



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

*Efecto de los ácidos grasos de cadena corta sobre la  
invasión de Staphylococcus aureus en células  
epiteliales mamarias bovinas*

Tesis que presenta:

**QFB. PATRICIA NAYELI ALVA MURILLO**

Para obtener el grado de:

*Maestro en Ciencias Biológicas*

Área temática: *Biotecnología Pecuaria*

Asesor: *Dr. Joel Edmundo López Meza*

Co-asesora: *Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa*

*Morelia, Michoacán*

*Agosto del 2011*

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. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.5), FOMIX (MICH-2009-C05-115910) y CONACyT (CB-2008-101451 y beca 226627).

*“Invertir en conocimientos produce siempre los mejores  
intereses”*

Benjamín Franklin

## *AGRADECIMIENTOS*

Agradezco infinitamente a mis padres, Perla y Francisco, por haberme dado las herramientas necesarias para lograr mis metas, por darme el don de la vida y por enseñarme a vivirla, por no ponerme límites y por enseñarme que puedo lograr todo lo que me propongo y por apoyarme durante el tiempo que duro este proyecto, se sacaron un diez. ¡Gracias de corazón!

A mi hermano, Alberto, por ser mi compañero desde el inicio de mi viaje en esta vida, por esos momentos de humor negro y ácido que solo nosotros dos entendemos... ¡a pesar de todo y de todos seguimos juntos campeón!

A toditita mi familia (abuelos, tíos, primos, sobrinos y anexos) por estar presentes y atentos a todo lo que hago, por darme ánimo y apoyarme siempre, por entender esos momentos en los que no pude estar con ustedes disfrutando de las reuniones. Saben que donde quiera que esté los llevo en mí.

Agradezco de manera especial al Dr. Joel E. López Meza y a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, quienes creyeron en mí desde el principio y me han tenido paciencia a lo largo de este ciclo. Gracias por lo que me han enseñado académica y profesionalmente, pero sobre todo mil gracias por la amistad y el apoyo que me han brindado. Espero seguir recolectando muchos logros.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Carlos Cervantes Vega, Dr. Horacio Cano Camacho y al Dr. Pedro D. Loeza Lara, por las sugerencias y aportes que hicieron a lo largo del proyecto, sin ustedes no hubiera sido posible culminarlo. ¡Gracias!

A mis compañeros y amigos de la maestría, comenzamos juntos esta travesía y estamos terminándola. Gracias por todos esos momentos de estudio, de fiesta, de baile, de risas, de llantos, de nervios, de retro-alimentación... Agradezco el haberlos encontrado en este camino.

A aquellos que cuando creía que no podía encontrar más amigos, descubrí que existen y me dieron la oportunidad de compartir con ellos momentos inigualables,

Ana, Ulises y Andrei. Gracias por esas cenas y almuerzos inigualables, por el café de las mañanas, por esas risas durante la comida, por el sarcasmo en su máximo esplendor. Espero compartir más éxitos con ustedes. ¡Bazinga!

A mis amigos de toda la vida, Anaid, Issra, Edith, Flays y Zaida, se que los descuide mucho y que a pesar de eso siguen a mi lado. No tengo palabras para agradecerles y retribuirles todo lo que me han dado.

A todos aquellos que están o que han estado en mi vida, gracias por la enseñanza y las experiencias vividas.

Gracias a la vida por darme las oportunidades para crecer, yo me seguiré encargando de aprovecharlas al máximo.

*Nayelí Alva*

# ÍNDICE

	Página
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	3
<b>2.1 Mastitis bovina</b>	3
2.1.1 Etiología de la mastitis bovina	4
2.1.2 Mecanismo de invasión de <i>Staphylococcus aureus</i> en las células de epitelio mamario bovino	6
<b>2.2 Inmunidad de la glándula mamaria</b>	10
<b>2.3 Ácidos grasos (AG)</b>	14
2.3.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la leche de bovinos	15
2.3.2 Propiedades antimicrobianas de los AGCC	18
2.3.3 Propiedades fisiológicas de los AGCC	20
2.3.4 AGCC: agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores	22
2.3.5 Mecanismo de acción de los AGCC: receptores acoplados a proteínas G (GPR)	24
<b>3. ANTECEDENTES</b>	26
<b>4. HIPÓTESIS</b>	29
<b>5. OBJETIVOS</b>	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos específicos	30
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
6.1 Reactivos y cepas	31
6.2 Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino	31
6.3 Efecto de los AGCC sobre el crecimiento de S.	31

<i>aureus</i> ATCC 27543	
6.4 Efecto de los AGCC sobre la viabilidad de las CEMB	32
6.5 Efecto de los AGCC en la invasión de <i>S. aureus</i> ATCC 27543 sobre las CEMB	32
6.6 Efecto de los AGCC sobre la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB	33
6.7 Extracción de ARN total y análisis de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana	33
6.8 Cuantificación del TNF- $\alpha$ por ELISA	34
6.9 Análisis estadístico	35
<b>7. RESULTADOS</b>	36
7.1 Efecto de los AGCC sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> y sobre la viabilidad de las CEMB	36
7.2 Efecto de los AGCC sobre la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB	40
7.3 Producción de NO	42
7.4 Efecto de los AGCC sobre la expresión del ARNm del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y de la $\beta$ -defensina de neutrófilos bovinos 5 (BNBD5)	45
7.5 Efecto de los AGCC sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ y sobre la expresión de la proteína	50
<b>8. DISCUSIÓN</b>	55
<b>9. CONCLUSIONES</b>	65
<b>10. REFERENCIAS</b>	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Establecimiento de la mastitis bovina por <i>S. aureus</i> .	7
Figura 2. Estructura de <i>Staphylococcus aureus</i> .	9
Figura 3. Mecanismo propuesto para la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB.	11
Figura 4. Efectos del butirato en humanos y animales.	22
Figura 5. Crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 27543 en presencia de propionato.	36
Figura 6. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en presencia de hexanoato.	37
Figura 7. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en presencia de octanoato.	38
Figura 8. Efecto del propionato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.	38
Figura 9. Efecto del hexanoato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.	39
Figura 10. Efecto del octanoato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.	40
Figura 11. El propionato y el hexanoato de sodio disminuyen la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB.	41
Figura 12. El octanoato de sodio modula la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB.	42
Figura 13. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de propionato de sodio.	43
Figura 14. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de hexanoato de sodio.	44
Figura 15. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de octanoato de sodio.	44
Figura 16. El propionato de sodio modula la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.	46
	48



Figura 17. Efecto del hexanoato de sodio sobre la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.	
Figura 18. El octanoato de sodio modula la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.	49
Figura 19. El propionato de sodio modula la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ y la secreción de la proteína en las CEMB.	51
Figura 20. Efecto del hexanoato de sodio sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ y en la liberación de la proteína en las CEMB.	53
Figura 21. Efecto del octanoato de sodio sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ y en la liberación de la proteína en las CEMB.	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias en los microorganismos patógenos contagiosos y ambientales que producen mastitis bovina.	4
Tabla 2. Defensas solubles de la glándula mamaria.	12
Tabla 3. Composición de los ácidos grasos de la leche bovina.	17
Tabla 4. Oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo.	35

## RESUMEN

La mastitis (inflamación de la glándula mamaria) bovina es causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, bacteria facultativa intracelular, que le permite evadir el sistema inmune del hospedero. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) poseen propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras. Se ha demostrado que en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) el butirato de sodio reduce la invasión (~50%) de *S. aureus* y modula la expresión de genes de la respuesta inmune innata. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del propionato, hexanoato y octanoato de sodio en la invasión de CEMB por *S. aureus* y en la regulación de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana. Las sales de los AGCC (0.25-10 mM) no afectaron el crecimiento bacteriano (2 h). El hexanoato no afectó la viabilidad de las CEMB, mientras que el propionato la disminuyó ligeramente a las 24 h; sin embargo, el octanoato ( $\geq 5$  mM) la disminuyó a las 24 h, siendo esto más evidente a las 48 h. Los ensayos de invasión de *S. aureus* en las CEMB mostraron que el propionato y hexanoato redujeron la invasión en un 27-55 % y 39-65 %, respectivamente. El octanoato indujo la invasión a 0.0625-0.5 mM; sin embargo, a 0.75-3 mM la inhibió. No hubo relación entre la producción de óxido nítrico y la invasión bacteriana. El análisis de la expresión de genes mostró que el propionato y el octanoato, en conjunto con la infección, estimularon la expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y disminuyeron la de BNBD5 ( $\beta$ -defensina). El hexanoato inhibió la expresión de ambos genes durante la infección. Los tres AGCC inhibieron la expresión del ARNm del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). El propionato indujo la liberación de la proteína del TNF- $\alpha$  al medio condicionado de las CEMB. En conclusión, los AGCC disminuyeron la invasión de *S. aureus* en las CEMB. El propionato y el octanoato regulan positivamente la expresión de TAP, lo cual puede relacionarse con la disminución en la invasión bacteriana. Los tres AGCC inhibieron, a nivel transcripcional, la expresión del TNF- $\alpha$ . Estos resultados sugieren que los AGCC pueden actuar como moduladores efectivos de la expresión de genes de la inmunidad innata de la glándula mamaria, lo que lleva a una mejor defensa contra la infección bacteriana.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial caracterizada por la inflamación de la glándula mamaria con daños localizados o generalizados, presentando manifestaciones clínicas y subclínicas dependiendo de la magnitud de éstos (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Esta es una enfermedad principalmente de etiología infecciosa de gran relevancia dentro de la ganadería lechera a nivel mundial, ya que provoca grandes pérdidas económicas debido a una disminución en la calidad y la cantidad de la leche producida, además del incremento de los costos por los tratamientos, los servicios veterinarios e incluso, por el desecho temprano de los animales (Brouillette *et al.*, 2003; Halasa *et al.*, 2007).

La mastitis bovina tiene primordialmente un origen bacteriano, siendo la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* uno de los principales agentes patógenos contagiosos causantes de la mastitis (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Las infecciones generadas por este microorganismo se caracterizan por ser crónicas (de larga duración) (Lahouassa *et al.*, 2007). Esto se ve favorecido ya que *S. aureus* tiene la capacidad de colonizar e invadir las células de la glándula mamaria (células epiteliales), lo que facilita su diseminación y permanencia en dicho tejido, permitiéndole evadir los sistemas de defensa del hospedero (inmunidad innata), ocasionando una disminución en la eficiencia de los tratamientos antibacterianos (Almeida *et al.*, 2007; Buzzola *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son productos derivados de la fermentación bacteriana de la fibra dietética en el rumen de los bovinos y en el colon de los humanos. Los AGCC son la principal fuente de energía para los rumiantes, ya que aportan aproximadamente el 70 % de ésta; adicionalmente, algunos de éstos están presentes en la leche bovina (butirato, hexanoato y octanoato) (Bergman, 1990; Parodi, 2004). Por otro lado, se ha descrito que los AGCC, además de sus propiedades nutricionales, participan en otros eventos como la diferenciación y la proliferación celular, la motilidad y la apoptosis (Li y Elsasser, 2005; Al-Lahham *et al.*, 2010; Meijer *et al.*, 2010). Incluso, recientemente se les ha reconocido como agentes con propiedades antimicrobianas,

antiinflamatorias y como moduladores de la inmunidad (German y Dillard, 2006; Tedelind *et al.*, 2007; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Estos estudios se han llevado a cabo principalmente con el ácido butírico (butirato) y poco se conoce sobre el efecto de otros AGCC en estos procesos (ej. propionato, hexanoato y octanoato).

Respecto a la participación de los AGCC en procesos de interacción patógeno-hospedero, se ha determinado su participación en la invasión de patógenos en células epiteliales. Van Immerseel *et al.* (2003) demostraron que en células de epitelio intestinal de pollos los ácidos propiónico (C3) o butírico (C4) disminuyen la invasión de *Salmonella enteritidis*. Asimismo, el tratamiento previo de las bacterias con ácido butírico reduce su invasión en las células de epitelio del ciego de pollos, mientras que el pretratamiento con ácido acético (C2) aumentó su virulencia y su capacidad de invasión (Van Immerseel *et al.*, 2004a). De manera similar, el pretratamiento de *Salmonella* con bajas concentraciones de ácidos caproico (C6), caprílico (C8) y caprico (C10) disminuye su invasión en la línea celular de epitelio intestinal T84 (Van Immerseel *et al.*, 2004b). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el butirato de sodio (0.25 – 0.5 mM) reduce hasta en un 50 % la internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino (CEMB), e induce la expresión del ARNm del péptido antimicrobiano traqueal (TAP), de la  $\beta$ -defensina y de la óxido nítrico sintasa inducible de (iNOS), e induce la producción del óxido nítrico (NO) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

Sabiendo que la mastitis bovina es una patología de la glándula mamaria que involucra un proceso inflamatorio e infeccioso, y que los AGCC (algunos presentes en la leche) tienen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, en este trabajo se evaluó el efecto del propionato, hexanoato y octanoato sobre la invasión de *S. aureus* en las CEMB y la regulación de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana durante este proceso.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Mastitis bovina**

La mastitis bovina es una enfermedad compleja que se define como la inflamación de la glándula mamaria. Puede ser de naturaleza infecciosa, traumática o tóxica (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Se considera como una enfermedad compleja y es producto de la interacción de varios factores, los cuales incluyen al animal, al medio ambiente y a los microorganismos, donde el hombre juega un papel decisivo (Armenteros *et al.*, 2002).

Esta enfermedad tiene alta prevalencia en el ganado lechero bovino y es una de las más importantes a nivel mundial, debido al daño que ocasiona al animal, además de que altera tanto el valor nutricional de la leche como el sanitario, influyendo también en la calidad de los derivados lácteos (Armenteros *et al.*, 2002). El daño que ocurre en el tejido mamario reduce el número y la actividad de las células epiteliales y contribuye, consecuentemente, a la disminución de la producción lechera. Aunque se utiliza terapia antimicrobiana para tratar la infección, aquélla no protege directamente a la glándula mamaria del daño causado (Zhao y Laccasse, 2008).

Dependiendo de lo extenso de los daños, la mastitis se puede manifestar de forma clínica o subclínica. La mastitis clínica se define como una infección de la glándula mamaria que puede ser detectada a simple vista y 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; por otra parte, la mastitis subclínica es una infección de la ubre donde no se observan cambios externos; no obstante, la infección puede ser detectada por un aumento en el conteo de células somáticas en la leche (Schrick *et al.*, 2001).

#### **2.1.1 Etiología de la mastitis bovina**

La inflamación de la glándula mamaria causada por patógenos es muy común durante el periodo de lactancia. Existen cerca de 200 microorganismos que

pueden generar esta enfermedad, entre ellos se incluyen hongos (ej. *Candida albicans*), algas (ej. *Prototheca*) y bacterias, siendo estas últimas las principales causantes de esta patología. Estos patógenos se han clasificado en contagiosos (aquellos que tienen como hábitat el animal) y ambientales (aquellos presentes en el medio ambiente del animal) (Tabla 1). Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp; mientras que dentro de los patógenos ambientales se encuentran algunos bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli* y *Klebsiella* spp), además de Gram-positivos como *Strept. dysgalactiae*, *Strept. uberis*, y *Enterococcus* spp. (Kerro-Dego et al., 2002; Blowey y Edmondson, 2009).

**Tabla 1. Principales diferencias en los microorganismos patógenos contagiosos y ambientales que producen mastitis bovina\***

	Contagiosos	Ambientales
Fuentes de infección	Ubre y pezón	Hábitat contaminado
Transferencia de la infección a la ubre	Durante ordeño	Entre ordeños y durante el periodo seco
Tipo de mastitis	La mayoría de los casos son subclínicos	Hay más proporción de casos clínicos ( <i>Strept. uberis</i> puede ser subclínico)
Estrategia de control	Limpieza y sellado post-ordeño	Higiene del ambiente
	Periodo seco	Limpieza pre-ordeño
	Higiene durante el ordeño	Sellador del pezón en el periodo seco
	Sacrificio del animal	

\*La distinción entre los dos grupos no siempre es precisa (Tabla modificada de Blowey y Edmondson, 2009).

Aunque todos los organismos antes mencionados pueden provocar mastitis bovina, la mayoría de los casos de esta enfermedad son causados por bacterias, destacando por su prevalencia *S. aureus* y *E. coli*. Se ha reportado una correlación entre el tipo de mastitis y el patógeno prevalente; para el caso de la mastitis aguda, el principal patógeno asociado es *E. coli*, mientras que la infección provocada por *S. aureus*, generalmente comienza con una fase aguda y luego se convierte en crónica y subclínica.

Las infecciones persistentes por *S. aureus* se asocian con un daño en la respuesta inmune, mediado por factores, ya sea del hospedero o de la bacteria, dando como resultado un reclutamiento tardío de neutrófilos, lo que permite el establecimiento de *S. aureus* en la glándula mamaria (Lahouassa *et al.*, 2007). Incluso, existe la hipótesis de que la mayoría de las infecciones intramamarias bovinas son causadas por pocas clonas de *S. aureus* dentro de la misma granja, y además estas clonas tienen una amplia distribución geográfica. Esto surge a partir del estudio de Smith *et al.* (2005) donde analizaron 259 aislamientos de *S. aureus* de tres regiones geográficas (Chile, Gran Bretaña y Estados Unidos de América). Ellos detectaron que la mayoría de estos aislamientos (87.4%) están dentro de un complejo clonal y que son específicas del sitio donde se aislaron (leche, piel del pezón, etc.) (Smith *et al.*, 2005).

