

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**EFFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO Y VITAMINA D SOBRE LA INVASIÓN
DE *Staphylococcus aureus* EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS
BOVINAS**



QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ANA DOLORES TÉLLEZ PÉREZ

ASESOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

COASESORA:

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN

ENERO DEL 2011

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**EFFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO Y VITAMINA D SOBRE LA INVASIÓN
DE *Staphylococcus aureus* EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS
BOVINAS**



QUE PRESENTA:

ANA DOLORES TÉLLEZ PÉREZ

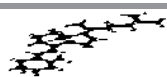
PARA OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

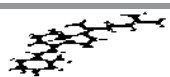
ENERO DEL 2011

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de los proyectos CONACYT (101451), CIC-UMSNH (14.5) y FOMIX (MICH-2009-C05-115910).

6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos particulares	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Estrategia experimental	21
7.2 Cepas y reactivos	22
7.3 Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino	22
7.4 Efecto de la vitamina D en el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	22
7.5 Efecto de la vitamina D en la viabilidad de las CEMB	23
7.6 Ensayo de infección de <i>S. aureus</i> 27543 en las CEMB en presencia de la vitamina D	23
7.7 Ensayo de infección de <i>S. aureus</i> 27543 en las CEMB en presencia de la vitamina D y el butirato de sodio	24
7.8 Cuantificación de óxido nítrico (NO) producido por las CEMB en presencia de la vitamina D	24
7.9 Extracción del ARN total de las CEMB y obtención del ADNc	24
7.10 PCR	
7.11 Análisis densitométrico	25
7.12 Análisis estadístico	25
8. RESULTADOS	27
8.1 Evaluación del crecimiento de <i>S. aureus</i> 27543 en presencia de las diferentes concentraciones de la vitamina D	27
8.2 Bioensayo de viabilidad de las CEMB en presencia de la vitamina D	28
8.3 Evaluación del efecto de la vitamina D sobre la invasión de <i>S. aureus</i> 27543 en las CEMB	28
8.4 Evaluación del efecto de la vitamina D y el butirato de sodio sobre la invasión de <i>S. aureus</i> 27543 en las CEMB	30
8.5 Cuantificación de la producción del óxido nítrico (NO) por las CEMB tratadas con la vitamina D y el butirato de sodio	31
8.6 Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune innata	32

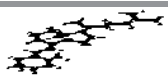


9. DISCUSIÓN	35
10. CONCLUSIONES	42
11. LITERATURA CITADA	43



ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Estructura anatómica de la glándula mamaria bovina	4
FIGURA 2	Representación esquemática de la invasión de <i>S. aureus</i> en la glándula mamaria bovina	8
FIGURA 3	Evaluación del crecimiento de <i>S. aureus</i> en presencia de la vitamina D	27
FIGURA 4	Efecto de la vitamina D en la viabilidad de las CEMB	28
FIGURA 5	Evaluación de la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB en presencia de la vitamina D	29
FIGURA 6	Evaluación de la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB en presencia de la vitamina D y el butirato de sodio	30
FIGURA 7	Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con vitamina D e infectadas	31
FIGURA 8	Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con vitamina D y butirato de sodio e infectadas	32
FIGURA 9	Expresión del ARNm de iNOS en las CEMB tratadas con vitamina D e infectadas	33
FIGURA 10	Expresión del ARNm de TAP en las CEMB tratadas con vitamina D	34

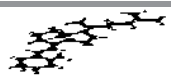


ÍNDICE DE CUADROS

Página

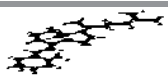
Cuadro 1

16



LISTA DE ABREVIACIONES

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
CD	Células dendríticas
CS	Células somáticas
CEMB	Células de epitelio mamario bovino
DO	Densidad óptica
Co	Cobalto
DTT	Ditiotreitol
Fe	Hierro
FnBP	Proteína de unión a fibronectina
IFN	Interferón
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
LT	Linfocitos
LTh	Linfocitos "helper"
LTc	Linfocitos citotóxicos
MDI	Multiplicidad de invasión
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetil-2, tiazolil)-2,5-difenil 2H-tetrazolio
NO	Óxido nítrico
nVDR	Receptor nuclear de vitamina D
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcripción reversa
SDS	Lauril sulfato de sodio
TAP	Péptido antimicrobiano traqueal
TNF	Factor de necrosis tumoral

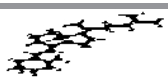


1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad más frecuente y costosa de la ganadería lechera a nivel mundial, la cual ocasiona pérdidas productivas y económicas, ésto debido a la disminución de la calidad y producción de la leche, los costos del tratamiento y el desecho temprano del ganado lechero (Rainard *et al.*, 2008). La mastitis bovina es una enfermedad que presenta daños patológicos localizados o generalizados, y dependiendo de la magnitud de los daños puede tener manifestaciones clínicas y subclínicas (Kerro-Dego *et al.*, 2002). La enfermedad está relacionada con factores genéticos, nutricionales, ambientales y el manejo durante el ordeño, los cuales predisponen al animal (Schrick *et al.*, 2001). La mastitis bovina es causada principalmente por bacterias, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente causal aislado de la ubre, microorganismo que puede estar presente por largos periodos de tiempo y produciendo signos severos en la ubre (Sharif *et al.*, 2009). Parte del éxito de *S. aureus* como patógeno se debe a que tiene la capacidad de producir productos extracelulares que le permiten evadir las barreras del sistema inmunológico e invadir la célula (Garzoni *et al.*, 2009).

La mastitis bovina se presenta con mayor frecuencia en la época de la lactancia, siendo el canal del pezón la principal vía de entrada ya que se encuentra abierto al momento del ordeño y expuesto a una gran cantidad de agentes infecciosos. Al producirse una infección en la glándula mamaria el tejido glandular es el principal blanco de la infección (básicamente las células epiteliales), por lo tanto la leche y sus componentes quedan en contacto con los elementos infectados al momento del ordeño (Miller *et al.*, 2007).

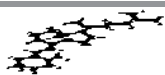
La leche es uno de los principales alimentos de la dieta de los humanos ya que cuenta con un alto contenido de proteínas, ácidos grasos esenciales, inmunoglobulinas y una excelente fuente de vitaminas y minerales. Además de sus propiedades nutrimentales, ciertos componentes de la leche juegan un papel importante en la defensa del organismo, particularmente las vitaminas y los ácidos



grasos (Stelwagen *et al.*, 2009). Las vitaminas son un componente esencial de la leche con reconocidos efectos reguladores en procesos fisiológicos; sin embargo, en años recientes se ha descrito que llevan a cabo acciones sobre el sistema inmunológico (Maggini *et al.*, 2007). Dentro de las vitaminas de la leche destaca la vitamina D, cuya principal función es regular el metabolismo del calcio y el fosforo en el organismo; no obstante, se ha demostrado que ejerce ciertas funciones en la modulación de la respuesta inmune, particularmente de la inmunidad innata, a través de regular la expresión de los genes que codifican para citocinas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos. Adicionalmente, se ha reportado que puede ejercer actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* (Eun, 2010). No obstante, hasta el momento se desconoce su participación en el proceso de infección de *S. aureus* en la glándula mamaria.

En relación a los ácidos grasos de la leche destacan los denominados ácidos grasos de cadena corta, estos participan en un gran número de procesos celulares como la proliferación y el ciclo celular, la expresión de genes de la inmunidad innata, entre otros. En el caso de la leche bovina, destaca el ácido butírico ya que es el único grupo de mamíferos que lo produce como componente de la leche. En relación con la mastitis bovina, investigaciones recientes demuestran que la sal de sodio del ácido butírico inhibe la internalización de *S. aureus* y a través de una regulación positiva estimula la expresión de péptidos antimicrobianos en células de epitelio mamario bovino (CEMB) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

En base a que la mastitis bovina es una patología de la glándula mamaria y de que ciertas moléculas de la leche bovina (ej. vitamina y ácidos grasos) modulan componentes del sistema inmune (ej. inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos), en este trabajo se evaluó el efecto de la participación conjunta del butirato de sodio y la vitamina D en la invasión de CEMB por *Staphylococcus aureus*.

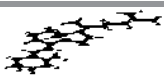


2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La ubre de la vaca se localiza en la región inguinal y consta de cuatro glándulas, cada uno de estos complejos glandulares es completamente independiente, con su propia estructura secretora la cual se comunica con el exterior a través de su pezón. El desarrollo mamario inicia durante la vida fetal en el ectodermo embrionario formando el tejido glandular (parénquima), después del nacimiento los conductos primarios se ramifican y proliferan a racimos de células alveolares epiteliales organizadas en estructuras esféricas vacías llamadas alvéolos, que son las unidades fundamentales secretoras de la leche. El tejido glandular se encuentra dispuesto en lobulillos, cada uno consiste de unos 200 alvéolos, los cuales a su vez se reagrupan en lóbulos (Ruckebusch *et al.*, 2000).

La glándula mamaria bovina se compone principalmente de dos tipos de tejidos, el tejido glandular o secretor de leche y el tejido conectivo, ambos protegen y le dan soporte a todo el tejido glandular y a los vasos sanguíneos que lo nutren. La estructura interna está formada por un sistema de lóbulos y conductos: los alveolos, los canales lácteos, la cisterna de la glándula y la cisterna del pezón (Figura 1). Los alveolos se encuentran formados por células glandulares con secreción apocrina, rodeados por los conductos de células mioepiteliales contráctiles, células epiteliales alveolares y por los vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos que se ramifican a lo largo del estroma en relación con el epitelio. La actividad de la célula secretora incluye tres fases: secreción, excreción y reposo. En la primera de ellas se sintetizan los componentes de la leche que se acumulan en el polo apical de la célula (el más próximo al lumen o luz del alveolo). Durante la fase excretora, los componentes de la leche son vertidos hacia la luz del alveolo pasando a un sistema de conductos lactíferos, luego se almacena en la cisterna de la glándula mamaria y por último en la cisterna del pezón hasta que se produce el amamantamiento o el ordeño. El vaciado de la ubre libera de la presión



intraalveolar, permitiendo otra vez la síntesis de leche. Además, el vaciado de la ubre estimula la producción de la hormona prolactina, la cual contribuye al mantenimiento de la lactación, de modo que mientras que se produzca regularmente el vaciado seguirá habiendo producción de leche (Roginski *et al.*, 2003).

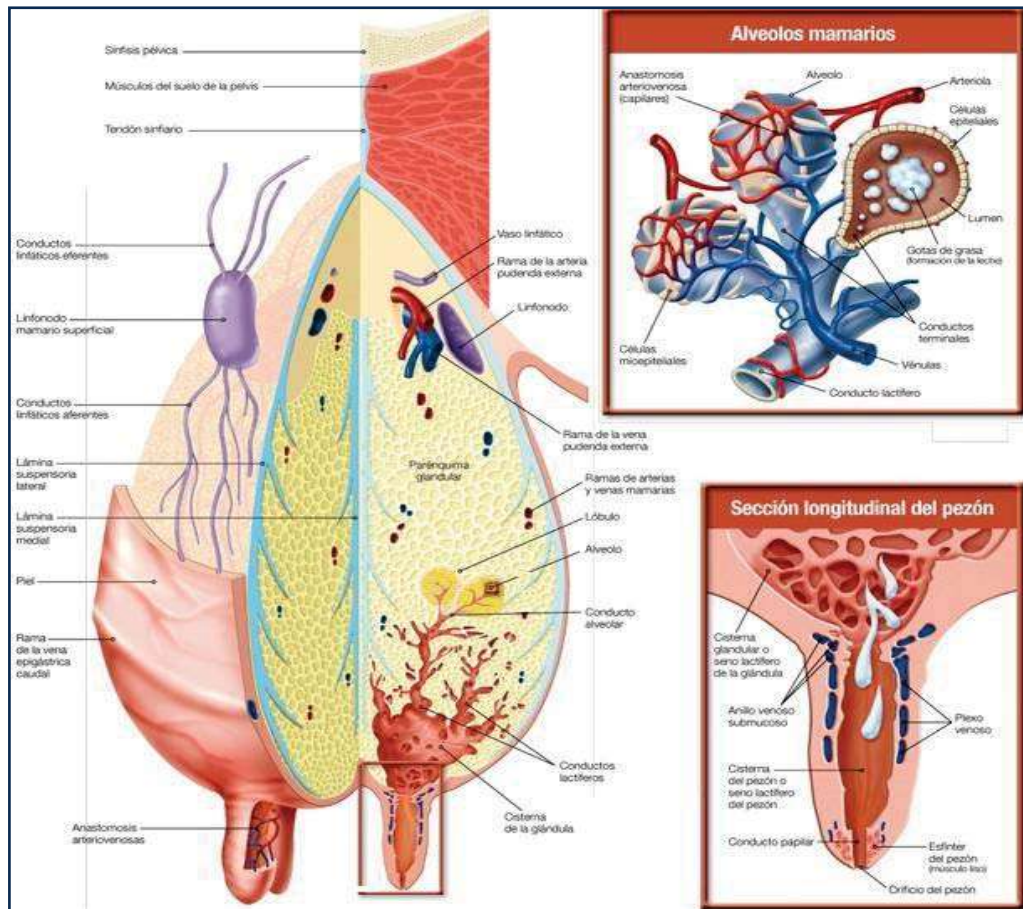
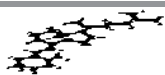


Figura 1. Estructura anatómica de la glándula mamaria bovina. Tomada de: www.servet.es/i/posteres/p_ubre.jpg.



