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. Mol Biol Cell. 7: 355–367.

Steele-Mortimer O., Mearesse S., Gorvel J.P., Ban-Hock T.H. and Finlay B. 1999. Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway, Cell Microbiol. 1 33-49.

Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A. and Granum P.E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 32(4):579-606. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x. Epub 2008 Apr 15.

Stenmark H. and Olkkonen V.M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biology* 2 (5):reviews 3007.1-3007.7

Sasaki T., Sasaki J., Sakai T., Takasuga S. and Susuki A. 2007. The Physiology of Phosphoinositides *Biological and Pharmaceutical Bulletin* Vol. 30 No. 9 P 1599-1604 *Vol. Biol. Pharm. Bull.* 30: 1599—1604.

Tarasenko O., Lee Soderberg K.H., Park M., Deirdre K. and McManus P. 2008. Glycoconjugates enhanced the intracellular killing of *Bacillus* spores, increasing macrophage viability and activation, *Arch. Microbiol* 189: 579–587

Tavares A.H., Silva S.S., Dantas A., Campos E.G., Andrade R.V., Maranhao A.Q., Brigido M.M, Passos-Silva D.G., Fachin A.L., Teixeira S.M.R., Passo.G.A.S., Soares C.M.A., Bocca A. L. , Carvalho M. J. A. , Silva-Pereira I. and Felipe M. S. S. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages, *Microbes Infect.* 9, 583-590.

Toh M., Moffitt M.C., Henrichsen L., Raftery M., Barrow K., Cox J.M., Marquis C.P. and Neilan B.A. Cereulide. 2004. The emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. *J Appl Microbiol.* 97(5):992-1000

Tonello F. and Zornetta I. 2012. *Bacillus anthracis* factors for phagosomal escape. *Toxins (Basel).* 4(7):536-53. doi: 10.3390/toxins4070536. Epub 2012 Jul 10.

Tuominen-Gustafsson H., Penttinen M., Hytonen J. and Viljanen M. 2006. Use of CFSE staining of borreliae in studies on the interaction between borreliae and human neutrophils, *BMC Microbiol.* 6: 92-106.

Vieira O.V., Botelho R.J. and Grinstein S. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.* 366:689-704.

Wang X.Q., Duan X.M., Liu L.H., Fang Y.Q. and Tan Y. 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 37(6):379-85.

Capítulo II

Efectos de otros microorganismos
sobre la interacción de *Bacillus*
cereus con células eucarióticas



INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta que la microbiota comensal constituye uno de los pilares de la homeostasis intestinal, resulta natural pensar en estrategias destinadas a mejorar el balance de la microbiota asociada a mucosas, modulando su composición o potenciando sus efectos beneficiosos (Takahashi *et al.*, 2009). Esto ha sido logrado a través de diferentes productos tales como los probióticos que están preparados a base de microorganismos viables (Parvez *et al.*, 2006) y han agregado nuevas posibilidades de desarrollo a la industria alimentaria en todo el mundo. Entre los microorganismos que han demostrado producir efectos benéficos para el hospedador merecen mencionarse aquellos de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* aunque también se han utilizado levaduras del género *Saccharomyces*.

Si bien existen numerosas evidencias experimentales de los efectos favorables de los microorganismos llamados probióticos, los mecanismos que permitan explicar adecuadamente su funcionamiento no están aún aclarados. Se han propuesto mecanismos relacionados con la provisión de actividades enzimáticas deseables (Parvez *et al.*, 2006), la disminución de actividades enzimáticas nocivas (Gudiel-Urbano y Goñi, 2002; Hugo *et al.*, 2006), la inhibición de la actividad de patógenos intestinales (Garrote *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001; Servin, 2004; Medrano *et al.*, 2008, Medrano *et al.*, 2009), la competencia por sitios de adhesión en el epitelio intestinal (Bernet *et al.*, 1994) y la modulación de los mecanismos de defensa del hospedador (Benyacoub *et al.*, 2005; Maldonado Galdeano y Perdígón, 2006; Riedel *et al.*, 2006; Zeuthen *et al.*, 2006; Verdu, 2009; Dogi *et al.* 2009).

La desorganización de la red de actina aparece como un tema recurrente durante la internalización y diseminación de microorganismos en células eucarióticas (McCallum y Theriot, 2000). Además, la alteración del tráfico intracelular de vesículas contribuye a crear lugares favorables para la supervivencia y el crecimiento de microorganismos (Clemens *et al.*, 2002; Sansonetti, 2001).

El transporte de microorganismos de la microbiota intestinal por células dendríticas y la generación de una respuesta inmune controlada (Macpherson y Uhr, 2004; Mueller y Macpherson, 2006) añaden una nueva dimensión a las posibilidades de explicar los mecanismos de acción de los microorganismos probióticos. Aunque el antagonismo de los efectos de microorganismos patógenos intestinales por microorganismos probióticos se atribuye al desplazamiento o impedimento de la interacción con las células del hospedador, se encuentra muchas veces que el probiótico afecta sólo mínimamente la interacción del patógeno con las células del hospedador. Esto podría indicar que además de una exclusión del patógeno existiría una interferencia en los mecanismos de señalización desencadenados por el patógeno.

Luego del contacto con las células, los microorganismos pueden adherirse o ser internalizados dependiendo de las células que estén involucradas en la interacción y desencadenan respuestas celulares relevantes para la homeostasis. Una vez dentro de la célula, los microorganismos pueden ser destruidos por mecanismos de defensa (especies reactivas de oxígeno, defensinas) o sobrevivir en dominios intralisosomales, intravacuolares o citoplasmáticos (Flannagan et al, 2009).

Las células presentadoras de antígeno tales como macrófagos y células dendríticas forman parte de los mecanismos de defensa innata. Estas células se encuentran en diferentes compartimentos de la mucosa en donde interaccionan con la microflora del huésped y microorganismos patógenos desencadenando diversas respuestas. En los últimos años numerosos trabajos *in vivo* avalan los efectos inmunomoduladores de los microorganismos probióticos.

En lo que se refiere a la inmunomodulación por parte de los microorganismos probióticos, se ha descrito que estos microorganismos pueden modular los mecanismos de defensa inmunitarios innatos y adaptativos (Borchers *et al.*, 2009). La inmunomodulación se puede lograr modificando el balance T_H1 / T_H2 (Hua et al., 2010). También inducen migración de células B y aumentan la secreción de IgA específica vía modulación de células dendríticas intestinales (Macpherson y Uhr, 2004), y facilitan la captación de antígenos en las placas de Peyer.

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un factor de transcripción citoplasmático que tiene un rol importante en la regulación del sistema inmune. En respuesta a las señales recibidas, la activación de NF- κ B ocurre por la fosforilación de su inhibidor (I κ B α), que se disocia del dímero de NF- κ B permitiendo la traslocación del factor de transcripción al núcleo donde induce la expresión del gen. Las bacterias comensales o no patógenas, principalmente a través de las señales mediadas por receptores del tipo Toll, pueden inhibir la activación del factor NF- κ B en las células epiteliales del intestino por varios mecanismos (Cerf-Bensussan et al, 2010).

Las infecciones intestinales causadas por las enterobacterias, inducen la activación de una cascada inflamatoria que produce un aumento de IL-8 y otras moléculas pro inflamatorias. El aumento de IL-8 provoca el reclutamiento de células hacia la zona de infección, entre las cuales se encuentran los neutrófilos. Algunos probióticos pueden inhibir la producción de IL-8 de las células epiteliales intestinales, a través de la modulación de NF- κ B (Sokol *et al.*, 2008).

Otros autores proponen un mecanismo totalmente diferente, donde los probióticos modulan la homeostasis intestinal a través, de la estimulación de las respuestas innatas. Así lograrían la activación de la vía NF- κ B y la producción de TNF- α , por lo cual, los efectos beneficiosos estarían asociados a procesos de estimulación inmunológica (Mizoguchi *et al.*, 2008; Pagnini *et al.*, 2010)

Por todo lo expuesto anteriormente, es sabido entonces, que la microbiota intestinal tiene un rol muy importante en la homeostasis intestinal. No sólo por un aumento en la producción de IgA, sino desencadenando de manera balanceada las respuestas celulares del tipo T_H1, T_H2 y T_Hreg (Brandtzaeg, 2010).

En nuestro grupo de trabajo, diferentes especies de microorganismos potencialmente probióticos, tales como *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200,

se encuentran ampliamente estudiados. Estos microorganismos fueron utilizados en ensayos de efectos antagónicos frente a patógenos.

En este capítulo de tesis se analizará la interacción de estas cepas de lactobacilos y bifidobacterias con células fagocíticas. Y en un siguiente paso, se evaluará si las cepas mencionadas tienen algún efecto sobre la interacción de *B. cereus* con las células del huésped.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Cepas:

Para la realización de estos ensayos, se utilizaron cuatro cepas de microorganismos potencialmente probióticos (tabla II.1).

Tabla II.1. Cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* utilizadas.

Cepa	Origen	Referencia
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> CIDCA 133	Aislada de leche cruda	De Urraza, 1997.
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114	Granulo de kefir AGK1	Garrote <i>et al</i> , 2000.
<i>Bifidobacterium bifidum</i> CIDCA 5310	Aislada de heces de neonato sano de entre 6 días y 4 meses. Alimentado con leche materna	Gómez Zavaglia <i>et al.</i> , 1998 Pérez <i>et al.</i> , 1998
<i>Bifidobacterium infantis</i> NCC 200 (anteriormente CIDCA 538)	Aislada de heces de neonato sano de entre 6 días y 4 meses. Alimentado con leche materna	Gómez Zavaglia <i>et al.</i> , 1998 Pérez <i>et al.</i> , 1998

El cepario se conservó a -80°C en criotubos con glicerol al 10 % (v/v) como crioprotector.

Cepas de *Bacillus cereus* utilizadas como modelo de microorganismo intestinal patógeno. Se utilizaron las cuatro cepas de *B. cereus* estudiadas en el capítulo I (Tabla II.2).

Tabla II.2. Cepas de <i>B. cereus</i> utilizadas		
Cepa	Origen	Referencia
<i>B. cereus</i> B10502	Intoxicación alimentaria. Gentilmente provista por el Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires	Minnaard <i>et al.</i> , 2004.
<i>B. cereus</i> M2	Leche descremada en polvo, aislada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.	Minnaard <i>et al.</i> , 2001.
<i>B. cereus</i> 2	Fórmula infantil. Aislada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.	Minnaard <i>et al.</i> , 2001.
<i>B. cereus</i> T1	Intoxicación alimentaria. Gentilmente cedida por el Dr. R. Buchanan del US Department of Agriculture, ARS Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit, Philadelphia, USA.	Buchanan y Schultz, 1992.

El cepario se conservó a -80°C en caldo BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) adicionado con glucosa al 0,1 % (p/v) (BHIG) con el agregado de glicerol al 10 % (v/v).

Condiciones de crecimiento:

Partiendo de las cepas conservadas a -80°C, se cultivaron las bacterias en MRS para su reactivación y luego se procedió a un segundo repique al 1 % (v/v) en MRS, ambas incubaciones en las condiciones que se especifican a continuación:

Para las cepas de *Bifidobacterium* el medio de cultivo MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) fue adicionado con cisteína al 0,05 % (p/v) concentración final, y las condiciones de crecimiento fueron a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 24 hs.

Para los lactobacilos el medio de crecimiento usado fue MRS y las condiciones de crecimiento fueron a 37°C por 24 hs en aerobiosis.

Capítulo II

Para las cepas de *B. cereus*, partiendo de las cepas conservadas a -80°C , las bacterias se cultivaron en caldo BHIG durante 16 hs en agitación y a 32°C , al cabo de este tiempo, se repicaron en medio BHIG (inóculo al 4 % (v/v)), y se incubaron a 32°C durante 3 hs con agitación, de manera de obtener cultivos en fase exponencial.

CÉLULAS EUCARIOTAS

Para la realización de los ensayos se utilizaron la línea celular macrofágica de origen murino RAW264.7, las líneas de origen humano HT-29, HT-29 (NF- κ B-GFP), y células dendríticas obtenidas por diferenciación a partir de células mononucleares de sangre periférica humana.

RAW264.7 (ATCC TIB-71): Es una línea celular macrofágica, generada a partir de ratones Balb/c, por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson, compuesta por células que presentan funcionalidad fagocítica y adherente. Fueron adquiridas del banco de células del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). Esta línea se cultivó en RPMI 1640 al cual se le agregan penicilina (1000 UI) y estreptomycinina (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (PARAFARM, Argentina), 2 g/l NaHCO_3 y se suplementó con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (PAA Laboratories, GMBH, Pasching, Austria) inactivado por calor (en baño de agua a 56°C durante 30 min) (en adelante RPMI completo). Las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera con 5 % (v/v) CO_2 – 95 % (v/v) aire.

HT-29: Es una línea celular de epitelio intestinal humano obtenida a partir de adenocarcinoma de colon humano. Esta línea se cultivó en DMEM al cual se le agregan penicilina (1000 IU) y estreptomycinina (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (PARAFARM, Argentina), 2 g/l NaHCO_3 y se suplementó con 10 % (v/v) SFB (PAA

Laboratories, GMBH, Pasching, Austria) inactivado por calor, Las incubaciones se realizaron a 37°C en una atmósfera con 5 % (v/v) CO₂– 95 % (v/v) aire.

HT-29 (NF-κB-GFP): Esta línea celular se obtuvo a partir de las células epiteliales intestinales HT-29, establemente transfectadas con el plásmido pNF-κB-hrGFP (Stratagene) (Tiscornia *et al.*, 2012^a). Los genes de la proteína GFP están bajo el promotor de NFκB, lo cual permite evaluar su activación por fluorescencia. El mantenimiento de la línea celular se hizo en medio DMEM (GIBCO) al cual se le agregan 2 g/l NaHCO₃, adicionado con SFB al 10 % (v/v) y suplementado con GlutaMAX (4 mM) a 37 °C y en atmósfera humidificada con 5 % (v/v) de CO₂– 95 % (v/v) aire.

Células Dendríticas: Estas células se obtuvieron por diferenciación a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Las PBMC fueron obtenidas mediante purificación a partir de conos de plaquetaféresis utilizando un gradiente de Ficoll. Las células se mantuvieron en nitrógeno líquido, con DMSO 10 % como crioprotector, hasta su utilización. Las células monocíticas se purificaron a partir de los PBMC por adherencia a la superficie de la botella de cultivo. Para la diferenciación de las células dendríticas (CD), los monocitos fueron incubados durante dos días en RPMI suplementado con 10 % (v/v) SBF, 800 U/ml factor estimulador de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF) (Clausen, Uruguay) e IL-4 (1 % de sobrenadante condicionado de la línea celular J588L, transfectada con el gen que codifica para IL-4). Se evaluó la pureza de los monocitos por citometría de flujo con anti-human CD14 conjugado con FITC (BD) comparando con el tiempo cero (previo a la adhesión de las células a superficie plástica) para analizar el porcentaje obtenido de enriquecimiento en CD, también se realizó una marcación con CD11c. Se controló el número y viabilidad de las CD por tinción con azul tripán (Tiscornia *et al.*, 2012^b). En los ensayos, se sembraron las placas con 2,5 x 10⁵ células/ml.

Capítulo II

Todas las líneas celulares se mantuvieron en nitrógeno líquido en viales de 1 ml del medio correspondiente a cada línea, adicionado con 10 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Se utilizaron medios de cultivo marca GIBCO (GIBCO, Life Technologies Rockville, EEUU) para el mantenimiento de las líneas celulares eucarióticas.

OPSONIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

En los experimentos con células murinas, cuando fue necesario, los microorganismos fueron opsonizados con suero de ratón. Los microorganismos fueron lavados con PBS y resuspendidos en RPMI adicionado al 10 % (v/v) con suero de ratón. En estas condiciones, los microorganismos se colocan a 37°C durante 30 min. y con agitación. Luego de este tiempo, los microorganismos se lavan con PBS y se llevan a la concentración necesaria para el experimento.

MARCACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Para la marcación de los microorganismos, se tomaron cultivos frescos y se centrifugaron 15 min. a 900 g. Se realizaron dos lavados con PBS, y luego se resuspendieron las bacterias en RPMI sólo adicionado con 2 g/l de NaHCO₃ (en adelante RPMI adhesión).

La marcación de los microorganismos con 5(6) succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) (Invitrogen) se realizó de la misma manera que para *B. cereus*, como se muestra en el inciso “Marcación de los microorganismos” del capítulo I. La fluorescencia de las bacterias marcadas puede

medirse por citometría de flujo usando una excitación de 488 nm y detectando la misma en el canal FL1 (Fluorescencia verde).

Para la marcación de los microorganismos se tomaron 500 µl del cultivo lavado y se resuspendieron las bacterias en RPMI adhesión, se les agregó CFDA-SE con una concentración final de 10 µg/ml (Pils *et al.*, 2006; Tuominen-Gustafsson *et al.*, 2006). Estas muestras se cultivaron al abrigo de la luz y en agitación, a 37°C durante 30 min. Luego de ese período de incubación, se lavaron los cultivos 3 veces con PBS para retirar el marcador en exceso. La CFDA-SE sólo marca células que tengan intactas sus envolturas celulares. La marcación de los microorganismos se evaluó por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson) y por microscopía de fluorescencia (Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

Una vez lograda la óptima marcación de las cepas en estudio, se procedió inicialmente a la realización de los ensayos de interacción de las diferentes cepas potencialmente probióticas con la línea macrofágica en estudio (RAW264.7). A partir de estos resultados, se seleccionó la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 para realizar estudios de interacción con las cepas de *B. cereus* previamente ensayadas en el capítulo I de esta tesis. Finalmente, para determinar con más detalle las interacciones involucradas y las respuestas generadas por las células eucarióticas, debido a la presencia de la bacteria láctica, se seleccionó la cepa B10502 de *B. cereus*.

ENSAYO DE INFECCIÓN EN MACRÓFAGOS

Los ensayos de infección se realizaron sobre la línea celular RAW264.7, utilizando las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200,

Capítulo II

opsonizadas o sin opsonizar. Los macrófagos se infectaron con las diferentes cepas durante 30 minutos y cuando fueron necesarios tiempos mayores de incubación se agregó antibiótico (gentamicina 100 µg/ml) al medio para evitar el desarrollo bacteriano. Las multiplicidades de infección (MDI) dependieron del ensayo realizado. Las incubaciones se realizaron a 37°C en estufa gaseada (5 % (v/v) CO₂). Para finalizar la fagocitosis las placas se retiraron de la estufa, se colocaron sobre hielo y se lavaron las fosas con PBS frío. En cada ensayo descrito a continuación, se detallan los protocolos utilizados.

CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A LOS MACRÓFAGOS POR MICROSCOPIA

Para los ensayos de asociación, las células RAW264.7 se sembraron (2×10^5 células/ml) en placas de 24 fosas sobre vidrios (vidrio de 1 cm², Assistant, Alemania) y se les permitió desarrollar por 48 hs para que alcanzaran un 80% de confluencia. En la infección, se utilizaron las cepas *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200 opsonizadas o sin opsonizar. Las placas de células fueron previamente lavadas con PBS estéril para retirar las células sueltas. Luego se agregaron las suspensiones de las bacterias en RPMI adhesión, dejando siempre fosas con medio solo como controles. Las placas se llevaron a incubar a 37°C por 30 minutos en estufa gaseada (5 % (v/v) CO₂), para permitir la interacción y la fagocitosis. Pasado este tiempo, las muestras se colocaron sobre hielo para detener el proceso de fagocitosis. Para remover las bacterias que no se unieron a los macrófagos, se realizaron dos lavados con PBS frío. La multiplicidad de infección (MDI) utilizada en el ensayo fue de 50.

En este ensayo, la asociación fue evaluada por microscopía. Para la observación de las muestras, se realizaron coloraciones de Gram sobre las células. Las imágenes se tomaron con un microscopio óptico, usando un aumento de 100X

(Leica DMLB equipado con una cámara Leica DC100. Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland).

ENSAYO DE FAGOCITOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para los ensayos de fagocitosis analizados por citometría de flujo (CF), se utilizaron las cepas, *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200 marcadas con CFDA-SE y según correspondiera, opsonizadas o sin opsonizar. La fagocitosis se ensayó usando la línea celular macrofágica RAW264.7. Las células fueron cultivadas en placas de 24 fosas, con un crecimiento de 48 hs, para lograr una confluencia del 80 %. La MDI usada en estos ensayos fue de 50.

La incubación de las cepas estudiadas con los macrófagos, se logró agregando las suspensiones de bacterias marcadas con CFDA-SE en RPMI adhesión, en una concentración que permitió llegar a la MDI adecuada al agregar 500 µl por fosa. El procedimiento general fue el mismo que en el análisis de asociación por microscopía (inciso “Cuantificación de bacterias asociadas a los macrófagos por microscopía”). Pasados los 30 min. de fagocitosis, se realizaron dos lavados con PBS frío, se colectaron las células de las fosas utilizando *cell scrapers* (BD Falcon, BD Biosciences) y se pasaron a tubos de citometría (BD Falcon, BD Biosciences).

Se diferenciaron las bacterias internalizadas de las no internalizadas, apantallando la fluorescencia de las bacterias no internalizadas con azul tripán tal como se indicó en el inciso “Análisis de la fagocitosis de *B. cereus* por citometría de flujo” del capítulo I. Para esto a los tubos seleccionados para apantallar, se les agregó azul tripán de manera de llegar a una concentración final de 0,2 % (p/v) por dos minutos, se los lavó dos veces con PBS y se volvieron a analizar.

La población macrofágica se identificó por marcación con F4/80 (anti-ratón F4/80 conjugado con biotina y estreptavidina unida a ficoeritrina (PE)

Capítulo II

(eBioscience, San Diego, EEUU)). Se evaluó el porcentaje de microorganismos internalizados a los 30 minutos post-infección.

Los análisis se realizaron empleando un equipo FACScalibur Becton-Dickinson. Se adquirieron 10000 eventos para cada muestra.

EXPRESIÓN DE MARCADORES DE LA SUPERFICIE CELULAR

La capacidad de las células de presentar antígenos está relacionada con la expresión de moléculas co-estimuladoras en su superficie celular. Una de estas moléculas es el B7-2 (CD86) (Abbas y Lichtman, 2004) por esta razón se analizó la expresión de este marcador en los macrófagos mediante análisis de CF, usando un anticuerpo anti-CD86-ficoeritrina (eBioscience, San Diego, EEUU). Se analizó el efecto causado por las distintas cepas potencialmente probióticas, dichas cepas fueron usadas en condiciones opsónicas y no opsónicas.

El ensayo se realizó usando células RAW264.7 crecidas en placas de 24 fosas durante 48 horas. Las células fueron lavadas dos veces con PBS previo al ensayo de fagocitosis. Se realizó la fagocitosis como se indicó previamente, incubando durante 30 min. en estufa gaseada a 37°C, usando una MDI de 20. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS frío para detener la fagocitosis y retirar las bacterias no adheridas a las células. Se procedió a reemplazar el medio de las fosas con RPMI – 10 % SFB, suplementado con gentamicina (100 µg/ml). Las placas fueron incubadas durante 48 hs más en estufa gaseada. Pasado este tiempo, se retiraron las placas y se lavaron dos veces con PBS. Las células fueron removidas de las fosas y pasadas a tubos de citometría. Se centrifugaron durante 5 minutos a 600 g y se descartó el sobrenadante.

Las muestras así obtenidas fueron marcadas con un anticuerpo anti-ratón anti-CD86-PE, para lo cual, fueron incubadas con el mismo durante 30 min en baño de hielo y al abrigo de la luz, en la concentración recomendada por el fabricante. Luego fueron lavadas dos veces con PBS – 2 % (v/v) SFB. Se

resuspendieron en PBS y se adquirieron por citometría de flujo en un equipo FACScalibur Becton-Dickinson. Se adquirieron 10000 eventos en cada muestra. Se realizaron los controles de isotipo correspondientes.

La figura II.1 muestra un esquema resumido del protocolo usado para los ensayos de cuantificación de asociación por microscopía, ensayo de fagocitosis por CF y expresión de marcadores descritos anteriormente en este capítulo.

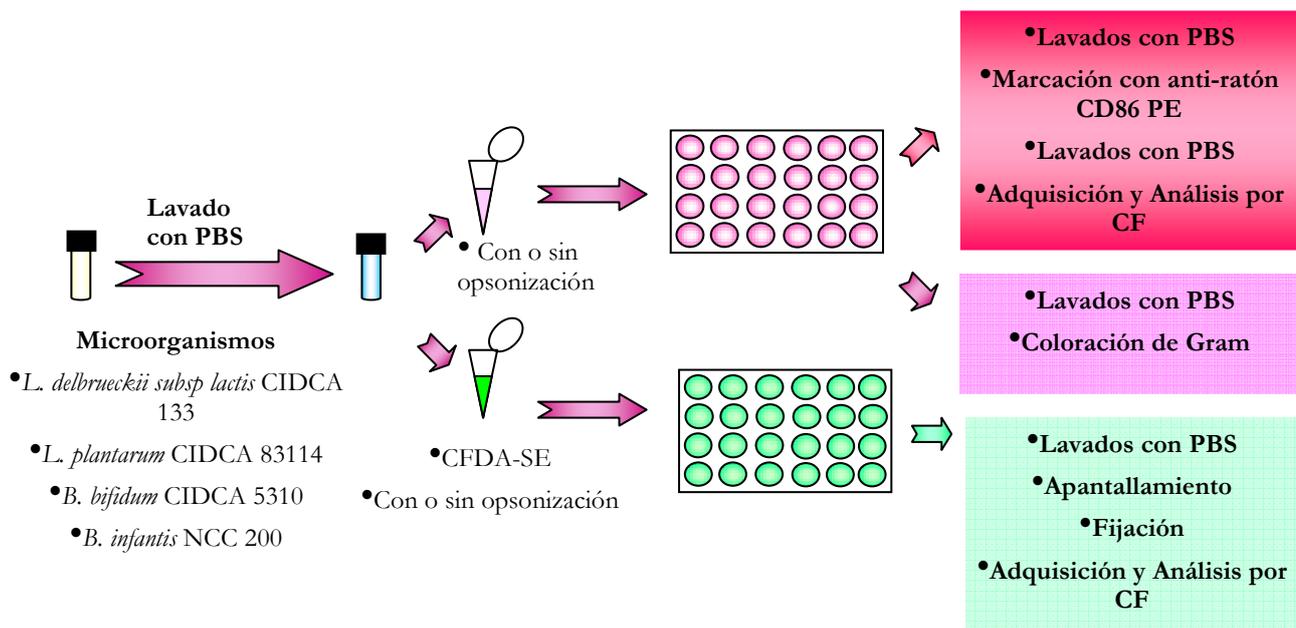


Figura II.1. Esquema general de los protocolos de interacción de RAW264.7 con los microorganismos potencialmente probióticos. Se muestran los esquemas de los diferentes ensayos realizados y sus posteriores análisis.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN CÉLULAS HT-29

Se utilizó la línea de células epiteliales intestinales HT-29, establemente transfectadas con el plásmido pNF- κ B-GFP (Stratagene). Como el gen de la proteína GFP está bajo el promotor de NF- κ B, la expresión de esta proteína permite evaluar la activación de la vía del NF- κ B. El medio utilizado en los

Capítulo II

experimentos fue DMEM suplementado con 10 % SBF y GlutaMAX. Las infecciones se llevaron a cabo utilizando la cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CIDCA 133, en combinación o no con las cuatro cepas de *B. cereus* estudiadas en el capítulo I.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de ensayo, las células se crecieron en placas de 24 fosas durante 48 hs, se infectaron usando una MDI final de 20 para cada microorganismo, y se evaluó la respuesta luego de 6 y de 18 hs de infección. Para evitar el desprendimiento de la monocapa, las infecciones se realizaron adicionando cloranfenicol (100 µg/ml) al medio de cultivo desde el inicio de la infección para evitar el crecimiento bacteriano durante el ensayo.

El esquema experimental que maximizó la respuesta celular sin dañar la monocapa implicó la infección en presencia de cloranfenicol durante 18 hs en estufa gaseada a 37 °C. La infección se realizó con cada una de las cepas de *B. cereus* en co-cultivo o no con la cepa 133. El control positivo de activación del factor NF- κ B, se realizó cultivando las células con TNF- α (3 ng/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EEUU). Pasado el tiempo de infección, las células se observaron al microscopio y se lavaron con PBS. Luego se extrajeron las células de las fosas y se realizaron las lecturas por citometría de flujo. Se analizó el porcentaje de eventos positivos para fluorescencia verde (GFP). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (CyanTM ADP Analyzer, Beckman Coulter, EEUU) y los resultados se procesaron utilizando el programa Summit v4.3 software (Dako Colorado, EEUU).

ASOCIACIÓN DE *BACILLUS CEREUS* A LAS CÉLULAS HT-29

Se incubaron las células HT-29 con los microorganismos usando el mismo esquema de infección puesto a punto en la determinación de la activación del factor NF- κ B (inciso “Evaluación de la activación del factor de transcripción NF- κ B en células HT-29). Para esto, se incubaron las células con las diferentes cepas

de *B. cereus* en presencia y ausencia de la cepa 133 durante 18 hs en estufa gaseada (5 % (v/v) CO₂) a 37°C en medio DMEM suplementado con 10 % de SBF, adicionado de cloranfenicol (100 µg/ml). Las cepas de *B. cereus* se utilizaron marcadas con CFDA-SE para poder determinar la asociación de las bacterias por citometría de flujo. Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo (CyanTM ADP Analyzer, Beckman Coulter, EEUU ya lo dije arriba) y los resultados se procesaron utilizando el programa Summit v4.3.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTE LA INFECCIÓN EN UN SISTEMA DE CO-CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS.

Para realizar estos ensayos, las células dendríticas (CD) se obtuvieron por diferenciación a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), tal como se explicó anteriormente.

Para la obtención de los sistemas de co-cultivos usando insertos, se sembraron las CD en placas de 12 fosas en una cantidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Se colocaron 500µl de la suspensión de CD por fosa y se agregaron los insertos conteniendo las células HT-29. Las células HT-29 se cultivaron sobre los insertos ($2,5 \times 10^5$ células/ml) 48 hs antes de realizar los co-cultivos con las CD. Estos co-cultivos se incubaron durante 6 horas en estufa gaseada y pasado este tiempo se cambió el medio del compartimento superior por un medio conteniendo los microorganismos para el ensayo, se conservaron fosas sin microorganismos para controles y fosas con 0,5 µg/ml de LPS (Sigma, EEUU) para ser utilizadas como controles positivos. En la figura II.2 se muestra un esquema general del sistema de co-cultivo utilizado.