Por otro lado, estudios realizados en distintas regiones del mundo permiten establecer características particulares en cada región (incluso en una misma región), respecto a la prevalencia de los patógenos responsables de la mastitis bovina. Por ejemplo, en Inglaterra se demostró que en los últimos 40 años han disminuido los casos de mastitis provocada por *S. aureus*; sin embargo, en el mismo periodo se ha observado un incremento en los casos asociados a patógenos ambientales (*E. coli* y *Strept. uberis*) (Blowey y Edmondson, 2009). Asimismo, en este estudio se reporta que la incidencia de mastitis clínica se ha reducido considerablemente, de 121 casos por cada 100 vacas/año en 1968, a sólo 50 casos por cada 100 vacas/año en 1995 y 47 en 2007. Esta reducción se atribuye a los efectos de las medidas de control tomadas, tales como la



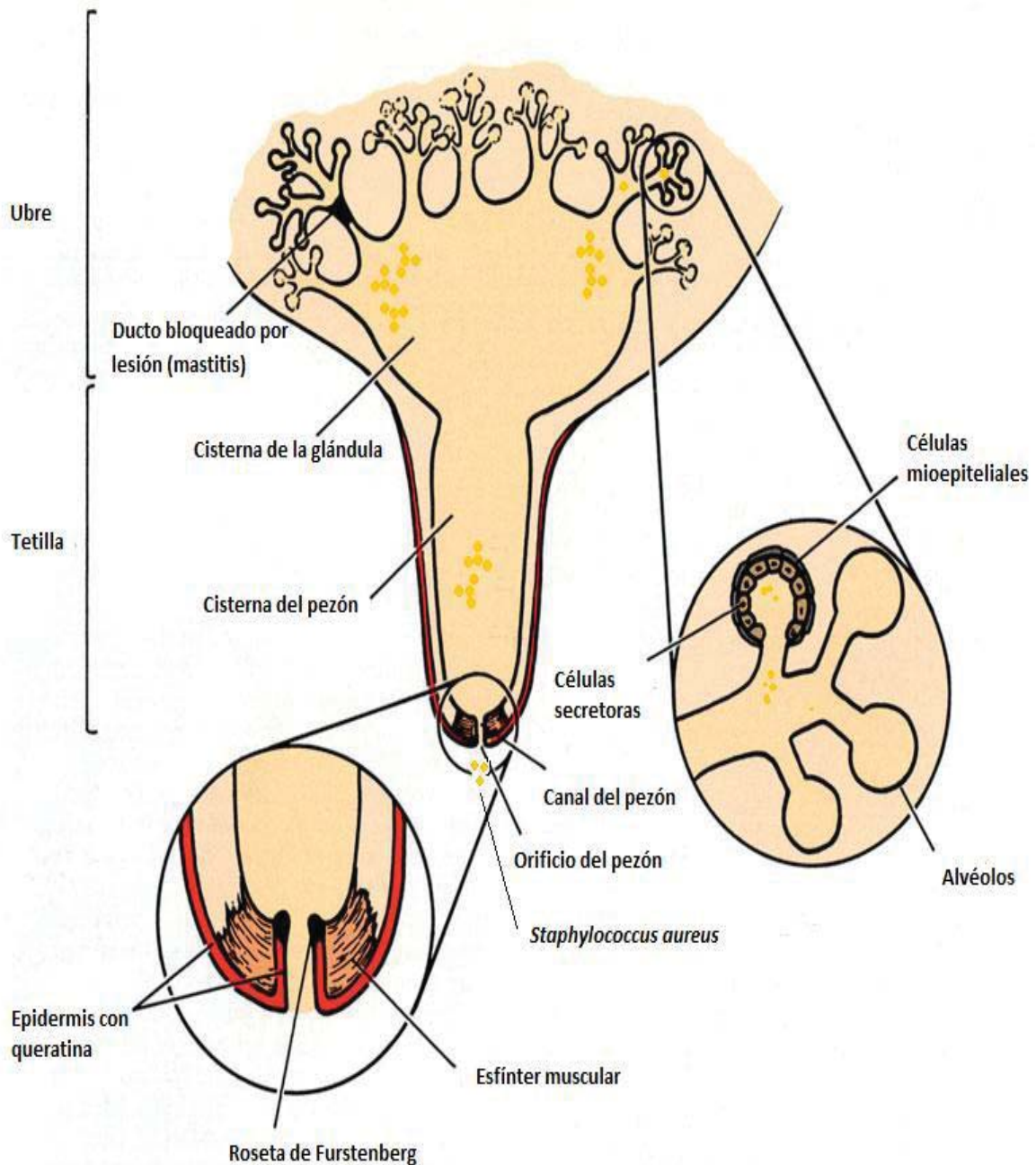
desinfección post-ordeño, la terapia del secado y el sacrificio selectivo de los animales.

### **2.1.2 Mecanismo de invasión de *Staphylococcus aureus* en las células de epitelio mamario bovino**

*S. aureus* es un patógeno contagioso que puede causar infecciones tanto en humanos como en animales (Brouillette *et al.*, 2003). En bovinos lecheros es el patógeno que, con mayor frecuencia, se aísla de casos de mastitis, llegando a representar un 70% de los mismos (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Esta bacteria pertenece a la familia Micrococcaceae, es un coco Gram positivo de ~0.8 micrómetros y se agrupa en racimos. Se distingue del resto de las especies de *Staphylococcus* porque da un resultado positivo a la prueba de coagulasa, fermenta el manitol, y presenta un pigmento amarillo-dorado en las colonias (Lowy, 1998; Kerro-Dego *et al.*, 2002).

En el caso de *S. aureus* responsable de mastitis bovina, el reservorio principal es la glándula mamaria. La infección comienza cuando el microorganismo penetra el canal del pezón, lo cual ocurre generalmente durante el ordeño. La bacteria presente en el orificio del pezón, puede ser impulsada dentro del canal del pezón cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño, atravesando la primera barrera de defensa constituida por la epidermis con queratina y lípidos (antibacterianos), la contracción del esfínter muscular y la roseta de Furstenberg (anillo de linfocitos) (Blowey y Edmondson, 2009). Un factor que favorece que *S. aureus* colonice la glándula mamaria es su capacidad para adherirse a las células epiteliales a través de receptores específicos; este microorganismo comienza la adhesión en la superficie epitelial, colonizando al pezón y multiplicándose dentro del mismo (Ziebuhr, 2001; Kerro-Dego *et al.*, 2002; Blowey y Edmondson, 2009). Si los microorganismos no son eliminados por el sistema inmune, las bacterias pueden continuar multiplicándose e invaden los ductos y áreas alveolares (Fig. 1). Las infecciones ocasionadas por *S. aureus* pueden causar un daño considerable al epitelio mamario, lo que provoca que la

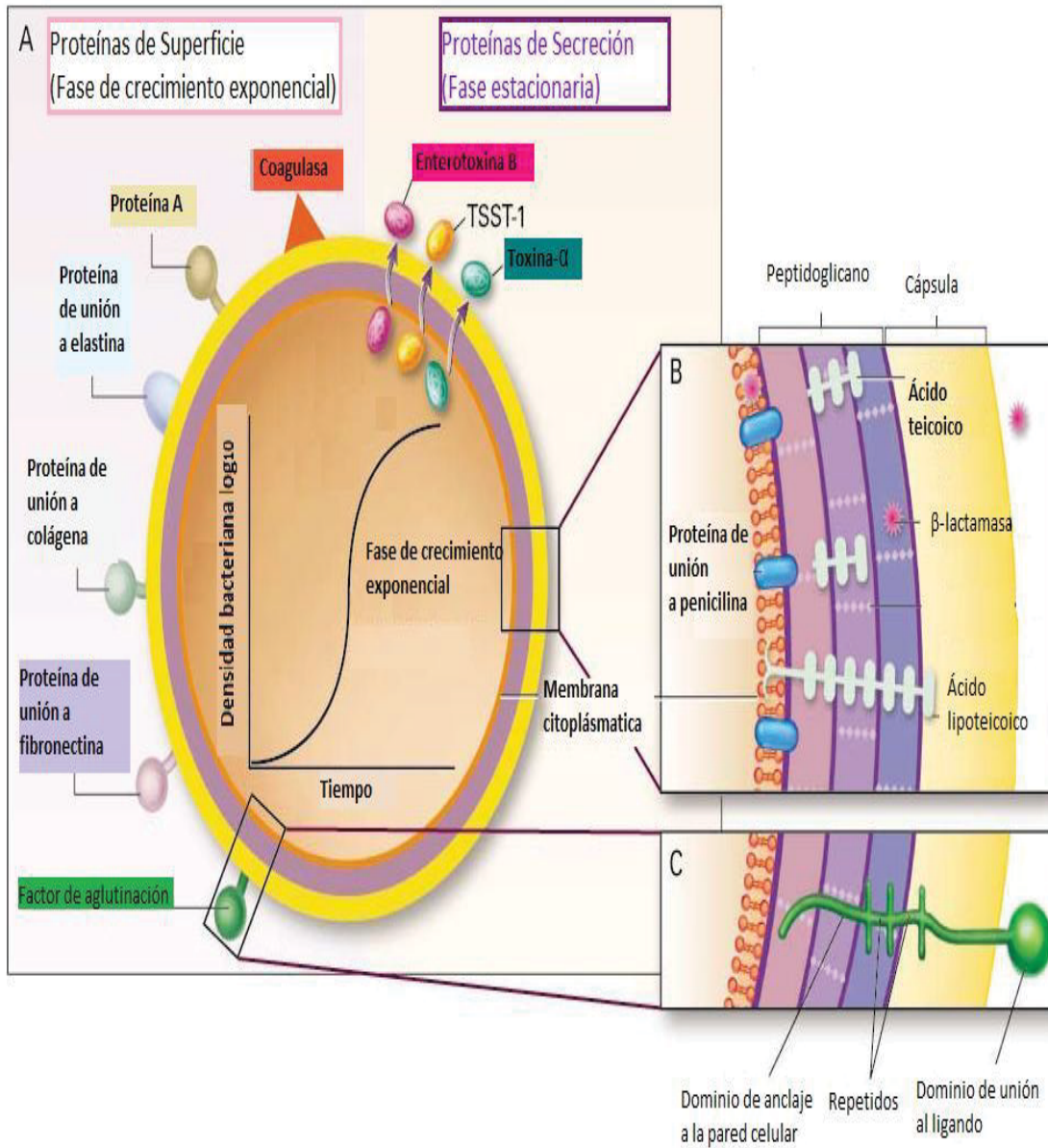
patología se complique por infecciones con microorganismos oportunistas (Sears y McCarthy, 2003).



**Figura 1. Establecimiento de la mastitis bovina por *S. aureus*.** La bacteria inicialmente alcanza el orificio del pezón donde puede persistir y multiplicarse; luego puede distribuirse a través del canal del pezón por colonización progresiva o por los cambios en la presión intramamaria, particularmente al finalizar el ordeño. El contacto con la leche favorece su transferencia al canal del pezón y también su diseminación en la glándula mamaria (Modificada de Blowey y Edmondson, 2009).

*S. aureus* tiene un arsenal diverso de componentes y productos que contribuyen a la patogénesis de la infección, los cuales pueden actuar en conjunto o solos (Fig. 2). Este microorganismo expresa un gran número de factores de virulencia, lo que incluye proteínas de superficie (ej. adhesinas) y de secreción (ej. toxinas y enzimas), además de otros componentes de superficie, que contribuyen al establecimiento o mantenimiento de la infección (Lowy, 1998; Sinha y Herrmann, 2005; Iwatsuki *et al.*, 2006). La regulación de estos factores es dependiente de la fase del crecimiento y de la densidad bacteriana, y se puede ver afectada por diferentes sistemas de regulación (Lowy, 1998; Sinha y Herrmann, 2005). Además, estos factores se expresan coordinadamente durante los distintos estadios de la infección. Durante la fase exponencial, se sintetizan activamente las proteínas de la pared celular o de superficie con funciones de adhesión, lo que coincide con algunas fases específicas de la infección (adhesión y colonización) (Cheung *et al.*, 2004; Iwatsuki *et al.*, 2006). Dentro de estas proteínas se encuentra la proteína A, las proteínas de unión a fibronectina (FnBP), las proteínas de unión a fibrinógeno, y las proteínas de unión a la colágena (Foster, 2005; Iwatsuki *et al.*, 2006). En la transición de la fase exponencial a la estacionaria, disminuye la expresión de las proteínas de adhesión, mientras que predomina la síntesis de toxinas extracelulares (ej.  $\alpha$ -toxina) y enzimas (ej. proteasas), facilitando la invasión bacteriana local y la diseminación, debido a los efectos tóxicos y a la actividad proteolítica (Cheung *et al.*, 2004).

Estudios *in vitro* han demostrado que la adhesión de los microorganismos patógenos a la superficie de células eucariotas es una etapa crucial para establecer la infección. Este es un proceso coordinado que involucra a los componentes de la superficie del patógeno y del hospedero (Kerro-Dego *et al.*, 2002). *S. aureus* es considerado clásicamente como un patógeno extracelular; sin embargo, se sabe que este microorganismo puede invadir células fagocíticas no profesionales, como células endoteliales, células de epitelio mamario bovino y fibroblastos de murinos (Shina *et al.*, 1999; Buzzola *et al.*, 2007).



**Figura 2. Estructura de *Staphylococcus aureus*.** (A) Proteínas de superficie y de secreción. La síntesis de algunas de estas proteínas depende de la fase del crecimiento y es controlado por diversos sistemas de regulación. (B) y (C) muestran la región interna de la envoltura celular. TSST-1: toxina-1 del síndrome del choque tóxico (Modificada de Lowy, 1998).

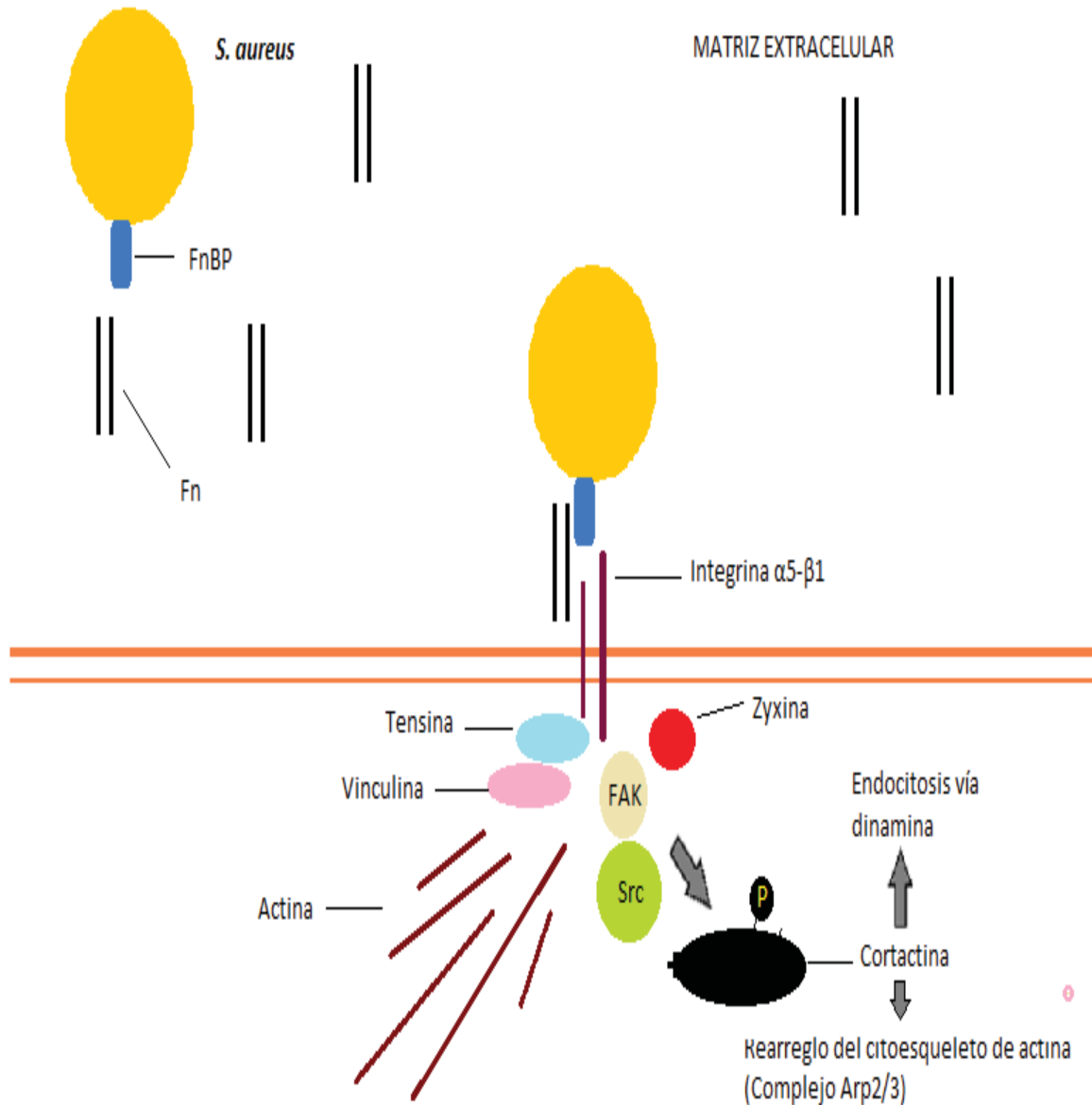
Para establecer la infección, *S. aureus* ha desarrollado diversos mecanismos de adhesión, los cuales son mediados por componentes del hospedero – proteínas de la matriz extracelular y del plasma (ej. fibronectina, fibrinógeno, vitronectina, trombospondina y colágena) – o por diversas proteínas de la bacteria (Shina y Herrmann, 2005). Algunas cepas de *S. aureus* aisladas de

infecciones humanas e intramamarias bovinas pueden unirse a la fibronectina (Fn) y a la colágena de la matriz extracelular, siendo capaces de invadir las CEMB, proceso que puede ser activado por un mecanismo endocítico específico que incluye la participación de elementos del citoesqueleto (Almeida *et al.*, 1996; Kerro-Dego *et al.*, 2002).

Cuando esta bacteria invade las CEMB lo hace a través del mecanismo “zipper” y ocurre por el contacto directo de los ligandos y receptores, que progresivamente invaginan al microorganismo (Fig. 3) (Almeida y Oliver, 2001). *S. aureus* puede expresar dos FnBP en la superficie celular, a y b, que actúan como invasinas. La FnBP de *S. aureus* se une a la fibronectina (Fn), formando un complejo (Fn-FnBP) presente en la superficie del patógeno, que es reconocido por la integrina  $\alpha 5\text{-}\beta 1$  (receptor de la célula hospedera). La bacteria induce el agrupamiento de las integrinas, lo que lleva al reclutamiento local de proteínas estructurales como tensina, vinculina y zyxina, y de enzimas de señalización como las tirosina quinasas de la familia Src y FAK (quinasas de adhesión focal), al sitio de adhesión de la bacteria. La actividad combinada de FAK y Src resulta en la fosforilación de tirosinas en moléculas efectoras, como la cortactina. Ésta se relaciona con la invasión bacteriana debido a su efecto sobre el rearrreglo del citoesqueleto por el complejo Arp2/3 o por la regulación de la endocitosis vía dinamina (Sinha *et al.*, 1999; Alexander y Hudson, 2001; Kerro-Dego *et al.*, 2002; Sinha y Herrmann, 2005).