2.2 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

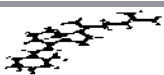
La glándula mamaria bovina esta expuesta al ataque constante de patógenos, particularmente durante la lactancia, por lo cual cuenta con diversos mecanismos de defensa, destacando los anatómicos, celulares e inmunológicos. La respuesta inmunitaria de la glándula mamaria contra los agentes infecciosos involucra una compleja interacción entre diferentes tipos celulares y sus productos. Sin embargo, se pueden agrupar en dos grandes categorías: la inmunidad innata y la inmunidad específica, que a su vez activan mecanismos anatómicos, celulares y humorales que interactúan en conjunto para proveer protección contra los microorganismos causantes de la mastitis (Pascal *et al.*, 2006).

2.2.1 MECANISMOS ANATÓMICOS

El canal del pezón es la principal puerta de entrada a numerosos microorganismos causantes de la mastitis. El conducto del pezón y la piel son la primera barrera de defensa contra los patógenos, el musculo liso y la elasticidad del conducto del pezón permite que se mantenga cerrado, limitando el ingreso bacteriano. El tapón de queratina formado en el orificio del pezón evita la migración de microorganismos hacia el interior, ejerce un efecto físico de absorción de las bacterias impidiendo su paso, el cual es removido por presión de la leche durante el ordeño (Sordillo *et al.*, 2002). La piel de la glándula mamaria debe estar sana manteniendo su humedad y sus características de flexibilidad y suavidad, si estas condiciones se pierden, el contenido ácido de la piel cambiará y será más fácil la colonización de patógenos en la ubre (Pascal *et al.*, 2006).

2.2.2 MECANISMOS CELULARES

La secreción láctea posee un componente celular constituido básicamente por macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos y en menor cantidad células dendríticas, conocido en su conjunto como células somáticas (CS). Las CS son un componente normal de la secreción láctea, cuyo número y proporción varía dependiendo del estado fisiológico en que se encuentre la glándula mamaria, como también de su grado de infección (Pyörälä, 2003). Durante la presencia de

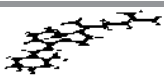


microorganismos patógenos en la glándula mamaria, la respuesta inmune es activada por la acción de diferentes células del sistema inmunológico. El antígeno es identificado y fagocitado por las células presentadoras de antígenos, principalmente macrófagos, lo que genera una respuesta inmune y como resultado de esta interacción inicia la respuesta inflamatoria y la secreción de citocinas pro-inflamatorias, entre las que predominan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β) estimulando el reclutamiento de neutrófilos y su acción fagocítica (Stelwagen *et al.*, 2009).

2.2.3 MECANISMOS HUMORALES

La respuesta inmune de la glándula mamaria se activa por la presencia de microorganismo patógenos y se inicia por el estímulo de los componentes de las diferentes células del sistema inmunológico. Las citocinas son un grupo de proteínas inmunomoduladoras que se encargan de la constitución y mantenimiento de la respuesta inmunitaria, como también de los procesos inflamatorios. Se ha encontrado una gran variedad de citocinas pro-inflamatorias en la glándula mamaria bovina, ejemplo de ellas son las interleucinas (IL-1, IL-2), TNF- α , e interferones (IFN- α , β , γ) (Lee *et al.*, 2006).

La interacción de la respuesta inmune innata y adquirida es esencial para la defensa de la glándula mamaria contra la internalización y proliferación de microorganismos patógenos (Collado *et al.*, 2008). La glándula mamaria cuenta con otros mecanismos de defensa, tales como: 1) el sistema del complemento presente en el suero y la leche, compuesto por una serie de proteínas que una vez activadas ejercen funciones como la opsonización de microorganismos, quimiotaxis de neutrofilos y la lisis de bacterias; 2) la lactoferrina que es una proteína producida por las células epiteliales y fagocitos de la glándula mamaria, ésta se incrementa en procesos inflamatorios y actúa inhibiendo el crecimiento de bacterias dependientes de hierro (Fe); 3) el sistema de la lactoperoxidasa, siempre esta presente en la leche y su función antibacteriana es la formación de hipotiocianato, ejerciendo un efecto oxidativo sobre las enzimas bacterianas; 4) La producción de óxido nítrico a través de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS),

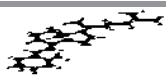


esta molécula tiene un papel importante en la actividad antimicrobiana y se produce a partir de L-arginina (Zeconni *et al.*, 2000).

2.3 MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es una enfermedad que se presenta en la etapa final del periodo seco y al inicio del periodo de lactancia, es de etiología compleja y se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche a traumatismos iatrogénicos o lesiones, irritaciones químicas, pero principalmente a la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre. Se define como una enfermedad multifactorial ya que el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para contrarrestarla, del tipo, número y patogenicidad de las bacterias presentes y fundamentalmente, de las condiciones del medio ambiente y del manejo general y sanitario del ordeño (Zhao *et al.*, 2007).

Las infecciones de la glándula mamaria se presentan cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican dentro de la glándula mamaria (Figura 2). De acuerdo al daño del epitelio glandular y el grado de inflamación de la ubre, la mastitis principalmente se clasifica en subclínica y clínica. La mastitis subclínica no presenta signos visibles y la leche parece normal, a pesar de ello, las células somáticas se encuentran elevadas. La mastitis clínica se manifiesta de forma aguda y crónica; en la forma aguda se observa una ubre roja, hinchada y con dolor, con tejido fibroso, leche anormal y disminución de la producción de leche, la vaca muestra signos generalizados: fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito y reducción aguda de la producción de leche; la forma crónica se manifiesta por cambios morfológicos en el aumento del tejido glandular y en la palpación (Roginski *et al.*, 2003).



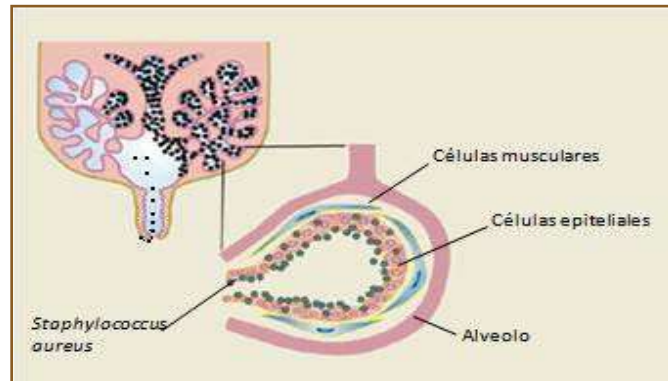


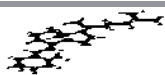
Figura 2. Representación esquemática de la invasión de *S. aureus* en la glándula mamaria bovina.

2.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS ASOCIADOS A MASTITIS BOVINA

Los organismos causantes de la mastitis bovina han sido clasificados en patógenos contagiosos y ambientales. Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria y la piel del pezón, los cuales se transmiten de animal a animal, entre ellos se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y especies de *Mycoplasma*. Los patógenos ambientales se encuentran en las instalaciones, corrales, echaderos o camas, tales como: los estreptococos ambientales que incluyen a *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactie*, y las bacterias coliformes principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter aerogenes* (Avila et al., 2009).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

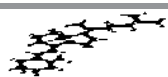
S. aureus es una bacteria esférica Gram positiva, generalmente dispuesta en racimos. Pertenece a la familia Micrococcaceae, posee un diámetro de aproximadamente 0.8 micrómetros, es inmóvil y no forma esporas, además es patógeno anaerobio facultativo. Se identifica con las pruebas de la coagulasa, manitol y termonucleasa, para las cuales es positivo. Es una bacteria reconocida por su gran capacidad para producir productos extracelulares y es uno de los



microorganismos con frecuencias altas de resistencia antimicrobiana (Cucarella *et al.*, 2001). En ocasiones actúa como agente etiológico de procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales domésticos, por lo que se considera un microorganismo zoonótico. Esto se debe a que posee un gran número de factores potenciales de patogenicidad que le permiten colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos (Garzoni *et al.*, 2007).

S. aureus es el principal agente patógeno aislado de casos de mastitis bovina, se clasifica dentro de los microorganismos contagiosos que afectan a la glándula mamaria y provoca grandes pérdidas económicas a la ganadería lechera a nivel mundial. El 60%-80% de los casos de mastitis bovina están dados por este microorganismo. Una de los mecanismos que utiliza para tener éxito es la capacidad que tienen ciertas cepas de *S. aureus* para invadir el epitelio mamario bovino, internalizarse y sobrevivir dentro de él (Buzzola *et al.*, 2007). Es un agente que normalmente no se encuentra en la piel sana, pero en caso de existir lesiones en la piel o heridas en el orificio del pezón, éstos se convierten en los principales reservorios de *S. aureus*, aumentando la susceptibilidad a la infección. Las bacterias presentes en estos reservorios pueden ser introducidas a la ubre, principalmente por el contacto con la leche en el momento en el que ocurre el llenado de la cisterna del pezón (Roginski *et al.*, 2003).

Ciertas cepas de *S. aureus* tienen la capacidad de invadir las células del epitelio mamario bovino (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Para ello, la adherencia de *S. aureus* a la superficie celular es el primer paso en el proceso de colonización e infección de la célula hospedera. La internalización se lleva a cabo por medio de un mecanismo llamado "zipper". Para adherirse a la superficie celular, *S. aureus* expresa un conjunto de adhesinas, que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs). Entre estas adhesinas se encuentran la proteína de unión a fibronectina (FnBP) que forma un complejo Fn-FnBP, que funciona como un ligando de alta afinidad para el receptor de integrina- β 1 de la célula hospedera, lo que estimula la polimerización de actina. La bacteria se endocita formando una

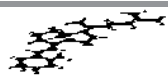


gran vacuola que es transportada al interior de la célula (Alexander, 2001; Kerro-Dego *et al.*, 2002).

2.5 COMPONENTES DE LA LECHE BOVINA

La leche se define como una suspensión secretada por la glándula mamaria de la vaca, compuesta por agua, grasa, proteínas, azúcares, vitaminas (C, B, A, D, y K) y minerales, además de otros micronutrientes que están en menor concentración. Su composición varía de acuerdo a numerosos factores, tales como: la raza, etapa de lactación y alimentación. La leche bovina contiene aproximadamente el 87% de agua, el 4.6% de lactosa, 3.4% de proteínas, 4.2% de grasa, 0.8% de minerales y 0.1% de vitaminas (Lindmark, 2008).

La leche contiene 4.9% de carbohidratos siendo la lactosa la más abundante, éste es un disacárido compuesto por moléculas de glucosa y galactosa. Las proteínas abundan en un 3.4%, las cuales contienen todos los aminoácidos esenciales requeridos por los seres humanos, éstas se sintetizan en la glándula mamaria y se clasifican por su composición química y propiedades físicas. La familia de la caseína está formada por varios tipos (α -s1, s2- α , β , y δ) y cada uno tiene su propia composición de aminoácidos. Las proteínas del suero no contienen fósforo y se componen aproximadamente del 50% de beta-lactoglobulina, 20% de α -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina, y otras proteínas y enzimas de menor importancia. La leche contiene aproximadamente el 4% de grasa total. Más de 400 ácidos grasos han sido identificados en la grasa láctea. Sin embargo, aproximadamente 15 a 20 ácidos grasos constituyen el 90% de la grasa de la leche, los cuales son la principal fuente de energía proporcionada por la leche, con propiedades fisiológicas y responsables de las propiedades organolépticas de la leche. Los ácidos grasos se dividen en tres grupos: ácidos grasos de cadena corta (butírico, hexanoico), cadena mediana (cáprico) y cadena larga (palmítico, linoleico), ésto debido a la cantidad de carbonos que contienen. Otros de los componentes importantes de la leche son las vitaminas, la leche



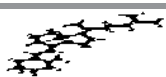
bovina contiene todas las requeridas por los mamíferos. Estas se clasifican en dos grupos: vitaminas liposolubles (A, D, E y K) que se encuentran principalmente en la grasa láctea y las vitaminas hidrosolubles que se encuentran en la fase acuosa. Las vitaminas ejercen funciones importantes en el organismo tales como: son cofactores de muchos procesos, actúan como antioxidantes y ayudan a metabolizar los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Otros de los micronutrientes contenidos en la leche son los minerales, los cuales tienen varias funciones como: la formación de hueso, función de ciertas enzimas, el mantenimiento del balance hídrico y el transporte de oxígeno. La leche es una buena fuente de calcio, magnesio, fósforo, potasio, selenio y zinc. Muchos minerales en la leche son asociadas entre sí en forma de sales, como el fosfato de calcio. En la leche aproximadamente el 67% del calcio, el 35% del magnesio, y el 44% del fosfato son sales, consolidados en la micela de caseína y el resto son solubles en el suero (Cashman, 2006).

2.5.1 LAS VITAMINAS DE LA LECHE BOVINA

Las vitaminas son compuestos orgánicos que se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su solubilidad. Sin embargo, esta propiedad hace que su síntesis y absorción sea por diferentes rutas, permitiendo su distribución y así poder ejercer su efecto.

2.5.2 VITAMINA A y β -caroteno

La vitamina A y el β -caroteno son una fuente importante de la leche bovina; estos elementos son sintetizados en el rumen y su conversión es llevada a cabo por enzimas de la mucosa de la pared intestinal en el animal (Parodi, 2004). Uno de los papeles más importantes de la vitamina A es el mantenimiento de los tejidos, principalmente los epiteliales, además colabora con el mantenimiento fisiológico de la visión y participa en la regulación de la respuesta inmune innata y de la respuesta inmune humoral (Maggini *et al.*, 2007).



