



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

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

TESIS QUE PRESENTA

EDITH VILLARREAL FERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el título de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN

SEPTIEMBRE 2009

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.1,14.5) y CONACyT (90110).

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIACIONES	ii
I. RESUMEN	1
I. MARCO TEÓRICO	2
2.1 MASTITIS BOVINA	2
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.3 LA INFLAMACIÓN	6
2.4 INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA	7
2.4.1 Factores anatómicos	7
2.4.2 Inmunidad innata de la glándula mamaria ...	8
2.5 LA LECHE BOVINA	10
2.6 ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA	12
2.6.1 Butirato	14
3 JUSTIFICACIÓN	17
4 HIPÓTESIS	18
5 OBJETIVO GENERAL	18
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	18
6 MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
7 RESULTADOS	25
8 DISCUSIÓN	35
9 CONCLUSIÓN	40
10 BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Esquema de la glándula mamaria	6
FIGURA 2. Efectos del butirato de sodio en humanos y animales	13
FIGURA 3. Efecto del butirato de sodio sobre la viabilidad de la CEMB	24
FIGURA 4. Efecto del butirato de sodio sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> .	25
FIGURA 5. Evaluación de la invasión de <i>s. aureus</i> en las CEMB en presencia de butirato de sodio	26
FIGURA 6. Cuantificación de la producción de óxido nítrico en las CEMB en presencia de butirato de sodio	27
FIGURA 7. Expresión del ARNm de TNF- α en las CEMB tratadas con butirato de sodio	28
FIGURA 8. Expresión del ARNm de iNOS en las CEMB tratadas con butirato de sodio	29
FIGURA 9. Expresión del ARNm de TAP en las CEMB tratadas con butirato de sodio	30
FIGURA 10. Expresión del ARNm de β -defensina en las CEMB tratadas con butirato de sodio	31
FIGURA 11. Acetilación de histonas en las inducida por butirato de sodio	33

LISTA DE ABREVIACIONES

Abreviación	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
β-defensina	Beta defensina
CEMB	Células de epitelio mamario bovino
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
LB	Luria Bertani
MDI	Multiplicidad de infección
MTT	Sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetil-2, tiasolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro
NO	Óxido nítrico
PA	Péptidos antimicrobianos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TAP	Péptido antimicrobiano traqueal
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UFC	Unidades formadoras de colonias

I. RESUMEN

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria que puede ser causada por diversos cambios metabólicos o por la infección por bacterias patógenas. La mastitis bovina genera una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial, en especial en las regiones con una producción lechera intensiva (Schlenstedt *et al*, 1997). Existen diversos agentes patógenos que causan mastitis bovina, sin embargo se sabe que el agente causal más importante es *S. aureus* puesto que tiene la capacidad de invadir y sobrevivir dentro de las células del epitelio mamario bovino. El tejido de la glándula mamaria está protegido por la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Ambas interactúan en conjunto para proveer protección contra los microorganismos causantes de la mastitis (Sordillo and Streicher, 2002). En éste padecimiento, los factores anatómicos y la respuesta inmune innata de la glándula mamaria actúan coordinadamente para eliminar el patógeno (Oviedo-Boyso *et al*, 2007). Por otro lado, los AGCC son componentes de la grasa de la leche de los bovinos, y son también conocidos por tener varios efectos fisiológicos y fisiopatológicos (Li and Li, 2006). El butirato está presente únicamente en la leche de bovinos, y además de tener propiedades nutrimentales, también se le ha asociado con funciones celulares como es la modulación de la respuesta inmune (Hague *et al*, 1995; Luhrs *et al*, 2002). Teniendo como base lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del butirato de sodio durante la invasión de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas y se analizó la expresión de genes de la respuesta inmune innata. Los resultados obtenidos demostraron que el butirato de sodio disminuye la invasión de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas y regula positivamente la expresión de genes de la respuesta inmune.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial caracterizada por la inflamación de la glándula mamaria con daños localizados o generalizados, puede tener manifestaciones clínicas y subclínicas dependiendo de la magnitud de los daños (Kerro *et al*, 2002). La mastitis clínica se caracteriza por la inflamación de uno o varios de los cuartos mamarios, el animal presenta dolor al tacto y en la leche se observan coágulos, descamaciones y en ocasiones sangre, no así la mastitis subclínica, donde la vaca se muestra saludable ya que la ubre no muestra signos de inflamación, no obstante, la infección puede ser detectada por un aumento en el conteo de células somáticas (Oviedo-Boyso *et al*, 2007).

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades más importantes del ganado lechero puesto que genera una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial, en especial en las regiones con una producción lechera intensiva (Schlenstedt *et al*, 1997). Las pérdidas económicas que ocasiona comprenden la disminución de la calidad y la cantidad de leche producida, un incremento en el costo de tratamientos médicos, servicios veterinarios y pérdida de animales (Halasa *et al*, 2007). Además de los altos costos financieros para el ganadero, la mastitis tiene una gran importancia en el valor higiénico de la leche y de sus subproductos, debido a que algunos agentes causales de la mastitis son patógenos potenciales en humanos y puede haber residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre. Para la industria de productos lácteos son muy significativas las transformaciones causadas a la leche por la mastitis, principalmente debido a una pérdida de sus características organolépticas (Schlenstedt *et al*, 1997).

La inflamación de la glándula mamaria es una respuesta que puede ser causada por cambios metabólicos, fisiológicos y más frecuentemente por microorganismos patógenos contagiosos o ambientales. Los patógenos contagiosos viven y se multiplican alrededor y dentro de la glándula mamaria de la

vaca y se diseminan de animal a animal y de cuarto a cuarto, debido a procedimientos poco higiénicos de ordeña (Kerro *et al*, 2002). Los patógenos contagiosos más importantes causales de la mastitis son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp* (Riffon *et al*, 2001; Kerro *et al*, 2002; Rossitto *et al*, 2002; Sears y McCarthy, 2003). Dentro de los principales patógenos ambientales encontramos *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y otros bacilos entéricos (Almeida *et al*, 1996; Kerro *et al*, 2002). Sin embargo, se sabe que *S. aureus* es a nivel mundial el agente patógeno contagioso más importante asociado con la glándula mamaria, que causa la mastitis clínica y subclínica (Kerro *et al*, 2002). Algunas bacterias responsables de la mastitis tienen la habilidad de invadir el epitelio mamario bovino, como es el caso de *S. aureus* que invade y sobrevive dentro de la célula (Buzzola *et al*, 2007). Una vez que el patógeno ha causado un daño considerable al epitelio mamario, la patología suele complicarse por infecciones con microorganismos oportunistas (Sears y McCarthy, 2003).

2.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno contagioso que puede causar infecciones tanto en humanos como en animales (Brouillette *et al*, 2004). Pertenece a la familia Micrococcaceae, microscópicamente es un coco Gram positivo de aproximadamente 0.8 micrómetros, agrupados en racimos. En las placas de agar las colonias son lisas, opacas, redondas, convexas-bajas y de 1-4 mm de diámetro. Se diferencia del resto de las especies de *Staphylococcus* porque da un resultado positivo a la prueba de coagulasa, fermenta el manitol, además presenta un pigmento amarillo-dorado en las colonias (Lowy, 1998).

Actualmente la identificación de esta bacteria se complementa con el análisis molecular del ADN mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); para ello se utiliza frecuentemente la amplificación del gen *nuc* que codifica la termonucleasa producida por *S. aureus* (Depardieu *et al*, 2004).

S. aureus es uno de los agentes etiológicos frecuentemente aislados de mastitis bovina (Jasper, 1982). Puede ser transmitido, principalmente por la mano del ordeñador durante el ordeño, por la toalla de aseo de la ubre y por la máquina de ordeño durante su funcionamiento. La transmisión puede facilitarse mediante un ordeño defectuoso (fallas en la compresión de la ordeñadora, interrupción de la succión al momento de colocar las pezoneras, ordeño ciego).

Para el establecimiento de la infección en la glándula mamaria, *S. aureus* debe entrar por el pezón, posteriormente la bacteria penetra por el canal lácteo al tejido glandular muy profundamente y es común que se encapsule para formar nódulos en la ubre los cuales se pueden palpar. Las infecciones causadas por *S. aureus* pueden volverse crónicas debido a la localización intracelular de la bacteria, que hace difícil que el sistema inmune la reconozca y la elimine, o bien, eliminarla mediante una terapia antimicrobiana convencional (Sears y McCarthy, 2003). La colonización de la glándula mamaria puede ser activada por la adhesión a proteínas de superficie de las células epiteliales (ej. Proteína A) (Ziebuhr, 2001; Kerro *et al*, 2002).

Durante la mastitis el principal mecanismo de defensa es la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares, a través de oxidación o por mecanismos independientes de oxígeno, después de la opsonización por anticuerpos, con o sin complemento. Sin embargo, los mecanismos de defensa del hospedero no pueden prevenir por completo una infección intramamaria, posiblemente debido a dos factores:

- 1.-Factores de virulencia y mecanismos de *S. aureus*, tales como la producción de factores antifagocíticos (proteína A y encapsulamiento), la adhesión a las células del epitelio mamario, la supervivencia intracelular en el epitelio y macrófagos, la producción de exotoxinas y proteasas.

- 2.-Defectos de protección de la célula hospedera como la reducción en la eficacia de los fagocitos debido a la fagocitosis de componentes de la leche, lo cual provoca una disminución de enzimas hidrolíticas en estas células.

Los factores de virulencia de *S. aureus* implican productos de secreción, componentes estructurales y mecanismos que contribuyen a la habilidad de la bacteria para sobrevivir en el hospedero y causar la mastitis (Kerro *et al*, 2002). Basándose en la actividad biológica, los factores de virulencia pueden ser clasificados en tres categorías: 1) los que modulan la adhesión de la bacteria a la célula o tejido, 2) los que promueven el daño tisular y la diseminación, y 3) los que protegen a la bacteria del sistema inmune. La adhesión de la bacteria al hospedero y al tejido, es el evento inicial de la mayoría de los procesos infecciosos y es considerado un factor importante de patogenicidad y virulencia. *S. aureus* es uno de los agentes causantes de mastitis más importantes que presenta adherencia a las células de la glándula mamaria tanto *in vivo* como *in vitro* (Kerro *et al*, 2002).

S. aureus produce una gran variedad de proteínas de superficie que promueven la adherencia al tejido dañado y mantienen la infección, como son: proteína A, proteína de unión a fibrinógeno, proteína de unión a fibronectina, etc., proteínas que ayudan a evitar la respuesta inmune y enzimas como coagulasa, colagenasa, fosfatasa ácida y alcalina, catalasa, proteasas, nucleasas, lipasas, hialuronidasa y hemolisinas (Ziebuhr, 2001; Kerro *et al.*, 2002). La síntesis de éstas proteínas depende de la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria (Lowy, 1998). Las hemolisinas producidas dañan el tejido y permiten su colonización intracelular lo que hace más complicado la eliminación de las bacterias, por lo que la infección se puede convertir en crónica. Al mismo tiempo, produce numerosas toxinas que se reconocen como superantígenos, que dañan el tejido y protegen a la bacteria de la respuesta inmune del hospedero liberando mediadores de la inflamación (Kerro *et al*, 2002; Zecconi *et al*, 2005). Las proteínas de superficie mejor caracterizadas son la proteína A, proteína de unión a fibrinógeno, proteína de unión a fibronectina y proteína de unión a colágena (Ziebuhr, 2001).

La invasión de *S. aureus* a la glándula mamaria puede ser activada por un proceso endocítico que incluye la participación de elementos del citoesqueleto de

la célula epitelial y/o receptores específicos y los ligandos correspondientes que requieren la síntesis de *novo* de proteínas de las células eucariota y procariota (Kerro *et al*, 2002).

2.3 LA INFLAMACIÓN

La inflamación es un mecanismo de protección que presenta el sistema inmune de los animales contra infecciones o lesiones. Es un proceso complejo en el que intervienen diversos elementos, como son los leucocitos, sustancias vasoactivas, citocinas y productos de la cascada del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina. Cuando hay una lesión lo primero que ocurre es una vasoconstricción transitoria de las arteriolas y una vasodilatación de los capilares con lo que se provoca que el flujo sanguíneo aumente. Cuando se dilatan los vasos aumenta su permeabilidad facilitando así que las células inflamatorias lleguen al sitio dañado (Coussens and Werb, 2002).

Los macrófagos, que son células inflamatorias, se originan en la médula y se liberan en la sangre como monocitos, circulan hasta entrar al tejido y diferenciarse en macrófagos. Dentro de sus principales funciones está la de fagocitar y presentar antígenos a otras células del sistema inmune como los linfocitos T y producir citocinas. Las citocinas son pequeñas proteínas que actúan como mensajeros intercelulares, estimulando o inhibiendo la diferenciación, proliferación o función de las células del sistema inmune. Comprenden a las linfoquinas, monocinas, interleucinas [desde la interleucina 1(IL-1) α y β , hasta la 16], factores de necrosis tumoral (TNF- α y β) e interferones.

