



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología**

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GPR41 Y
GPR43 EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE DEFENSA EN
CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO INFECTADAS
CON *Staphylococcus aureus***

TESIS

Presenta:

Mitzi Ernestina Juárez Gutiérrez

Para obtener el título de:

Médica Veterinaria Zootecnista

Asesor:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Morelia, Michoacán. Junio, 2016



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología**

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GPR41 Y
GPR43 EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE DEFENSA EN
CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO INFECTADAS
CON *Staphylococcus aureus***

TESIS

Presenta:

Mitzi Ernestina Juárez Gutiérrez

Para obtener el título de:

Médica Veterinaria Zootecnista

Morelia, Michoacán. Junio, 2016



Aprobación de Impresión del Trabajo

Morelia, Michoacán, a 22 de junio de 2016


DR. JOSÉ LUIS SOLORIO RIVERA


Director de la FMVZ-UMSNH


P R E S E N T E .

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: "**PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES GPR41 Y GPR43 EN LA EXPRESION DE MOLECULAS DE DEFENSA EN CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO INFECTADAS CON Staphylococcus aureus**", del P. MVZ. MITZI ERNESTINA JUAREZ GUTIERREZ, dirigida por el asesor DR. JOEL EDMUNDO LOPEZ MEZA, fue *revisada y aprobada* por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE


DR. JOSÉ LUIS SOLORIO RIVERA
PRESIDENTE


DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA
VOCAL


DR. JOEL EDMUNDO LOPEZ MEZA
VOCAL (ASESOR)

AGRADECIMIENTOS

Gracias infinitas a mi Dios, por la vida tan maravillosa que me ha regalado.

Doy gracias a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haber sido el centro de formación de la mayor parte de mis estudios académicos hasta el momento.

Agradezco al Dr. Joel Edmundo López Meza por la asesoría, apoyo y valiosas aportaciones al presente trabajo de tesis. De igual manera a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa porque en conjunto me abrieron las puertas de su laboratorio y me permitieron llevar a término este proyecto.

Expreso mi gratitud a mis compañeros de laboratorio, a aquellos que me brindaron sus conocimientos: Marisol, Iván, Naye, Mine, Rafa, Jacqui, Elena, Moni (muchísimas gracias); y su apoyo en aquellos momentos que resultaban un tanto complicados: Luis, Adrián. Gracias.

Muchas gracias pollo y Mario por su amistad y hermandad incondicional. Por ser mis cómplices en tantas aventuras y hacer de la licenciatura una etapa fenomenal. Estoy segura que seguiremos por muy lejos que vayamos. Gracias my friends!

A ti, por el apoyo, aliento, motivación y amor que me brindaste en todo el proceso. Mil gracias por estar y hacer de mi mundo un lugar mucho más hermoso.

Mis disculpas por no mencionar a todos aquellos amigos y profesores que en algún momento u otro fueron y/o siguen siendo parte especial de mi vida y de mi formación, pero si en algún momento llegan a leer estas líneas, estoy segura que sabrán que hablo de ustedes.

Esto apenas comienza...

DEDICATORIA

A los dos pilares más grandes, fuertes y firmes de mi vida:

MIS PADRES:

Ernestina Gutiérrez Vázquez

Aureliano Juárez Caratachea

No me alcanzaría una vida para agradecerles por tanto. Por su amor incondicional y ser ejemplo de lucha y trabajo constante.

Me enseñaron a volar, más sabían que no volaría su vuelo. Me enseñaron a soñar, más sabían que no soñaría su sueño. Me enseñaron a vivir, más sabían que no viviría su vida...sin embargo, en cada vuelo, en cada sueño, en cada día vivido, perdurará PARA SIEMPRE su huella.

Gracias por lo que soy y también por lo que no soy.

Mi amor, respeto y admiración para ustedes, por siempre!

A mi hermana Ana Celestina por ser mi amiga y muchas veces confidente todos estos años. Gracias por esos dos tesoros hermosos que nos regalaste: Paula Mariana y Esteban Haziél, que con sus ocurrencias, risas y amor me brindan tanta felicidad.

LOS AMO CON TODAS LAS FUERZAS DE MI CORAZÓN!

**“Nunca consideres el estudio como una obligación
sino como una oportunidad para penetrar en el
bello y maravilloso mundo del saber”
(Albert Einstein)**

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 del proyecto CONACyT (CB-2013-01-221363), “Rutas de transducción activadas por ácidos grasos durante la internalización bacteriana: el modelo de *Staphylococcus aureus* en epitelio mamario bovino”. Se contó además con una beca de CONACyT (número de becario 23472).

ÍNDICE

	Páginas
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción	3
4. Marco teórico	5
4.1. Mastitis bovina.....	5
4.2. Etiología de la mastitis bovina.....	6
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
4.4. Mecanismo de invasión de <i>Staphylococcus aureus</i> en células de epitelio mamario bovino (CEMB)	8
4.5. Ácidos grasos (AG)	10
4.6. Propiedades de los AG.....	11
4.7. Receptores acoplados a proteínas G (GPR's)	12
4.8. Toxina PTX.....	14
4.9. Respuesta inmune innata.....	16
5. Antecedentes	20
6. Hipótesis	22
7. Objetivo.....	22
8. Materiales y métodos.....	23
8.1. Material biológico.....	23

8.2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
8.3. Cultivo de las CEMB.....	23
8.4. Bloqueo de los GPRs y extracción del ARN total.....	24
8.5. Extracción del ARN total y síntesis del ADNc.....	25
8.6. Análisis de la expresión de los genes de los receptores GPR's y PAM's.....	25
8.7. Análisis estadístico.....	27
9. Resultados.....	28
10. Discusión.....	34
11. Conclusión.....	38
12. Bibliografía.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo propuesto para la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB	8
Figura 2. Estructura de un receptor acoplado a proteína G.....	11
Figura 3. Expresión del gen del receptor GPR41 en las CEMB.....	29
Figura 4. Expresión del gen del receptor GPR43 en las CEMB.....	30
Figura 5. Expresión del gen del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB	31
Figura 6. Expresión del gen del péptido antimicrobiano lingual (LAP) en las CEMB.....	32
Figura 7. Expresión del gen de la psoriasina S100A7 en las CEMB.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones de bloqueo de los receptores GPR´s en las CEMB	23
Tabla 2. Reactivos utilizados en la síntesis del ADNc	24
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	25
Tabla 4. Reactivos utilizados para la PCR punto final	26

1. RESUMEN

La mastitis bovina es una patología que afecta a alta proporción del ganado lechero en todo el mundo. Su importancia radica en las pérdidas económicas que genera y los daños al animal. *Staphylococcus aureus* es el principal agente etiológico aislado en casos de mastitis bovina, el cual tiene la capacidad de internalizarse y sobrevivir dentro de las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), las cuales participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria produciendo péptidos antimicrobianos (PAM's) y otros mediadores de la inflamación. Recientemente se demostró que los receptores acoplados a proteína G (GPR's) GPR41 y GPR43, cuyos ligandos son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), participan en la internalización de *S. aureus*. En este trabajo se utilizó la toxina PTX de *Bordetella pertussis* (100 y 200 ng/ml) para bloquear la actividad de dichos receptores y se evaluó su participación en la expresión de los PAM's TAP, LAP y la psoriasina bovina S100A7. Para ello se cultivaron CEMB en presencia de la toxina PTX con o sin infección, y se extrajo el ARN total para sintetizar el ADNc. Luego se estableció la expresión de los genes de interés mediante PCR punto final y su posterior análisis densitométrico. Respecto a la expresión de los receptores GPR's en las CEMB, ambos mostraron una expresión basal y ésta se incrementó en las CEMB infectadas con *S. aureus*; sin embargo, los tratamientos con la toxina PTX la inhibieron. De igual manera, la infección indujo la expresión de TAP, LAP y S100A7. Interesantemente, solo la expresión de TAP se incrementó en las CEMB infectadas y previamente tratadas con PTX. En conclusión el bloqueo de la actividad de los receptores GPR's favoreció la expresión de TAP, lo cual puede estar relacionado con la disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB previamente reportada.

Palabras clave: mastitis, *Staphylococcus aureus*, GPR's, toxina PTX, péptidos antimicrobianos

2. ABSTRACT

Bovine mastitis is a pathology that affects dairy cattle worldwide and it is very important due to the economic losses and the damage to the animal. *Staphylococcus aureus* is the main etiologic agent isolated from cases of bovine mastitis that has the ability to internalize and survive within the bovine mammary epithelial cells (bMECs), which are involved in the innate immune response of the mammary gland producing antimicrobial peptides (AP's) and other mediators of inflammation. Recently, it was shown that G protein-coupled receptors (GPR's) GPR41 and GPR43, whose ligands are the short-chain fatty acids (SCFA), are involved in the internalization of *S. aureus* into bMECs. In this work, pertussis toxin (PTX) of *Bordetella pertussis* (100 and 200 ng/ml) was used to block the activity of these receptors to evaluate their participation in the expression of AP's TAP, LAP and bovine psoriasin S100A7. For this, bMEC were cultured in the presence of PTX toxin with or without infection and total RNA was extracted to synthesize cDNA. The expression of genes of interest was established by PCR endpoint and subsequent densitometric analysis. Regarding the expression of GPR's receptors in bMEC, both showed a basal expression and this was increased in bMEC infected by *S. aureus*; however, it was inhibited by the treatment with PTX toxin. Similarly, the infection induced the expression of TAP, LAP and S100A7. Interestingly, only the expression of TAP was increased in infected bMEC previously treated with PTX. In conclusion, blocking GPR's receptors activity favored the expression of TAP, which may be related with the decreased of the internalization of *S. aureus* in bMEC previously reported.

3. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina (MB) es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria, comúnmente causada por una infección de origen microbiano. Es considerada una de las enfermedades más costosas en el ganado bovino lechero, generando grandes pérdidas económicas importantes debido a la disminución de la cantidad y calidad de la leche (Zhao y Lacasse, 2007). Esta enfermedad puede cursar con signos clínicos visibles (mastitis clínica) o sin signos aparentes (mastitis subclínica).

Diversos estudios han demostrado que *Staphylococcus aureus* es el patógeno contagioso con mayor prevalencia asociado a la MB (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Bergonier *et al.*, 2014). La prevalencia de esta enfermedad se ha asociado con la capacidad de esta bacteria para invadir y multiplicarse en el interior de la célula epitelial de la glándula mamaria (Zhao y Lacasse, 2007).

Existen diversos factores que favorecen la incidencia de la mastitis, uno de ellos es el periodo de lactancia. En esta etapa, las células epiteliales de la glándula mamaria y los patógenos causantes de la infección están en contacto directo con los componentes de la leche, los cuales pueden ser considerados elementos importantes en el establecimiento o no del patógeno (Burton y Erskine, 2003). Uno de los componentes principales de la leche son las grasas, destacando entre ellas los ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Los AGCC, también llamados ácidos grasos volátiles (VFA), son ácidos grasos orgánicos que contienen de 1-6 carbonos. Estos son formados de manera preferencial en el tracto gastrointestinal de los mamíferos por la fermentación microbiana de los carbohidratos (Rombeau *et al.*, 1990). En bovinos, los AGCC son producidos mediante la fermentación anaeróbica bacteriana de la fibra dietética en el rumen y son absorbidos a través de la pared ruminal, proporcionando la principal fuente de energía para los rumiantes (Erwin *et al.*, 1961; Bergman, 1990). Los AGCC se han estudiado básicamente como fuente de nutrientes; sin embargo,

ahora se sabe que cuentan con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras (anti-inflamatorias) (Miller *et al.*, 2005).