## **2.2 Inmunidad de la glándula mamaria**

La inmunidad innata en los mamíferos es una de las primeras líneas de defensa del hospedero ante una infección, ya que proporciona la capacidad de reconocer inmediatamente los primeros signos de la infección y de responder a ellos. La inmunidad innata de la glándula mamaria está constituida por las barreras físicas del orificio del pezón (ej. esfínter muscular y queratina), por macrófagos ( $m\phi$ ), neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y por algunos factores solubles (Tabla 2) (Sordillo y Streicher, 2002).



**Figura 3. Mecanismo propuesto para la invasión de *S. aureus* en las CEMB.** La bacteria se une a la fibronectina (Fn) por medio de sus proteínas de unión a fibronectina (FnBP), formando el complejo Fn-FnBP, que sirve como un ligando de alta afinidad para el receptor integrina  $\alpha 5\text{-}\beta 1$  de la célula hospedera, lo que estimula la polimerización de actina y la endocitosis, mediante la formación de una vacuola que es transportada al interior de la célula (Modificada de Sinha y Herrmann, 2005).

**Tabla 2. Defensas solubles de la glándula mamaria.**

Factores solubles	Función biológica
Citocinas	Factores proinflamatorios e inmunorreguladores
Complemento	Bacteriolítico y/o facilita la fagocitosis
Lisozima	Secuestra el fierro de las secreciones de la ubre, minimizando la multiplicación bacteriana.
Lactoferrina	Secuestra el fierro de las secreciones de la ubre, minimizando la multiplicación bacteriana; perturba la pared bacteriana; regula la actividad de los leucocitos
Lactoperoxidasa	Inhibe el crecimiento bacteriano
Péptidos antimicrobianos	Antimicrobianos e inmunomoduladores

(Tomada de Sordillo y Streicher, 2002; Blowey y Edmondson, 2009)

Estudios recientes han comenzado a dilucidar el papel de las células de epitelio mamario (CEM) en la estimulación de la inmunidad innata. La principal función reconocida de las CEM es la producción de la leche durante la lactancia; sin embargo, se ha demostrado que estas células poseen mecanismos de defensa ante el ataque de los patógenos (Günther *et al.*, 2010). Las CEM responden rápidamente al estímulo bacteriano con cambios significativos en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), algunas interleucinas (IL-1  $\beta$ , IL-8 e IL-6), quimiocinas, receptores tipo Toll (TLR) y péptidos antimicrobianos ( $\beta$ -defensinas) (Lutzow *et al.*, 2008; Günther *et al.*, 2010).

Existen diferentes mediadores de la inflamación que se expresan en distintos tiempos después del estímulo bacteriano. Hay un grupo heterogéneo de polipéptidos solubles pequeños o mediadores de la inflamación, llamados citocinas, que forman parte de una red compleja que ayuda a regular la respuesta inmune e inflamatoria (Tosi, 2005). Las citocinas pro-inflamatorias promueven la

inflamación inmediatamente después de que se detecta al patógeno, mientras que las citocinas antiinflamatorias suprimen y delimitan la actividad de las pro-inflamatorias. Las principales citocinas pro-inflamatorias son la IL-1 y el TNF- $\alpha$  (Günther *et al.*, 2011). Se ha reportado que las CEMB después de la infección bacteriana son capaces de liberar citocinas (ej. TNF- $\alpha$ ) (Rainard y Riollot, 2006).

Los péptidos antimicrobianos (PA) son moléculas efectoras clave de la inmunidad innata de los organismos superiores, ya que poseen acción antimicrobiana y/o inmunomoduladora. Entre ellos se encuentran las defensinas, que son péptidos catiónicos anfipáticos de aproximadamente 30 aminoácidos. Estas se clasifican en función de los seis residuos conservados de cisteína y en los puentes disulfuro que forman, y se dividen en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ . Las  $\alpha$  defensinas se encuentran en mamíferos, las  $\beta$  defensinas se expresan en vertebrados, invertebrados y plantas; mientras que las  $\theta$  defensinas solo se han descrito en primates (ej. macaco Rhesus) (Easton *et al.*, 2009; López-Meza *et al.*, 2009). La subfamilia de las  $\beta$  defensinas es la única que se ha encontrado en bovinos, éstas se pueden expresar ya sea constitutivamente (en neutrófilos) o de forma inducible (en las células epiteliales) (Tetens *et al.*, 2010).

En el ganado bovino (*Bos taurus*) se ha reportado la expresión de diferentes  $\beta$  defensinas en posibles sitios de invasión bacteriana, con frecuencia de manera inducible. En la glándula mamaria se expresa constitutivamente TAP (péptido antimicrobiano traqueal), LAP (péptido antimicrobiano lingual), BNBD3 ( $\beta$  defensina de neutrófilo bovino), BNBD4, BNBD5, BNBD9, BNBD10, BNBD12, DEFB1 ( $\beta$  defensina bovina) y EBD ( $\beta$  defensina entérica) (Swanson *et al.*, 2004; Luenser y Ludwig, 2005; López-Meza *et al.*, 2009; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Tetens *et al.*, 2010). Aunque, también se ha observado la expresión inducible de BNBD4, 5 y 10, LAP y DEFB1 en respuesta a procesos infecciosos (ej. mastitis) (Tetens *et al.*, 2010).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre diatómico que tiene la capacidad de atravesar la membrana celular, y es principal compuesto reactivo de nitrógeno y



oxígeno producido por las células. El NO es un componente importante del sistema inmune, este compuesto puede actuar como antimicrobiano y tiene un papel trascendental en la respuesta inflamatoria; además el NO, regula la dilatación de los vasos sanguíneos y es un mensajero neuronal. Esta molécula se sintetiza a partir de la L-arginina y el O<sub>2</sub>, en una reacción de dos pasos, formando el intermediario N-hidroxi-L-arginina. Existen cuatro enzimas que participan en la síntesis del NO, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS). Dos de estas isoformas (eNOS y nNOS) son dependientes de calcio-calmodulina y se expresan constitutivamente. La enzima iNOS se expresa en una amplia gama de células después de ser estimuladas con mediadores inflamatorios y productos bacterianos (Boulanger *et al.*, 2001). Bajo condiciones de inflamación (ej. mastitis) las CEMB son capaces de producir NO, que puede ayudar a contrarrestar el establecimiento de la infección o a su resolución (Boulanger *et al.*, 2001; Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). La mtNOS también es una enzima inducible, pero es una isoforma distinta a la iNOS, su actividad es inducida por la acción de endotoxinas (ej. LPS) (Aguirre *et al.*, 2011).

Si el patógeno es capaz de evadir la inmunidad innata, o sino es completamente eliminado por ésta, entonces la inmunidad adquirida se activa. La inmunidad adquirida reconoce determinantes antigénicos específicos del patógeno. Si el hospedero es sometido al mismo estímulo antigénico más de una vez, aumenta la capacidad de reacción del sistema inmune como consecuencia de la memoria inmunológica. En la glándula mamaria es necesario que la inmunidad innata y adquirida estén en constante interacción y coordinación para proveer de protección óptima contra la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002).

### **2.3 Ácidos grasos (AG)**

Los AG son moléculas orgánicas que comprenden a los lípidos más sencillos, y pueden ser también componentes de lípidos más complejos (ej. triacilglicéridos). Su estructura básica está constituida por una cadena alquílica o hidrocarbonada (de 2 a 36 carbonos) unida a un grupo reactivo carboxilo terminal

(-COOH) y un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en el otro extremo. La cadena hidrocarbonada puede estar saturada (sin doble enlace) o insaturada (uno o más dobles enlaces), lineal o ramificada, incluso puede tener estructuras cíclicas o grupos hidroxilos. De acuerdo al tamaño de la cadena alquílica podemos clasificarlos como (i) ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que tienen de 2 a 8 átomos de carbono (ii) de cadena media (10-14 carbonos) y (iii) de cadena larga (>16 carbonos) (Bauman y Griinari, 2003).

La mayoría de los AG que se encuentran en la naturaleza tienen un número par de átomos de carbono (12-24), resultado del modo de síntesis de estos compuestos, que involucra la condensación de dos unidades de carbono (acetato). En la mayor parte de los AG insaturados los dobles enlaces están en la configuración *cis*; no obstante, los AG *trans* se producen por la fermentación en el rumen de los bovinos. Los AG son ácidos débiles, con valores de pK<sub>a</sub> alrededor de 4.5. Por lo que se encuentran a pH fisiológico en forma aniónica (RCOO<sup>-</sup>):



El grupo carboxilo hace que éste sea extremadamente hidrófilo, mientras que la cadena hidrocarbonada no polar se relaciona con la poca solubilidad de los AG en el agua; mientras más larga sea la cadena y menos dobles enlaces tenga el AG, será menor la solubilidad en el agua. El grupo -COOH (polar) influye en la ligera solubilidad de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el agua. El punto de fusión se ve influenciado por la longitud del AG y el número de dobles enlaces, cuanto más corta sea la cadena y mientras más dobles enlaces contenga el ácido, el punto de fusión será más bajo.

### **2.3.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en la leche de bovinos**

Los AGCC están compuestos por 2 a 8 átomos de carbono (Bauman y Griinari, 2003). Los AGCC son los principales productos obtenidos del metabolismo bacteriano en el rumen o en el colon de humanos. Se obtienen generalmente de la fibra dietética (carbohidratos) por la fermentación anaeróbica

bacteriana. Sin embargo, estas moléculas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y podemos encontrarlas como componentes de la grasa de la leche bovina. La grasa de la leche bovina consiste principalmente de triacilglicéridos (TAG, ~98%), fosfolípidos (~1%), colesterol (menos del 0.5%), ésteres de colesterol, monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) (~2% de la fracción de lípidos) y AG libres (~0.1%), que en conjunto llegan a constituir entre 2 y 3% de las grasas totales (Jensen y Newburg, 1995). En los rumiantes, la grasa de la leche está constituida aproximadamente por 400 AG diferentes y se relaciona con el metabolismo de los lípidos que ocurre en el rumen (Bauman y Griinari, 2003). Se han realizado muchos estudios acerca de la composición básica de los principales lípidos y AG de la leche, y en la Tabla 3 se presenta un resumen de estos componentes.

El sistema de síntesis de los AG en la glándula mamaria de la vaca, produce moléculas con un número par de carbonos (4-16) (Bauman y Griinari, 2003). Los AG de 4 a 14 carbonos se obtienen principalmente de la síntesis *de novo*, siendo sus precursores el acetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato. Los ácidos acético y butírico se generan en el rumen por la fermentación bacteriana de las fibras dietéticas; durante la absorción a través del epitelio del rumen, el ácido butírico es convertido a  $\beta$ -hidroxibutirato (Parodi, 2004). Los AG de cadena larga (>16 carbonos) son importados del plasma sanguíneo a partir de los TAG que forman parte de las lipoproteínas de la sangre -principalmente los quilomicrones y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad)- después de la hidrólisis por la lipoproteínlipasa (LPL) en la glándula mamaria. También se obtienen de los AG no esterificados que circulan unidos a la albúmina (Neville y Picciano, 1997; Parodi, 2004). Los AG de 16 carbonos se originan de ambas fuentes (Bauman y Griinari, 2003).

Los componentes de la leche tienen principalmente propiedades nutricionales, principalmente. Se ha estimado que los AGCC entre un 5 y un 15% del requerimiento de calorías totales en humanos y un 70% de los requerimientos de energía en los rumiantes (Bergman, 1990). Actualmente, además de esta

particularidad, se sabe que algunos de estos componentes poseen propiedades fisiológicas y fisiopatológicas interesantes. La grasa de la leche y de los derivados lácteos tiene compuestos que pueden ser cardioprotectores, como los esfingolípidos y el ácido linoleico conjugado (Parodi, 2004). Los AGCC no están exentos de estas propiedades, se sabe que el ácido butírico previene el cáncer de colon (efecto anticancerígeno); además, este AGCC disminuye la proliferación de células de epitelio mamario sanas, e inhibe el desarrollo de tumores mamarios inducidos químicamente (Parodi, 2004). Se ha reportado que este tipo de moléculas tienen también propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y moduladoras de la inmunidad.

**Tabla 3. Composición de los ácidos grasos de la leche bovina.**

Ácido graso	Número de carbonos*	% en peso del total de ácidos grasos
Butírico	4:0	3.4
Caproico	6:0	2.1
Caprílico	8:0	1.2
Cáprico	10:0	2.6
Láurico	12:0	3
Mirístico	14:0	10.6
Palmítico	16:0	27.7
Palmitoleico	16:1	2
Esteárico	18:0	12.8
Oleico	18:1	26.6
Linoleico	18:2	2.3
Linolénico	18:3	1.6

\*Se menciona la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces, separado por dos puntos.  
(Tomada de German y Dillard, 2006)

### 2.3.2 Propiedades antimicrobianas de los AGCC

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana de una gran variedad de lípidos, incluyendo a los AG libres y a sus MAG, y se ha descubierto que actúan contra virus encapsulados, bacterias Gram positivas y Gram negativas (Nair *et al.*, 2005). Aunque el mecanismo antibacteriano de los AG no ha sido dilucidado, estos compuestos exhiben propiedades bactericidas y bacteriostáticas dependiendo del estado fisiológico del organismo y de las características fisicoquímicas del ambiente externo. Diversos estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de los AG han permitido establecer que esta propiedad disminuye conforme aumenta el tamaño de la cadena de carbonos, siendo los ácidos grasos de cadena media los que tienen mayor actividad (Wang y Johnson, 1992; Isaacs *et al.*, 1995; Nair *et al.*, 2005).

Dada la naturaleza de ácidos débiles de la mayoría de estos compuestos, el pH es considerado un determinante principal para su efectividad debido a que afecta la concentración de la forma no disociada del ácido. Se ha asumido que la forma no disociada del ácido orgánico puede penetrar fácilmente la membrana lipídica de la célula bacteriana y una vez dentro, debido al pH casi neutro del citoplasma, se disocia en aniones y protones. Una ligera disminución del pH intracelular puede provocar la inactivación de enzimas intracelulares, la inhibición del transporte de aminoácidos, la interferencia con la transducción de señales y la inhibición de la expresión de factores de virulencia y genes que codifican resistencia a antibióticos. La bacteria debe mantener el pH del citoplasma cercano al neutral para el correcto funcionamiento de las macromoléculas y para exportar el exceso de protones requiere del consumo de adenosín trifosfato (ATP), lo que puede resultar en el agotamiento de la energía celular bacteriana (Ricke, 2003; Nair *et al.*, 2005; Van Immerseel *et al.*, 2006; Van Deun *et al.*, 2008a). Esto apoya la hipótesis de que la acumulación de aniones es el efecto tóxico principal de los ácidos orgánicos y que algunos organismos son más resistentes a ellos debido a que son capaces de soportar que su pH interno disminuya. No obstante, existen otras actividades antimicrobianas menos directas que se les han atribuido a los

AG, que incluyen la interferencia con el transporte de nutrientes, el daño en la membrana citoplasmática, trastornos de la permeabilidad de la membrana externa y la influencia en la síntesis de macromoléculas (Ricke, 2003; Van Immerseel *et al.*, 2006).

La propiedad de los AGCC de actuar como antimicrobianos ha permitido que sean utilizados como suplemento de alimentos. Los AGCC acético, propiónico y butírico adicionados al alimento de las aves ejercen actividad antimicrobiana contra *Campylobacter jejuni*, siendo el ácido butírico (12.5 mM) el que mejores resultados ha mostrado (Van Deun *et al.*, 2008a). En el mismo sentido, en los últimos 30 años, los ácidos fórmico y propiónico (y otras combinaciones), se han examinado por su potente actividad bactericida en alimentos contaminados con patógenos, principalmente *Salmonella* spp. (Ricke, 2003). Por otro lado, se ha demostrado que los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico tienen actividad antibacteriana más potente que los ácidos de cadena más corta contra *Salmonella*, y este efecto es específico de especie. Estos tres ácidos tienen actividad bacteriostática contra *S. enteritidis* a una concentración de 25 mM, mientras que la misma cepa tolera hasta 100 mM de los ácidos más cortos. En el mismo estudio se observó que el ácido caprílico y cáprico son bactericidas y que el MAG del ácido cáprico (5 mM) actúa contra *S. enteritidis* y *S. Typhimurium* (Van Immerseel *et al.*, 2006).

Los ácidos cáprico y laúrico tienen actividad bactericida contra *E. coli*, *S. enteritidis*, *C. jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens*. Se ha observado que la ingesta de ácido octanoico y de aceites con altas concentraciones del mismo pueden mejorar la resistencia de los conejos a *E. coli* O128 enteropatógena (Sřivanová *et al.*, 2009).

Los cerdos infectados con *S. Typhimurium* son una fuente principal de salmonelosis en humanos (enfermedad zoonótica). Una estrategia para reducir el número de cerdos infectados ha sido suplementar su agua o alimento con compuestos ácidos. Se sabe que los AGCC tienen actividad antimicrobiana directa contra *S. Typhimurium*, pero también se ha demostrado que tienen efectos

indirectos sobre la bacteria, afectando su patogenicidad. Boyen *et al.* (2008) demostraron que al suplementar el medio de crecimiento bacteriano con ácido caproico y caprílico a 2 mM, se presentó una disminución en la expresión del gen de virulencia *fimA* (gen que codifica la subunidad mayor de la fimbria o pili tipo 1). Mientas que la expresión de *hilA* (regulador transcripcional de la isla de patogenicidad de *Salmonella*, SPI1) y la invasión en células de epitelio intestinal del cerdo disminuyeron al utilizar ácido propiónico o butírico a 10 mM, y ácido caproico o caprílico a 2 mM.

En el caso de la mastitis bovina, se han buscado estrategias alternativas para el control de los principales patógenos, ya que el uso inadecuado de los antibióticos ha provocado la selección de microorganismos resistentes a los mismos. En este sentido, se ha examinado la eficacia de los AGCC y sus MAG contra patógenos de mastitis. El ácido caprílico y su MAG (100 y 50 mM, respectivamente) tienen actividad bactericida en contra de los principales patógenos causantes de mastitis *Streptococcus agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *E. coli* y *S. aureus* (Nair *et al.*, 2005).