Las citocinas actúan en varios tipos celulares utilizando mecanismos autócrinos, parácrinos, endócrinos y yuxtácrinos. Efectúan múltiples funciones fisiológicas y fisiopatológicas:

1. Las citocinas inflamatorias se producen en respuesta a infecciones y estimulaciones inmunológicas como inmunizaciones.

2. Algunas citocinas actúan como factores de crecimiento y reguladores normales.
3. Algunas actúan para facilitar el mantenimiento de la función inmune.

La reacción inflamatoria se inicia por la producción y liberación de TNF- α , interferones e interleucinas (Casey, 2000).

2.4 INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

El sistema inmune se caracteriza por la capacidad de reconocer y distinguir entre agentes externos y moléculas producidas por el organismo (Janeway y Medzhitov, 2002). El tejido de la glándula mamaria está protegido por la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Ambas interactúan en conjunto para proveer protección contra los microorganismos causantes de la mastitis (Sordillo and Streicher, 2002). La efectividad de éstas está determinada por la susceptibilidad o la resistencia a la infección de la glándula mamaria. En éste padecimiento, los factores anatómicos y la respuesta inmune innata de la glándula mamaria actúan coordinadamente para eliminar el patógeno (Oviedo-Boyso *et al*, 2007).

2.4.1 Factores anatómicos

El canal de la ubre es la primera línea de defensa, porque las bacterias deben penetrar a través de él para así causar una infección intramamaria. La función del esfínter del pezón es mantener el orificio cerrado y así aislar el interior de la glándula mamaria (Fig. 1). Esto significa, que cualquier daño a ésta estructura referirá un incremento de la incidencia de mastitis. El canal del pezón está provisto de queratina, la cual es una barrea física adicional, que previene la migración de bacterias a la cisterna de la glándula mamaria (Oviedo-Boyso *et al*, 2007). Por estas razones, el canal del pezón es considerado como una barrera importante contra la infección intramamaria.

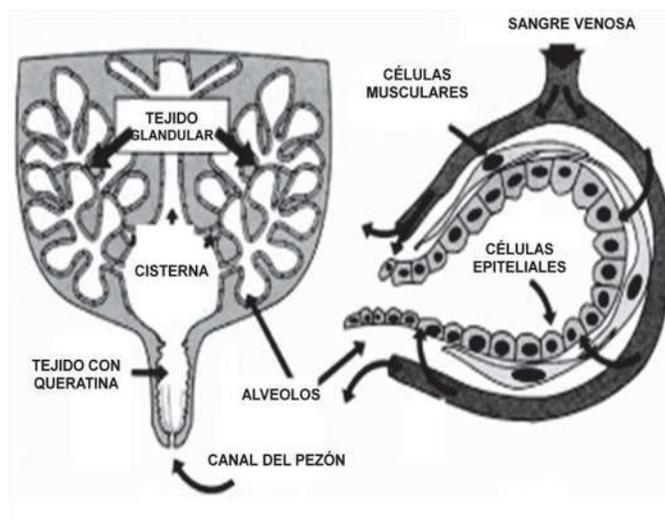


FIGURA 1. ESQUEMA ANATÓMICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA. Muestra los factores anatómicos más importantes que actúan como barrera de defensa contra agentes externos potencialmente dañinos (Lowy, 1998).

2.4.2 Inmunidad innata de la glándula mamaria

Cuando una bacteria logra penetrar al canal del pezón, la segunda línea de defensa consiste de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Estas células regulan tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adquirida (Oviedo-Boyso *et al*, 2007).

El tejido sano de la glándula mamaria bovina y la leche contienen principalmente macrófagos, cuando hay una infección bacteriana como es el caso de la mastitis bovina, los macrófagos ya sea del tejido o de la leche, reconocen el patógeno que está invadiendo e inician la respuesta inflamatoria descargando citocinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-1 β) que inducen el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de la infección y se producen también prostaglandinas y leucotrienos que incrementan la reacción inflamatoria local (Rainard, 2003; Bannerman *et al*, 2004), además controlan la respuesta inmune adquirida (Sordillo and Streicher, 2002).

Durante la infección se activa la vía del NF- κ B que es un factor de transcripción importante implicado en la regulación de la respuesta inmune innata

(Andoh *et al*, 1999; Place *et al*, 2005) controlando la expresión de genes que codifican citocinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas inducibles de la inflamación, como la sintasa inducible de óxido nítrico y la ciclo oxigenasa-2, moléculas de adhesión y factores de crecimiento (Jobin and Sartor, 2000; Segain *et al*, 2000; Luhrs *et al*, 2002).

La respuesta inmune innata es crucial para el control de la proliferación de microorganismos y la erradicación de patógenos asociados a mastitis; lo cual está íntimamente relacionado con la respuesta inmune adquirida, que es fundamental para establecer la memoria inmunológica (Oviedo-Boyso *et al*, 2007). La glándula mamaria también contiene factores bacteriostáticos no específicos que pueden actuar independientes o asociados con inmunoglobulinas, estos factores pueden ser: la proteína lactoferrina que es una proteína de defensa inducible producida por las células epiteliales, su expresión en la glándula mamaria aumenta cuando cesa la lactancia y durante la mastitis clínica; factores del complemento, presente en el suero y la leche, producido principalmente por los hepatocitos y algunos monocitos y macrófagos en diferentes tejidos; el sistema lactoperoxidasatiocianato - peróxido-hidrógeno y la lisozima (Rainard, 2003). La sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) es un elemento clave de la actividad antimicrobiana realizada por los macrófagos activados en la glándula mamaria. Este complejo enzimático cataliza la conversión de la arginina a citrulina y óxido nítrico, un radical altamente reactivo con actividad antibacteriana (Rainard y Riollot, 2003).

Uno de los elementos de la inmunidad innata que tiene un papel crucial para combatir las infecciones son los péptidos antimicrobianos (PA). Son péptidos de bajo peso molecular (menores a 10 kDa), típicamente son moléculas catiónicas debido a su alto contenido de lisina y arginina. Son moléculas anfipáticas, lo que les concede estabilidad en ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos (Boman, 1995; Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997).

Los PA se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales regularmente expuestos al ataque microbiano como la piel, el intestino y pulmones. Las células sanguíneas de defensa también son importantes productoras de PA, donde

constituyen parte de los mecanismos efectores no-oxidativos contra patógenos potenciales. Los PA se sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina y a mucho menor costo metabólico, pueden almacenarse en altas concentraciones, estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan o producen cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Son un medio rápido, no específico para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios (Evans y Harmon, 1995).

Para llevar a cabo su función antimicrobiana, los PA utilizan uno de los siguientes mecanismos: a) interfieren en la síntesis de enzimas metabólicas ó del DNA; o b) actúan directamente a nivel de la membrana celular ya sea alterando la permeabilidad o lisándola mediante la formación de canales o poros (Nissen-Meyer y Nes, 1997). En los mamíferos los PA se dividen en dos familias, las defensinas y las catelicidinas. Las defensinas de los mamíferos son PA que se consideran importantes en la inmunidad innata y podrían contribuir a la inmunidad adaptativa contra las invasiones microbianas. Las defensinas en los mamíferos se clasifican en 3 categorías, según su tamaño y patrón de puentes disulfuro: α , β y θ . En las vacas, se conocen alrededor de 13 tipos de β -defensinas producidas por neutrófilos (Yang *et al*, 2002).

2.5 LA LECHE BOVINA

Para producir leche, la glándula mamaria bovina tiene que llevar a cabo por lo menos tres funciones en sus células epiteliales; la primera es obtener energía para realizar su trabajo, donde la mitocondria juega un papel muy importante; la segunda es elaborar los elementos para la leche que no provienen directamente de la sangre; la tercera es regular la cantidad de los diferentes elementos que integran la leche (Bath *et al*, 1979). La leche contiene principalmente agua, lactosa, proteínas, sales inorgánicas, vitaminas, etc., composición que varía entre especies. Para el proceso de producción, la glándula dependerá del flujo sanguíneo para el suministro de energía y de los elementos precursores de la

leche. La cantidad y la disponibilidad del material producto del metabolismo con que cuenta la glándula, así como la capacidad con la cual ésta toma ese producto dependerán, por tanto, de la rapidez con que la sangre fluya por la glándula. Se estima que pasan por la glándula mamaria bovina 500 volúmenes de sangre ó 375 de plasma por cada volumen de leche que se produce (Bath *et al*, 1979). En la leche, la proteína principal es la caseína y en el plasma la albúmina y globulina (Dukes, 1961).

Los precursores de los constituyentes de la leche de bovinos, son en general: glucosa, aminoácidos, acetato, β -hidroxibutirato y triglicéridos, los cuales se describen a continuación:

- a) Proteínas: α , β , γ y κ -caseína, lactoalbúmina, β -lactoalbúmina, seroalbúmina sanguínea, inmunoglobulinas (Rose *et al*, 1970; Dukes, 1961).
- b) Lactosa. Principal carbohidrato de la leche y consiste en una molécula de glucosa y una de galactosa; este carbohidrato se sintetiza en la glándula mamaria de la vaca.
- c) Grasa. La grasa presente en la leche de la vaca se caracteriza por obtener una mezcla de triglicéridos. Aproximadamente el 50% de los ácidos grasos presentes en la leche son ácidos grasos de cadena corta (4 a 14 carbonos) y el resto, de ácidos grasos de cadena larga (16-20 carbonos). La leche contiene una elevada proporción de ácidos grasos saturados (Bath *et al*, 1979). Los ácidos grasos de cadena corta no provienen de los ácidos grasos presentes en la ración, sino que son sintetizados en la glándula mamaria a partir de acetatos, cuerpos cetónicos y β -hidroxibutirato. Existen diversos estudios que indican que la grasa de la leche contiene numerosos componentes con potencial anticarcinogénico (Parodi, 1997).
- d) Minerales, vitaminas y agua. Los principales minerales son el calcio, fósforo, potasio y magnesio, los cuales son suministrados por la sangre. El agua de la leche, pasa parcialmente, por el movimiento de agua de la sangre a las células en el mantenimiento del equilibrio osmótico, como

resultado de la síntesis de proteínas, grasa y lactosa. La leche es una fuente rica de vitamina A, D y riboflavina. La niacina está presente en pequeñas cantidades y se considera que la leche es pobre en ácido ascórbico y rica en tiamina (Bath *et al*, 1979; Muñoz, 1979).

La leche bovina es un excelente medio de crecimiento para *S. aureus*, debido a que puede hidrolizar caseína y fermentar lactosa (Carter *et al*, 1995). Esta bacteria produce un elevado nivel de proteasas en un medio rico en caseína (Anderson, 1976).

2.6 ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC)

Los ácidos grasos de cadena corta son el resultado de la fermentación anaeróbica bacteriana en el colon de todas las especies de mamíferos, donde utilizan como sustrato las fibras dietéticas (carbohidratos complejos) (Karakı *et al*, 2008). Los ácidos grasos de cadena corta, 2-4 carbonos, monocarboxilados como son el acetato, propionato y butirato, son los mayores aniones presentes en el lumen del intestino grueso. La producción de acetato, propionato y butirato ocurre en una producción molar aproximada de 60:20:20, respectivamente (Cummings *et al*, 1979). Pero es difícil estimar la producción total porque más del 95% de los ácidos grasos de cadena corta son absorbidos y metabolizados (Topping and Clifton, 2001).

La producción de AGCC permite tomar energía principalmente de las fuentes de carbono como la fibra dietética que no se digiere en el intestino delgado. Se ha estimado que los AGCC aportan cerca de un 5 - 15% del requerimiento de calorías totales de humanos, y un 70% de los requerimientos de energía de los rumiantes (Bergman, 1990). Los AGCC están disponibles en concentraciones milimolares (mM) en el lumen del colon que son absorbidos a través del epitelio por transporte activo y pasivo (Cook *et al*, 1998; Topping and Clifton, 2001). Además, son conocidos por tener varios efectos fisiológicos y fisiopatológicos en el intestino. El acetato es considerado el AGCC predominante

en el colon. Sin embargo, con respecto a la inflamación, se sabe poco del acetato y el propionato.

Los AGCC no son absorbidos como nutrientes a través del epitelio intestinal de humano, pero tienen influencia en varias funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal (Cummings and Macfarlane, 1997; Topping and Clifton, 2001). Por ejemplo, estimulan el flujo de sangre en el colon (Mortensen *et al*, 2000), influyen en la captación del fluido electrolítico (Binder y Mehta, 1989), contracción del músculo liso (Yajima, 1985), secreción transepitelial del cloro (Yajima, 1988; Hubel y Russ, 1993), proliferación de células epiteliales de colon (Sakata, 1987; Kripke *et al*, 1989) inhibe la proliferación de células cancerosas previniendo así el cáncer colorectal (Ogawa *et al*, 2003).