2.5.3 LA VITAMINA E

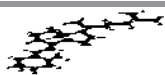
La vitamina E (tocoferol) ha sido reconocida como un antioxidante natural y más del 90% de la actividad es proporcionada por el metabolito α -tocoferol (Parodi, 2004). Los radicales libres y la peroxidación son inmunosupresores, por lo tanto la vitamina E se encarga de mantener bajas concentraciones tisulares de peróxidos, ya que si aumentan o se acumulan pueden producir graves daños celulares y tisulares. Distintas investigaciones reportan que la suplementación de vitamina E en la alimentación de los bovinos a finales de la gestación reduce la incidencia de mastitis en un 37% (Smith *et al.*, 1997).

2.5.4 LA VITAMINA K

La leche contiene muy bajas cantidades de vitamina K, aun así, es poco probable que ocurra una deficiencia, ya que se encuentra bien distribuida en otros alimentos. Es sintetizada por enzimas bacterianas del rumen e intestino en los bovinos (Parodi, 2004). La vitamina K es esencial para todas las especies, su principal función es la formación de protrombina y de algunos factores que forman parte de la cascada de la coagulación (Li *et al.*, 2003).

2.5.5 LAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B

Dentro de la variada síntesis por parte de los microorganismos ruminales, éstos tienen la capacidad de sintetizar todas las vitaminas hidrosolubles, incluyendo las vitaminas del complejo B. Las vitaminas del complejo B (tiamina, niacina, ác. pantoténico, riboflavina, ác. fólico, B6 y B12), se sintetizan por la fermentación microbiana de la microflora del rumen (Frank *et al.*, 2005). La vitamina B12 o cianocobalamina, es la molécula más larga y compleja de las vitaminas del complejo B, la cual necesita de un átomo de cobalto (Co) para formar una molécula de vitamina B₁₂. Participa en el metabolismo de las grasas, carbohidratos y proteínas, también juega un rol importante en la modulación de ciertas células del sistema inmune y en la producción de glóbulos rojos; además, en conjunto con el ácido fólico participa en la síntesis del aminoácido metionina. Otro de los elementos del complejo B que juegan un papel importante es la



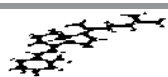
vitamina B₆, la cual participa en la síntesis de proteínas y en la diferenciación y modulación de ciertos componentes del sistema inmune (Maggini *et al.*, 2007).

2.5.6 LA VITAMINA C

La leche bovina no se considera una fuente importante de vitamina C, su contenido es bajo. La vitamina C está concentrada en los leucocitos durante un proceso infeccioso, de hecho, ha sido definida como un estimulante de la activación de los leucocitos y especialmente del movimiento de neutrófilos y monocitos. Estimula el sistema inmunológico, mejora la proliferación de linfocitos T en respuesta a la infección aumentando la producción de citocinas y la síntesis de inmunoglobulinas (Maggini *et al.*, 2007).

2.5.7 LA VITAMINA D

La vitamina D es esencial para la vida de los animales superiores incluyendo el hombre, siendo uno de los más importantes reguladores biológicos del metabolismo del calcio y fosforo. La vitamina D no es facilitada como tal en la dieta, el organismo la sintetiza a partir de varios precursores presentes en los alimentos los cuales se metabolizan hasta llegar a su forma activa. El metabolito precursor de la vitamina es hidroxilado en el hígado a 25-hidroxivitaminaD₃ (25-OH-D₃), que es la forma circulante y es convertido a la forma activa 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃, calcitriol o vitamina D₃) en el tubulo contorneado proximal del riñon, por la acción de la enzima 1 α -hidroxilasa. Estudios recientes han reportado que algunos tejidos como el epitelio mamario, la próstata, el colon y la piel poseen la enzima 1 α -hidroxilasa por lo tanto son capaces de sintetizar a la 1,25-(OH)₂D₃ localmente (Pozzo 2005; Matthew *et al.*, 2006). La vitamina D₃ es transportada a los tejidos periféricos, almacenándose en los lípidos de muchos tejidos. A diferencia de otras vitaminas liposolubles, la vitamina D₃ prácticamente no se almacena en el hígado, ésta se transporta a las células que la necesitan, uniéndose de forma específica a su receptor nuclear (nVDR). Este receptor se expresa en células de diferentes tejidos como intestino, riñon, huesos, piel y en células de epitelio mamario. Además se ha detectado en queratinocitos,

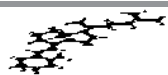


monocitos de bovinos y en una gran cantidad de células del sistema inmune. Se ha reportado que a través de su receptor, la vitamina D3 modula la transcripción de diversos genes, entre ellos el de TNF- α (Gombart *et al.*, 2007; Kemmis *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2010).

2.5.7.1 LA VITAMINA D Y SU ACCIÓN EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

El papel de la vitamina D en la regulación del calcio y el metabolismo del fósforo están bien establecido; sin embargo, las funciones de esta vitamina se han ampliado más allá de estos mecanismos. La 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, la forma activa de la vitamina D3, está involucrada en ciertas funciones dentro del sistema inmune.

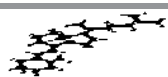
La vitamina D cuenta con un receptor nuclear (nVDR) que se ha encontrado en diferentes tejidos (adiposo, cerebro, colon, epidídimo, los túbulos seminíferos, intestino, riñón, hígado, pulmón, placenta, próstata, retina, piel, estómago) y en ciertas células del sistema inmunológico tales como: linfocitos, monocitos y queratinocitos (Norman *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 2010). Altas concentraciones de 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ impiden la diferenciación de los monocitos a células dendríticas (CD) y macrófagos e inhiben la maduración de las CD ya diferenciadas, esto es debido a que se bloquea la transcripción de ciertas citocinas importantes para la maduración de las CD. Hay dos tipos de linfocitos T (LT), los LT helper (LTh) y LT citotóxicos (LTc), cuya diferencia radica principalmente en los correceptores que contienen (CD4+ y CD8+, respectivamente) y en su función; los LTh liberan citocinas que activan a otras células efectoras del sistema inmune y los LTc actúan en la respuesta inmune contra virus y tumores (Matthew *et al.*, 2006). Estos correceptores son moléculas de membrana que ayudan al reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos. A su vez, los LTh se dividen en linfocitos Th1 y linfocitos Th2, que se diferencian por el tipo de citocinas que liberan cuando son estimulados. Los Th1 liberan interferón (IFN), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e IL-2, y los Th2 liberan IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas pueden activar a otras células efectoras del sistema inmune para que combatan al elemento extraño. Las

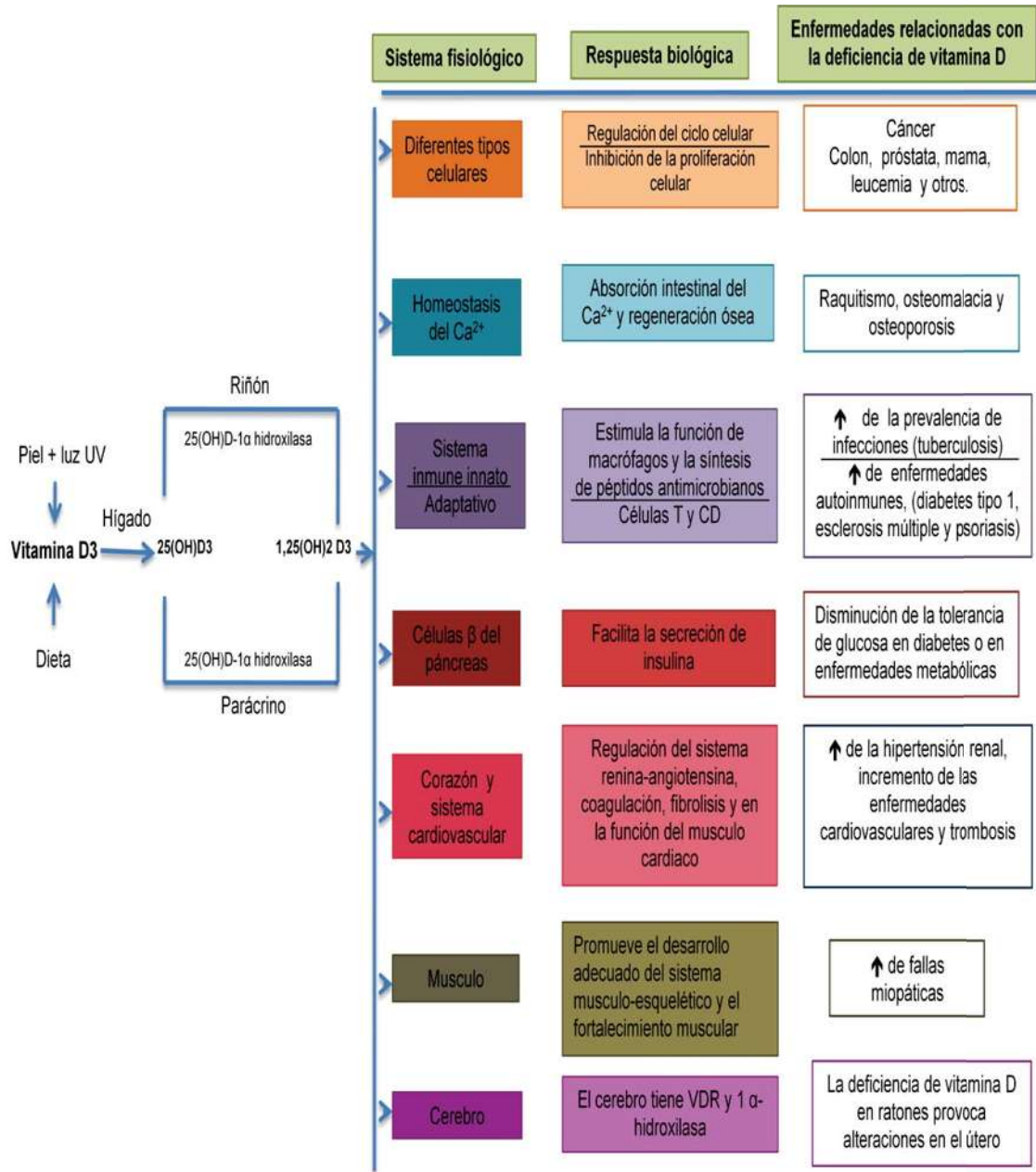


CD pueden producir IL-12, sustancia importante para la maduración de los linfocitos Th1. Como se mencionó anteriormente, la 1,25-(OH)₂D₃ inhibe la maduración de las CD y esto causa que sean incapaces de producir IL-12, también inhibe la transcripción de los genes de IL-2 e IFN- α , característicos de los linfocitos Th1, dando como resultado una pobre maduración de estas células. Por otro lado, la 1,25-(OH)₂D₃ puede activar la transcripción de genes que propician la síntesis de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, características de los linfocitos Th2. De igual forma se ha observado la participación de la 1,25-(OH)₂D₃ sobre el mantenimiento de la homeostasis de los LT y de CD mediante la apoptosis o muerte programada de estas células (Cuadro 1) (Russell *et al.*, 2010).

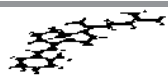
2.5.8 EL BUTIRATO DE SODIO

El ácido butírico se encuentra exclusivamente en la leche bovina y no se demostrado su existencia en la leche de otros mamíferos, es un ácido graso de cadena corta (AGCC) formado por 4 carbonos. En los humanos se encuentra normalmente en el intestino, donde su producción es llevada a cabo por la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono insolubles (Schwab *et al.*, 2007; Hamer *et al.*, 2007). En los animales, además de su papel como la principal fuente de energía en los rumiantes, se ha demostrado que tiene efectos sobre la fisiología del colon, afecta la proliferación y diferenciación celular, así como también juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune (Kumar *et al.*, 2009). Reportes recientes hechos por nuestro grupo de trabajo demostraron que la sal de sodio de este AGCC (butirato de sodio) disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB (aprox. 50%), y modula la expresión de péptidos antimicrobianos (péptido antimicrobiano traqueal y beta-defensina) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).





Cuadro 1. Contribución de la vitamina D en la salud.

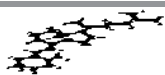


3. ANTECEDENTES

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, como resultado generalmente del ataque de microorganismos. El principal agente etiológico de esta enfermedad es *S. aureus*, el cual puede dar origen a la mastitis bovina clínica y subclínica. Algunas cepas de esta bacteria tienen la capacidad de invadir el epitelio mamario bovino, característica que le permite evadir el sistema inmune del hospedero y que dificulta el control de la bacteria mediante los antibióticos (Buzzola *et al.*, 2007). La mastitis es una patología que se presenta principalmente en la etapa de lactancia, generalmente durante el inicio y final del periodo seco (Green *et al.*, 2002). Por lo tanto cuando se presenta el proceso infeccioso, el microorganismo y las células de epitelio mamario bovino están en contacto con los componentes de la leche.