### **2.3.3 Propiedades fisiológicas de los AGCC**

Estudios en diferentes modelos animales y en humanos han demostrado que los AGCC son rápidamente absorbidos en el lumen del colon y parcialmente metabolizados por las células epiteliales del colon. Una proporción de estos entra a la circulación portal y periférica (Meijer *et al.*, 2010). Cuando los colonocitos absorben los AGCC, éstos los toman por la membrana apical a través de distintos mecanismos, incluyendo la difusión no iónica, el intercambio AGCC/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y el transporte activo por transportadores de AGCC (Canani *et al.*, 2011).

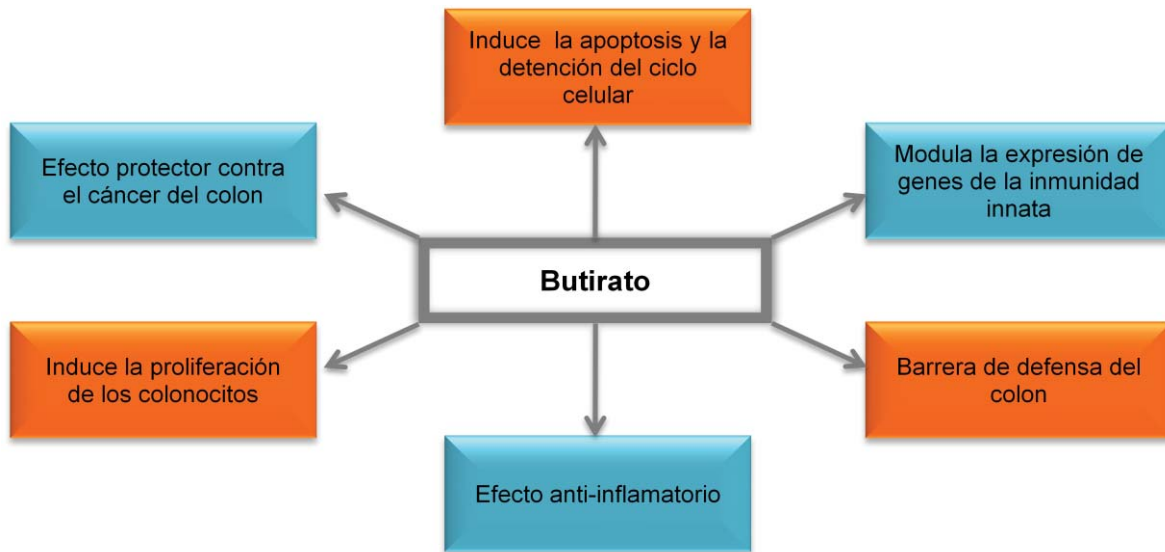
Los AGCC tienen influencia en varias funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, estimulan el flujo de sangre en el colon, influyen en la captación del fluido electrolítico y en la contracción del músculo liso, estimulan la proliferación de células epiteliales del colon e inhiben la proliferación de células cancerosas previniendo así el cáncer colorrectal (Parodi, 2004; Hamer *et al.*,

2008). En este sentido, el ácido butírico (butirato) es el AGCC más estudiado tanto en humanos como en animales (Fig. 4). Este ácido graso está presente en la grasa de la leche de los bovinos, lo cual la hace distinta del resto de los mamíferos (Parodi, 1997). Además de ser una fuente importante de energía, el butirato puede ejercer efectos inmunomoduladores demostrados tanto *in vitro* como *in vivo*.

El butirato de sodio tiene una amplia gama de efectos en muchas rutas biológicas, mediante su capacidad de inhibir las desacetilasas de histonas (HDACs), lo que provoca un incremento en la acetilación de histonas. Induce la detención del ciclo celular en la fase G1, provoca apoptosis al activar tanto a los receptores de muerte como a la ruta de apoptosis intrínseca; además, regula negativamente las ciclinas y la activación de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Se ha demostrado también que modula la respuesta inmune del hospedero al activar a los neutrófilos y potencializar la producción de la inmunoglobulina E (IgE) dependiente de IL-4 (Li y Li, 2006). El butirato tiene propiedades antiinflamatorias, las cuales se han observado en células de adenocarcinoma de colon y en muchas otras; además, regula la respuesta inmune en parte por su efecto supresor sobre la actividad del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Se ha sugerido que esta inhibición se debe a que interfiere en la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  mediada por el proteasoma 26S (Li y Li, 2006; Tedelind *et al.*, 2007).

En cuanto a los efectos de otros AGCC, se sabe que el octanoato induce la perturbación del ciclo celular en células de preadipocitos (Nakajima *et al.*, 2003). Este AGCC induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en adipocitos y disminuye la expresión del ARNm de CD36 (una translocasa de ácidos grasos) (Guo *et al.*, 2006), mientras que en cultivos primarios de las CEMB el octanoato estimula la acumulación de TAG de manera dependiente de la concentración (1-10 mM) y aumenta la expresión de CD36 (Yonezawa *et al.*, 2004).





**Figura 4. Efectos del butirato en humanos y animales.** El butirato se origina a partir de la fermentación bacteriana en el tracto intestinal de mamíferos. Por lo que se han estudiado ampliamente los efectos del butirato en el intestino humano, y se ha demostrado que previene e inhibe la carcinogénesis en el colon, al inducir la apoptosis y la detención del ciclo celular. Además, actúa como antiinflamatorio en células epiteliales de cáncer de colon; induce la proliferación celular de colonocitos; ayuda a mantener la defensa del colon al inducir la expresión de péptidos antimicrobianos (LL-37), al modular el estrés oxidativo y la permeabilidad intestinal. Mientras que en epitelio mamario bovino, es capaz de modular la expresión de genes de la inmunidad innata, como péptidos antimicrobianos y citocinas pro-inflamatorias; induce la apoptosis y la detención del ciclo celular en células epiteliales bovinas de riñón.

### 2.3.4 AGCC: agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores

Los AGCC, especialmente el butirato, han sido el centro de interés por mucho tiempo debido a su capacidad de modular las respuestas inflamatorias en células epiteliales de colon. Los resultados de estos estudios han arrojado efectos benéficos. El butirato como agente antiinflamatorio actúa inhibiendo la activación del factor NF- $\kappa$ B en células de epitelio de colon humano, como resultado de la inhibición de la HDAC (Inan *et al.*, 2000). El NF- $\kappa$ B regula muchos genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, iNOS, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), el receptor  $\alpha$  de células T (TCR- $\alpha$ ) y algunas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. El butirato disminuye la expresión de las citocinas pro-inflamatorias

inhibiendo al NF- $\kappa$ B, ya que interfiere en la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  (Meijer *et al.*, 2010; Canani *et al.*, 2011). Otros efectos antiinflamatorios del butirato ocurren mediante la inhibición de la señalización del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y por la regulación positiva de la expresión del receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales (PPAR $\gamma$ ), receptor nuclear altamente expresado en células de epitelio de colon que inhibe al NF- $\kappa$ B (Canani *et al.*, 2011).

Respecto a otros AGCC, como el acetato y el propionato, se tienen pocos efectos documentados en procesos de inflamación. Sin embargo, Tedelind *et al.* (2007) proponen que estos dos AGCC, además del butirato, pueden ser útiles en el tratamiento contra desórdenes inflamatorios, como en la enfermedad inflamatoria intestinal. Esto debido a que disminuyen la liberación del TNF- $\alpha$  en neutrófilos humanos, estimulada por la acción del lipopolisacárido (LPS). El tratamiento con estos tres ácidos en las células COLO320DM inhibió la activación del NF- $\kappa$ B, siendo el acetato el menos efectivo. En el mismo estudio se observó que el propionato provoca una disminución en la expresión del ARNm de la IL-6 dependiente de la concentración, relacionándose con la disminución de los niveles de la proteína detectados en el medio de cultivo de colonocitos de ratón. Al inducir la colitis con dextrán sulfato de sodio en ratones, se observó un aumento en la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  e IL-6, y de la iNOS; sin embargo, al aplicar el tratamiento con estos AGCC la inducción se vio fuertemente suprimida.

En el mismo sentido, el propionato inhibe la producción de la resistina (citocina pro-inflamatoria) en tejido adiposo humano, además de disminuir la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) en células endoteliales humanas activadas por citocinas (ej. el TNF- $\alpha$ ) (Al-Lahham *et al.*, 2010). Asimismo, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se ve inactivado en las células HUVEC al ser tratadas con propionato (Zapolska-Downar y Naruszewicz, 2009). Por otro lado, el propionato inhibe moderadamente la actividad de COX, una enzima primordial en la producción de eicosanoides pro-inflamatorios (Al-Lahham *et al.*, 2010). Este AGCC es capaz de activar al PPAR $\gamma$ , lo cual inhibe la expresión de

genes regulados por el NF- $\kappa$ B; mediante mecanismos dependientes e independientes del PPAR $\gamma$  (Al-Lahham *et al.*, 2010).

Estudios recientes han demostrado que el butirato induce la expresión de péptidos antimicrobianos como la catelicidina humana (LL-37), y se ha propuesto que el mecanismo molecular puede estar ligado a un aumento en la señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP) o por la acetilación de histonas (Schauber *et al.*, 2003; Kida *et al.*, 2006; Canani *et al.*, 2011). Esto es relevante ya que los PA, combinados con otros componentes de la inmunidad innata, forman la primera línea de defensa contra infecciones. De la misma manera, el propionato induce la transcripción de este PA en células SW620, mientras que no se observó efecto por parte del acetato (Schauber *et al.*, 2003).

### **2.3.5 Mecanismo de acción de los AGCC: receptores acoplados a proteínas G (GPR)**

Se considera que los efectos de los AGCC en el lumen intestinal son inducidos por la activación de receptores específicos y/o por su absorción en células epiteliales; sin embargo, el mecanismo exacto está siendo dilucidado. Se ha reportado la existencia de receptores para AGCC (acético, propiónico y butírico), éstos pertenecen a los receptores GPR, específicamente GPR41 y GPR43, la unión de su ligando induce la generación de inositol trifosfato (IP3) y la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, lo que se relaciona con la activación de la fosfolipasa C (PLC); además, incrementa la activación de ERK 1/2 e inhibe la acumulación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular (Le Poul *et al.*, 2003; Karaki *et al.*, 2008)

Los AGCC pueden actuar sobre las células de la inmunidad a través de los receptores GPR41 y GPR43, los cuales se ha demostrado que se expresan también en estas células. Las posibles funciones inmunomoduladoras de los AGCC quedaron en evidencia en un estudio reciente en ratones GPR43 *-/-*. Estos animales mostraban inflamación severa, relacionada con el aumento en la

producción de mediadores inflamatorios y en el incremento del reclutamiento neutrófilos (Sina *et al.*, 2009).

En bovinos también se ha descrito la existencia de estos receptores. Recientemente Wang *et al.* (2009) demostraron la presencia del ARNm de GPR41 y GPR43 en una gran variedad de tejidos de bovinos, como el hígado, corazón, bazo, riñón, pulmón, rumen, páncreas, entre otros. Yonezawa *et al.* (2009) demostraron la presencia de los receptores GPR41 y GPR43 funcionales en las CEMB. En las CEMB la activación de estos receptores enciende las rutas de señalización de la MAPK p38/HSP27 (Yonezawa *et al.*, 2009).

### 3. ANTECEDENTES

Los AGCC no solo son importantes debido a su valor nutricional, sino que han sido estudiados desde otros puntos de vista, ya que poseen propiedades fisiológicas atractivas, particularmente el butirato (Miller *et al.*, 2007). Existen numerosos reportes que evidencian la participación de este AGCC en el control de los procesos inflamatorios de colon e incluso se ha evaluado su uso terapéutico contra estos padecimientos en modelos animales (Harig *et al.*, 1989; Chapman *et al.*, 1994; Butzner *et al.*, 1996; Kanauchi *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2000; Raqib *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el butirato es un potente inhibidor de la proliferación celular y de la angiogénesis; promueve también la diferenciación celular y la apoptosis en diferentes líneas celulares cancerígenas, entre ellas algunas derivadas de cáncer de mama y colon (Hague y Paraskeva, 1995; Mandal y Kumar, 1996; Emenaker *et al.*, 2001). Los mecanismos mediante los cuales este ácido graso regula los eventos anteriores aún no se conocen con precisión (Li *et al.*, 2007). A nivel molecular, el butirato regula diversas modificaciones epigenéticas, particularmente estimula la hiperacetilación de las histonas, evento estrechamente asociado con una regulación negativa o la inactivación de oncogenes y con la expresión de genes que codifican péptidos con propiedades antimicrobianas (Chen *et al.*, 2003; Kida *et al.*, 2006; Raqib *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2007). Este compuesto inhibe tanto la producción del NO como la expresión de la enzima que lo produce (iNOS) en células de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimuladas con LPS, esto debido a la acción inhibitoria sobre la activación del NF- $\kappa$ B (Chakravorty *et al.*, 2000).

Con respecto a otros AGCC, se ha demostrado que el acetato y el propionato también contribuyen a las propiedades antiinflamatorias de los AGCC *in vivo* (Tedelind *et al.*, 2007). El propionato estimula la generación del superóxido en neutrófilos de humanos (Nakao *et al.*, 1998) y a la quimiotaxis en los mismos (Le Poul *et al.*, 2003). También se ha indicado que los AGCC inhiben fuertemente la liberación del TNF- $\alpha$  estimulada por LPS, pero no afectan la liberación de la IL-8

inducida por LPS; indicando así que el LPS estimula la liberación del TNF- $\alpha$  e IL-8 por mecanismos distintos en los neutrófilos de humanos (Tedelind *et al.*, 2007).

En bovinos existen numerosos reportes acerca de los AGCC como fuente de energía; sin embargo, son escasos los estudios que evalúan los efectos de éstos sobre otras funciones. Recientemente se han publicado algunos estudios realizados en una línea celular de riñón de bovinos donde se analizó el efecto del butirato sobre diversas funciones celulares, se demostró que en estas células induce la apoptosis y perturba el ciclo celular durante la transición G1/S y G2/M, y que esta respuesta es dependiente de la concentración; además, existen cuatro rutas que son perturbadas por efecto del butirato, siendo éstas: el punto de control de revisión de daño al ADN en la transición G2/M, el metabolismo de las pirimidinas, además de la regulación de la transición G1/S y el metabolismo de las purinas (Li y Elsasser, 2005; Li y Li, 2006; Li *et al.*, 2007).

Se conoce también que los AGCC pueden ejercer actividad antimicrobiana. En este sentido, los AGCC acético, propiónico y butírico cuando se adicionan al alimento de las aves poseen actividad antimicrobiana contra *C. jejuni*, siendo el ácido butírico el que mejores resultados ha mostrado (Van Deun *et al.*, 2008a). Aunque el mecanismo de acción no está del todo dilucidado, estos efectos pueden ser parcialmente entendidos por la capacidad que tienen los AGCC para atravesar las membranas celulares, disociarse en el interior y con ello acidificar el citoplasma celular (Van Immerseel *et al.*, 2006).

Estudios recientes en nuestro grupo de trabajo demostraron que el butirato de sodio reduce la internalización (~50 %) de *S. aureus* en las CEMB, y que esto probablemente se asocia con la expresión de péptidos antimicrobianos (TAP y  $\beta$ -defensina), con el aumento en la expresión de la iNOS y con la producción del NO, además de la inducción de la acetilación de histonas (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Estos resultados indican que el butirato ejerce una acción moduladora de la respuesta antimicrobiana en las células epiteliales mamarias bovinas, que permite postular que los AGCC puedan jugar un papel importante en los procesos

infecciosos de *S. aureus* causante de mastitis bovina. Es importante señalar que para el caso de los otros AGCC no existen evidencias de que un papel preponderante en este tipo de procesos, como el que se ha asociado con el butirato.

Partiendo del conocimiento de que la mastitis bovina es una patología de la glándula mamaria que involucra un proceso infeccioso e inflamatorio, y que adicionalmente los AGCC –algunos presentes en la leche bovina- tienen reconocidas propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, el objetivo de este trabajo fue establecer la participación del propionato, hexanoato y octanoato de sodio en la invasión de las CEMB por *S. aureus* y en la regulación de la expresión de genes de la inmunidad innata.

#### **4. HIPÓTESIS**

El propionato, hexanoato y octanoato de sodio disminuyen la invasión celular por *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas, regulando positivamente la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Establecer el efecto del propionato, hexanoato y octanoato de sodio en la invasión de células epiteliales mamarias bovinas por *Staphylococcus aureus* y en la regulación de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana.

### 5.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto del propionato, hexanoato y octanoato de sodio sobre el crecimiento de *S. aureus* y sobre la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino.
- II. Cuantificar la invasión celular de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino en presencia de propionato, hexanoato y octanoato de sodio.
- III. Evaluar la expresión de TNF- $\alpha$  en células de epitelio mamario bovino tratadas con propionato, hexanoato y octanoato de sodio e infectadas con *S. aureus*.
- IV. Analizar la expresión de los péptidos antimicrobianos en células de epitelio mamario bovino tratadas con propionato, hexanoato y octanoato de sodio e infectadas con *S. aureus*.
- V. Determinar la producción de óxido nítrico por las células de epitelio mamario bovino tratadas con propionato, hexanoato y octanoato de sodio e infectadas con *S. aureus*.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Reactivos y cepas**

El propionato, hexanoato y octanoato de sodio se adquirieron de la casa comercial Sigma. Se utilizaron las concentraciones de 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM.

Para el presente estudio se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) aislada de un caso de mastitis bovina clínica, con la capacidad de invadir endotelio y epitelio mamario bovino (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Para obtener el inóculo, la bacteria se creció en caldo Luria Bertani (LB, 5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura, por cada litro de agua, BIOXON), incubándose a 37°C durante 16-18 h. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se ajustaron midiendo -en el cultivo bacteriano- la densidad óptica (D.O.) a 600 nm.