Se sabe también que las fibras dietéticas y los AGCC tienen un potencial clínico elevado, incluso pueden tener eficacia en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Crohn, mediante la inhibición de citocinas pro-inflamatorias e induciendo la activación del factor transcripcional NF- κ B (Andoh *et al*, 2003).

Los efectos de los AGCC en el lumen del intestino se considera que son inducidos vía la activación de receptores específicos y/o vía absorción en las células epiteliales; sin embargo, el mecanismo exacto aún no es claro. Diversos estudios han analizado los efectos de los AGCC en los neutrófilos (Niederman *et al*, 1997). Se demostró que el propionato estimula la generación del superóxido en neutrófilos de humanos (Nakao *et al*, 1998), también estimula la quimiostasis de los neutrófilos (Le *et al*, 2003). Pero aun no está claro cómo influyen en la respuesta de los mediadores inflamatorios, como los lipopolisacáridos (LPS) en los neutrófilos.

En estudios recientes, se demostró que los AGCC inhiben fuertemente la expresión del TNF- α en neutrófilos humanos estimulados con LPS, al mismo tiempo se demostró que no afectaba la expresión de IL-8, lo que indica que la expresión de estas citocinas en neutrófilos son regulados por mecanismos separados (Tedelind *et al*, 2007).

2.6.1 Butirato

El ácido butírico o butirato es un ácido graso de cadena corta (C4), producido en el lumen intestinal de los rumiantes por la fermentación bacteriana principalmente de carbohidratos solubles y en menor medida los insolubles y proteínas endógenas (Hamer *et al*, 2008). El butirato es el AGCC más estudiado puesto que se ha observado que tiene varios efectos tanto en humanos como en animales (Fig 2).

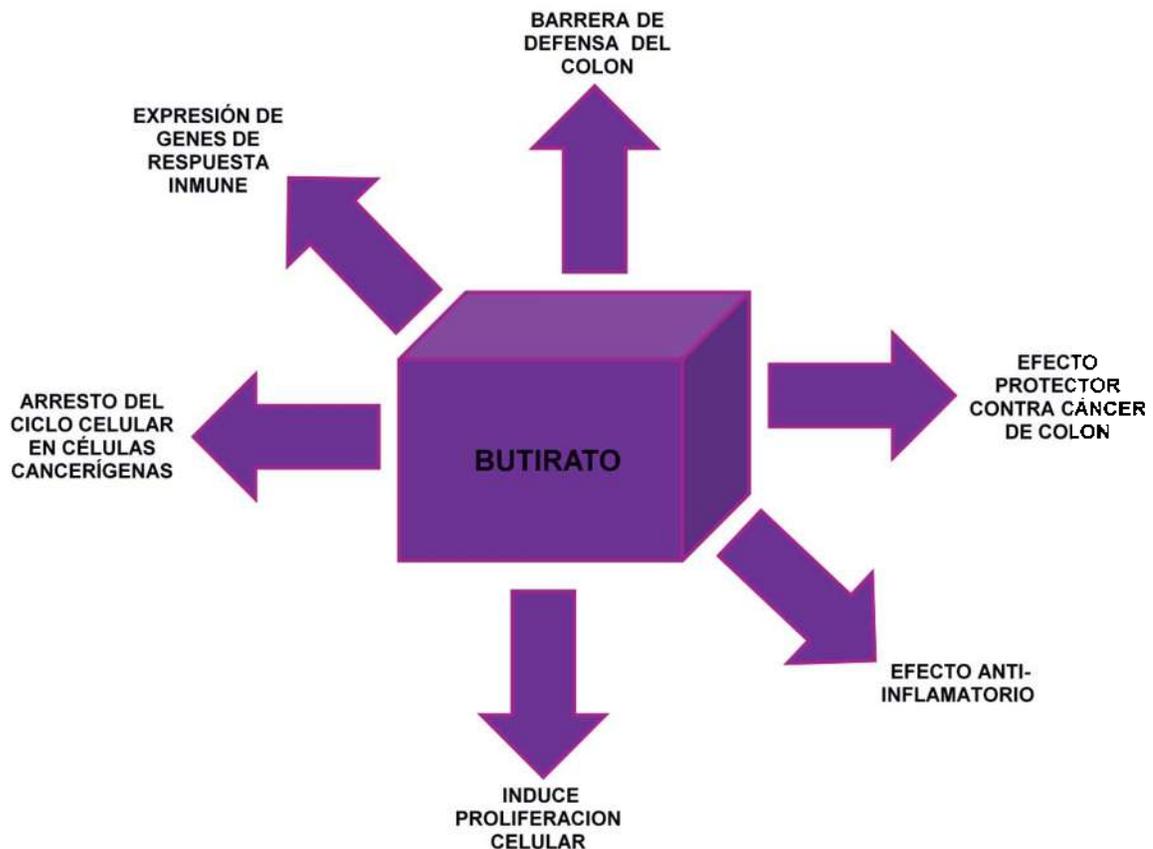


FIGURA 2. EFECTOS DEL BUTIRATO EN HUMANOS Y ANIMALES. El butirato es un producto final de la fermentación bacteriana de carbohidratos complejos en el lumen intestinal (Hamer *et al*, 2008).

Este ácido graso está presente únicamente en la grasa de la leche de los rumiantes lo cual la diferencia de la leche del resto de los mamíferos (Parodi,

1997). La grasa de la leche de bovinos contiene butirato con valores de 7.5 a 13.0 mol/ 100 mol de grasa total, que corresponde a un 2-5% del peso de la leche. En la ingestión, la hidrólisis del butirato mediada por lipasas comienza en el estómago y se completa en el intestino delgado. Una vez liberado el butirato es absorbido por los enterocitos del lumen del intestino (Parodi, 1997).

Se considera que el butirato es la fuente de energía preferida por las células del colon (Kida *et al*, 2006). El epitelio del colon es un tejido blanco para los efectos benéficos del butirato (Cuff *et al*, 2005). Además de ser una fuente importante de energía, el butirato puede ejercer efectos inmunomodulatorios demostrados tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se ha demostrado que el butirato en bajas concentraciones tiene una influencia significativa en el sistema inmune de humanos y roedores, ya que *in vitro*, disminuye la proliferación de los linfocitos en ratones y en ratas (Weber y Herr, 2006) y específicamente en linfocitos humanos incrementa la expresión del ARNm y la producción de IL-10, pero no tiene efecto en la producción del INF- γ y si se aumenta la concentración, se inhibe la expresión del INF- γ pero se incrementa significativamente la expresión de IL-10.

Los resultados encontrados en reportes de células mononucleares de sangre periférica de cerdo muestran, que al igual que en humanos, la expresión de IL-10 se ve favorecida con el tratamiento de butirato a bajas concentraciones, lo cual no sucede con el INF- γ (Nancey *et al*, 2005). Pero los resultados encontrados en células mononucleares de cerdo tratadas con altas concentraciones de butirato contrastan con lo reportado en humanos y roedores, ya que en cerdos la expresión del INF- γ se incrementó y la de IL-10 disminuyó, lo cual dio como resultado la disminución de la magnitud del proceso inflamatorio. Este hallazgo indica que la regulación de la producción de citocinas en cerdos depende de la concentración de butirato de sodio, lo cual no sucede en humanos y roedores (Weber *et al*, 2006).

El butirato es un potente inhibidor de la proliferación de células cancerígenas, además de inducir la diferenciación celular y la apoptosis en líneas

celulares cancerígenas (Hague *et al*, 1995). Los mecanismos de las funciones celulares en las que el butirato tiene efecto aún no han sido descritas en su totalidad, aunque se considera por la regulación de la expresión de genes, que es debido a la inhibición de la enzima histona desacetilasa (Comalada *et al*, 2006). Además hay reportes donde se indica que el butirato induce la hiperacetilación de histonas y la hipermetilación del ADN, ambos eventos están asociados con la inactivación de la expresión de oncogenes. Además el butirato juega un papel muy importante en la prevención de tumores invasivos y la metástasis (Gibson *et al*, 1994). El colon es el órgano que se asocia mayormente con la acción del butirato. Aunque el butirato inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon, paradójicamente estimula la proliferación de células normales de colon (Parodi, 1997).

Otros efectos demostrados del butirato son los descritos en líneas celulares de epitelio de pulmón humano, donde se observa que induce la expresión de péptidos antimicrobianos como son las catelicidinas (Hancock y Scott, 2000); estos péptidos juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas (Kida *et al*, 2006). El butirato de sodio induce la acetilación de histonas y la inhibición reversible de la histona desacetilasa en células epiteliales de pulmón, favoreciendo la inducción de la expresión del gen de las catelicidinas (Kida *et al*, 2006).

Existen reportes donde se describe que el butirato de sodio puede inducir apoptosis y el arresto del ciclo celular en una línea celular de epitelio de riñón de bovino, puesto que, en el 40% de las células tratadas con butirato de sodio se indujo la apoptosis después de 24 h. Además el butirato bloqueó la sobrevivencia de las células en dos distintas fases (la G1 y la M/G2) del ciclo celular (Li and Li, 2006). En estudios posteriores, también en células epiteliales de riñón de bovinos, se demostró que el tratamiento con butirato induce la actividad de la caspasa-3 e induce la acumulación de histonas acetiladas, es por tal motivo que ejerce un efecto regulador en el ciclo celular y en la apoptosis (Li and Elsasser, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria que afecta al ganado bovino lechero generando así grandes pérdidas económicas a nivel mundial. El agente etiológico frecuentemente aislado es *S. aureus*, considerado como un microorganismo patógeno contagioso, que es difícil de controlar con una terapia antimicrobiana convencional debido a su capacidad de invadir las células del epitelio mamario bovino y a la resistencia que presenta frente a los antimicrobianos.

Adicionalmente, se han estudiado ampliamente las funciones antimicrobianas y moduladoras de algunos de los ácidos grasos de la leche, siendo el butirato el más estudiado. Se conoce que este ácido graso, además de tener propiedades nutrimentales para los rumiantes, posee distintas funciones celulares entre las que se encuentra la proliferación y la diferenciación celular, motilidad, arresto del ciclo celular y apoptosis, además de asociársele con la modulación de la respuesta inmune a través de la expresión de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, no se ha estudiado la participación del butirato de la leche bovina durante el establecimiento y desarrollo de la infección por *S. aureus* en la glándula mamaria para lo cual se plantea la siguiente hipótesis:

IV. HIPÓTESIS

El butirato de sodio disminuye la invasión de *Staphylococcus aureus* en las células de epitelio mamario bovino mediante la expresión de genes de respuesta inmune innata.