En el 2003, dos grupos de investigadores simultáneamente reportaron la identificación de dos receptores acoplados a proteínas G (GPR's) para AGCC en humanos, a los cuales denominaron GPR41 y GPR43 (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Tazoe *et al.*, 2008). El receptor GPR41 fue relacionado con el tejido adiposo, ya que es expresado en adipocitos y tiene participación en la adipogénesis (Brown *et al.*, 2003). Por su parte, el receptor GPR43 fue detectado en diversas células del sistema inmune, lo que sugiere un papel en la activación y diferenciación de las células de la respuesta inmune (Kebede *et al.*, 2009).

Posteriormente se demostró que el genoma de los bovinos contiene genes similares a los GPR's reportados en humanos (>75% de identidad). Estos receptores fueron detectados en una variedad de tejidos de bovino y además se demostró que estos receptores responden a tratamientos con AGCC (Wang *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009). En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que diversas concentraciones de AGCC (butirato, propionato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* en cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si estos GPR's tienen alguna participación en la respuesta inmune de las CEMB durante el proceso de internalización de *S. aureus* regulada por AGCC.

Con base a lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus*, y evaluar si tienen alguna relación con la expresión de genes de la respuesta inmune innata, particularmente la antimicrobiana.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria. Es una patología que afecta a una alta proporción de ganado lechero en todo el mundo; su etiología puede ser infecciosa o no infecciosa. La importancia de la mastitis bovina radica en que es la patología más común y económicamente más costosa del ganado lechero, dado que afecta el total de costos de producción, estimando pérdidas en el tratamiento con antibióticos, sacrificio y muerte de los animales; además de que reduce significativamente la producción láctea y afecta la composición de ésta, aunado a que afecta negativamente los parámetros reproductivos (Schrick *et al.*, 2001, Bradley, 2002, Seegers *et al.*, 2003). La estimación de pérdidas anuales a nivel mundial por concepto de mastitis es de 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002). En Estados Unidos, las pérdidas anuales por mastitis han sido estimadas entre los 1.5 y 2 billones de dólares, invirtiendo alrededor de 200 dólares por vaca (Kerr *et al.*, 2001; Wellenberg *et al.*, 2002). En México, el promedio de gasto por vaca es de mil setecientos a dos mil pesos anuales (Wolter, 2004).

De acuerdo a su duración la mastitis bovina se puede clasificar en aguda, de aparición repentina y relativamente corta duración, o crónica cuando la infección ha logrado persistir por un periodo largo de tiempo. En relación a sus manifestaciones clínicas, la mastitis puede ser clínica o subclínica. La mastitis clínica se caracteriza por la inflamación de uno o varios cuartos de la ubre, se puede presentar enrojecimiento, hinchazón, dolor, endurecimiento, elevación de la temperatura y reducción en la producción y calidad de leche. Por su parte, en la mastitis subclínica la ubre no muestra signos de inflamación, comúnmente es de larga duración, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche y afecta la calidad de la misma; además, puede servir como un reservorio para infectar a otros animales (Heringstad *et al.*, 2000; Schrick *et al.*, 2001; Cervinkova *et al.* 2013). Sin embargo,

en este tipo de mastitis la infección puede ser detectada por el aumento en el conteo de las células somáticas del cuarto afectado, tales como leucocitos (neutrófilos predominantemente) y células epiteliales (Bradley, 2002; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

En general, la mastitis causada por microorganismos se caracteriza por tres etapas: invasión del patógeno, infección e inflamación. En la etapa de invasión, los microorganismos se mueven a través del canal del pezón. En la etapa de infección, la bacteria se establece dentro de la cisterna de la glándula, donde se multiplica y disemina por todo el tejido de la glándula mamaria, dependiendo de la susceptibilidad del animal. En la etapa final, el proceso inflamatorio da lugar a un incremento considerable en la cuenta de células somáticas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

4.2 Etiología de la mastitis bovina

El tratamiento aplicado contra la mastitis es regularmente dirigido a eliminar del hato patógenos contagiosos y ambientales (White y McDermott, 2001). De acuerdo a su epidemiología, el principal reservorio de patógenos contagiosos es una ubre infectada, mientras que un ambiente contaminado es el principal reservorio de patógenos causantes de mastitis con etiología ambiental. Tanto *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma spp.*, son considerados como típicos patógenos contagiosos. Por otro lado, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, enterobacterias, son consideradas como típicos patógenos ambientales (Gruet *et al.*, 2001; Bradley, 2002; Barkema *et al.*, 2009).

Estos microorganismos invaden la glándula mamaria cuando el orificio del pezón está abierto, por ejemplo, durante o después del ordeño, o cuando hay algún daño físico al pezón, siguiendo de una rápida multiplicación bacteriana y producción de sustancias dañinas que resultan finalmente en una respuesta inflamatoria

(Shuster *et al.*, 1996; Schrick *et al.*, 2001). La invasión de las CEMB por las bacterias afecta la función secretora de las células y esto puede estar relacionado con el decremento de la producción láctea asociada con la mastitis (Matthews *et al.*, 1994). Los mecanismos que utilizan las bacterias para persistir dentro de la glándula mamaria incluyen aquellos que le permiten evadir al sistema inmune y su eliminación por el ordeño natural (Leigh, 1999), tales como la habilidad para resistir la fagocitosis, la adherencia a la matriz extracelular y a las CEMB (Almeida *et al.*, 1999; Lammers *et al.*, 2001).

4.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es el agente etiológico de numerosas infecciones agudas y crónicas en humanos y animales; se le ha implicado en una amplia variedad de enfermedades como endocarditis, osteomielitis y choque séptico (Qazi *et al.*, 2001). Es el agente patógeno más frecuentemente aislado y responsable de casos de mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras (Borm, 2006; Bouchard *et al.*, 2013). Es una bacteria en forma de coco, Gram + y coagulasa positivo (Wolter *et al.*, 2004). Este microorganismo vive dentro o fuera de la ubre, y su carácter contagioso favorece su propagación en el ganado (Rodríguez, 2002). Esta bacteria infecta la glándula mamaria de los bovinos, invadiendo los alveolos y posteriormente el tejido conectivo de la ubre bovina en el periodo de lactancia (Hensen *et al.*, 1999), generando de manera preferencial la mastitis subclínica crónica, la cual se detecta principalmente por un recuento elevado de células somáticas, siendo este su gran impacto negativo en la producción y calidad de la leche (Saran y Chaffer, 2000).

S. aureus generalmente no es considerado un patógeno intracelular de la magnitud de la que se asocian a los patógenos intracelulares facultativos clásicos (e.j. *Listeria*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*); sin embargo, está bien documentado que *S. aureus* es capaz de internalizarse y sobrevivir en una amplia variedad de células de mamíferos, entre ellas, las CEMB. Este mecanismo es empleado para replicarse dentro de la célula hospedera y evadir la respuesta

inmune propia del organismo, además de que lo protege de la terapia antimicrobiana (Bayles *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2001).

4.4 Mecanismo de invasión de *Staphylococcus aureus* en las células de epitelio mamario bovino (CEMB)

Las CEMB juegan un papel relevante durante las infecciones intramamarias debido a que están en contacto íntimo con los patógenos responsables de la mastitis y son un blanco para bacterias intracelulares que provocan infecciones crónicas y subclínicas, como lo hace *S. aureus* (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Alva-Murillo *et al.*, 2014).

La infección por *S. aureus* es un proceso complejo, ya que cuenta con gran variedad de factores de virulencia (enterotoxinas, hemolisinas, coagulasas, producción de biopelículas) e involucra diferentes combinaciones de componentes de superficie y extracelulares, los cuales son expresados durante la infección y le permiten colonizar, invadir y multiplicarse dentro del hospedero, además de evadir mecanismos de defensa del organismo y el efecto de los antibióticos (Álvarez, 2010; Bouchard *et al.*, 2013; Boonyayatra *et al.*, 2014).

Este patógeno puede persistir por largos periodos de tiempo en las vacas ya que puede internalizarse en diferentes tipos celulares (ej. epitelios y endotelios). El principal mecanismo de internalización es el conocido como “zipper”, el cual es dependiente de la presencia de proteínas de unión a fibronectina (FnBP) en la superficie de la bacteria (de las adhesinas más importantes) y su interacción con la fibronectina (Fn, componente de la matriz extracelular), este complejo FnBP-Fn es reconocido por la integrina $\alpha 5\beta 1$ (receptor localizado en célula hospedera), presuntamente seguida de eventos de transducción de señales que conducen a un reordenamiento del citoesqueleto de actina de la célula hospedera (**Fig 1.**) (Wesson *et al.*, 2000; Kerro-Dego *et al.*, 2002). Después de la internalización, se ha observado que la expresión del gen regulador accesorio *agr* de la bacteria activa la producción

de hemolisinas, entre otras toxinas, para que se produzca la ruptura del endosoma y con ello *S. aureus* pueda ser liberado hacia el citoplasma y multiplicarse (Qazi *et al.*, 2001; Shompole *et al.*, 2003).