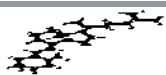
La leche contiene diferentes vitaminas, entre ellas la vitamina D cuyo metabolito activo ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) regula diversos procesos celulares, como la inhibición de la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis y la prevención de la angiogenesis y la metástasis (Parodi, 2004). Adicionalmente, se sabe que la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ tiene efectos inmunomoduladores, entre ellos modula la inmunidad innata al aumentar el reclutamiento y la diferenciación de macrófagos, además previene la autoinmunidad al inhibir la habilidad de las células dendríticas de inducir la respuesta inmune celular tipo Th-1 (Griffin *et al.*, 2003). La presencia de la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ en monocitos de ganado bovino incrementa la expresión de genes de la respuesta inmune innata (iNOS y RANTES) (Nelson *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la presencia de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ induce la expresión de la catelicidina, un péptido antimicrobiano, en queratinocitos y monocitos (Schauber *et al.*, 2006).

Por otro lado, el ácido butírico se encuentra presente en la grasa de la leche bovina el cual la diferencia de la leche del resto de los mamíferos (Parodi, 1997). Diferentes estudios donde se evalúa el efecto de la sal de este ácido graso (butirato) tanto en humanos como en animales, han reportado que tiene efectos sobre la expresión de genes de la respuesta inmune innata, participa como barrera



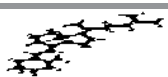
de defensa del colon, protege contra cáncer de colon y tiene un efecto anti-inflamatorio, además de que induce la detención del ciclo celular (Hague *et al.*, 1995; Parodi, 1997; Place *et al.*, 2005; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

Estudios realizados *in vitro* sobre la invasión de células de epitelio mamario bovino por *S. aureus*, patógeno responsable de la mastitis bovina, reportaron que el butirato de sodio disminuye la internalización bacteriana (-50%) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Por otro lado, Gombart *et al.*, (2007) evaluaron el efecto conjunto del butirato de sodio y la 1,25(OH)₂D₃, y demostraron que se incrementaba la expresión de la catelicidina en células de leucemia mieloide. Sin embargo, la participación de la vitamina D y su efecto conjunto con el butirato de sodio durante el establecimiento de la infección de *S. aureus* en las CEMB no se ha analizado.



4. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una infección de etiología compleja que causa grandes pérdidas a la ganadería lechera a nivel mundial. Durante varios años se han buscado y desarrollado diferentes métodos preventivos que controlen y permitan eliminar las infecciones intramamarias causadas por microorganismos patógenos. *S. aureus*, es el microorganismo aislado con mayor frecuencia de casos de mastitis, que presenta una alta frecuencia de resistencia a antibióticos, así como diversos factores de virulencia y la capacidad de invadir células de epitelio mamario bovino. Por otro lado, ciertos componentes de la leche, además de su valor nutricional, han sido estudiados por su capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora; los ácidos grasos, en específico el ácido butírico, tiene propiedades anti-inflamatorias, interviene en el arresto del ciclo celular, así como en la expresión de genes de la respuesta inmune y tiene la capacidad de modular la internalización de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino (CEMB). Es conocido que las vitaminas juegan un papel importante dentro del sistema inmunológico, en especial la vitamina D, a la cual se le asocia con diferentes funciones, entre estas la modulación de la respuesta inmune innata. Sin embargo, no se ha descrito el efecto de la vitamina D en la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Además, no se ha establecido el efecto conjunto de la vitamina D con el ácido butírico durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB.



5. HIPÓTESIS

El tratamiento conjunto de la vitamina D y el butirato de sodio en células de epitelio mamario bovino provoca una disminución de la invasión celular por *Staphylococcus aureus*.

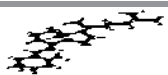
6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Establecer la participación conjunta del butirato de sodio y la vitamina D en la invasión de células epiteliales mamarias bovinas por *Staphylococcus aureus*.

6.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del butirato de sodio y vitamina D sobre el crecimiento de *S. aureus* 27543 y la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino.
2. Determinar la invasión de *S. aureus* 27543 en células de epitelio mamario bovino en presencia de vitamina D.
3. Evaluar la invasión de *S. aureus* 27543 en células de epitelio mamario bovino en presencia de butirato de sodio y vitamina D.
4. Cuantificar la producción de óxido nítrico producido por células de epitelio mamario bovino tratadas con butirato de sodio y vitamina D e infectadas.
5. Analizar la expresión de genes de la inmunidad innata en células de epitelio mamario bovino tratadas con vitamina D e infectadas.

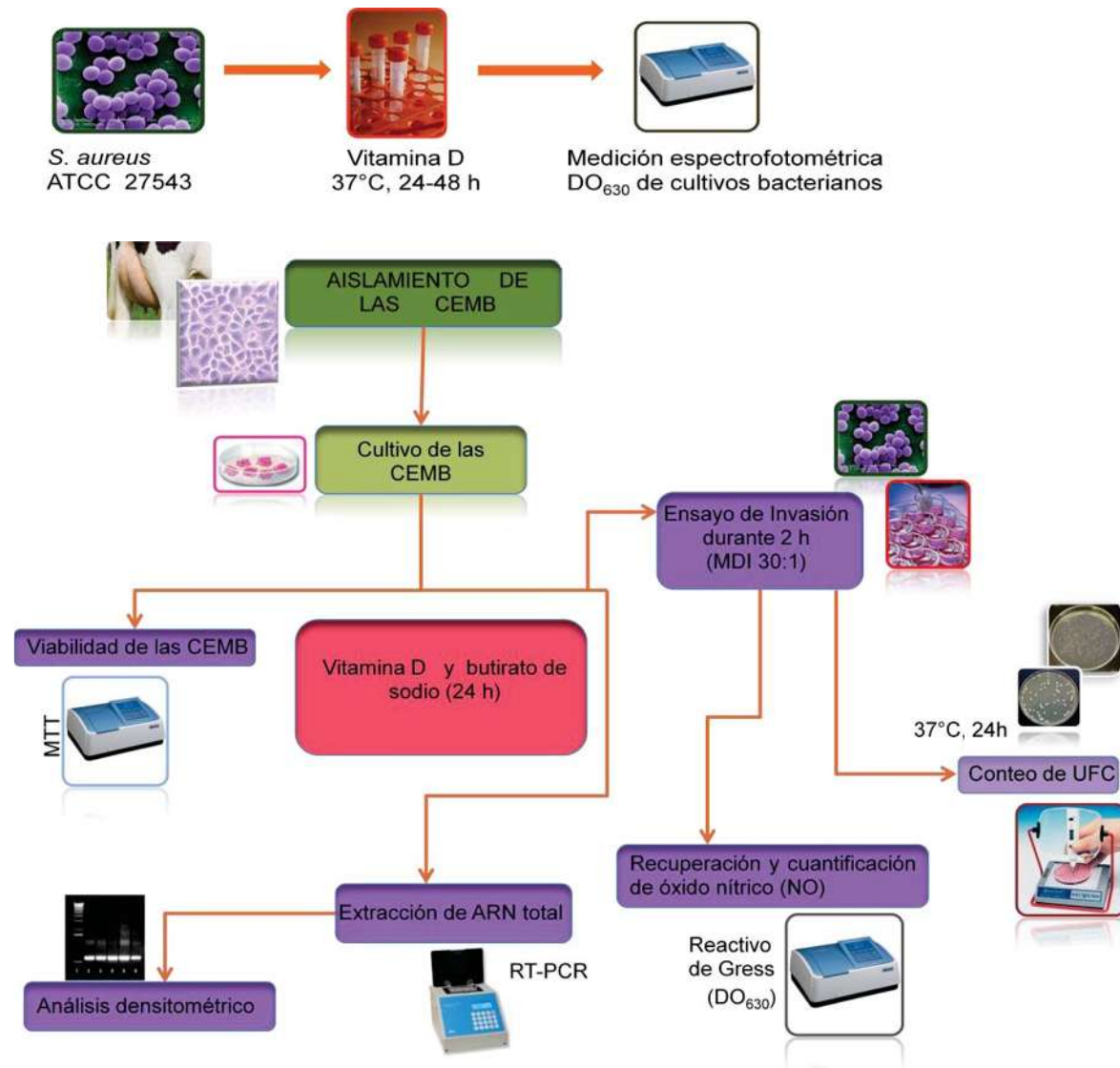


7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH.

7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Efecto de la vitamina D en el crecimiento de *S. aureus*



7.2 CEPAS Y REACTIVOS

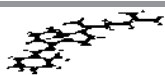
Se utilizó la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 27543 aislada de un caso de mastitis clínica. La cepa se cultivó en caldo Luria-Bertani (5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura, agua c.b.p. 1000 ml, BIOXON) y se incubó a 37°C durante 16 h. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se ajustaron midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm. Como reactivos se emplearon el butirato de sodio (Sigma) y el colecalciferol (vitamina D, Sigma). Se utilizó la concentración de butirato de sodio de 0.25 mM, previamente reportada como la mejor inhibidora de la internalización de *S. aureus* (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Para el caso de la vitamina D se analizaron las concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 nM de acuerdo a lo reportado en la literatura.

7.3 CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO (CEMB)

El cultivo primario se obtuvo a partir del tejido alveolar de la ubre de vacas en etapa lactante, como se ha descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (Anaya *et al.*, 2006). Se utilizaron CEMB del pasaje 2 al 8, éstas se cultivaron en cajas Petri (Costar-Corning) con una mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone), 10 µg/ml de insulina (Sigma), 5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 100 U/ml de penicilina estreptomina (100 µg/ml) y 1 µg/ml de anfotericina B (Invitrogen). Las CEMB se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

7.4 EFECTO DE LA VITAMINA D EN EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC 27543

Se cultivó *S. aureus* en caldo LB y se incubó en agitación a 37°C por 18 h. Se ajustó la DO₆₀₀ del cultivo bacteriano a 0.2 (9x10⁷ UFC), se adicionaron los diferentes tratamientos de vitamina D (1, 10, 50, 100 y 200 nM), se incubaron a 37°C por 24 y 48 h con agitación constante, posteriormente se midió la DO₆₀₀ de



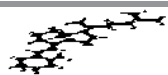
los cultivos a las distintas condiciones. El cultivo de *S. aureus* sin tratamiento se utilizó como control.

7.5 EFECTO DE LA VITAMINA D EN LA VIABILIDAD DE LAS CEMB

Para determinar el efecto de la vitamina D (1-200 nM) en la viabilidad de las CEMB se realizó el ensayo de MTT, que es una técnica colorimétrica en donde se emplea la sal bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma). Se incubaron 5×10^3 células con la vitamina D durante 24 h a 37°C en cajas de 96 pozos (Costar-Corning), se adicionaron 10 µl de MTT (5 mg/ml) en buffer salino de fosfatos (PBS) a cada pozo y se incubaron por 4 h a 37°C. Se adicionaron 100 µl de lauril sulfato de sodio (SDS, Sigma) al 10%, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Por último, se determinó la absorbancia del lisado a 595 nm en un lector de placas (DAS) para ELISA.

7.6 ENSAYO DE INFECCIÓN DE *S. aureus* 27543 EN LAS CEMB EN PRESENCIA DE LA VITAMINA D

Se cultivaron monocapas de CEMB polarizadas en cajas de 24 pozos (Costar-Corning), a las que previamente se les adicionó colágena tipo I de cola de ratón (Invitrogen). Antes de los ensayos de invasión se incubaron las CEMB con los tratamientos de vitamina D (1-200 nM) por 24 h a 37°C. Las monocapas de CEMB confluentes (2×10^5 células/pozo) fueron infectadas con la cepa de *S. aureus* ATCC 27543, utilizando una multiplicidad de infección (MDI) de 30:1 (bacterias por célula), durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂. Para eliminar a las bacterias no endocitadas se agregó gentamicina a una concentración final de 80 µg/ml, incubándose 1 h a 37°C. Se recuperó el medio para la cuantificación de óxido nítrico. Se lavaron las monocapas de CEMB tres veces con PBS (pH 7.4) y se despegaron con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco), las células se recuperaron centrifugando a 2,500 rpm durante 10 min y se lisaron con 250 µl de H₂O destilada estéril. Se hicieron diluciones del lisado celular (1:100) y se distribuyó por triplicado en agar LB, se incubaron a 37°C por 18 h, y finalmente se realizó el conteo de las UFC por métodos de conteo estándar.



7.7 ENSAYOS DE INFECCIÓN DE *S. aureus* 27543 EN LAS CEMB EN PRESENCIA DE LA VITAMINA D Y EL BUTIRATO DE SODIO

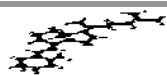
Se llevó a cabo el mismo procedimiento realizado en el ensayo de invasión antes mencionado, excepto en la etapa de incubar las células con los tratamientos, en este caso se agregaron las diferentes concentraciones de vitamina D (1-200 nM) en conjunto con la concentración de butirato de sodio (0.25 mM).

7.8 CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PRODUCIDO POR LAS CEMB

Se evaluó el NO secretado por las CEMB al medio de cultivo midiendo la concentración de nitrito (NO_2^-) presente en el medio condicionado usando la reacción de Greiss. Se determinó el NO producido por las CEMB estimuladas con la vitamina D (1-200 nM) y también las CEMB estimuladas por la vitamina D en conjunto con el butirato de sodio (0.25mM) por 24 h, sin infectar e infectadas. El reactivo de Greiss se preparó antes de la medición de NO_2^- , se mezclaron volúmenes iguales de la solución A (10 % sulfanilamida y 40 % de ácido fosfórico, Sigma) y de la B [1 % N-(1-naftiletildiamida dihidroclorada, Sigma)]. La concentración de NO_2^- se estimó a partir de una curva estándar preparada con NaNO_2 (Sigma) en PBS (pH 7.4). Se colocaron diluciones 1:7 del reactivo de Greiss y del medio condicionado (20 μl y 140 μl , respectivamente), y se realizó la medición de la absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro (DAS).