V. OBJETIVO GENERAL

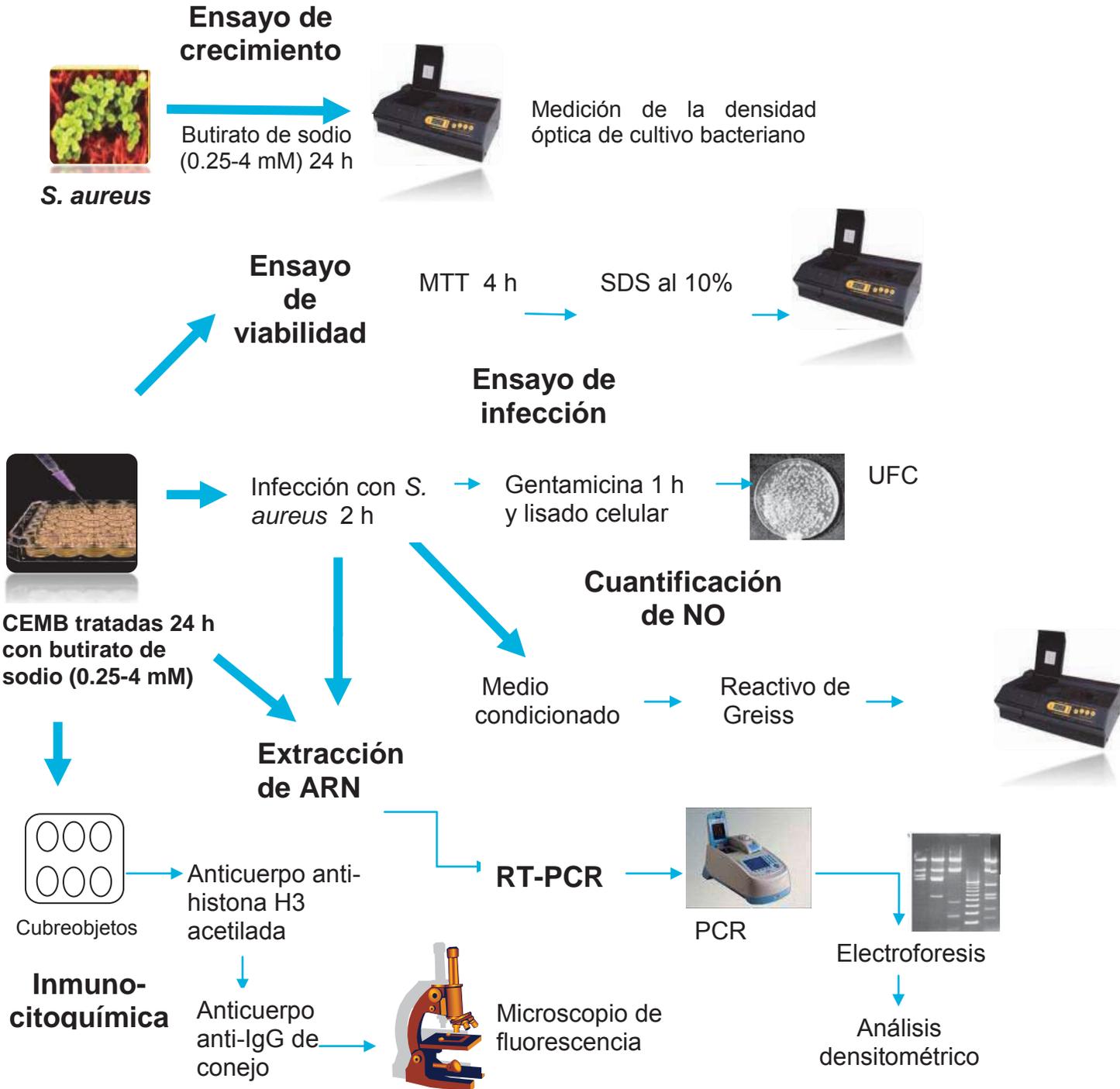
Evaluar el efecto del butirato de sodio sobre la invasión de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (CEMB).

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la viabilidad de las CEMB en presencia de butirato de sodio, así como el efecto sobre la proliferación de *S. aureus*.
2. Evaluar la invasión de *S. aureus* en las CEMB en presencia de butirato de sodio.
3. Analizar la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*.
4. Evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*.
5. Cuantificar la producción de óxido nítrico producido por las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*.
6. Determinar el efecto de butirato de sodio en la acetilación de histonas en las CEMB.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6.2 CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO (CEMB)

Las células fueron aisladas a partir del tejido alveolar de ubres de vacas lactantes de acuerdo con un protocolo establecido previamente en el laboratorio (Anaya-López *et al*, 2006). Las CEMB se cultivaron en cajas de Petri con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (100 µg/mL), insulina (5 µg/mL) e hidrocortisona (5 µg/mL).

6.3 CULTIVO DE *Staphylococcus aureus*

Se utilizó una cepa comercial de *S. aureus* ATCC 27543, aislada de un caso de mastitis clínica. Se cultivó en medio Luria Bertani (LB, Difco) a 37°C. El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de cultivos crecidos durante 16-18 h a 37°C.

6.4 ENSAYO DE CRECIMIENTO DE *S. aureus* EN PRESENCIA DE BUTIRATO DE SODIO

Se cultivó *S. aureus* de una cepa comercial ATCC 27543 en medio líquido LB, se incubó en agitación por 18 h. La suspensión bacteriana se ajustó por DO₆₀₀ a 97X10⁶ UFC/mL, posteriormente se agregaron diferentes concentraciones (0.25 - 4 mM) de butirato de sodio, se incubaron por 24 h a 37°C en agitación y posteriormente se midió la absorbancia.

6.5 ENSAYO DE VIABILIDAD DE CEMB

Para evaluar la viabilidad de las CEMB con las diferentes concentraciones de butirato de sodio, se utilizó el bioensayo de MTT, una técnica colorimétrica que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio, que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan púrpura. Se cultivaron 5 X10³ células por pozo, en cajas de 96 pozos con medio sin suero y sin antibióticos. Se agregó butirato de sodio a diferentes concentraciones (0.25 - 4mM) por 24 y 48 h, posteriormente se agregaron 10 µL

de MTT, y se incubó a 37°C por 4 h, posteriormente se agregó SDS al 10% y se homogenizó perfectamente con pipeteo constante. Posteriormente se determinó la absorbancia en espectrofotómetro (590 nm, DAS).

6.6 ENSAYOS DE INFECCIÓN

En cajas de cultivo celular de 24 pozos se agregó colágena de cola de ratón por un periodo de 2h. Posteriormente se crecieron a confluencia las CEMB con medio DMEM sin suero y antibióticos, se agregó butirato de sodio en diferentes concentraciones (0.25 - 4 mM) y se incubaron por 24 h a 37°C en 5% de CO₂. Posteriormente se lavaron las células 3 veces con PBS estéril, y se dejaron con DMEM sin suero y sin antibióticos. Se infectaron las células con la cepa de *S. aureus* (97X10⁶ UFC/mL), se empleó una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula, después de 2 h se lavó con PBS estéril 3 veces y se agregó 40 µg/mL de gentamicina por pozo durante 1 h para matar las bacterias que quedaron sin invadir la célula. Posteriormente se volvió a lavar 3 veces con PBS estéril. Se agregó tripsina (0.25%) para despegar y recuperar las células y se centrifugó a 15000 rpm 10 minutos, se decantó la tripsina y se agregaron 150 µL de agua destilada estéril; esto para lisar las células, y éstas se sembraron en agar LB y se incubaron a 37°C por 18 h, y después se procedió a hacer el conteo manual de UFC.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO PRODUCIDO POR LAS CEMB

El NO se cuantificó en el medio condicionado obtenido del tratamiento de las células con diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM) 24 h previas a la infección y en el medio que se recuperó posterior a la infección. El NO se evaluó midiendo la concentración de nitrito (NO₂) empleando la reacción de Greiss. El reactivo de Greiss se preparó mezclando 1 volumen de solución stock A (10% de sulfanilamida, 40% de ácido fosfórico, Sigma) y 1 volumen de solución stock B [1% N-(1-naphtyl) etilendiamida dihidroclorido, Sigma]. Finalmente, se utilizó 1 volumen de la mezcla de reactivos por 1 volumen de medio condicionado y se procedió a medir la absorbancia que se determinó a 550 nm en un

espectrofotómetro (DAS). La concentración de nitrito se calculó a partir de una curva estándar de NaNO_2 (Sigma) en PBS estéril.

6.7 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se realizó la extracción de ARN total de células de epitelio mamario bovino tratadas con diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 - 4 mM) e infectadas con *S. aureus*. Se agregó el reactivo Trizol (Invitrogen) y se rasparon las células adheridas. Posteriormente se trataron con cloroformo, se precipitó el ARN con isopropanol, y se centrifugó hasta obtener una pastilla que fue disuelta en agua con inhibidor de RNasa que se incubó a 60°C por 10 min, posteriormente fue tratado con DNasa I (Invitrogen).

6.8 ANÁLISIS DE RT-PCR

Se realizó la síntesis de ADNc (ADN complementario) por retrotranscripción a partir del ARN total extraído de las CEMB tratadas con butirato de sodio, infectadas con *S. aureus* y sin infectar. La retrotranscripción se realizó en 20 μL conteniendo 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Oligo d(T) y 500 nM de dNTPs (Invitrogen). La reacción fue incubada a 65°C por 5 min e inmediatamente transferida a hielo y centrifugada. Posteriormente, se añadió First Standar Buffer 1X (Invitrogen), ditiotreitól 10 nM e inhibidor de RNasa 2 U/ μL (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/ μL , Invitrogen) y posteriormente se volvió a incubar a 37°C por 50 min, seguido de la inactivación de la reacción mediante el calentamiento a 70°C por 15 min.

6.9 PCR

En las reacciones de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), los péptidos antimicrobianos β -defensina y el péptido antimicrobiano traqueal (TAP), además del factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Tabla 1). Se amplificó también β -actina para verificar la integridad de ARN y la eficiencia del RT-PCR. Los productos de ADN amplificados

de las PCR se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, y finalmente se hizo un análisis densitométrico estandarizado respecto a la expresión de β -actina.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Especificidad	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de alineamiento °C/ número de ciclos
TAP bovino*	Sentido Reverso	5'-GCCAGCATGAGGCTCCAT-3' 5'-AACAGGTGCCAATCTGT-3'	166	50/35
β -defensina bovina	Sentido Reverso	5'-TCTTCTGGTCCTGTCTGCT-3' 5'-CCGAACAGGTGCCAATCTGT-3'	130	55/35
iNOS bovino	Sentido Reverso	5'-GGAAGCAGTAACAAAGGAGATAG3' 5'-CATAGCGGATGAGCTGGGCG-3'	282	60/40
β -actina	Sentido Reverso	5'-ATGGTGGGCATGGGTCAGAA-3' 5'-TCATACTCCTTGCTGAT-3'	900	55/25
TNF- α bovino	Sentido Reverso	5'-CTGGTTCAGACACTCAGGTCCT-3' 5'-GAGGTAAAGCCCCTCAGCA-3'	183	60/35

(Ochoa-Zarzosa *et al*, 2009)

6.10 IDENTIFICACIÓN DE HISTONAS ACETILADAS (INMUNOCITOQUÍMICA)

Para este ensayo se utilizaron células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus* y sin infectar, tratadas 24 h previas con butirato de sodio (0.25 - 4 mM). Se sembraron 20,000 CEMB en cubreobjetos redondos (1 cm de diámetro) cubiertos con colágena en PBS. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron por 10 min con paraformaldehído (4% en PBS). A continuación, se lavó 3 veces con PBS y se bloqueó por 2 h a temperatura ambiente con FBS (suero fetal bovino) al 10% en PBS. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con Tritón 0.3%. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-histona H3 acetilada (Upstate) diluido 1:1000. Las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado

a rodamina, diluido 1:100 en PBS-Tritón, por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS, los cubreobjetos se montaron en una solución PBS-glicerol 1:1. Finalmente, se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems), se seleccionaron 30 campos al azar, se fotografiaron y se contaron los núcleos fluorescentes. Posteriormente se midió la intensidad relativa de fluorescencia con el software Leica Qwin Standard v 2.3 (Leica Microsystems Imaging Solutions).

6.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos se les realizó una comparación de medias y se aplicó la prueba t de Student. Los valores de $P < 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS

Ensayo de viabilidad de las CEMB y crecimiento de *S. aureus* en presencia de butirato de sodio

Primero se realizaron ensayos de viabilidad de las CEMB tratadas con diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM), la viabilidad se determinó por medio del ensayo de MTT. Los resultados obtenidos mostraron que el butirato de sodio no afectó negativamente la viabilidad de las células después de 24 y 48 h de cultivo, excepto en las condiciones de 0.5 y 4 mM (Fig. 3).

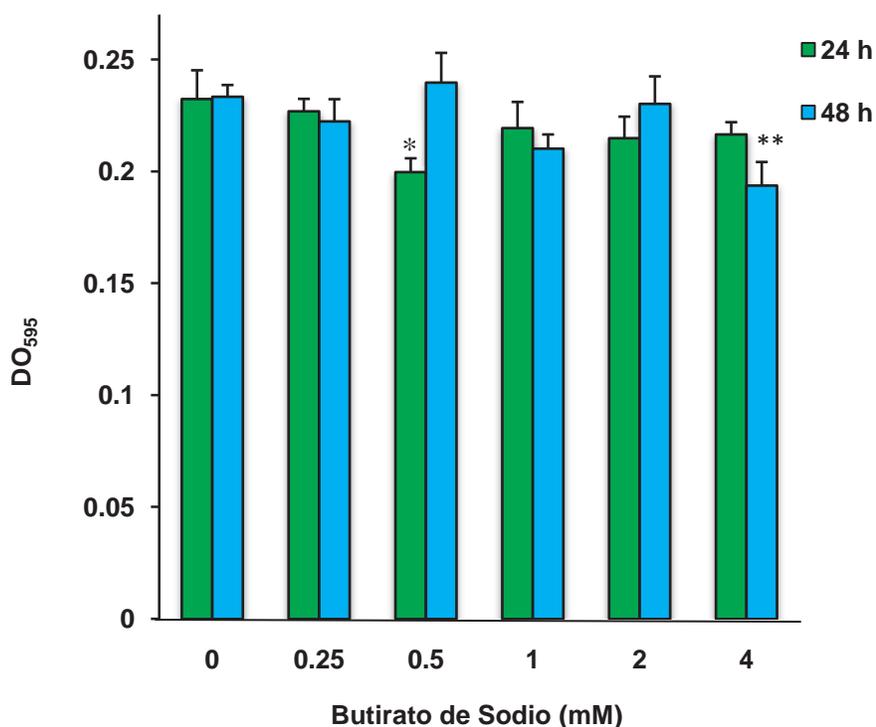


FIGURA 3. EFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO SOBRE LA VIABILIDAD DE LA CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO BOVINO. Las CEMB fueron cultivadas en presencia de butirato de sodio (0.25 – 4 mM) por 24 y 48 h. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “*” y “**” indican cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato. * 24h y ** 48h

Posteriormente, se realizó el ensayo de crecimiento de *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM) con el fin de evaluar si este compuesto tenía algún efecto sobre la viabilidad de las CEMB, para ello se midió la densidad óptica después de 24 h de cultivo. En la figura 4, se muestra que el butirato de sodio no afectó el crecimiento de *S. aureus*, puesto que el crecimiento de la bacteria es similar en presencia o ausencia de butirato.