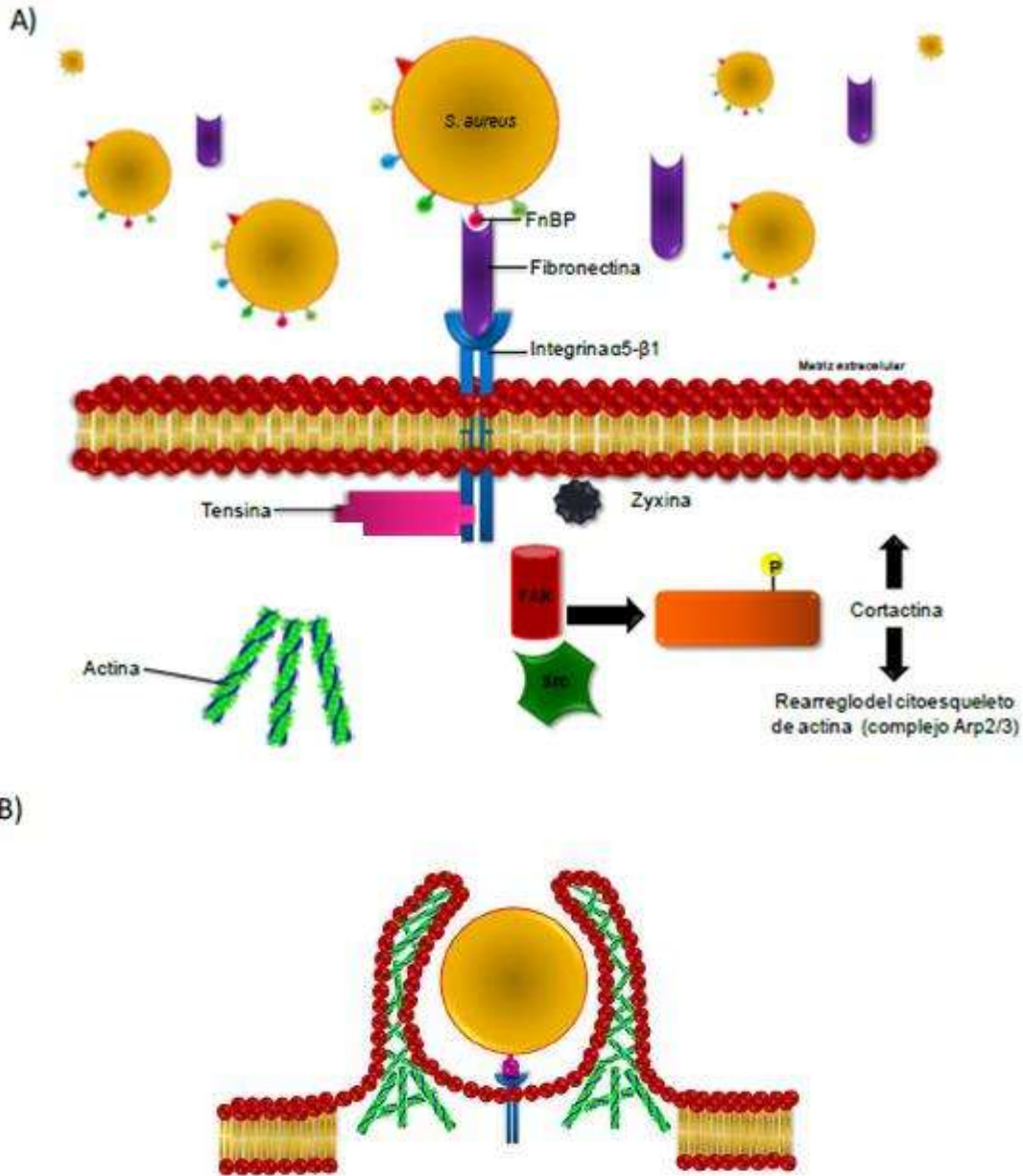


Figura 1. Mecanismo propuesto para la invasión de *S. aureus* en las CEMB. A) La bacteria se une a la fibronectina (Fn) por medio de las proteínas de unión a fibronectina (FnBP), una vez formado el complejo Fn-FnBP se une a un receptor de la célula hospedera denominado receptor integrina $\alpha 5 \beta 1$. **B)** La unión del ligando al receptor estimula la polimerización de actina y la endocitosis, mediante la formación de una vacuola que es transportada al interior de la célula (Tomado de Tena-Hernández, 2012).

4.5 Ácidos grasos (AG)

Los AG son biomoléculas de naturaleza lipídica los cuales desempeñan actividades fisiológicas muy importantes ya que forman parte de los componentes de las membranas biológicas, además de que algunos derivados de AG funcionan como hormonas y mensajeros intracelulares (Nelson y Cox, 2005).

Los AG están estructurados por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo terminal (-COOH) (Rustan y Devron, 2005). Son moléculas anfipáticas, debido a que su cadena hidrocarbonada es hidrófoba y el grupo carboxilo hidrófilo (Nelson y Cox, 2005). De acuerdo a la longitud de su cadena pueden dividirse en ácidos grasos de cadena corta (1-4 carbonos), cadena media (6-10 carbonos) y cadena larga a partir de 16 carbonos (Cuvelier *et al.*, 2004).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente el acetato, propionato y butirato, están presentes en el torrente sanguíneo en humanos como resultado de la fermentación bacteriana anaeróbica de los carbohidratos no digeridos del colon (Ohira *et al.*, 2013). Juegan un rol importante en la regulación de la fisiología del hospedero y se han visto implicados en procesos patofisiológicos, así como en una variedad de trastornos inmunes (Pluznick, 2014). De igual manera en los mamíferos, específicamente en los bovinos, los AGCC son producidos por la fermentación anaeróbica bacteriana de la fibra dietética en el rumen y absorbidos a través de la pared ruminal, proporcionando la principal fuente de energía para los rumiantes (Erwin *et al.*, 1961; Bergman, 1990).

Los AGCC también conocidos como AGV's (ácidos grasos volátiles) son el: ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, isobutírico y 2-metilbutírico. Los ácidos acético, propiónico y butírico son los que se producen en mayor cantidad durante la fermentación en el rumen (Zavaleta, 2003).

Durante la etapa de lactancia la glándula mamaria bovina es capaz de sintetizar AG, los cuales pasarán a ser constituyentes de la leche. Estos pueden ser tomados del torrente sanguíneo o ser sintetizados *de novo* en las CEMB. Los AG de la leche pueden ser obtenidos por medio de dos vías: la actividad antimicrobiana en el rumen o a través de la ingesta de alimentos (Parodi, 2004).

La leche bovina contiene aproximadamente 87% de agua, 4.6% de lactosa, 3.4% de proteína, 4.2% de grasa, 0.8% de minerales y 0.1% de vitaminas. La composición varía dependiendo de la raza, estrategias de alimentación, manejo, número de lactancia, estación, entre otras (Mansson, 2008). La grasa de la leche bovina está conformada aproximadamente por 98% de triacilglicéridos, menos de 2% de fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol, además de pequeñas cantidades de AG libres (Jensen *et al.*, 2002).

4.6 Propiedades de los AG

Los AG no son solo nutrientes esenciales, sino que también contribuyen a muchas funciones celulares. Participan en diversas actividades como: nutrientes para el epitelio del colon, moduladores del pH colónico y otras funciones asociadas con el transporte de iones; además de regular la proliferación, diferenciación y expresión de genes (Miller *et al.*, 2005). Para llevar a cabo algunas de estas funciones requieren de la participación de receptores, particularmente aquellos conocidos como Receptores acoplados a proteínas G (GPR's), los cuales se describen a continuación.

4.7 Receptores acoplados a proteínas G (GPR's)

En los organismos, incluyendo a los rumiantes, existen los sistemas de comunicación celular en donde son liberados mediadores químicos que regulan las actividades de otras células. Estos a su vez, reconocen a receptores nucleares o receptores de la membrana plasmática de las células blanco (Gether, 2000). Una vez que el mediador interactúa con el receptor, éste transduce la señal a través de gran número de efectores, hasta que se emite una respuesta celular (Gether, 2000; Marinissen *et al.*, 2001).

Existen receptores nucleares que actúan como sensores de los AG, tales como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs); ellos mantienen la homeostasis bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas por medio de coordinar la expresión de proteínas que involucran la ingesta, síntesis, transporte, almacenamiento, degradación y eliminación de lípidos (Chawla *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos de los efectos biológicos de los AG pueden ser mediados por mecanismos alternativos (independientes de PPARs) e involucran a receptores de membrana; estos son los receptores acoplados a proteínas G o GPR's (Ichimura *et al.*, 2009).

Los GPR's constituyen una de las familias más grandes de proteínas en el genoma humano; estos receptores cuentan con motivos estructurales que les permiten interactuar con una gran diversidad de ligandos extracelulares, proteínas intracelulares, proteínas G, arrestinas y otros receptores (Eglen *et al.*, 2007). Los GPR's están formados por una sola cadena polipeptídica que consta de aproximadamente 300 aminoácidos (Eglen *et al.*, 2007). Esta proteína está constituida por 7 dominios transmembranales, con el extremo amino terminal en el exterior y el carboxilo en el interior de la célula (Le Poul *et al.*, 2003; Stoddart *et al.*, 2008). Presentan una estructura con siete secuencias de 25-35 residuos aminoácidos, con alto grado de hidrofobicidad, dispuestos en una estructura de hélices α que atraviesan la membrana celular. Estas hélices están conectadas por

tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares. Los receptores acoplados a proteínas G están parcialmente inmersos en la bicapa lipídica, en un ambiente no polar (**Fig. 2**) (Scarselli *et al.*, 2000).

Una de las características distintivas de los GPR's es la capacidad de interactuar con una proteína G heterotrimérica, formada por las subunidades α , β y γ . En la subunidad $G\alpha$ reside la actividad de GTPasa. La proteína G, se une al receptor entre los dominios 5 y 6 (Herroeder *et al.*, 2009). Cuando el receptor es activado por un ligando se inducen cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G, provocando que la subunidad α libere GDP y una GTP, lo cual provee la energía necesaria para la disociación de la subunidad α , de las subunidades $\beta\gamma$ (Eglen *et al.*, 2007).

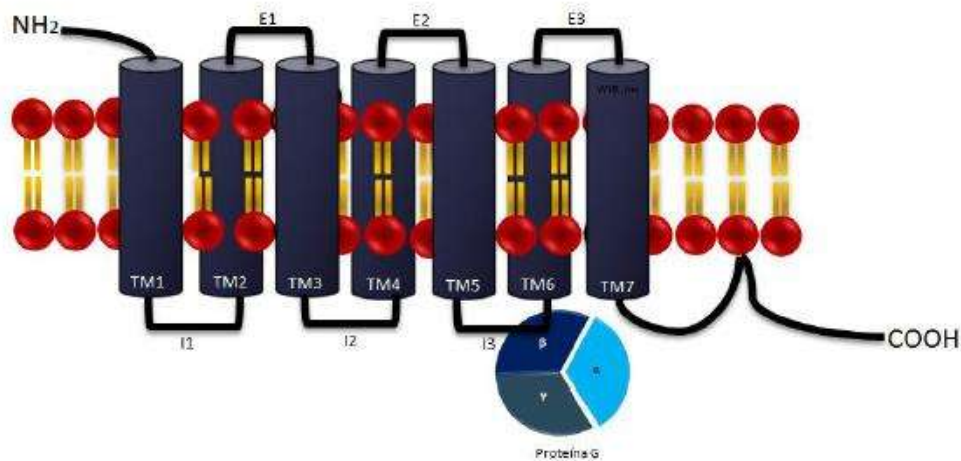


Figura 2. Estructura de un receptor acoplado a proteína G. El receptor está formado por 7 dominios transmembranales (TM), con un extremo amino terminal localizado en el exterior de la célula y uno carboxilo terminal en el interior. Los dominios se encuentran conectados a través de 3 bucles extracelulares (E) y 3 bucles intracelulares (I) (Tomado de Tena-Hernández, 2012).

En el 2003, dos grupos de investigadores simultáneamente reportaron la identificación de dos GPR's que son activados por AGCC (formiato, acetato, propionato, butirato y pentanoato) en humanos, a los cuales denominaron GPR41 y GPR43 (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Tazoe *et al.*, 2008). Estos receptores difieren en su especificidad por el ligando con diferente longitud de cadena de carbonos (Ichimura *et al.*, 2009). Gran número de reportes han visto implicados ambos receptores en la modulación de diversos eventos fisiológicos; el receptor GPR41 ha sido relacionado con el tejido adiposo y en trastornos intestinales, ya que es expresado en adipocitos y tiene participación en la adipogénesis, así como en células enteroendócrinas (Brown *et al.*, 2003; Reimann y Gribble, 2013). Por su parte, el receptor GPR43 ha sido detectado en diversas células del sistema inmunitario, mostrando abundancia en leucocitos, lo que sugiere un papel en la activación, diferenciación y quimioatracción de las células de la respuesta inmune (Kebede *et al.*, 2009; Reimann y Gribble, 2013).

El acoplamiento de estos receptores a la proteína G es diferente. El receptor GPR41 está acoplado a una proteína G α_i , la cual es sensible a la toxina PTX de *Bordetella pertussis*. Respecto al receptor GPR43, éste puede estar acoplado a las proteínas G α_i y G α_q (insensible a la toxina PTX de *B. pertussis*) (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2003; Stoddart *et al.*, 2008). Ambos receptores activan la liberación de Ca $^{2+}$, estimulando la vía ERK (cinasa regulada extracelularmente) e inhibiendo la acumulación de AMPc (Le Poul *et al.*, 2003).

4.8 Toxina PTX

Bordetella pertussis es una bacteria Gram negativa que afecta el tracto respiratorio del humano; es el agente etiológico de la tosferina (Carbonetti, 2010). El género se compone de 7 especies, entre ellas, *B. parapertussis* (provoca la tosferina leve similar en los humanos, *B. bronchiseptica* (causa infecciones respiratorias en mamíferos, como cerdos y perros) y *B. avium* (responsable de la rinitis en aves) (Antoine *et al.*, 2000).