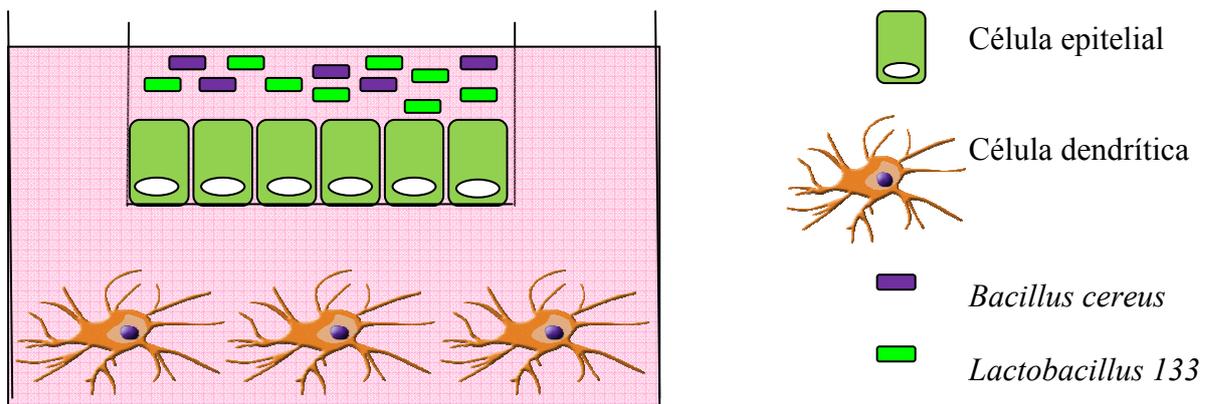


Figura II.2. Esquema representativo del modelo usado para los ensayos de cocultivos de células epiteliales con células dendríticas.

Para los ensayos se utilizaron insertos con tamaño de poro de 3,0 μm (Costar, EEUU). Se seleccionó la cepa de *B. cereus* B10502 para los ensayos, y se estudió el efecto de la misma en presencia o ausencia de la cepa *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133. Los microorganismos se añadieron en el compartimento superior utilizando una MDI de 20 para cada uno respecto a las CD. Las incubaciones se realizaron en presencia de cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El punto final del ensayo se obtuvo a las 18 hs de incubación a 37°C en atmósfera con 5 % (v/v) CO_2 .

Luego de las 18 hs de incubación las células fueron observadas al microscopio y se realizaron todas las determinaciones correspondientes. Una parte de los experimentos se realizaron con las bacterias marcadas con CFDA-SE, en estos ensayos se determinaron: la interacción de los microorganismos con las células eucariotas y la producción de citoquinas. Otra parte de los experimentos se hizo con los microorganismos sin marcar, en estos ensayos se determinaron los marcadores de superficie en las CD y se tomaron muestras para la determinación de citoquinas. Cada uno de los experimentos realizados con el sistema de co-

cultivos se detalla a continuación. Se muestra un esquema resumido de los ensayos en la figura II.3.

- CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Pasadas las 18 hs de incubación, se retiraron los sobrenadantes y el inserto fue guardado para determinaciones de interacción de *B. cereus* con enterocitos. Luego se recolectó el sobrenadante del compartimento de CD y se separó para la posterior determinación de citoquinas. Las CD que se encontraban en la fosa inferior, se removieron mediante *cell scrapers* y se lavaron con PBS, se colocaron en tubos de citómetro y se procedió a la marcación con anticuerpos para la caracterización. La ausencia de linfocitos se comprobó mediante marcaciones con CD3 - FITC y CD19 – PE. Se evaluó la disminución en la expresión de CD14 (CD14 – FITC).

Las características de las células se estudiaron utilizando marcaciones con anticuerpos CD11c - PerCP, CD86 - PE, y HLA - DR - FITC. En un primer paso se adquirieron CD sin marcar y CD con marcaciones simples, para poder seleccionar las regiones a analizar. Estos análisis se explican en detalle en la sección de resultados de este capítulo. En los estudios se excluyeron los dobletes utilizando un gráfico el *pulse width* (ancho de señal) vs FSC. El *pulse width* permite discriminar agregados celulares que tendrán un mayor valor en este parámetro. Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo, utilizando el programa Summit v4.3.

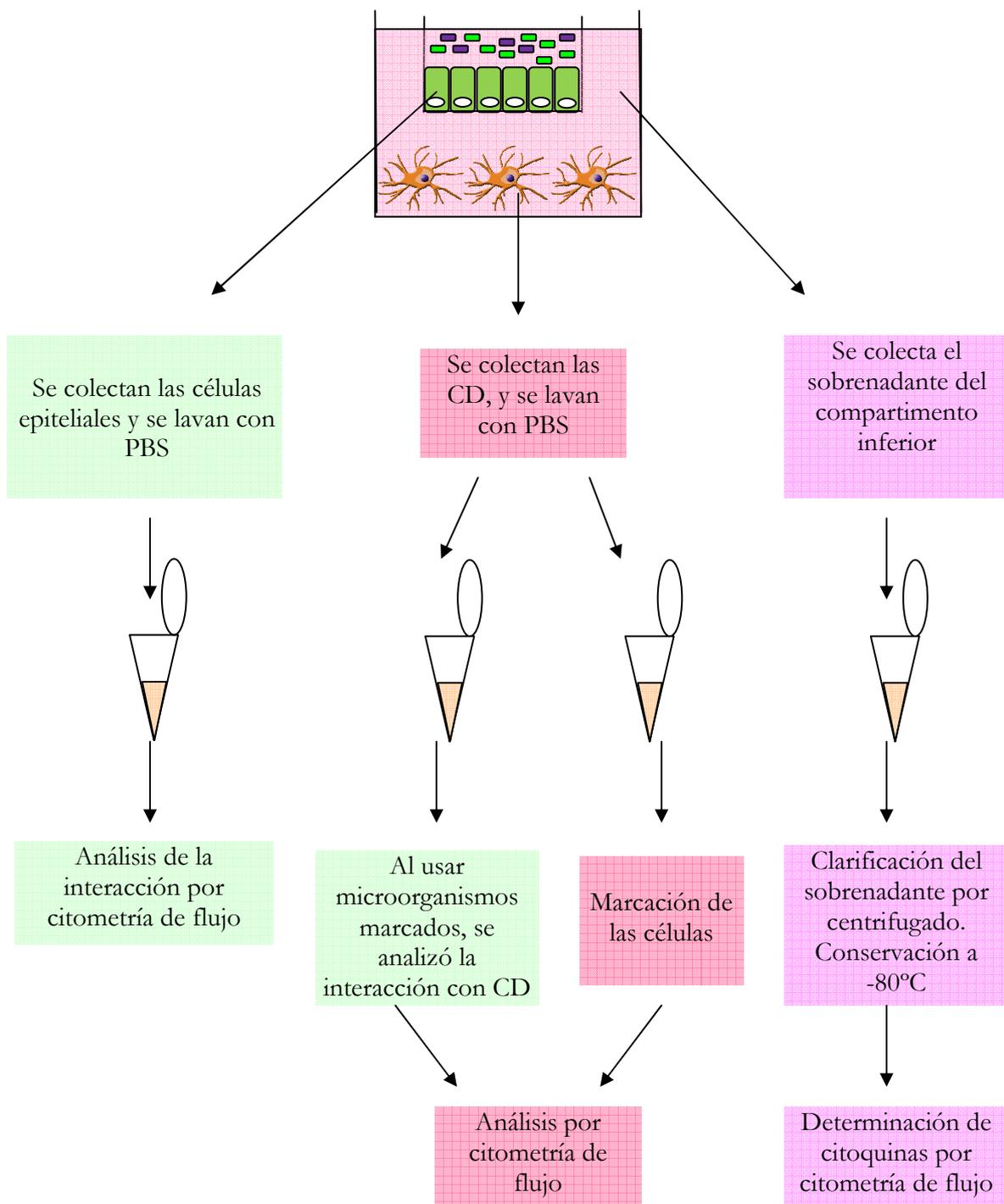


Figura II.3. Esquema general de los ensayos utilizando sistemas de co-cultivos celulares

- ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE *B. CEREBUS* CON ENTEROCITOS Y CD

Se analizó la interacción de la cepa B10502 con las diferentes poblaciones celulares, para este estudio se usó la cepa marcada con CFDA-SE. La interacción fue analizada tanto en presencia como en ausencia de la cepa 133. Se utilizaron cocultivos de células HT-29 con CD obtenidas como se describió previamente. Los ensayos se realizaron colocando los microorganismos en el compartimento superior. Luego de la incubación en estufa gaseada (5 % (v/v) CO₂) a 37°C durante 18 hs y en presencia de cloranfenicol, los insertos fueron retirados y lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas, luego se desprendieron las células usando tripsina, se pasaron a tubos de citómetro para su análisis, algunas muestras fueron apantalladas con una solución de azul tripán y finalmente se adquirieron por citometría de flujo. Se analizó por citometría de flujo usando el programa Summit v4.3.

- MEDICIÓN DE CITOQUINAS

La determinación de citoquinas se efectuó mediante citometría de flujo utilizando un kit FlowCytomix™, FlowCytomix human Th1/Th2 11 plex (eBioscience, EEUU), este kit permite analizar once citoquinas a la vez, de las cuales se seleccionaron, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, y TNF α . El análisis de los datos se realizó usando el Software BMS FlowCytomix version 2.2.1. Este ensayo utiliza una mezcla de microesferas rodeadas de anticuerpos que reaccionan específicamente con las distintas citoquinas a determinar. Estas microesferas se diferencian por su fluorescencia y por su tamaño y esta propiedad permite distinguirlas por citometría de flujo de la manera que muestra la figura II.5.

Las microesferas se incubaron con las muestras a evaluar o los tubos con citoquinas para la realización de la curva de estandarización, luego se agregó el anticuerpo secundario biotinilado, que se une específicamente a las citoquinas

Capítulo II

capturadas y finalmente se adicionó la estreptavidina-PE, se muestra un esquema en la figura II.4. Una vez unida la PE, las microesferas que capturan las citoquinas correspondientes, van a emitir en FL2, como se indica en le figura II.5.

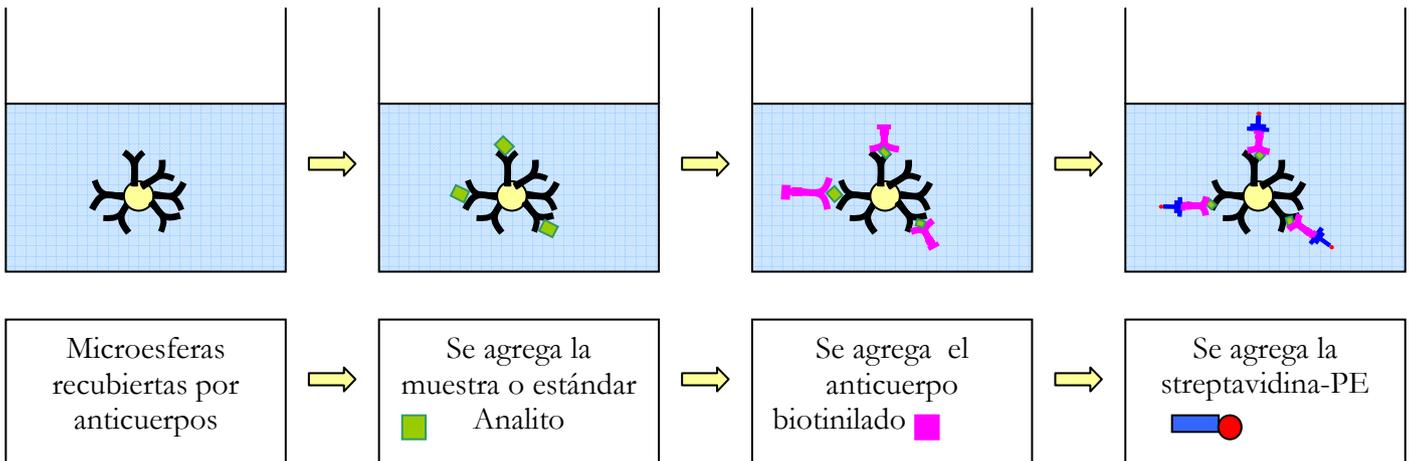


Figura II.4. Esquema del funcionamiento del kit para la determinación de citoquinas por citometría de flujo.

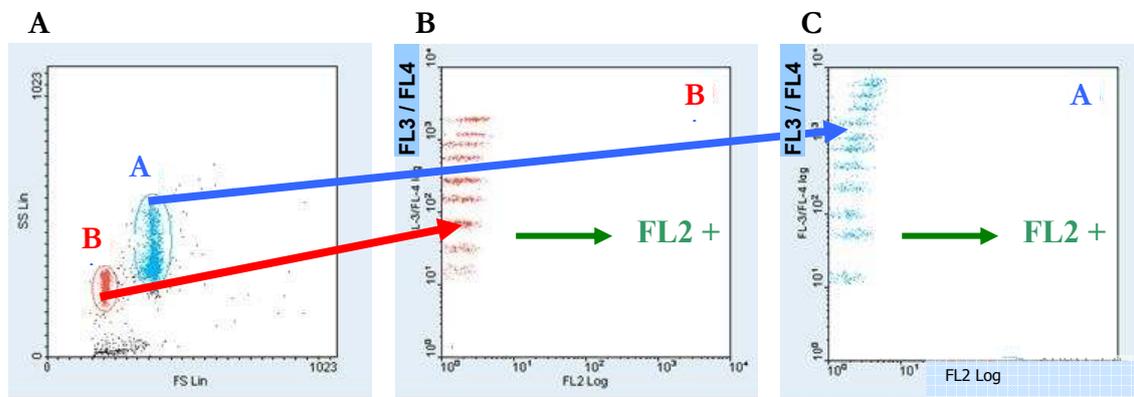


Figura II.5. Esquema de análisis de citoquinas por citometría de flujo.

En el gráfico SSC-H vs FSC-H (A) se muestran las dos poblaciones de microesferas pertenecientes al kit contenidas en dos regiones, A y B. Sobre cada una de las poblaciones, se realiza un gráfico FL3/FL4 vs FL2, como se muestra en B y C. En estos gráficos las microesferas se separan por su diferente intensidad de fluorescencia para FL3 o FL4 (según el citómetro utilizado). Al unirse la muestra o el estándar marcados con PE, las microesferas se corren en el sentido positivo para FL2 según su intensidad sobre esta fluorescencia.

Para la determinación, se tomaron los sobrenadantes del compartimento inferior, donde se encuentran las CD. Los sobrenadantes se centrifugaron a 900 g por 5 min para eliminar células o microorganismos que pudieran estar presentes (clarificación del sobrenadante) y se guardaron a -80°C hasta el momento del análisis de citoquinas. El análisis se realizó por citometría de flujo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se hicieron usando un test de Student InfoStat software. (InfoStat, Version 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)

RESULTADOS

MARCACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Se confirmó la marcación de los microorganismos usados tanto por observación microscópica como por citometría de flujo. En la figura II.6 se muestra la marcación con CFDA-SE para la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 analizada por citometría de flujo. La figura II.6, muestra los histogramas obtenidos al analizar la cepa sin marcar (II.6 A) y marcada (II.6.B). Se puede ver que la marcación resultó efectiva por la alta proporción de eventos positivos en FL1.

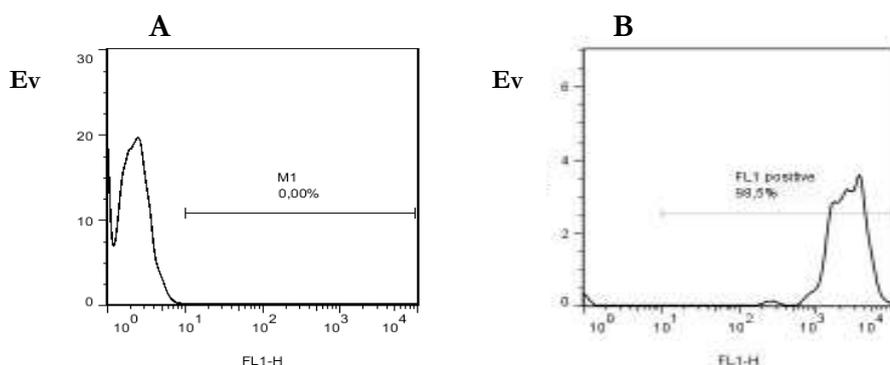


Figura II.6. Marcación de *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133. En la figura se muestran los histogramas (eventos (Ev.) vs. FL1 (CFDA-SE) obtenidos de la adquisición por citometría de flujo para la misma cepa. En el gráfico A se muestra el análisis de la bacteria sin marcar y en el gráfico B la correspondiente a la bacteria marcada con CFDA-SE.

INTERACCIÓN DE LACTOBACILOS Y BIFIDOBACTERIAS CON MACRÓFAGOS

ENSAYOS DE MICROSCOPIA

Se realizaron coloraciones de Gram sobre las células luego de 30 min de cultivo con las diferentes cepas de bifidobacterias y lactobacilos, utilizando una MDI de 50. Los ensayos se realizaron con las bacterias opsonizadas y sin opsonizar.

La figura II.7 muestra las microfotografías donde se aprecia la interacción de las diferentes cepas ensayadas, con las células RAW264.7 a los 30 min post incubación.

En la figura II.7.A, se muestran los resultados como porcentajes de células asociadas a los microorganismos. Como era de esperar, se observó un incremento del porcentaje de células con microorganismos asociados en los grupos incubados con bacterias opsonizadas comparando con las células que fueron incubadas con bacterias sin opsonizar. Los valores para las distintas cepas fueron: *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 sin opsonizar $63,4 \pm 4,6$ % y opsonizada $80,4 \pm 8,5$ % ($p < 0,05$); *B. bifidum* CIDCA 5310 sin opsonizar $52,3 \pm 3,8$ % y opsonizada $64,4 \pm 3,1$ % ($p < 0,05$); *B. infantis* NCC 200 sin opsonizar $40,1 \pm 5,6$ % y opsonizada $56,6 \pm 9,5$ % ($p < 0,05$). Para *L. plantarum* CIDCA 83114 no se observaron diferencias significativas entre la cepa sin opsonizar ($55,9 \pm 4,5$ %) y la cepa opsonizada ($58,2 \pm 4,1$ %). Las microfotografías muestran las células RAW264.7 sin infectar (B) y asociadas a *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 (C), *L. plantarum* CIDCA 83114 (D), *B. bifidum* CIDCA 5310 (E), *B. infantis* NCC 200 (F), todas en condiciones de opsonización.

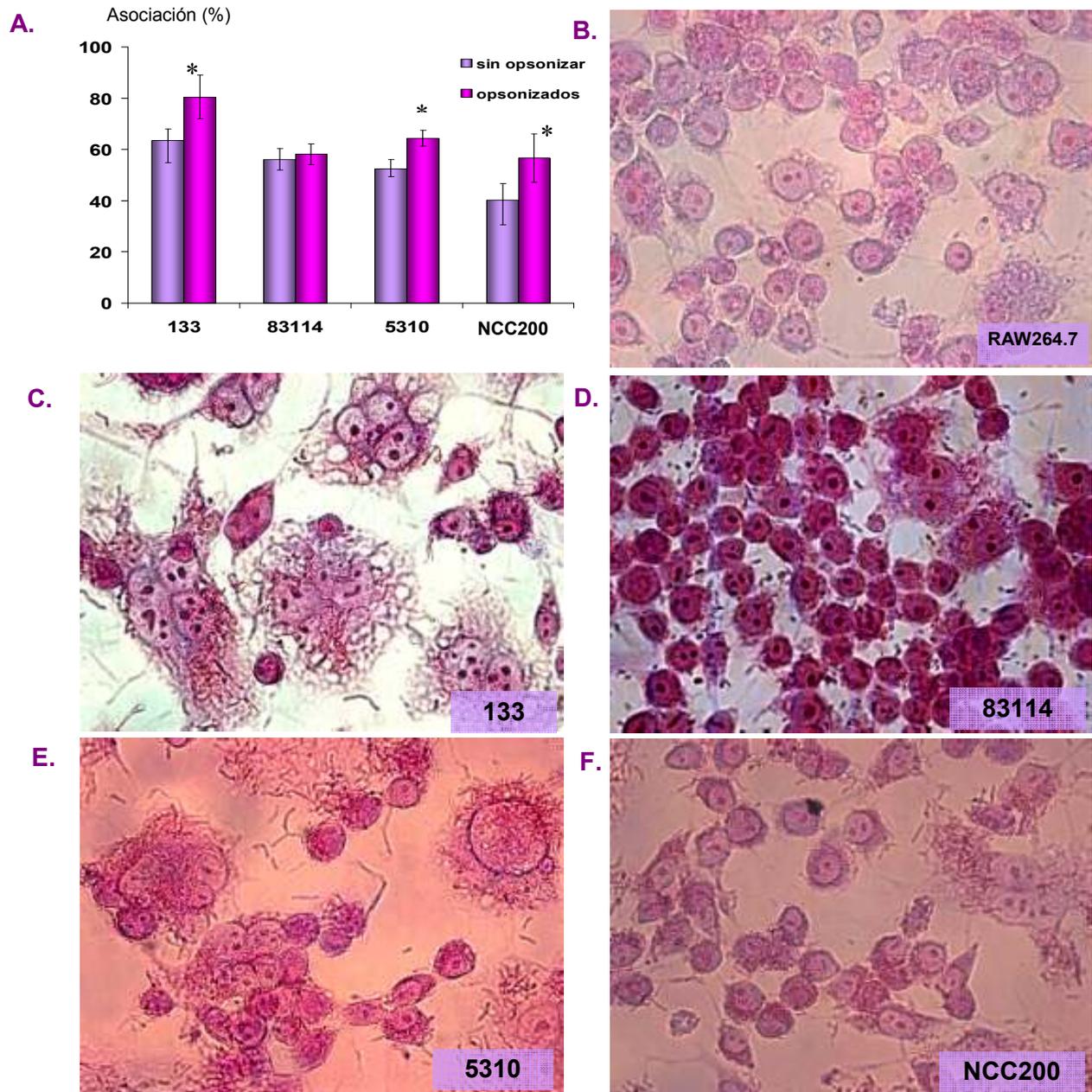


Figura II.7. Asociación de macrófagos con lactobacilos y bifidobacterias. En la figura A, se muestra el porcentaje de asociación de células con los microorganismos calculado por observación microscópica. Los asteriscos representan diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada cepa entre bacterias opsonizadas y sin opsonizar. De B a F, se muestran las microfotografías de células RAW264.7 sin infectar (B) y de las células incubadas con las diferentes cepas opsonizadas (C a F) (100 x)

ENSAYOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las cepas, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200 marcadas con CFDA-SE, opsonizadas o sin opsonizar se utilizaron en un ensayo de fagocitosis con la línea celular macrofágica RAW264.7. El tiempo de infección ensayado fue de 30 min y la MDI usada en estos ensayos fue de 50.

Como primer paso en el análisis de la fagocitosis, se identificó la población a analizar, para esto, se realizó un gráfico SSC-H vs FSC-H, donde usando una marcación con F4/80, se pudo seleccionar la región de macrófagos, representada como R1 en la figura II.8.A. Para poder seleccionar esta región, se adquirieron inicialmente, células solas sin incubar con los microorganismos y marcadas con F4/80.

Una vez seleccionada la región R1, los análisis de la fagocitosis se efectuaron sobre esa población. Se analizaron las células incubadas con las diferentes cepas lácticas marcadas con CFDA-SE, y se evaluó el porcentaje de fluorescencia verde (FL1) perteneciente a las bacterias, con y sin el agregado de azul tripán. Estos eventos se seleccionaron en una región llamada R2 en un gráfico FL1 vs FSC-H. Para la delimitación de la región R2, se adquirieron células sin incubar con microorganismos como control negativo, es decir, células que no deberían contener elementos positivos para FL1.

Sin el apantallamiento, los eventos contenidos en la región R2, representaron las bacterias adheridas más las internalizadas por los macrófagos a los 30 min de incubación. Se realizaron las medidas utilizando azul tripán, de esta manera se cuantificaron los microorganismos que habían sido internalizados por las células fagocíticas para ese mismo tiempo. Este análisis fue realizado con las diferentes cepas en condiciones de opsonización o no. La figura II.8.B muestra los gráficos FL1 vs FSC-H de las células infectadas con las diferentes cepas, donde R2 representa la población de células con bacterias-CFDA-SE asociadas o internalizadas, a los 30 min post incubación.

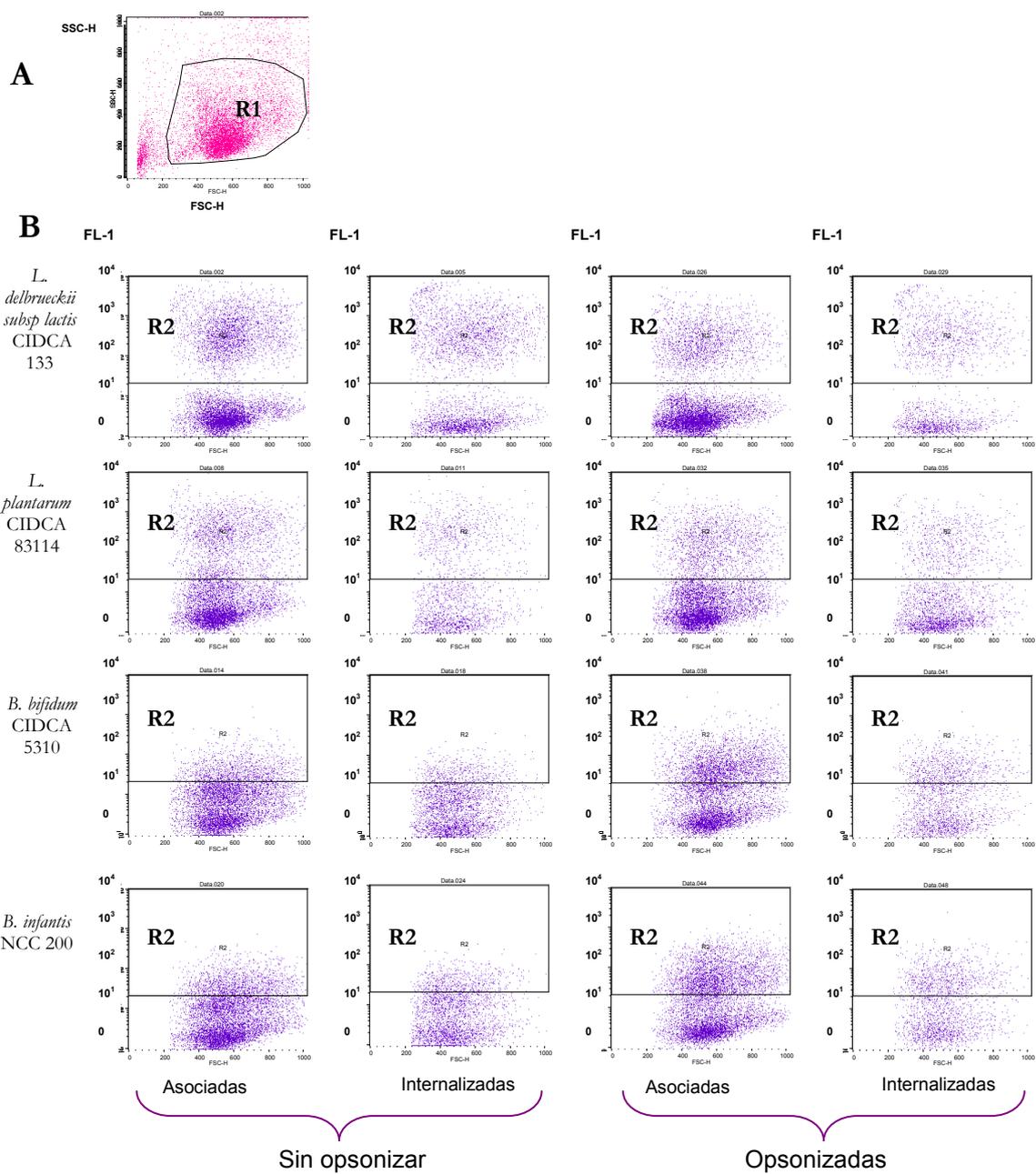


Figura II.8. Interacción de lactobacilos y bifidobacterias con células RAW264.7. En el gráfico SSC-H vs FSC-H, (Figura A) se representa la región de la población de macrófagos (R1). La figura B muestra los gráficos FL-1 vs FSC-H donde se evidencian las células fagocíticas con bacterias-CFDA-SE asociadas en la región R2. Se muestran las diferentes cepas analizadas en condiciones de opsonización o sin opsonizar. Asociadas (muestras sin apantallar) representa la población de células con bacterias-CFDA-SE adheridas. Internalizadas, se trata de muestras con agregado de azul tripán. Ambas tomadas a los 30 min post-incubación.

En la figura II.9, se muestran los porcentajes de bacterias opsonizadas (Figura II.9.A) y sin opsonizar (Figura II.9.B) que resultaron internalizadas por los macrófagos o se encuentran asociadas a ellos. Se pudo apreciar que para cada una de las cepas no se encontraron diferencias entre asociación e internalización.

La opsonización de las cepas 133, 5310 y NCC 200 permite una mayor interacción con los macrófagos, sin embargo en el caso de la cepa 83114 la interacción fue igual independientemente de la opsonización.

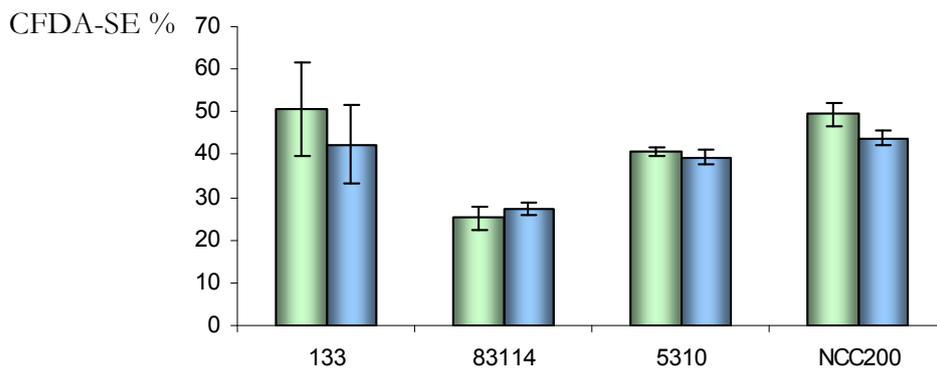


Figura II.9.A. Porcentajes de lactobacilos y bifidobacterias opsonizados asociados e internalizados por macrófagos. Luego de 30 min de fagocitosis, se analizaron las muestras por CF. Se diferencian las bacterias asociadas de las internalizadas mediante el agregado de azul tripán.

■ Asociadas ■ Internalizadas

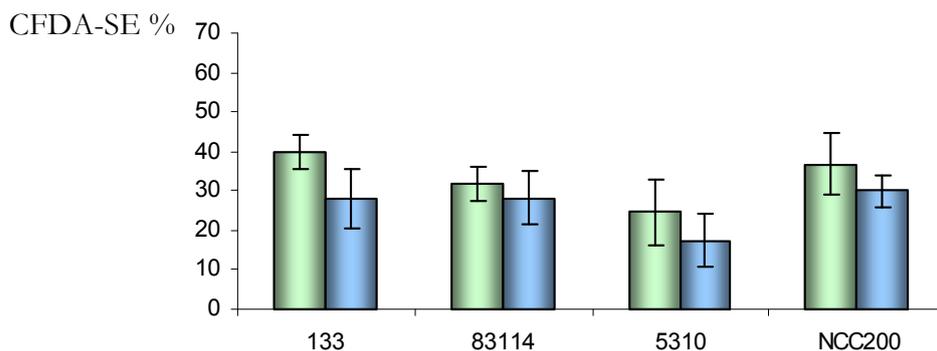


Figura II.9.B. Porcentajes de lactobacilos y bifidobacterias sin opsonizar asociados e internalizados por macrófagos. Luego de 30 min de fagocitosis, se analizaron las muestras por CF. Se diferencian las bacterias asociadas de las internalizadas mediante el agregado de azul tripán.