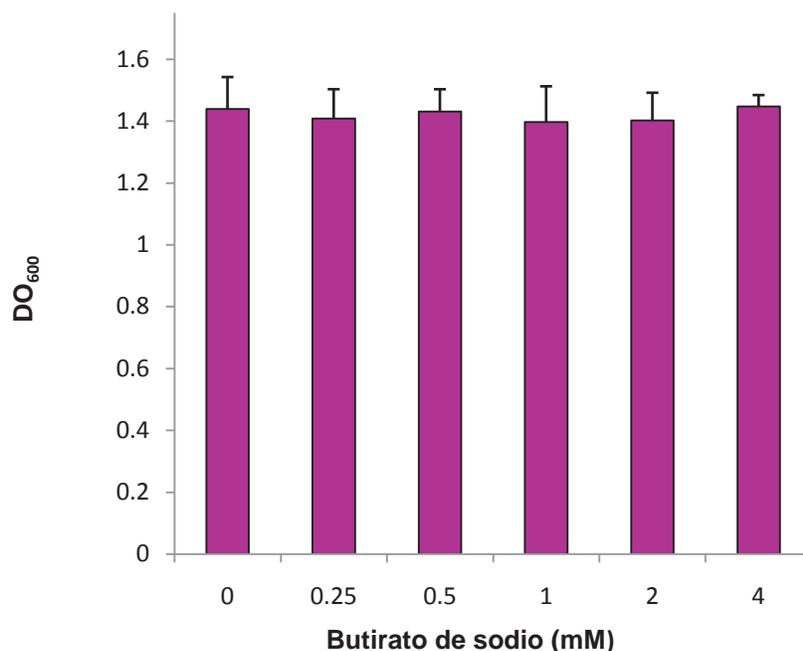


FIGURA 4. EFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *S. aureus*. El crecimiento de *S. aureus* no se afectó por la presencia de butirato de sodio después de 24 h de cultivo. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Evaluación del efecto del butirato de sodio sobre la invasión de *S. aureus* en las CEMB

Para evaluar el efecto del butirato de sodio en la invasión de *S. aureus* en las CEMB, se realizaron ensayos de infección, donde se cultivaron las CEMB tratadas con las diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM) 24

h antes de ser infectadas con *S. aureus*. El butirato de sodio en las concentraciones de 0.25 - 1 mM provocó una disminución de la invasión del ~50% (Fig. 5); esta diferencia fue significativa respecto a las CEMB sin tratar. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de 2 – 4 mM de butirato de sodio, solo se observó una disminución de ~10%. Estos valores se determinaron comparando con las células control que no fueron tratadas con butirato de sodio.

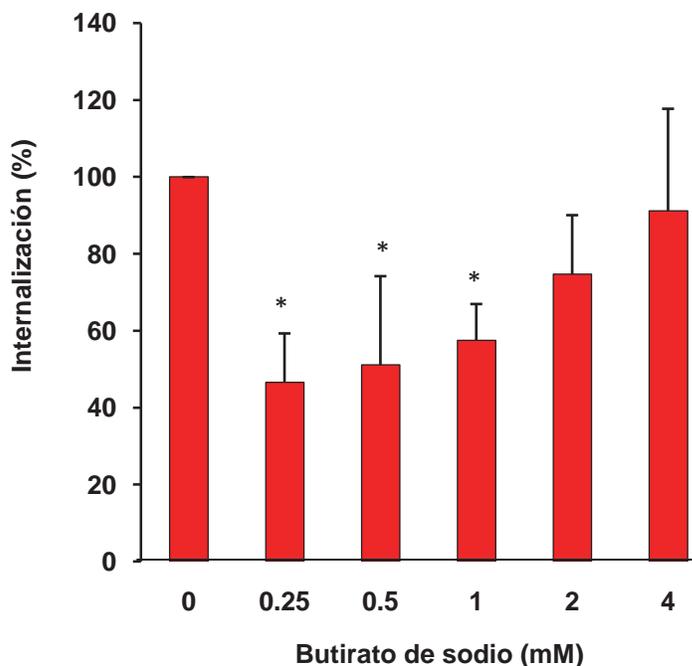


FIGURA 5. EVALUACIÓN DE LA INVASIÓN DE *S. aureus* EN LAS CEMB EN PRESENCIA DE BUTIRATO DE SODIO. Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM) en la invasión de *S. aureus* en las CEMB. Se representa el número de UFC recuperadas después de la lisis de las células, los valores fueron determinados considerando las células sin tratar con butirato de sodio como el 100% de la invasión. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato.

Cuantificación de la producción de óxido nítrico por las CEMB

Se cuantificó el óxido nítrico producido por las CEMB antes de la infección y después de la infección en presencia de butirato de sodio. Las células fueron tratadas 24 h antes con las diferentes concentraciones de butirato de sodio. Los resultados muestran que la presencia de butirato de sodio antes de la infección

induce la producción de óxido nítrico de hasta ~7 veces en las concentraciones de 0.5 y 1 mM, y de ~13 y ~20 veces en las concentraciones de 2 y 4 mM respectivamente. Cuando las células fueron infectadas con *S. aureus* el incremento de la producción de NO fue de ~10 veces respecto al control sin infectar y sin butirato de sodio, en las concentraciones de 0.25 -1 mM de butirato de sodio.

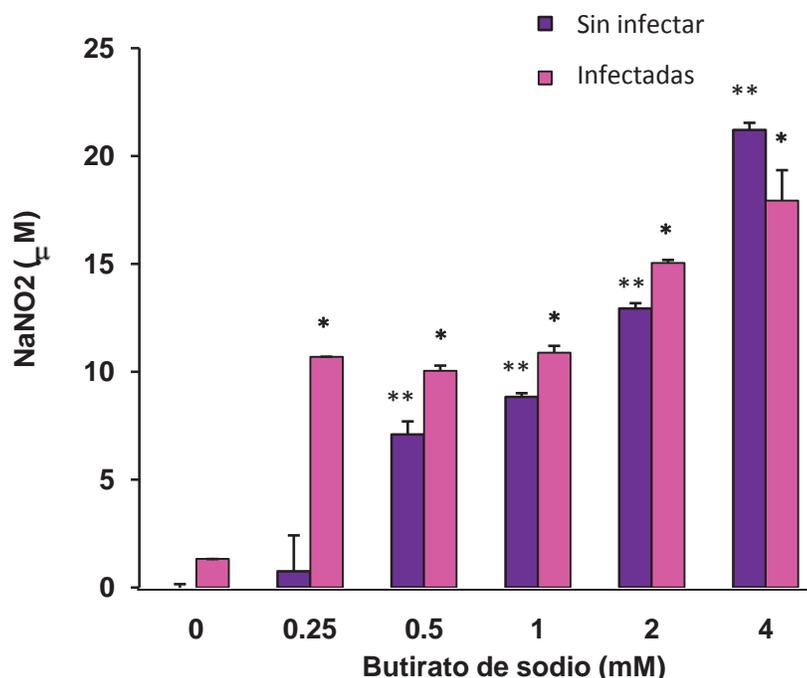


FIGURA 6. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LAS CEMB EN PRESENCIA DE BUTIRATO DE SODIO. Se determinó la cantidad de óxido nítrico producido por células infectadas y no infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 – 4 mM). El óxido nítrico fue medido como la concentración de nitrito (NO_2^-) en el medio condicionado sin células. Los valores de la gráfica son el resultado de tres o más experimentos independientes realizados por triplicado. “**” y “***” indican cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al control sin butirato de sodio en células infectadas y sin infectar respectivamente.

Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune innata

Se analizó la expresión del ARNm del TNF- α en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*, para determinar si el butirato y la infección regulan la expresión del TNF- α . Se evaluó la expresión del ARNm mediante RT-PCR en células tratadas 24 h previas a la infección con las diferentes concentraciones de butirato de sodio. Cabe mencionar que para los análisis del

ARNm se utilizaron únicamente las concentraciones de 0.25 a 2 mM, ya que en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se detectó que en éste rango de concentraciones es donde se observa un efecto significativo. En la figura 7A se muestran los productos de RT-PCR donde se observa un incremento en la intensidad en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de butirato de sodio, y en la figura 7B la gráfica muestra que el butirato de sodio incrementó ~3 veces la expresión del ARNm de TNF- α en la concentración de 0.25 y ~5 veces en la concentración de 0.5mM.

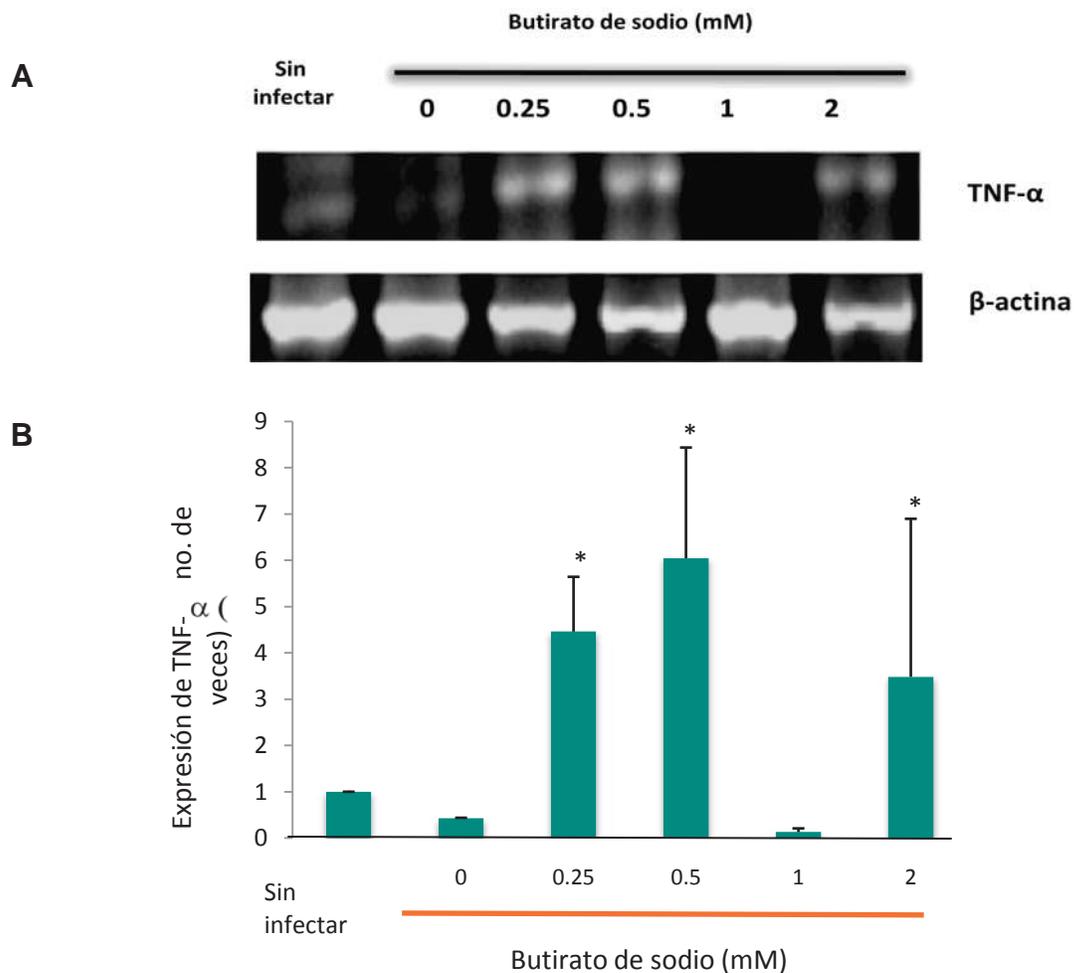


FIGURA 7. EXPRESION DEL ARNm DE TNF- α EN LAS CEMB TRATADAS CON BUTIRATO DE SODIO. A) Electroforesis en geles de agarosa al 2% representativa de los productos de RT-PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para TNF- α y β -actina. B) Análisis densitométrico de la expresión de TNF- α con respecto a la expresión de β -actina. Los datos de la gráfica son resultado del promedio de 3 experimentos independientes. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato.