B. pertussis posee numerosos factores de virulencia, los cuales pueden ser agrupados en dos grupos funcionales: adhesinas y toxinas, dentro de estas últimas se encuentra la toxina pertussis (PTX) (Antoine *et al.*, 2000). La toxina PTX es una exotoxina proteica (Verma y Burns, 2007). Es un complejo de subunidades con una configuración AB₅ (una subunidad activa y 5 subunidades de unión). El oligómero B es un anillo pentamérico compuesto por las subunidades S₂, S₃, dos S₄ y una S₅, las cuales se unen a varias (la mayoría no identificadas) moléculas glicoconjugadas en las superficie de las células blanco (Wong y Rosoff, 1996). La subunidad S₂ y S₃ contienen cada una diferentes dominios de unión a carbohidratos (Saukkonen *et al.*, 1992), lo cual probablemente explica la capacidad de PTX para unirse e intoxicar la células (por lo menos en cultivo) (Carbonetti, 2010).

La actividad enzimática de PTX reside en la subunidad A, también conocida como S₁ (Katada *et al.*, 1983). Una vez en el citosol de la célula, S₁ hidroliza NAD celular y la toxina bloquea la activación del receptor por medio de una ADP ribosilación en un residuo de cisteína localizado cuatro aminoácidos antes del C-terminal de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica (Milligan, 1998). Esta modificación resulta en la inhibición de las vías de señalización de proteínas acopladas a proteína G_i (Katada *et al.*, 1983).

La ADP-ribosilación de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica bloquea a la subunidad α en su estado inactivo (forma de unión a GDP) por lo que es incapaz de inhibir la adenilato ciclasa (AC). Esta modificación de las proteínas G _{α i/o} resulta en una mayor acumulación de AMPc (Magmool y Kurose, 2011), aumentando la expresión de péptidos antimicrobianos (Sunkara *et al.*, 2013). Este es uno de los mecanismos por los cuales la toxina PTX induce variados efectos patológicos en las células hospederas (Magmool y Kurose, 2011).

La toxina PTX se usa comúnmente como reactivo en estudios de señalización de células de mamíferos debido a su efecto inhibitor de GPR's. Además, PTX

puede promover la infección de *B. pertussis* por una variedad de mecanismos: uno de ellos es el efecto inhibitorio de la inmunidad innata, reduciendo la respuesta inmune adaptativa generada por la infección (Carbonetti, 2010).

4.9 Respuesta Inmune Innata

Como se comentó con anterioridad, la mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria de la vaca; en esta inflamación, el sistema inmune de la glándula mamaria se activa para eliminar el patógeno. Este mecanismo de defensa incluye factores anatómicos, celulares y solubles que actúan en coordinación y son cruciales para la modulación de la resistencia y susceptibilidad de la glándula mamaria a la infección (Oviedo *et al.*, 2007).

Algunas bacterias son capaces de modular la producción de citoquinas en las células del sistema inmune de la glándula mamaria, lo que modifica la respuesta inmune innata acogida. La interacción entre bacterias patógenas, epitelio, glándula mamaria y células del sistema inmune, es complejo. Por esta razón, el estudio y caracterización completa de la respuesta inmune innata y adquirida a diferentes agentes etiológicos son necesarios para entender en detalle la fisiopatología de la mastitis, y también para diseñar enfoques eficientes para el diagnóstico, tratamiento y control de esta enfermedad (Oviedo *et al.*, 2007).

En general, el sistema inmune se caracteriza por su capacidad de reconocer y discriminar entre los agentes invasores del exterior y las moléculas producidas por el organismo (Janeway *et al.*, 2002). La glándula mamaria realiza variedad de funciones inmunológicas que confiere protección; incluso en el pre-parto en el calostro existen diversos anticuerpos que son secretados para proteger al recién nacido contra agentes infecciosos (Sordillo *et al.*, 1997).

El tejido de la glándula mamaria se protege por medio de dos mecanismos de defensa inmune: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Los sistemas

inmunes innatos y adquiridos interactúan estrechamente en un intento de proporcionar protección contra los microorganismos causantes de la mastitis (Sordillo *et al.*, 1997; Rivas *et al.*, 2002; Burvenich *et al.*, 2003). Las CEMB participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria produciendo mediadores pro- y anti-inflamatorios, tales como los péptidos antimicrobianos (PAM's), óxido nítrico, etc. (Rainard *et al.*, 2006; Schukken *et al.*, 2011).

Los PAM's son producidos por una amplia variedad de organismos como parte de su primer línea de defensa (eucariotes) o como una estrategia de competencia por nutrientes y espacio (procariotes); tienen una actividad no específica, característica que los califica como candidatos potentes para aplicaciones biomédicas. Los PAM's están entre las alternativas más prometedoras para evitar la proliferación de patógenos resistentes a antibióticos y el tratamiento de enfermedades bacterianas tanto en humanos como en animales. (López-Meza *et al.*, 2011; López-Meza *et al.*, 2015).

Los PAM's son usualmente péptidos pequeños (12-100 residuos de aminoácidos), tienen carga positiva (+2 a +9), aunque existen también algunos con carga neutra y negativa. Son anfipáticos y han sido aislados de bacterias, plantas y animales, incluyendo humanos; lo que da un panorama de la diversidad estructural tan grande de estas moléculas y sus diferentes mecanismos de acción. El amplio espectro de las actividades biológicas reportadas para estas moléculas sugiere un potencial benéfico en el tratamiento del cáncer, infecciones parasitarias, virales y fúngicas, así como en la modulación del sistema inmune (López-Meza *et al.*, 2011).

Estos péptidos de defensa del organismo son un componente primitivo y conservado de la respuesta inmune innata, son moléculas que proveen protección contra patógenos ambientales, actuando en contra de amplio número de microorganismos. La producción de PAM's es el mayor componente de la respuesta inmune innata contra alguna infección. Su producción puede ser constitutiva o

inducida, considerando algunas características como el organismo, el tipo celular y el péptido (Pinheiro da Silva y César-Machado, 2012).

Las principales fuentes celulares de PAMs son los granulocitos, macrófagos, plaquetas y las células epiteliales (Rainard y Riollet, 2006). En bovinos han sido descritos y evaluado la expresión de algunos de estos péptidos, tales como LAP (péptido antimicrobiano lingual), TAP (péptido antimicrobiano traqueal) (Diamond *et al.*, 1991); además de otras moléculas antimicrobianas como la psoriasina bovina S100A7 (proteína de la familia de las proteínas de unión a Ca, con actividad antibacteriana), entre otros (Téllez-Pérez *et al.*, 2012).

Varios genes de β -defensinas se expresan en la ubre bovina, tanto en el tejido mamario sano (LAP, TAP y BNBD3), probablemente de expresión constitutiva, o en el tejido infectado (Roosen *et al.*, 2004). Además, se ha reportado una abundante expresión del ARNm de LAP en los revestimientos de los conductos del pezón y cisterna de cuartos con mastitis, lo que sugiere que la expresión de LAP se induce en el sitio de la infección (Swanson *et al.*, 2004).

Los genes de las defensinas TAP y LAP tienen una expresión constitutiva e inducible en el tejido epitelial mamario bovino (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, el estudio de su expresión y regulación continúa en constante investigación tanto *in vivo* como *in vitro*, analizando el incremento o la disminución de dichos genes que codifican para estas defensinas tanto en una ubre sana como en casos de mastitis, para confirmar el papel crucial que reflejan en la defensa de la glándula mamaria contra agentes infecciosos (Kościuczuk *et al.*, 2014).

Por otro lado, la psoriasina (S100A7) también se ha visto asociada con la respuesta de la glándula mamaria a infecciones. La psoriasina fue detectada en la cisterna de la glándula en vacas infectadas con *E. coli*; además, se detectó un aumento de su expresión en vacas infectadas con *S. aureus* (Regenhard *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014).

Estas observaciones muestran que TAP, LAP y S100A7 se expresan en la glándula mamaria y sugieren un papel de estos en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria en condición de mastitis.

5. ANTECEDENTES

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria. Es una patología que afecta a una alta proporción de ganado lechero en todo el mundo; su etiología puede ser infecciosa o no infecciosa. Además, *S. aureus* es el principal agente patógeno responsable de casos de mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras (Borm, 2006; Bouchard *et al.*, 2013).

En bovinos, los AGCC (acetato, butirato y propionato) son producidos por fermentación anaeróbica bacteriana de la fibra dietética en el rumen y absorbidos a través de la pared ruminal, proporcionando la principal fuente de energía para los rumiantes (Erwin *et al.*, 1961; Bergman, 1990). Los AG se han estudiado básicamente como fuente de nutrientes; sin embargo, ahora se sabe que cuentan con propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas y anti-inflamatorias, participando también en diversas funciones celulares, tales como la regulación de la proliferación, diferenciación y expresión de genes (Miller *et al.*, 2005).

En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo se demostró que diversas concentraciones de AGCC (butirato, propionato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). En el caso del butirato y del hexanoato se ha logrado determinar las rutas de comunicación celular involucradas en la regulación de la internalización de esta bacteria en las CEMB, siendo la ruta TLR2/p38 la descrita hasta el momento como relevante (Alva-Murillo *et al.*, 2015). No obstante, la posible participación de otras rutas no se ha evaluado, particularmente la de los receptores acoplados a proteínas G (GPR's).

En este sentido, un estudio previo del grupo de trabajo demostró que los receptores GPR41 y GPR43 tienen una participación en la internalización de *S. aureus* en las CEMB, ya que al ser bloqueados con la toxina PTX de *B. pertussis*,

la endocitosis de *S. aureus* disminuyó (Tena-Hernández, 2012). Sin embargo, se desconoce qué mecanismos están involucrados en ello.

Recientemente se reportó el sinergismo que tiene el AMPc (adenosín monofosfato cíclico) con el AGCC butirato. Su acción sinérgica se relacionó con su capacidad para inducir la expresión de PAM's en humanos (Sunkara *et al.*, 2014). Es conocido que el bloqueo de la actividad de los GPR's favorece un incremento en la concentración intracelular de AMPc. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó si el bloqueo de los receptores de AGCC GPR41 y GPR43 con la toxina PTX favorece la expresión de PAM's en CEMB.

6. HIPÓTESIS

La actividad de los receptores GPR41 y GPR43 regula positivamente la expresión de los péptidos antimicrobianos TAP, LAP y la psoriasina S100A7 en células de epitelio mamario bovino infectadas con *Staphylococcus aureus*.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la actividad de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus* regula la expresión de los péptidos antimicrobianos TAP, LAP y la psoriasina S100A7.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico y reactivos

El modelo de estudio que se utilizó en este trabajo fueron cultivos de células de epitelio mamario bovino (CEMB).

Se utilizó la cepa de la bacteria *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 27543 (American Type Culture Collection) que tiene la capacidad de invadir a las CEMB (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

El bloqueo de la actividad de los receptores GPR's en las CEMB se realizó con la toxina PTX de *B. pertussis* (100 y 200 ng/ml, 16 h; Sigma) (vehículo: agua) (Tena-Hernández, 2012).

8.2 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Para la obtención del inóculo de la bacteria, ésta se creció en caldo Luria Bertani (5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura), incubándose a 37°C durante 16-18 h. Posteriormente se ajustó la densidad óptica (DO₆₀₀) de acuerdo a las necesidades del experimento (DO 0.2 = 9.2×10^7 UFC/ml).

