

Valuación in vitro de la actividad de fagocitosis e inducción de apoptosis en neutrófilos bovinos frente a *S. Aureus* capsular mediante microscopía de campo claro y epifluorescencia

Valente Velázquez, Montoya García, Valladares Carranza, Castañeda Vázquez, y Hernández Beltrán

V. Velázquez, N. Montoya, B. Valladares, H. Castañeda y A. Hernández.
Universidad Estatal de Sonora (UES), Carrera de Comercio Internacional. Ley Federal del Trabajo s/n,
Colonia Apolo, Hermosillo, Sonora, México, CP 83100.
luisim00@hotmail.com

M.Ramos., V.Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,
Guanajuato, 2014.

Abstract

Neutrophils (PMN), is the first cellular defense line in bovine mastitis, *S. aureus* expressing the capsular exopolysaccharide is considered a virulence factor. The effect of the capsule on *S. aureus* phagocytosis and PMN apoptosis in vitro was evaluated in dairy cattle. The neutrophil phagocytosis index (PI) and apoptosis was evaluated by the methods of light microscopy stained with May Grünwald -Giemsa and epifluorescence staining with ethidium bromide and acridine orange. The results obtained for the PI for light microscopy were compact strain CC 6.06 ± 0.32 , capsular strain CP5 5.06 ± 0.16 ($p < 0.05$). PI values by epifluorescence technique was: CC 7.51 ± 0.54 and CP5 5.12 ± 0.55 ($p < 0.05$). The percentage of apoptosis induction evaluated by light microscopy was: Positive Control C (+) 97.56 ± 1.47 , Control negative C(-) 27.08 ± 2.18 , CC 35.11 ± 2.87 and CP5 53.01 ± 8.03 ($p < 0.05$). The Apoptosis values using epifluorescent technique were: C(+) 95.47 ± 3.07 , C(-) 20.39 ± 2.00 , CC 26.47 ± 1.42 and CP5 46.90 ± 5.82 ($p < 0.05$). There were differences in the activity of in vitro phagocytosis between compact and diffuse capsular *S. aureus* types and its ability to induce apoptosis of bovine neutrophils.

4 Introducción

El *S. aureus* principal agente causal de la mastitis bovina, debido a los factores de virulencia del agente que acentúa el proceso inflamatorio en la glándula mamaria. La expresión de exopolisacáridos capsular es un factor asociado a la evasión del sistema inmune innato del hospedador. De los 11 tipos capsulares identificados en el ganado lechero con mastitis, de ellos los serotipos 5 y 8 son los más prevalentes (Lee et al., 2005; Verdier et al., 2007). La migración de los neutrófilos (PMN) en la glándula mamaria constituye la primera línea de defensa celular frente a patógenos por el proceso de fagocitosis durante el desarrollo de la mastitis desempeñando un papel crucial en la resistencia a la infección (Paape et al., 2003). La apoptosis ocurre al activarse los mecanismos de inactivación de después de la fagocitosis por neutrófilos, limitando limitando el daño tisular (Elbim y Lizard, 2009).

Durante el proceso de apoptosis se llevan a cabo diferentes procesos que pueden evaluarse en condiciones in vitro mediante diversos ensayos. Algunos se basan en la observación de los cambios morfológicos en las células: condensación nuclear, asperación de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos. Otros métodos evalúan la: pérdida del potencial de membrana mitocondrial, fragmentación del ADN, activación de las vías de las caspasas y la translocación de fosfatidilserina. Estos procesos pueden ser evaluados mediante por microscopía de campo claro y epifluorescencia, Western blotting, microscopía electrónica y citometría de flujo (Dorward, et al., 2014)

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad de fagocitosis e inducción de apoptosis in vitro de neutrófilos de bovinos lecheros frente a *S. aureus* de tipo capsular en evaluados bajo microscopía de campo claro y epifluorescencia.