■ Asociadas ■ Internalizadas

EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULATORIAS

Se evaluó la expresión de CD86 en células macrofágicas RAW264.7. Luego de la incubación con las diferentes cepas de lactobacilos y bifidobacterias, las células fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD86 conjugado con PE. La MDI utilizada fue de 20 y el tiempo final de ensayo de 48 hs. Se analizaron las cepas opsonizadas y sin opsonizar.

Se realizaron los análisis de las poblaciones celulares, de manera equivalente al estudio de interacción de las bacterias con las células RAW264.7. Una vez identificada la población de macrófagos, se analizó mediante un gráfico FL2 (PE) vs FSC-H, la cantidad de eventos que resultaron positivos para PE (CD86+), quedando los mismos en otra región seleccionada. Luego se realizó un histograma en FL2 donde se analizaron los eventos pertenecientes a las dos regiones mencionadas previamente. Los eventos positivos para FL2 en el histograma, se consideraron para el cálculo del porcentaje. Se utilizaron células sin incubar con los microorganismos, marcadas con el anticuerpo, como control de la expresión basal de la molécula coestimuladora. Como último paso se analizaron las muestras de células infectadas con las distintas cepas en condiciones de opsonización y sin opsonizar.

En la figura II.10 se muestran los porcentajes obtenidos para la expresión de la molécula coestimuladora CD86 sobre las células en las diferentes condiciones de incubación con las cepas de bifidobacterias y lactobacilos.

Los microorganismos *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133, *B. bifidum* CIDCA 5310 y *L. plantarum* CIDCA 83114 indujeron incremento de la expresión de CD86 en las células fagocíticas al comparar con el control ($14,9 \pm 3,0$ %), se vieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 en ambas condiciones de cultivo ensayadas (sin opsonizar: $42,1 \pm 10,7$ % y opsonizada: $62,2 \pm 2,7$ %), y para la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 sin opsonizar ($23,0 \pm 1,2$ %). La cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 opsonizada ($18,3 \pm 5,0$ %) y la cepa *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 tanto sin opsonizar ($15,3 \pm 7,7$

%) como opsonizada ($21,5 \pm 3,2$ %) no mostraron diferencias significativas respecto al control. Puede observarse que la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 fue la más eficiente para inducir la expresión de este marcador. *B. infantis* NCC 200 no indujo modificaciones en la expresión de este marcador de co-estimulación en las condiciones evaluadas (sin opsonizar: $15,3 \pm 7,7$ %, opsonizada: $10,3 \pm 0,0$ %), incluso se pudo observar un descenso significativo ($p < 0,05$) de la expresión respecto al control al incubar los macrófagos con esta cepa en condiciones de opsonización.

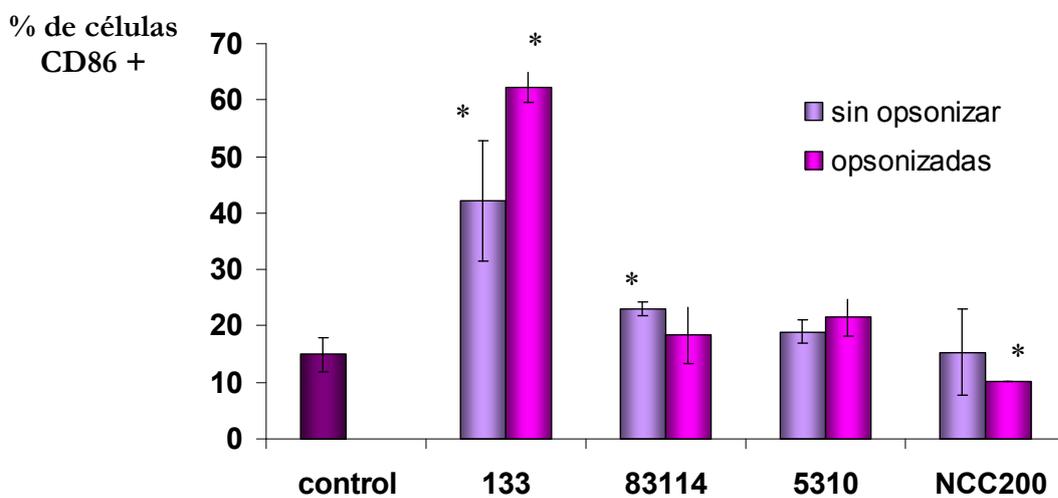


Figura II.10. Expresión del marcador de superficie CD86 sobre células RAW264.7. Los porcentajes se calculan luego de 48 hs de incubación de las células con las diferentes cepas potencialmente probióticas (* $p < 0,05$ respecto al control). Las barras representan la desviación estándar y no se muestran cuando ésta es muy pequeña.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B POR *B. CEREUS* Y *LACTOBACILLUS* EN CÉLULAS HT-29

Mediante el uso de células epiteliales intestinales HT-29 transfectadas (pNF- κ B-GFP), se evaluó la activación del factor NF- κ B. En un primer paso de análisis, se identificó la población celular a analizar en un gráfico SSC *vs* FSC (marcado

como SS y FS en la figura), esta población se seleccionó en R1 como se muestra en la figura II.11.A. En un siguiente paso se procedió a excluir los dobletes mediante un gráfico de *pulse width vs* FSC, se seleccionaron los singletes en una región R2 (II.11.B). Finalmente, sobre los eventos que pertenecían a R1 y R2, se analizó el porcentaje de células positivas para la expresión de GFP (NF- κ B). Este análisis se realizó mediante un gráfico GFP (FL1) *vs* FS, se consideraron positivos los eventos pertenecientes a la región R3 (II.11.C).

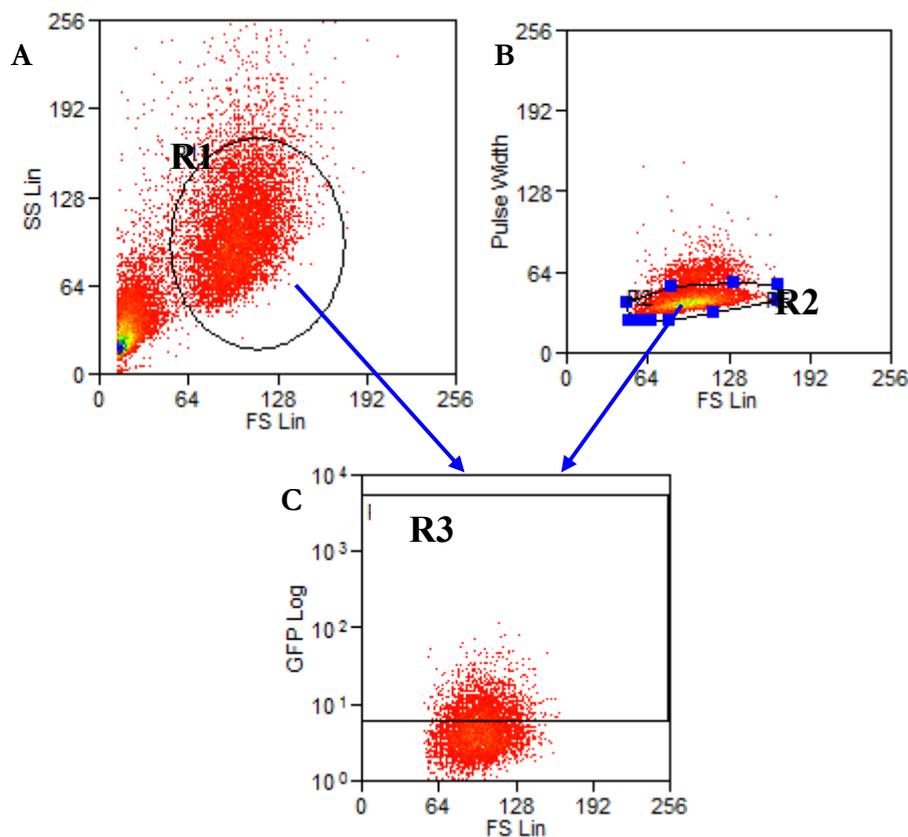


Figura II.11. Expresión de NF κ B en células HT-29-GFP. Ejemplo del análisis de la expresión de NF κ B para células HT-29-GFP incubadas por 18 hs con TNF- α . El gráfico SS *vs* FS muestra la población a analizar en la región R1. El gráfico pulse width *vs* FS muestra en R2 la población de células excluyendo los agregados. Los eventos en R3 del gráfico GFP *vs* FS, representan las células positivas para la expresión de NF κ B. Este último análisis se realizó sobre los eventos pertenecientes a la intersección de R1 con R2.

Los tiempos cortos de incubación (6 hs) con las diferentes cepas y con TNF- α (control positivo), no fueron suficientes para generar una buena señal de activación de NF- κ B. Los tiempos de incubación de 18 hs, permitieron obtener

alrededor de un 30 % de células que expresaron GFP luego de la incubación con TNF- α (control positivo), sin embargo los valores obtenidos en las células infectadas con las diferentes cepas de *B. cereus*, ya sea en co-cultivo con el lactobacilo o en su ausencia, no produjeron valores superiores al 10 % de células que expresaron el factor.

Para las cepas B10502, T1 y M2 los valores fueron más altos en la coincubación con la cepa 133 que en su ausencia. La sola presencia del lactobacilo, no produce respuesta por parte de las células (Figura II.12).

Los valores de expresión del factor NF- κ B luego de 18 hs de incubación en las diferentes condiciones, se muestran en la figura II.12. Células sin estimular, se utilizaron como valor basal de expresión ($1,56 \pm 0,25$ %). Las células estimuladas con TNF- α mostraron valores de expresión de $33,39 \pm 1,46$ %. Las incubaciones con las cepas, dieron lugar a valores bajos de estimulación. Incubación de las células con la cepa 133 sola, $1,34 \pm 0,07$ %; cepa B10502, $4,11 \pm 0,08$ %; B10502 coincubada con 133, $6,91 \pm 0,28$ %; cepa T1 $3,93 \pm 0,52$ %, T1 coincubada con cepa 133, $9,84 \pm 0,11$ %, cepa M2 $3,57 \pm 0,30$ % y cepa M2 coincubada con 133, $8,30 \pm 0,21$; por último, la cepa 2 mostró un valor de $3,96 \pm 0,03$ % y al ser coincubada con la cepa 133 el valor fue $3,80 \pm 0,071$ %.

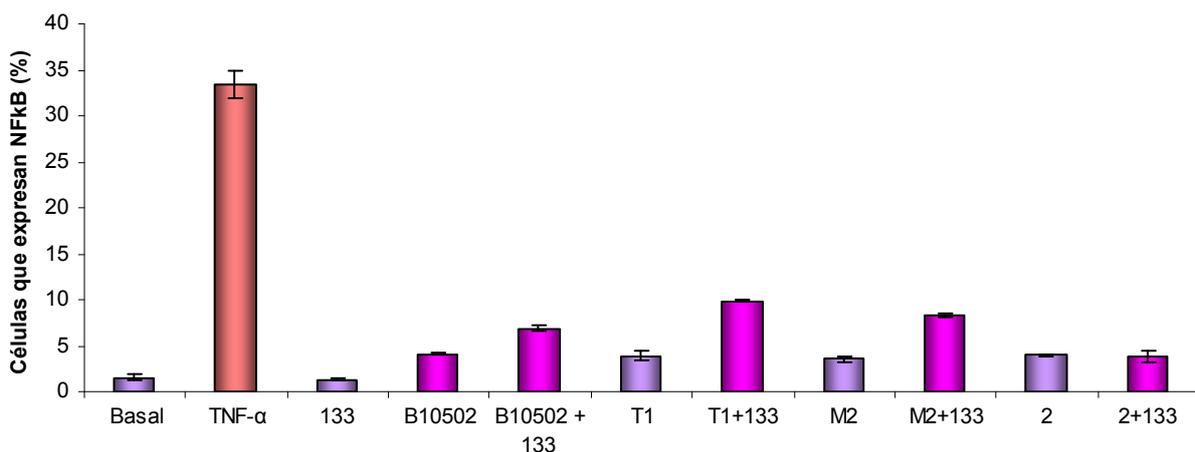


Figura II.12. Expresión del factor NF- κ B en células HT-29-GFP coincubadas con *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 y diferentes cepas de *B. cereus*. Se utilizó citometría de flujo para la determinación del porcentaje de células que expresan el factor luego de 18 hs de cultivo en las diferentes condiciones.

ASOCIACIÓN DE *BACILLUS CEREUS* A LAS CÉLULAS HT-29 Y EXPRESIÓN DE IL-8

Se estudió la asociación de *B. cereus* a las células HT-29, para ello se marcaron las diferentes cepas con CFDA-SE. Se utilizó la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 sin marcar en cocultivo para analizar su efecto en la asociación de *B. cereus* con células HT-29. Se determinó la población a analizar en un gráfico SSC vs FSC y luego de excluir los dobletes de células, se seleccionaron los eventos positivos para FL1 (Células asociadas a bacterias-CFDA-SE) en gráfico FL1 vs FS. El análisis efectuado fue semejante al de la figura II.11.

La evaluación de los porcentajes de células asociadas a los microorganismos luego de 18 hs de infección, mostró para la cepa 2, una tendencia a una menor asociación cuando la misma es incubada con las células acompañada por la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 ($p=0,08$).

La asociación de las otras cepas de *B. cereus* no resulta afectada por la presencia de la cepa 133. Los valores obtenidos para las diferentes cepas en presencia o no de la cepa 133, se muestran en la tabla II.3.

Al incubar las cepas de *B. cereus* con la cepa 133, la tendencia de los valores fue equivalente para cada cepa cuando se encontraba sin la presencia del lactobacilo.

Las cepas B10502 y 2 resultaron más asociadas que las cepas T1 y M2, y esto resulta independiente de la presencia de la cepa 133.

Tabla II.3. Asociación de las diferentes cepas de *B. cereus*-CFDA-SE a células HT-29. La determinación de los porcentajes se realizó por CF, seleccionándose sobre la población a analizar, las células positivas para FL1 (CFDA-SE).

Condición	Cepas de <i>Bacillus cereus</i>			
	T1	B10502	2	M2
Sin cepa 133	6,51 ± 0,41	28,48 ± 4,42	24,04 ± 3,37	7,97 ± 0,56
Con cepa 133	7,13 ± 1,03	28,04 ± 2,25	15,87 ± 1,16	8,64 ± 0,01

Por otro lado, se evaluó la inducción de IL-8 al incubar con los diferentes microorganismos en estas mismas condiciones de cultivo (Figura II.13). La determinación se realizó sobre el sobrenadante del cultivo. La producción se vio incrementada considerablemente en la infección con la cepa B10502 ($2009,75 \pm 131,78$ pg/ml), alcanzando los niveles del control positivo (TNF- α : $2063,76 \pm 141,55$ pg/ml), aunque también se vio incremento respecto al control basal ($52,73 \pm 11$ pg/ml) para las cepas T1 ($769,81 \pm 64$ pg/ml) y 2 ($782,72 \pm 44,41$ pg/ml). La cepa M2 no mostró un incremento de la producción de IL-8 ($197,52 \pm 29,56$ pg/ml) y este valor no se vio afectado por la presencia de la cepa 133 ($166,65 \pm 72,63$ pg/ml).

La presencia de la cepa 133, disminuyó la producción de la citoquina estudiada para las cepas B10502, 2 y T1. Los valores obtenidos en los co-cultivos con la cepa 133 fueron: B10502 con 133, $562,2 \pm 27,66$ pg/ml; T1 con 133, $193,59 \pm 2,35$ pg/ml; M2 con 133, $166,65 \pm 72,63$ pg/ml; 2 con 133, $232,81 \pm 8,63$ pg/ml. Presentaron diferencias significativas entre la presencia y la ausencia de la cepa 133 para las cepas B10502, T1, y 2 ($p < 0,05$). La cepa láctica 133 no induce la producción de IL-8 en estas células cuando se encuentra sola ($143,69 \pm 18,85$ pg/ml) (Figura II.13).

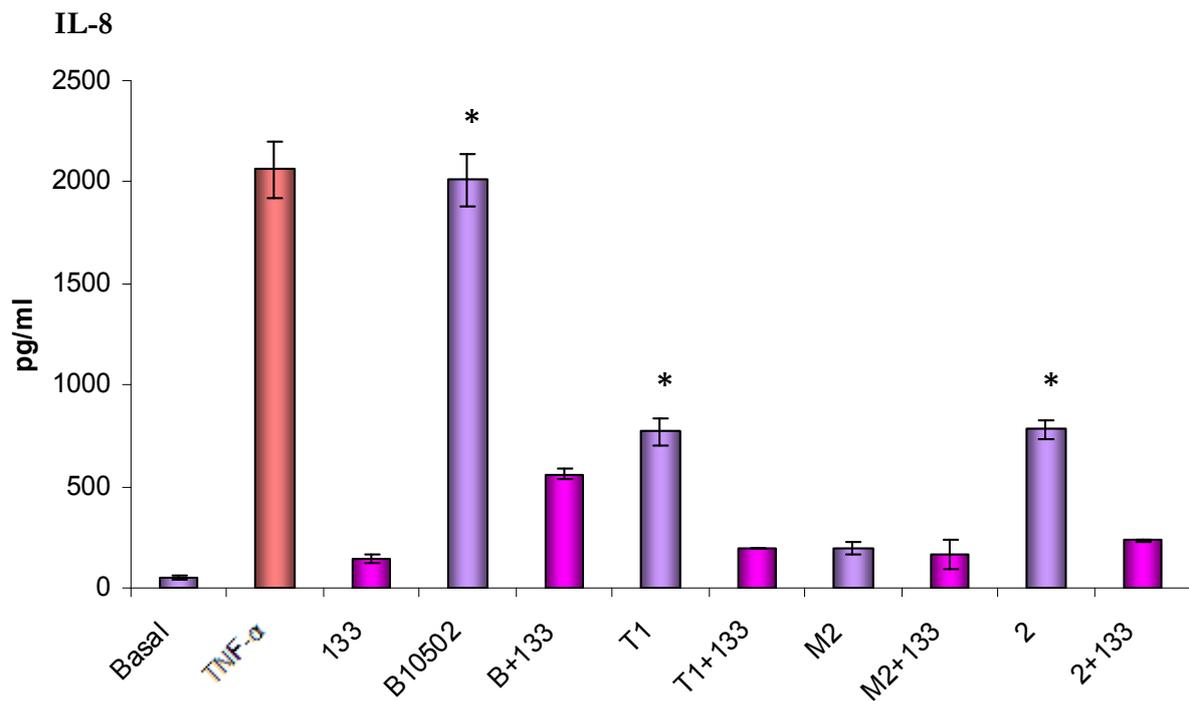


Figura II.14. Producción de IL-8 en células HT-29 tratadas con diferentes estímulos. Luego de incubar 18 hs en presencia de los distintos estímulos, se determinó la cantidad de IL-8 en los sobrenadantes. Se expresan los resultados en pg/ml. Los asteriscos representan diferencias significativas para cada cepa de *B. cereus* respecto a la presencia o ausencia de la cepa 133 en el cultivo (* $p < 0,05$).

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA GENERADA POR LA INFECCIÓN EN CO-CULTIVOS DE CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES Y CÉLULAS DENDRÍTICAS.

- CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO Y ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE

Las células utilizadas se caracterizaron como células dendríticas a través del estudio de la expresión de marcadores y morfología. Fueron consideradas las células con fenotipo CD11c+, CD14-, HLA-DR+ y CD86+ para la realización de los experimentos. En la figura II.14 se muestran los gráficos obtenidos por citometría de flujo para el ejemplo de análisis de células estimuladas con LPS.

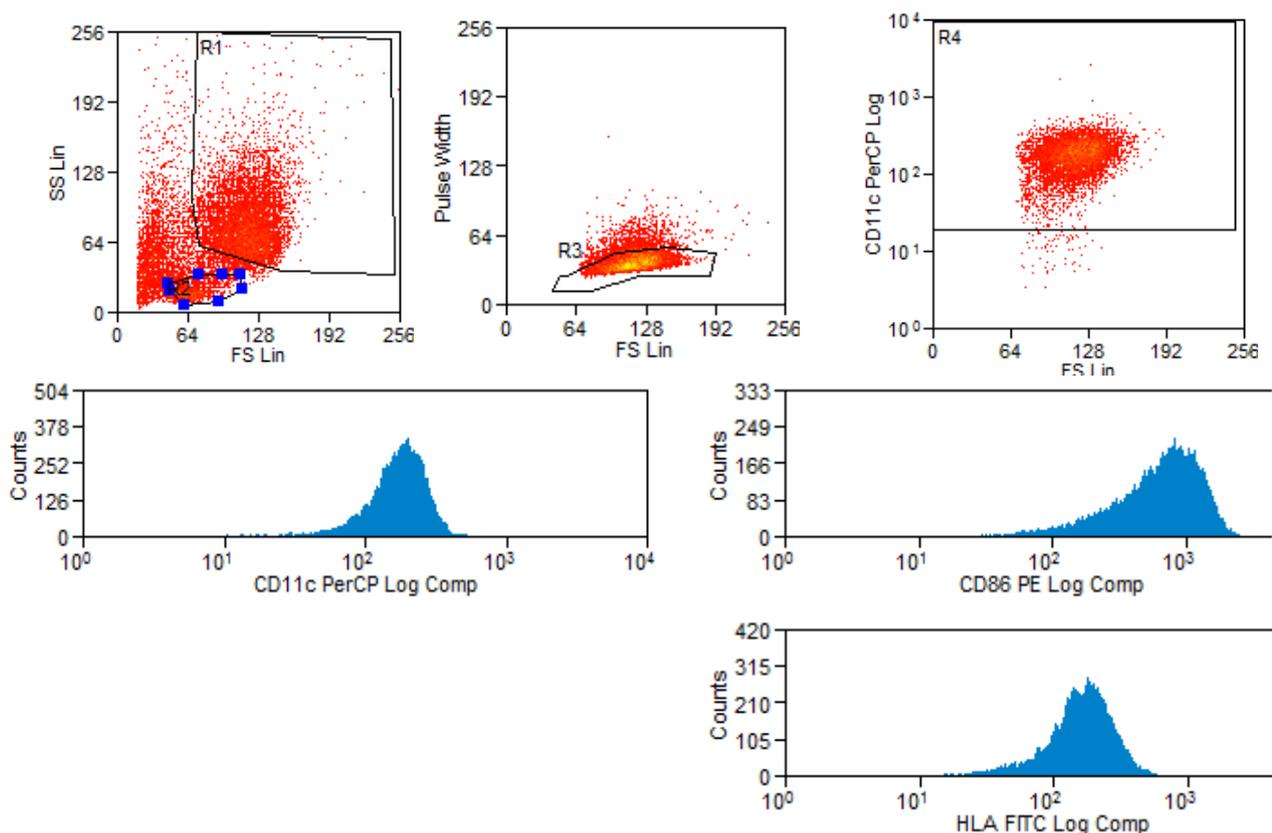


Figura II.14. Análisis de células dendríticas obtenidas de PBMC. Los gráficos representan un ejemplo de células tratadas con LPS. En el gráfico SS vs FS, el área R1 selecciona la población a analizar. El área R3 en el gráfico de *pulse width* vs FS, excluye los dobletes de R1. El análisis de la marcación con CD11c se realizó en la intersección de R1 y R3. Una vez seleccionadas las células CD11c positivas (células dendríticas), se analizó la expresión de CD86 y HLA-DR sobre los eventos pertenecientes a la intersección de R1, R3 y R4 utilizando histogramas.

Se evaluó la expresión de marcadores de superficie HLA-DR y CD86 mediante marcación con anticuerpos fluorescentes y citometría de flujo. La expresión de HLA-DR no se vio significativamente aumentada al comparar las células tratadas con el basal. La expresión de la molécula de superficie CD86, sin embargo, se vio incrementada con los estímulos realizados, a saber, incubación con la cepa B10502 ($611,1 \pm 77,8$), incubación con la cepa 133 ($346,1 \pm 121,2$) e incubación con ambas cepas ($546,2 \pm 13,9$), sin diferencias significativas entre ellas. La estimulación del control positivo se realizó con LPS (Figura II.15).

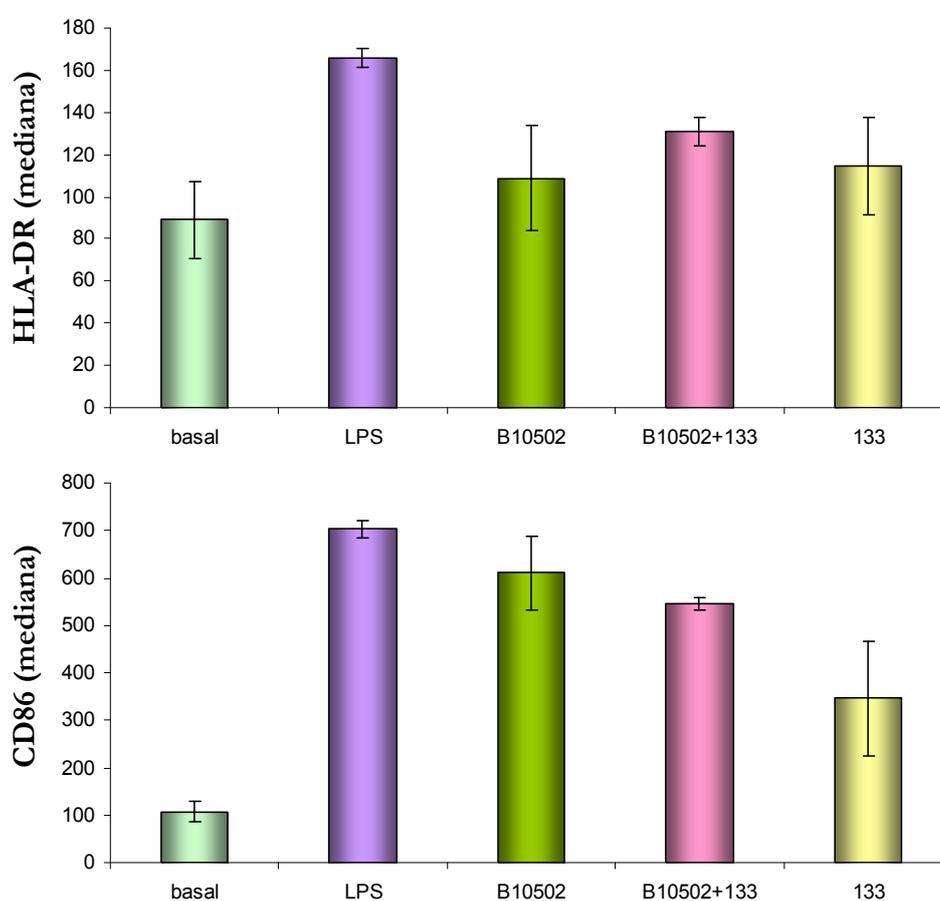


Figura II.15. HLA-DR y CD86 en las células dendríticas en co-cultivo con HT-29. Se midió la mediana de la fluorescencia luego de la infección con *B. cereus* y el lactobacilo. Se incubaron las células con los diferentes estímulos durante 18 hs. Como control positivo de activación se utilizó LPS. El basal esta representado por la expresión de cada marcador en células sin estimular. Los análisis se realizaron por CF.

- ANÁLISIS DE ADHESION DE *B. CEREBUS* A CÉLULAS EPITELIALES Y DENDRÍTICAS

Se analizó la interacción de la cepa B10502 con las diferentes poblaciones celulares en co-cultivo, para este estudio se utilizó la cepa marcada con CFDA-SE. Los análisis de asociación con las células dendríticas y epiteliales, se realizaron por CF de la misma manera que se realizaron para el análisis de asociación con células HT-29. La interacción fue analizada tanto en presencia como en ausencia de la cepa láctica 133.

Se vio que los microorganismos fueron capaces de pasar a través de las células HT-29 sembradas en el compartimento superior y llegar a tener interacción con las células dendríticas. Los tiempos de incubación fueron de 18 hs. La interacción de las células con la cepa de *B. cereus*, fue diferente en cada tipo celular; dependiendo de si este microorganismo se encontraba o no en presencia de la cepa 133. La interacción con *B. cereus* B10502, resultó ser mayor en las células epiteliales cuando se encontraba en presencia del lactobacilo ($22,43 \pm 0,71$ %), que en ausencia del mismo ($13,11 \pm 0,41$ %). La interacción de CD con *B. cereus* B10502, sin embargo resultó mayor en ausencia de 133 ($42,67 \pm 2,00$ % asociadas) que en su presencia ($17,99 \pm 0,62$ %) (Figura II.16).

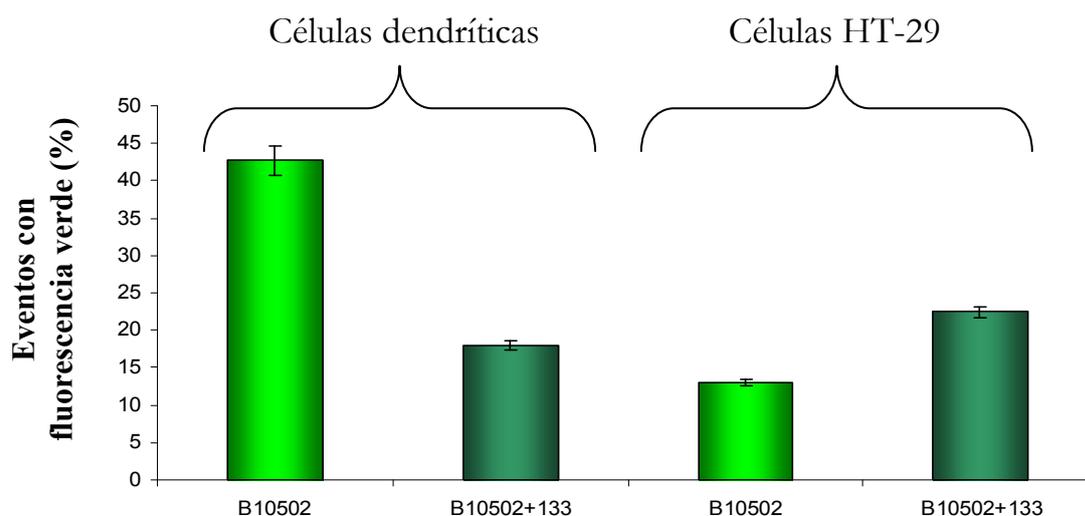


Figura II.16. Interacción de la cepa de *B. cereus* B10502-CFDA-SE a células HT-29 y células dendríticas en co-cultivo en presencia y ausencia de *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133. El estudio se realizó por citometría de flujo sobre las diferentes poblaciones celulares y analizando el porcentaje de eventos positivos para la fluorescencia verde dentro de esas poblaciones.