8.3 Cultivo de las células de epitelio mamario bovino (CEMB)

El cultivo de las CEMB se obtuvo a partir de muestras de tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, mediante un método descrito previamente (Anaya *et al.*, 2006). Las CEMB fueron cultivadas (pasaje 4 al 6) en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio DMEM/F-12 Ham, Sigma (F12K completo), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 5% de suero de ternera, 1.5gr. de NaHCO₃, 1% de penicilina-estreptomina, 500µl de anfotericina (Invitrogen), 500µl de insulina (Sigma) y 500µl de hidrocortisona (Sigma). También se utilizó el medio F12Ki (F12K incompleto), el cual contiene todos los insumos mencionado anteriormente, pero sin antibióticos y sin suero. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

8.4 Bloqueo de los receptores GPR's y extracción del ARN total

Las CEMB fueron cultivadas en cajas de 6 pozos (Costar-Corning) y se sometieron a diferentes condiciones (**Tabla 1**). Para ello se adicionó colágena tipo I de cola de rata a los pozos de las cajas donde se cultivaron las CEMB, sembrando $\sim 50 \times 10^4$ células/pozo en medio F12K completo. A las 24 h (comprobando que todos los pozos se encontraban confluentes) se lavaron las células con PBS y se aplicó F12K incompleto por al menos 12 h previas a los tratamientos.

Se utilizaron dos pozos con CEMB (sin infección y sin toxina PTX) como controles. En otros dos pozos se infectaron las CEMB con *S. aureus* por 2 h a 37°C, empleando una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias/célula. Para el bloqueo de los receptores GPR's se utilizó una concentración de 100 ng/ml y 200 ng/ml de toxina PTX, por 16 h. Esta última condición se realizó solamente con la toxina y con la toxina más la infección de *S. aureus*.

Tabla 1. Condiciones de bloqueo de los receptores GPR's en las CEMB

-
1. CEMB control
 2. CEMB + *S. aureus*
 3. CEMB + PTX 100 ng/ml
 4. CEMB + PTX 200 ng/ml
 5. CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*
 6. CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*

8.5 Extracción del ARN total y síntesis del ADNc

Para la extracción del ARN total se utilizó Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La muestra obtenida fue tratada con DNAsa I (Invitrogen) para eliminar cualquier contaminación con DNA. La síntesis del ADNc se realizó por medio de la reacción de transcriptasa reversa (RT) a partir del ARN total. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l (**Tabla 2**).

Tabla 2. Reactivos utilizados en la síntesis del ADNc

Reactivo	Contenido	Incubación (termociclador)
ARN total	1 μ g	
Oligonucleótidos dT (15-18 bases)(μ g/ml) 15: 900.23; 16: 901.08 17: 1021.92 18: 1082.76	1 μ l	65°C / 5min
dNTP's Mix (10 mM)	1 μ l	
5X First-Strand buffer	4 μ l	
0.1 M DTT	2 μ l	37°C / 2min
RNasa Out	0.5 μ l	
M-MLV RT (100 U)	1 μ l	37°C / 50min 70°C / 15min

8.6 Análisis de la expresión de los genes de los receptores GPR's y PAM's

El ADNc se utilizó para establecer los niveles de expresión de los genes de los receptores GPR41 y GPR43, además de los PAM's TAP, LAP y la psoriasina S100A7. Se utilizaron oligonucleótidos específicos que codifican para dichos genes (**Tabla 3**). Como control interno se utilizó GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Gene	Oligonucleótido	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
GPR41	Directo	5'- CCAACCCAGACCACTCCTTC -3'	57.7	159	Yonezawa <i>et al.</i> , 2009
	Reverso	5'- TTAGCAAGAGCACGTCCACA -3'			
GPR43	Directo	5'- CATGGTGGTCACCACCTTCT -3'	57	230	
	Reverso	5'- GACTGGCATTGAGGCTACCA -3'			
GAPDH	Directo	5'- TCAACGGGAAGCTCACTGG -3'	56.9	237	
	Reverso	5'- CCCAGCATCGAAGGTAGA -3'			
TAP	Directo	5'- GCGCTCCTCTTCTGGTCCTG -3'	57	216	Medina-Estrada <i>et al.</i> , 2015
	Reverso	5'- GCACGTTCTGACTGGGCATTGA -3'			
LAP	Directo	5'- GCCAGCATGAGGCTCCATC -3'	54	194	
	Reverso	5'- CTCCTGCAGCATTTTACTTGGGCT -3'			
S100A7	Directo	5'- GCAGCTCTCAGCTTGAGCAG -3'	54	221	
	Reverso	5'- CCAGCAAGGACAGGAAGTCTCAG -3'			

TAP: Péptido Antimicrobiano Traqueal; LAP: Péptido Antimicrobiano Lingual; S100A7: Psoriasina bovina; GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

La reacción de la PCR punto final se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl (**Tabla 4**). Las condiciones del ciclo de PCR fueron las siguientes: 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94°C por 30 s, T_m (temperatura media respectiva de cada oligo) por 30 s, 72°C por 30 s y finalmente 72°C por 5 min.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la PCR punto final

Reactivo	Contenido
10 buffer 10X PCR	2 μ l
MgCl ₂ 50 mM	0.6 μ l
Oligo directo (10 mM)	1 μ l
Oligo reversa (10 mM)	1 μ l
Taq polimerasa	1 μ l
dNTP's (10 pmol)	2 μ l

Posteriormente, se corrió un gel de agarosa a 1% (0.3 g de agarosa, 30 ml de buffer TBE 1X, 0.75 μ l de SYBR green) en donde se colocó un peine para 12 orificios. De cada producto de amplificación de las muestras de PCR punto final, se tomaron 5 μ l y se cargaron en el gel. El voltaje al que se corrió cada gel fue a 80 volts por un tiempo de 30 min. Finalizada la corrida, se colocó el gel en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 100 System) y bajo efecto de la iluminación de la luz UV se distinguieron las bandas respectivas, según la condición y el gen en cuestión. Luego se tomó un registro fotográfico.

Posteriormente se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de los genes por densitometría. Para ello se utilizó el software ImageJ, tomando en cuenta la intensidad de expresión de cada gen en sus respectivas condiciones y la del gen endógeno. Los valores estimados para el análisis densitométrico se normalizaron en relación a la expresión del gen endógeno GAPDH.

8.7 Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron de tres mediciones diferentes de cada gen y de cada condición. Se compararon mediante la prueba *t* de Student. Los resultados son reportados con la media \pm el error estándar. Los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si los receptores GPR41 y GPR43 regulan la expresión de TAP, LAP y S100A7 en CEMB infectadas con *S. aureus*. Con este fin se bloqueó el funcionamiento de los receptores con la toxina PTX y se analizó la expresión de los genes de interés.

Para ello se cultivaron las CEMB bajo diferentes condiciones (tabla 1) y se realizó la extracción de ARN total, para posteriormente sintetizar el ADNc, el cual se utilizó para establecer los niveles de expresión mediante la técnica de PCR en punto final. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en geles de agarosa a 1% y se analizaron por densitometría con el software ImageJ. Como control se utilizó el gen endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa). Los resultados se muestran a continuación.

Primero se evaluó el efecto de la infección, la toxina PTX y la combinación de ambos sobre la expresión de los receptores GPR's. El análisis de la expresión del receptor GPR41 se muestra en la Figura 3. Las CEMB mostraron una expresión basal de este receptor (Fig. 3A, carril 1). Sin embargo, se observó un incremento de la expresión de este receptor en las condiciones de infección con *S. aureus* (~0.2 veces) y en las CEMB tratadas con 100 ng/ml de la toxina PTX (~0.6 veces) (Fig. 3A, carriles 2 y 4). Lo anterior se comprobó con el análisis densitométrico (Fig. 3B). El resto de las condiciones tuvieron una disminución en la expresión de este receptor.

Respecto a la expresión del receptor GPR43, los resultados se presentan en la Figura 4. De manera similar a lo observado en el receptor GPR41, las CEMB poseen una expresión basal de este receptor, la cual también fue inducida por la bacteria. Interessantemente, el resto de las condiciones tuvieron una disminución significativa en la expresión de este receptor.

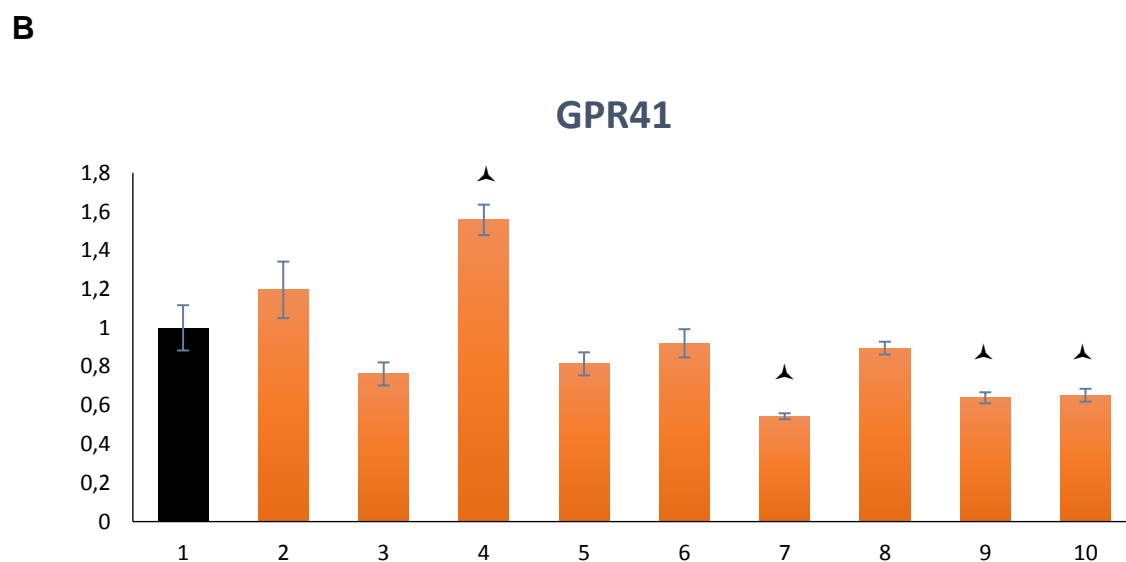
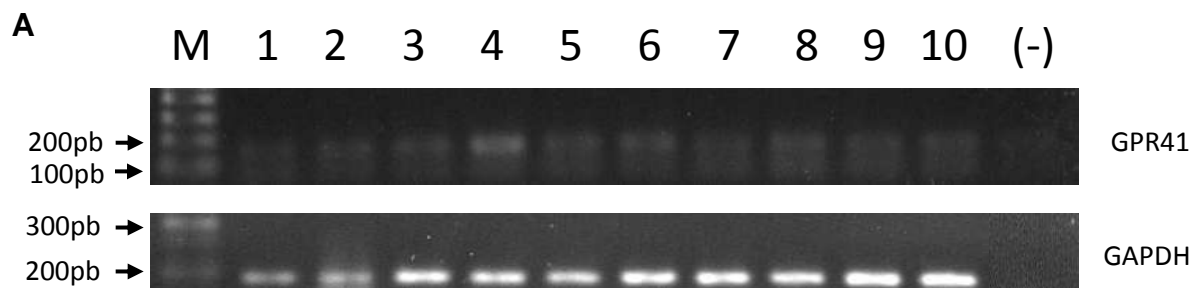


Figura 3. Expresión del gen del receptor GPR41 en las CEMB. (A) Se realizó PCR en punto final con las distintas condiciones establecidas y mediante electroforesis se observó el producto de amplificación. M: Marcador 1kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + *S. aureus*; 3 y 4: CEMB + PTX 100 ng/ml; 5 y 6: CEMB + PTX 200 ng/ml; 7 y 8: CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*; 9 y 10: CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*; (-): control negativo (agua). **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de GPR41 en relación a la expresión de GAPDH. Los resultados obtenidos corresponden al promedio del estudio por densitometría de tres mediciones de dos experimentos independientes. Los resultados son reportados con la media ± el error estándar. El símbolo “▲” indica cambio significativos ($P \leq 0.05$) en relación a la condición control (CEMB).

