

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio (2do año)

PERIODO 04/2013-04/2014

1. APELLIDO: Merlo

NOMBRES: Julieta

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Mar del Plata **CP:** 7600 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): jmerlo@mdp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

"Evaluación de los factores que modulan la variabilidad en la magnitud de la respuesta inmune en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*: parasitismo"

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2013

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento: Departamento de Biología

Cátedra:

Otros: Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC)-CONICET

Dirección: Calle: Funes **N°:** 3250

Localidad: Mar del Plata **CP:** 7600 **Tel:** 475 3150

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Cutrera, Ana Paula

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Mar del Plata **CP:** 7600 **Tel:**

Dirección electrónica: acutrera@mdp.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

De acuerdo al plan de trabajo propuesto para el período **04/2013 – 04/2014**, hasta el momento las labores desarrolladas fueron las siguientes:

Puesta a punto del cultivo de *Eimeria* sp. y determinación de dosis antiparasitarias (abril-mayo 2013): a partir de antecedentes bibliográficos reportados para organismos relacionados y experimentación en *C. talarum* se diseñó un protocolo para el aislamiento y esporulación de quistes

de *Eimeria* sp., los cuales son requeridos para el desarrollo de la experimentación propuesta. Los quistes se obtuvieron de heces de individuos capturados que presentaban alto grado natural de parasitismo por parte de este protozoo. El protocolo obtenido consiste en el burbujeo (mediante el uso de un aireador) de estas heces en solución de dicromato de potasio durante 5 días y posterior lavado, filtrado y concentración de los quistes infectivos. Además, se determinó la dosis adecuada de Ivermectina y Toltrazol para la especie, la cual permite la eliminación de casi la totalidad de los endoparásitos sin dañar al individuo. Se monitoreó el efecto de distintas dosis en la liberación de huevos/ooquistes en las heces durante los días posteriores a la inoculación de los antiparasitarios. Las dosis mínimas efectivas fueron: 40 µl Toltrazol/ 100 g peso corporal, vía oral y 25 µl Ivermectina/ 100 g peso corporal, vía oral.

Captura y colecta de muestras a campo: desde junio de 2013 (inicio período reproductivo) se capturaron individuos adultos de *C. talarum* en la localidad de Mar de Cobo; 9 hembras (122 ± 21 g) y 13 machos (154 ± 35 g). La obtención de muestras a campo (extendido de sangre y recolección de heces) así como la determinación de la condición de las hembras (preñez/no preñez) se realizó sin dificultad para todos los individuos capturados. Los individuos fueron trasladados al bioterio donde fueron aleatoriamente designados a un grupo experimental: 1) 0 quistes *Eimeria* sp.; $n = 5$, 2) 500 quistes *Eimeria* sp.; $n = 7$, 3) carga natural; $n = 10$. Se decidió agregar el grupo “carga natural” al proyecto para evaluar también en qué medida las infecciones parasitarias intermedias (naturales) de *Eimeria* sp afectan la respuesta inmune mediada por células e innata en *C. talarum*. Al ingresar al bioterio, se cepilló el pelaje de cada individuo para obtener los ectoparásitos presentes e cada uno y se inoculó a los individuos de los grupos 1) y 2) con la dosis determinada de antiparasitarios. Una vez terminados los experimentos, los individuos fueron devueltos al sitio de captura. Las capturas de individuos continuarán en los meses restantes de la época reproductiva (hasta diciembre de 2013) hasta completar el $n = 60$ propuesto en el plan.

Día 7 de cautiverio: pasado el período de aclimatación de los individuos a la condición de cautiverio (7 días desde la captura) se procedió a colectar heces, cepillar el pelaje, pesarlos (hembras: 128 ± 19 g, machos: 155 ± 32 g), realizar un extendido de sangre e inocular a los individuos del grupo 1) con PBS (buffer fosfato salino) y a los del grupo 2) con 500 quistes de *Eimeria* sp.

Día 14 (10 de los 22 individuos capturados aún no llegaron a esta instancia): se procedió a la extracción de sangre del seno retro-orbital de los individuos ($n = 12$) para los siguientes ensayos: hematocrito, perfil leucocitario, determinación de triglicéridos, glucosa, cortisol, actividad del complemento y anticuerpos naturales, capacidad bactericida. Se agregaron 5 determinaciones en sangre a lo planteado en el proyecto, con el objeto de observar de una manera más amplia el efecto del tratamiento con *Eimeria* sp.