Posteriormente, se analizó la expresión de iNOS por RT-PCR para determinar si el butirato de sodio en las diferentes concentraciones y la infección regulan su expresión en las CEMB. Para este análisis se utilizaron CEMB tratadas con butirato de sodio y sin tratar, posteriormente se infectaron con *S. aureus*. Los resultados muestran en la figura 8 que la expresión de la iNOS es regulada positivamente por la infección y el butirato de sodio en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM, no así en las demás concentraciones.

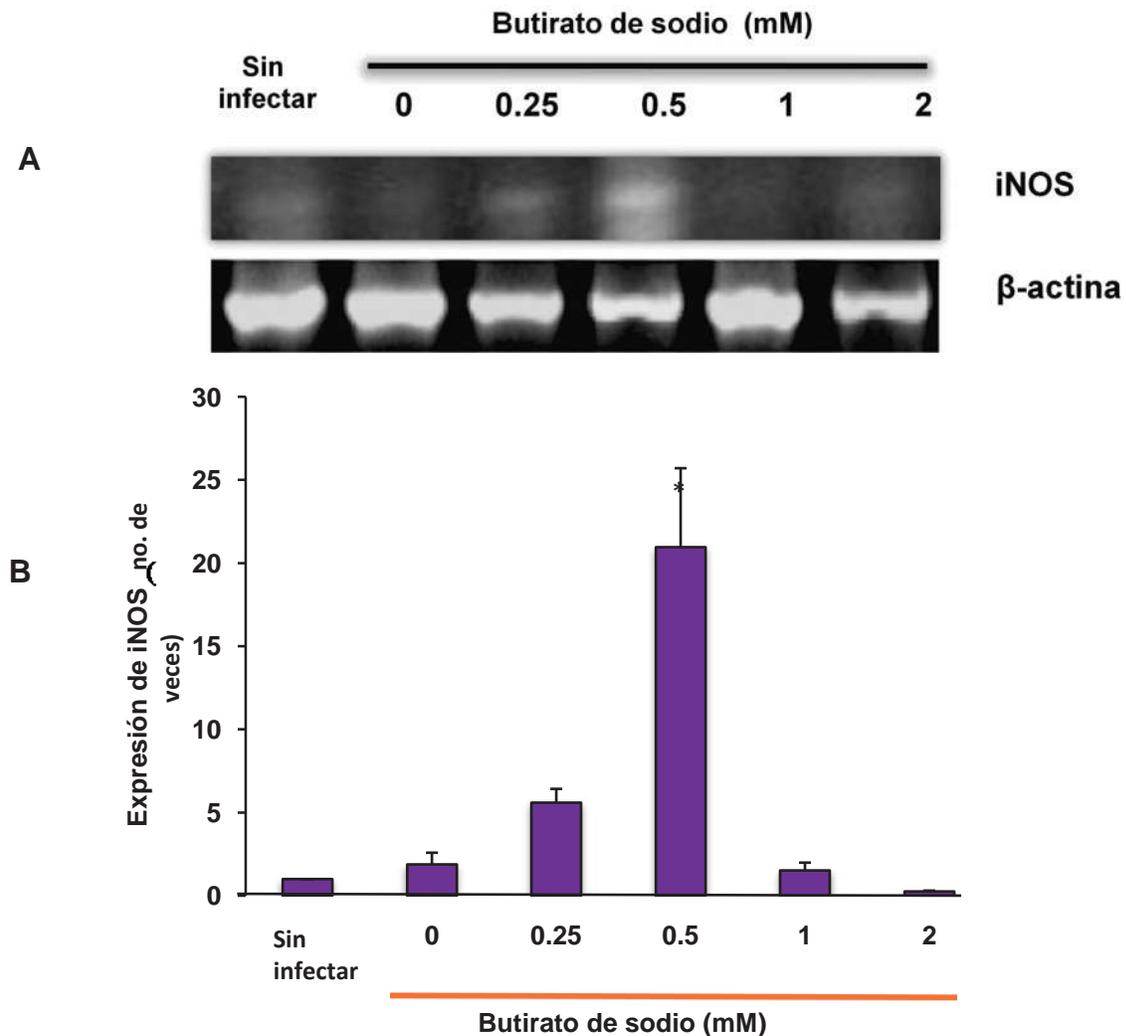


FIGURA 8. EXPRESIÓN DEL ARNm DE iNOS EN LAS CEMB TRATADAS CON BUTIRATO DE SODIO. Las CEMB se trataron 24 h antes de la infección con butirato de sodio (0.25 – 2 mM) y se infectaron con *S. aureus*. A) Electroforesis en geles de agarosa al 2% representativa de los productos de RT-PCR amplificados con 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 del promedio de 3 experimentos independientes. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato de sodio.

Análisis de la expresión de péptidos antimicrobianos

Para evaluar la expresión de TAP se utilizaron células sin infectar e infectadas con *S. aureus* y tratadas previamente con butirato de sodio (0.25 - 2 mM). La figura 9B demuestra que las células infectadas y tratadas con butirato de sodio, a una concentración de 0.25, 0.5 y 2mM mostraron un incremento de la expresión de ~2 veces con respecto al control sin infectar y sin butirato.

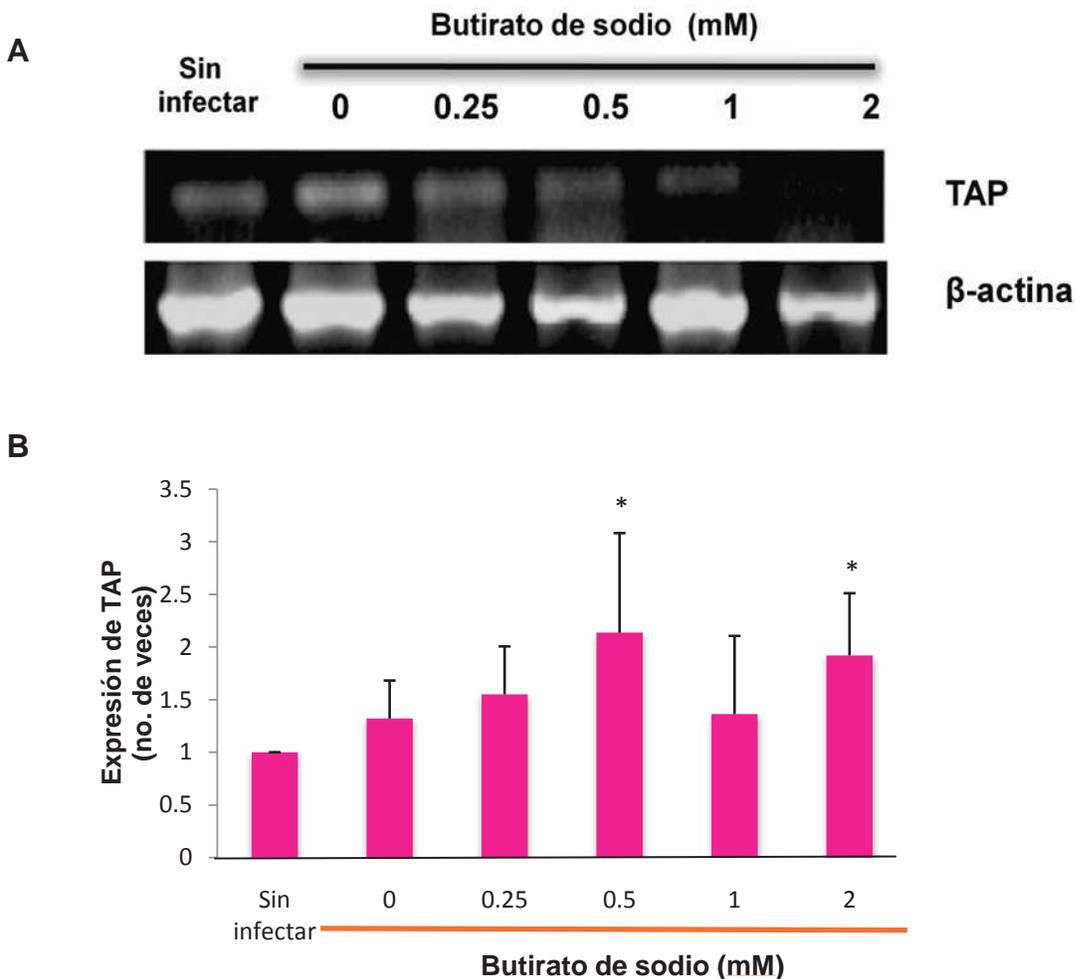


FIGURA 9. EXPRESIÓN DEL ARNm DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO TRAQUEAL EN LAS CEMB TRATADAS CON BUTIRATO DE SODIO. Las CEMB fueron tratadas con las diferentes concentraciones de butirato de sodio por 24 h y posteriormente infectadas con *S. aureus*. A) Electroforesis en gels de agarosa al 2% representativa 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 del promedio de 3 experimentos independientes. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato de sodio.

A continuación, se analizó la expresión de β -defensina por RT-PCR en células sin infectar y células infectadas con *S. aureus*, tratadas con butirato de sodio, para determinar si el butirato y la infección regulan la expresión de β -defensina. En la figura 10B se observa que el butirato de sodio en concentraciones de 0.25 - 0.5 mM incrementó la expresión de β -defensina ~3 veces, mientras en la concentración de 2 mM se observó la inhibición de la expresión de este gen.

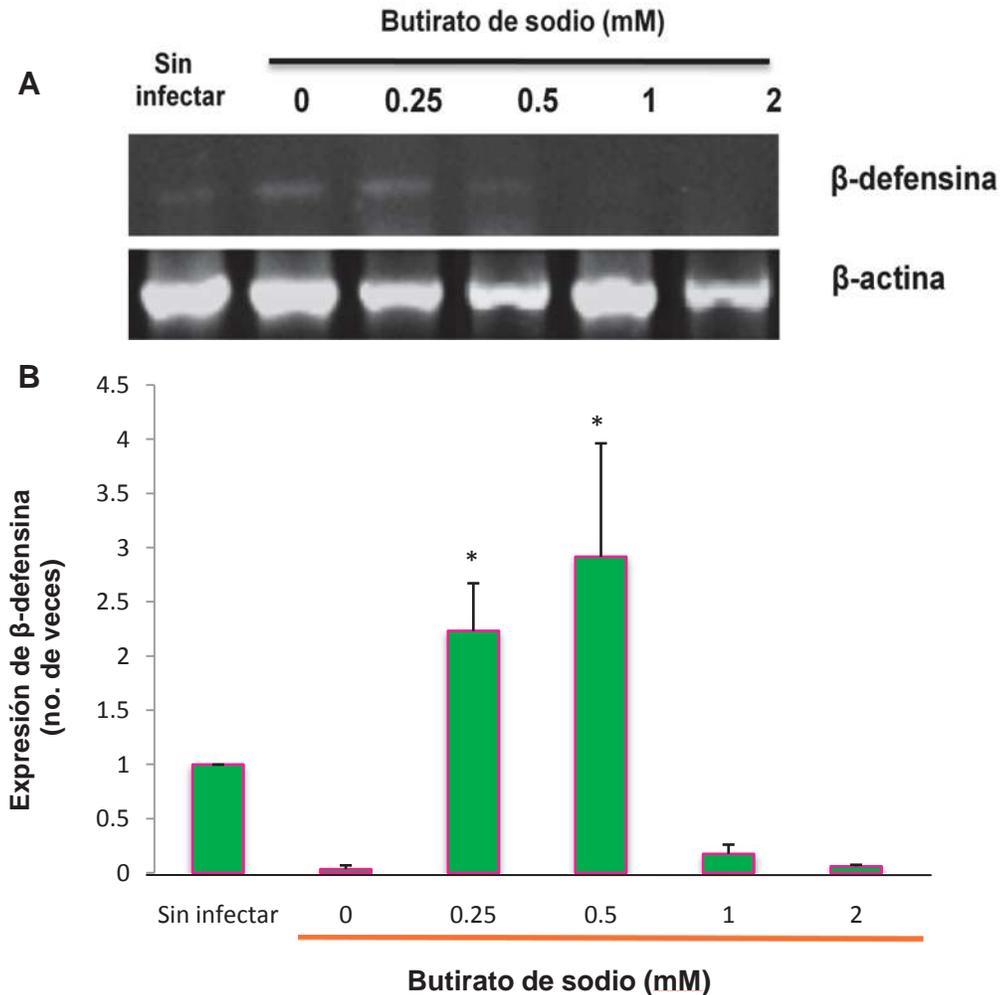
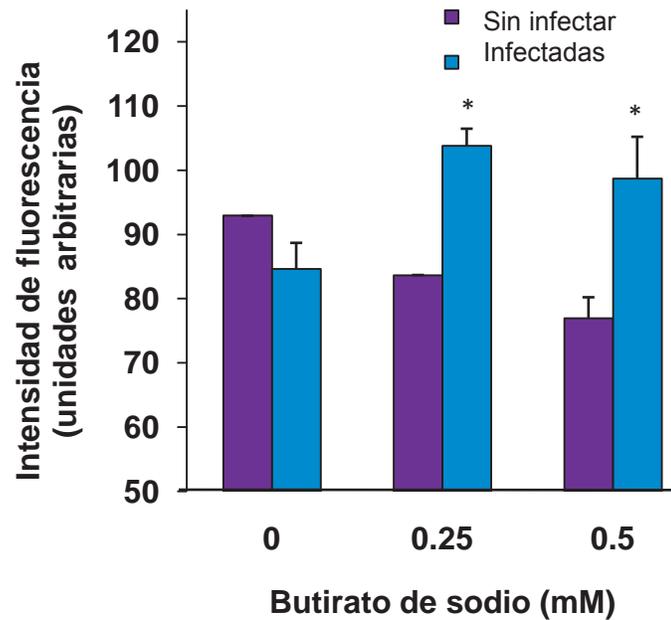