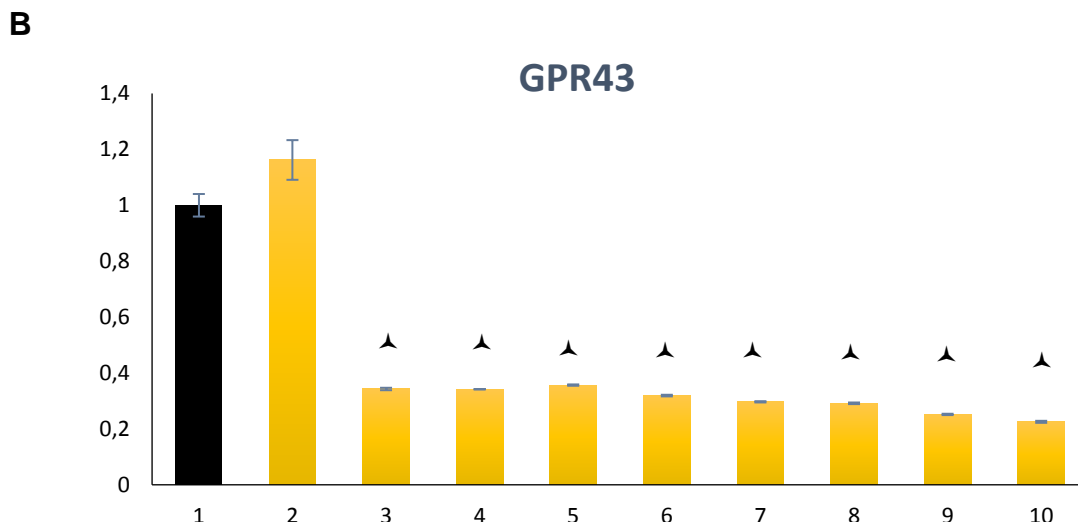
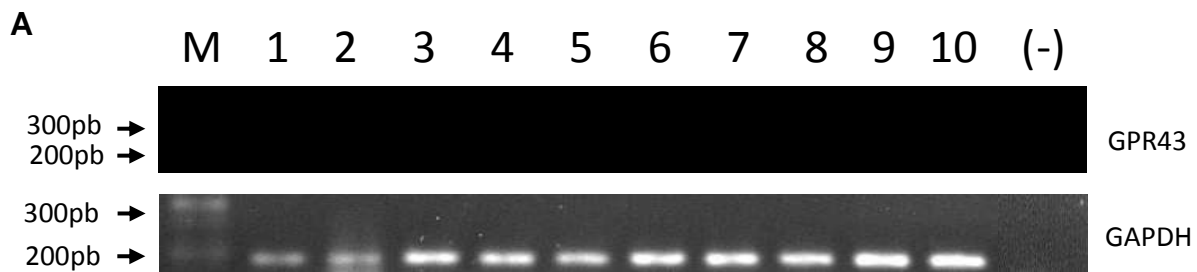


Figura 4. Expresión del gen del receptor GPR43 en las CEMB. (A) Se realizó PCR en punto final con las distintas condiciones establecidas y mediante electroforesis se observó el producto de amplificación. M: Marcador 1kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + *S. aureus*; 3 y 4: CEMB + PTX 100 ng/ml; 5 y 6: CEMB + PTX 200 ng/ml; 7 y 8: CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*; 9 y 10: CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*; (-): control negativo (agua). **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de GPR43 en relación a la expresión de GAPDH. Los resultados obtenidos corresponden al promedio del estudio por densitometría de tres mediciones de dos experimentos independientes. Los resultados son reportados con la media \pm el error estándar. El símbolo “▲” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) en relación a la condición control (CEMB).

Los resultados de la expresión del gen del péptido antimicrobiano TAP se muestra en la Figura 5. Las CEMB poseen una expresión basal de este PAM, la cual aumentó con la infección (~0.6 veces). Es importante destacar que estos niveles de expresión se mantuvieron en las CEMB previamente tratadas con la toxina PTX (~0.5 veces). En el resto de las condiciones se observó una disminución de la expresión de este péptido.

Por otro lado, la expresión del gen de LAP en las CEMB se vio significativamente aumentada (~0.7 veces) solamente en aquellas células infectadas con *S. aureus*, como puede observarse Figura 6. A diferencia de lo observado con TAP, el tratamiento previo con la toxina PTX inhibió el efecto estimulador de la bacteria.

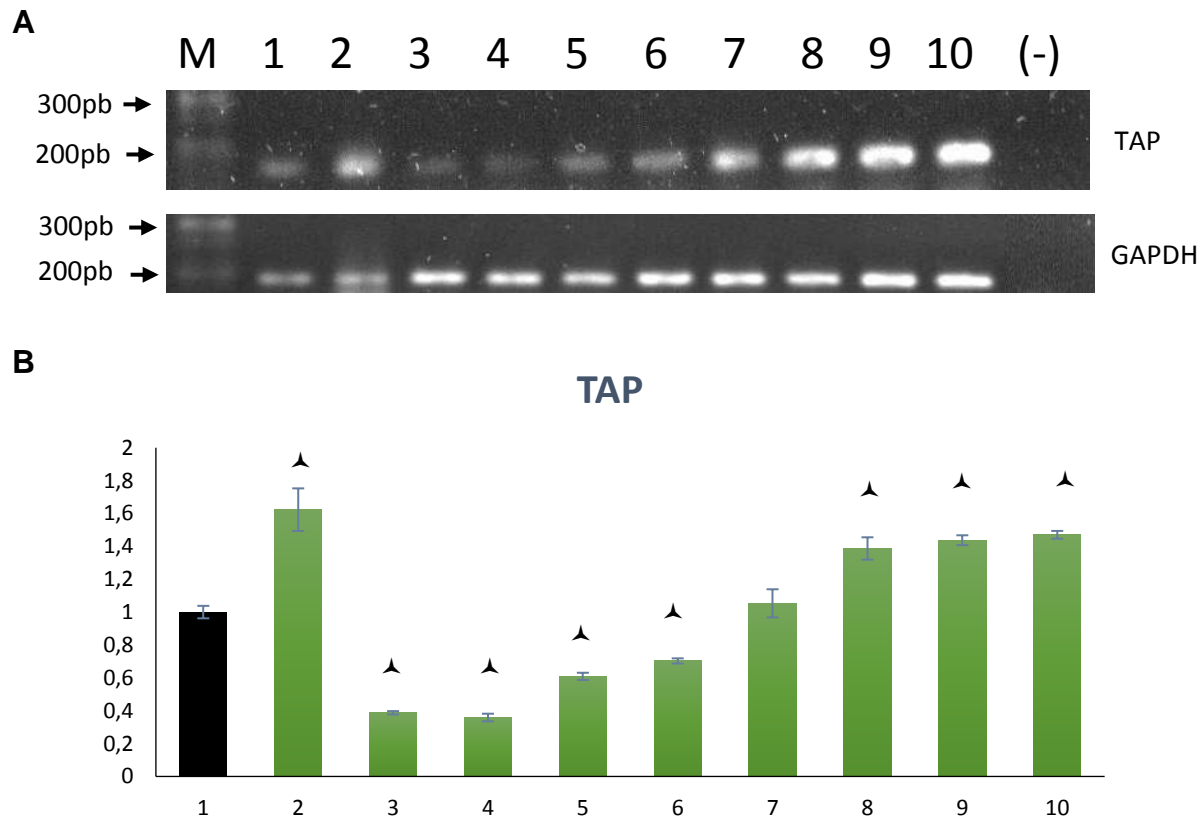


Figura 5. Expresión del gen del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB. (A) Se realizó PCR en punto final con las distintas condiciones establecidas y mediante electroforesis se observó el producto de amplificación. M: Marcador 1kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + *S. aureus*; 3 y 4: CEMB + PTX 100 ng/ml; 5 y 6: CEMB + PTX 200 ng/ml; 7 y 8: CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*; 9 y 10: CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*; (-): control negativo (agua). **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de GPR41 en relación a la expresión de GAPDH. Los resultados obtenidos corresponden al promedio del estudio por densitometría de tres mediciones de dos experimentos independientes. Los resultados son reportados con la media \pm el error estándar. El símbolo “▲” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) en relación a la condición control (CEMB).

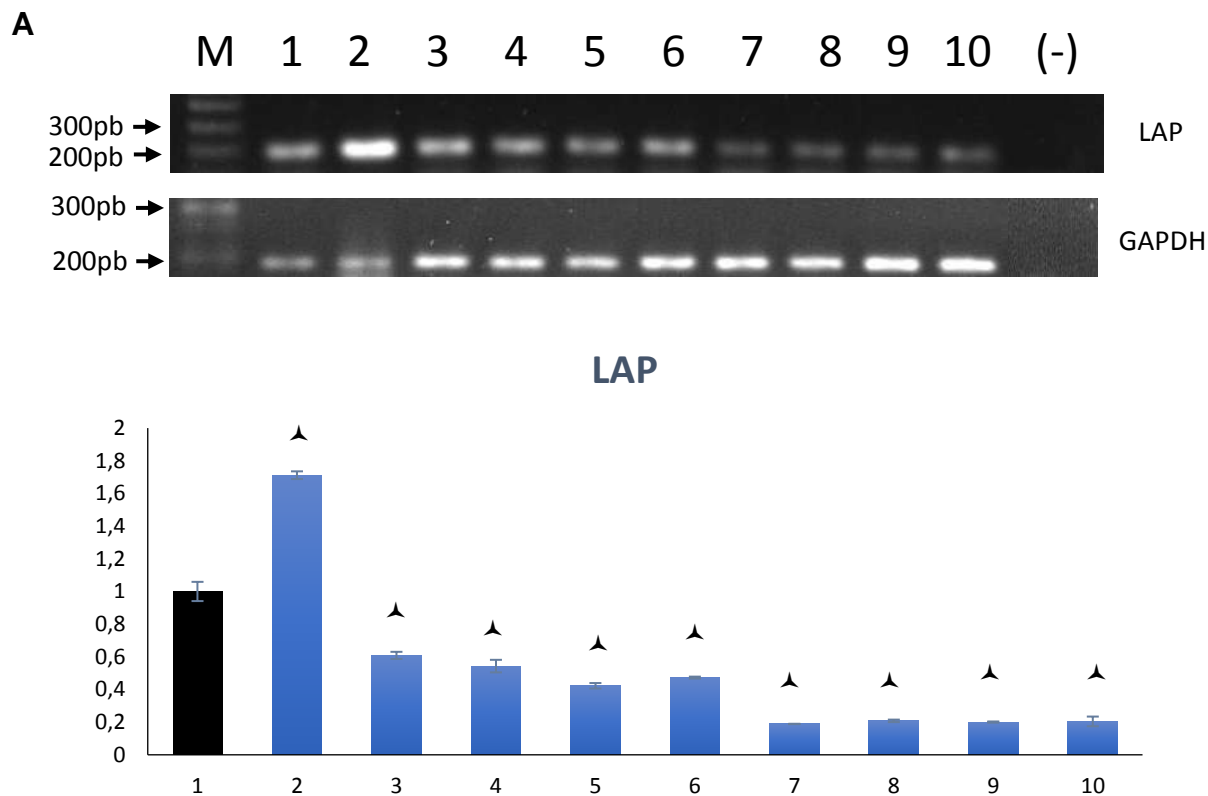


Figura 6. Expresión del gen del péptido antimicrobiano lingual (LAP) en las CEMB. (A) Se realizó PCR en punto final con las distintas condiciones establecidas y mediante electroforesis se observó el producto de amplificación. M: Marcador 1kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + *S. aureus*; 3 y 4: CEMB + PTX 100 ng/ml; 5 y 6: CEMB + PTX 200 ng/ml; 7 y 8: CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*; 9 y 10: CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*; (-): control negativo (agua). **(B)** Análisis densitométrico de la expresión de GPR41 en relación a la expresión de GAPDH. Los resultados obtenidos corresponden al promedio del estudio por densitometría de tres mediciones de dos experimentos independientes. Los resultados son reportados con la media ± el error estándar. El símbolo “▲” indica cambio significativos ($P \leq 0.05$) en relación a la condición control (CEMB).