4.1 Método

Grupo de animales

El grupo de animales donadores se integró con 3 vacas con un periodo pos partum en promedio de 121 días (Van Oostvelt et al., 2001). Los criterios de inclusión al grupo de estudio fueron: serología negativa a anticuerpos anti *S. aureus* tipo capsular 5 y 8 (Karakawa et al., 1985), conteos celulares somáticos en leche de 200×10^3 células/ml (Echeverri et al., 2010), bacteriológicamente negativas a 3 muestreos consecutivos a *Staphylococcus aureus* y negativas a la prueba de california (Capuco et al., 1986). La leche se obtuvo mediante un sistema de ordeño mecánico y un protocolo de buenas prácticas de manejo e higiene. Durante el estudio las vacas se mantuvieron en condiciones adecuadas en consideración a las normas oficiales mexicanas NOM-052-ZOO 1995 y NOM 062-ZOO 1999.

Diseño del experimento

Para evaluar la actividad de fagocitosis de los PMN bovinos se emplearon dos grupos experimentales, considerados como tratamiento y controles los tipos capsulares compactos CC y difusos de *S. aureus* agrupados como: CC neutrófilos + cepas compactas de *S. aureus*, CP5 neutrófilos + cepa capsular 5. En los ensayos de inducción de apoptosis se empleó un control positivo C(+) neutrófilos + ciclofosfamida ($400\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) y un control negativo C(-) integrado por la suspensión de neutrófilos. Los ensayos in vitro se realizaron por triplicado para evaluar el Índice de Fagocitosis (IF), y Apoptosis se emplearon 2 cepas para CC y 4 para CP5. Se emplearon cepas de campo de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis (García, 2013), previamente conservadas a -20°C en glicerol en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 25% (Tollersrud et al., 2000). La expresión de la cápsula in vitro se llevó a cabo en el medio de infusión cerebro corazón adicionado al 10 % con suero de leche incubado durante 24hr (Sutra et al., 1990). El tipo capsular se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y seroaglutinación en placa con un antisuero policlonal de conejo anti-CP5 comparados con las cepas de control ATCCC ATCC 12598 y ATCC 25904

Aislamiento de neutrófilos

A partir de una muestra de sangre bovina por venopunción de la vena yugular depositada en tubos de recolección al vacío (Vacutainer, Becton Dickison, USA) con heparina como anticoagulante (Worku et al., 1994). Se determinó el conteo diferencial de leucocitos por el método hematológico empleando un hemocitómetro, y la tinción de Giemsa Los neutrófilos (PMN) se aislaron mediante por el método de lisis hipotónica de eritrocitos (LHE) (Velázquez et al., 2008). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000g a 4°C por 20 minutos en tubos cónicos de propileno, para descartar plasma. La lisis de eritrocitos se realizó en tubos de plástico de 15 ml durante adicionados con 8ml de solución A a 4°C (NaCl, 0.020 M), y 4ml de sangre expuesta durante 30 segundos. Posteriormente se agregaron 2 ml de solución B a 4°C (NaCl, 0.164 M) para centrifugarce a 300g por 3 minutos. Se recuperó el pellet de células y se lavó dos veces en solución balanceada Hank para finalmente resuspenderce en el medio RPMI 1640. La concentración de neutrófilos se ajustó a una concentración de 2.5×10^6 células viables/ml.

La viabilidad de los neutrófilos se determinó empleando el método de exclusión de azul de tripán al 4%. La pureza de neutrófilos maduros se observó en un frotis celular en un portaobjetos, teñido con May Grünwald-Giemsa (Salgar et al., 1991). Tanto la pureza como la viabilidad de los PMN se estimó al 95%.

Microscopía de campo claro

Para determinar la actividad de fagocitosis in vitro se empleó como sustrato una suspensión bacteriana inactivada a 120°C durante 20 minutos ajustada a 2×10^8 CFU/ml conservada a 4°C hasta el momento de su uso. Se colocó en una proporción 1:10 neutrófilo: bacteria (Sutra et al., 1990a). En un microtubo se adicionó 0.1ml de la suspensión bacteriana, 0.1ml de suero autólogo inactivado a 56°C y 0.8ml de suspensión de neutrófilos. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hr, posteriormente se le adicionó lisostafina (1µg/ml, SIGMA, USA) y se reincubaron por 30 minutos finalmente se realizó un frotis que se tiñó con May Grünwald-Giemsa y se observó en el microscopio óptico. La actividad de fagocitosis in vitro se evaluó a partir del IFN determinado por el número promedio de bacterias fagocitadas por neutrófilo, después de observar y contar 200 células en diferentes campos microscópicos. La evaluación de la apoptosis in vitro de los neutrófilos aislados de vacas lecheras, se realizó a partir de un frotis teñido con May Grünwald-Giemsa, las muestras se observaron en el microscopio de campo claro 100x analizando diferentes campos para enumerar 200 neutrófilos por muestra de acuerdo a las características morfológicas descritas por Sladek y Rysanek (2000).