Día 15: para que la extracción de sangre no influya en la respuesta inflamatoria, se esperó hasta el día siguiente (día 15) para inyectar PHA (fitohemaglutinina: Sigma L-8754 solución de 3 mg/ml, se aplicaron 0,3 µl/g peso corporal) en la pata trasera izquierda y PBS (control) en la pata trasera derecha de cada individuo. Previo a las inyecciones se midió el grosor de cada pata con un calibre digital.

Día 16: 24 h después de las inyecciones de PHA y PBS se midió el grosor de cada pata. Se estimó la inflamación para cada pata/individuo como $(\text{grosor } 24 \text{ h} - \text{grosor previo}) / \text{grosor } 24 \text{ h}$. La inflamación promedio fue: PHA = $0,24 \pm 0,13 \text{ mm}$, $n = 6$; PBS = $0,04 \pm 0,05 \text{ mm}$, $n = 6$.

Análisis de muestras. Evaluación de las cargas ecto y endoparasitarias: Las muestras de ectoparásitos del pelaje se conservan para su posterior identificación morfológica bajo lupa. A partir de las heces colectadas en el campo y al día 7, se obtuvieron los huevos/ooquistes utilizando la técnica de flotación de Sheather, los cuales se cuantificaron bajo microscopio utilizando una cámara tipo MacMaster. Estos incluyeron nematodos gastrointestinales (*Trichuris pampeana*, *Paraspidodera uncinata*, *Graphidioides subterraneus* y *Pudica ctenomydis*) y un protozoo intestinal (*Eimeria* sp.). La carga parasitaria de cada individuo se estimará mediante el cálculo de índices de diversidad H.

Perfil leucocitario: los extendidos de sangre realizados a campo, 7 y 14 días se fijaron en metanol y se conservan para su posterior tinción y observación en microscopio óptico. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente en esta especie por lo cual no se esperan inconvenientes al momento de la realización de las observaciones.

Hematocrito: se realizó sin dificultad para todos los individuos a los que se les extrajo sangre. $\text{Hemat}_{\text{hembras}} = 48 \pm 2,4$, $n = 6$; $\text{hemat}_{\text{machos}} = 57 \pm 3,5$, $n = 6$.

Triglicéridos: Se determinó la concentración de triglicéridos en plasma mediante el método enzimático TG color (Wiener®) en 12 individuos, hasta el momento ($\text{TG}_{\text{hembras}} = 2,88 \pm 2 \text{ g/l}$, $n = 6$; $\text{TG}_{\text{machos}} = 2,08 \pm 0,94 \text{ g/l}$, $n = 6$).

Glucosa: se determinó el nivel de glucosa para los 12 individuos ($\text{Gluc}_{\text{hembras}} = 96 \pm 58 \text{ mg/dl}$, $n = 6$; $\text{gluc}_{\text{machos}} = 77 \pm 21 \text{ mg/dl}$, $n = 6$) utilizando un glucómetro Accu-Chek Active®.

Cortisol: las muestras de plasma (50 μl por cada individuo) destinadas a la determinación de cortisol se conservan en freezer a -20°C para su posterior envío al Laboratorio de Análisis Clínicos Dr. Daniel Samaruga, donde utilizan un kit Coat-A-Count (Siemens Medical Solutions Diagnostics) de radioinmunoensayo, previamente validado para *C. talarum* (Vera et. al 2011).

Actividad del complemento y anticuerpos naturales: se separó plasma y se mantiene en freezer a -20°C para la posterior realización de los ensayos de hemólisis-hemoaglutinación. Este ensayo ya ha sido realizado en esta especie para el proyecto de Beca de Estudio 2012 (primer año) sin dificultades.

Capacidad bactericida: Se realizaron ensayos de evaluación de capacidad bactericida del plasma de los individuos siguiendo el protocolo de Liebl y Martin (2009) por medio de medición de densidad óptica a 600 nm empleando un espectrofotómetro. Brevemente, durante estos ensayos preliminares, se determinó la curva de crecimiento de *Escherichia coli* a partir de un inóculo de glicerol stock incubado overnight a 37°C con agitación y se definió la concentración inicial del cultivo más apropiada para el análisis. Además, se comparó la capacidad bactericida de sangre y plasma mediante la técnica de crecimiento en placa (LB + agar), siendo éstas similares. Debido a que la fracción celular de la sangre dificulta la determinación de la capacidad bactericida por espectrofotometría, se decidió emplear plasma. De esta manera, se determinó la capacidad bactericida del plasma de 12 individuos ($\text{Cap. Bactericida}_{\text{hembras}} = 7,63\% \pm 2,59$, $n = 6$; Cap.