FIGURA 10. EXPRESIÓN DEL ARNm DE β - DEFENSINA EN LAS CEMB TRATADAS CON BUTIRATO DE SODIO. Las CEMB fueron tratadas con butirato de sodio (0.25 – 2 mM) por 24 h y posteriormente infectadas con *S. aureus*. Se utilizó como control las células no infectadas y sin butirato de sodio. A) Electroforesis en geles de agarosa al 2% representativa de los productos de RT-PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para β -defensina y β -actina. B) Análisis densitométrico de la expresión de β - defensina con respecto a la expresión de β -actina. Los datos de la gráfica son resultado del promedio de 3 experimentos independientes. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato de sodio.

Identificación de histonas acetiladas

Por último, se realizó un ensayo inmunocitoquímico para evaluar el efecto del butirato de sodio sobre la acetilación de histonas en las CEMB. Se utilizaron células de epitelio mamario bovino sin infectar e infectadas con *S. aureus*, éstas fueron tratadas con las diferentes concentraciones de butirato de sodio (0.25 -4 mM). Es importante señalar que en experimentos anteriores se observó que en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de butirato de sodio se observan los efectos significativos, por lo que para este experimento solo se muestran los resultados de éstas concentraciones y las posteriores fueron descartadas. En la figura 11(A), se muestran los resultados obtenidos, donde se puede observar que en las células tratadas con butirato de sodio en concentraciones de 0.25 y 0.5 mM e infectadas con *S.aureus* se induce ~20 veces la acetilación de histonas H3 respecto a las células que no recibieron tratamiento con butirato de sodio. Las CEMB que fueron únicamente tratadas con butirato de sodio no muestran un incremento en la acetilación de histonas (Figura 11B).

A



B

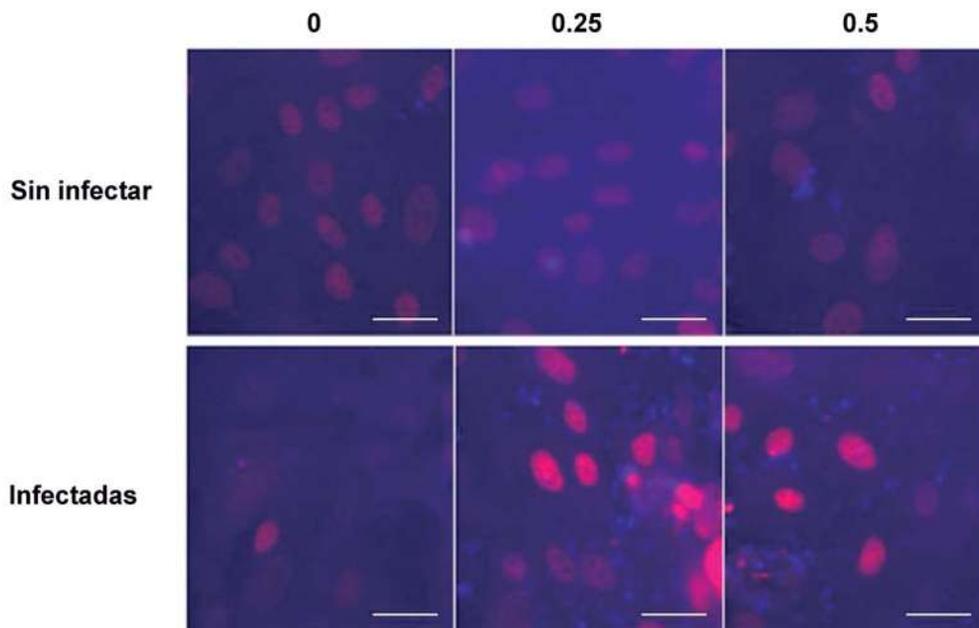


FIGURA 11. ACETILACIÓN DE HISTONAS EN LAS CEMB INDUCIDA POR BUTIRATO DE SODIO Y LA INFECCIÓN. Se utilizaron CEMB infectadas y no infectadas, tratadas previamente con butirato de sodio (0.25 – 4 mM). A) Se estimó la acetilación de las histonas cuantificando la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias), se contaron 30 campos al azar con un objetivo de 40X. Los resultados mostrados son producto de 3 experimentos independientes. “*” indica cambios significativos $P \leq 0.01$ con respecto al tratamiento sin butirato de sodio. B) Fotografías representativas donde se muestra la acetilación de las histonas. La barra corresponde a 20 μm .

VIII. DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria que puede ser causada por diversos cambios metabólicos o por la infección por bacterias patógenas. *S. aureus* es el patógeno que se aísla con mayor frecuencia y es capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células del epitelio mamario siendo esta una de las causas por lo que muestra baja respuesta a la terapia antimicrobiana convencional (Kerro *et al*, 2002; Buzzola *et al*, 2007). Por otro lado, los AGCC son componentes de la grasa de la leche de los bovinos, y son también conocidos por tener varios efectos fisiológicos y fisiopatológicos (Li and Li, 2006). El butirato está presente únicamente en la leche de bovinos, y además de tener propiedades nutrimentales, también se le ha asociado con funciones celulares como la proliferación y diferenciación celular, la motilidad, la apoptosis, el arresto del ciclo celular, además de la prevención del cáncer mediante la inhibición de la proliferación de células cancerígenas y la modulación de la respuesta inmune (Hague *et al*, 1995; Luhrs *et al*, 2002). Teniendo como base lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del butirato de sodio durante la invasión de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas y se analizó la expresión de genes de la respuesta inmune innata.

Para los experimentos se utilizaron cultivos primarios de CEMB y una cepa de *S. aureus* aislada de un caso de mastitis clínica. Se hicieron experimentos para evaluar el efecto del butirato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB y *S. aureus* y los resultados demostraron que las concentraciones utilizadas de butirato de sodio (0-4 mM) no afectaron la viabilidad de las células ni la proliferación de las bacterias (Fig. 3 y 4). Aunque se ha reportado el efecto antimicrobiano de los AGCC sobre bacterias patógenas (ej. *Salmonella*), en el presente estudio no se observó este efecto sobre *S. aureus*, esto puede ser debido a que en los estudios realizados por Van *et al* (2006) utilizaron AGCC en concentraciones que van de 25-100 mM, además se reportan los efectos antimicrobianos como específicos de especies de bacterias entéricas.

Para el establecimiento de la infección en la glándula mamaria uno de los mecanismos de patogénesis más importante es la invasión de la bacteria en la célula epitelial (Kerro *et al*, 2002). El butirato está presente únicamente en la leche de los bovinos y por lo tanto está en contacto con las células epiteliales mamarias bovinas, ante esto, podemos suponer que el butirato de sodio podría estar modulando la invasión de *S. aureus* en las CEMB. Para probar esto, se hicieron ensayos de infección con CEMB y se infectaron con *S. aureus* aislado de un caso de mastitis clínica. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con butirato de sodio en concentraciones de 0.25 -1 mM disminuyeron hasta un 50% la invasión (Fig. 5), no así en las concentraciones más elevadas de butirato de sodio. Aunque estos son los primeros reportes del efecto del butirato de sodio en la invasión de *S. aureus* en CEMB, los resultados coinciden con reportes similares donde el butirato de sodio evita la invasión de *C. jejuni* en células Caco-2 (Van *et al*, 2008); además de que en ambos casos se presenta el efecto de forma dependiente de la concentración, lo cual sugiere la presencia de un receptor específico.

En la respuesta inflamatoria hay una liberación endógena de citocinas proinflamatorias que a su vez producen grandes concentraciones de NO que son citotóxicas y citostáticas para las células epiteliales (Bruckdorfer, 2005). Las células epiteliales mamarias bovinas que atraviesan un proceso inflamatorio son capaces de producir NO (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008). Para evaluar el efecto del butirato de sodio en estos eventos, se hicieron una serie de experimentos para cuantificar el NO producido por las células tratadas con butirato de sodio antes y después de la infección. Los resultados mostraron que el butirato de sodio induce la producción de NO, pero posterior a la infección el NO se eleva hasta ~20 veces en las concentraciones de 0.25 – 1 mM, respecto al control utilizado sin butirato de sodio; este incremento de la producción de NO se correlaciona directamente con la disminución de la invasión de *S. aureus* en CEMB por lo que podría estar regulando este proceso. Estos resultados coinciden con trabajos similares reportados en líneas celulares de ratón donde la infección también con *S. aureus*

aumentó significativamente la producción de NO (Sasaki *et al*, 1998; Chan *et al*, 2001).

La enzima iNOS cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina y la biosíntesis de NO (Tenorio *et al*, 1995). En este trabajo se demostró que las CEMB son capaces de producir este radical con actividad antibacteriana durante un proceso inflamatorio. Tomando en cuenta estos antecedentes también se analizó la expresión del ARNm de iNOS en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*. Se observó que el butirato de sodio y la infección aumentan la expresión de este gen en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM con respecto al control (Fig. 8). Estos resultados, sugieren que el butirato de sodio está interviniendo en la expresión de este gen. En general la producción de NO y la expresión de iNOS coinciden en las concentraciones de 0.25 y 0.5 de butirato de sodio. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado anteriormente en células de la glándula mamaria estimuladas con la enterotoxina estafilocócica C, donde el butirato de sodio incrementa significativamente la expresión de iNOS y la producción NO mediada por TNF- α (Komine *et al*, 2004).

Otro de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la expresión de la citocina proinflamatorias TNF- α , esta citocina es secretada principalmente por los macrófagos, los cuales están presentes en la respuesta inflamatoria (Coussens and Werb, 2002). Investigaciones recientes muestran que el butirato de sodio participa regulando funciones de la respuesta inflamatoria en células epiteliales tanto gástricas como hepáticas (Luhrs *et al*, 2002) y en células de epitelio mamario bovino (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008). Los resultados obtenidos del análisis de la expresión del ARNm de TNF- α en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*, indican que bajo estas condiciones existe un incremento significativo (~3 veces) del ARNm en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de butirato de sodio; sin embargo, en las concentraciones más elevadas el efecto no resultó significativo.

Uno de los elementos importantes de la inmunidad innata es la producción de péptidos antimicrobianos. En este trabajo se realizó el análisis de la expresión de ARNm de péptidos antimicrobianos en las CEMB tratadas con butirato de sodio e infectadas con *S. aureus*. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) muestran que se induce su expresión por la infección en presencia de butirato de sodio en la concentración de 0.5 mM (Fig. 9). Estos resultados coinciden con Schaubert *et al* (2003, 2004, 2006) que reportan que los AGCC modulan la expresión del péptido antimicrobiano catelicidina LL-37 en células epiteliales de colon con un proceso inflamatorio; también coinciden con lo reportado por Kida *et al* (2006) donde demuestran que el butirato de sodio regula positivamente la expresión del gen de la catelicidina en células epiteliales de pulmón. Por otra parte, en la expresión de β -defensina en las CEMB, los resultados muestran una regulación positiva en las concentraciones de 0.25 y 0.5 mM de butirato de sodio. Por el contrario, en las células que no fueron tratadas con butirato de sodio lo que ocurrió fue una inhibición de la expresión del gen al igual que en concentraciones más elevadas de butirato de sodio (1 – 2 mM) (Fig. 10). Al finalizar la evaluación de la expresión de genes de la respuesta inmune innata y de acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, se evidenció que la infección en presencia de butirato de sodio (0.25 y 0.5 mM) induce significativamente la expresión de genes de respuesta inmune innata y esto se correlaciona directamente con los resultados del ensayo de infección donde se observó que el butirato de sodio, en estas mismas concentraciones, está disminuyendo la invasión de *S. aureus* en las CEMB.