Microscopía de epifluorescencia

Como sustrato para el ensayo de fagocitosis in vitro, observado en el microscopio de fluorescencia se empleó una suspensión bacteriana inactivada de *S. aureus*, ajustada a 2×10^8 CFU/ml y conjugada con isotiocianato de fluoresceína. La observación bajo el microscopio de epifluorescencia para determinar la apoptosis se realizó a partir de una solución de Bromuro de Etidio (100 µg/ml) (PROMEGA, Madison USA) y Naranja de Acridina (100 µg/ml). A 100 µl de muestra se le adicionó 8 µl de ambos reactivos. El número total de PMN apoptóticos se determinó por el número de células que presentaban cromatina color verde brillante y una condensación o fragmentación nuclear y el número de PMN que tenían una cromatina color naranja brillante con condensación o fragmentación nuclear. Las células con cromatina verde brillante y estructura organizada se consideraron células viables mientras que las células necróticas se caracterizaron por presentar una coloración anaranjada brillante y estructura organizada (McGahon et al., 1995).

Evaluación de resultados

A partir del índice del IF de los tratamientos, comparados con el control, se determinó la media y desviación estándar. Para evaluar las diferencias de la actividad de fagocitosis e inducción de apoptosis entre los tratamientos y el grupo control se realizó una prueba de análisis de varianza y una prueba de t-student para comparar las medias de los tratamientos utilizando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc. USA).

4.2 Resultados y discusión

En el estudio se evaluó la actividad de fagocitosis e inducción de apoptosis con cepas de *S. aureus* tipo compacto y capsular sobre PMN bovinos empleando las técnicas de microscopía de campo claro y epifluorescencia. Los valores en el ensayo in vitro para evaluar el índice de fagocitosis (IF) de los PMN con la técnica de microscopía de campo claro fueron, para el tipo CC 6.06 ± 0.32 , CP5 5.06 ± 0.16 ($P < 0.05$) (Gráfica 1). La evaluación de la inducción de la apoptosis expresada en porcentaje al considerar las características morfológicas cariopícnosis, zeiosis, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, apreciadas en los frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa fueron: control positivo C(+) 97.56 ± 1.42 , control negativo C(-) 27.08 ± 2.18 , CC 35.11 ± 2.87 , CP5 53.01 ± 8.03 ($p < 0,05$) (Gráfica 2).

En microscopía de epifluorescencia el IF para los diferentes grupos fue: CC 7.51 ± 0.54 , CP5 5.12 ± 0.55 ($p < 0.05$) (Gráfica 1). La evaluación de la inducción de la apoptosis (Figura 1) mediante la técnica de epifluorescencia, observada en frotis húmedo teñidos con bromuro de etidio y naranja de acridina fue: C(+) 95.42 ± 3.07 , C(-) 20.39 ± 2.00 , CC 26.47 ± 1.42 , CP5 46.90 ± 5.82 ($p < 0,05$) (Gráfica 2). Al realizar los ensayos in vitro se observó que *S. aureus* tipo capsular 5 induce in vitro una mayor proporción de apoptosis y un menor índice de fagocitosis en los PMN en comparación con el CC y el CP (Montoya 2013). Estas evidencias sugieren una mayor patogenicidad de CP 5 para la infección por *S. aureus* al ocurrir la mastitis asociada al CP5 y CP8 relacionados con la sobrevivencia intracelular del agente en los neutrófilos (Velázquez et al., 2012). Por otra parte la actividad de fagocitosis de los PMN en condiciones in vivo, puede ser influida por las opsoninas presentes en la leche y el tejido glandular mamario al sufrir la infección. Sin embargo ante la presencia del exopolisacárido capsular del *S. aureus*, se interfieren los receptores de opsoninas como el complemento presentes en la pared bacteriana, evitando el sitio de unión y con ello la disminución sustancial de la fagocitosis bacteriana por los PMN (Guidry et al., 1991; Cunnion et al., 2001; Luong y Lee, 2002). Lo anterior puede explicar las diferencias obtenidas en el IF entre CC y CP5 en el presente estudio, una característica importante de la virulencia de *S. aureus* es la inducción de la apoptosis, la cual reduce la eficacia en la actividad microbicida de los neutrófilos aislados de sangre humana (Nilsdotter-Augustinsson et al., 2004). En el estudio la presencia de CP5 indujo en mayor proporción de apoptosis en comparación con la CP tipo compacto.

Los resultados obtenidos en el estudio indican que las cepas capsulares son más patógenas al ser expuestas en los ensayos de fagocitos in vitro por la inducción de apoptosis. Es posible que las evidencias obtenidas a través de los ensayos in vitro de fagocitosis e inducción de apoptosis, puedan explicar la capacidad del *S. aureus* para incrementar la persistencia de la infección en la glándula mamaria durante la mastitis. Esta situación puede explicar los mecanismos de patogénesis de la infección de los serotipos capsulares durante el desarrollo de la mastitis *S. aureus* del ganado lechero (Fattom, et al., 1998).

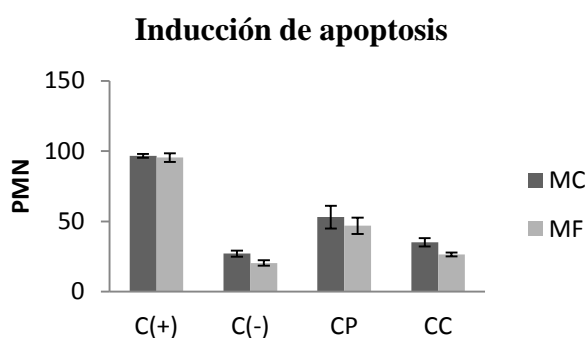
La técnica de microscopía de campo claro empleada en la observación de frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa permitió la identificación de PMN maduros y la observación de los cambios inducidos por la apoptosis temprana y tardía en los leucocitos; permitió observar los estadios de apoptosis temprana caracterizados por cariopícnosis y zeiosis.

Mientras que los PMN con un proceso de apoptosis avanzada mostrarán fragmentación nuclear o la formación de cuerpos apoptóticos similares a los descritos por Sladek y Rysanek (2000). El empleo del isotiocinato de fluoresceína en los ensayos in vitro de fagocitosis favoreció la tinción de las bacterias para ser observadas y contabilizadas al interior de los PMN (Sutra et al., 1990b). Así mismo mediante la técnica de epifluorescencia empleada en la observación de los frotis húmedos teñidos con bromuro de etidio y naranja de acridina, fue posible identificar las características estructurales de los PMN propias de la apoptosis: condensación y fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos. (OTRO). Estos fluorocromos hacen posible la diferenciación de las células que muestran una apoptosis temprana y tardía. Las células de color verdoso brillante y la alta condensación o fragmentación del núcleo se consideraron con apoptosis temprana. A diferencia de los cambios mostrados por la apoptosis tardía que presentaron cromatina de color naranja con una condensación o fragmentación, con un citoplasma ligeramente naranja (McGahon et al., 1995).

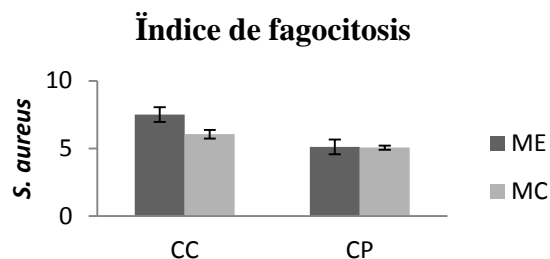
Las técnicas empleadas en este estudio son asequibles para evaluar los cambios morfológicos estructurales a de manera simples y a bajo costo, si consideramos otras técnicas como citometría de flujo que requiere de equipo especial.

El uso de citometría de flujo a su vez permite el análisis de una gran cantidad de células de manera rápida asegurando resultados fiables en un gran volumen de muestras mientras que el empleo de microscopía de campo claro y de epifluorescencia no requiere de concentraciones celulares altas. En el estudio se evaluó la actividad de fagocitosis e inducción de apoptosis con los cepas capsulares de *S. aureus* sobre PMN bovinos mediante la técnica de microscopía de campo claro y epifluorescencia.

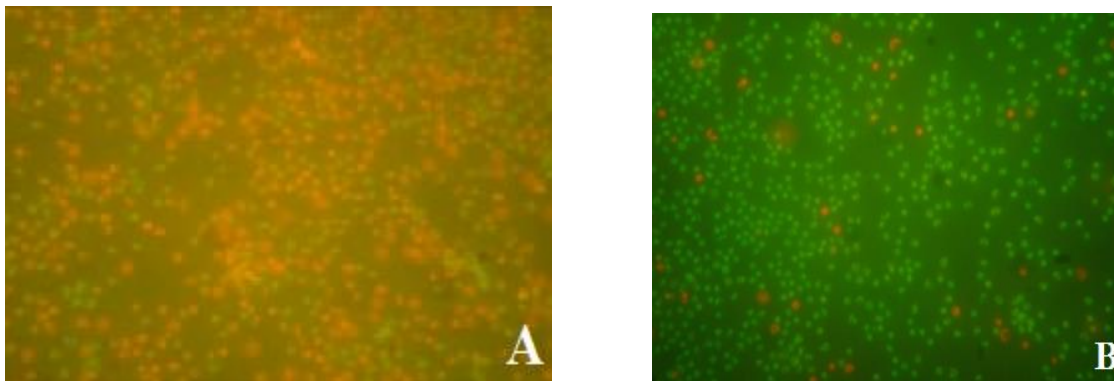
Grafica 4. Número de *S. aureus* fagocitados por los neutrófilos después de una hora de incubación. Media y desviación estándar del grupo control y grupos experimentales observadas por microscopía de campo claro (MC) y de epifluorescencia (ME). Cepa control; CP cepa capsular. Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos $P < 0.05$.



Grafica 4.1. Proporción de neutrófilos bovinos apoptóticos inducidos por *S. aureus* después de una hora de incubación. Media y desviación estándar de los grupos controles y grupo experimental observadas por microscopía de campo claro (MC) y microscopía de fluorescencia (ME). Control positivo CC(+) PMN incubados con ciclofosfamida (400µg/100µl); control negativo CC(-) neutrófilos; CC cepa compacta y CP cepa capsular. Diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos $P < 0.05$



Neutrófilos bovinos aislados de sangre, teñidos con naranja de acridina y bromuro de etidio. A) Control positivo: PMN incubados con ciclofosfamida (400µg/100µl), B) PMN incubados con cepas compactas de *Staphylococcus aureus*. Células verdes son PMN viables, células rojas son neutrófilos apoptóticos, 16x.



4.3 Conclusiones

En el estudio se concluye que la capacidad del *S. aureus* del tipo capsular para reducir la fagocitosis e inducir la apoptosis observada mediante las técnicas de microscopía de campo claro y epifluorescencia.

4.4 Referencias

Capuco A.V., Paape M.J. & Nickerson S.C. (1986) *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. *Am J Vet Res*, 47, 663-668

Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. (2001): Capsule Production and Growth Phase Influence Binding of Complement to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 69(11):6796–6803.

Dorward D. A., Rossi A. G., Dransfield I. & Lucas C. D. (2014). Assessment of neutrophil apoptosis. En Quinn M. T. & DeLeo F. R. (Ed. 2º), *Neutrophil Methods and Protocols* (pp. 159-180), Montana USA:HumanaPress.

Echeverri J. J. Z., Jaramillo M. G. & Restrepo L. F. B. (2010). Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia *Rev. Lasallista Investig*,7(1),49-57.

Elbim C. & Lizard G. (2009). Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Journal of the International society for Advancement of citometry*, 75(6), 475–481

Fattom AI, Sarwar J, Basham L, Ennifar S y Naso R. (1998): Antigenic Determinants of *Staphylococcus aureus* Type 5 and Type 8 Capsular Polysaccharide Vaccines.

Guidry AJ, Oliver SP, Squiggins KE, Erbe EF, Dowlen HH, Hambleton CN y Berning LM. (1991): Effect of anticapsular antibodies on Neutrophil Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 74:3360-3369.

Karakawa W.W., Fournier J. M., Vann W. F., Arbeit R., Schneerson R.S. & Robbins J. B. (1985). Method for the Serological Typing of the Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 22 (3), 445-447.

Lee J. W., Bannerman D. D., Paape M. J., Huang M. K. & Zhao X. (2005). Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Infection and immunity*, 73(3), 1578-1583.

Luong TT, Lee CY. (2002): Overproduction of Type 8 Capsular Polysaccharide Augments *Staphylococcus aureus* Virulence. *Infection and immunity*, 70(7):3389-3395.

McGahon A. J., Mstin S. J., Bissonnette R.P., Mahboubi A., Shi Y., Mogil R. J., Nishioka W.K. & Green D. R. (1995). The end of the (Cell) line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*. *Methods Cell Biol*, 46,153-85.

Montoya García N. (2013). Evaluación *in vitro* de la apoptosis de neutrófilos de vacas lecheras inducida por los tipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca Méx.

Nilsdotter-Augustinsson A, Wilsson A, Larsson J, Stendahl O, Ohman L, Lundqvist-Gustafsson H. (2004): *Staphylococcus aureus*, but not *taphylococcus epidermidis*, modulates the oxidative response and induces apoptosis in human neutrophils. *APMIS*, 112:109–18

Paape M.J, Bannerman D.D, Zhao X. & Lee J. W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res*, 34(5), 597–627.

Salgar S. K., Papee M. J., Alston-Mills B. & Miller R. H. (1991). Flow cytometric study of oxidative burts activity in bovine neutrophils. *Am J Vet Res*, 52(8), 1201-1207.

Sladek Z. & Rysanek D. (2000). Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from mammary glands of unbred heifers. *Veterinary Medicine Czech*, 45(3), 71–81.

Sutra L., Mendiola C., Rainard P. & Poutrel B. (1990a). Encapsulation of *Staphylococcus aureus* Isolates from Mastitic Milk: Relationship between Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 and Colony Morphology in Serum-Soft Agar, Clumping Factor, Teichoic Acid, and Protein A. *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 447-451.

Sutra L., Rainard P. & Poutrel B. (1990b). Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2253-2258

Tollersrud T., Kenny K., Reitz A. J. & Lee J. C. (2000). Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol*, 38(8), 2998-3003.

Van Oostveldt K., Vangroenweghe F., Dosogne H. & Burvenich F. (2001) Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res*, 32, 617–622.

Velázquez V., Pescador N., Gorodezky C. & Saltijera J. (2008). In vitro differential neutrophil phagocytosis activity on *Staphylococcus aureus* when obtained from blood and milk of dairy cows in early lactation period. *Revista latinoamericana de microbiología*, 50(3,4), 66-71.

Velazquez V., García A.M. J., Valladares B., Barbabosa A., Alonso A. U. & Zepeda J. A. Identificación de los tipos capsulares 5 y 8 de *S. aureus* por PCR y aglutinación en placa en aislamientos obtenidos de vacas lecheras en hatos de producción familiar del Valle de Toluca. Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuario Agrícola Forestal y Acuícola-Pesquera. Querétaro México 2012.

Verdier I., Durand G., Bes M., Taylor K. L., Lina G., Vandenesch F., Ali I. Fattom & Etienne J. (2007). Identification of the Capsular Polysaccharides in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by PCR and Agglutination Tests. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 725–729.

Worku M., Paape M. J., Filep R. & Miller R.H. (1994). Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors for IgG2 and IgM. *Am. J. Vet Res*, 55, 221–226.