- MEDICIÓN DE CITOQUINAS

Se realizó la determinación de citoquinas inducidas por las diferentes condiciones de estimulación en los sobrenadantes de cultivo por citometría de flujo. Para esto se utilizó un kit comercial, FlowCytomix Human Basic kit (Bender MedSystems GMBH, Viena, Austria), que permite la detección simultánea de diferentes biomoléculas. El kit usado fue Human Th1/Th2 11plex, que permite analizar 11 citoquinas distintas, de las cuales se seleccionaron TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 p70.

Tal como se muestra en la figura II.17, la IL-8 se vio incrementada al incubar las células en las tres condiciones estudiadas.

Al incubar con B10502 se obtuvo un valor de $3456,23 \pm 1167,52$ pg/ml, para la incubación con 133; $3723,76 \pm 2311,04$ pg/ml y al incubar con B10502 y

133 juntas, $4167,84 \pm 1008,63$ pg/ml ($p < 0,05$ respecto al basal). El valor basal de IL-8 fue $885,66 \pm 19,28$ pg/ml y el valor luego del estímulo con LPS fue $6181,45 \pm 65,6$ pg/ml. Por otro lado la producción de IL-6 no se vio incrementada considerablemente respecto al control al incubarse con el lactobacilo solo ($87,65 \pm 123,95$ pg/ml), pero su valor resultó similar al del control positivo con LPS ($128,35 \pm 11,60$ pg/ml). En presencia de *B. cereus*, la expresión de IL-6 se vio aumentada ($890,56 \pm 263,03$ pg/ml) ($p < 0,05$ respecto al basal) y dicho aumento no se vio afectado por la presencia del lactobacilo ($1091,52 \pm 55,73$ pg/ml) ($p < 0,05$ respecto al basal).

Se analizó la producción de TNF- α , se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) respecto al basal en las condiciones ensayadas con *B. cereus* (B10502: $2773,62 \pm 114,04$; B10502 con 133: $5990,49 \pm 421,28$) con la cepa 133 el aumento no resultó significativo pero se apreció un aumento ($3781,85 \pm 2928,2$), siendo los valores inclusive mayores a los obtenidos con el control positivo (LPS: $776,17 \pm 114,04$). El mayor incremento se vio en los co-cultivos de *B. cereus* B10502 y *Lactobacillus* 133 (Figura II.17).

Los valores para las citoquinas IL-10 e IL-12 p70 no llegaron a niveles detectables en ninguna de las condiciones ensayadas, por esta razón no se presentan gráficos para estas citoquinas.

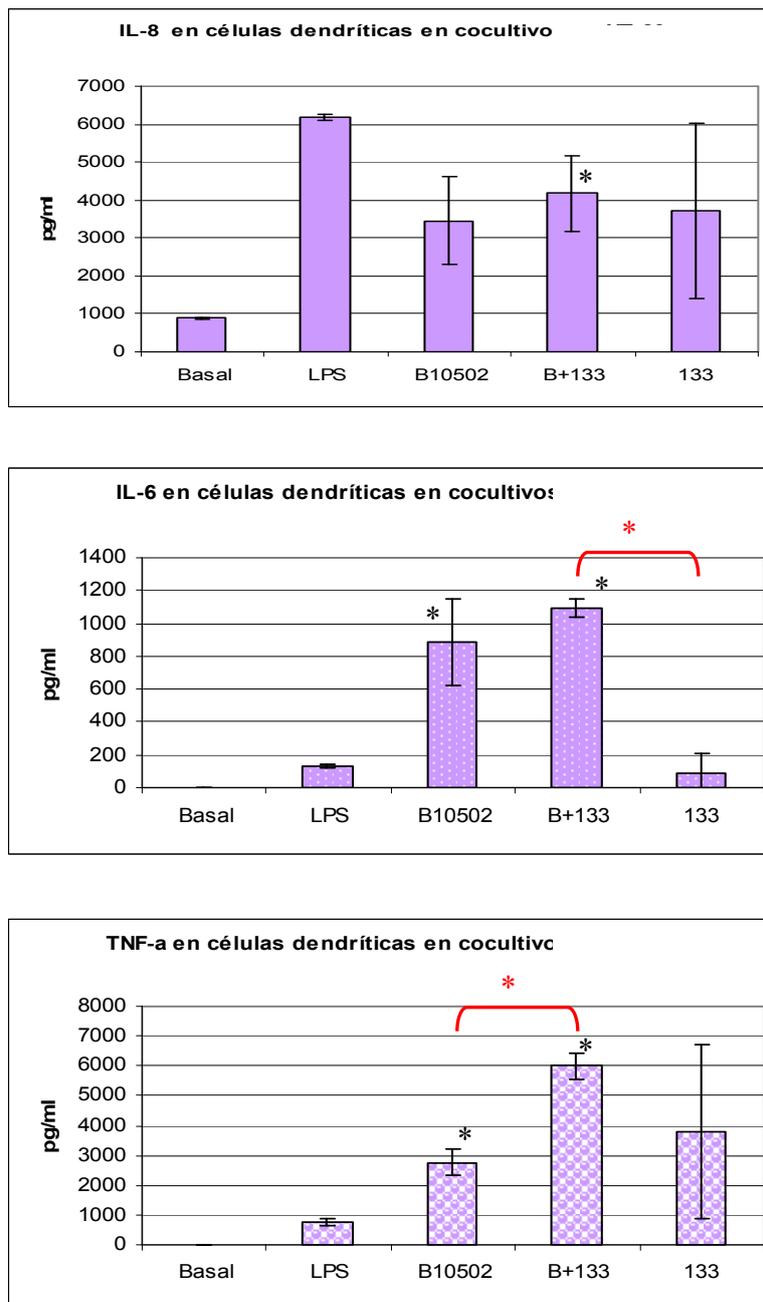


Figura II.17. Producción de citoquinas en las células dendríticas luego de la incubación con *B. cereus* B10502 y *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133. Producción de IL-8, IL-6 y TNF- α , las determinaciones se realizaron en los sobrenadantes de las CD. Las células se incubaron por 18 hs en las diferentes condiciones. Los resultados se expresan en pg/ml. Los asteriscos negros representan diferencias significativas respecto al basal. Los rojos, $p < 0,05$ entre los valores marcados por el corchete.

DISCUSIÓN

Aunque los microorganismos patógenos y no patógenos comparten numerosos motivos moleculares (ácidos lipoteicoicos, peptidoglicano, lipopolisacárido, flagelina, etc), los resultados de la interacción con las células del hospedador son muy distintos (Sansone, 2004). Los motivos de estas diferencias no se conocen con precisión pero las claves deben buscarse en los tres eventos fundamentales en la interacción microorganismo-hospedador: detección, señalización y respuesta. Diferentes estudios han tratado de develar los mecanismos que llevan al establecimiento de relaciones benéficas y algunos de los mecanismos involucrados han comenzado a ser comprendidos (Hsieh et al, 2008; Borchers et al, 2009; Spiller, 2008).

En nuestro grupo de trabajo se han efectuado estudios de las interacciones entre microorganismos y el hospedador a nivel intestinal tomando como base dos vertientes definidas y complementarias que se centran en aspectos benéficos y adversos. En este contexto se han realizado estudios sobre la interacción de microorganismos de diferentes géneros y especies con enterocitos humanos en cultivo que se han extendido también a la dimensión *in vivo* a través de la implementación de modelos animales de infección.

Entre los microorganismos seleccionados que han sido ampliamente estudiados, se encuentran *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114, *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200 (anteriormente CIDCA 538), entre los que destacan, gracias a sus capacidad de antagonizar microorganismos patógenos, las cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 y *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310. La cepa *B. infantis* NCC 200, fue seleccionada debido a que posee un patrón de interacción con células eucarióticas muy diferente a la otra cepa de *Bifidobacterium* considerada en este estudio (*Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310) (Perez *et al.*, 1998). Esta cepa no posee adherencia a células Caco-2 ni a superficies

de vidrio; no presenta autoaglutinación ni hemaglutinación, todas propiedades presentes en la cepa *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 (Pérez *et al.*, 1998)

El antagonismo de los microorganismos potencialmente probióticos sobre los efectos de agentes patógenos, se atribuye generalmente a varios factores. La disminución de la adhesión (Trejo *et al.*, 2006) y/o la invasión del patógeno (Golowczyc *et al.*, 2007), el descenso de la capacidad de desarrollo del patógeno (Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005), la inmunomodulación (Benyacoub *et al.*, 2005) y el descenso de la actividad enzimática dañina de algunos microorganismos (Hugo *et al.*, 2006).

Resultados obtenidos en el grupo con las cepas *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *B. bifidum* CIDCA 5310 sugieren que la unión de las cepas al epitelio, podrían estar modificando el microambiente de tal manera de disminuir la expresión de factores de virulencia del patógeno, y también podría estar relacionada con el antagonismo de las señales de las vías involucradas en los efectos citopáticos.

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por las bacterias lácticas, también producen efectos antagónicos sobre los patógenos o los factores celulares de los patógenos. Ruas-Madiedo y col., sugirieron que algunos EPS de lactobacilos y bifidobacterias, incrementan la adhesión de los patógenos intestinales (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro grupo, al estudiar el EPS aislado de kefir (kefirán) frente a *B. cereus*, si bien no se vio un antagonismo en cuanto a la adhesión a enterocitos, se evidenció que el kefirán modificaba la distribución de la adhesión del microorganismo (Medrano *et al.*, 2009) El antagonismo del kefirán sobre el efecto citopático de *B. cereus*, podría deberse o bien a un bloqueo de la interacción o interfiriendo en las cascadas de señales involucradas a los factores de virulencia (Medrano *et al.*, 2009). Los efectos antagónicos de los EPS, también se pueden observar sobre el efecto biológico debido a los factores extracelulares de *B. cereus* (Medrano *et al.*, 2008; Ruas-Madiedo *et al.*, 2010).

La cepa *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 fue capaz de inhibir la actividad nitrato reductasa de una cepa de *Escherichia coli* no patógena (Hugo *et al.*, 2006) y de antagonizar los efectos de una cepa de EHEC de aislado clínico sobre la línea celular Hep-2 (Hugo *et al.*, 2008). Esta cepa, es también capaz resistir los efectos de moléculas antimicrobianas intestinales, lo cual no resulta ser una propiedad general de los lactobacilos, lo que podría resultar relevante para una aplicación de la cepa *in vivo* (Hugo *et al.*, 2010).

En el contexto del estudio de microorganismos relevantes en el tracto digestivo, se utilizó *Bacillus cereus*. Se ha demostrado que este microorganismo presenta una virulencia multifactorial, su actividad biológica depende tanto de factores extracelulares como de la adhesión e inclusive invasión de las células. Esta actividad biológica, se correlaciona con los clusters de ribotipificación y con la presencia de secuencias de genes que codifican para toxinas. El desprendimiento de la monocapa con distintas diluciones de sobrenadantes permitió establecer diferentes modelos dosis-respuesta, en los que se clasificaron a las distintas cepas. Se demostraron diversos efectos biológicos y estos efectos fueron dependientes de la cepa. (Minnaard *et al.*, 2001 ; Minnaard *et al.*, 2004 ; Minnaard *et al.*, 2007 ; Minnaard *et al.*, 2013)

Los resultados antes expuestos, llevaron a la elección de cuatro cepas, cuyo comportamiento, en lo que a la actividad biológica se refiere, es muy diferente (cepas: B10502, T1, M2 y 2). Se decidió seleccionar a la cepa B10502, aislada de un brote de toxoinfección, para profundizar los estudios de antagonismo con una cepa potencialmente probiótica, en sistemas *in vitro* más complejo de interacción como lo son los sistemas de co-cultivos de enterocitos con células dendríticas.

Los estudios de interacción de las cepas seleccionadas con la línea macrofágica de origen murino RAW264.7, se realizaron en condiciones similares a los ensayos para las cepas de *B. cereus* en el capítulo I. Se dejaron interactuar por 30 minutos, tiempo suficiente para que ocurriera la fagocitosis, y los análisis se

realizaron de manera similar. Para las cepas de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus* la multiplicidad de infección utilizada fue de 50 en los ensayos de 30 minutos de interacción y de 20 cuando se emplearon tiempos mayores.

Los resultados mostraron que los macrófagos murinos fueron más efectivos para fagocitar las cepas que habían sido opsonizadas con suero de ratón, esto se pudo ver para las cepas *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133, *B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200, pero no se vio el mismo efecto al analizar la cepa de *L. plantarum* CIDCA 83114, esta cepa fue fagocitada en la misma medida con y sin opsonización. Algo similar se pudo observar al estudiar la asociación de las bacterias con las células eucarióticas, se apreció un incremento del porcentaje de células con microorganismos asociados para las cepas *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133, *B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. infantis* NCC 200 opsonizadas, comparando con las mismas cepas sin opsonizar. Sin embargo, para la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114, no hubo diferencias entre las dos condiciones cuando se analizó la asociación. La cepa *L. plantarum* CIDCA 83114 se diferencia del resto de las cepas en esta característica, lo que podría estar indicando que el mecanismo de reconocimiento y de fagocitosis para esta cepa sería diferente. Esta distinta interacción con la célula fagocítica, podría estar relacionado con la diferencia de la superficie del microorganismo (Pérez *et al.* 1998)

Por otro lado, *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133, *B. bifidum* CIDCA 5310 y la cepa de *L. plantarum* CIDCA 83114, indujeron un incremento de la expresión del marcador CD86 comparándolo con la expresión basal que presentan estas células. La cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 fue la que mayor eficiencia tuvo para inducir la expresión de este marcador.

La cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 fue seleccionada en base al conocimiento en el grupo y a los resultados preliminares de interacción de las cuatro cepas lácticas con macrófagos murinos, esta cepa se seleccionó para los estudios de antagonismo frente a *B. cereus*.

Capítulo II

En una siguiente etapa, se analizó la activación de la vía NFκB en células epiteliales, para profundizar los conocimientos sobre los mecanismos de interacción de *B. cereus* con células del sistema inmune y analizar también los efectos de una cepa potencialmente probiótica sobre esta interacción. En un paso posterior, se decidió utilizar sistemas de co-cultivos de células epiteliales con células dendríticas de manera de considerar también el diálogo entre células que se establece en sistemas de infección. Sobre este sistema se analizaron las interacciones, la liberación de citoquinas en respuesta a esa interacción, y la activación de las células dendríticas.

En el contexto de las infecciones intestinales, las células epiteliales cumplen un rol importante en cuanto al reconocimiento de los microorganismos y en el envío de señales a las células del sistema inmune que interaccionan con ellas. En la superficie apical de algunas células no se encuentran receptores tipo Toll (TLR), pero si los hay en su membrana basolateral y en vesículas del citosol. Dentro de la célula también encontramos receptores tipo NOD (NLR). Ambos tipos de receptores, luego del reconocimiento de microorganismos, activan la vía de NFκB, provocando la generación de una respuesta pro-inflamatoria por parte de las células epiteliales. Esto incluye la producción de citoquinas como IL-8, que atrae neutrófilos; β-defensinas, que poseen propiedades antimicrobianas y atrae células dendríticas inmaduras; las citoquinas IL-1 e IL-6 también pueden encontrarse y estas citoquinas activan macrófagos. Todas estas señales pro-inflamatorias generadas, produce la activación de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas para poder lograr la eliminación del patógeno.

Para los estudios de interacción que involucran la cepa *L. delbrueckii subsp lactis* CIDCA 133 como microorganismo antagónico frente al patógeno, los resultados al ensayar las infecciones sobre las células HT-29 (NF-κB-GFP), no mostraron una activación importante por parte de las cepas de *B. cereus* estudiadas.

Lo mismo ocurrió en presencia de la cepa 133. Se pudo comprobar que la cepa 133 por si sola tampoco producía la activación de NF- κ B, manteniendo los valores del control de células sin estimular. Esto podría estar relacionado con un efecto no inflamatorio del lactobacilo, que como se discutirá más adelante estaría implicado también con la disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Estos efectos anti-inflamatorios fueron reportados también para otros microorganismos como *Lactobacillus rhamnosus*. Este microorganismo demostró sus efectos anti-inflamatorios sobre células epiteliales, entre otras cosas a través del descenso de la expresión del factor NF- κ B (Grompone *et al.*, 2012). En levaduras aisladas de kefir, se pudo ver un efecto anti-inflamatorio sobre células epiteliales que estaría vinculado a una disminución de la activación de la vía de NF- κ B (Romanin *et al.*, 2010).

En nuestros estudios las multiplicidades de infección utilizadas fueron de 20 para cada uno de los microorganismos y la incubación se realizó en presencia de cloranfenicol durante las 18 hs debido a que al tratar de hacer una incubación previa de 30 minutos sin antibiótico; como se utilizó en las infecciones de *B. cereus* con macrófagos murinos en el capítulo I, las células resultaban totalmente desprendidas por las cepas de *B. cereus*.

Al evaluar la interacción de *B. cereus* con las células HT-29, la presencia del lactobacilo, no indujo cambios en la asociación. Los largos tiempos de incubación utilizados (18 hs), podrían estar relacionados con la falta de efecto de la cepa 133. La cepa 2 muestra una tendencia a una menor asociación ($p=0,08$) cuando se encuentra presente el lactobacilo. Esta cepa y la cepa B10502, presentaron los más altos porcentajes de microorganismos asociados a las células.

La IL-8 puede ser inducida, por varios estímulos inflamatorios, como lo son IL-1, TNF y bacterias. La simple adhesión de la bacteria a los enterocitos, junto a la secreción de proteínas asociadas a la virulencia sería suficiente para la producción de IL-8 (Eaves-Pyles *et al.*, 1999; Gewirtz *et al.*, 1999; Lammers *et al.*, 2002). Muchos microorganismos patógenos inducen la producción de IL-8 en

células epiteliales, *Helicobacter pylori* (Papadakos *et al.*, 2013), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Edwards *et al.*, 2011), *E. coli* enteroinvasiva (Jung *et al.*, 1995), *Yersinia enterocolitica* (Schulte *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1995), *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes* (Jung *et al.*, 1995), entre otros. Sin embargo, se ha observado que las bifidobacterias y los lactobacilos, no inducen la producción de IL-8 en estas células (Lammers *et al.*, 2002; Imaoka *et al.*, 2008), e inclusive que pueden provocar la disminución de la producción de IL-8 en infecciones (Bermudez-Brito *et al.*, 2012) lo que daría cuenta de la capacidad inmunomodulatoria de este microorganismo.

En nuestro estudio se observó que el lactobacilo no indujo la producción de IL-8 en cultivos epiteliales. Por otro lado las cepas de *B. cereus*, B10502, T1 y 2 produjeron un aumento de IL-8. La cepa que mostró provocar la mayor producción de IL-8 fue la cepa B10502, que además fue la que presentó la más alta asociación con las células. Sin embargo, al realizar la incubación en presencia de la cepa 133, se pudo ver que el lactobacilo fue capaz de disminuir considerablemente la producción. Estos hallazgos llevan a la conclusión, que la cepa 133 podría estar actuando como una cepa con propiedades anti-inflamatorias, al menos en el contexto de cultivos epiteliales. Recordemos que esta cepa tampoco indujo la expresión de NF- κ B.

Para evaluar el efecto de la cepa de *B. cereus* B10502 en un sistema de cocultivo de enterocitos y células dendríticas, los microorganismos marcados se sembraron en la parte superior de los insertos, donde se encontraban las células HT-29 formando una monocapa, se pudo ver que B10502 fue capaz de pasar a través de las células HT-29 y llegar a tener interacción con las células dendríticas. Si bien los tiempos de incubación estudiados en estos ensayos fueron largos (18 hs), se pudo ver que la influencia de la cepa 133 en interacción con la cepa de *B. cereus*, fue diferente en cada tipo celular. La asociación de *B. cereus* con células dendríticas fue mayor cuando no se encontraba en cocultivo con la cepa 133 que en presencia

de ésta, y a la vez se apreció un menor porcentaje de asociación a las HT-29 en ausencia de la cepa 133. Esto lleva a pensar que la cepa 133 podría o bien, estar dificultando el pasaje de *B. cereus* a través de las células epiteliales, ya sea por impedimento estérico o por competencia o desplazamiento, o bien interactuando con las células dendríticas en competencia con *B. cereus*.

Las células dendríticas interactúan con los microorganismos y los diferencian utilizando receptores tipo Toll (TLR), luego presentan los antígenos procesados a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC en ratón, HLA-DR en humano).

Las células dendríticas median la activación de células T, que se encuentra regulada por moléculas HLA-DR, moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, y citoquinas. Los sistemas de co-cultivos de células dendríticas y células epiteliales permiten analizar el diálogo entre estos dos tipos celulares.

Haller y colaboradores demostraron que bacterias no patógenas inducían una respuesta a nivel de citoquinas liberadas por células dendríticas, diferente cuando se encontraban las células epiteliales presentes (Haller *et al.*, 2000). Asimismo, cepas que inducen respuestas anti-inflamatorias (*Lactobacillus rhamnosus*) producen un descenso notable de la expresión de CD86 y de HLA en las células dendríticas en co-cultivo (Grompone *et al.*, 2012).

En la incubación de *B. cereus* y el lactobacilo, no se pudo apreciar, en las condiciones ensayadas en el presente trabajo de tesis, un aumento en la expresión de HLA-DR en las células dendríticas respecto a la expresión basal de las células.

La expresión del marcador de coestimulación CD86, se vio aumentada respecto al basal (células sin estimular), en las tres condiciones de incubación con bacterias. Si bien parece haber un descenso de la expresión al incubar las células con la cepa 133 sola, no se presentaron diferencias significativas al comparar las tres condiciones de cultivos con bacterias entre sí. Se ha sugerido previamente que los probióticos aumentan la expresión de MHC-II y modulan la expresión de moléculas coestimuladoras dependiendo del origen de las células dendríticas y la cepa del probiótico (Kim *et al.*, 2012). Específicamente, en células dendríticas

humanas, cepas de lactobacilos indujeron la expresión de HLA-DR y CD86 (Mohamadzadeh *et al.*, 2005)

En el estudio de la producción de citoquinas por parte de las células, en el contexto de co-cultivos, los resultados muestran que la cepa B10502 induce una respuesta pro-inflamatoria en las células eucarióticas (producción de IL-6, IL-8 y TNF- α). La IL-8 se vio incrementada al incubar las células con las tres condiciones estudiadas (B10502, 133 y B10502 con 133). Al comparar con los resultados obtenidos al ensayar con las células HT-29 en ausencia de células dendríticas, se apreció que la producción de IL-8 podía ser modulada por la cepa 133, lo que no ocurre en los co-cultivos con las células dendríticas.

Esto pone en evidencia la importancia del entorno celular para modificar el efecto de *B. cereus* a nivel intestinal. *B. cereus*, sería capaz de producir un efecto pro-inflamatorio sobre las células en sistemas de cocultivo donde se establece un diálogo molecular entre las células similar a lo que ocurre en sistemas más complejos, evitando la acción del lactobacilo.

Debido a que los microorganismos resultaron capaces de tener contacto directo con las células dendríticas, no podemos discernir si la respuesta generada resulta de la liberación de señales por parte de las células epiteliales o por el contacto directo de los microorganismos con las células.

Por otro lado la expresión de IL-6 no se vio incrementada al incubarse con el lactobacilo, lo que apoyaría la idea de que se trata de una bacteria no inflamatoria. La cepa de *B. cereus*, provocó un aumento en la producción de IL-6 que no se vio afectado por la presencia del lactobacilo. Algo similar ocurrió al evaluar la producción de TNF- α . Podríamos pensar que la cepa 133, en el contexto de los co-cultivos, y en las multiplicidades de infección ensayadas, resulta incapaz de modular la respuesta pro-inflamatoria generada por el patógeno.

Las citoquinas IL-10 e IL-12 p70 no pudieron ser detectadas en el ensayo.

Los resultados muestran que las cepas de lactobacilos y bifidobacterias presentan diferente tipo de interacción con células fagocíticas.

Se seleccionó la cepa *L. delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 para evaluar el efecto antagónico frente a las cepas de *B. cereus* estudiadas en el capítulo 1. El lactobacilo pudo disminuir el efecto inflamatorio que produjeron las cepas de *B. cereus* sobre cultivos de enterocitos. Sin embargo al evaluar la propiedad en el entorno del diálogo entre células dendríticas y enterocitos, el efecto antagónico se pierde. Los resultados obtenidos permitieron observar el comportamiento dependiente del entorno para el efecto antagónico de la cepa 133

BIBLIOGRAFÍA

Abbas KA. y Lichtman AH. Versión en Español de la 5ta edición de la versión en inglés Cellular and Molecular Immunology. Copyright MMIII Elsevier Science, an Elsevier Imprint.. Elsevier España, Madrid, España. (2004)

Benyacoub J.; Pérez, P. F.; Rochat, F.; Saudan, K. Y; Reuteler, G.; Antille, L. N.; Humen, M.; De Antoni, G. L.; Cavadini, C.; Blum, S. and Schiffrin, E. J. 2005. *Enterococcus faecium* strain SF68 improves immune response to *Giardia intestinalis* in mice. J. Nutr. 135: 1171-1176.

Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Gil A. 2012. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. PLoS One. ;7(8):e43197. doi: 0.1371/journal.pone.0043197.

Bernet, M. F.; Brassart, D.; Neeser, J. R. and Servin, A. L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* La1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut. 35: 483-489.

Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. 2009. Probiotics and immunity. J Gastroenterol. 44:26-46.

Brandtzaeg P. 2010. Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity. Beneficial Microbes 1(3): 211-227

Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat Rev Immunol, 7:735-744.

Clemens, D. L.; Lee, B. Y. and Horwitz, M. A. 2002. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome in human macrophages is isolated from the host cell cytoplasm. *Inf. Immun.* 70: 5800-5807.

De Urraza, P.J. 1997. Obtención de bacterias lácticas para cultivos starters: aislamiento, caracterización y conservación. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Dogi, C.A.; Weill, F. and Perdígón, G. 2009. Immune response of non-pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa. *Immunobiology*, doi:10.1016/j.imbio.2009.01.005 1

Eaves-Pyles T, Szabo C, Salzman AL. 1999. Bacterial invasion is not required for activation of NF-kappaB in enterocytes. *Infect Immun.* 67:800–4.

Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2005. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 71:6008-13.

Flannagan, R. S.; Cosío, G. and Grinstein, S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Rev. Microbiol.* 7: 355-366.

Garrote, G. L.; Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. 2000. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection* 63: 364-369.

Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, et al. 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect Immun.* 67:608–17.

Capítulo II

Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. 2007. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol.* 118(3):264-73.

Gómez Zavaglia A, Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J Food Prot.* 61(7):865-73.

Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, Fernández-Calero T, Tiscornia I, Bollati-Fogolín M, Chambaud I, Foligné B, Montserrat A, Ramón D. 2012. Antiinflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.*;7(12):e52493.

Gudiel-Urbano, M. and Goñi, I. 2002. Effect of short-chain fructooligosaccharides and cellulose on cecal enzymes in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 46: 254-258.

Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. 2000 Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut.* 47(1):79-87

Hsieh, M. H. and Versalovic, J. 2008. The Human Microbiome and Probiotics: Implications for Pediatrics. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 38: 309-327.

Hua MC, Lin TY, Lai MW, Kong MS, Chang HJ, Chen CC. 2010. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells. *World J Gastroenterol.* 16(28):3529-40.

Hugo AA.; Kakisu, EJ, De Antoni GL and Pérez PF. 2008. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. Lett. Appl. Microbiol. 46: 613-619

Hugo AA, De Antoni GL, Pérez PF. 2010. *Lactobacillus delbrueckii* subsp lactis (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells. Lett Appl Microbiol. 50(4):335-40. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02796.x.

Hugo, A. A.; De Antoni, G. L. and Pérez, P. F. 2006. *Lactobacillus delbrueckii* subsp lactis strain CIDCA 133 inhibits nitrate reductase activity in *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 111: 191-196.

Imaoka A, Shima T, Kato K, Mizuno S, Uehara T, Matsumoto S, Setoyama H, Hara T, Umesaki Y. 2008. Antiinflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral bloodmononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. World J Gastroenterol. 14(16):2511-6.

Kim JY, Park MS, Ji GE. 2012 Probiotic modulation of dendritic cells co-cultured with intestinal epithelial cells. World J Gastroenterol. Mar 28;18(12):1308-18. doi: 10.3748/wjg.v18.i12.1308

Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M 2002. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. Am J Gastroenterol. 97(5):1182-6.

Macpherson, A. J. and Uhr, T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science: 303: 1662-1665.

Capítulo II

Maldonado Galdeano, C. and Perdígón G. 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin. Vacc. Immunol.* 13: 219-226.

McCallum, S. J. and Theriot, J. A. 2000. Bacterial manipulation of the host cell cytoskeleton. Chapter 10 in *Cellular Microbiology* Ed. by Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. and Rappuoli, R. ASM Press, Washington.

Medrano, M., Hamet, M., Abraham, A., Pérez, P. F. 2009. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Antonie van Leeuwenhoek*. En prensa.

Medrano, M., Pérez, P. F., Abraham, A. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 1-7.

Minnaard J, Humen M and Pérez P. 2001. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cell. *J Food Prot.* 64:1535-1541.

Minnaard J., Delfederico L., Vasseur V., Hollmann A., Rolny I., Semorile L. and Pérez P.F. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 197-206.

Minnaard J., Lievin-Le Moal V., Coconnier M., Servin A., and Pérez P. 2004. Disassembly of F-Actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiates human intestinal caco-2 cells. *Infect. Immun.* 72:3106-3112.

Minnaard J., Rolny I. and Pérez P. 2013. Interaction between *Bacillus cereus* and cultured human enterocytes: Effect of calcium, cell differentiation and bacterial extracellular factors. *J Food Prot.* En prensa.

Mizoguchi E, Hachiya Y, Kawada M, Nagatani K, Ogawa A, Sugimoto K, Mizoguchi A, Podolsky DK. 2008. TNF receptor type I-dependent activation of innate responses to reduce intestinal damage-associated mortality. *Gastroenterology* 134(2):470-80.

Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;102:2880–2885

Mueller, C. and Macpherson, A. J. 2006. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut* 55: 276-284.

Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. 2010.

Parvez, S.; Malik, K. A.; Kang, S. A. and Kim, H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1171-1185.

Pérez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol.* 64(1):21-6.

Pérez, P. F.; Minnaard, J. ; Rouvet, M. ; Knabenhans, C. ; Brassart, D. ; De Antoni, G. L. and Schiffrin, E. J. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from lactobacilli: an in vitro study. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 5037-5042.

Pils, T. Schmitter, F. Neske, C. R. Hauck. 2006. Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry, *J. Immunol. Methods.* 65 301–310

Capítulo II

Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(1):454-9. doi: 10.1073/pnas.0910307107.

Riedel, C. U.; Foata, F.; Goldstein, D. R.; Blum, S. and Eijmanns, B. J. 2006. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. Int. J. Food Microbiol. 110: 62-68.