### **6.2 Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino**

El cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB) se obtuvo del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, se aisló y cultivó como se ha descrito previamente (Anaya *et al.*, 2006). Las CEMB de pasaje 2 al 8 se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/ml, GIBCO), 10 µg/ml insulina (Sigma), 10 µg/ml hidrocortisona (Sigma), 40 µg/ml de gentamicina (Pharma Life), 250 ng/ml de anfotericina B (Invitrogen) y pH de 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **6.3 Efecto de los AGCC sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 27543**

Se cultivó *S. aureus* ATCC 27543 en caldo LB a 37°C/18 h con agitación constante. Se ajustó la D.O.<sub>600</sub> del cultivo bacteriano a 0.2 (equivalente a 9x10<sup>7</sup> UFC/ml). Se adicionaron los tratamientos de propionato, hexanoato y octanoato

(0.25, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mM), en este caso el control fue el cultivo de *S. aureus* sin tratamiento. Se incubó a 37°C por 2, 4, 8, 16 y 24 h con agitación constante. Se midió la D.O.<sub>600</sub> (espectrofotómetro DAS) de los cultivos en las distintas condiciones y tiempos.

#### **6.4 Efecto de los AGCC sobre la viabilidad de las CEMB**

Para determinar el efecto de los AGCC sobre la viabilidad de las CEMB, se realizó el ensayo colorimétrico de reducción por MTT (sal de tetrazolio bromuro 3-5(4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5)-difeniltetrazolio, Sigma). Se cultivaron  $5 \times 10^3$  células por pozo, en cajas de 96 pozos (Costar-Corning), con medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos, bajo las distintas concentraciones de propionato, hexanoato y octanoato, durante 24 y 48 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se adicionaron 10 µl de MTT (5 mg/ml) en buffer salino de fosfatos (PBS, 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, por cada litro de agua) a cada pozo, incubándose 4 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionaron 100 µl de lauril sulfato de sodio (SDS, Sigma) al 10%, se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la absorbencia del lisado a 555 nm en un lector de placas (DAS) para ELISA.

#### **6.5 Efecto de los AGCC en la invasión de *S. aureus* ATCC 27543 sobre las CEMB**

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron las monocapas confluentes de CEMB ( $\sim 2 \times 10^5$  células/pozo). Se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos a cada pozo, además de los AGCC (0.25 – 10mM), incubándose por 24 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se infectaron las CEMB con la cepa de *S. aureus* ATCC 27543, empleando una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula, para lo cual se realizó el conteo de CEMB de un pozo, ajustando paralelamente la D.O.<sub>600</sub> del cultivo bacteriano a 0.2 ( $\sim 9 \times 10^7$  UFC/ml). El proceso de infección se llevó a cabo durante 2 h a 37°C.

Cumplido este tiempo. se lavaron 3 veces las CEMB con 500  $\mu$ l de PBS, después se agregó gentamicina a una concentración final de 80  $\mu$ g/ml, para eliminar a las bacterias no endocitadas, incubándose 1 h a 37°C. Se recuperó el medio de cultivo para la cuantificación de óxido nítrico. Se lavaron las células 3 veces con PBS estéril, luego se despegaron con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) y se recuperaron centrifugando a 2,500 rpm/10 min, para posteriormente lisarlas con 250  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se hicieron diluciones 1:100 del lisado y se inocularon 200  $\mu$ l en agar LB (caldo LB con 10 g de agar bacteriológico. BIOXON) y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se realizó el conteo total de las UFC. Como control se utilizaron las CEMB sin los tratamientos de AGCC.

### **6.6 Efecto de los AGCC sobre la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB**

El NO se cuantificó en el medio condicionado obtenido de los ensayos de infección con los distintos tratamientos de los AGCC, se midió la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) aplicando la reacción de Griess (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). El NO que se determinó corresponde al producido por las CEMB con los diferentes tratamientos de los AGCC sin infectar e infectadas. El reactivo de Griess se preparó mezclando un volumen de la solución stock A (10% sulfanilamida y 40% de ácido fosfórico, Sigma) y un volumen de la solución stock B [1% N-(1-naftiletildiamida dihidroclorada, Sigma)]. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  se determinó por medio de una curva estándar de  $\text{NaNO}_2$  (pH 7.4, Sigma) en PBS estéril (1, 5, 10, 40, 60, 80, 100  $\mu$ M). Se colocaron diluciones 1:7 del reactivo de Griess y de medio condicionado (20  $\mu$ l y 140  $\mu$ l, respectivamente). Finalmente, se midió la absorbencia a 550 nm en el espectrofotómetro (DAS).

### **6.7 Extracción de ARN total y análisis de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana**

El ARN total (5  $\mu$ g) de las CEMB se extrajo de todas las condiciones evaluadas usando Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y después se usó para sintetizar ADNc. La muestra obtenida se trató con DNAsa I

(Invitrogen) para remover cualquier contaminación con ADN. La síntesis de ADNc se realizó por la reacción de transcripción reversa (RT) y se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  conteniendo 25  $\mu\text{g/ml}$  de oligo d(T)<sub>15-18</sub> (Invitrogen), 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min y después 5 min en hielo. Se centrifugó y se añadieron 4  $\mu\text{l}$  de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditiotreitól (Invitrogen) y 2 U/ $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsa (Invitrogen), luego se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/ $\mu\text{l}$  de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min. Se confirmó la integridad del ADNc sintetizado por medio de una PCR con oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Tabla 4).

La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 0.9 pmol/ $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido, 250 ng de ADNc y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que codifican los péptidos antimicrobianos TAP y BNBD5, además de la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ . Como control interno (gen endógeno) se utilizó GAPDH (Tabla 4).

### **6.8 Cuantificación del TNF- $\alpha$ por ELISA**

La respuesta de las CEMB a los tratamientos de los AGCC y a la infección también fue evaluada cuantificando la proteína de TNF- $\alpha$  bovina a través de la prueba de ELISA. Esta proteína fue medida en los medios de cultivo recolectados de las CEMB a las 2 h de infección. El medio fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La proteína de TNF- $\alpha$  fue cuantificada con el kit de ELISA TNF- $\alpha$  bovina/TNFSF1A de acuerdo a las instrucciones del proveedor (R&D Systems).

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

Especificidad	Sentido	Secuencia (5'-3')	Producto de amplificación (pb)	Tm (°C)	Referencia
	Directo	CCCCTGGAGATAACCTCCCA			
TNF- $\alpha$ bovina	Reverso	CAGACGGGAGACAGGAGAGC	101	55.5	Mookherjee <i>et al.</i> , 2006
	Directo	GCGCTCCTCTTCCTGGTCCTG			
TAP	Reverso	GCACGTTCTGACTGGGCATTGA	216	57.1	Este estudio
	Directo	GCCAGCATGAGGCTCCATC			
BNBD5	Reverso	TTGCCAGGGCACGAGATCG	143	55.0	Cormican <i>et al.</i> , 2008
	Directo	TCAACGGGAAGCTCACTGG			
GAPDH	Reverso	CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	56.9	Yonezawa <i>et al.</i> , 2009

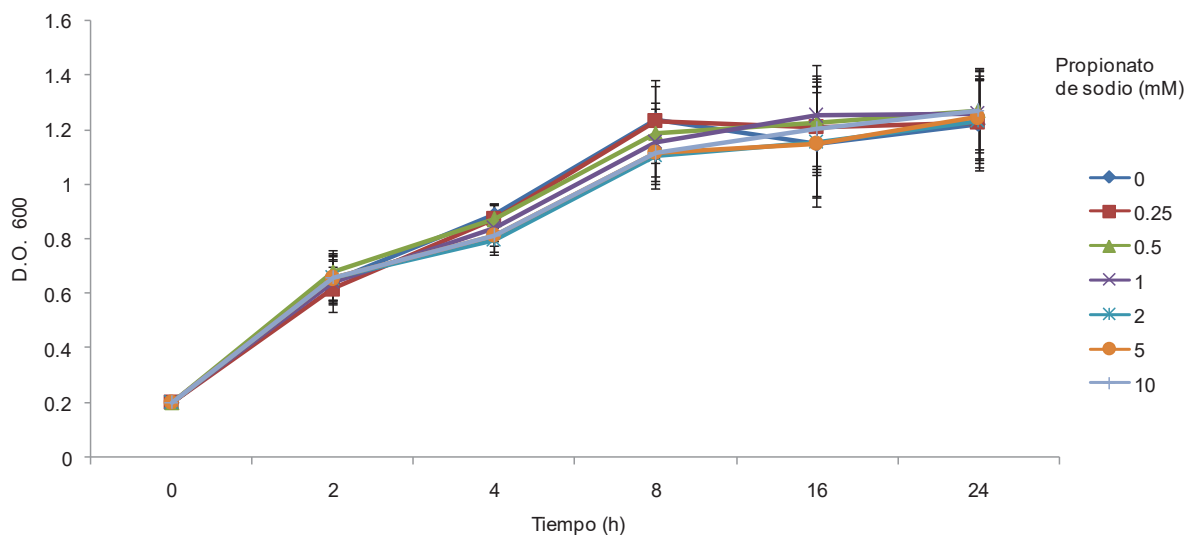
## 6.9 Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes por triplicado y se compararon mediante un análisis de varianza (StatPlus®) y la prueba *t* de Student. Los resultados se reportan con  $\pm$  el error estándar promedio. Los valores de  $P \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

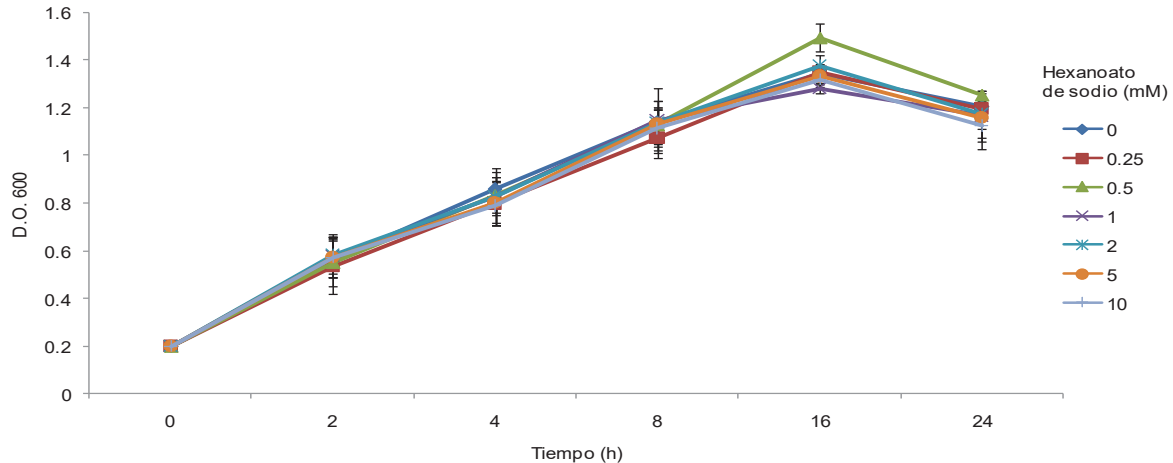
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de los AGCC sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB

Algunos AGCC tienen actividad antimicrobiana contra patógenos de mastitis (Nair *et al.*, 2005), por lo que se decidió evaluar el efecto del propionato, hexanoato y octanoato de sodio sobre el crecimiento de *S. aureus*. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en el crecimiento cuando *S. aureus* se cultivó con propionato o hexanoato por 24 h, con respecto al control sin tratamiento (Figs. 5 y 6). Con estos resultados se estableció que estos dos AGCC no actúan como antimicrobianos a las concentraciones evaluadas (0.25-10 mM), ya que no afectaron el crecimiento bacteriano.



**Figura 5. Crecimiento de *S. aureus* ATCC 27543 en presencia de propionato.** Se cultivó *S. aureus* y se ajustó la D.O.<sub>600</sub> a 0.2 ( $9 \times 10^7$  UFC), posteriormente se adicionó el propionato de sodio (0.25-10 mM) y se midió la D.O.<sub>600</sub> a los tiempos indicados. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. “\*”  $P \leq 0.05$  con respecto al tratamiento sin propionato.

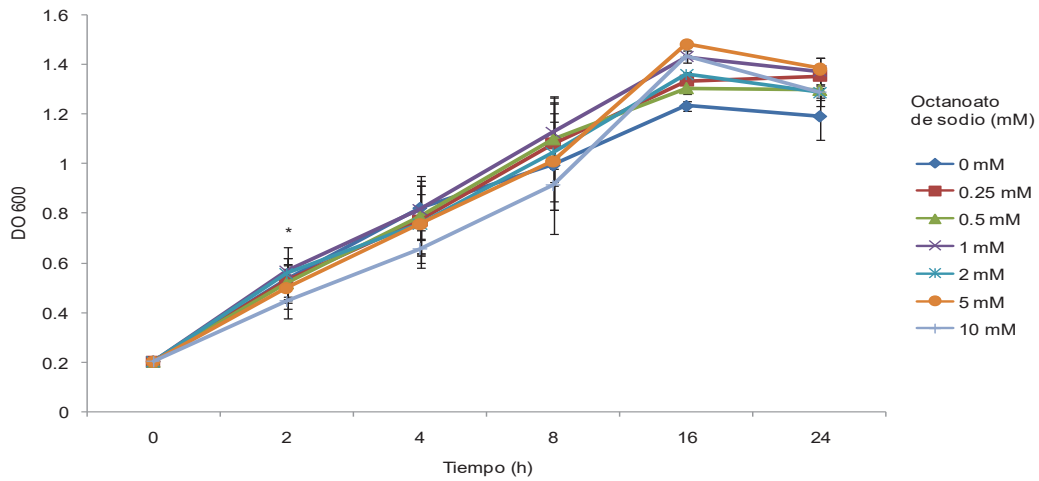


**Figura 6. Crecimiento de *S. aureus* en presencia de hexanoato.** Se cultivó *S. aureus* y se ajustó la D.O.<sub>600</sub> a 0.2 ( $9 \times 10^7$  UFC), posteriormente se adicionó el hexanoato de sodio (0.25-10 mM) y se midió la D.O.<sub>600</sub> a los tiempos indicados. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. “\*”  $P \leq 0.05$  con respecto al tratamiento sin hexanoato.

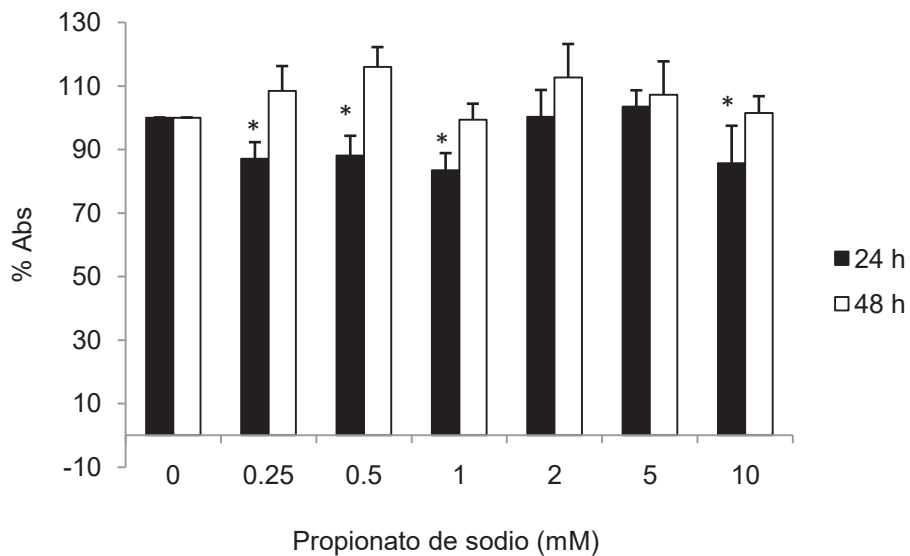
Al analizar el efecto del octanoato de sodio sobre el crecimiento de *S. aureus* se determinó que a las 2 h hay una disminución significativa de ~7 y 17 % en el crecimiento, cuando se utilizaron concentraciones de 5 y 10 mM, respectivamente (Fig. 7). Este comportamiento se mantuvo hasta las 48 h con 10 mM (datos no mostrados). Sin embargo, en el resto de los tratamientos no se observó efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. aureus*.

Para determinar el efecto de los AGCC sobre la viabilidad de las CEMB, las células fueron tratadas independientemente con diferentes concentraciones de propionato, hexanoato y octanoato de sodio (0.25-10 mM) por 24 y 48 h. Los resultados obtenidos mostraron que el propionato de sodio (Fig. 8) causó una disminución moderada en la viabilidad de las células a las 24 h de cultivo en las condiciones de 0.25 (12 %), 0.5 (11 %), 1 (16 %) y 10 mM (14 %); a las 48 h no se afectó la viabilidad. Con el objetivo de establecer si el efecto del propionato a las 24 h se debía a algún daño celular, se decidió evaluar la viabilidad de las CEMB por el ensayo de exclusión del azul tripano. Se determinó que el propionato no afectó la viabilidad celular, ya que en todas las condiciones (0.25-10 mM) evaluadas la viabilidad fue mayor al 96 % (datos no mostrados).



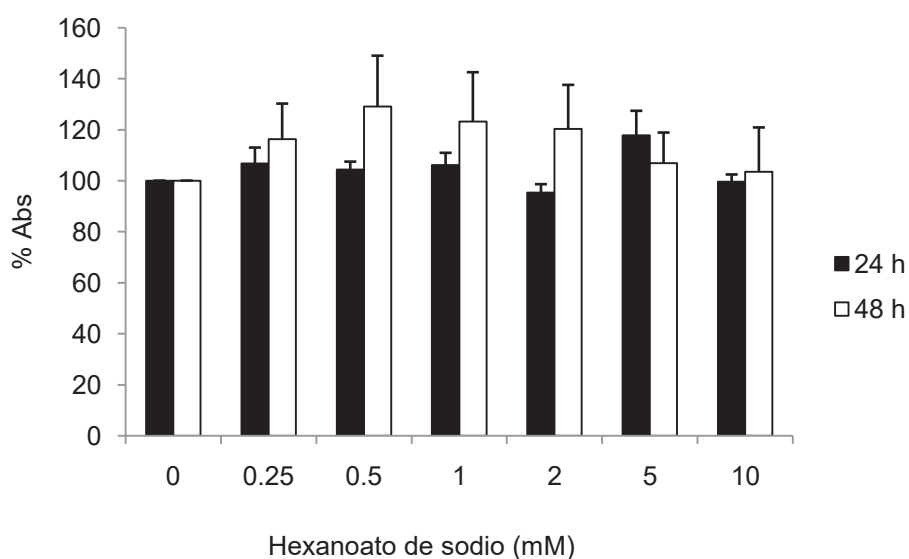


**Figura 7. Crecimiento de *S. aureus* en presencia de octanoato.** Se cultivó *S. aureus* y se ajustó la D.O.<sub>600</sub> a 0.2 ( $9 \times 10^7$  UFC), posteriormente se adicionó el octanoato de sodio (0.25-10 mM) y se midió la D.O.<sub>600</sub> a los tiempos indicados. Los resultados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. “\*”  $P \leq 0.05$  con respecto al tratamiento sin octanoato.