La acetilación de histonas está relacionada con el aumento de la transcripción de los genes, esto parece que es debido a que al acetilarse las histonas el cromosoma sufre una alteración en su compactación lo cual facilita la transcripción (Kida *et al*, 2006). Con este antecedente se realizó un ensayo inmunocitoquímico donde se evaluó la participación del butirato de sodio en la acetilación de histonas. Los resultados observados (Fig.11) mostraron que en células epiteliales mamarias bovinas, el tratamiento únicamente con butirato de sodio no fue capaz de inducir la

acetilación de histonas, lo cual coincide con lo reportado anteriormente en una línea celular de riñón de bovino, donde se describe que el butirato de sodio en concentraciones menores a 5 mM no aumenta la acetilación de las histonas (Li and Li, 2006). Por el contrario, los resultados demuestran que el tratamiento con butirato de sodio y la infección con *S. aureus* aumentan significativamente la acetilación de las histonas H3 en CEMB, evento que a su vez puede estar ligado a la regulación positiva de la expresión de genes de respuesta inmune descritos en este trabajo.

IX. CONCLUSIÓN

El butirato de sodio disminuye la invasión de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas y regula positivamente la expresión de genes de la respuesta inmune.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J., & Oliver, S.P. 1996. Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J.Dairy Sci.*, 79, (6) 1021-1026
- Anaya-Lopez, J.L., Contreras-Guzman, O.E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., Lopez-Meza, J.E., Valdez-Alarcon, J.J., & Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res.Vet.Sci.*, 81, (3) 358-361
- Anderson, J.C. 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br. Vet.J.*, 132, (3) 229-245
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Hata, K., Araki, Y., Takaya, H., Shimada, M., & Bamba, T. 1999. Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin.Exp.Immunol.*, 118, (1) 23-29
- Andoh, A., Tsujikawa, T., & Fujiyama, Y. 2003. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr.Pharm.Des*, 9, (4) 347-358
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Hare, W.R., & Hope, J.C. 2004. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J.Dairy Sci.*, 87, (8) 2420-2432
- Bergman, E.N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.*, 70, (2) 567-590
- Binder, H.J. & Mehta, P. 1989. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology*, 96, (4) 989-996
- Boman, H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu.Rev.Immunol.*, 13, 61-92
- Brouillette, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B.G., & Malouin, F. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet.Microbiol.*, 101, (4) 253-262
- Bruckdorfer, R. 2005. The basics about nitric oxide. *Mol.Aspects Med.*, 26, (1-2) 3-31
- Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L., & Sordelli, D.O. 2007. Differential abilities of capsulated and
-
-

- noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect.Immun.*, 75, (2) 886-891
- Chan, E.D., Morris, K.R., Belisle, J.T., Hill, P., Remigio, L.K., Brennan, P.J., & Riches, D.W. 2001. Induction of inducible nitric oxide synthase-NO* by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by MEK1-ERK, MKK7-JNK, and NF-kappaB signaling pathways. *Infect.Immun.*, 69, (4) 2001-2010
- Comalada, M., Bailon, E., de, H.O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A., & Galvez, J. 2006. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 132, (8) 487-497
- Cook, H.W., Ridgway, N.D., & Byers, D.M. 1998. Involvement of phospholipase D and protein kinase C in phorbol ester and fatty acid stimulated turnover of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in neural cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1390, (1) 103-117
- Coussens, L.M. & Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, (6917) 860-867
- Cummings, J.H., Hill, M.J., Bone, E.S., Branch, W.J., & Jenkins, D.J. 1979. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am.J.Clin.Nutr.*, 32, (10) 2094-2101
- Cummings, J.H. & Macfarlane, G.T. 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, 21, (6) 357-365
- Depardieu, F., Perichon, B., & Courvalin, P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 42, (12) 5857-5860
- Dukes, H.H. 1961. Veterinary physiology: past, present, and future. *Cornell Vet.*, 51, 546-556
- Evans, E.W. & Harmon, B.G. 1995. A review of antimicrobial peptides: defensins and related cationic peptides. *Vet.Clin.Pathol.*, 24, (4) 109-116
- Gibson, P.R., Rosella, O., Rosella, G., & Young, G.P. 1994. Butyrate is a potent inhibitor of urokinase secretion by normal colonic epithelium in vitro. *Gastroenterology*, 107, (2) 410-419
- Gutierrez-Barroso, A., Anaya-Lopez, J.L., Lara-Zarate, L., Loeza-Lara, P.D., Lopez-Meza, J.E., & 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, (1-2) 113-122
- Hague, A., Elder, D.J., Hicks, D.J., & Paraskeva, C. 1995. Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int.J.Cancer*, 60, (3) 400-406
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O., & Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet.Q.*, 29, (1) 18-31
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., & Brummer, R.J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, 27, (2) 104-119
- Hancock, R.E. & Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, 8, (9) 402-410
- Hancock, R.E. & Scott, M.G. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, (16) 8856-8861
- Hubel, K.A. & Russ, L. 1993. Mechanisms of the secretory response to luminal propionate in rat descending colon in vitro. *J.Auton.Nerv.Syst.*, 43, (3) 219-229
- Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.*, 20, 197-216
- Jasper, D.E. 1982. The role of *Mycoplasma* in bovine mastitis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 181, (2) 158-162
- Jobin, C. & Sartor, R.B. 2000. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 278, (3) C451-C462
- Karaki, S., Tazoe, H., Hayashi, H., Kashiwabara, H., Tooyama, K., Suzuki, Y., & Kuwahara, A. 2008. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J.Mol.Histol.*, 39, (2) 135-142
- Kerro, D.O., van Dijk, J.E., & 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, (4) 181-198
- Kida, Y., Shimizu, T., & Kuwano, K. 2006. Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. *Mol.Immunol.*, 43, (12) 1972-1981

-
- Komine, K., Kuroishi, T., Komine, Y., Watanabe, K., Kobayashi, J., Yamaguchi, T., Kamata, S., & Kumagai, K. 2004. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 11, (1) 203-210
- Kripke, S.A., Fox, A.D., Berman, J.M., Settle, R.G., & Rombeau, J.L. 1989. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, 13, (2) 109-116
- Le, P.E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., Lannoy, V., Decobecq, M.E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van, D.J., Parmentier, M., & Detheux, M. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J.Biol.Chem.*, 278, (28) 25481-25489
- Li, C.J. & Elsasser, T.H. 2005. Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: involvement of caspase and proteasome pathways. *J.Anim Sci.*, 83, (1) 89-97
- Li, R.W. & Li, C. 2006. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC.Genomics*, 7, 234
- Lowy, F.D. 1998. Staphylococcus aureus infections. *N.Engl.J.Med.*, 339, (8) 520-532
- Luhrs, H., Gerke, T., Muller, J.G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberge, F., Scheppach, W., & Menzel, T. 2002. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand.J.Gastroenterol.*, 37, (4) 458-466
- Menzel, T., Luhrs, H., Zirlik, S., Schaubert, J., Kudlich, T., Gerke, T., Gostner, A., Neumann, M., Melcher, R., & Scheppach, W. 2004. Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. *Inflamm.Bowel.Dis.*, 10, (2) 122-128
- Mortensen, F.V., Jorgensen, B., Christiansen, H.M., Sloth-Nielsen, J., Wolff, B., & Hessel, I. 2000. Short-chain fatty acid enemas stimulate plasminogen activator inhibitor-1 after abdominal aortic graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled study. *Thromb.Res.*, 98, (5) 361-366
- Nakao, S., Moriya, Y., Furuyama, S., Niederman, R., & Sugiya, H. 1998. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell Biol.Int.*, 22, (5) 331-337
-

-
- Nancey, S., Moussata, D., Graber, I., Claudel, S., Saurin, J.C., & Flourie, B. 2005. Tumor necrosis factor alpha reduces butyrate oxidation in vitro in human colonic mucosa: a link from inflammatory process to mucosal damage? *Inflamm.Bowel.Dis.*, 11, (6) 559-566
- Niederman, R., Zhang, J., & Kashket, S. 1997. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, 8, (3) 269-290
- Nissen-Meyer, J. & Nes, I.F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch.Microbiol.*, 167, (2/3) 67-77
- Ogawa, H., Rafiee, P., Fisher, P.J., Johnson, N.A., Otterson, M.F., & Binion, D.G. 2003. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 309, (3) 512-519
- Oren, Z. & Shai, Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47, (6) 451-463
- Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J.G., Valdez-Alarcon, J.J., Bravo-Patino, A., Carabez-Trejo, A., Cajero-Juarez, M., & Baizabal-Aguirre, V.M. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF-kappaB and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *Scand.J.Immunol.*, 67, (2) 169-176
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J.J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J.E., Bravo-Patino, A., & Baizabal-Aguirre, V.M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J.Infect.*, 54, (4) 399-409
- Parodi, P.W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J.Nutr.*, 127, (6) 1055-1060
- 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, (3) 394-406
- Rainard, P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet.Res.*, 34, (5) 647-670
- Rainard, P. & Riollet, C. 2003. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod.Nutr.Dev.*, 43, (5) 439-457
-

-
- Rao, A.G. 1995. Antimicrobial peptides. *Mol.Plant Microbe Interact.*, 8, (1) 6-13
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagace, J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 39, (7) 2584-2589
- Rioja, I., Terencio, M.C., Ubeda, A., Riguera, R., Quintela, J.M., & Alcaraz, M.J. 2002. A new ditriazine inhibitor of NF-kappaB modulates chronic inflammation and angiogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 365, (5) 357-364
- Rose, D., Brunner, J.R., Kalan, E.B., Larson, B.L., Melnychyn, P., Swaisgood, H.E., & Waugh, D.F. 1970. Nomenclature of the proteins of cow's milk: third revision. *J.Dairy Sci.*, 53, (1) 1-17
- Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J.L., & Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J.Dairy Sci.*, 85, (1) 132-138
- Sakata, T. 1987. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br.J.Nutr.*, 58, (1) 95-103
- Sasaki, S., Miura, T., Nishikawa, S., Yamada, K., Hirasue, M., & Nakane, A. 1998. Protective role of nitric oxide in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect.Immun.*, 66, (3) 1017-1022
- Schauber, J., Rieger, D., Weiler, F., Wehkamp, J., Eck, M., Fellermann, K., Scheppach, W., Gallo, R.L., & Stange, E.F. 2006. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.*, 18, (6) 615-621
- Schauber, J., Iffland, K., Frisch, S., Kudlich, T., Schmausser, B., Eck, M., Menzel, T., Gostner, A., Luhrs, H., & Scheppach, W. 2004. Histone-deacetylase inhibitors induce the cathelicidin LL-37 in gastrointestinal cells. *Mol.Immunol.*, 41, (9) 847-854
- Schauber, J., Svanholm, C., Termen, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Luhrs, H., & Gudmundsson, G.H. 2003. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*, 52, (5) 735-741
-

-
- Schlenstedt, R., Zschock, M., Kloppert, B., & Wolter, W. 1997. [Occurrence of *Prototheca mastitis* in dairy farms in Hesse]. *Tierarztl.Prax.Ausg.G.Grosstiere.Nutztiere.*, 25, (5) 407-412
- Sears, P.M. & McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.*, 19, (1) 171-85, vii
- Segain, J.P., Raingeard, d.I.B., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M., & Galmiche, J.P. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47, (3) 397-403
- Sordillo, L.M. & Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, 7, (2) 135-146
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & 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) 2826-2832
- Tenorio, F., Giraldi-Guimaraes, A., & Mendez-Otero, R. 1995. Developmental changes of nitric oxide synthase in the rat superior colliculus. *J.Neurosci.Res.*, 42, (5) 633-637
- Topping, D.L. & Clifton, P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.*, 81, (3) 1031-1064
- Van, D.K., Pasmans, F., Van, I.F., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. 2008. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *Br.J.Nutr.*, 100, (3) 480-484
- Van, I.F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., & Ducatelle, R. 2006a. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.*, 35, (3) 182-188
- Weber, T.E. & Kerr, B.J. 2006. Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 113, (1-2) 139-147
- Yajima, T. 1985. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *J.Physiol*, 368, 667-678
-

Yajima, T. 1988. Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. *J.Physiol*, 403, 559-575

Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W., & Oppenheim, J.J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.*, 23, (6) 291-296

Zecconi, A., Binda, E., Borromeo, V., & Piccinini, R. 2005. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. *J.Dairy Res.*, 72, (2) 203-208

Ziebuhr, W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol.*, 8:102-107