Romanin D, Serradell M, González Maciel D, Lausada N, Garrote GL, Rumbo M. 2010. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. Int J Food Microbiol. 140(2-3):102-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014

Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. J Food Prot. 69(8):2011-5

Ruas-Madiedo, P.; Medrano, M.; Salazar, N.; de los Reyes-Gavilán, C.; Pérez, P. F. and Abraham, A. G. 2010. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. J. Appl. Microbiol. 109:2079-2086.

Sansonetti, P. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 280: G319-G323.

Sansonetti, P. 2004. War and peace at mucosal surfaces. Nat. Rev. Immunol. 4: 953-964.

Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacili and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 28: 405-440.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(43):16731-6. doi: 10.1073/pnas.0804812105.

Spiller, R. 2008. Review article: probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther 28: 385–396.

Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H. 2009. New horizon of mucosal immunity and vaccines. Curr Opin Immunol. 21(3):352-8.

Tiscornia I, Sánchez-Martins V, Hernández A, Bollati-Fogolín M. 2012^b. Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an in vitro co-culture assay with intestinal epithelial cells. B.J Immunol Methods. 31;384(1-2):164-70.

Tiscornia I; Espósito P, Porro V; Hernández P; Cerecetto H; González M; Barreiro E; Bollati-Fogolín M. 2012^a. NF-kB signalling pathway: generation and characterization of a reporter cell line of human origin. ESACT Proceedings Vol. 5, DOI: 10.1007/978-94-007-0884-6.

Trejo FM, Minnaard J, Perez PF, De Antoni GL. Anaerobe. 2006. Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by Bifidobacterium supernatants.12(4):186-93.

Capítulo II

Tuominen-Gustafsson H, Penttinen M, Hytönen J, Viljanen MK. 2006 Use of CFSE staining of borreliae in studies on the interaction between borreliae and human neutrophils. *BMC Microbiol.* 18;6:92.

Verdu, E. F. 2009. Probiotics effects on gastrointestinal function: beyond the gut?. *Neurogastroenterol Motil*, 21: 477–480.

Zeuthen, L. H.; Christensen, H. R. and Frøkiær, H. 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with Gram-negative bacteria. *Clin. Vacc. Immunol.* 13: 365-375.

Capítulo III

Desarrollo de un modelo murino de infección con *Bacillus cereus*



INTRODUCCIÓN

En el contexto de las infecciones intestinales, se seleccionó como modelo de patógeno a analizar, la bacteria *Bacillus cereus*. Este patógeno es un microorganismo Gram positivo, esporulado, capaz de producir enfermedades intestinales y no intestinales. La virulencia de esta bacteria es multifactorial y se han demostrado diversos efectos biológicos en enterocitos humanos en cultivo (Caco-2) que varían según la cepa.

Se cuenta con un cepario altamente estudiado en sistemas *in vitro*. Basándonos en las cualidades de cada cepa y por los estudios realizados para anteriores capítulos de esta tesis, se seleccionó para analizar los efectos *in vivo*, la cepa de *B. cereus* B10502. Esta cepa, presenta importancia epidemiológica, ya que fue aislada de un brote de toxoinfección alimentaria. En estudios previos, se demostró que *B. cereus* B10502, produce daño a células Caco-2, lo cual es atribuido principalmente a su capacidad de adherirse a los enterocitos (Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007).

Los modelos murinos ofrecen una gran variedad de herramientas inmunológicas que permiten determinar factores específicos involucrados en las interacciones entre el hospedador y el patógeno. En este capítulo de tesis, se buscó un modelo de infección murino para lograr un estudio más completo de la infección producida por *Bacillus cereus*.

Numerosos microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de patogenia para evadir la respuesta inmune del huésped. En lo que respecta a *B. cereus*, los mecanismos involucrados en las infecciones producidas por este patógeno, son poco conocidas.

Las superficies mucosas son la principal barrera contra la permanente carga antigénica del medio ambiente (Neutra *et al.*, 2001; Mowat, 2003). El tejido

linfoide asociado a las mucosas, continuamente estimulado por el medio ambiente ha desarrollado la habilidad de distinguir entre agentes nocivos, a los que neutraliza mediante diversos mecanismos protectivos, y antígenos inocuos, contra los que no genera respuestas (Mayer, 2003; Macpherson *et al.*, 2004; MacDonald y Monteleone, 2005).

El tejido linfoide asociado al intestino, GALT (del inglés: Gut-Associated Lymphoid Tissue) puede clasificarse de dos maneras en lo que se refiere a la respuesta inmune. Se distinguen sitios inductivos, en donde los antígenos son procesados y presentados para iniciar la respuesta inmune, tales como placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), y otros (Mowat, 2003; Kelsall y Strober, 1999; McGhee, 1999) y sitios efectores, en los que se localizan las células previamente activadas y diferenciadas que cumplen las funciones efectoras (Kelsall y Strober, 1999; Dogi *et al.*, 2010). Ambos sitios participan de manera conjunta para generar a nivel de mucosa y suero una respuesta adecuada para el huésped. Esta respuesta incluye la producción de la inmunoglobulina A (IgA). La IgA secretada limita la asociación de las bacterias patógenas con las superficies de las células epiteliales intestinales y restringe la entrada de los microorganismos no patógenos a través del epitelio. La IgA que resulta específica para las bacterias intestinales, es producida con la ayuda de las células dendríticas que muestrean a las mismas en distintos sitios de la mucosa (MacPherson, 2010).

Entre las células del intestino, se encuentran las células M. Estas células se encuentran involucradas en el transporte de antígenos lumbinales, incluyendo bacterias. Estos antígenos resultan luego liberados a nivel de las placas de Peyer. Así los microorganismos que atraviesan la barrera epitelial, interaccionan directamente con las células del sistema inmune. Entre estas células, se encuentran las células presentadoras de antígenos que incluyen, los macrófagos, las células dendríticas y linfocitos B.

Los macrófagos y las células dendríticas de la mucosa intestinal constituyen una de las primeras defensas frente a los microorganismos que entran en contacto con el espacio subepitelial, y son necesarias para la eliminación de los

microorganismos. Además, las células inmunes de las placas de Peyer, de los nódulos linfoides y de la pulpa blanca del bazo están involucradas en las respuestas frente a enteropatógenos, y se encuentran en un estado continuo de recirculación entre los órganos linfoides secundarios. El contacto de los microorganismos con estas células, implica la expresión de moléculas tales como MHC-II y CD86, relacionadas con la activación de la respuesta inmune.

Estas células presentadoras de antígenos, que expresan MHC y moléculas coestimuladoras en sus superficies, son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T.

Los linfocitos T, se dividen en dos clases, los que expresan CD8 en su superficie y los que expresan CD4. Estos marcadores son importantes para determinar la interacción de estas células con otras. Las células CD8⁺ son los linfocitos citotóxicos que actúan principalmente en la eliminación de células que reconocen. Las células CD4⁺ están involucradas en la activación de las células que reconocen.

Las células CD4⁺ se pueden clasificar en células Th1, Th2, Th17 y Treg. Las respuestas se encuentran asociadas a un conjunto de citoquinas características. Las células Th1, tienen una función dual, controlar infecciones debidas a ciertos microorganismos intracelulares y actuar como células colaboradoras (helper) para estimular la producción de anticuerpos. Las células Th2 están involucradas en la activación de células B para la producción de anticuerpos. Las células CD4⁺ Th17, se encuentran involucradas en la inducción de la producción de citoquinas por parte de células epiteliales y fibroblastos para la reclusión de neutrófilos a la zona de infección. Las células T reguladoras (Treg) actúan inhibiendo las respuestas de otros tipos celulares ayudando de esta forma a prevenir una reacción exagerada durante las respuestas inmunes.

Las citoquinas involucradas con cada tipo de linfocito T descrito, no sólo definen la función o mecanismo efector de la respuesta inmune, sino que también se encuentran implicadas en el desarrollo y diferenciación de la propia subpoblación.

Las células T_H1 , liberan interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y otras citoquinas. Como resultado se activan macrófagos y se favorecen los procesos de fagocitosis, es decir, que se encuentran involucradas en los procesos mediados por células.

Las células T_H2 , producen IL-4, IL-5 e IL-13, citoquinas asociadas a la producción de inmunoglobulinas y eosinofilia. También se encuentran involucradas en la defensa del huésped frente a parásitos.

Las células T_H17 , inducen la expresión de quimiocinas involucradas con el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Se caracterizan por la producción de IL-17, IL-21, IL-22 y TNF- α

Las células T_{Reg} , son esenciales para contrarrestar las respuestas inflamatorias, ya que producen citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β . Intervienen en fenómenos de tolerancia.

En la tabla III.1, se consignan algunas citoquinas con relevancia en el contexto de la inmunidad de mucosas. Cabe aclarar que los roedores carecen de un homólogo directo de IL-8, pero las quimiocinas CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, y CXCL5-6/LIX están reconocidas como homólogos funcionales de IL-8 y están involucradas con el reclutamiento de neutrófilos (Hol *et al*, 2009).

Tabla III.1. Citoquinas con relevancia en el contexto de la inmunidad de mucosas. Principales fuentes de producción y principales células diana y efectos biológicos.

Citoquinas y quimiocinas	Principal fuente	Células diana y efecto biológico
IL-1 β	Macrófagos, epiteliales	Activa células T, activa macrófagos, fiebre
IL-2	Células T	Proliferación de células T
IL-4	Células T, <i>mast cells</i>	Activación de células B, <i>switch</i> a IgE Diferenciación a T _H 2
IL-5	Células T, <i>mast cells</i>	Crecimiento de eosinófilos, diferenciación
IL-6	Células T, macrófagos, endoteliales	Crecimiento y diferenciación T y B. Producción de proteínas de fase aguda, fiebre.
IL-8 (CXCL8)	Macrófagos	Pro inflamatoria. Activa neutrófilos, basófilos, T CD8+, endoteliales
IL-10	Monocitos	Potente supresor de la actividad de macrófagos (anti-inflamatoria) Diferenciación a T _H 2
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Activación de células NK. Inducción a diferenciación T CD4+ en T _H 1
IL-13	Células T	Crecimiento y diferenciación B, inhibe la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos y las células T _H 1
IL-17	Células T _H 17, CD8+, Células NK, neutrófilos	Induce producción de citoquinas por células epiteliales, del endotelio y fibroblastos. Pro inflamatoria
IL-21	Células T _H 2	Induce la proliferación B, T y NK
INF- γ	Células T y NK	Activación de macrófagos, incremento de la expresión de MHC-II y procesamiento de antígenos. Suprime T _H 2
TNF- α	Macrófagos, NK, T	Promueve inflamación, activación endotelial
CXCL2	Fibroblastos, epiteliales	Atrae neutrófilos al sitio de infección

Las células dendríticas son células fagocíticas, pero su rol en el sistema inmune resulta más complejo que la fagocitosis. Se considera que presentan el nexo entre la inmunidad innata y adquirida. Son las únicas capaces de estimular la proliferación y diferenciación de las células T no activadas (T_H0). Además determinan el tipo de respuesta inmune de las células que activan, a través de diferentes marcadores de superficie (Murphy *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2010)

Las células dendríticas se pueden clasificar como inmaduras, que se encuentran en los tejidos periféricos, y maduras (Rescigno y Di Sabatino, 2009). Las células dendríticas inmaduras actúan principalmente como células fagocíticas, presentando altos niveles de endocitosis y bajos de moléculas coestimuladoras (Westendorf *et al.*, 2010). Cuando estas células detectan productos microbianos o entran en contacto con citoquinas pro-inflamatorias, las células dendríticas inmaduras, se transforman en maduras, reduciendo su capacidad de captura de antígenos pero aumentando su capacidad de estimulación de las células T (Macdonald *et al.*, 2011). Se incrementa también la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de las células. Se reajusta el patrón de receptores de quimiocinas para facilitar su migración a los órganos linfoides (Rescigno y Di Sabatino, 2009). Luego de estos cambios, las células dendríticas migran a zonas ricas en células T, como por ejemplo, las placas de Peyer o nódulos linfáticos mesentéricos, para activar los linfocitos e iniciar la respuesta inmunitaria (Macdonald *et al.*, 2011).

En ratón, las células dendríticas se identifican por la expresión de CD11c en su superficie. En las placas de Peyer se han descrito al menos tres subpoblaciones de células dendríticas, que se diferencian de acuerdo a los marcadores de superficie que expresan. Se clasifican en mieloides (CD11b+), linfoides (CD8 α +) y dobles negativas (CD11b-/CD8 α -). Las mieloides se localizan en el domo subepitelial de la placa de Peyer, las linfoides en la zona interfolicular; y las dobles negativas, en ambas regiones (Iwasaki y Kelsall, 2001).

Las funciones de estas células son diferentes entre sí. Las células CD11c⁺/CD11b⁺ en las placas de Peyer, presentan la capacidad de producir altos niveles de IL-10, polarizando la respuesta efectora a tipo T_H2 en comparación con las otras dos subpoblaciones. Las CD11c⁺/CD11b⁻/CD8 α⁺ y las dobles negativas de las placas de Peyer estimuladas con antígenos virales o bacterianos, inducen respuesta del tipo T_H1 por producción de IL-12 e INF-γ (Iwasaki y Kelsall, 2001; Fleeton *et al*, 2004).

Las células dendríticas que llegan a los nódulos linfáticos mesentéricos, pueden viajar desde la *lamina propria* o desde las placas de Peyer y presentan funciones diferentes. Cuando llegan desde la *lamina propria* cumplen un rol importante en la tolerancia oral (Worbs *et al*, 2006). Si las células dendríticas llegan a los nódulos linfáticos mesentéricos desde las placas de Peyer, pueden transportar bacterias comensales, y su función sería la de activar linfocitos B para producir IgA secretoria (Macpherson y Uhr, 2004). Estas células dendríticas contenidas en los nódulos linfáticos mesentéricos, impiden que el microorganismo pase a otros tejidos, evitando infecciones sistémicas (Macpherson y Uhr, 2004).

Considerando los antecedentes expuestos, el objetivo de este capítulo fue estudiar los efectos de *Bacillus cereus* en un modelo *in vivo*, empleando ratones hembras C57BL/6.

En este capítulo se estudió la modificación de la estructura de la mucosa intestinal mediante coloraciones histológicas, como así también los cambios en la estructura histológica de otro órgano relevante frente a la respuesta en una infección, el bazo. Asimismo, se analizó el balance de células inmunes en respuesta a la infección, en diferentes sectores de la mucosa intestinal, en nódulos linfáticos mesentéricos y en el bazo, y la expresión de citoquinas involucradas en las respuestas inmunes.

Para alcanzar una evaluación más completa de la respuesta inmune frente a la infección por *Bacillus cereus* se realizaron ensayos de translocación del microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES EMPLEADOS

Se emplearon ratones C57BL/6J hembras de entre 6 y 8 semanas de edad, pertenecientes a la categoría SPF (libres de patógenos específicos), obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los progenitores de esta cepa, proceden de Jackson Laboratory (EEUU).

Los ratones fueron separados en grupos de entre 5 y 7 individuos al ser trasladados al bioterio de experimentación. El mencionado bioterio se encuentra en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata y consta de un sistema controlado con barreras para evitar contaminaciones cruzadas y externas. El traslado de los ratones se realizó 7 días antes de comenzar con los protocolos de experimentación, de manera de permitir a los animales tener un período de adaptación y lograr así disminuir el estrés causado por el transporte y el cambio de las condiciones de alojamiento.

Los procedimientos realizados durante la totalidad de los ensayos, fueron efectuados de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación.

CEPA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Cepa:

Para la realización de estos ensayos, se utilizó la cepa de *Bacillus cereus* B10502. Esta cepa, aislada de una intoxicación alimentaria, fue gentilmente provista por el Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires (Minnaard *et al* 2004; Minnaard 2007).

La cepa se conservó a -80°C en caldo BHIG (BHI con glucosa 0,1 % (p/v) adicionado de glicerol al 10 % (v/v) tal como se detalló en el capítulo I.

Condiciones de crecimiento:

A partir de cultivos de 16 horas crecidos en BHIG a 32°C y en agitación, se inocularon erlenmeyers con 500 ml del mismo medio de cultivo, el inóculo usado fue del 4 % (v/v) y se incubaron durante 3 horas a 32°C en agitación. Los cultivos así obtenidos fueron centrifugados 15 minutos a 10000 g, los sobrenadantes fueron descartados y los pellets obtenidos fueron lavados dos veces con PBS estéril. Las bacterias se resuspendieron en PBS. Se controló la cantidad de microorganismos por medidas de densidad óptica (DO) a 600 nm (DO = 1 corresponden a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) (espectrofotómetro UV-visible Helios Gamma, Thermo Spectronics), por recuento en placas de agar nutritivo y por recuento en cámara de Neubauer.

La concentración de microorganismos usados dependió de cada etapa experimental de este capítulo.

INFECCIÓN CON *B. CERESUS* B10502.

Para este estudio, los ratones se separaron en tres grupos de 5 ratones cada uno. Un grupo fue mantenido como control, y dos grupos fueron infectados con la cepa de *B. cereus* B10502. Se quitó el alimento de los animales 16 hs antes a la infección, luego de infectar los animales el alimento se volvió a colocar.

Los ratones fueron infectados con 100 μl de la cepa B10502 por vía intragástrica, en una dosis de 10^8 microorganismos por ratón (mo/ratón). Al grupo control se le administraron de la misma manera, 100 μl de PBS estéril.

Los días de sacrificio de los animales, fueron establecidos a los 2 y 5 días post-infección (PI). Los animales fueron controlados diariamente. El sacrificio fue realizado por inhalación de CO_2 . Inmediatamente luego del sacrificio de los

animales, se procedió a la toma de las muestras para la realización de los diferentes análisis.

En la figura III.1 se muestra un esquema simplificado del protocolo de infección utilizado.

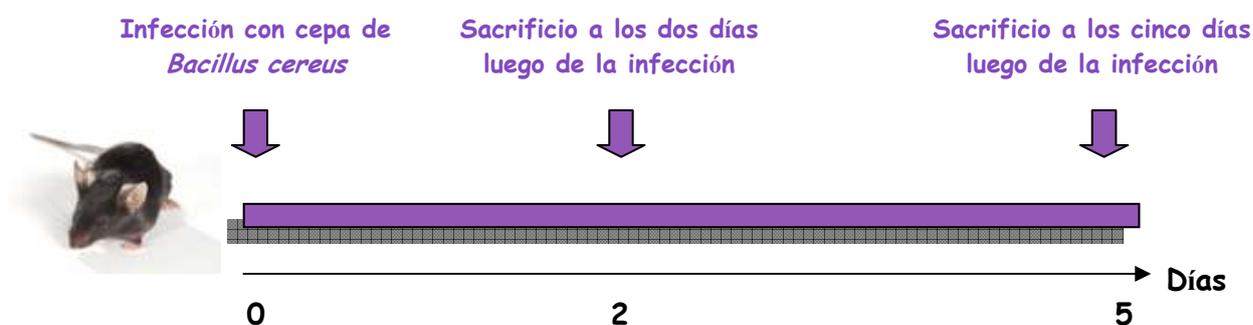


Figura III.1. Esquema de infección y sacrificio de los animales. Los animales (ratones C57BL/6J) fueron infectados en el día 0 con 10^8 microorganismos por ratón y los sacrificios se realizaron a los 2 o 5 días post infección. La cepa de *B. cereus* utilizada en el ensayo fue la B10502.

Se realizaron coloraciones histológicas en bazo e intestino delgado para posteriores análisis de estructuras de los diferentes órganos. Para estudiar la modificación en el número de células productoras de mucus, se utilizó una tinción específica. Se efectuaron estudios sobre diferentes poblaciones celulares en nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), placas de Peyer (PP) y bazo por citometría de flujo. Estos protocolos se explican a continuación.

Determinación de los efectos de la infección en la estructura histológica

Inmediatamente luego del sacrificio, se realizó la necropsia de los animales. Se extrajeron una porción del intestino delgado y una de bazo para estudios histológicos. Las muestras fueron enjuagadas con PBS, y fijadas con etanol 96°,

luego se procedió a deshidratar e incluir la muestra en Histoplast (Biopack, Argentina). En los órganos incluidos, se realizaron cortes histológicos con micrótopo manual (micrótopo SM 2000R, Leica). Para los análisis de estructura, los cortes de intestino delgado y de bazo fueron desparafinados, hidratados y coloreados con Hematoxilina-Eosina (Sainte-Marie, 1962). Las muestras fueron evaluadas mediante microscopía de campo claro en un microscopio Leica DMLB acoplado a una cámara Leica DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza).

Protocolo de coloración con Hematoxilina – Eosina:

Desparafinización de los cortes:

1. Xileno (3 veces durante 5 minutos cada vez)
2. Etanol absoluto (2 veces durante 2 minutos cada vez)
3. Etanol 96° (2 veces durante 2 minutos cada vez)
4. Etanol 80° – 70° (2 minutos)
5. Agua destilada (1 minuto)

Coloración de los cortes:

1. Colocar en solución de Hematoxilina durante 5 minutos
2. Lavar con agua corriente, luego agua ácida (pH=6) durante 3 min. aprox. (el preparado adquiere un color morado), agua corriente y finalmente agua destilada para terminar de lavarlo
3. Colocar en solución de Eosina durante 30 segundos
4. Lavar con etanol 70° una vez rápidamente
5. Deshidratar en etanol 96° (2 veces durante 2 min.), etanol absoluto (2 veces durante 2 min.), xilol (2 veces durante 2 min.)
6. Montar en portaobjeto usando bálsamo de Canadá.

Determinación de células productoras de mucus

La identificación de las células productoras de mucus se realizó mediante tinción con azul de Alcían. Para esto, los cortes de intestino delgado fueron colocados en acético 3 % durante 3 min y luego en una solución de azul de Alcían (Azul de Alcían 0,5 g/l en ácido acético 3 % (v/v), pH: 2,5). Se lavaron con agua y se colorearon con eosina durante 30 segundos. Luego de la coloración con eosina, se prosiguió de la misma manera que para la coloración con Hematoxilina - Eosina, hasta montar los preparados con bálsamo de Canadá.

Se realizaron los recuentos de células productoras de mucus y los resultados se expresaron como número de células productoras de mucus por campo (40x).

ESTUDIO DEL ACCESO DE *B. CEREUS* A DIFERENTES TEJIDOS

Como continuación del estudio del modelo de infección de *B. cereus*, utilizando la cepa B10502, se buscó al microorganismo en diferentes tejidos luego de la administración. Las condiciones de crecimiento usadas para la cepa, fueron las descritas en el inciso “Condiciones de crecimiento”.

Localización de *B. cereus*

Los animales fueron separados en dos grupos, control e infectados. De la misma manera que para el resto de los ensayos realizados, a los animales control se le administraron 100 µl de PBS por vía intragástrica. El resto de los animales fue infectado con 100 µl de una suspensión de la cepa B10502. La dosis utilizada fue de 1×10^9 mo por ratón. La infección se realizó por vía intragástrica.

La figura III.2 muestra el esquema de experimentación usado para el ensayo.

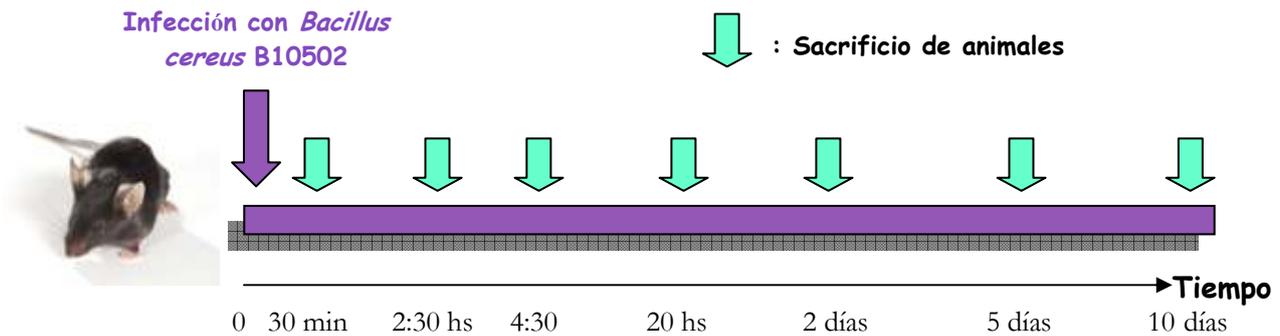


Figura III.2. Esquema de infección y sacrificio de animales. Los animales (ratones C57BL/6J) fueron infectados en el día 0 con 10^9 microorganismos por ratón y los sacrificios se realizaron a los 30 min, 2:30 hs, 4:30 hs, 20 hs, 2 días, 5 días y 10 días post infección. Luego se tomaron las muestras para los ensayos. La cepa de *B. cereus* utilizada para la infección fue B10502.

Los ratones fueron controlados diariamente, sin apreciarse cambios en el peso corporal de los mismos ni signos de patología durante el período estudiado. El sacrificio de los ratones fue realizado por inhalación de CO_2 . La extracción de las muestras durante la necropsia, se realizó en condiciones de asepsia.

Los tiempos analizados en este ensayo fueron: 30 min, 2:30 hs, 4:30 hs, 20 hs, 2 días, 5 días y 10 días post infección. Las muestras tomadas para la búsqueda del microorganismo, dependieron del tiempo post infección analizado. Los detalles se listan en la tabla III.2.

Las muestras de estómago, intestino delgado (ID) proximal, ID medio, ID distal y ciego, se tomaron por lavados de los mismos con 2 ml de PBS estéril. De estas muestras se realizaron enriquecimientos en caldo BHIG (9 ml) y búsqueda en placas de agar nutritivo con polimixina B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los caldos de enriquecimiento, fueron inoculados con 1 ml de los lavados.

La concentración de polimixina B utilizada no inhibió el desarrollo de *B. cereus* B10502.

Las muestras PP, NLM, bazo e hígado se colocaron en eppendorf estériles y tarados conteniendo PBS, de esta manera se calculó el peso del trozo de órgano a

analizar. Los eppendorf se colocaron en hielo hasta el momento de la disgregación. Para la disgregación en condiciones de asepsia se usó un equipo de disgregación (IKA T 10 basic, ULTRA-TURRAX®). Estas muestras se centrifugaron por 5 minutos a 600 g, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue lisado por el agregado de agua estéril. De estos lisados se tomaron 100 µl y se colocaron en placas con agar nutritivo adicionado con polimixina B (100 µg/ml).

Se tomaron de la última porción del intestino grueso de cada animal, entre 2 y 3 pellets de materia fecal. Dichos pellets se colocaron en eppendorf tarados estériles, conteniendo sacarosa 0,3 M, y se conservaron a -80°C hasta el momento de realizar el recuento de bacterias en placa.

Los tubos de caldo para enriquecimiento, se colocaron en agitación a 32°C por 16 horas y luego se sembraron placas de agar nutritivo con polimixina B.

Todas las placas fueron realizadas por duplicado, se incubaron a 32 °C y se observaron a las 16, 24 y 48 hs.

Tabla III.2. Muestras de ratones analizadas en el ensayo de localización de *B. cereus* B10502. Se representan las muestras analizadas con X y las no analizadas con ND. IDP: Intestino delgado proximal; IDM: Intestino delgado medio; IDD: Intestino delgado distal; MF: materia fecal; PP: placas de Peyer; NLM: nódulos linfáticos mesentéricos.

Órgano	30 min	2:30 hs	4:30 hs	20 hs	2 días	5 días	10 días
Estómago	X	X	X	X	X	ND	ND
IDP	X	X	X	X	X	ND	ND
IDM	X	X	X	X	X	ND	ND
IDD	X	X	X	X	X	ND	ND
Ciego	X	X	X	X	X	ND	ND
MF	X	X	X	X	X	X	X
Bazo	ND	ND	ND	ND	ND	X	X
PP	ND	ND	ND	ND	ND	X	X
NLM	ND	ND	ND	ND	ND	X	X
Bazo	ND	ND	ND	ND	ND	X	X
Hígado	ND	ND	ND	ND	ND	X	X

CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES CELULARES EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN

Estos análisis se realizaron sobre los animales infectados con 10^8 microorganismos/ratón.

Obtención de las poblaciones celulares

Luego del sacrificio, se extirparon placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y bazo para estudios de citometría de flujo. Los órganos se mantuvieron en PBS estéril y sobre baño de hielo hasta su procesamiento. Para su análisis, las células se extrajeron mediante disgregación mecánica de los órganos, se procedió a su lavado con PBS adicionado de suero fetal bovino (SFB) inactivado al 2 % (v/v) y se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 500 g) La disgregación mecánica se realizó mediante un dispositivo diseñado especialmente (Humen, 2009).

En el caso del bazo, las células se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y se mantuvieron durante 30 segundos con agitación, en estas condiciones se lisaron los glóbulos rojos, pasado este tiempo se adicionaron 9 ml de RPMI para restaurar las condiciones de tonicidad. Las células se obtuvieron por centrifugación y se resuspendieron en PBS adicionado de SFB inactivado al 2 % (v/v).

Se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer en cada suspensión celular obtenida de diluciones 1/100, 1/20 y 1/5 para células de bazo, NLM y PP respectivamente. Para calcular el número de células viables, el recuento se realizó usando una solución de azul tripán 0,04 % (v/v) en PBS.

Caracterización de diferentes poblaciones celulares

A partir de las células obtenidas como se indicó en el inciso anterior, se emplearon 3×10^5 células/tubo de citometría para proceder a la marcación de las siguientes poblaciones celulares:

- Poblaciones de linfocitos T: anti-CD4-FITC y anti-CD8-PE.
- Poblaciones de linfocitos B: anti-B220-FITC.
- Población de macrófagos: anti-F4/80-biotinilado más streptavidina-FITC.
- Población de células dendríticas: anti-CD11c-FITC.

Las marcaciones se realizaron en células de PP, NLM y bazo, para cada uno de los ratones.

Conjuntamente se evaluó la expresión de CD86 y MHC-II, usando anti-CD86-PE y anti-MHC-II-PE, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados con su respectivo fluorocromo fueron diluidos en PBS adicionado de SFB al 10 % (v/v), y usados en las concentraciones recomendadas por el fabricante (e-Bioscience, San Diego, EEUU). Para la marcación se colocaron 50 μ l de las diluciones de los anticuerpos sobre las muestras centrifugadas en tubos de citometría (Falcon, BD Biosciences) y se incubaron por 30 minutos en oscuridad y sobre un baño de hielo. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron dos veces con PBS adicionado de SFB al 2 % (v/v), y luego se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldeído (PFA) al 1 % en PBS para su fijación. Las muestras se conservaron a 4°C y al abrigo de la luz hasta su análisis por citometría de flujo.

Para cada órgano se prepararon controles de células sin marcar y células con simple marca cuando se trató de dobles marcaciones. Asimismo, se utilizaron los controles de isotipo correspondientes, de acuerdo con el origen de los anticuerpos usados.