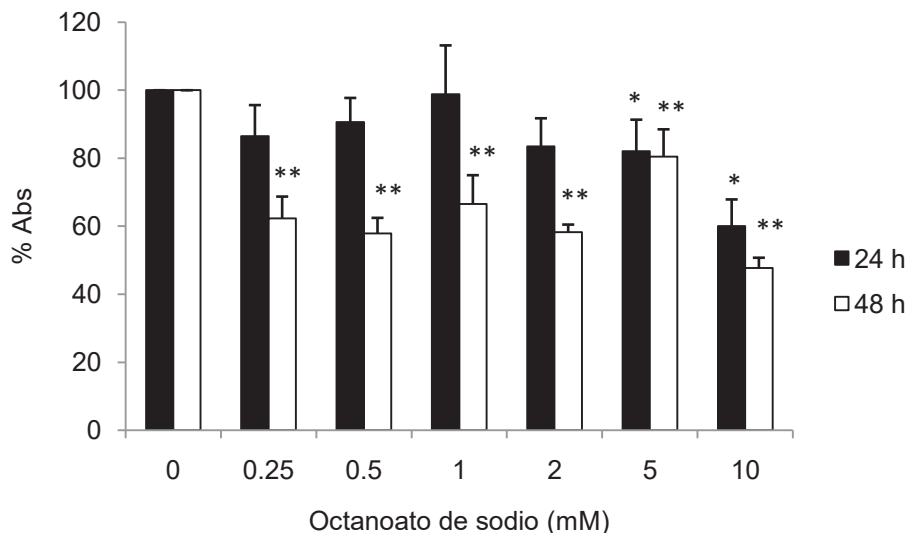
**Figura 8. Efecto del propionato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.** Las CEMB fueron cultivadas en presencia de propionato de sodio (0.25-10 mM) por 24 y 48 h. La viabilidad de las CEMB se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” indican cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento sin propionato.

Cuando las CEMB fueron tratadas con hexanoato de sodio no se observó algún efecto sobre la viabilidad en las condiciones probadas (Fig. 9). En el mismo sentido, al utilizar octanoato de sodio (Fig. 10) no se observó disminución en la viabilidad de las CEMB a las 24 h de cultivo, excepto a 5 (20 %) y 10 mM (14 %). Sin embargo, a las 48 h sí hubo una disminución significativa de la viabilidad de las células (30-54 %), determinada por la reducción del MTT, en todas las concentraciones probadas.



**Figura 9. Efecto del hexanoato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.** Las CEMB fueron cultivadas en presencia de hexanoato de sodio (0.25-10 mM) por 24 y 48 h. La viabilidad de las CEMB se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.  $P \leq 0.05$ .

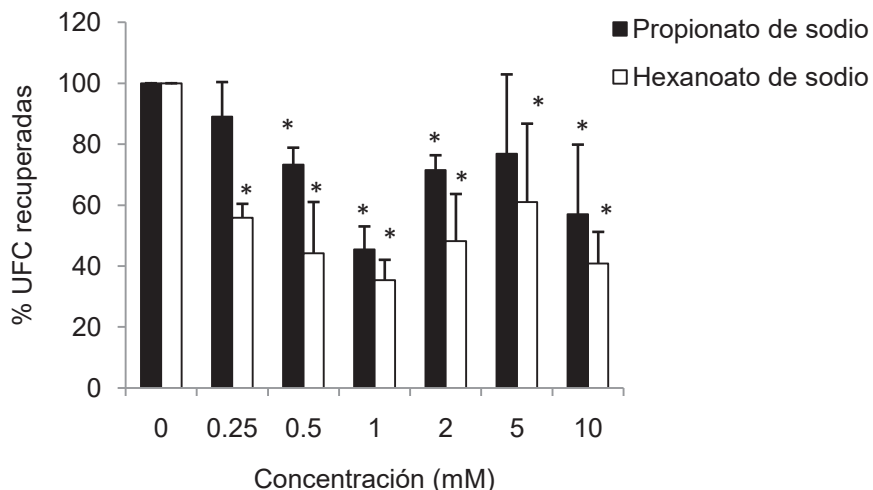
De acuerdo con los resultados de viabilidad de las CEMB, se decidió continuar con los bioensayos de invasión. Se optó por eliminar las concentraciones de 5 y 10 mM de octanoato de sodio en los ensayos siguientes, debido a que se presentó un efecto de inhibición, tanto en el crecimiento bacteriano, como en la viabilidad de las CEMB.



**Figura 10. Efecto del octanoato de sodio sobre la viabilidad de las CEMB.** Las CEMB fueron cultivadas en presencia de octanoato de sodio (0.25-10 mM) por 24 y 48 h. La viabilidad de las CEMB se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” y “\*\*”: indican el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento sin octanoato a las 24 y 48 h, respectivamente.

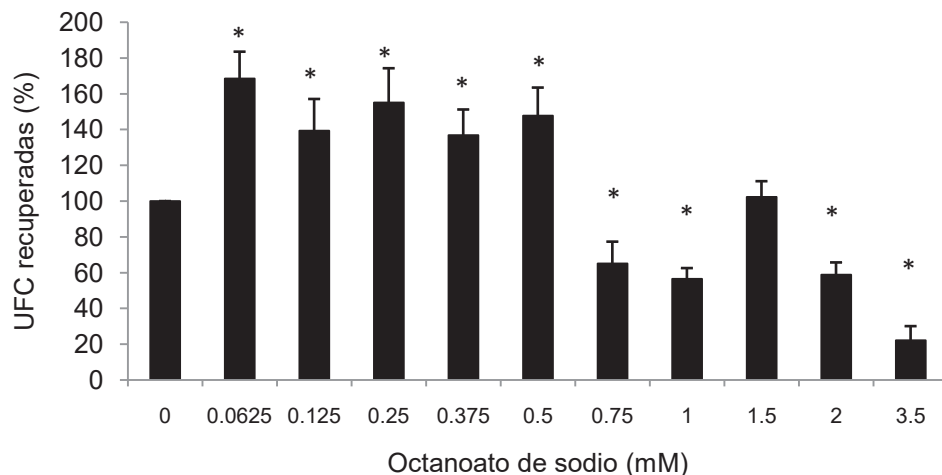
## 7.2 Efecto de los AGCC sobre la invasión de *S. aureus* en las CEMB

Para determinar el efecto de los AGCC en la invasión de *S. aureus* en las CEMB se realizaron ensayos de protección con gentamicina. Para lo cual se cultivaron las CEMB tratadas con las diferentes concentraciones de los AGCC (0.25-10 mM) por 24 h antes de ser infectadas con *S. aureus*. De acuerdo a las UFC recuperadas en los ensayos de invasión, se demostró que el propionato de sodio en las concentraciones de 0.5, 1, 2 y 10 mM provocó una disminución en la invasión bacteriana de 27, 55, 29 y 43 %, respectivamente (Fig. 11). De la misma manera, al tratar a las CEMB con hexanoato de sodio se observó una reducción significativa en la invasión de *S. aureus* en todas las concentraciones, esta disminución fue del 39 al 65 % (Fig. 11). En los dos casos, el mayor efecto inhibitorio se presentó con el tratamiento de 1 mM del AGCC correspondiente.



**Figura 11. El propionato y el hexanoato de sodio disminuyen la invasión de *S. aureus* en las CMEB.** Se trataron a las CEMB con propionato o hexanoato de sodio 24 h previas a la infección. Se representa el número de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB, los valores fueron determinados considerando las células sin tratar con el AGCC como el 100 % de la invasión. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento sin propionato o hexanoato.

En el caso de los ensayos con octanoato de sodio no se evaluaron las concentraciones de 5 y 10 mM debido a que éstas afectaron el crecimiento bacteriano y la viabilidad de las CEMB. Además, de acuerdo con los resultados preliminares que se obtuvieron con este AGCC, donde a 0.25 y 0.5 mM aumentó la invasión bacteriana (hasta en un 60 y 30 %, respectivamente), se decidió utilizar concentraciones menores a las establecidas al principio del proyecto. De tal manera que las concentraciones que se evaluaron estuvieron en el rango de 0.0625-3.5 mM. Los resultados que se obtuvieron mostraron que el octanoato de sodio posee un efecto dual. En concentraciones de 0.0625-0.5 mM se observó un aumento en las UFC recuperadas, presentándose un incremento de hasta un 64 % en la concentración de 0.0625 mM; sin embargo, al aplicar los tratamientos de 0.75, 1, 2 y 3.5 mM se observó una reducción en la invasión de la bacteria, llegando a inhibirse hasta un 77 % la invasión cuando se utilizó la concentración de 3.5 mM (Fig. 12).



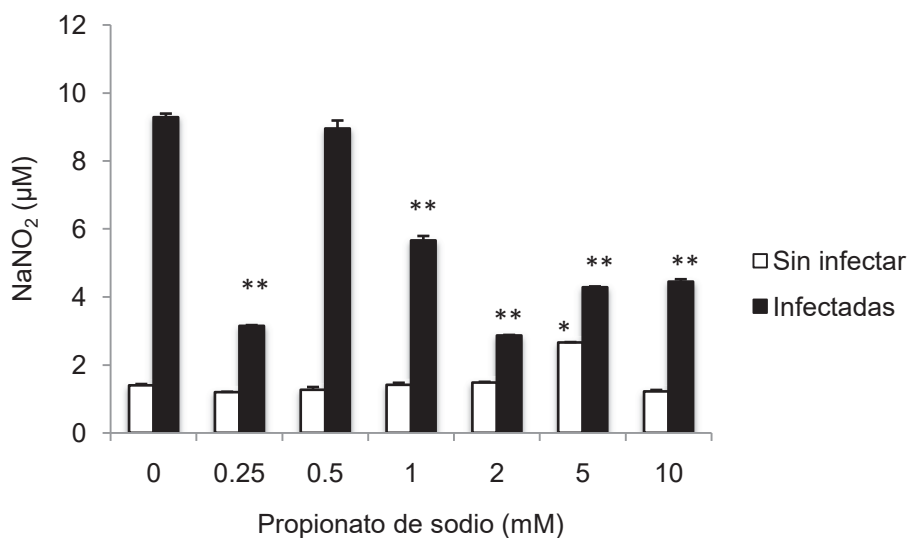
**Figura 12. El octanoato de sodio modula la invasión de *S. aureus* en las CEMB.** Se trataron a las CEMB con octanoato 24 h previas a la infección. Se representa el número de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB. Los valores fueron determinados considerando las células sin tratar con octanoato de sodio como el 100% de la invasión. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al tratamiento sin octanoato.

### 7.3 Producción de NO

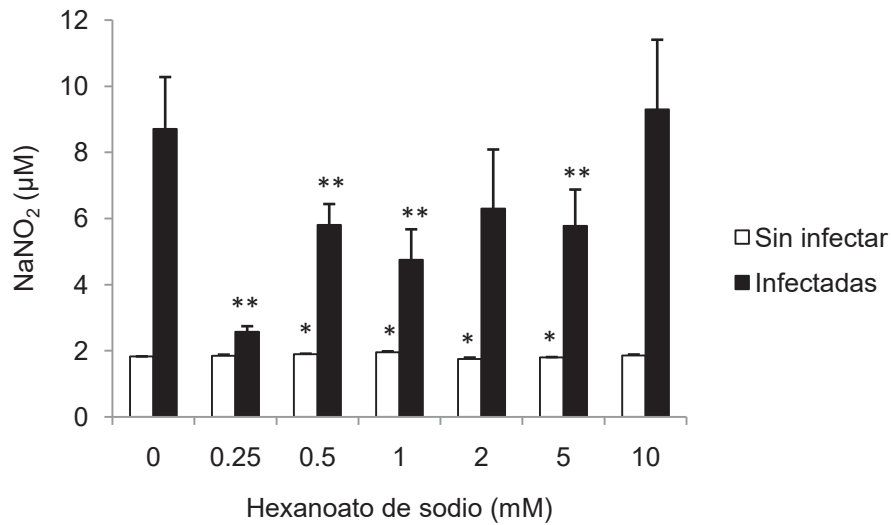
La cuantificación de NO se realizó en el medio condicionado de las CEMB tratadas 24 h con las distintas concentraciones de los AGCC con y sin infección. Los resultados mostraron que los AGCC no tienen efecto sobre la producción de NO (Figs. 13-15). Cuando las CEMB fueron infectadas con *S. aureus* se observó un incremento significativo en la producción de NO (~ 9 veces), lo que indica que la infección por sí sola induce la producción de NO (Figs. 13-15).

En el caso del propionato de sodio la concentración de 5 mM indujo (~2 veces) la producción de NO (Fig. 13). Cuando las CEMB fueron tratadas con propionato e infectadas hubo una disminución en la producción de NO en todas las concentraciones, excepto a 0.5 mM, respecto a las CEMB infectadas (Fig. 13). De la misma forma, el hexanoato (0.5-5 mM) inhibió la producción de NO en las CEMB infectadas, en relación a las CEMB infectadas (Fig. 14). En base a estos resultados, se pudo establecer que la inducción de NO estimulada por la bacteria es inhibida con los tratamientos de propionato y hexanoato, aunque esta no llega

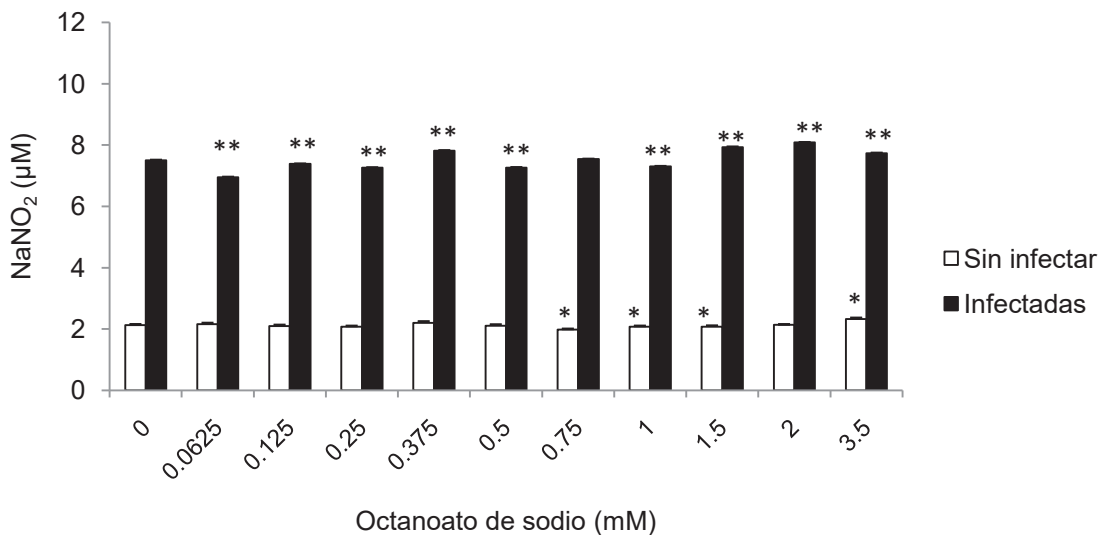
al nivel basal. Sin embargo, con el octanoato no se observó el comportamiento anterior, en todos los casos se presentó una alta producción de NO, siendo similar a la producción observada con la infección, aunque se detectaron pequeños incrementos de NO con los tratamientos de 0.375, 1.5, 2 y 3.5 mM, y ligeras disminuciones con los tratamientos de 0.0625-0.25, 0.5 y 1 mM (Fig. 15).



**Figura 13. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de propionato de sodio.** Se determinó la cantidad de NO producido por las CEMB infectadas y no infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de propionato por 24 h. El NO fue medido como la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente en el medio condicionado. Los valores de la gráfica son el resultado de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*\*” y “\*” indican cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control sin propionato de sodio en células sin infectar e infectadas, respectivamente.



**Figura 14. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de hexanoato de sodio.** Se determinó la cantidad de NO producido por células infectadas y no infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de hexanoato por 24 h. El NO fue medido como la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente en el medio condicionado. Los valores de la gráfica son el resultado de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” y “\*\*” indican cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control sin hexanoato de sodio en células sin infectar e infectadas, respectivamente.



**Figura 15. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB en presencia de octanoato de sodio.** Se determinó la cantidad de NO producido por células infectadas y no infectadas, tratadas con las diferentes concentraciones de octanoato por 24 h. El NO fue medido como la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) presente en el medio condicionado. Los valores de la gráfica son el resultado de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “\*” y “\*\*” indican cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al control sin octanoato de sodio en células sin infectar e infectadas, respectivamente.