7.9 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LAS CEMB Y OBTENCIÓN DEL ADNc

Primeramente las CEMB fueron incubadas durante 24 h con los diferentes tratamientos de la vitamina D e infectadas con *S. aureus* ATCC 27543. Para realizar la extracción del ARN total se utilizó Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La pastilla de ARN total se resuspendió en agua con inhibidor de RNAsa. La muestra obtenida luego se trató con DNAsa I para eliminar cualquier contaminación de DNA (Invitrogen). La síntesis de ADNc se realizó mediante la reacción de transcripción reversa (RT) a partir del ARN total obtenido



y previamente tratado con DNAsa. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo 25 μ g/ml de Oligo d(T) (Invitrogen) y 500 nM dNTP's (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min. Después se añadió First Strand Buffer 1X (Invitrogen), ditioneitol (DTT) 10 nM e inhibidor de RNAsa 2 U/ μ L (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/ μ L, Invitrogen) y posteriormente se incubó a 42°C por 50 min, por último la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min.

7.10 PCR

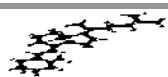
Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar dos genes representativos de la inmunidad innata, el péptido antimicrobiano traqueal (TAP) (Directo 5'-GCCAGCATGAGGCTCCAT-3'; 5'-AACAGGTGCCAATCTGT-3'; 166 pb) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Directo 5'-GGAAGCAGTAACAAAGGAGATAG3'; reverso 5'-CATAGCGGATGAGCTGGGCG-3'; 282 pb). Como control interno de las reacciones se utilizó β -actina (Directo 5'-ATGGTGGGCATGGGTCAGAA-3'; reverso 5'-TCATACTCCTGCTTGCTGAT-3'; 900 pb). Los productos obtenidos de los PCR se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

7.11 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

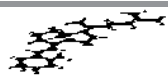
Los productos de amplificación del PCR fueron sometidos a un análisis densitométrico estandarizado usando el software ImageJ (v.1.43u, Windows). Los valores estimados del análisis anterior se expresaron en relación a la expresión de β -actina.

7.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos provenientes de los ensayos de crecimiento de *S. aureus* 27543 y de la viabilidad de las CEMB, así como los resultados de los bioensayos de invasión de *S. aureus* en las CEMB y la cuantificación de óxido nítrico fueron el resultado de al menos tres experimentos independientes por triplicado. Los



resultados se sometieron a una comparación mediante la prueba t de Student, y se reportan con \pm el error estándar promedio.



8. RESULTADOS

8.1 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *S. aureus* 27543 EN PRESENCIA DE VITAMINA D

Se evaluó el efecto de la vitamina D (1-200 nM) en el crecimiento de *S. aureus*, ésto para observar si ejercía algún efecto directo en la bacteria. Al evaluar las diferentes concentraciones de la vitamina D sobre el crecimiento de *S. aureus* no se observó una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano durante las primeras 4 h (Figura 3); sin embargo, se presentó una disminución significativa a las 6 h (10 y 200 nM) y a las 24 h (10, 50, 100 y 200 nM). Además, se observó que a las 48 h hubo un aumento significativo en el crecimiento bacteriano (1 nM). En el resto de los tratamientos no se presentaron cambios significativos en el crecimiento.

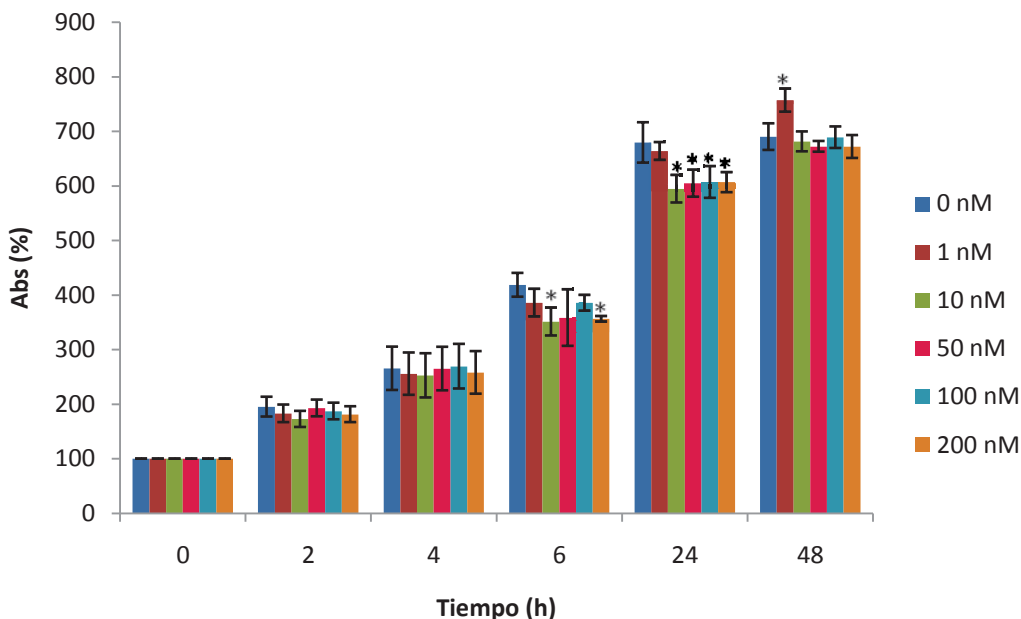
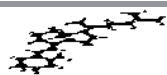


Figura 3. Evaluación del crecimiento de *S. aureus* en presencia de la vitamina D. Se determinó el crecimiento de *S. aureus* adicionando las concentraciones de vitamina D (1-200 nM) y se midió la D.O.₆₀₀ a las 2, 4, 6, 24 y 48 h. Los resultados obtenidos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento sin vitamina D.



8.2 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DE LAS CEMB EN PRESENCIA DE LA VITAMINA D

Para realizar el análisis del efecto de la vitamina D sobre la viabilidad de las CEMB tratadas con las diferentes concentraciones (1-200 nM), se utilizó el ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados del ensayo mostraron que la presencia de las diferentes concentraciones de la vitamina D no tuvieron efecto alguno en la viabilidad de las CEMB (Figura 4).

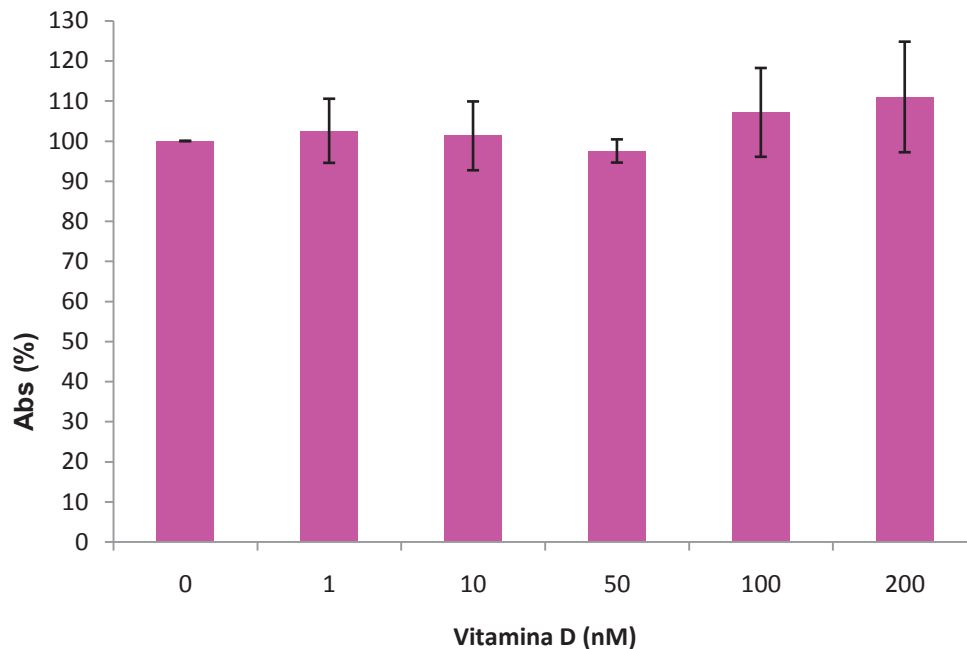
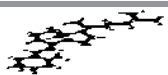


Figura 4. Efecto de la vitamina D en la viabilidad de las CEMB. El ensayo de MTT se realizó en las CEMB previamente cultivadas en presencia de la vitamina D (1-200 nM) por 24 h. Los resultados obtenidos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “**” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento sin vitamina D.

8.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LA INVASIÓN DE *S. aureus* 27543 EN LAS CEMB

Para evaluar el efecto de la vitamina D en la invasión de *S. aureus* en las CEMB se realizaron ensayos de protección con gentamicina, en los cuales se cultivaron las células y fueron tratadas con diferentes concentraciones de la



vitamina D (1-200 nM) por un periodo de 24 h antes de ser infectadas con *S. aureus*.

Los resultados que se obtuvieron de las UFC recuperadas en los ensayos de invasión de las CEMB con *S. aureus* se muestran en la figura 5. Se observó que la vitamina D inhibió la internalización de la bacteria de manera dependiente de la concentración, con un efecto en forma de campana invertida. Se determinó que la disminución de la invasión fue de 23, 53, 74, 61 y 15% para las concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 nM, respectivamente. El mayor efecto inhibitorio se observó con el tratamiento de 50 nM, el cual disminuyó la internalización de *S. aureus* hasta en un 74%.

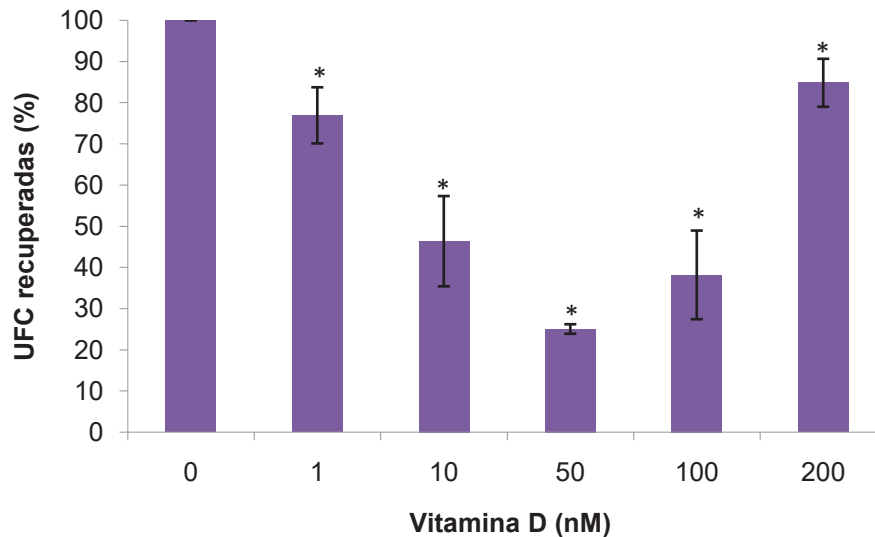
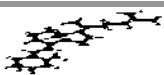


Figura 5. Evaluación de la invasión de *S. aureus* en las CEMB en presencia de la vitamina D. El ensayo se realizó en las CEMB previamente cultivadas en presencia de la vitamina D (1-200 nM) por 24 h, las cuales fueron luego infectadas con *S. aureus* por 2 h. Se presenta el porcentaje de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB, los valores fueron determinados considerando las células sin tratar con vitamina D como el 100% de la invasión. Los resultados obtenidos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento sin vitamina D.



8.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VITAMINA D Y EL BUTIRATO DE SODIO SOBRE LA INVASIÓN DE *S. aureus* ATCC EN LAS CEMB

Para evaluar el efecto conjunto de la vitamina D y el butirato de sodio sobre la invasión de *S. aureus* 27543 en las CEMB, se realizaron ensayos de infección en los cuales las células se cultivaron y fueron tratadas con las diferentes concentraciones de vitamina D (1-200 nM) y butirato de sodio (0.25mM) por un periodo de 24 h antes de ser infectadas con *S. aureus*.

Los resultados que se obtuvieron de las UFC recuperadas en los ensayos de invasión mostraron que la adición del butirato de sodio (0.25 mM) no modificó la inhibición de la invasión bacteriana ejercida por la vitamina D (ver Figura 5), excepto a 200 nM (Figura 6), la cual puede atribuirse al efecto del butirato de sodio.