Análisis por citometría de flujo

Para el análisis de las muestras se empleó un equipo FACScalibur (Becton Dickinson). Por cada muestra se adquirieron 10000 eventos. Como primer paso, se analizaron las células sin marcar para poder localizar las diferentes poblaciones y a su vez, para poder usarlas como controles negativos de marcación. En el caso de muestras con dobles marcas, se observaron previamente las simples marcaciones para poder realizar la compensación correspondiente. Por último se analizaron las muestras.

En la figura III.3 se muestra un esquema resumido del procesamiento de las muestras de los animales.

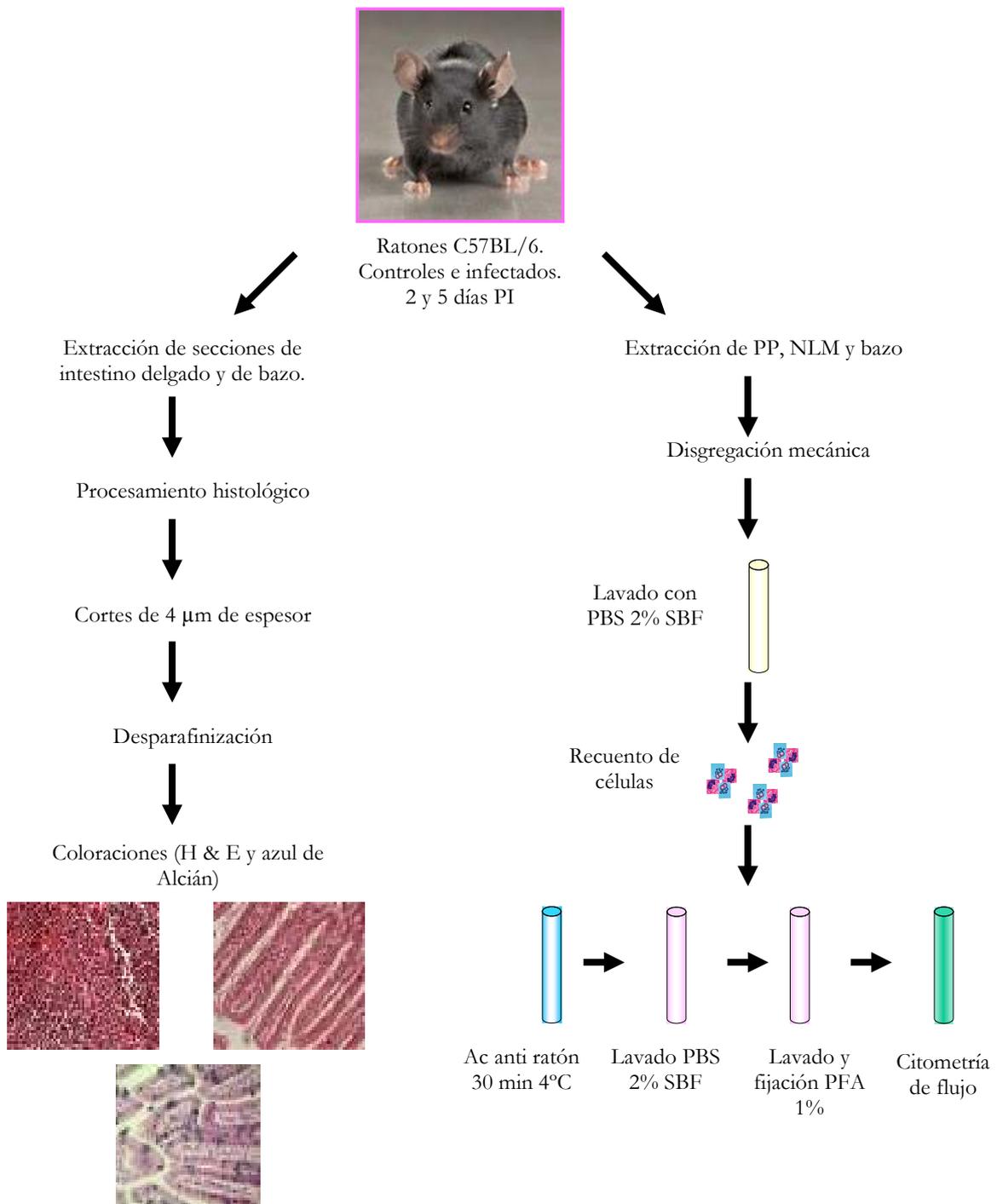


Figura III.3. Esquema del procesamiento de muestras de animales. Luego del sacrificio de los animales, se realizaron las necropsias y se extrajeron los órganos a analizar. Se realizaron histologías y análisis de poblaciones celulares por CF.

ESTUDIO DE CITOQUINAS EN LA INFECCIÓN CON *B. CEREBUS* B10502

Los ensayos de infección se realizaron de la misma manera explicada previamente, junto con las muestras tomadas para realizar histologías y recuento de microorganismos, se conservaron porciones de órganos para realizar análisis de citoquinas por PCR en tiempo real (RT-PCR). La dosis de infección estudiada fue 10^9 mo por ratón. Las muestras se tomaron luego de 2 y 5 días de realizada la infección y en un experimento posterior se tomaron muestras a los 2:30 hs, 4:30 hs, 20 hs, y 2 días post infección.

Para la realización de los análisis por RT-PCR, en el momento de la necropsia de los animales, se tomó un trozo de cada órgano a ser analizado. Se estudiaron en estos ensayos, PP y NLM.

Las muestras se colocaron en eppendorf tarados con buffer RA1 (GE Healthcare, Alemania) con β -mercapto etanol (RA1-2ME) y se ubicaron inmediatamente en hielo. Luego, se disgregaron en condiciones de asepsia. Las muestras se colocaron con este mismo buffer rápidamente a -80°C hasta el momento de realizar la extracción del RNA. La extracción del RNA se realizó usando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Alemania). La transcripción reversa se hizo usando random primers y MMLV-transcriptasa reversa (Invitrogen, EEUU). Al obtenerse el cDNA, éste fue conservado a -20°C hasta el momento del análisis. La RT-PCR se realizó según indicaciones del fabricante usando el iCycler thermal cycler (BioRad, EEUU). Los primers usados fueron diseñados con el software Primer Express (Applied Biosystem) y previamente utilizados (Rumbo *et al.*, 2004; Anderle *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2008). La normalización se realizó utilizando primers para β -actina. Los cálculos se realizaron según la diferencia ΔCt descrita por Rumbo y colaboradores (Rumbo *et al.*, 2004).

Las citoquinas analizadas fueron: IL-6, CXCL2, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ . Las secuencias de los primers se muestran en la tabla III.2. Todos los primers se obtuvieron de Genbiotech SRL (Argentina).

Tabla III.3. Secuencias de los primers utilizados. Se muestran las secuencias para los primers de las citoquinas: CXCL2, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 p40, INF- γ . Se utilizó el gen de β -actina como control interno. Bases nucleotídicas: A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina

GEN	SECUENCIA	REFERENCIA
CXCL2	CCCTCACAGGAAGAACCAAA CACATCAGGTACGATCCAGGC	Errea <i>et al.</i> , 2010
TNF- α	CATCTTCTAAAATTCGAGTGACAA CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	Roberts <i>et al.</i> , 2008
IL-6	GTCTCTGGGAAATCGTGGAAA AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	Roberts <i>et al.</i> , 2008
IL-10	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA TGCTCCACTGCCCTTGCTCTT	Rumbo, com. personal
IL-12p40	GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTC CACATGTCACTGCCCGAGAGT	Correa <i>et al.</i> , 2012
INF- γ	TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG TGCAGGATTTCATGTCACCAT	Correa <i>et al.</i> , 2012
β-Actina	CGTCATCCATGGCGAACTG GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	Rumbo <i>et al.</i> , 2004

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar. Los resultados se analizaron utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) a través del software InfoStat (Grupo InfoStat, Córdoba, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias significativas fueron establecidas mediante test t de student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

INFECCIÓN CON *B. CEREUS*

Los ratones fueron infectados con 100 μ l de *B. cereus* B10502 por vía intragástrica, con una dosis de 10^8 o de 10^9 mo por ratón. Al grupo control se le administraron de la misma manera, 100 μ l de PBS. Para los análisis histológicos o de poblaciones celulares por citometría de flujo, los sacrificios de los animales, fueron establecidos a los 2 y 5 días post-infección. Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ e inmediatamente luego del sacrificio, se procedió a la toma de las muestras para la realización de los diferentes análisis.

Efectos macroscópicos de la infección con *B. cereus*

Los animales no se encontraban con signos de enfermedad al momento del sacrificio. Macroscópicamente, en las necropsias de los animales, se pudo observar un agrandamiento de las placas de Peyer, el mismo fue aún mayor a los 5 días post infección (PI) que a los 2 días PI. La hepato o esplenomegalia no fue vista como signo constante en los animales infectados.

Se presentan fotografías de las necropsias en la figura III.4, donde se observó el efecto mencionado, estas fotografías se corresponden con la dosis infectiva de 10^9 microorganismos por ratón. De la misma dosis infectiva, se muestran en la figura III.5, porciones de intestinos sobre una escala milimetrada para comparar los tamaños de las PP. En estas fotografías se muestra también una porción de intestino de un ratón sacrificado a las 20 hs PI.



Figura III.4. Fotografías de la cavidad peritoneal de los animales. Se muestra un animal control y uno infectado. El animal infectado fue sacrificado luego de 5 días de la infección con B10502 en una dosis de 10^9 microorganismos por animal. Las flechas indican placas de Peyer.

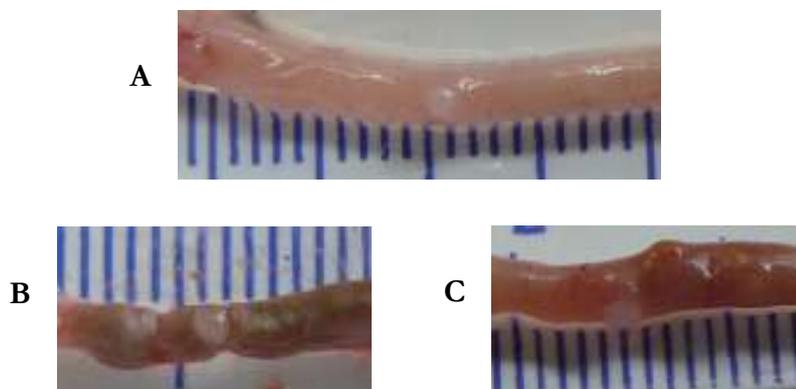


Figura III.5. Placas de Peyer en intestino de ratón. A: extraídos de animales control. B y C: extraídos de animales infectados con la cepa de *B. cereus* B10502. Los animales se infectaron con 10^9 microorganismos por animal y se sacrificaron a las 20 hs (B) y 48 hs (C) post infección.

Efectos de la infección en la estructura histológica

En la figura III.6 se pueden apreciar fotografías de cortes histológicos de intestino delgado coloreados con Hematoxilina-Eosina. Las microfotografías son representativas del efecto visto para la totalidad de los animales de los grupos control y a los cinco días post infección.

En los cortes histológicos de intestino delgado se analizaron, el engrosamiento de las vellosidades, la relación vellosidad/cripta y la celularidad de la *lamina propria*. Se pudo observar que la infección con *B. cereus* B10502, produjo un engrosamiento de las vellosidades a los 5 días PI (Figura III.6). No se observaron cambios en la relación vellosidad/cripta en las condiciones ensayadas.

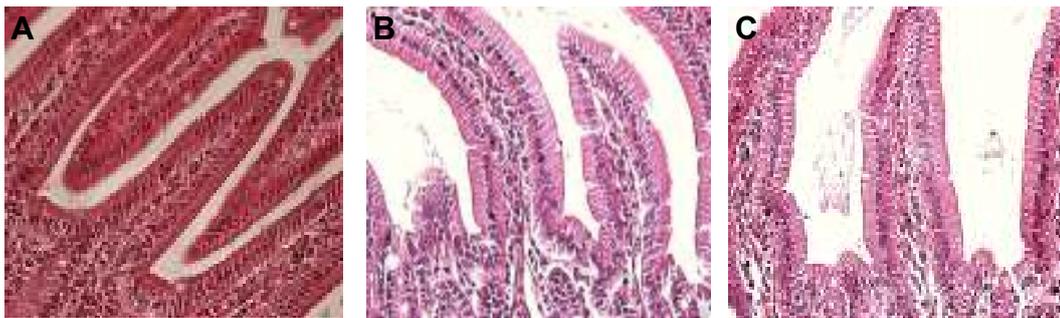


Figura III.6. Tinción con hematoxilina y eosina de intestino delgado. Se realizaron tinciones de H&E en intestino delgado. Las imágenes representan A: ratón del grupo control; B y C: ratón del grupo infectado con *B. cereus* B10502 en una dosis de 10^8 microorganismos por ratón a los 5 días post infección. Los cortes fueron observados con un aumento de 40X.

La figura III.7, muestra las microfotografías de cortes histológicos de bazo coloreados con Hematoxilina-Eosina luego de 5 días PI. Se observaron alteraciones en la arquitectura de este órgano. Se apreciaron agregados celulares en los bazos de animales infectados (marcados con flechas en la figura III.7), que no se encontraron para los bazos de animales del grupo control.

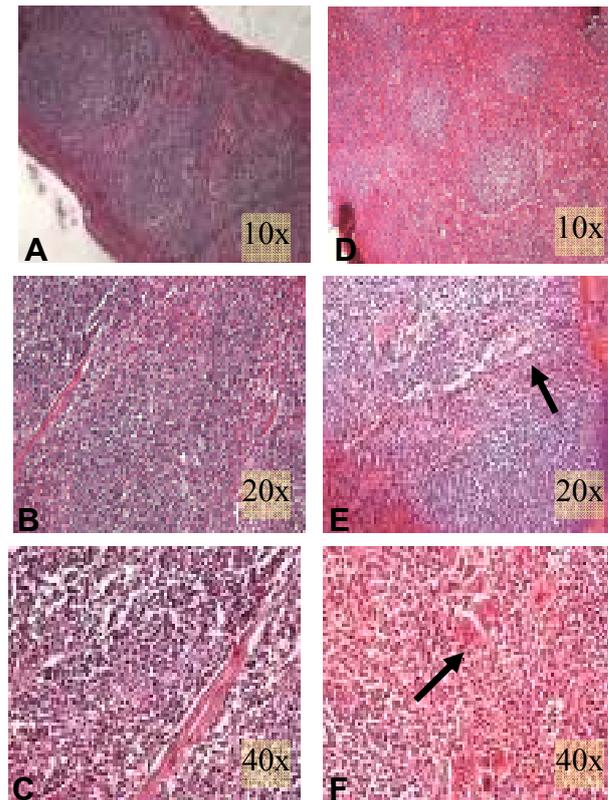


Figura III.7. Tinción con hematoxilina y eosina de bazo. Las microfotografías A, B y C representan bazos de ratones del grupo control; D, E y F, son representativas del grupo sacrificado a los 5 días de la infección con *B. cereus* B10502, en una dosis de 10^8 microorganismos por ratón.

Células caliciformes

Luego de la tinción con azul de Alcian de muestras de intestino, se realizó el análisis de las células productoras de mucus. En la figura III.8 se muestran microfotografías representativas. Se pudo observar un aumento del número de células caliciformes en los ratones infectados con *B. cereus* B10502 a los 5 días PI. La figura III.9, muestra el resultado de la cuantificación de células productoras de mucus. Se pudo observar un aumento significativo ($p < 0,005$) en el número de estas células en los animales infectados con *B. cereus* B10502 ($17,73 \pm 2,77$) con respecto a los del grupo control ($11,35 \pm 1,84$).

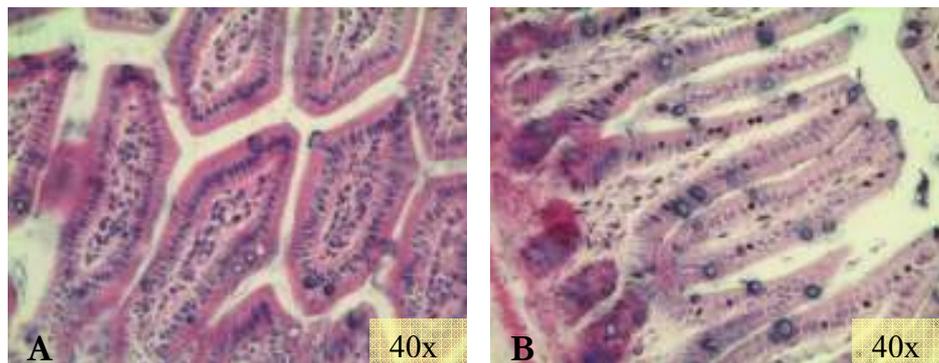


Figura III.8. Tinción con azul de Alcian en intestino delgado. Las microfotografías corresponden a intestinos del grupo control (A) y de animales infectados con *B. cereus* en una dosis de 10^8 microorganismos por ratón a los 5 días PI (B). Esta tinción permite diferenciar las células productoras de mucus que se visualizan en color azul.

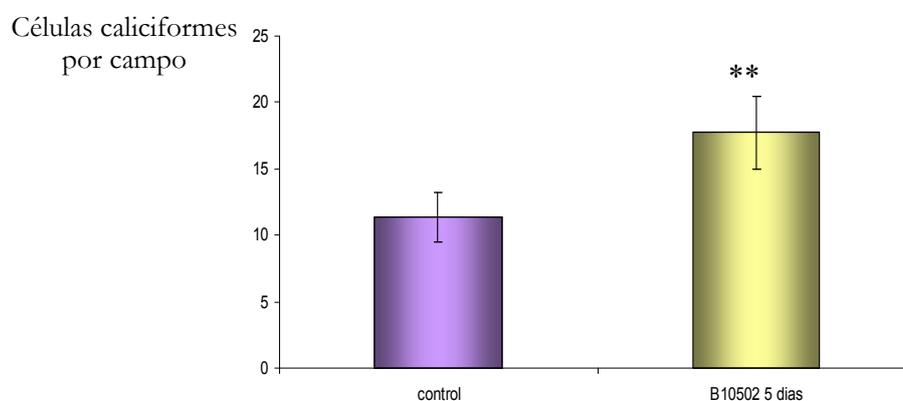


Figura III.9. Células productoras de mucus. El gráfico muestra el valor promedio de células caliciformes por campo, observado en 40X. Se representan los datos para animales control y para animales infectados con *B. cereus* en una dosis de 10^8 microorganismos por ratón a los 5 días PI. Los asteriscos representan una diferencia significativa (**: $p < 0,005$).

ANÁLISIS DE LOCALIZACIÓN DE *B. CEREBUS*

Con el fin de determinar el destino del microorganismo y para profundizar el conocimiento sobre los efectos en el modelo animal, se estudio la presencia de *B. cereus* en diferentes tejidos luego de la infección.

Se utilizaron ratones infectados con la cepa B10502 en una dosis de 1×10^9 microorganismos por ratón. Luego de los sacrificios, se realizó la extracción de los órganos en condiciones de asepsia.

Los tiempos analizados fueron, 30 min, 2:30 hs, 4:30 hs, 20 hs, 2 días, 5 días y 10 días. Se tomaron muestras de diferentes órganos de los animales y se realizaron recuentos directos en placas de agar nutritivo adicionado de polimixina B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y enriquecimientos en caldos BHIG. Lo mismo se hizo con las muestras de materia fecal. Las placas, realizadas por duplicado, se incubaron a 32 °C y se observaron a las 16, 24 y 48 hs. Cuando correspondió, se sembraron tubos de caldo para enriquecimientos. Los tubos se incubaron de la misma manera que las placas. Los caldos de enriquecimiento, fueron luego sembrados en agar nutritivo y llevados a 32°C por otras 24 hs.

Para la evaluación se seleccionaron las colonias desarrolladas en las placas que tuvieran las características macroscópicas de las colonias de *B. cereus*. A las colonias seleccionadas, se les efectuaron coloraciones de Gram, cuando fue necesario se realizaron nuevos aislamientos en agar nutritivo. En la figura III.10 se muestra un ejemplo del análisis de las muestras en placas de agar nutritivo. El ratón infectado presentó colonias con características compatibles con *B. cereus* (Figura III.10.A).

Se tomaron como positivos los casos en que se detectó la presencia de *B. cereus*, ya sea antes o luego del enriquecimiento. Los mismos procedimientos se hicieron para los ratones control, en estos animales no se encontraron microorganismos compatibles con la presencia de *B. cereus* administrada. Los datos se muestran en la tabla III.4.

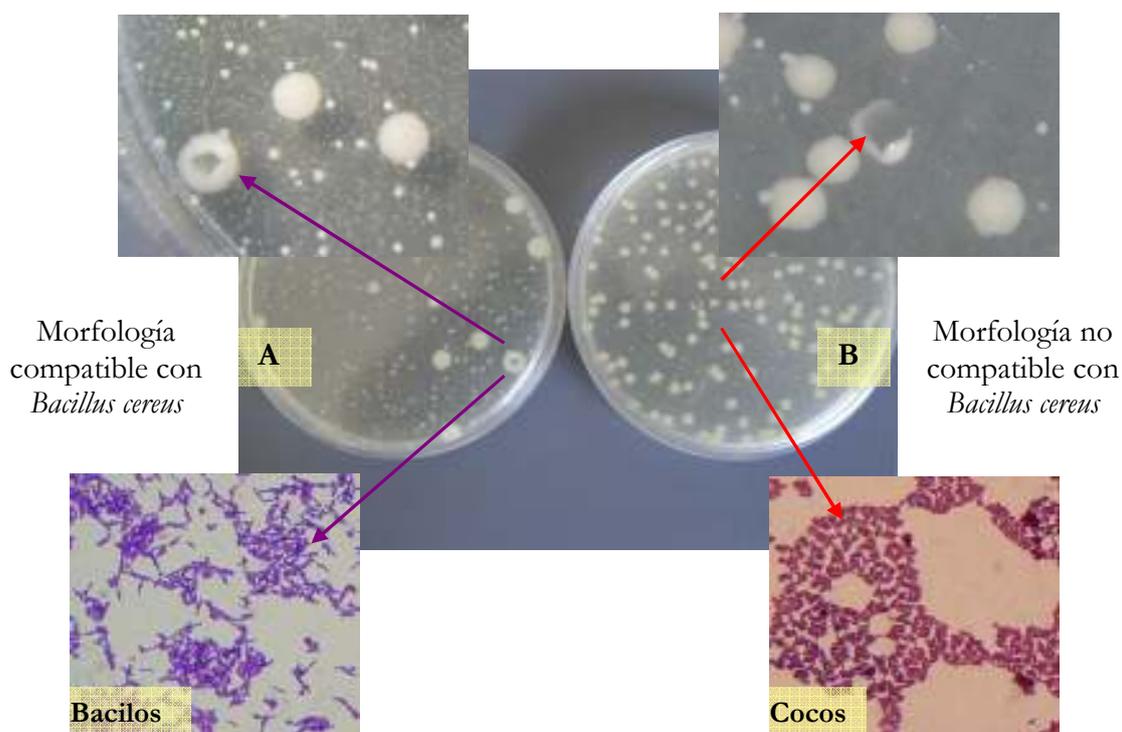


Figura III.10. Colonias pertenecientes a muestras de lavados de estómago. Las fotografías muestran las colonias que se encontraron para una muestra de estómago de ratón infectado (A) y de ratón control (B). Se muestra una ampliación de las colonias seleccionadas y sus respectivas coloraciones de Gram.

Tabla III.4. Presencia de *B. cereus* en diferentes tejidos y materia fecal de animales. Los signos + representan el hallazgo de *B. cereus* en el tejido o MF analizados. IDP: intestino delgado proximal; IDM: intestino delgado medio; IDD: intestino delgado distal. MF: materia fecal; PP: placas de Peyer; NLM: nódulos linfáticos mesentéricos; ND: No determinado.

Órgano	Tiempo post infección						
	30 min	2:30 hs	4:30 hs	20 hs	2 días	5 días	10 días
Estómago	+	+	-	-	-	ND	ND
IDP	+	+	+	-	-	ND	ND
IDM	+	-	+	-	-	ND	ND
IDD	-	+	+	-	-	ND	ND
Ciego	ND	ND	+	-	-	ND	ND
MF	ND	ND	+	-	-	-	-
Bazo	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
PP	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
NLM	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Bazo	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
Hígado	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

EFFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE EL BALANCE DE POBLACIONES CELULARES

Estudio de células CD4+ y CD8+

En la figura III.11 se muestra un ejemplo representativo de los pasos seguidos en el análisis de los datos de la marcación de la población linfocitaria por citometría de flujo. A modo de ejemplo se muestra el análisis de células provenientes de NLM, pero el procedimiento es equivalente para todos los órganos en estudio. En un primer paso, se procede a seleccionar la población de linfocitos en un gráfico SSC-H *vs* FSC-H, esta población se representa en una región R1. Sobre esta región R1, se realizó el análisis poblacional de linfocitos CD4+ y CD8+. Para poder hacer esta selección correctamente, se analizaron en un primer paso muestras sin marcar y muestras con simple marca. De esta forma se seleccionaron las zonas positivas y negativas para cada marca en gráficos de FL1 *vs* FL2. Finalmente se analizaron las muestras marcadas con anticuerpos anti CD4 (FITC) y anti CD8 (PE).

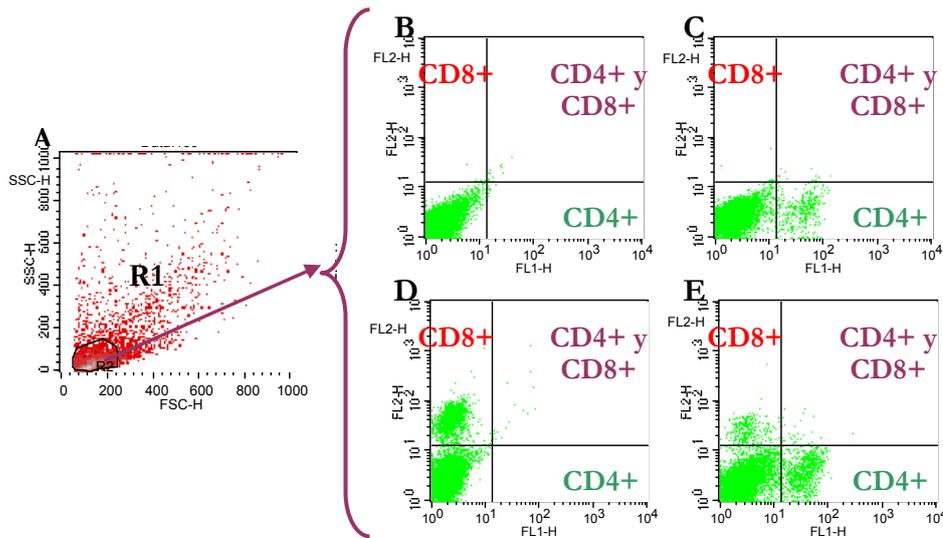


Figura III.11. Marcación de CD4 y CD8. Se analizó la expresión de CD4 y CD8 por CF en muestras de PP, NLM y bazo. Los gráficos mostrados corresponden a una muestra de NLM. La figura A muestra la región de linfocitos (R1). Se utilizaron, un anti CD4 - FITC (FL1) y un anti CD8 - PE (FL2). Los análisis de las marcaciones se realizaron sobre la población de R1. De B a E se muestran gráficos de FL1 *vs* FL2. En B se representa una muestra sin marcar, en C marcada sólo con anti CD 4 FITC, en D marcada sólo con anti CD8 PE y en E un ejemplo de muestra con ambas marcas.

La infección de los animales por la cepa *B. cereus* B10502 (10^8 microorganismos por ratón), indujo un incremento significativo ($p < 0,05$) de la población de linfocitos CD8+ en el bazo, a los 2 días PI, este incremento no fue significativo en el grupo 5 días PI. Cuando se analizó esta población celular en las células extraídas de los NLM, se pudo ver un descenso del porcentaje de linfocitos CD8+ en los ratones infectados a los 5 días PI ($p < 0,05$). Al analizar este marcador en las células obtenidas de las placas de Peyer, no se observaron diferencias entre el grupo control y los grupos infectados. Los datos se muestran en la tabla III.5.

El análisis de la población de linfocitos T CD4+, no mostró cambios en el porcentaje de esta población celular entre los grupos infectados y control, para ninguno de los órganos estudiados (Tabla III.6).

No se produjeron cambios significativos en la relación CD4+ : CD8+ en los tejidos y tiempos analizados.

Tabla III.5. Población de linfocitos CD8+ en los diferentes tejidos. Los datos representan los valores de cada grupo de animales. El análisis se realizó por CF. (*: $p < 0,05$)

Tejido	Control	2 días PI	5 días PI
PP	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,2
NLM	31,7 ± 6,1	24,7 ± 6,6	20,4 ± 5,6*
Bazo	12,3 ± 1,1	16,3 ± 2,2*	14,8 ± 2,5

Tabla III.6. Población de linfocitos CD4+ en los diferentes tejidos. Los datos representan los valores de cada grupo de animales. El análisis se realizó por CF. (*: $p < 0,05$)

Tejido	Control	2 días PI	5 días PI
PP	8,2 ± 2,8	5,5 ± 0,9	7,4 ± 2,4
NLM	19,7 ± 3,9	21,9 ± 2,9	21,9 ± 4,4
Bazo	5,6 ± 1,3	6,6 ± 1,4	6,7 ± 1,6

Estudio de células B220+ y de la expresión de MHC

La sub-población de células B220 +, se corresponde principalmente con los linfocitos B. Resulta de importancia el análisis de la expresión de MHC-II en la superficie de estas células, ya que tienen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos ante los linfocitos T.

De la misma manera que para la población de linfocitos CD4 y CD8, el análisis se realizó sobre una región que contiene a los linfocitos. De esta manera no se tuvieron en cuenta para el análisis las células no linfocíticas. La región se

representa como R1 en la figura III.12. Sobre esta población seleccionada, y para cada muestra, se realizaron los gráficos de FL1 *vs* FL2. Los eventos positivos para FL1 representa la marcación con anti B220 que se encuentra conjugado a FITC y FL2 representa la marcación con anti MHC-II que se encuentra marcada con PE. Se seleccionó la población B220 + que expresaba MHC-II (R2). Sobre la población que resulta de la intersección de ambas regiones, se realizó un histograma para FL2, de manera de poder discriminar entre las células con expresión alta de MHC-II (MHC-II^{high}) y las de expresión baja (MHC-II^{low}) (Figura III.12).