#### **7.4 Efecto de los AGCC sobre la expresión del ARNm del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y de la $\beta$ -defensina de neutrófilos bovinos 5 (BNBD5)**

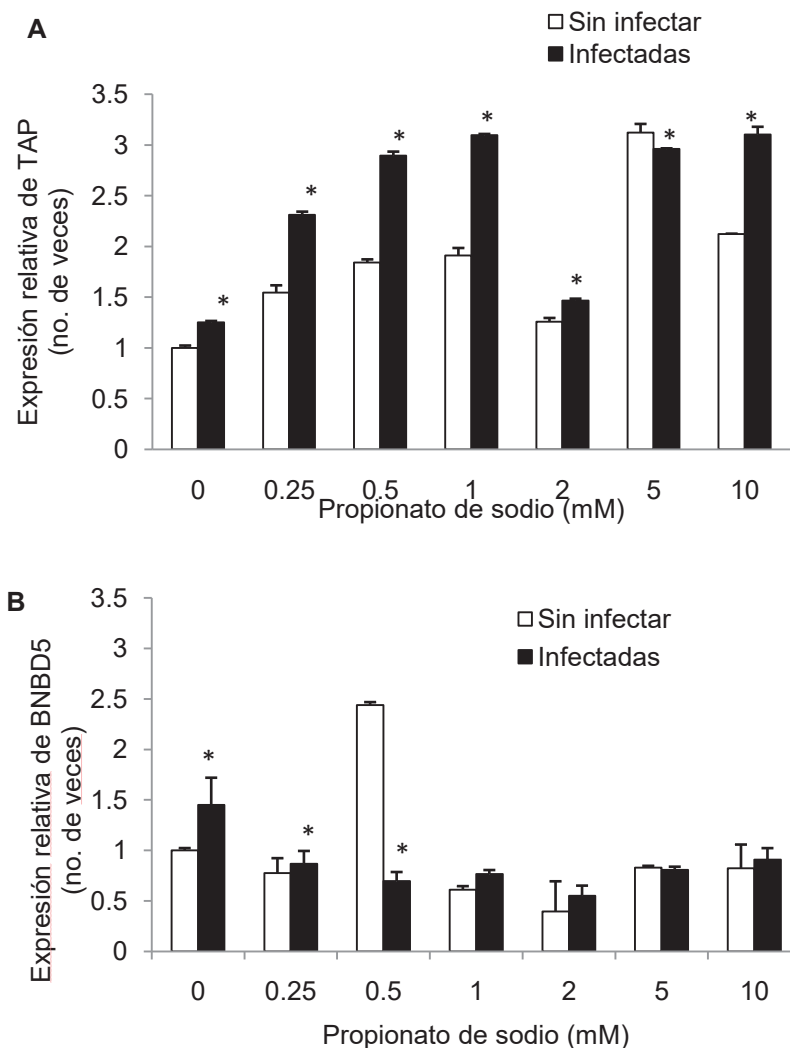
Para determinar si los AGCC modulan la expresión de genes de la respuesta inmune innata (con o sin infección), se analizó la expresión relativa de TAP y BNBD5 por PCR en tiempo real. Inicialmente se evaluó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, esto se realizó a través de una curva de validación donde se valoró el comportamiento de amplificación de los PA respecto al gen endógeno (GAPDH). Los resultados derivados de esta evaluación mostraron que todos los pares de oligonucleótidos cumplieron con los valores requeridos para la pendiente de la gráfica ( $-3.3 \pm 10\%$ ) y para el coeficiente de correlación ( $R^2 = 0.99$ ). Adicionalmente, se corroboró que en los productos de amplificación existiera un solo amplicón, esto a través de determinar las curvas de disociación de los productos (datos no mostrados). Una vez establecidas las condiciones de amplificación se procedió a realizar la cuantificación relativa de la expresión de estos genes en todos los tratamientos.

Las CEMB sin tratamiento y sin infección mostraron una expresión basal del ARNm de TAP. El propionato indujo la expresión relativa de TAP, excepto a 2 mM (Fig. 16A), este incremento fue de 0.5 a 2 veces al aplicar el AGCC a 0.25 y 5 mM, respectivamente. Por otro lado, la infección por sí sola aumentó ligeramente (0.5 veces) dicha expresión en relación a las CEMB sin estimular y sin infectar (Fig. 16A). Los tratamientos de propionato (0.25, 0.5, 1, 2 y 10 mM) en conjunto con la infección mostraron un incremento en la expresión del PA (0.6, 0.8, 0.9, 0.3 y 1 veces, respectivamente) en relación a las CEMB estimuladas con el AGCC, excepto a 5 mM (Fig. 16A). El propionato favorece la respuesta de la CEMB ante la infección.

Por otro lado, las CEMB presentaron una expresión basal del ARNm de BNBD5 (Fig. 16B). Al estimular a las CEMB con el propionato la expresión disminuyó o no se modificó, en relación a las CEMB sin tratar con el AGCC, excepto con 0.5 mM donde se observó un aumento en la expresión de la



defensina (1.4 veces). La infección en las CEMB por *S. aureus* estimuló la expresión del ARNm del BNBD5 (Fig. 16B). Respecto al tratamiento del AGCC en conjunto con la infección, sólo se observó efecto al utilizar 0.5 mM de propionato, ya que se redujo la expresión de la defensina (1.7 veces), en relación a las CEMB estimuladas solo con propionato. La infección disminuyó el efecto del propionato (a 0.5 mM) en la expresión de BNBD5.

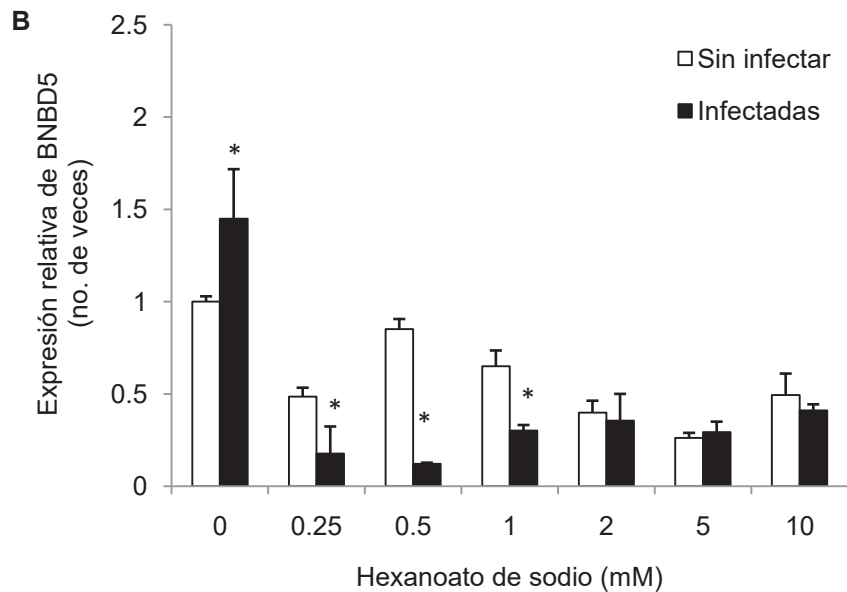
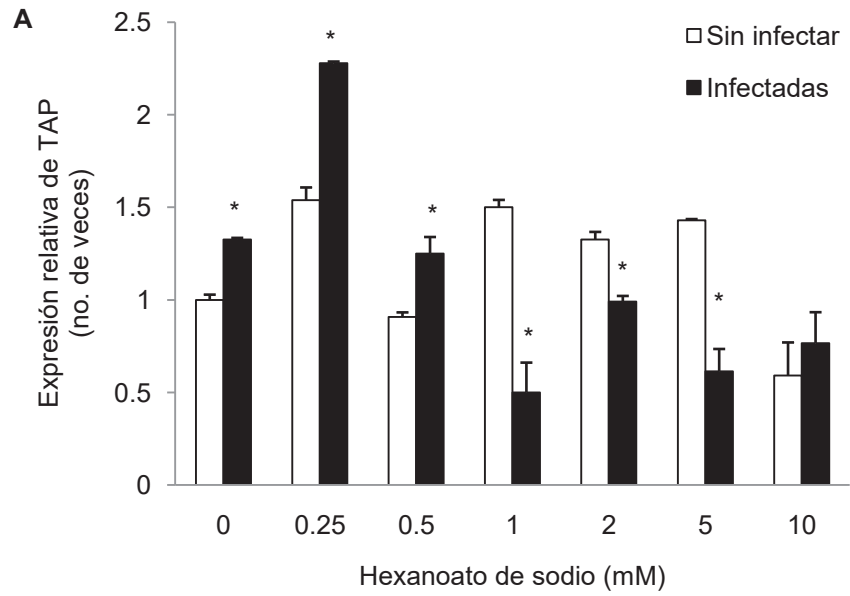


**Figura 16. El propionato de sodio modula la expresión de péptidos antimicrobianos en las CMEB.** Las CEMB fueron tratadas con propionato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm de TAP (A) y BNBD5 (B). Se realizó la extracción de ARN total y posteriormente se sintetizó el ADNc de las diferentes muestras. La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real utilizando como control endógeno GAPDH. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con propionato.

En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos del análisis de la expresión de los 2 PA por efecto del hexanoato de sodio. Se observó que los tratamientos de 0.25, 1, 2 y 5 mM de hexanoato indujeron ligeramente la expresión del ARNm de TAP en las CEMB (desde 0.3 hasta 0.5 veces), mientras que los tratamientos con 0.5 y 10 mM disminuyeron ligeramente la expresión del ARNm de este PA, respecto a las CEMB sin tratamiento (Fig. 17A). Al infectar a las CEMB hubo una ligera inducción en la expresión de TAP. Por otro lado, al estimular a las CEMB con el AGCC e infectarlas se inhibió la expresión de TAP (hasta 1 vez con 1 mM), en relación a las CEMB tratadas con el hexanoato, excepto a 0.25 y 0.5 mM donde se estimuló la expresión del PA (0.7 y 0.3 veces, respectivamente) (Fig. 17A).

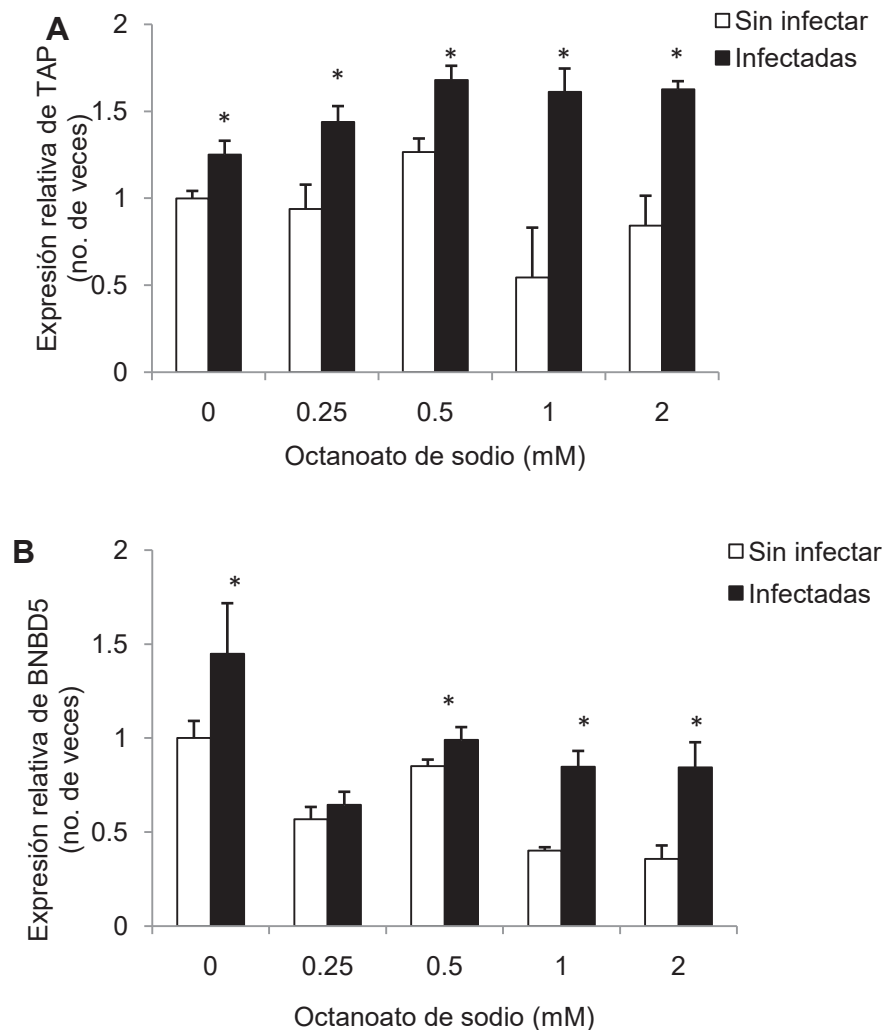
Por otra parte, todos los tratamientos con este AGCC causaron una disminución en la expresión del ARNm de BNBD5, observándose el mayor efecto a 5 mM (0.7 veces) (Fig. 17B). El hexanoato (0.25, 0.5 y 1 mM) en conjunto con la infección redujeron la expresión de la defensina, siendo el efecto más notorio al utilizar 0.5 mM del AGCC (0.7 veces), respecto a las CEMB estimuladas con el AG. La inhibición en la expresión de BNBD5 causada por el hexanoato fue más evidente en las CEMB infectadas.

Debido a que durante los ensayos de invasión con octanoato se observó un efecto estimulador y otro inhibitorio de la invasión bacteriana se decidió evaluar dos concentraciones representativas de cada comportamiento. Al estimular las CEMB con 0.5 mM de octanoato se indujo la expresión del ARNm de TAP (0.3 veces), respecto a las CEMB sin tratamiento ni infección, mientras que al utilizar 1 mM disminuyó la expresión (0.5 veces); no hubo efecto al utilizar 0.25 y 2 mM del AGCC (Fig. 18A). Se observó una inducción (0.3 veces) en la expresión del PA al infectar las CEMB. El octanoato en conjunto con la infección estimuló la expresión del gen de TAP, respecto a las CEMB tratadas con el AGCC. El mayor efecto estimulador se presentó en las células infectadas con 1 mM de octanoato (1 vez) (Fig. 18A).



**Figura 17. Efecto del hexanoato de sodio sobre la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.** Las CEMB fueron tratadas con hexanoato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm de TAP (A) y BNBD5 (B). Se realizó la extracción de ARN total y posteriormente se sintetizó el ADNc de las diferentes muestras. La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con hexanoato.

Por otro lado, el AGCC redujo la expresión de BNBD5 en todas las condiciones evaluadas, mostrando el mayor efecto al utilizar 2 mM (0.6 veces), en relación a las CEMB sin tratamiento (Fig. 18B). Se observó una inducción ligera en la expresión de BNBD5 en las CEMB infectadas. Mientras que el AGCC en conjunto con la infección estimuló la expresión del PA, excepto a 0.25 mM, observándose el mayor efecto con 2 mM (0.5 veces), respecto a las CEMB tratadas con octanoato y sin infectar (Fig. 18B).



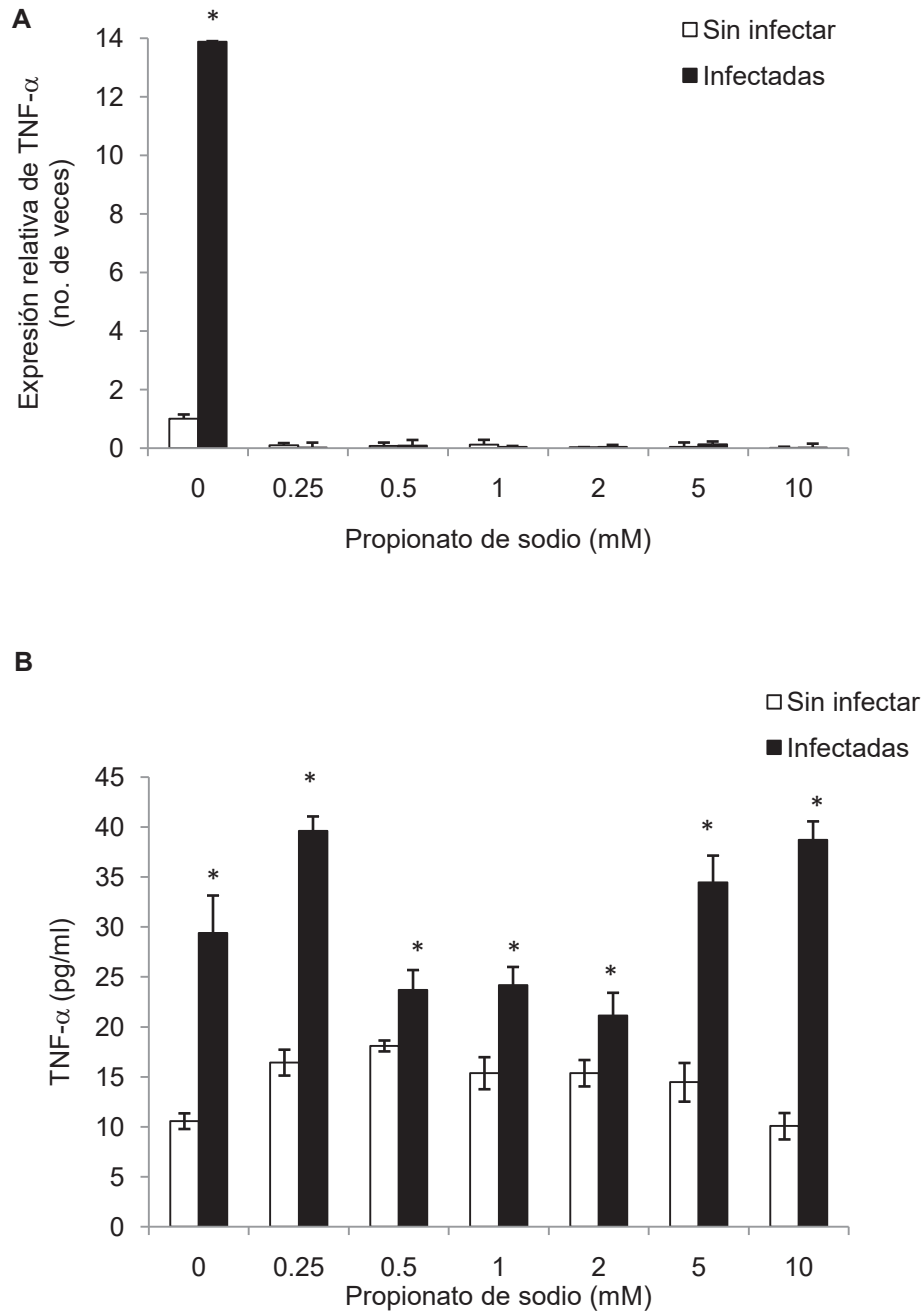
**Figura 18. El octanoato de sodio modula la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.** Las CEMB fueron tratadas con octanoato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm de TAP (A) y BNBD5 (B). Se realizó la extracción de ARN total y posteriormente se sintetizó el ADNc de las diferentes muestras. La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con octanoato.

## **7.5 Efecto de los AGCC sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ y sobre la producción de la proteína**

Siguiendo con el análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune, se evaluó el efecto de los AGCC sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  (citocina pro-inflamatoria), asimismo se determinó la presencia de la proteína en los medios condicionados de las CEMB.