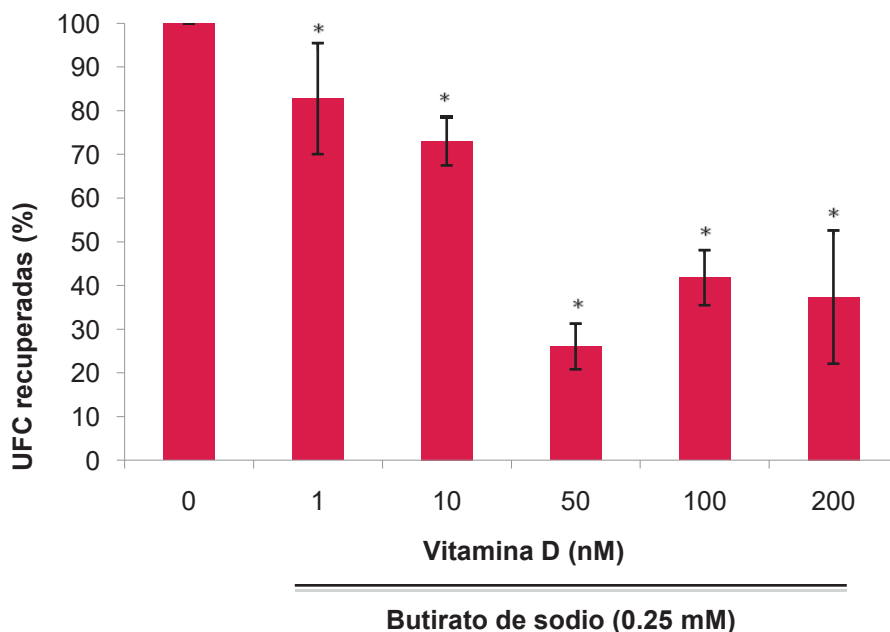
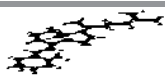


Figura 6. Evaluación de la invasión de *S. aureus* en las CEMB en presencia de la vitamina D y el butirato de sodio. Se determinó el efecto de la vitamina D (1-200 nM) en conjunto con el butirato de sodio (0.25 mM), las cuales fueron luego infectadas con *S. aureus* por 2 h. Se presenta el porcentaje de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB, los valores fueron determinados considerando las células sin tratar con vitamina D como el 100% de la invasión. Los resultados obtenidos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al tratamiento sin butirato de sodio y vitamina D.



8.5 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR LAS CEMB TRATADAS CON LA VITAMINA D Y EL BUTIRATO DE SODIO

El NO es un radical libre y es sintetizado por una familia de enzimas denominadas NO sintasas (NOS), es una molécula que se asocia con la modulación de la respuesta inmune innata en el momento en que se presenta una infección. Con el objeto de evaluar si el NO presentó algún efecto en la respuesta de la invasión bacteriana, fue que se llevó a cabo la cuantificación de esta molécula en las CEMB con tratamiento e infectadas.

Se recuperó el medio condicionado de las CEMB tratadas con los diferentes tratamientos de la vitamina D e infectadas para realizar la cuantificación de NO. Al realizar la cuantificación de NO se observó que ninguno de los tratamientos modificó la producción de óxido nítrico (Figura 7). Cuando se determinó el NO en las CEMB tratadas con las diferentes concentraciones de vitamina D en conjunto con el butirato de sodio, se observó solo una disminución en 50 nM/0.25 mM (Figura 8).

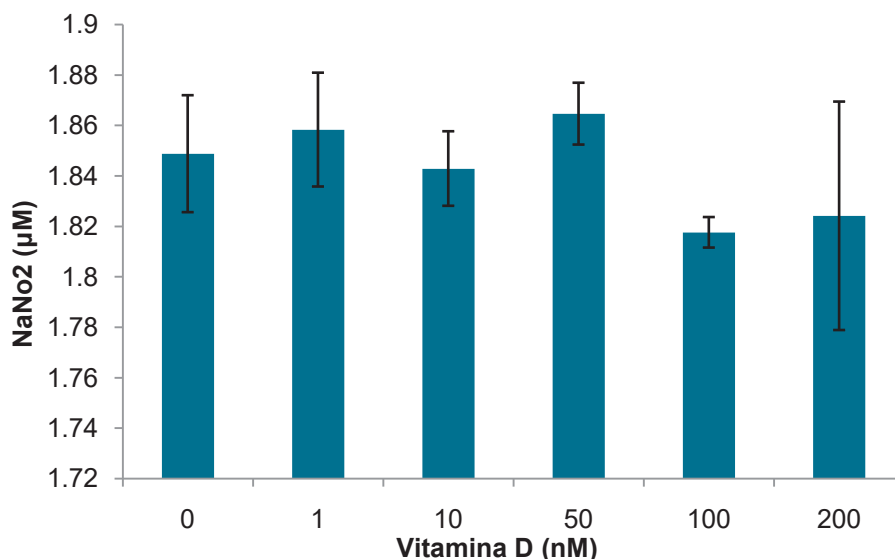
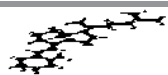


Figura 7. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con vitamina D e infectadas. Se determinó la cantidad de NO producido por las CEMB infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de vitamina D (1-200 nM). El NO fue medido como la concentración de nitrito (NO₂⁻) presente en el medio condicionado. Los valores presentados en la gráfica son el resultado de tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al control (CEMB sin vitamina D e infectadas).



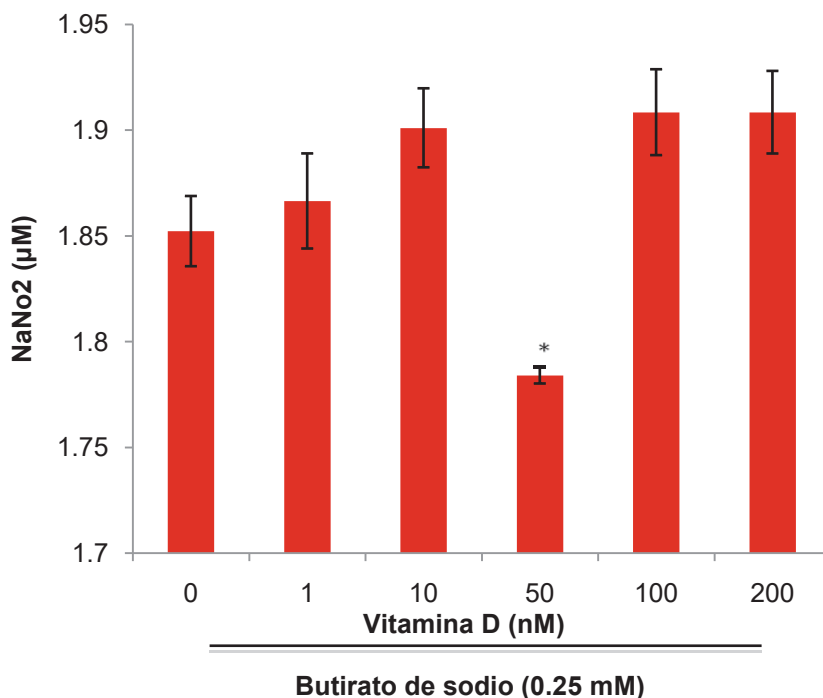
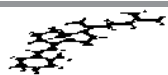


Figura 8. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con vitamina D y butirato de sodio e infectadas. Se determinó la cantidad de NO producido por las CEMB infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de vitamina D (1-200 nM) en conjunto con el butirato de sodio (0.25 mM). El NO fue medido como la concentración de nitrito (NO_2^-) presente en el medio condicionado. Los valores presentados en la gráfica son el resultado de tres experimentos independientes por triplicado. El símbolo “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto al control (CEMB sin tratamiento e infectadas).

8.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Para determinar si las diferentes concentraciones de la vitamina D modulan la expresión de ciertos genes de la respuesta inmune innata de las CEMB (sin infectar e infectadas con *S. aureus*), se llevó a cabo la extracción del ARN total y se realizó la síntesis del ADNc mediante RT y los genes se analizaron por PCR. Con el fin de probar el éxito de la reacción de síntesis del ADNc se amplificó β -actina, un gen constitutivo. Se observó la amplificación de este gen en todos los tratamientos, lo cual demostró que el ADNc era de buena calidad (Figura 9).



Además, este gen se utilizó como control interno de la expresión el cual fue utilizado para realizar el análisis densitométrico.

Se analizó la expresión de iNOS para determinar si las diferentes concentraciones de la vitamina D y la infección regulan su expresión en las CEMB. La evaluación se realizó en las CEMB sin tratar y tratadas con vitamina D, las cuales posteriormente se infectaron con *S. aureus*. Los resultados muestran que la expresión de iNOS es regulada positivamente por la infección; sin embargo, el tratamiento con la vitamina D inhibe el efecto inductor de la bacteria (Figura 9).

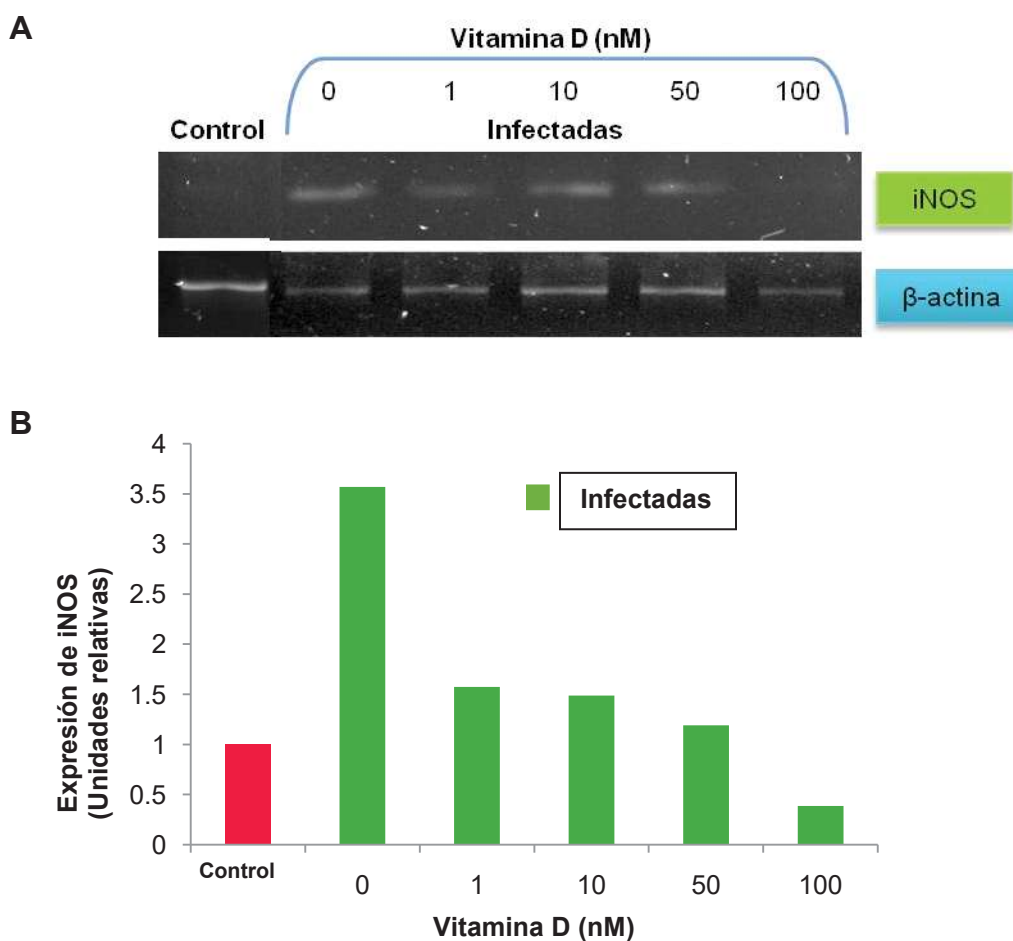
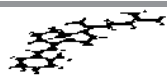


Figura 9. Expresión del ARNm de iNOS en las CEMB tratadas con vitamina D e infectadas. Las CEMB se incubaron por 24 h con los diferentes tratamiento de vitamina D y posteriormente se infectaron durante 2 h con *S. aureus*. A) Muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para iNOS y β -actina. B) Análisis densitométrico de la expresión de iNOS con respecto a la expresión de β -actina. Los datos de la gráfica son resultado de un experimento.



También se llevó a cabo el análisis de la expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB sin tratar y tratadas con vitamina D y posteriormente infectadas con *S. aureus*. Se observó que la infección con *S. aureus* induce la expresión de TAP (aprox. 2.5 veces). Sin embargo, cuando la infección de las CEMB se realizó en presencia de la vitamina D la expresión de TAP disminuyó, excepto en la concentración de 100 mM.