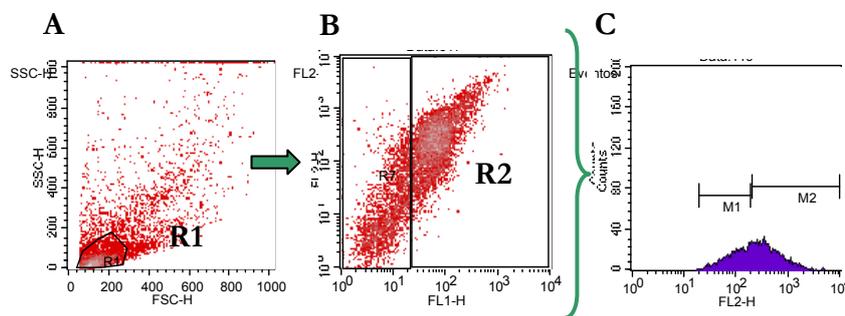


Figura III.12. Análisis de la expresión de MHC-II en células B220+. Se seleccionó la población de linfocitos mediante una región R1 en el gráfico SSC-H *vs* FSC-H (A). Sobre esta población celular, se seleccionó mediante un gráfico FL1 *vs* FL2, la población de células B220 + que expresaban MHC-II (R2 en B). Un histograma realizado sobre las células pertenecientes a R1 y R2, permitió discriminar entre células con alta (M2) y baja (M1) expresión de MHC-II.

En placa de Peyer no se observaron diferencias en la expresión de este marcador para las células B220+ al comparar los grupos infectados con el grupo control.

Se pudo ver, que la infección con *B. cereus* B10502, indujo en los NLM, un leve incremento en el porcentaje de células B220+/MHC-II+ respecto al control, para ambos grupos infectados, siendo mayor el incremento para el grupo de 2 días PI.

Se observó una disminución significativa de la expresión de MHCII en la población de células B220 + para el bazo en el grupo de ratones de 5 días PI. (Tabla III.7).

No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) al analizar la expresión de MHC-II high y low en las muestras.

Tabla III.7. Población de linfocitos B MHC-II positivos. Los datos representan los valores de cada grupo de animales. El análisis se realizó por CF. (*: $p < 0,05$)

Tejido	Control	2 días PI	5 días PI
PP	67,9 ± 3,2	62,4 ± 4,4	67,1 ± 3,5
NLM	33,8 ± 5,3	42,5 ± 9,9	36,8 ± 10,3
Bazo	46,4 ± 3,8	45,3 ± 2,5	35,0 ± 4,6*

Expresión de MHC-II en la población macrófaga

La capacidad de las células macrófagas para actuar como presentadoras de antígenos, se puede evaluar por los niveles de expresión de moléculas de MHC-II en su superficie. Se definieron diferentes sub-poblaciones celulares según la capacidad de expresar MHC-II. Expresión de MHC-II^{high} para una expresión elevada de estas moléculas y expresión de MHC-II^{low} cuando se trata de una expresión más débil.

El esquema presentado en la figura III.13, ejemplifica los pasos en el análisis de datos. Se muestran células provenientes de placa de Peyer, pero el procedimiento es equivalente para todos los órganos en estudio. Se seleccionó una región de células R1 sobre un gráfico SSC-H vs FSC-H. Sobre esta región se realizó el análisis poblacional de células F4/80+. En los experimentos se utilizó un anti F4/80 conjugado a FITC (FL1-H). Para esto sobre la población de R1, se realizó un análisis en un histograma para FL1 y se tomaron como positivos los eventos en M1 en la figura III.13.C.

Se realizó una región en el Gráfico FL1 vs FL2, llamada R2, que representó a las células que resultaron positivas para el mismo marcador (F4/80) (Figura III.13.B). De la población que resulta de la unión de R1 y R2, se analizaron los porcentajes de expresión de MHC-II (FL2-H), en un histograma (Figura III.13.D). En los ensayos se utilizó un anti MHC-II conjugado a PE. En el histograma, M1 representa el porcentaje de MHC-II^{low} y M2 el porcentaje de MHC-II^{high}. Como en cada análisis de marcadores por citometría de flujo, se analizaron en un primer paso, células sin marcar y células con simple marca, estos primeros análisis permiten una correcta selección de las regiones a analizar.

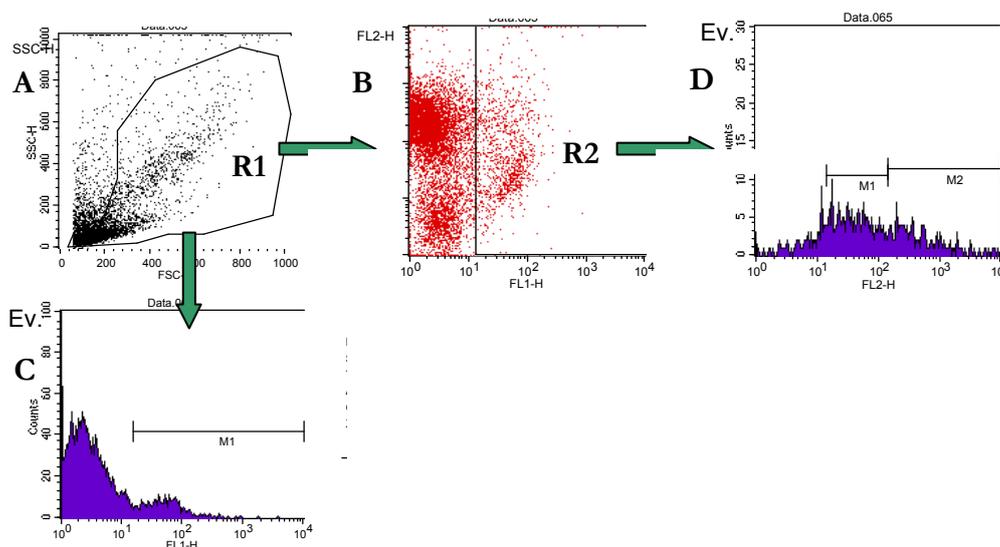


Figura III.13. Expresión de MHC-II en células F4/80 +. Se muestran células obtenidas de PP. Población a analizar región R1 (A). Sobre R1 se analizan los eventos + para F4/80 y se seleccionan como R2 (B). Sobre los eventos que pertenecen a R1 y R2 se realizó el análisis de la expresión de MHC-II con expresión alta (M2) y baja (M1) como se muestra en D. En C se muestra un histograma realizado sobre la población en R1 para seleccionar los eventos F4/80+ (M1)

En los animales infectados con *B. cereus* B10502, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de células F4/80+ en placa de Peyer para el grupo de 2 días PI.. En los ratones del grupo de 5 días PI, no se apreció un

aumento de la población F4/80+ en las placas de Peyer, sin embargo, se pudo ver un cambio en la expresión de la molécula MHC-II. En esta población la expresión de MHC-II estuvo incrementada a expensas del MHC-II^{high} ($p < 0,05$).

En el caso de las células aisladas de los NLM, se apreció un incremento de células que expresaban F4/80 en su superficie para el grupo de 5 días PI aunque la diferencia no fue significativa ($p = 0,1$). Se apreció que el aumento de MHC-II en el grupo de 5 días PI, fue a expensas de la expresión de MHC-II^{low} ($p = 0,07$).

Para el bazo, la población de células F4/80+ no se vio alterada en ninguna condición de infección pero para los animales del grupo de 5 días PI, la expresión de MHC-II^{high} en las células F4/80+, estuvo aumentada significativamente ($p < 0,05$). Los resultados se representan en la figura III.14.

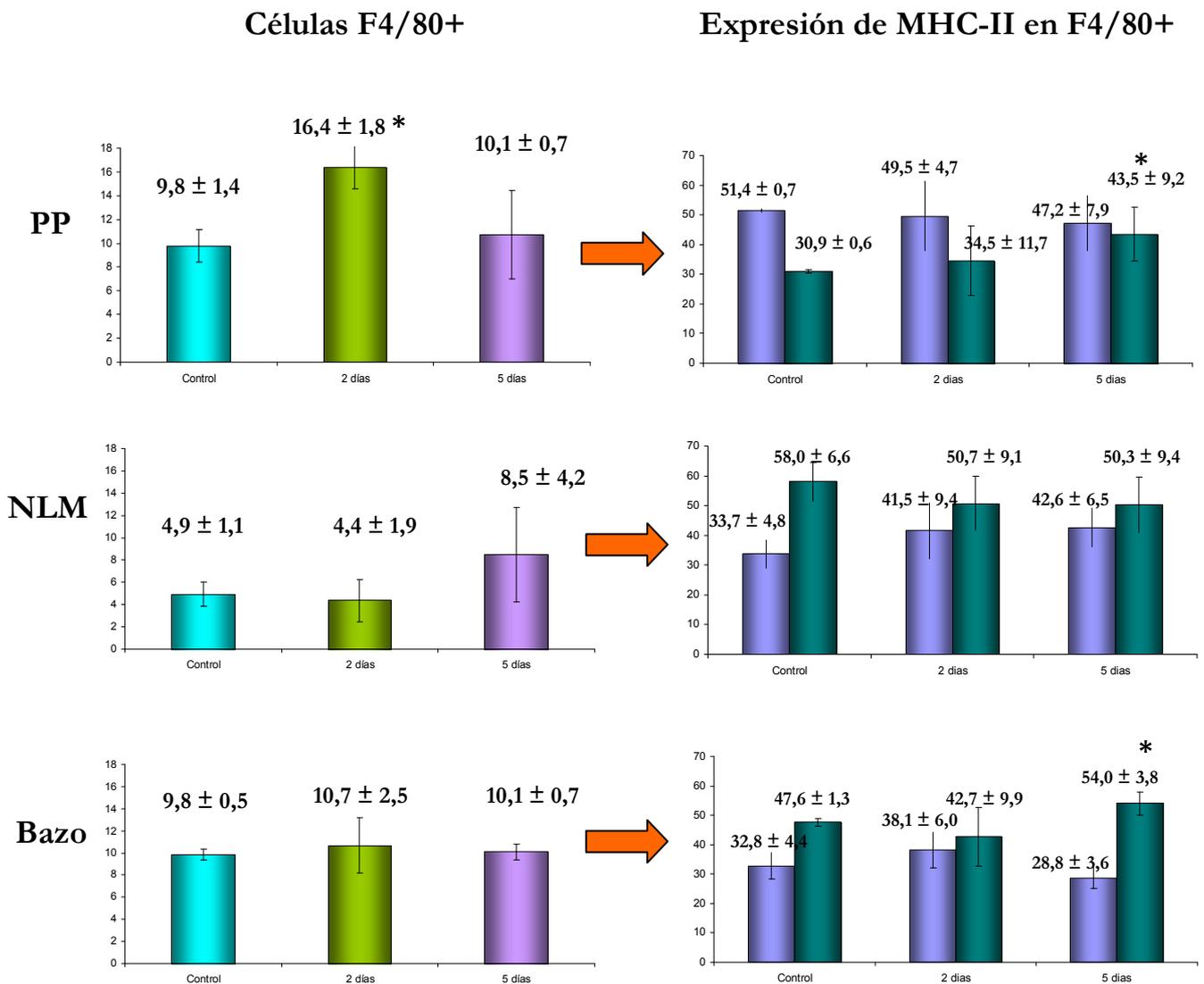


Figura III.14. Porcentaje de macrófagos (F4/80+) y expresión de MHC-II en ratones infectados con la cepa B10502. Se representan los porcentajes de macrófagos para cada tejido analizado. Sobre la población de F4/80+ se analizaron los porcentajes de expresión de MHC-II^{low} y MHC-II^{high}. (*: p<0,05).
 2 días: células extraídas de ratones de 2 días post infección.
 5 días: células extraídas de ratones de 5 días post infección.

MHCII^{low}
 MHCII^{high}

Estudio de la población de células dendríticas y de la expresión de CD86

Las células dendríticas de ratón, expresan CD11c en su superficie. Tienen la capacidad de actuar como células presentadoras de antígenos. Esta capacidad no sólo se ve reflejada por la expresión de las moléculas de MHC-II en su superficie, también expresan moléculas co-estimuladoras. Dos de estas moléculas, que intervienen en la activación de linfocitos T por parte de las células dendríticas, son B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) (Abbas y Lichtman, 2004). Es por esto, que en la población celular que resultó positiva para el marcador CD11c, se estudió la expresión de la molécula B7-2 (CD86). En los ensayos realizados, se utilizó un anti CD11c conjugado a FITC (FL1) y un anti CD86 conjugado a PE.

En la figura III.15 se muestra cómo se seleccionó la región de células para el estudio. Se realizaron los mismos controles que en los ejemplos de análisis de otras poblaciones celulares.

En un primer paso se selecciona la región de análisis, mostrada como R1 en la figura III.15. Sobre esta población se analizaron los eventos positivos para FL1 (CD11c) en un gráfico FL1 *vs* FL2. Luego sobre una población seleccionada como CD11c + en este gráfico, se analizó la expresión de CD86. En el caso de analizarse células de placas de Peyer y NLM, se quitaron del análisis las células en la región marcada como R3 en la figura III.15. Estas células, presentaron muchos eventos en esa región, aún en ausencia de marcación, lo que indicó una alta auto fluorescencia. Para las células extraídas de bazo, no se apreció autofluorescencia, por lo cual la expresión de CD86, se analizó en los eventos pertenecientes a R1 y R2. El análisis de la expresión de CD86 sobre células dendríticas, se realizó mediante histogramas en FL2.

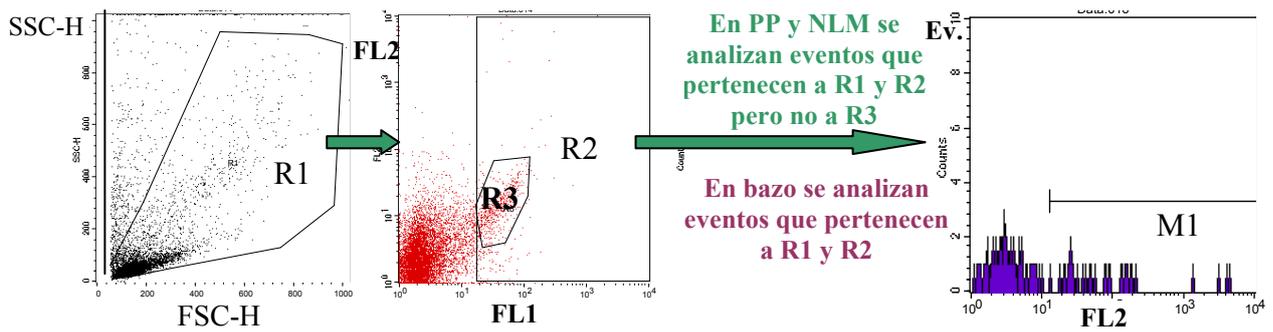


Figura III.15. Análisis de células CD11c+ y de la expresión de CD86. En el gráfico SSC-H vs FSC-H se seleccionó la población a analizar (R1). Sobre esa población, se seleccionaron los eventos CD11c+ mediante un gráfico FL1 vs FL2. Para PP y NLM, sobre las células que pertenecen a R1 y R2 pero no a R3, se seleccionaron los eventos positivos para CD86 (FL2) en un histograma. Para las células de bazo, el análisis de expresión de CD86 se realizó sobre R1 y R2.

La infección con *B. cereus* B10502, no indujo modificaciones en el porcentaje de células CD11c+. Esta población se situó alrededor del 3,5 % en las PP y alrededor del 2 % en NLM y bazo, para todas las condiciones analizadas.

En lo que respecta a la expresión de CD86, en las células extraídas de placas de Peyer no se apreciaron modificaciones significativas (Tabla III.8). En cambio, en las células extraídas de los nódulos linfáticos mesentéricos a los 5 días post-infección, se observó una tendencia hacia una disminución de la expresión de esta molécula co-estimuladora ($p=0,07$) (Tabla III.8). En el bazo, se observó que estuvo disminuida significativamente la expresión de CD86 para los ratones del grupo 2 días PI ($p<0,05$).

Tabla III.8. Expresión de CD86 en células dendríticas. Se presentan los valores de expresión en porcentajes calculados como se explicó en el texto. (*: $p<0,05$).

Tejidos	Control	2 días PI	5 días PI
PP	23,5 ± 11,2	19,7 ± 5,3	32,3 ± 14,3
NLM	54,1 ± 12,4	47,72 ± 1,9	37,5 ± 14,3
Bazo	43,3 ± 1,3	34,2 ± 1,3*	44,7 ± 3,0

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS POR RT-PCR

Como paso siguiente en el estudio de la infección, se decidió analizar el perfil de citoquinas que se secretaban como parte de la respuesta inmune. Para estos análisis se utilizó una PCR en tiempo real (RT-PCR) y se analizaron los RNAm de algunas citoquinas que pudieran ser relevantes en el contexto de la infección.

Las citoquinas liberadas en respuesta a patógenos, incluyen IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . Las quimioquinas atraen células a los sitios de infección, entre las células atraídas se encuentran los neutrófilos, monocitos, y otras células efectoras. Entre estas quimioquinas se encuentran CXCL8 (inicialmente conocida como IL-8) y CXCL2. CXCL2 resulta también conocida como MIP2- α y Gro β , y es muy similar en su secuencia de aminoácidos a CXCL1.

Luego de la infección con 10^9 microorganismos por ratón, junto con las muestras tomadas para el estudio de localización de microorganismos, se guardaron porciones de órganos para realizar análisis de citoquinas por RT-PCR. Se analizaron los tiempos 2:30 hs, 4:30 hs, 20 hs, 2 días y 5 días PI. Las citoquinas analizadas fueron las siguientes: IL-6, CXCL2, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ . Para la realización de los cálculos, la normalización fue realizada utilizando primers para β -actina. Cada gen fue referido al valor del mismo gen del grupo control. Los resultados se enunciaron como expresión relativa de RNAm para cada citoquina analizada.

Se vio un leve aumento de IL-12, TNF- α para las muestras obtenidas de NLM a las 20 hs y 2 días PI. En el caso del INF- γ , el valor a los 2 días PI resultó significativamente mayor ($p < 0,05$). Para las muestras obtenidas de PP, en los tiempos y las muestras analizadas, se observaron expresiones relativas de RNAm que resultaron menores a la unidad al referirlo al control. Se han observado en algunos casos, animales con altos valores de expresión, pero la distribución del conjunto presentó una alta dispersión.

Se muestran los valores de expresión de RNAm para las diferentes condiciones analizadas en las figuras III.16 y III.17.

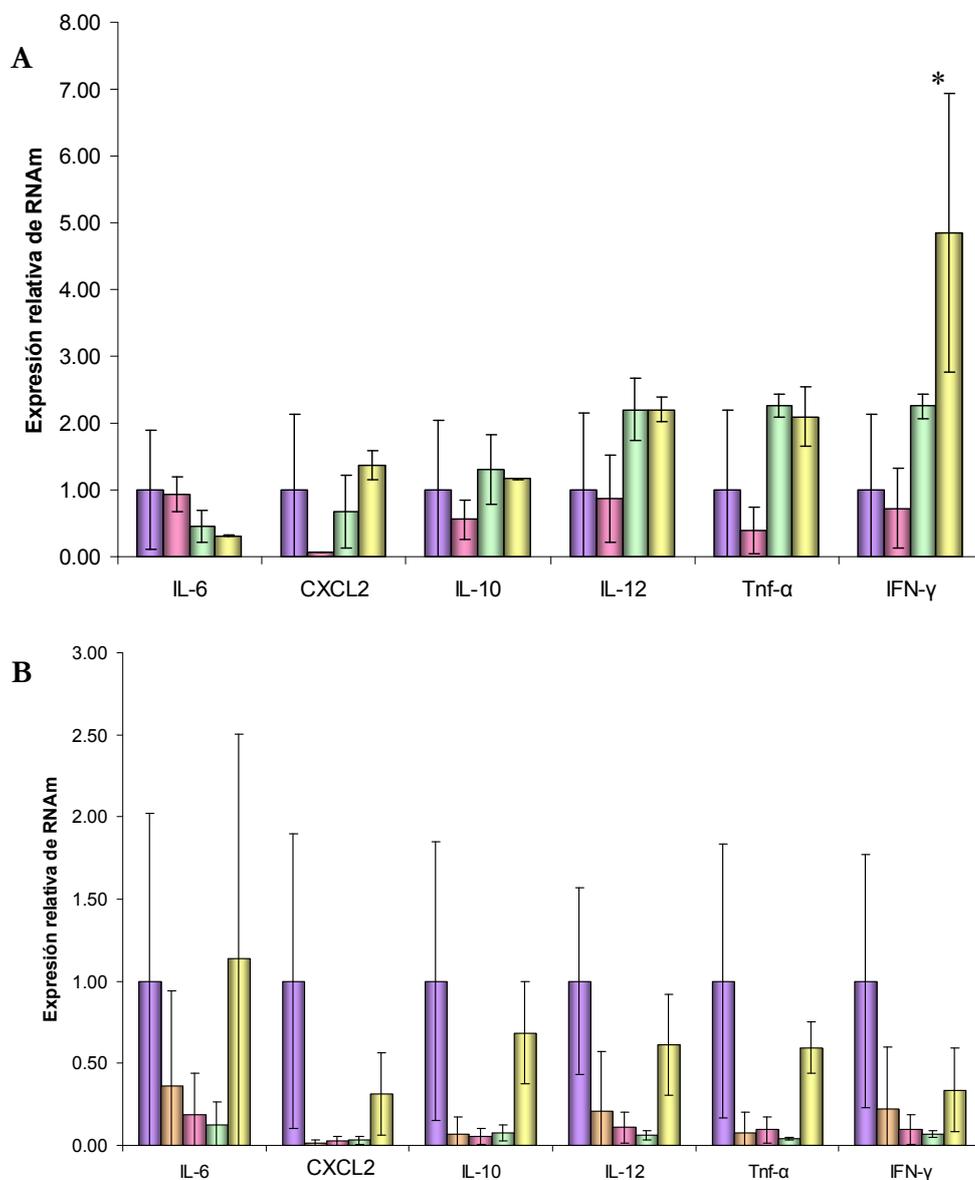


Figura III.16. Expresión relativa de RNAm hasta las 48 hs post infección. Se muestra la expresión relativa del RNAm de las citoquinas estudiadas en la infección con *B. cereus* B10502 (10^9 microorganismos por ratón). En la figura A se muestran los valores obtenidos para NLM y en la figura B los valores obtenidos para PP. A continuación se encuentran las referencias de cada color. Las escalas difieren entre los gráficos, para permitir la visualización de los cambios.

Control
 2:30 horas
 4:30 horas
 20 horas
 48 horas

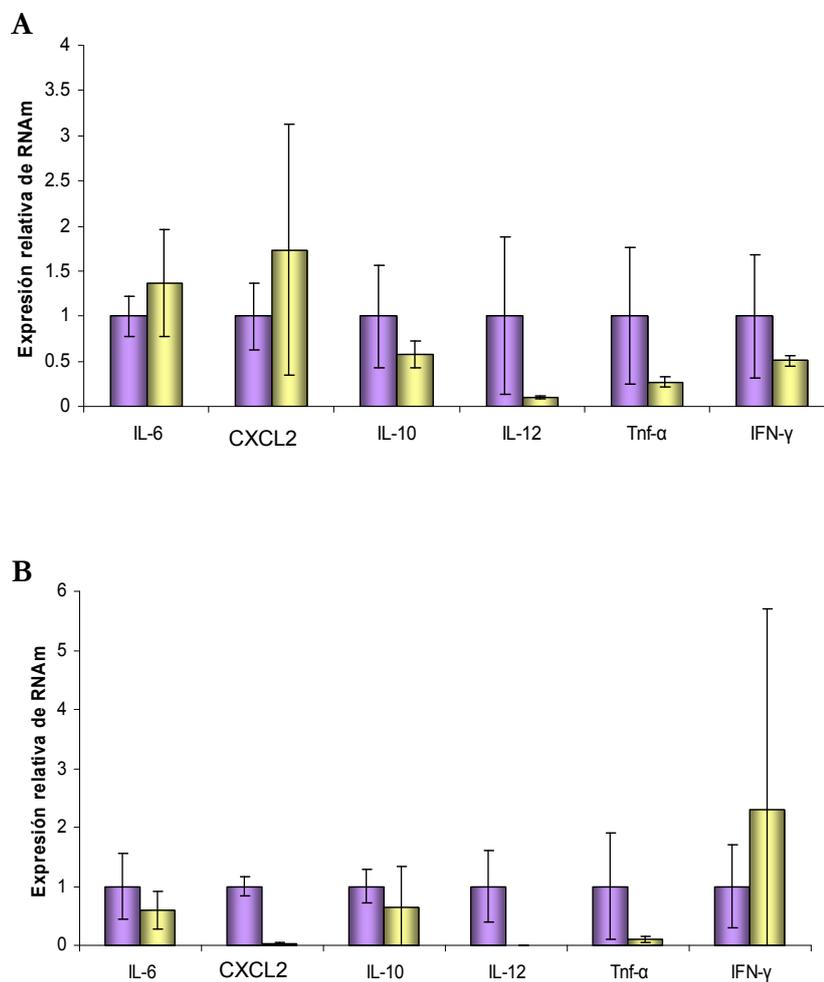


Figura III.17. Expresión relativa de RNAm a los 5 días post infección. Se representa la expresión relativa de RNAm de cada citoquina analizada para la infección con B10502 en una dosis de 10^9 microorganismos por ratón. El gráfico A pertenece a muestras de NLM a los 5 días PI. B representa los valores para muestras de PP a los 5 días PI.

■ Grupo control

■ Grupo infectado con B10502

DISCUSIÓN

En este capítulo de tesis se analizaron los efectos de *B. cereus* en un modelo murino de infección. Se estudió la estructura de la mucosa intestinal mediante coloraciones histológicas, como así también los cambios en la estructura histológica de otro órgano relevante frente a la respuesta en una infección, el bazo. Se analizó el balance de células inmunes en respuesta a la infección en diferentes sectores de la mucosa intestinal, en nódulos linfáticos mesentéricos y en el bazo. Asimismo, se estudió la expresión de citoquinas involucradas en las respuestas inmunes.

Entre las afecciones intestinales que puede causar *B. cereus* en el hombre, se encuentran el síndrome emético y diarreico. La capacidad de adhesión al epitelio, así como la habilidad de muchas cepas de invadirlo (Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007) podrían ser factores asociados al síndrome diarreico, además de los factores exocelulares. Debido a que las enterotoxinas son producidas en el intestino por las formas vegetativas de esta bacteria (Andersson *et al.*, 1998) y que un porcentaje de estas formas es capaz de resistir el ambiente gastrointestinal (Wijnands *et al.*, 2009), nuestro trabajo se centró en un modelo de infección usando el microorganismo en su forma vegetativa.

En general las afecciones gastrointestinales causadas por *B. cereus* se autolimitan y solo requieren reposición hídrica, por lo que resulta ser una patología poco declarada. Sin embargo se han descripto varios casos de víctimas fatales por intoxicaciones alimentarias causadas por este microorganismo (Dierick *et al.*, 2005; Naranjo *et al.*, 2011).

La cepa de *B. cereus* utilizada en este capítulo presenta relevante importancia epidemiológica, ya que fue aislada de un brote de toxoinfección alimentaria. En estudios previos, se demostró que *B. cereus* B10502 produce daño celular a células Caco-2, lo cual es atribuido principalmente a su adhesión a las células (Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007).

La superficie del tracto gastrointestinal debe proteger al huésped de microorganismos dañinos y a la vez debe permanecer permeable para la absorción de nutrientes. El epitelio intestinal forma una barrera física muy eficiente, donde las células epiteliales se encuentran polarizadas y unidas por uniones estrechas, actuando a modo de barrera. A esto se suma la producción local de mucus que ayuda a reducir el contacto directo de los microorganismos con el epitelio y forma un microambiente degradativo. Por otro lado también son secretados agentes antimicrobianos, como las defensinas y la IgA. Las células epiteliales actúan también detectando microorganismos presentes en el intestino, junto a las células M que se especializan en la captación transepitelial de antígenos. Estas células se encuentran íntimamente ligadas con los tejidos linfoides asociados a mucosas y se las encuentra mayoritariamente en las placas de Peyer. Las células dendríticas (CD) constituyen un importante componente de la *lamina propria* y se ha demostrado que censan el contenido intestinal a través de extensiones de su citoplasma (Rescigno *et al.*, 2001).

Debido al alto número de microorganismos en el intestino, que incluye tanto microorganismos comensales como patógenos, resulta importante la diferenciación en cuanto a la respuesta generada para evitar inflamaciones innecesarias. Al igual que los patógenos, los microorganismos comensales expresan patrones moleculares que permiten su reconocimiento a través de receptores del tipo Toll.

En las placas de Peyer, las CD inducen la activación de linfocitos para generar una respuesta adecuada según el antígeno. Las CD intestinales pueden transportar un bajo número de bacterias comensales vivas, lo que les permite inducir selectivamente IgA para proteger al huésped de la entrada de estos microorganismos a través de la mucosa. Estas CD se encuentran restringidas a los compartimentos inductivos de la mucosa intestinal por los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) (Macpherson y Uhr, 2004). Si en lugar de ser reconocidos por las CD, los microorganismos comensales son fagocitados por los macrófagos

presentes en la *lamina propria*, estos microorganismos resultan rápidamente eliminados (Macpherson y Uhr, 2004).

En el caso de los microorganismos patógenos intestinales, estos pueden alcanzar otros órganos. Cuando el patógeno puede atravesar la mucosa, se encuentra con macrófagos y CD, con los cuales genera un contacto directo. El reconocimiento por las CD también se logra a través de extensiones del citoplasma de las CD, siendo ésta otra probable vía de entrada del microorganismo a través del epitelio. Así las bacterias resultan transportadas desde el tracto gastrointestinal a los NLM (Serbina *et al.*, 2008). Macpherson y Uhr, mostraron en un modelo murino de infección, que *Salmonella typhimurium* viables alcanzaban los NLM dentro de macrófagos. Inclusive fueron capaces de localizarla en bazo (Macpherson y Uhr, 2004).

El bazo es un órgano linfoide que no posee una conexión directa con el sistema linfático, y toma los antígenos de la sangre; así esta involucrado en las respuestas inmunes. Presenta una estructura similar a los nódulos linfáticos. Contiene una estructura interna con centros germinales T y B, por lo cual esta implicado en la inmunidad tanto celular como humoral. En la pulpa roja se encuentran los eritrocitos: esta zona cumple una función de filtración mecánica de la sangre. Los linfocitos se encuentran rodeando las arteriolas formando áreas aisladas llamadas pulpa blanca, que tiene funciones inmunes. En la pulpa blanca se encuentran las vainas linfáticas periarteriolas, que contienen linfocitos T, y los folículos linfoides que contienen linfocitos B. Una zona llamada zona marginal rodea los folículos que contiene unos pocos linfocitos T, presenta macrófagos y también una clase de linfocitos B no circulantes.

Debido a lo expuesto anteriormente, en el estudio de la infección con *Bacillus cereus* en un modelo murino, los análisis de las variaciones poblacionales relacionadas con una respuesta inmune, se realizaron en PP, NLM y bazo.

Como se ha mencionado previamente, el género *Bacillus* incluye varias especies que están estrechamente relacionadas. Mucha de la información usada para diferenciar entre las especies *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, se basaba en características fenotípicas y pruebas bioquímicas. Sin embargo, y principalmente debido a la transferencia horizontal de información genética, resulta muy difícil la identificación, ya que muchos marcadores se encuentran codificados en plásmidos (Helgason *et al.*, 2000). Helgason y colaboradores, demostraron que *B. anthracis* se encuentra genéticamente muy relacionado a *B. cereus*, y *B. thuringiensis*, que usualmente se podrían considerar como no patógenos o inclusive beneficiosos. Sin embargo, la transferencia horizontal de plásmidos, podría cambiar sus características.