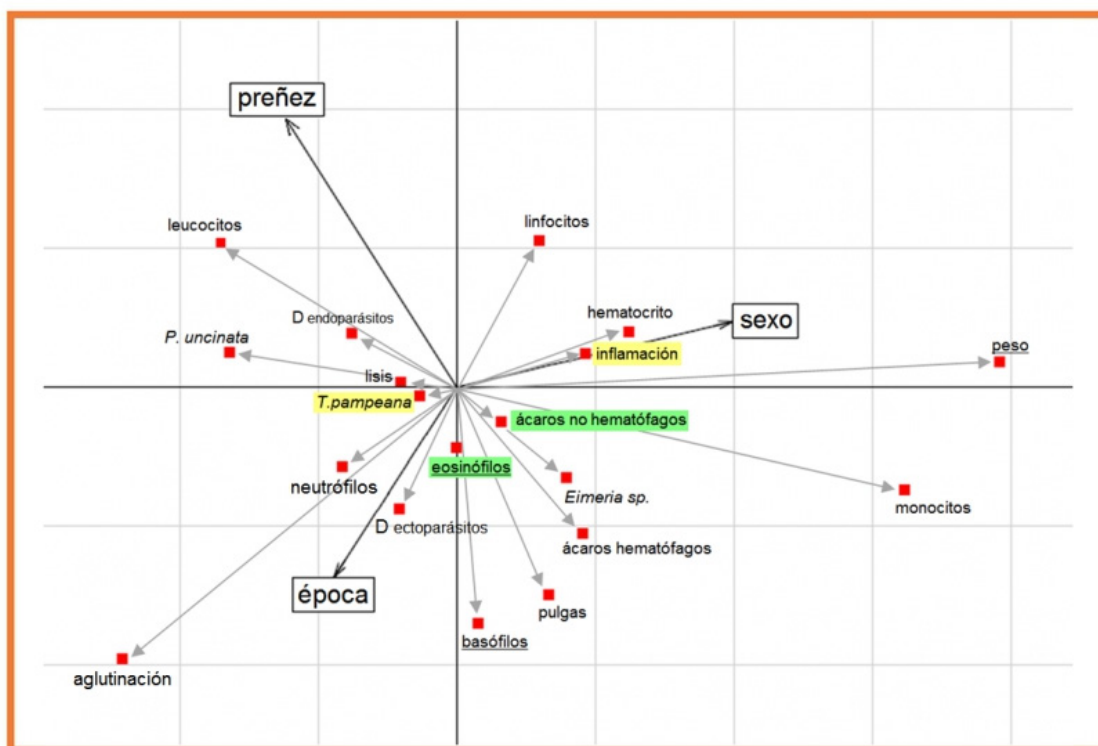
Bactericida_{machos} = 7,97% ± 3,61, n = 6). Para los restantes, el plasma se encuentra mantenido en freezer a -20°C para ser analizado en los próximos días.

Análisis estadísticos: los análisis propuestos para los datos consisten en ANOVAs de dos vías para analizar el efecto del tratamiento (nivel de infección por *Eimeria* sp.: grupos 1, 2 y 3) y la condición reproductiva (hembra preñada, hembra no preñada, macho) sobre cada variable estimada (respuesta inmune inflamatoria, diversidad de endo y ectoparásitos, hematocrito, actividad del complemento, actividad de anticuerpos naturales, etc.). Dado que aún resta capturar individuos para completar los ensayos y analizar las muestras que se tienen conservadas, no se cuenta aun con resultados de estas pruebas estadísticas. Se proyecta completar la obtención de los datos necesarios en enero/febrero y analizar los mismos en marzo.

Con respecto a los análisis pendientes del plan de trabajo previo (**período 04/2012 – 04/2013**) cuyo objetivo era "determinar las asociaciones entre la carga parasitaria, la condición física y la capacidad de respuesta inmune inflamatoria en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*", los principales resultados fueron:

- Las especies de ectoparásitos encontradas en los individuos fueron: *Polygenis* sp. (pulga), *Eulinognathus* sp. (piojo) y ácaros de las familias Laelapidae y Listrophoridae. Los huevos/ooquistes de endoparásitos encontrados en las heces pertenecieron a las especies: *Trichuris pampeana*, *Paraspidodera uncinata* y *Eimeria* sp.
- La inyección subcutánea de PHA desencadenó una respuesta inflamatoria acorde a datos previos (Merlo 2011).
- El análisis de co-inercia (COi; Fig.1) reveló una asociación significativa entre las matrices de datos categóricos (análisis de correspondencia) y de datos continuos (análisis de componentes principales; $R_v = 0.246$, $p < 0.001$).
- Los dos primeros ejes del COi explicaron el 58.36% del total de la varianza (eje 1 = 43.67%; eje 2 = 14.69%). El eje 1 se observó estructurado principalmente por el peso corporal y la actividad lítica del complemento. El segundo eje estuvo estructurado principalmente por la abundancia de basófilos y eosinófilos en sangre periférica.
- Los análisis de riesgo detectaron asociaciones significativas entre la magnitud de la inflamación y la abundancia de *T. pampeana* (asociación negativa; $RR = 0.22$, $p = 0.0048$) y entre la abundancia de eosinófilos en sangre periférica y la abundancia de ácaros no hematófagos (asociación positiva; $RR = 2.09$, $p = 0.038$).

Fig. 1:



Los resultados de este proyecto se expondrán en el 1er Congreso Internacional Científico y Tecnológico y en las XXVI Jornadas Argentinas de Mastozoología.

Durante este período se ha enviado a publicar un manuscrito “Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the tuco-tuco *Ctenomys talarum*: implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents”. Actualmente, un segundo manuscrito que refiere a la evaluación de los costos energéticos asociados a la respuesta inflamatoria se encuentra en etapa final de redacción. A continuación, se elaborará un tercer manuscrito que corresponderá al plan de trabajo del período 04/2012-04/2013 y que se refiere a los resultados que se exponen de manera sintética arriba.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA.

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

1. “Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the tuco-tuco *Ctenomys talarum*: implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents”

Merlo, J.L., A. P. Cutrera y R. R. Zenuto

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

1. Análisis de los costos energéticos de la respuesta inflamatoria y de los compromisos con la reproducción en el tuco-tuco de los talas (*Ctenomys talarum*)

El trabajo se encuentra en la etapa final de escritura para su publicación.

Autores: **Merlo**, J.L., A.P. Cutrera, F. Luna y R.R. Zenuto.

2. Análisis de los costos energéticos de la respuesta inflamatoria en crías del tuco-tuco de los talas (*Ctenomys talarum*): compromisos entre defensa inmune y crecimiento.

El trabajo se encuentra en la etapa final de escritura para su publicación.

Autores: Cutrera, A.P., F. Luna, M.B. Baldo, J.L. **Merlo**, C.D. Antinuchi.

3. Evaluación de posibles factores moduladores de la respuesta inmune en *Ctenomys talarum*.

El trabajo se encuentra en la etapa inicial de escritura para su publicación.

Autores: **Merlo**, J.L., A.P. Cutrera, F. Luna y R.R. Zenuto.

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

1. "Factores que modulan la respuesta inmune en *Ctenomys talarum*"

Autores: Merlo, J.L.

1er Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología

A desarrollarse los días 19 y 20 de septiembre de 2013 en La Plata.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

1. Curso de Postgrado: "**Integración de Sistemas: de las moléculas al organismo**" Dictado entre los días 8 de marzo al 28 de junio de 2013. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP. 68 hs totales. Aprobado

2. Curso de Postgrado: "**Epistemología**" Dictado entre los días 30 de agosto al 29 de noviembre de 2013. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP. 102 hs totales. cursando actualmente.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES

(Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

1. Como miembro de la Asociación Jóvenes Investigadores en Formación (A.J.I.F., ISBN 619-005-20-11): miembro del comité organizador del VIII Encuentro Anual de Biólogos en Red a desarrollarse los días 14 y 15 de noviembre de 2013 en Mar del Plata; coordinadora e integrante del equipo "AGUAcadabra" que desarrolla durante el mes de septiembre de 2013 (Mes de la Ciencia) actividades de laboratorio en escuelas primarias y secundarias públicas de nuestra ciudad (ej: EPB n°44, EPB n°47, ESB n°9).

2. Cursando 4 to nivel de Idioma Inglés en el Laboratorio de Idiomas de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Curso anual.

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

"Evaluación de los factores que modulan la variabilidad en la magnitud de la respuesta inmune en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*: influencia de la cantidad y calidad de la dieta"

Acciones a desarrollar: ver Solicitud de Beca de Entrenamiento 2014

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....

Firma del Director

.....

Firma del Becario