Finalmente, respecto a la psoriasina S100A7, ésta no mostró una expresión basal en la CEMB. Sin embargo, la infección la indujo notablemente (~17 veces) (Fig. 7). En el resto de las condiciones no se observó expresión de este gen.

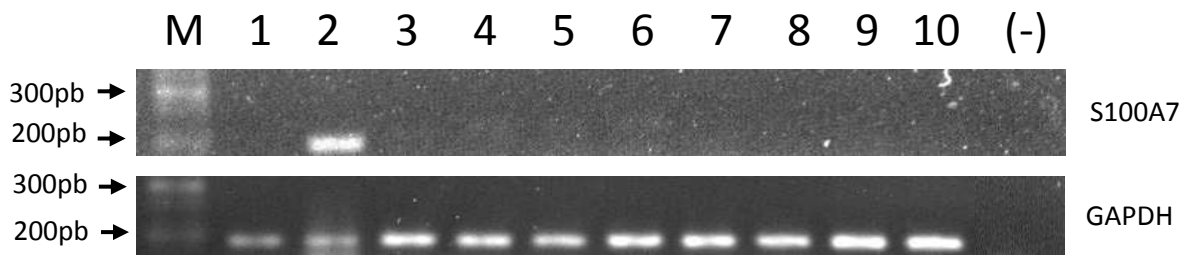


Figura 7. Expresión del gen de la psoriasina S100A7 en las CEMB. Se realizó PCR en punto final con las distintas condiciones establecidas y mediante electroforesis se observó el producto de amplificación. M: Marcador 1kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + *S. aureus*; 3 y 4: CEMB + PTX 100 ng/ml; 5 y 6: CEMB + PTX 200 ng/ml; 7 y 8: CEMB + PTX 100 ng/ml + *S. aureus*; 9 y 10: CEMB + PTX 200 ng/ml + *S. aureus*; (-): control negativo (agua).

10. DISCUSIÓN

La mastitis bovina es la patología más costosa y con mayor prevalencia que afecta al ganado lechero en todo el mundo. Esta se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria (Carrillo-Casas y Miranda-Morales, 2012). Las pérdidas económicas asociadas a mastitis se derivan principalmente de la disminución en la producción láctea y, en menor grado, al sacrificio de vacas con infecciones crónicas, costos de tratamientos veterinarios y penalizaciones en la calidad de la leche (Seegers *et al.*, 2003).

La mastitis es causada por un amplio número de agentes patógenos que penetran a través del canal del pezón y se multiplican en la cisterna de la ubre. Uno de los principales agentes patógenos aislados en casos de mastitis bovina es *Staphylococcus aureus* (Calvinho y Tirante, 2005), el cual es capaz de internalizarse y sobrevivir en una amplia variedad de células de mamíferos, entre ellas, las CEMB. Este mecanismo es empleado para replicarse dentro de la célula hospedera y evadir la respuesta inmune propia del organismo, además de la protección que le brinda contra la acción de los antibióticos (Bayles *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2001).

Las células reclutadas (sistema inmunitario) y las células residentes (CEMB), juntas, juegan un papel esencial en la defensa inmediata contra infecciones locales. El tejido de la glándula mamaria bovina se protege por medio de dos mecanismos de defensa: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Las CEMB participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria, produciendo mediadores pro- y anti-inflamatorios, entre otras moléculas de defensa, tales como los péptidos antimicrobianos (Rainard *et al.*, 2006; Schukken *et al.*, 2011).

En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que diversas concentraciones de AG (butirato, propionato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). En el caso del butirato y del hexanoato se ha logrado determinar las

rutas de comunicación celular involucradas en la regulación de la internalización de esta bacteria en las CEMB, siendo la ruta TLR2/p38 la descrita hasta el momento como relevante (Alva-Murillo *et al.*, 2015). No obstante, la posible participación de otras rutas no se ha evaluado, particularmente la de los GPR's. En este sentido, un estudio previo del grupo de trabajo demostró que los receptores GPR41 y GPR43 tienen una participación en la internalización de *S. aureus* en las CEMB, ya que al ser bloqueados con la toxina PTX de *B. pertussis*, la endocitosis de *S. aureus* disminuyó (Tena-Hernández, 2012). Es por ello, que en el presente trabajo se utilizó la toxina PTX para bloquear a los GPR's. El bloqueo reside en la subunidad α , manteniendo su estado inactivo (forma de unión a GDP) por lo que es incapaz de inhibir la adenilato ciclasa (AC). Esta modificación de las proteínas Gai resulta en una mayor acumulación de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (Magmool y Kurose, 2011). Adicionalmente, recientemente se reportó el sinergismo que tiene el AMPc con el AGCC butirato. Su acción sinérgica se relacionó con su capacidad para inducir la expresión de PAM's en humanos (Sunkara *et al.*, 2014). Por lo anterior, en este trabajo se evaluó si el bloqueo de los receptores de AGCC, GPR41 y GPR43 con la toxina PTX favorece la expresión de PAM's en las CEMB.

Respecto a la expresión de los receptores GPR41 y GPR43, ambos mostraron una expresión basal en la CEMB, lo cual coincide con lo reportado por Yonezawa y col. (2009). Al ser infectadas las CEMB se indujo la expresión de ambos receptores, efecto que fue inhibido por el tratamiento previo con la toxina PTX. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Tena-Hernández (2012), en el que señala que el tratamiento con la toxina PTX presenta un efecto inhibitorio en la internalización de *S. aureus*, y que en conjunto con la infección no se induce la expresión del receptor GRP43. En el trabajo realizado por Tena-Hernández (2012) no se detectó la expresión del ARNm del receptor GPR41 en las CEMB; sin embargo en éste trabajo si se detectó la expresión de este receptor en las CEMB en cada una de las condiciones con las que se trabajó, utilizando el mismo juego de oligonucleótidos. Esta discrepancia podría deberse a que las células utilizadas no provienen de los mismos lotes y que además los pasajes utilizados variaron.

Existen diversos trabajos en los que se identifica la expresión de PAM's, tales como LAP y TAP en el tejido de la glándula mamaria bovina o en CEMB infectadas o no, reconociendo su actividad antimicrobiana y papel fundamental en la defensa del hospedero durante infecciones, como es el caso de la mastitis (Roosen *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004; López-Meza *et al.* 2009; Ochoa-Zarzosa *et al.* 2009). En el presente trabajo, la expresión de LAP mostró una expresión basal en las CEMB y se vio significativamente incrementada en aquellas CEMB infectadas con *S. aureus*. Esto coincide con lo descrito por Swanson y col. (2004) y Kawai y col. (2013), en el que se demuestra la expresión inducible de LAP en las CEMB en respuesta a una infección, lo cual indica un posible rol de LAP en la respuesta inmune contra la mastitis bovina. Las CEMB tratadas con PTX con y sin infección disminuyeron la expresión de este PAM, lo cual sugiere que su expresión no está relacionada con el la actividad de los GPR's.

En el caso del gen de TAP, este tuvo una expresión basal en la CEMB, la cual se incrementó de manera significativa en aquellas CEMB infectadas con *S. aureus*. Estos datos coinciden con los reportados por Alva-Murillo y col. (2012) y Téllez-Pérez y col. (2012), que hacen mención de la expresión basal de este PAM y del incremento de su expresión en CEMB infectadas con el mismo patógeno del que se hizo uso en éste estudio. En contraste con ello, López-Meza *et al.* (2009) reportan que al infectar las CEMB con *S. aureus* existe una reducción en la expresión de TAP. No existe una respuesta clara para esta aparente discrepancia, pero el uso de vehículos distintos en la preparación de las soluciones podría explicarlo.

Un dato relevante es que la expresión de TAP se vio incrementada en aquellas CEMB tratadas con la toxina PTX con y sin infección. Estos resultados sugieren que la actividad de los receptores GPR's está relacionada con la regulación de la expresión de TAP. Esto debido a lo que se ha reportado con anterioridad, donde el bloqueo de los receptores GPR's produce un incremento en las concentraciones intracelulares de AMPc, y como consecuencia de ello un

incremento en la expresión de PAM's. Sin embargo, se requieren medir las concentraciones intracelulares de AMPc para corroborarlo.

Finalmente, lo que concierne a la psoriasina bovina S100A7, una proteína de unión a calcio con actividad antibacteriana; ésta no mostró una expresión basal, en contraste con el estudio realizado por Téllez-Pérez y col. (2012), quien reporta una expresión basal de este gen en las CEMB. Cabe señalar que en el trabajo referido el vehículo que se utilizó fue etanol, el cual puede afectar la expresión de los genes. En el presente trabajo, la psoriasina S100A7 solamente se expresó en aquellas CEMB que fueron infectadas con *S. aureus*, esto está de acuerdo con otros trabajos donde se reporta la expresión de S100A7 en presencia de esta bacteria (Alva-Murillo *et al.*, 2013; Medina-Estrada *et al.* 2016).

11. CONCLUSIÓN

El bloqueo de la actividad de los receptores GPR's favoreció la expresión del péptido antimicrobiano TAP, lo cual puede estar relacionado con la disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, R.A., Luther, D.A. and Oliver, S.P. 1999. Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*. 178:81-5.
- Alva-Murillo, N., López-Meza, J.E., and Ochoa-Zarzosa, A. 2014. Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed Research International*. Vol. 2014, article 538546, 9 pages
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Baez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol Immunol*. 68:445-455
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. 2013. Effects of Sodium Octanoate on Innate Immune Response of Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. *BioMed Research International*. 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/927643>
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J.E. 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet Microbiol*.155:324-31.
- Álvarez, L.P. 2010. Efecto del ácido salicílico sobre la virulencia de *Staphylococcus aureus* y su interacción con el huésped. Tesis doctoral. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Antoine, R., Raze, D. and Loch, C. 2000. Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int. J. Med Microbiol*. 290:301-305.
- Barkema, H.W., Green, M.J., Bradley, A.J. and Zadoks, R.N. 2009: Invited review: the role of contagious disease in udder health. *Int J. Dairy Sci*. 92:4717–4729.

- Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A. and Trumble, W.R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infection and Immunity*. 66(1):336-342.
- Bergman, E.N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*. 70:567-590.
- Bergonier, D., Sobral, D., Febler, A.T., Jaquet, E., Gilbert, F.B., Schwarz, S., Treilles, M., Bouloc, P., Pourcel, C. and Vergnaud, G. 2014. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Vet Res*. 45:97
- Boonyayatra, S., Rin-ut, S. and Punyapornwithaya, V. 2014. Association of intramammary infection caused by biofilm-producing pathogens with chronic mastitis in dairy cows. *Int J. Dairy Sci*. 9(3):89-95
- Borm, A.A., Fox, L.K., Leslie, K.E., Hogan, J.S., Andrews, S.M., Moyes, K.M., Oliver, S.P., Schukken, Y.H., Hancock, D.D., Gaskins, C.T., Owens, W.E. and Norman, C. 2006. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *Int J. Dairy Sci*.89:2090–2098.
- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y. and Even, S. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into Bovine Mammary Epithelial Cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(3):877-885.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal*. 164:116-128
- Brown, A., Goldsworthy, S.M., Barnes, A., Tchean, L., Daniels, D., Muir, A., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, L., Fraser, N.J., Pike, N.B., Strum, J.C., Steplewski, K.M., Murdock, P.R., Holder, J.C., Marshall F.H., Szekeres, P.G., Wilson, S., Ignar, D.M., Foord, M.S., Wise, A., and Dowell, S.J.. 2003. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 278:11312-11319.

- Burton, J.L. and Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19:1-45.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A. and Duchateau, L. 2003. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res.* 34(5)21-64.
- Calvino, L.F. and Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE-Ciencias Veterinarias* 4(1-2). Capítulo 17.
- Carbonetti, N.H. 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 5:455-469
- Carrillo-Casas, E.M. and Miranda-Morales, R.E. 2012. Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count, Milk Production. *Overview of Animal Nutrition, Management and Health*
- Cenvinkova, D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, A., Vrtkova, I., Marosevic, D. and Jaglic, Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows *Veterinarni Medicina.* 58(11): 567–575
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M. and Malgelsdorf, D.J. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology. *Science.* 294(5548):1866-1870
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W.L. and Bevins, C.L. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3952–3956.
- Eglén, R. M., Bosse, R. and Reisine, T. 2007. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol.* 3:425-441.

- Erwin, E.S., Marco, G.J. and Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Int J. Dairy Sci.* 44:9. 1768-1771.
- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21:90-113.
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X. and Kaltsatos, V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 50:245–259
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-Lopez, J.L., Lara-Zárate, 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 inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 121:113- 122.
- Hensen, S.M., Pavicic, M.J.A.M.P., Lohuis, J.A.C.M. and Poutrel, B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* Strains. *Int J. Dairy Sci.* 83:418-429
- Heringstad, B., Klemetsdal, G. and Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci.* 64:95-106.
- Herroeder, S., Reichardt, P., Sassmann, A., Zimmermann, B., Jaeneke, D., Hoeckner, J., Hollmann, M. W., Fischer, K. D., Vogt, S., Grosse, R., Hogg, N., Gunzer, M., Offermanns, S. and Wettschureck, N. 2009. Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. *Immunity.* 30:708-20.
- Huang, J., Lou, G., Zhang, Z., Wang, X., Ju, Z., Qi, C., Zhang, Y., Wang, C., Li, R., Li, J., Yin, W., Xu, W., Moisés, S.J., Lóor, J.J. and Zhong, J., 2014. iTRAQ-proteomics and bioinformatics analyses of mammary tissue from cows with clinical mastitis due to natural infection with *Staphylococci aureus*. *Genomics.* 15:839

- Ichimura, A., Hirasawa, A., Hara, T. and Tsujimoto, G. 2009. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 89:82-88
- Janeway Jr, C.A. and Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 20:197-216
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids. *Int J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Katada, T., Tamura, M. and Ui, M. 1983. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys*. 224:290–298.
- Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y. and Isobe, N. 2013. Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*. 153(3-4):298-301.
- Kebede, M.A., Alquier, T., Latour, M.G., and Poitout, V. 2009. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications?. *Diabetes Obes Metab*. 11:10-20.
- Kerr, D. E., Plaut, K., Bramley, A. J., Williamson, C. M., Lax, A. J. and Moore, K. 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nature Biotechnology*. 19:66-70.
- 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. *Veterinary Quarterly*. 24(4):181-198.
- Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L. and Bagnicka, E. 2014. Expression patterns of β -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative Staphylococci. *Vet Res*. 10:246
- Lammers, A., Van Vorstenbosch, C.J., Erkens, J.H.F. and Smith, H.E. 2001. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Vet Microbiol*. 80:255-65.

- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., Lannoy, V., Decobecq, M.E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., and Detheux, M. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 278:25481-25489.
- Leigh, J.A. 1999. Streptococcus uberis: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?. *Veterinary Journal.* 157:225-38.
- López-Meza, J.E, Ochoa Zarzosa, A., Barboza-Corona, J.E. and Bideshi, D.K. 2015. Antimicrobial Peptides: Current and Potential Applications in Biomedical Therapies. *BioMed Research Intenational.* 2015. Article ID 367243, 2 pages, 2015. doi:10.1155/2015/367243
- López-Meza, J.E., Gutiérrez-Barroso, A. and Ochoa-Zarzosa, A. 2009. Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells. *Research in Veterinary Science.* 87:59–63.
- López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J.A. and Loeza-Lara, P.D. 2011. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application, *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, Dr. Sylwia Olsztyńska (Ed.), ISBN: 978-953-307-514-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-trends-research-and-technologies/antimicrobialpeptides-diversity-and-perspectives-for-their-biomedical-application>
- Magmool, S. and Kurose, H. 2011. Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins.* 3:884-899.
- Mansoon-Lindmark, H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research.* 52
- Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-376.
- Matthews, K.R., Almeida, R.A. and Oliver S.P. 1994. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. *Infection and immunity.* 5641-5646pp.

- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. (2015). Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathog.* 89:43-53
- Medina-Estrada, I., López-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2016. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of Estradiol in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Mediators of Inflammation*. Volume 2016. ID 6120509, 16 pages.
- Melchior, M.B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J. 2006. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections. *Veterinary Journal.* 171(3):398-407.
- Miller, S. J., Zaloga, G. P., Hoggatt, A. M., Labarrere, C. and Faulk, W. P. 2005. Short-chain fatty acids modulate gene expression for vascular endothelial cell adhesion molecules. *Nutrition.* 21:740-748.
- Milligan, G. 1998. Techniques used in the identification and analysis of function of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins. *Biochem J.* 255:1-13
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2005. Lehninger Principles of Biochemistry. Ed. Freeman and Company. pp. 648-649.
- Nilsson, N.E., Kotarsky, K., Owman, C. and Olde, B. 2003. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:1047–52.
- 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.* 47:1-7.
- Ohira, H., Fujioka, Y., Katagiri, C., Mamoto, R., Aoyama-Ishikawa, M., Amako, K., Izumi, Y., Nishiumi, S., Yoshida, M., Usami, M. and Ikeda, M. 2013. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J Atheroscler and Thromb.* 20(5).425-442

- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F. and Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118:133-140.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. and Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54:399-409.
- Parodi, P. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr.* 127:1055-1060.
- Pinheiro da Silva, F. and César-Machado, M.C. 2012. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 36:308-314
- Pluznick, J.L. 2014. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut microbes.* 5(2):202-207
- Qazi, S.N.A., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E.D., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P. and Hill, P.J. 2001. *agr* Expression Precedes Escape of Internalized *Staphylococcus aureus* from the Host Endosome. *Infect. Immun.* 69(11):7074-7082
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., and Hinchcliff, K.W. 2002. *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina.* Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.
- Rainard, P. and Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37:369-400
- Regenhard, P., Petzl, W., Zerbe, H. and Sauerwein, H. 2010. The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Vet Microbiol.* 143(2-4):293-298.
- Reimann, F. and Gribble, F.M. 2013. A Tag to Track Short Chain Fatty Acid Sensors. *Endocrinology.* 154(10):3492-3494
- Rivas, A.L., Tadevosyan, R., Quimby, F.W., Coksaygan, T. and Lein, D.H. 2002. Identification of subpopulation of bovine mammary-gland phagocytes

and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. *Can J Vet Res.* 66(1):65-72

- Rodríguez-C, J.F. 2002. Revisión sobre mastitis en ganado bovino, causa y efectos en la salud animal y pública. Servicio profesional de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México pp. 7-26
- Rombeau, J.L., Kripke, S.A. and Settle R.G. 1990. Dietary Fiber. Short-chain fatty acids. Production, absorption, metabolism and intestinal effects. Editorial Springer-Verlag US. 317-337pp.
- Roosen, S., Exner, K., Paul, S., Schroder, J.M., Kalm, E. and Looft, C. 2004. Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm.Genome.* 15:834–842.
- Rustan, A.C. and Devron, C.A. 2005. Fatty acids: Structures and properties. Encyclopedia of life sciences.
- Saran, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. pp 11-16
- Saukkonen., K., Burnette, W.N., Mar, V.L., Masure, H.R. and Tuomanen, E.I. 1992. Pertussis toxin has eukaryotic-like carbohydrate recognition domains. *Proc Natl Acad Sci.* 1992(89):118–122.
- Scarselli, M., Armogida, M., Chiacchio, S., DeMontis, M. G., Colzi, A. and Corsini, Maggio, G. 2000. Reconstitution of functional dopamine D (2s) receptor by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *Eur J Pharmacol.* 397:291-296.
- Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. and Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Int J. Dairy Sci.* 84: 1407-12.)
- Schukken, Y.H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N. and Seyfert, H.M.

2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:270-289

- Seegers, H., Fourichon, C. and Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 34(5):475-491.
- Shuster, D.E., Lee, E.K. and Kehrli, M.E. 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *American Vet Res.* 57:1569-75.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K. and DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Int J. Dairy Sci.* 80(18):51-65.
- Stoddart, L., Smith, N., Jenkins, L., Brown, A. and Milligan, G. 2008. Conserved polar residues in transmembrane domains V, VI, and VII of free fatty acid receptor 2 and free fatty acid receptor 3 are required for the binding and function of short chain fatty acids. *J Biol Chem.* 47:32913-32924.
- Sunkara, L.T., Zeng, X., Curtis, A.R. and Zhang, G. (2014). Cyclic AMP synergizes with butyrate in promoting α -defensin 9 expression in chickens. *Molecular Immunology.* 57:171-18.
- Swanson, K., Gorodetsky, S., Good, L., Davis, S., Musgrave, D., Stelwagen, K., Farr, V. and Molenaar, A. 2004. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect. Immun.* 72:7311–7314.
- Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.I. and Kuwahara A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic function. *J. Physiol Pharmac.* 59: 251-262.
- Téllez-Pérez, A.D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. 2012. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Vet Microbiol.* 160:91-98
- Tena-Hernández, S. 2012. Participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la internalización de *Staphylococcus aureus* en células de epitelio

mamario bovino tratadas con ácidos grasos de cadena corta. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.

- Verma, A. and Burns, D.L. 2007. Requirements for assembly of PtlH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 75:2297–2306
- Wang, A., Gu, Z., Heid, B., Akers, R.M., and Jiang, H. 2009. Identification and characterization of the bovine G protein-coupled receptor GPR41 and GPR43 genes. *Int J. Dairy Sci.* 92:2696-2705.
- Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol.* 88:27-45.
- White, D.G. and McDermott, P.F. 2001. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *Int J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E151-E155
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. y Zschock, M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.
- Yang, J., Sang, Y., Meade, K. and Ross, C. 2001. The role of oct-1 in the regulation of tracheal antimicrobial peptide (TAP) and lingual antimicrobial peptide (LAP) expression in bovine mammary epithelial cells. *Immunogenetics.* 63(11):715-725
- Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K., and Obara, Y. 2009. Short-chain fatty acid signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Regul Peptides.*153:30-36.
- Zavaleta, E. 2003. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Ciencia veterinaria.* 1:223-236.
- Zhao, X., and Lacasse, P. 2007. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Int J. Dairy Sci.* 86:57-65.