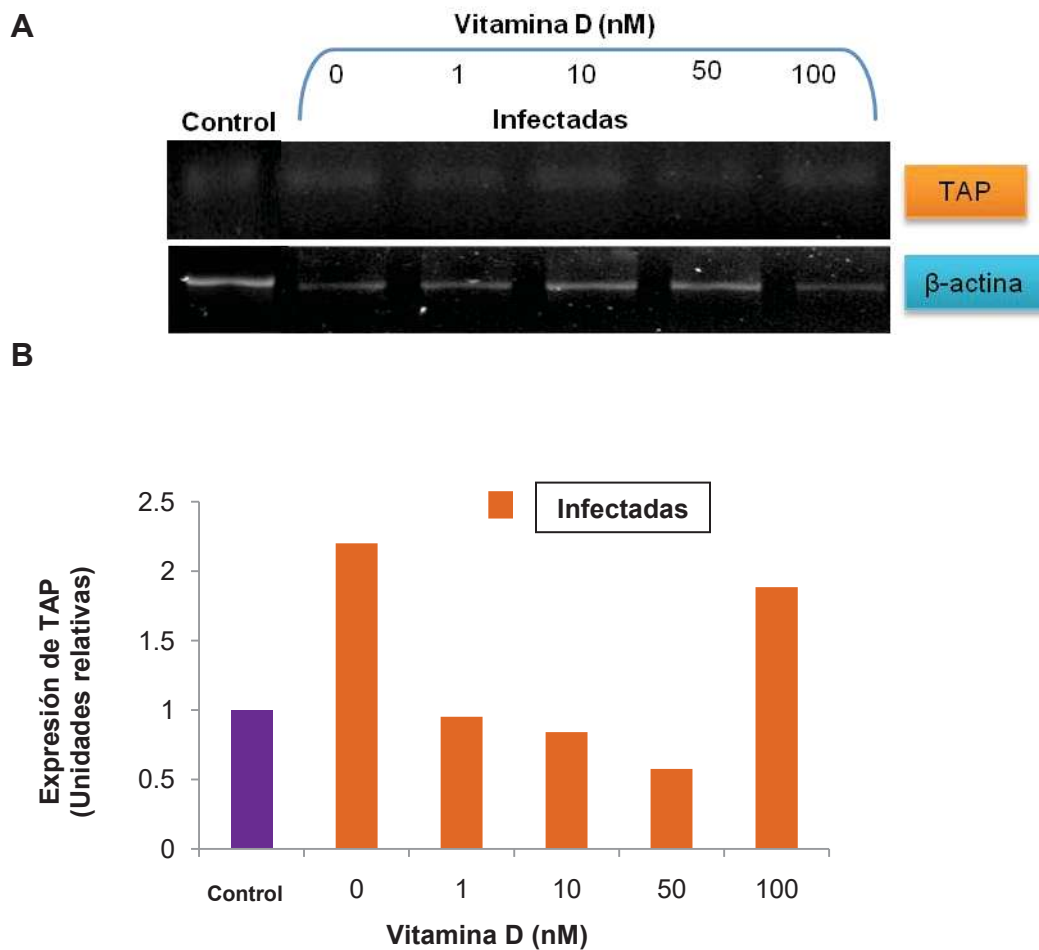
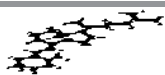


Figura 10. Expresión del ARNm de TAP en las CEMB tratadas con vitamina D e infectadas. Las CEMB se incubaron por 24 h con los diferentes tratamientos de vitamina D y posteriormente se infectaron durante 2 h con *S. aureus*. A) Muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para TAP y β -actina. B)



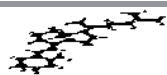
Análisis densitométrico de la expresión de TAP con respecto a la expresión de β -actina. Los datos de la gráfica son resultado de un experimento.

9. DISCUSIÓN

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria ocasionada principalmente por el ataque de microorganismos. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia durante el periodo de lactancia provocando una disminución en la calidad y producción de leche lo que genera grandes pérdidas económicas importantes en la ganadería lechera bovina (Schrick *et al.*, 2001). Para su control se recurre principalmente al uso de antibióticos; sin embargo, el uso inadecuado de los mismos ha llevado a la selección de microorganismos resistentes causantes de la mastitis, lo que ha resultado en la disminución de la eficacia de la terapia antimicrobiana (Kerro-Dego *et al.*, 2002).

El principal agente causal de la mastitis en bovinos es *Staphylococcus aureus* que tiene la capacidad de invadir las células del epitelio mamario bovino (CEMB) y sobrevivir dentro de ellas, lo que le permite evadir el sistema inmune del hospedero y las estrategias de control antimicrobiano (National Mastitis Council, 1996; Kerro-Dego *et al.*, 2002). Durante la infección –parcial o total- de la ubre tanto las CEMB como el patógeno se encuentran en contacto directo con los componentes de la leche, entre ellos las vitaminas y los ácidos grasos. Estas moléculas, además de su aporte nutricional, se han estudiado por los efectos antimicrobianos y moduladores de la inmunidad innata (Parodi, 1997; Li *et al.*, 2006; Maggini *et al.*, 2007; Tedelind *et al.*, 2007; Van Deun *et al.*, 2008b; Baeke *et al.*, 2010; Jo, 2010). Particularmente en el caso de la mastitis bovina se ha demostrado que el butirato de sodio inhibe la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la vitamina D sobre la invasión de *S. aureus* ATCC 27543 en las CEMB y la expresión de genes de la inmunidad innata; además de su efecto conjunto con el butirato de sodio en este proceso.

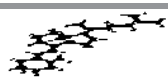
La vitamina D3 (colecalfiferol) se adquiere principalmente a partir de dos fuentes distintas: 1) directamente por la ingesta de los alimentos o 2) por su



síntesis en la piel la cual es mediada por la exposición de los rayos UV. Este último proceso ocurre a partir del 7-dehidroxicolesterol (7DHC), que es convertido a pre-vitamina D3 en respuesta a la exposición de rayos UV en la epidermis, posteriormente se modifica por isomerización para convertirse en vitamina D3. Sin embargo, se necesitan dos reacciones posteriores para poder obtener el metabolito biológicamente activo (calcitriol), primero la vitamina D3 es transportada al hígado e hidroxilada por la enzima 25-hidroxilasa (CYP2R1) a 25-hidroxivitamina D3 [25(OH)D3], producto que pasa al riñón para una segunda hidroxilación por la enzima 1 α -hidroxilasa (CYP27B1) convirtiéndose en su forma activa 1 α ,25-dihidroxivitamina D3 [1,25-(OH)₂D₃] (Baeke *et al.*, 2010).

Hasta hace algunos años se pensaba que el calcitriol se sintetizaba únicamente en el riñón, pero estudios recientes han reportado que un gran número de tejidos (ej. epitelio mamario, próstata, colon y piel) y células del sistema inmune (monocitos) poseen la enzima 1 α -hidroxilasa, por lo que son capaces de sintetizar localmente a la 1,25-(OH)₂D₃ (Pozzo 2005; Matthew *et al.*, 2006). Debido a que las células de epitelio mamario pueden producir el metabolito activo de la vitamina D3 a partir de colecalciferol, se decidió utilizar este compuesto en el presente trabajo. Las concentraciones de colecalciferol (1, 10, 50, 100 y 200 nM) que se emplearon en este estudio, se basan en reportes anteriores en donde se demostró que la 1,25-(OH)₂D₃ modula la respuesta inmune innata de distintas líneas celulares (humanas y bovinas) en este rango de concentraciones (Cui *et al.*, 2009; Shifera *et al.*, 2010).

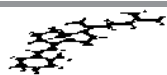
Para determinar si las concentraciones utilizadas de colecalciferol (1 – 200 nM) tenían un efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*, se cultivó a la bacteria en caldo LB en presencia de este compuesto y se monitoreó su crecimiento (0 – 48 h). Los resultados no mostraron un efecto del colecalciferol a las 2 y 4 h; sin embargo, hubo una disminución significativa a las 6 h de ~ 15 % (10 y 200 nM) y a las 24 h de 12, 11, 9 y 11 % (10, 50, 100 y 200 nM, respectivamente), mientras que a las 48 h aumento el crecimiento bacteriano (1 nM) (figura 3). No se encontraron reportes donde se indique que la vitamina D3 posea propiedades



antimicrobianas; no obstante, se conoce que esta molécula tiene un efecto antimicrobiano indirecto sobre *Mycobacterium tuberculosis* en monocitos humanos, al inducir la producción de péptidos antimicrobianos (catelicidina: LL-37) y la autofagia (Jo, 2010).

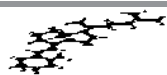
Por otro lado, se ha demostrado que la 1,25-(OH)₂D₃ inhibe el crecimiento de células cancerígenas de colon, mama, y próstata, al igual que de algunos tipos de leucemia humana (Welsh, 2007). Por otro lado, en animales se ha reportado que este compuesto inhibe la inducción química de tumores de piel y colon (Parodi, 2004). En base a lo anterior, se decidió evaluar el efecto de la 1,25-(OH)₂D₃ sobre la viabilidad de las CEMB (ensayo de reducción colorimétrica del MTT). Los resultados obtenidos mostraron que el colecalciferol (1-200 nM) no afectó la viabilidad de las CEMB a las 24 h (figura 4). Aunque hay reportes previos que indican que la 1,25-(OH)₂D₃ inhibe el crecimiento celular, estos trabajos se enfocaron solamente en células cancerígenas, y no en modelos de cultivo celular primario como en el presente trabajo (CEMB).

El principal agente patógeno de la mastitis bovina es *S. aureus*, se sabe que algunas cepas de este microorganismo son facultativas intracelulares, otorgándole la capacidad de invadir el endotelio y el epitelio mamario bovino, lo que le permite sobrevivir dentro de la célula y reproducirse en ella, evitando así al sistema inmune del hospedero y disminuyendo la eficacia de la terapia antimicrobiana (Gresham *et al.*, 2000). Cuando se presenta la infección en la glándula mamaria, tanto las CEMB como la bacteria se encuentran en contacto directo con los diferentes componentes de la leche, entre ellos la vitamina D. Por lo antes mencionado se decidió evaluar la participación de la vitamina D durante la invasión bacteriana en las CEMB, realizando ensayos de protección con gentamicina y utilizando la cepa de *S. aureus* ATCC 27543, ya que tiene la capacidad de invadir el epitelio mamario bovino (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). En los resultados obtenidos se observó una disminución en la internalización de la bacteria con los diferentes tratamientos, esta reducción fue de 23, 53, 74, 61 y 15% para las concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 nM, respectivamente (figura



5), presentando un efecto de campana invertida, el cual puede estar dado por la activación del receptor VDR. Se observó que el mayor efecto inhibitorio del colecalciferol se presentó con la concentración de 50 nM. Si bien no hay trabajos previos que reporten el efecto de la vitamina D sobre la invasión bacteriana de patógenos causantes de mastitis bovina; Liu *et al.* (2007) reportaron un estudio con *M. tuberculosis* (patógeno intracelular) en donde se demostró que la 1,25-(OH)₂D₃ disminuye las UFC (28 %) recuperadas de monocitos humanos al estimularlos durante 3 días con este metabolito, efecto que puede estar modulado por la inducción del péptido antimicrobiano LL-37. También se ha observado que la 1,25-(OH)₂D₃ ayuda en la resolución de la infección por *M. tuberculosis* en macrófagos al activar el proceso de autofagia (Jo, 2010). Para determinar si la disminución de la invasión de *S. aureus* en las CEMB está regulada por la activación de la autofagia, se necesitan estudios posteriores.

El óxido nítrico (NO) es una molécula efectora que regula la dilatación de vasos sanguíneos, participa como mensajero neuronal, juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y además se le atribuye que puede actuar como antimicrobiano (Boulanger *et al.*, 2001). Se ha reportado que las CEMB infectadas con *S. aureus* tienen la capacidad de producir NO como respuesta a la infección (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Nelson *et al.* (2010) reportaron que existe un aumento en la producción de NO en monocitos tratados con la 1,25-(OH)₂D₃ (0-4 ng/ml, por 24 h) y estimulados con LPS, esta inducción es dependiente de la concentración. Por lo que se decidió evaluar la producción de NO de las CEMB estimuladas con el colecalciferol (1-200 nM) e infectadas, recuperando el medio condicionado de las CEMB y mediante la reacción de Griess. Los resultados mostraron que los diferentes tratamientos no modificaron la producción de NO, y que no hay una relación entre la producción de NO y la disminución de la invasión bacteriana (figura 5 y 6), por lo que se puede inferir que las CEMB tratadas con el colecalciferol no utilizan este mecanismo como defensa. Los resultados obtenidos no concuerdan con los observados en monocitos (Nelson *et al.*, 2010). Cabe mencionar que en el presente trabajo se simuló el proceso infeccioso con una

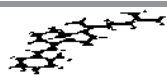


bacteria Gram (+) viva, a diferencia del trabajo de monocitos donde se utilizó un componente de la pared celular (LPS) de las bacterias Gram (-).

La vitamina D es un modulador del sistema inmune innato y adaptativo, el metabolito activo $1,25-(OH)_2D_3$ actúa a través del receptor de vitamina D (VDR), miembro de la superfamilia de receptores nucleares de transcripción, que se expresa ampliamente en el tejido epitelial y en células del sistema inmune (Wang *et al.*, 2004). Se sabe que la $1,25-(OH)_2D_3$ y sus análogos modulan la expresión de genes de péptidos antimicrobianos en diferentes líneas celulares, y estos péptidos pueden ayudar a su vez a evitar el establecimiento de infecciones y a la resolución de las mismas (Akutsu *et al.*, 2001). Por lo antes mencionado se analizó la expresión de genes de la inmunidad innata (TAP e iNOS) durante el proceso infeccioso de las CEMB sin tratar y tratadas con el colecalciferol (figuras 9 y 10).

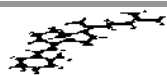
Al evaluar la expresión del ARNm de TAP se observó que la infección induce positivamente su expresión, respecto a las CEMB sin tratamiento. Este dato coincide con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (López-Meza *et al.*, 2009). Por otro lado, en presencia del colecalciferol (1-100 nM) se observó una disminución en la expresión del ARNm de esta defensina, con respecto a las CEMB solo infectadas (figura 10). Si bien no hay reportes previos que relacionen la expresión del ARNm de TAP con el estímulo de la $1,25-(OH)_2D_3$ durante el proceso infeccioso, se sabe que este compuesto induce la expresión de algunos péptidos antimicrobianos, como LL-37, en células mononucleares de sangre periférica y en queratinocitos humanos, a través de la activación del VDR y de la ruta de señalización de MEK/ERK (Martineau *et al.*, 2007; Peric *et al.*, 2009). Además, Wang *et al.* (2004) reportaron que el LPS y la $1,25-(OH)_2D_3$ inducen la expresión del péptido antimicrobiano CAMP en neutrófilos. Sin embargo, no existen reportes que evalúen el efecto de la vitamina D3 en un proceso infeccioso como el que se evaluó en este trabajo.

Los resultados obtenidos del análisis del ARNm de iNOS mostraron que su expresión es regulada positivamente por la infección; sin embargo, su expresión disminuye en presencia del colecalciferol (figura 9). La regulación de iNOS



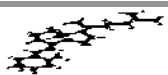
contribuye al efecto antimicrobiano de la 1,25-(OH)₂D₃, ya que esta enzima produce NO a partir de L-arginina, pero existen datos contradictorios al respecto. Por un lado se ha reportado que la 1,25-(OH)₂D₃ induce la expresión de iNOS en macrófagos humanos, mientras que otros reportes indican que la vitamina tiene efecto inhibitorio sobre esta enzima (Baeke *et al.*, 2010). Nelson *et al.* (2010) reportan que en monocitos se presenta una regulación positiva de la expresión del ARNm de iNOS al tratarlos con la 1,25-(OH)₂D₃ y LPS.

Nuestro grupo de trabajo reportó que el butirato de sodio (0.25 mM) disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB en un 50% aproximadamente y modula positivamente la expresión del ARNm de péptidos antimicrobianos (TAP y β-defensina), la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Existen pocos estudios donde se evalúa el efecto conjunto del butirato de sodio y la 1,25-(OH)₂D₃, en uno de ellos se reportó que ambos compuestos incrementan la expresión del gen CAMP en una línea celular de leucemia mieloide, permitiendo así una mejor actividad de la respuesta inmune innata (Gombart *et al.*, 2007). Partiendo del hecho de que el butirato de sodio tiene propiedades anti-inflamatorias, que modula la expresión de genes de la inmunidad innata en la glándula mamaria bovina -lo que puede brindar una mejor defensa contra infecciones bacterianas- y que la vitamina D también es un inmunomodulador, se decidió evaluar el efecto conjunto de estos compuestos en la invasión de *S. aureus* a las CEMB. Para lo cual se realizaron ensayos de protección con gentamicina, se evaluaron todas las concentraciones de colecalciferol (1-200 nM) en presencia de 0.25 mM de butirato de sodio, ya que esta concentración es la que posee el mayor efecto inhibitorio en la invasión bacteriana (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos mostraron que la disminución en las UFC recuperadas fue similar al efecto observado cuando se empleó solamente el colecalciferol (hasta del 74%), con excepción de la concentración de 200 nM; por lo que se puede concluir que el efecto del colecalciferol no se ve modificado al adicionar el butirato (figura 6). Solo al utilizar el colecalciferol a 200 nM con el butirato de sodio (0.25 mM) se observó una mayor



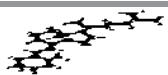
disminución de las UFC recuperadas (67%) respecto al control (CEMB sin tratamiento), y a las CEMB solo tratadas con colecalciferol, observándose un efecto aditivo entre estos dos compuestos.

Para establecer si existía una relación entre la modulación de la expresión de iNOS y la producción de NO en el proceso de internalización de *S. aureus*, se evaluó la producción de esta molécula en los medios condicionados recuperados de los distintos tratamientos (colecalciferol/butirato). La producción de NO fue similar respecto al control (CEMB infectadas) en todos los tratamientos, excepto al utilizar 50 nM de colecalciferol y 0.25 mM de butirato de sodio, donde se observó una disminución de 4 % (figura 8). No se observó relación en la producción de NO por las CEMB con respecto a la disminución en la invasión bacteriana y la expresión del ARNm de iNOS, por lo que se puede deducir que la inhibición de la invasión de *S. aureus* a las CEMB no está modulada por la producción de NO.



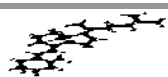
10. CONCLUSIÓN

El colecalciferol (vitamina D) inhibió la internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino, siendo mayor el efecto a una concentración de 50 nM (~ 70%). Esta inhibición no se modificó significativamente por la adición de butirato de sodio (0.25 mM), con lo cual se puede establecer que no existe un efecto aditivo o sinérgico entre los dos compuestos. Finalmente, el colecalciferol no moduló la producción de NO por lo que se establece que no tiene participación en la inhibición de la invasión bacteriana.

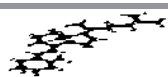


11. LITERATURA CITADA

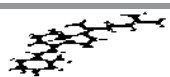
- Alexander, E.H. and Hudson, M.C. 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 361-366.
- Akutsu, N., Lin, R., Bastien, Y., Bestawros, A., Enepekides, J.D., Black, M.J. and White J.H. 2001 Regulation of gene expression by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analog EB1089 under growth- inhibitory conditions in squamous carcinoma cells. *Mol. Endocrinol.* 15: 1127-1139.
- Avila, J. and Blanco, A. 2009. Mastitis endotóxica. *Memorias XXXIII Congreso Nacional de Buiatría.* 121-122.
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C. and Mathieu, C. 2010. Vitamina D: modulation of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10(4): 482-496.
- Boulanger, V., Bouchard, L., Zhao, X. and Lacasse, P. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J. Dairy Sci.* 84(6): 1430-1437.
- Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L. and Sordelli, D.O. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *J. Infect. Immun.* 75 (2): 886-91.
- Cashman, K.D. 2006. Milk minerals (including trace elements) and bone health. *Int. Dairy J.* 16: 1389-1398.
- Collado, V.M., Porras, R., Cutuli, M.T. and Gómez, E.L. 2008. The innate immune system: its mechanisms. *Rev. Complut de Cienc. Vet.* 2: 1-16.



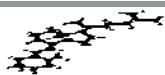
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J. and Amorena, B. 2001. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 2888–2896.
- Cui, M., Klotz, A., Jiang, Y. and Fleet, C.J. 2009. The effect of differentiation on 1,25 dihydroxyvitamin D –mediated gene expression in the enterocyte-like cell line caco-2. *J Cell Physiol.* 218(1): 113–121.
- Frank, S., Brindley, A.A., Deery, E., Heathcote, P., Lawrence, A.D., Leech, H.K., Pickersgill, R.W. and Warren, M.J. 2005. Anaerobic synthesis of vitamin B12: characterization of the early steps in the pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 811-814.
- Garzoni, C., Francois, P., Huyghe, A., Couzinet, S., Tapparel, C., Charbonnier, Y., Renzoni, A., Lucchini, S., Lew, D.P., Vaudaux, P., Kelley, L.W. and Srenzel, J. 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC. Genomics.* 8: 171.
- Gombart, A.F., Kelly, O.J., Saito, T. and Koeffler, H.P. 2007. Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)₂D₃ in various tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 103: 552–557.
- Green, M.J., Green, L.E., Medley, G.F., Schukken, Y.H. and Bradley, A.J. 2002. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 85: 2589-2599.
- Gresham, H.D., Lowrance, J.H., Caver, T.E., Wilson, B.S., Cheung, A.L. and Lindberg, F.P. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* 164(7): 3713-22.



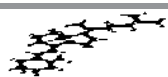
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J.L., Lara-Zarate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatroy resonse genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol Immunopathol.* 121: 113-122.
- Hague, A. and Paraskeva, C. 1995. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur. J. Cancer Prev.* 4: 359-64.
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J. and Brummer, R.J. 2007. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27: 104–119.
- Holt, C. 1995. Effect of heating and cooling on the milk salts and their interaction with casein, in: heat induced changes in milk. *Int. Dairy F.* 8: 256-258
- Jo, E, K. Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. 2010. *Cell. Microbiol.* 12(8): 1026-1035.
- Kemmis, C.M. and Welsh J. 2008. Mammary epithelial cell transformation is associated with deregulation of the vitamin D pathway. *J. Cell. Biochem.* 105: 980–988.
- Kerro-Dego, O., van Dijk, J.E. and Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24:181-198.
- Kumar, A., Wu, H., Collier, L.S., Kwon, J.M., Hanson, J.M. and Neish, A.S. 2009. The bacterial fermentation product butyrate influences epithelial signaling via reactive oxygen species-mediated changes in cullin-1 neddylation. *J. Immunol.* 182: 538-546.



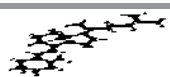
- Lee, J.W., Bannerman, D.D., Paape, M.J., Huang, M.K. and Zhao, X. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet. Res.* 37: 219–229.
- Li, R.W. and Li, C.J. 2006. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics.* 7:234.
- Li, J., Lin, J.C., Wang, H., Peterson, J.W., Furie, C.B., Furie, B., Booth, S.L., Volpe, J.J. and Rosenberg, P.A. 2003. Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* 23(13): 5816 –5826.
- Lindmark M. H., 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr. Res.* 52: 1-3.
- Liu, P.T., Stenger, S., Tang, D.H. and Modlin, R.L. 2007. Vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J. Immunol.* 179: 2060-2063.
- López-Meza, J.E., Gutiérrez-Barroso, A. and Ochoa-Zarzosa, A. 2009. Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* 87(1): 59-63.
- Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S. and Hornig, H.D. 2007. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br. J. Nutr.* 98: 29-33.
- Markus, S.M., Reynders, V., Shastri, Y., Loitsch, S., Stein, J. and Schroder O. 2007. Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells. *Mol. Immunol.* 44: 2107–2114.



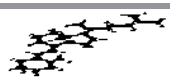
- Martineau, A.R., Wilkinson, K.A., Newton, S.M., Floto, R.A., Norman, A.W., Skolimowska, K., Davidson, R.N., Sørensen, O.E., Kampmann, B., Griffiths, C.J. and Wilkinson, R.J. 2007. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J. Immunol.* 178(11):7190-7198.
- Matthew, J.R., Kemmis, M.C., Taffany, D.A. and Welsh J. 2006. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with 25-Hydroxycholecalciferol actions in human mammary Cell. *J. Nutr.* 136: 2754–2759.
- Miller, G.D., Jarvis, J.K. and McBean, L.D. 2007. Handbook of dairy foods and nutrition. Ed. National Dairy Council. 42- 50.
- National Mastitis Council. 1996. Current concepts of mastitis. Fourth Edition. Cap. 1-3.
- Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Thacker, T.C., Beitz, D.C. and Lippolis, J.D. 2010. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) in bovine monocytes. *J. Dairy Sci.* 93(3): 1041-1049.
- Norman, A.W. and Bouillon, R. 2010. Minireview, vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp. Biol. Med.* 235(9): 1034–1045.
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H. and López-Meza, J.E. 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog.* 47(1): 1-7.
- Parodi, P. W. 2004. Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.* 59:3-59.
- Parodi, P.W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.* 127(6):1055-60.



- Pascal, R. and Riollot, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369–400.
- Place R.F., Noonan E.J., Giardina C. 2005. HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha. *Biochem. Pharmacol.* 70: 394–406.
- Peric, M., Koglin, S., Dombrowski, Y., Gross, K., Bradac, E., Büchau, A., Steinmeyer, A., Zügel, U., Ruzicka, T. and Schaubert, J. 2009. Vitamin D analogs differentially control antimicrobial peptide/"alarmin" expression in psoriasis. *Plos. One.* 4(7): 6340.
- Pozzo, M.J. 2005. Vitamina D: acciones no clásicas. *Act. Ost.* 1: 28-33
- Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 34: 565-578.
- Rainard, P., Fromageau, A., Cunha, P. and Florence, B. 2008. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Vet. Res.* 39: 52.
- Roginski, H., Fox, F.P. and Fuquay, W.J. 2003. *Encyclopedia of dairy sciences.* Ed. Advisory board. 3: 1680-1751.
- Ruckebusch, Y., Phaneuf, L.P. and Dunlop, R. 2000. Fisiología de pequeñas y grandes especies. *Manual Moderno.* 769-775.
- Schrack, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.I., Dowlen, H.H. and Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407-1412.
- Schwab, M., Reynders, V., Shastri, Y., Loitsch, S., Stein, J. and Schröder, O. 2007. Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of



- the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells. *Mol. Immunol.* 44:2107-2114.
- Sharif, A., Umer, M. and Muhammad, G. 2009. Mastitis control in dairy production. *J. Agric. Soc. Sci.* 5: 102–105.
- Shifera, A.S., Leong, D. and Hardin, J.A. 2010. Vitamin D does not modulate NF-kappaB activity in jurkat T cells. *Immunol. Lett.* 131(2): 151- 158.
- Smith, K.L., Hogan, J.S. and Weiss W.P. 1997. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci.* 75: 1659-1665.
- Sordillo, M.L. and Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7(2): 135-146.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., and Wheeler, T.T. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *J. Anim. Sci.* 87: 3-9.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. and Vidal, A. 2007. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 13(20): 2826-32.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Dycatelle, R. and Haesebrouck, F. 2008b. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *Br. J. Nutr.* 100(3): 480-484.
- Veldman, C. M., Cantorna, T. M. and DeLuca, F.H. 2000. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Arch. Biochem. Biophys.* 15(2): 334 - 338.
- Wang, T.T., Nestel, P.F., Bourdeau, V., Nagai, Y., Wang,Q., Liao, J., Mendoza, T.V., Lin, R., Hanrahan, J.H., Mader, S. and White J.H. 2004. Cutting



edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* 173: 2909-2912.

Welsh, J. 2007. Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. *J. Bone Miner. Res.* 2: 86-90.

Zecconi, A. and Smith, K.L. 2000 International symposium on ruminant mammary Gland Immunity. 11–14.

Zhao, X. and Lacasse, P. 2007. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86: 57-65.