Existen publicaciones de casos clínicos donde afecciones que típicamente parecían debidas a *B. anthracis*, resultaban ser causadas por *B. cereus*, portador de un plásmido de virulencia similar a pXO1 de *B. anthracis* (Wright *et al.*, 2011). Al respecto, se ha publicado un trabajo en el cual se ha reportado una infección en chimpancés con características de infección aguda por ántrax. En el mismo se ha descrito el hallazgo del bacilo en todos los tejidos, y utilizando PCR en tiempo real se confirmó la presencia de marcadores de *B. anthracis*. Sin embargo, estos aislados diferían fenotípicamente de este microorganismo. Fue así que se secuenció el genoma de uno de los aislados, y se encontró que estaba íntimamente relacionado a *Bacillus cereus* aunque conteniendo los dos plásmidos de virulencia de *B. anthracis* (Klee *et al.*, 2010). El descubrimiento de que otras especies de *Bacillus* además de *B. anthracis* puedan causar afecciones del tipo ántrax, demuestra la adquisición natural de ambos plásmidos de *B. anthracis* por parte de *B. cereus* (Salter, 2011).

No se han descrito hasta el momento modelos *in vivo* de la infección con *Bacillus cereus*. La gran mayoría de los estudios con modelos *in vivo* para el género *Bacillus* se encuentran para el patógeno *B. anthracis* y principalmente para su forma esporulada. Más aún, los modelos de infección más utilizados son a través de

inyecciones intravenosas, intraperitoneales, intraepiteliales e intratraqueales del microorganismo o de sus toxinas (Firoved *et al.*, 2005; Heninger *et al.*, 2006; Glomski *et al.*, 2007), aunque también se han estudiado infecciones con aerosoles ya que la infección por vía inhalatoria puede ocurrir mediante inhalación de esporas (Walberg *et al.*, 2008).

La afección sistémica de ántrax es muy importante, ya que muchas veces resulta fatal. Duong y colaboradores (2006), publicaron un trabajo utilizando un modelo murino en el cual a los animales se les realizó una infección subcutánea que llevó a la enfermedad sistémica con múltiples patologías que incluían edema, hemorragias, neumonía secundaria y linfocitosis. Realizaron estudios histopatológicos de los nódulos linfáticos torácicos, hígado y riñón, en los cuales se apreció la presencia del microorganismo. En el caso del bazo, pudieron ver cambios dramáticos en su estructura y un descenso de la cantidad de linfocitos. Los microorganismos que encontraron en este órgano resultaron rodeados por macrófagos (Duong *et al.*, 2006).

En lo que respecta al ántrax gastrointestinal, Glomski y colaboradores, desarrollaron un modelo murino de infección. Este modelo refleja muchas de las características que presenta la infección en el hombre. Los autores analizaron el curso de la infección a través de la inoculación de esporas de *B anthracis*. Utilizaron dos vías de inoculación, la vía intragástrica, y una sonda que alcanzaba el estómago. Ambas inoculaciones se realizaron con animales anestesiados y utilizaron imágenes de bioluminiscencia para lograr el estudio de la infección en tiempo real (Glomski *et al.*, 2007). Al inocular ratones BALB/c por vía intragástrica, usando una sonda rígida, pudieron ver que el microorganismo se alojaba en el lugar de la inoculación (laringofaringe). Al utilizar una sonda flexible que alcanzaba el estómago, observaron que la infección se iniciaba en el abdomen y luego progresaba de manera sistémica alcanzando el bazo y pulmones. Además demostraron que el primer lugar donde el microorganismo se desarrollaba resultaba ser la placa de Peyer (Glomski *et al.*, 2007). La forma en que el microorganismo logra el pasaje por

la placa de Peyer sin dañar la mucosa, se encuentra aún sin dilucidar. Este pasaje podría ocurrir a través de células M o CD (Rescigno *et al.*, 2001).

Para comenzar el estudio de infección con células vegetativas de *B. cereus*, una vez seleccionada la cepa a utilizar, se decidió probar una dosis infectiva de entre 10^8 y 10^9 microorganismos por ratón. Para asemejar el modelo a una situación de intoxicación alimentaria, se decidió infectar los animales por vía intragástrica. Los microorganismos fueron lavados previamente a la infección y los animales fueron inoculados con 100 μ l de la suspensión microbiana. En esta tesis, se estudió una infección en única dosis.

Al disecar los animales, se pudo notar macroscópicamente el agrandamiento de las placas de Peyer (PP) en los animales infectados, respecto a los animales control. Al retirar las muestras de intestino, se tomaron las primeras PP (intestino delgado proximal) y se compararon los tamaños, verificando el agrandamiento en los animales infectados. No se observaron hepato o esplenomegalia en los animales infectados, salvo alguna excepción. A los 5 días post infección (5 PI) el tamaño de las PP fue mayor aún que en los animales del grupo de 2 días post infección (2 PI).

Las PP son tejidos organizados donde se alojan células necesarias para la respuesta inmune. Entre estas células podemos encontrar macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Este mayor tamaño de las PP en los animales infectados, podría estar relacionado a una inflamación debida a una respuesta inmune generada por la infección en esta zona. Podría pensarse en un reclutamiento de células hacia las PP. La interacción entre los diferentes tipos celulares involucrados y la liberación de citoquinas podrían determinar un estado de inflamación en la zona aunque mucho menos intenso que para otros patógenos tales como *Salmonella* (Willer *et al.*, 2012), *Campylobacter jejuni* (Morales *et al.*, 2011) o *Citrobacter rodentium* (Murphy *et al.*, 2012).

Cabe resaltar que algunos microorganismos patógenos intestinales no causan mayores alteraciones en modelos murinos. En nuestro grupo de trabajo esto fue observado para los microorganismos *Clostridium difficile* (Trejo, 2009) y

Giardia intestinalis (Humen, 2009), que presentan las características típicas de las patologías al utilizar otros modelos animales de infección, pero que mostraron infecciones autolimitadas cuando se inocularon ratones. Igualmente, el modelo murino permitió ahondar en el estudio de interacción con el hospedador.

En la infección con *B. cereus* en un modelo murino analizada en esta tesis pudo observarse que los efectos no indicaron una virulencia elevada, pero si se presentaron cambios en poblaciones celulares y alteraciones relacionadas con una respuesta inmune a la infección. Estos resultados podrían ser un primer paso en el análisis de la interacción del microorganismo con el hospedador en sistemas altamente complejos como los modelos animales.

Para alcanzar una evaluación más completa del efecto de la infección por *B. cereus* se realizaron ensayos de translocación del microorganismo. Para los tiempos de 2 y 5 días post infección no se localizó al microorganismo en ninguno de los órganos analizados. Al buscarlo en tiempos más cortos de infección, se pudo ver el pasaje del microorganismo a través del sistema digestivo. Se detectó la presencia de *B. cereus* en estómago e intestino delgado proximal y medio a los 30 min post infección y en este tiempo no fue detectado en el intestino delgado distal. Para el análisis realizado a las 2:30 hs de infección, aún se encontraban microorganismos en estómago e intestino delgado, pero a este tiempo ya se presentaban microorganismos en el intestino delgado distal. Cuando se evaluaron tiempos de post infección de 4:30 hs, no se encontraron microorganismos en el estómago, pero se confirmó la presencia de los mismos a lo largo de todo el intestino delgado. En este último tiempo, también se encontraron microorganismos en ciego y materia fecal.

El siguiente tiempo analizado fue de 20 hs post infección, a partir de cual ya no se encontraron microorganismos viables en materia fecal ni en los tejidos analizados. Sin embargo, en la búsqueda del microorganismo en las diferentes partes del sistema digestivo analizadas, en algunos casos fue necesario un enriquecimiento previo. Esto podría estar indicando que si bien *B. cereus* B10502

realiza su pasaje por el sistema gastrointestinal en menos de 20 hs, no se estaría eliminando todo el microorganismo administrado, o al menos no tan rápidamente. Para completar este análisis, se debería buscar el microorganismo en tiempos intermedios entre las 5 y 20 hs post infección.

Otra posibilidad a considerar sería la muerte del microorganismo en un tiempo menor de las 20 hs ya que a 5 hs post infección es el último tiempo en que se encuentra al microorganismo viable en heces. Si ocurriera la lisis masiva de microorganismos esto provocaría la liberación de exotoxinas (Henderson *et al*, 1999) y serían los factores liberados en el lumen los que causarían las respuestas encontradas a lo largo de los análisis realizados en el modelo. Sin embargo, los efectos en el animal resultaron visibles a los 5 días post infección, como lo muestra el tamaño de las placas de Peyer y los resultados que se discutirán más adelante.

Si bien los datos obtenidos por Glomski y colaboradores se refieren a una infección gastrointestinal por esporas de *B. anthracis*, resulta interesante que a pesar de la pérdida del microorganismo en las heces de los ratones, pudieron ver las afecciones típicas de la patología (Glomski *et al.*, 2007). En este modelo de infección, los autores vieron colonización en la zona de inoculación, y un consiguiente progreso sistémico. La zona de inoculación de *B. cereus*, no fue estudiada en esta tesis, y no se vio translocación del microorganismo a otros órganos en los tiempos y dosis estudiados.

Podría pensarse que los efectos vistos en los animales inoculados con *B. cereus* no se deban a la presencia del microorganismo en los tejidos, sino a los factores extracelulares liberados por los mismos o a la inducción por distintos componentes celulares. Es sabido que *B. cereus* produce toxinas en el lumen intestinal (Anderson *et al.*, 1998). Los factores extracelulares producidos por el microorganismo podrían contener sustancias que alterarían la mucosa y provocarían la inducción de señales para desencadenar una respuesta inmune.

Mediante coloraciones histológicas, se pudo apreciar que la infección con *B. cereus* B10502 indujo cambios en la estructura de la mucosa intestinal a los 5 días

post infección. En los cortes histológicos de intestino delgado, coloreados con Hematoxilina-Eosina, se vio un ensanchamiento de las microvellosidades en los animales infectados, hecho compatible con una situación de inflamación aguda (Morales *et al.*, 2011). La mayoría de las infecciones intestinales agudas se encuentran acompañadas de un aumento de células caliciformes y de síntesis y secreción de mucus (Kim y Ho, 2010). En nuestros resultados se observó un mayor número de células productoras de mucus en los ratones infectados que podría estar relacionado con la necesidad de reparar daños ocasionados por la infección (Kim y Ho, 2010). También podría estar vinculado con el mantenimiento de la integridad de la capa protectora de mucus en las vellosidades o a una mayor producción de mucus para lograr eliminar microorganismos. Esto podría estar ocurriendo tanto si consideramos la producción de toxinas por el microorganismo alojado en el lumen, la liberación de factores luego de una lisis masiva o la interacción con componentes de la estructura celular.

Respecto al bazo de los ratones infectados, pudo apreciarse una alteración de la arquitectura del órgano. También se observaron acúmulos de células que no se encontraban presentes en los ratones del grupo control, con morfología celular compatible con linaje leucocitario. Esto, como se discutirá más adelante, podría estar relacionado con los cambios vistos a nivel de las poblaciones celulares en este órgano.

El análisis de las poblaciones celulares en los diferentes órganos estudiados mostró, en algunos casos, modificaciones debidas a la infección. A continuación se discuten los resultados obtenidos.

Respecto a la población de linfocitos T, en la placa de Peyer no se apreciaron diferencias en las poblaciones, ni para linfocitos CD4+, ni para linfocitos CD8+. Se vio un descenso de linfocitos CD8+ en los NLM a los 5 días post infección y un aumento de la población en el bazo a los 2 días PI. La población de linfocitos CD4+ permaneció inalterada en todos los casos.

Los linfocitos T CD8⁺ están relacionados con el reconocimiento y eliminación de células infectadas y de células dañadas. Si tenemos en cuenta la posibilidad del daño en el tejido, ya sea por liberación de factores o por adhesión de *B. cereus* a los enterocitos, podría verse un aumento de la población de linfocitos T CD8⁺. Esto podría relacionar el aumento visto en la población de linfocitos CD8⁺ en el bazo a 2 días PI con la alteración histológica vista a los 5 días PI.

La relación CD4⁺ : CD8⁺ se vio levemente aumentada al considerar las células extraídas de NLM a los 5 días post infección ($p=0,07$). En el resto de los tejidos considerados, esta relación permaneció sin cambios respecto al control.

La población de linfocitos B se analizó mediante marcación con B220 y análisis en su superficie diferenciando la expresión de MHC-II en alta (MHC-II^{high}) y baja (MHC-II^{low}) expresión. En las células extraídas de las placas de Peyer no se vieron cambios para la población de linfocitos B que expresaban MHC-II. A los 2 días PI se apreció un leve incremento de las células B que expresaban MHC-II en los NLM. Este leve incremento descendió a los 5 días PI, prácticamente alcanzando los valores del grupo control. En el bazo a los 5 días PI se observó una disminución significativa de la población de células B que expresaba MCH-II; esto podría deberse a un efecto de la infección sobre la movilización de células esplénicas.

En el contexto de la infección por *B. cereus*, pudo observarse un aumento de la población macrofágica en las PP a los 2 días PI ($p<0,05$). Si bien a los 5 días PI la población F4/80⁺ en PP volvió al nivel de los ratones sin infectar, estos macrófagos presentaron una mayor expresión de MHC-II en su superficie. Esta mayor expresión fue a expensas de MHC-II^{high} ($p<0,05$), lo cual podría estar indicando una activación de macrófagos en respuesta a la infección. Estos resultados se correlacionan con el mayor tamaño observado para las PP.

Al analizar la población en los NLM, pudo observarse un ligero aumento a los 5 días post infección ($p=0,1$). En el bazo, a los 5 días post infección, se vio un

aumento de la expresión de MHC-II^{high} ($p < 0,05$) en los macrófagos. La presencia de macrófagos activados, podría relacionarse con los datos obtenidos de las histologías para los 5 días post infección, donde se apreció un cambio de la arquitectura del órgano, en respuesta a la infección y acúmulos de células diferentes a las presentes en los bazo de los ratones control. Las poblaciones de linfocitos B y de macrófagos que se encontraron aumentadas o activadas en los ratones infectados, se relacionan con una respuesta inflamatoria debida a la infección con *B. cereus*.

Para la población de células dendríticas (CD11c+) que también presentan antígenos a los linfocitos, se seleccionó, para el estudio de su activación, la expresión de la molécula coestimuladora CD86 (B7-2). Se analizó el porcentaje de células CD11c+ - CD86+. Para las células extraídas de placas de Peyer no se vieron diferencias en la expresión de CD86. Este resultado podría indicar que a los tiempos analizados la respuesta a la infección en placas de Peyer se generaría a nivel de macrófagos, población que se encuentra aumentada a los 2 días post infección y continúa activada a los 5 días post infección.

En lo que se refiere a los NLM, la expresión de CD86 en células dendríticas a los 2 días no se vio modificada, sin embargo se apreció un descenso de la misma a los 5 días post infección ($p = 0,07$).

El tejido que marcó una diferencia en cuanto a la expresión de la molécula coestimuladora fue el bazo. En este tejido la expresión disminuye significativamente a los 2 días post infección ($p < 0,05$) y luego vuelve a los niveles de expresión de los ratones sin infectar a los 5 días post infección.

Esta disminución de la molécula coestimuladora CD86 no se ve reflejada en el aumento de linfocitos T CD8+ observado a 2 días PI.

Para completar la visión de la respuesta frente a la infección se analizó la expresión de RNAm de algunas citoquinas. Los estudios se realizaron para los mismos tejidos donde se analizaron las poblaciones celulares, pero se agregaron tiempos cortos de infección. Se hicieron análisis de la expresión relativa de los

respectivos RNAm. Las citoquinas analizadas fueron las siguientes: IL-6, CXCL2, IL-10, IL-12, INF- γ y TNF- α .

Chakrabarty y colaboradores, estudiaron la respuesta inmune generada por la infección con esporos de *B. anthracis* en células epiteliales de pulmón. Esta infección produjo una respuesta pro-inflamatoria fuerte, con producción de IL-6, TNF- α , citoquinas producidas por monocitos (MIP-1 α/β y MCP-1) y la citoquina producida por neutrófilos, IL-8 (Chakrabarty *et al.*, 2007). Resultados obtenidos con *B. cereus*, *in vitro* con macrófagos, mostraron una producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , y factores microbicidas, como por ejemplo óxido nítrico; esta respuesta generada resultó dependiente de la dosis infectiva y del tiempo de exposición (Huttunen *et al.*, 2003). Sin embargo, estos estudios fueron realizados con cultivos celulares.

En el caso de un microorganismo relacionado, como lo es *B. anthracis*, los estudios sobre la producción de citoquinas en modelos *in vivo* presentan una forma diferente de administración del patógeno o incluyen esporas en la administración.

La expresión de RNAm de citoquinas se realizó mediante RT-PCR. En este ensayo, si bien los valores obtenidos para los animales infectados resultaron modificados en algunas citoquinas, los mismos no resultaron elevados. En tiempos menores a las 20 hs, no se registraron modificaciones en la expresión de RNAm de las citoquinas analizadas, en los tejidos estudiados.

Se vieron modificaciones en la expresión de RNAm para IL-12p40, INF- γ y TNF- α para las 20 hs y 2 días post infección. Sin embargo sólo pudo observarse un cambio significativo en la expresión de RNAm de INF- γ . Este interferón se encuentra relacionado con la activación de macrófagos y producción de un aumento de expresión de MHC-I y MHC-II en las células presentadoras de antígenos, lo cual se relaciona con un mayor procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T. Puede ser producida por macrófagos, células NK, CD

y también por linfocitos T CD8+. Genera respuesta del tipo Th1, necesaria para el desarrollo de la inmunidad mediada por células (Murphy et al., 2007)

Este resultado podría estar correlacionado con el aumento de macrófagos y el aumento de expresión de MHC-II durante el período de infección.

Dado que la infección con *B. cereus* B10502 sobre el modelo murino no condujo a un cuadro grave, es de esperar una respuesta a nivel de citoquinas no muy elevada.

Si bien el modelo mostró infecciones autolimitadas, se observó un claro efecto en los diferentes marcadores estudiados. Estos estudios podrían ayudar a dilucidar el mecanismo de interacción de *B. cereus* con el huésped. Se pudieron evaluar cambios a niveles histológicos y la respuesta montada por el hospedador debido a la infección. Se mostró la capacidad de modificar y activar ciertas poblaciones celulares, tales como los macrófagos. Esto podría estar implicado no sólo en la eliminación del patógeno sino que podría resultar relevante en lo que respecta a sus mecanismos de patogenicidad.

Otras cepas de *B. cereus* podrían resultar más virulentas en el modelo de infección utilizado. Esto sería compatible con la gran variedad de actividades biológicas de diferentes cepas de este microorganismo (Minnaard *et al.*, 2001; Minnaard *et al.*, 2004; Minnaard *et al.*, 2007) y con los resultados obtenidos en los capítulos previos de este trabajo de tesis.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas K.A. y Lichtman A.H. 2004. Cellular and Molecular Immunology. Copyright MMIII Elsevier Science, an Elsevier Imprint.

Anderle P., Sengstag T., Mutch D.M., Rumbo M., Praz V. y Mansourian R. 2005. Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior–posterior and crypt-villus axes. BMC Genom; 6(1):69.

Andersson A., P. Granum, y U. Rnöner. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Int. J. Food Microbiol. 39:93–99.

Chakrabartk K, Wu W, Booth JL, Duggan ES, Nagle NN, Coggeshall KM, Metcalf JP. 2007. Human lung innate immune response to *Bacillus anthracis* spore infection. Infect Immun. 75(8):3729-38.

Correa Franco, M. Utilización de fermentos lácticos obtenidos a partir del kefir para evaluar su capacidad antagónica in vivo frente al protozoario intestinal *Giardia intestinalis*. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos de la UNLP, 2012.

Dierick ,K., Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J..2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. J Clin Microbiol. 43: 4277-4279

Duong S., Chiaraviglio L. and Kirby J.E .2006. Histopathology in a murine model of anthrax. Int J Exp Pathol. Apr; 87(2):131-7.

Firoved AM, Miller GF, Moayeri M, Kakkar R, Shen Y, Wiggins JF, McNally EM, Tang WJ, Leppla SH. 2005 *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol.* 167(5):1309-20

Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL. 2007. Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog.* 3(6):e76.

Helgason, E.; Økstad, O. A.; Caugant, D. A.; Johansen, H. A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I. and Kolstø, A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 2627–2630.

Henderson B., Wilson M., McNab R. y Lax A. 1999. Bacterial Proteins Toxins. Chapter 7 in *Cellular Microbiology. Bacteria-Host Interactions in Health and Disease.* Ed: John Wiley and Sons, UK, f. p.: 273-310.

Heninger S, Drysdale M, Lovchik J, Hutt J, Lipscomb MF, Koehler TM, Lyons CR 2006 Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun.* 74(11):6067-74.

Humen M. 2009. Interacción de *Giardias intestinalis* con el hospedador. Efecto antagónico de probióticos intestinales. Tesis docoral. FCE-UNLP.

Huttunen K, Hyvärinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvonen MR. 2003. Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environ Health Perspect.* 111(1):85-92.

Kim YS and Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 12(5):319-30. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2

Klee SR, Brzuszkiewicz E.B, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, Franz T, Pauli G, Appel B, Liebl W, Couacy-Hymann E, Boesch C., Meyer F.D, Leendertz F.H, Ellerbrok H, Gottschalk G, Grunow R .and Liesegang H 2010. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One.* 5(7):e10986.

Macpherson A.J and Uhr T 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 303(5664):1662-5.

Minnaard J, Humen M and Pérez P. 2001. Effect of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cell. *J Food Prot.* 64:1535-1541.

Minnaard Y., Delfederico L., Vasseur V., Hollmann A., Rolny I.; Semorile L. y Perez. P.F. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *Int. J. Food Microbiol.*;116: 197-206

Minnaard Y., Lievin-Le Moal V., Coconnier M. H., Servin A.L. y Perez. P.F. 2004. Disassembly of F-Actin Cytoskeleton after Interaction of *Bacillus cereus* with Y Fully Differentiated Human Intestinal Caco-2 Cells. *Infect. Immun.* 72:3106 -3112.

Morales W., Pimentel M., Hwang L., Kunkel D., Pokkunuri V., Basseri B., Low K., Wang H., Conklin J.L. y Chang C. 2011. Acute and chronic histological changes of the small bowel secondary to *C. jejuni* infection in a rat model for post-infectious IBS. *Dig Dis Sci.* ;56(9):2575-84. doi: 10.1007/s10620-011-1662-6.

Murphy K., Travers P., Walport M. 2007. Janeway's Immunobiology, 7th edition, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Murphy C.T., Hall L.J., Hurley G., Quinlan A., MacSharry J., Shanahan F., Nally K and Melgar S 2012. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 impairs mucosal immunity and clearance of the enteric pathogen *Citrobacter rodentium* *Infect Immun.* Aug; 80(8):2712-23.

Naranjo, M., Denayer S, Botteldoorn N, Delbrassinne L, Veys J, Waegenare J, Sirtaine N, Driesen RB, Sipido KR, Mahillon J, Dierick K. 2011. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *J Clin Microbiol.* 12: 4379–4381.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2(4):361-7.

Rescigno M, Di Sabatino A. 2009. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 119(9):2441-50.

Roberts R., Moreno G., Bottero D., Gaillard M.E., Fingerhann M., Graieb A., Rumbo M. y Hozbor D. 2008. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine.* 26(36):4639-46.

Rumbo M.; Sierro F; Debard N; Kraehenbuhl J.P. y Finke D. 2004. Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology* ; 127(1):213–23.

Sainte-Marie G. A. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *Histochem. Cytochem*, 10, 250–256

Salter S.J. 2010. You cannot *B. cereus*. *Nat Rev Microbiol*. 9(2):83. doi: 10.1038/nrmicro2506. Epub Dec 29.

Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M. y Pamer E.G. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. ;26:421-52. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.

Trejo F. 2009. Interacción entre *Clostridium difficile*, Lactobacilos y Bifidobacterias. Tesis doctoral. FCE-UNLP

Walberg K, Baron S, Poast J, Schwartz B, Izotova L, Pestka S, Peterson JW. 2008. Interferon protects mice against inhalation anthrax. *J Interferon Cytokine Res*. 28:597-601.

Wijnands L. M., Pielat A., Dufrenne J.B., Zwietering M.H. y van Leusden F.M. 2009. Modelling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *J. Appl. Microbiol*. 106:258–267.

Willer Y., Müller B. y Bumann D. 2012. Intestinal inflammation responds to microbial tissue load independent of pathogen/non-pathogen discrimination. *PLoS One*. ;7(5):e35992

Wright AM, Beres SB, Consamus EN, Long SW, Flores AR, Barrios R, Richter GS, Oh SY, Garufi G, Maier H, Drews AL, Stockbauer KE, Cernoch P, Schneewind O, Olsen RJ, Musser JM. 2011. Rapidly progressive, fatal, inhalation anthrax-like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing,

pathology, and coordinated response Arch Pathol Lab Med. 135(11):1447-59. doi:
10.5858/2011-0362-SAIR.1

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de tesis efectúa un recorrido por aspectos aún no explorados de la interacción de *Bacillus cereus* con el hospedador. En sistemas in vitro con células fagocíticas se encontró que este microorganismo es rápidamente internalizado e inactivado, aún en condiciones no opsónicas. Sin embargo, se evidenciaron diferencias entre las cepas que implicarían distintas cinéticas de interacción, tráfico intracelular hacia compartimentos altamente degradativos y estimulación de las células fagocíticas.

Por otro lado, la interacción con células fagocíticas y no fagocíticas se vio modificada en presencia de microorganismos no patógenos como lactobacilos y bifidobacterias lo cual muestra la relevancia de este tipo de modelos para realizar una aproximación experimental del efecto biológico de este patógeno. La moderada respuesta inflamatoria generada por *Bacillus cereus*, fue modulada por la presencia de un lactobacilo potencialmente probiótico.

Los estudios realizados en el modelo murino demuestran que este sistema constituye una aproximación válida para indagar acerca de la capacidad de *Bacillus cereus* de producir una respuesta ya que la supervivencia de los animales permite realizar estudios a tiempos largos postinfección.

Tomados en conjunto, los resultados del presente trabajo de tesis, muestran que la interacción de *Bacillus cereus* con células epiteliales y fagocíticas profesionales da lugar a respuestas dependientes de la cepa que constituyen elementos a considerar para obtener una visión global de la patogénesis de este microorganismo. Aún cuando son rápidamente inactivados por las células fagocíticas, estos microorganismos producen efectos a nivel de expresión de moléculas relevantes en la comunicación célula-célula. Es interesante destacar que aunque en el modelo murino no se demostró una translocación masiva ni infección de tejidos, los cambios y respuestas observados en lugares como el bazo podrían estar en relación con esta capacidad de generar señales aún cuando el microorganismo es controlado por los sistemas de defensa del hospedador.

Conclusiones Generales

Los cuadros más graves asociados a *Bacillus cereus* podrían estar indicando la presencia de cepas que, además de los factores de virulencia tradicionalmente descritos, presentan la capacidad de generar respuestas mayores en el contexto de las variables estudiadas en el presente trabajo.

Apéndice

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVOS

❖ **Caldo MRS** (De Man, Rogosa, Sharpe)

(Biokar Dianostic, Beauvais, Francia)

Polipeptona	10 g/l
Extracto de carne	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Tween 80	1,08 g/l
Fosfato dipotásico	2 g/l
Acetato de sodio	5 g/l
Citrato de amonio	2 g/l
Sulfato de magnesio	0.2 g/l
Sulfato de manganeso	0.05 g/l
L(-) clorhidrato de cisteína	0,5 g/l

❖ **Caldo BHI** (Extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)

(Biokar Dianostic, Beauvais, Francia) adicionado con glucosa.

D(+)-glucosa	2.1 g/l
NaCl	5.0 g/l
Na ₂ HPO ₄	2.5 g/l
Agua bidestilada c.s.p	1l
pH: 7.2-7.4.	

❖ **Agar Nutritivo**

(Parafarm, Argentina)

peptona de carne	5.0 g/l
extracto de carne	3.0 g/l
agar-agar	12.0 g/l
Agua bidestilada c.s.p	1l

Peptona y extracto de carne: BIODAR, Francia

❖ **PBS (BUFFER FOSFATO SALINO)**

KH_2PO_4	0.144 g/L
Na_2HPO_4	0.795 g/L
NaCl	9 g/L
Agua bidestilada c.s.p:	1L
pH: 7-7.4	

Los medios de cultivos y buffers listados anteriormente, fueron preparados con agua bidestilada. La esterilización se realizó por autoclave a 121°C durante 15-20 min.

MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS EUCARIOTAS

❖ **RPMI**

RPMI Completo

RPMI 1 sobre/l	
Penicilina/estreptomicina (1000 IU, 1000 µ/ml)	13 ml/l
Bicarbonato de sodio	2 gr
Gentamicina	0.5 gr
Aminoácidos no esenciales	13 ml
Suero fetal bovino (inactivado 30 min a 58°C)	120 ml
NaHCO ₃	2 gr/l
Agua para irrigación quirúrgica	1 l

RPMI adhesión (RPMI sin suplementar)

RPMI 1 sobre/l	
NaHCO ₃	2 gr/l
Agua de irrigación quirúrgica csp	1 l
pH 7,5	

❖ **DMEM** (Dulbecco Modified Eagle's Medium),
(GIBCO, EEUU)

DMEM Completo

DMEM 1 sobre/l	
Penicilina/estreptomicina (1000 IU, 1000 µ/ml)	13 ml/l
Suero Fetal Bovino (inactivado 30 min a 58C)	180ml/l
Aminoácidos no esenciales 100X	13 ml/l

Apéndice

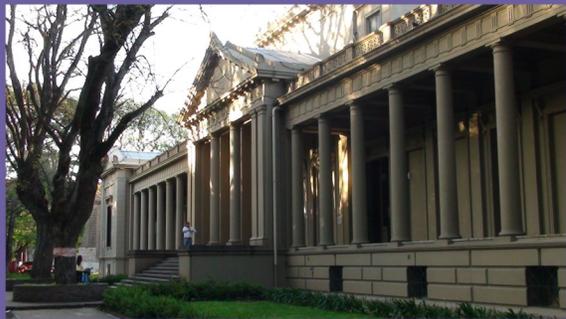
Gentamicina (50 mg/ml)	10ml/l
NaHCO ₃	2 gr/l
Agua de irrigación quirúrgica	1l
pH 7,5	

DMEM adhesión (DMEM sin suplementar)

DMEM 1 sobre/l	
NaHCO ₃	2 gr/l
Agua de irrigación quirúrgica csp	1l
pH 7,5	

Los medios para las células eucariotas, se prepararon utilizando agua de irrigación quirúrgica (Droguería Lino, Argentina). Los medio de esterilizaron por membrana de filtración estéril de 0,22 μ m.

Los aminoácidos no esenciales 100X, fueron provistos por GIBCO-Invitrogen Corporation.



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA