

Análisis *in vitro* de la adherencia de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* a células con características similares a las del epitelio ruminal

***In vitro* analysis of *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* adherence to cells with similar characteristics to the ruminal epithelium**

S. Ruiz¹; M.C. Giménez^{1,2}; G.N. Arenas^{1,3}; N. Sohaefer¹; L. Pereyra¹; C. Pereyra¹; L. Quiroga¹; S. Vernola¹; A. Gaia¹; D. Cardone¹; C. Goncalves¹; L. Sanchez¹; A. Tapia¹; D. Carrión¹; P. Galeano¹ y D. Grilli^{1,2}.

¹Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina

²Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, CCT-CONICET Mendoza

³Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

Contacto: diegoqrilli@yahoo.com.ar

Palabras clave: Adhesión; Bacteria; Rumen
Key Words: Adhesion; Bacterium; Rumen

Introducción: recientemente, nuestro equipo de investigación logro aislar *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* a partir del rumen de cabras Criollas. Esta cepa demostró una capacidad superior para degradar la hemicelulosa contenida en el heno de alfalfa a la informada en especies de butirivibrios ruminales relacionadas. Debido a esto, se decidió iniciar el estudio de la capacidad probiótica de *P. xylanivorans*. Dado que resulta necesario, en primer lugar, estudiar la adherencia bacteriana al epitelio del tracto digestivo, como un requisito fundamental para la selección de potenciales probióticos, hemos iniciado el análisis *in vitro* de la capacidad de adherencia de *P. xylanivorans* utilizando como modelo una línea celular con características similares a las células presentes en el epitelio ruminal.

Objetivo: determinar, mediante dos técnicas de microscopía óptica, la Multiplicidad de Infección (MOI) que permitirá evidenciar la adherencia de *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* a una línea celular tumoral, con características similares a las células del epitelio ruminal; con el fin de estimar el establecimiento de la cepa probiótica en el ecosistema ruminal.

Metodología: se cultivaron células SW480 (línea celular derivada de un adenocarcinoma de colon humano) en medio de cultivo DMEM durante 48 h a 37°C hasta obtener una confluencia aproximada de 200.000 células por portaobjeto en placa de 24 pocillos. Por otro lado, se procedió con el cultivo anaeróbico de *P. xylanivorans*, durante 48 h a 39°C hasta obtener una concentración de 3×10^9 bacterias mL⁻¹. En el primer grupo de pocillos se incubaron *P. xylanivorans* y células SW480, a MOI de 2600, 200 o 100 bacterias por célula durante 1 h. Posteriormente se retiraron los inóculos y las monocapas se lavaron con PBS, a fin de retirar las bacterias no adheridas. Finalmente, los portaobjetos obtenidos de cada pocillo fueron coloreados con la tinción de Giemsa y analizados en el microscopio óptico. En el segundo grupo de pocillos, destinado al análisis por microscopía confocal, el inóculo bacteriano fue pre-incubado con Rodamina-Red:

un colorante que tiene afinidad tintorial por la pared celular bacteriana. Posteriormente, la incubación con las células se realizó en las mismas condiciones experimentales que para la tinción de Giemsa. Finalmente, las monocapas se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron (PBS-albúmina-saponina) y se incubaron con Faloidina-488, un reactivo con afinidad tintorial por el citoesqueleto de las células; para contrastar las células y facilitar la visualización de la adherencia bacteriana. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia.

Resultados y Discusión: al analizar los preparados teñidos con Giemsa, se observó una relación bacterias:célula (B:C) significativamente ($p < 0,001$) superior con la MOI 200 ($0,26 \pm 0,01$), en comparación la MOI 2600 ($0,19 \pm 0,02$). El porcentaje de bacterias libres fue significativamente superior con la MOI 2600 ($47,50 \pm 3,54\%$) en comparación a la MOI 200 ($32,50 \pm 7,78\%$). Además, con la MOI 2600 se observó un mayor número de bacterias aglutinadas. El fenómeno de aglutinación ocurre por un exceso de bacterias que ocasiona unión de las bacterias entre sí, generando interferencias para adherirse a las células. No se observaron eventos de adherencia bacteriana ni bacterias libres al utilizar la MOI 100. Resultados similares fueron obtenidos al analizar los preparados mediante microscopía confocal. Otros investigadores obtuvieron una mayor relación B:C (2,5) cuando inocularon la cepa de referencia de *P. xylanivorans* a la línea celular CaCo-2 con una MOI 140.

Conclusión: los resultados preliminares de microscopía óptica y confocal permitieron establecer que con una MOI de 200, se observa una mayor adherencia de *P. xylanivorans* a las células, disminuyendo el fenómeno de aglutinación bacteriana. Como perspectiva, se planean realizar ensayos de adherencia con la línea celular CaCo-2 que permitirá comparar los resultados con la cepa de referencia.