En relación a la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ , se observó un nivel basal de expresión en las CEMB sin AGCC y sin infección (Fig. 19A). Los tratamientos con propionato (0.25-10 mM) inhibieron la expresión del ARNm de esta citocina, con respecto a las CEMB sin tratamiento, esta reducción fue hasta de 1 vez (2 mM). La infección por sí sola aumentó la expresión del TNF- $\alpha$  hasta 13 veces. Cuando se estimularon a las CEMB con el AGCC y se infectaron, no hubo efecto en la expresión de la citocina pro-inflamatoria, en relación a las CEMB tratadas con propionato únicamente (Fig 19A). La infección no modificó el efecto generado por el AGCC.

Por otro lado, las CEMB (sin estímulo ni infección) secretaron al medio la proteína TNF- $\alpha$  de manera basal (10.6 pg/ml) (Fig. 19B). El propionato de sodio (0.25-5 mM) indujo la liberación de la proteína TNF- $\alpha$  al sobrenadante de las CEMB (Fig. 19B), el mayor aumento se observó con 0.5 mM (0.7 veces, 18.1 pg/ml). Las CEMB infectadas liberaron 29.4 pg/ml de proteína, aumentando 1.7 veces, respecto a las CEMB sin tratamiento ni infección. Por otro lado, las CEMB tratadas con el AGCC y luego infectadas, mostraron un incremento en la liberación del TNF- $\alpha$  al sobrenadante, presentándose a 10 mM el mayor efecto inductor (2.8 veces, 38.7 pg/ml), esto en relación a las CEMB tratadas solo con el propionato (Fig. 19B).

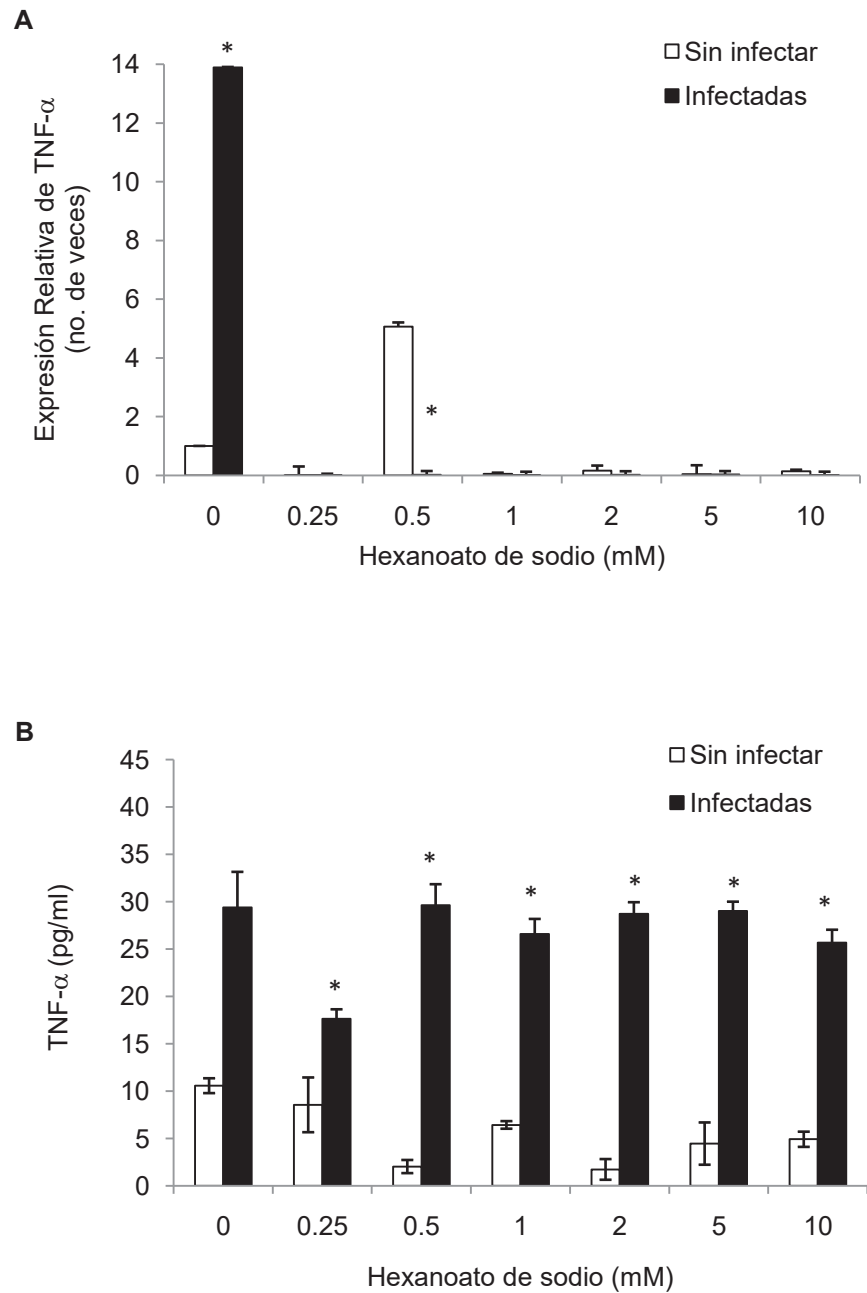


**Figura 19. El propionato de sodio modula la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  y la secreción de la proteína en las CEMB.** Las CEMB fueron tratadas con propionato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  (A). La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. La secreción de la proteína se determinó por ELISA (B), a partir del sobrenadante recolectado de las CEMB sometida a los diferentes tratamientos del AGCC. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con propionato.

Respecto a los efectos del hexanoato de sodio sobre la expresión del TNF- $\alpha$ , se observó un abatimiento en la expresión del gen del TNF- $\alpha$  (0.25-10 mM), excepto a 5 mM donde se detectó un aumento en la expresión de hasta 4 veces (Fig. 20A). En este mismo sentido, al tratar a las CEMB con este AGCC e infectarlas, se observó una disminución en la expresión del ARNm de la citocina al utilizar 5 mM de hexanoato (5 veces) -respecto a las CEMB estimuladas sólo con hexanoato- anulando prácticamente la expresión del gen. El efecto del AGCC durante la infección no modificó el comportamiento de la expresión respecto al efecto generado sólo por el hexanoato en las demás condiciones.

Al cuantificar la presencia del TNF- $\alpha$  en el medio de cultivo celular, se observó que el hexanoato (0.5-10 mM) disminuyó la concentración de la proteína secretada, siendo el mayor efecto al utilizar 2 mM del AGCC, produciendo solamente 1.7 pg/ml, esto respecto a las CEMB sin tratamiento ni infección (Fig. 20B). Las CEMB infectadas mostraron una mayor secreción de la proteína, respecto a las CEMB. Los tratamientos del AGCC en conjunto con la infección aumentaron la presencia de la proteína en el sobrenadante, con respecto a las CEMB tratadas con hexanoato, aumentando hasta 15.5 veces (28.7 pg/ml) al utilizar la concentración de 2 mM (Fig. 20B).

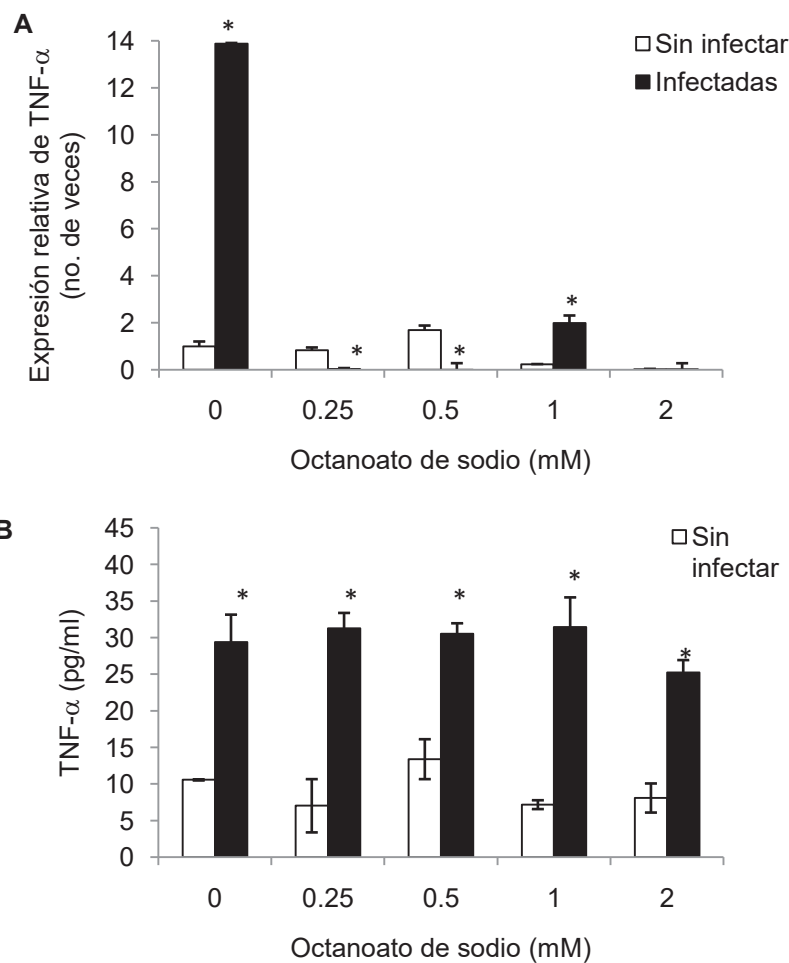
Finalmente, en la figura 21 se muestran los resultados de los efectos del octanoato de sodio sobre la expresión del TNF- $\alpha$ . El octanoato (0.5 mM) indujo ligeramente la expresión del gen del TNF- $\alpha$  (0.7 veces), mientras que las demás concentraciones tuvieron un efecto inhibitorio, la expresión prácticamente se anuló al utilizar 2 mM de este AGCC (Fig. 21A). Las CEMB infectadas con *S. aureus* mostraron un aumento en la expresión de esta citocina, de hasta 13 veces. Por otro lado, el octanoato en conjunto con la infección redujeron la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ , con respecto a las CEMB infectadas, eliminando el efecto inductor que tiene la infección. Las células infectadas y tratadas con 0.25 y 0.5 mM del AG, tuvieron una reducción en la expresión del gen, mientras que con 1 mM se observó un aumento hasta de 1 vez, en relación a las CEMB tratadas con el AGCC (Fig. 21A).



**Figura 20. Efecto del hexanoato de sodio sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  y en la liberación de la proteína en las CEMB.** Las CEMB fueron tratadas con hexanoato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  (A). La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. La secreción de la proteína se determinó por ELISA (B), a partir del sobrenadante recolectado de las CEMB sometida a los diferentes tratamientos del AGCC. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con hexanoato.



Por otro lado, no se observó algún efecto significativo del octanoato sobre la secreción del TNF- $\alpha$  al sobrenadante, excepto a 1 mM donde se detectó una ligera disminución (7.2 pg/ml), respecto a las CEMB sin tratamiento (10.6 pg/ml) (Fig. 21B). Se observó que la infección aumentó la presencia de la proteína en el medio de cultivo (29.4 pg/ml). Todas las condiciones de octanoato en conjunto con la infección aumentaron la liberación de la citocina, en relación a las CEMB tratadas con el AGCC, pero aún así se mantuvo el efecto que se le atribuye a la infección, lo que indica que el octanoato no influye en este proceso.



**Figura 21. Efecto del octanoato de sodio sobre la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  y en la liberación de la proteína en las CEMB.** Las CEMB fueron tratadas con octanoato 24 h antes de la infección. Se evaluó la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$  (A). La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. La secreción de la proteína se determinó por ELISA (B), a partir del sobrenadante recolectado de las CEMB sometida a los diferentes tratamientos del AGCC. “\*” indica el cambio significativo ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB sin infectar y tratadas con octanoato.

## 8. DISCUSIÓN

La mastitis es la enfermedad con más alta prevalencia en el ganado bovino lechero y es responsable de pérdidas financieras severas a nivel mundial, por la disminución en la calidad y la producción de leche. A menudo para su control se ha empleado como tratamiento una amplia gama de antimicrobianos en forma indiscriminada e inapropiada, ésto ha provocado una disminución de su eficacia y un incremento en la resistencia microbiana (Susamo y Ocampo, 1992). *S. aureus* es el principal patógeno causal de mastitis en bovinos, es capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células del epitelio mamario, siendo esta una de las causas por lo que puede evadir al sistema inmune y además muestra una disminuída respuesta a la terapia antimicrobiana convencional (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Buzzola *et al.*, 2007). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), además de sus propiedades nutricionales, también son conocidos por tener varios efectos fisiológicos y fisiopatológicos, y algunos de ellos (C<sub>4:0</sub>-C<sub>8:0</sub>) son componentes de la grasa de la leche bovina. Dado lo anterior, durante una infección intramamaria como la generada por *S. aureus*, tanto la bacteria como las CEMB están en contacto directo con los AGCC. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que el butirato de sodio (0.25-4 mM) modula la expresión de genes de la respuesta inmune y la invasión de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Por lo anterior y debido a los efectos antimicrobianos, antiinflamatorios e inmunomoduladores reportados para los AGCC, en este trabajo se evaluó el efecto del propionato, hexanoato y octanoato, sobre la invasión de *S. aureus* ATCC 27543 en las CEMB y en la modulación de la expresión de genes de la inmunidad innata.

Los ácidos orgánicos tienen propiedades antimicrobianas debido a su habilidad de acidificar el citoplasma celular, lo que puede afectar la actividad de las enzimas y los sistemas de transporte de nutrientes. Se ha reportado que el ácido caprílico (C8) (presente en la leche bovina) y su monoacilglicérido, monocaprilin, poseen este efecto contra patógenos causales de mastitis en concentraciones de 100 y 50 mM, respectivamente (Nair *et al.*, 2005). Por lo que

en el presente trabajo se decidió evaluar si las concentraciones a utilizar de los diferentes AGCC tenían un efecto antimicrobiano. Para lo cual se cultivó la bacteria en presencia de ellos y se monitoreó su crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que el propionato (Fig. 5) y el hexanoato (Fig. 6) no afectaron el crecimiento bacteriano; cabe resaltar que en este trabajo se utilizaron concentraciones inferiores que las reportadas con actividad antibacteriana contra patógenos de mastitis. Por otro lado, el octanoato (5 y 10 mM) disminuyó el crecimiento bacteriano a las 2 h del cultivo (Fig. 7). Se sabe que los AG con propiedades antimicrobianas más efectivas son los ácidos constituidos por 8-12 carbonos (Nair *et al.*, 2005); lo que concuerda con el efecto generado por el octanoato. Además, el efecto antibacteriano de los AGCC es específico de especie; mientras que los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico tienen actividad bacteriostática (25 mM) contra *Salmonella enteritidis*, la misma cepa tolera hasta 100 mM de los ácidos más cortos (Van Immerseel *et al.*, 2006). Esto podría explicar porque el octanoato fue el único que manifestó algún efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*.

Se ha demostrado que el butirato de sodio induce la detención del ciclo celular y la apoptosis por medio de la modulación de distintas rutas de señalización, además disminuye la proliferación de células epiteliales mamarias normales e induce la actividad de las caspasas 1 y 3 (Avivi-Green *et al.*, 2002). Se sabe también que el butirato puede regular distintas funciones en las células de epitelio de riñón de bovinos (MDBK), que incluyen apoptosis y la perturbación del ciclo celular, en la transición de G1/S y de M/G2 (Li y Elsasser, 2005; Li *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se decidió evaluar el efecto de los AGCC sobre la viabilidad de las CEMB. Las evaluaciones indicaron que el hexanoato no afectó la viabilidad de las CEMB, mientras que el propionato provocó una ligera reducción en la viabilidad a las 24 h (Fig. 9). Se decidió evaluar la viabilidad de las CEMB con el ensayo de exclusión de azul tripano, para determinar si el efecto del propionato es consecuencia del daño celular. Los resultados obtenidos mostraron que este AGCC no afecta la viabilidad celular. Estas diferencias se atribuyen a las limitaciones del ensayo de reducción del MTT, ya que no éste no discrimina entre

los efectos citotóxicos o citostáticos. Por otro lado, las células tratadas con octanoato ( $\geq 5$  mM) mostraron una disminución en la viabilidad celular a las 24 h (Fig. 10), siendo ésta más evidente a las 48 h, en donde en todas las concentraciones ejercieron una reducción significativa (30-54 %). En este sentido, un estudio reportado por Sakurazawa y Ohkusa (2005) indica que el ácido propiónico (4.7-5.3 mM) induce apoptosis en células HeLa, Vero y Hep-2, las cuales son líneas celulares derivadas de cáncer. Por otro lado, se conoce también que el butirato (4 mM/48 h) induce apoptosis a través de la regulación negativa de la expresión y actividad funcional de la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , lo que conduce a la perturbación de la adhesión a la matriz extracelular en células de cáncer colorrectal (Buda *et al.*, 2003). Sin embargo, se requiere de estudios posteriores en este sentido para determinar cuáles son las causas que conducen a la muerte de las CEMB por efecto del octanoato.

Algunas cepas de *S. aureus* causantes de la mastitis en bovinos son capaces de invadir a la CEMB, vivir dentro de ella y reproducirse, evitando así al sistema inmune del hospedero (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que el butirato modula la invasión de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Por lo que sugerimos que otros AGCC también pueden modular este proceso. El motivo por el cual se evaluó el efecto del propionato de sodio durante el mismo proceso es debido a que se ha reportado que tiene efectos antiinflamatorios y modula la expresión de LL-37 (Schauber *et al.*, 2003; Tedelind *et al.*, 2007), pudiendo actuar durante la mastitis bovina. Mientras que el hexanoato y el octanoato son componentes de la leche bovina, y están en contacto con la bacteria y las CEMB durante el proceso infeccioso intramamario. Por lo anterior, se determinó si los AGCC evaluados en este trabajo afectaban la invasión de *S. aureus* en las CEMB.

El propionato de sodio redujo la invasión bacteriana en las CEMB (hasta un 55 %), excepto a 5 mM (Fig. 11), mientras que el hexanoato (Fig. 11) en todas las concentraciones disminuyó el número de UFC recuperadas (44, 56, 65, 52, 39 y 60 %). El efecto inhibitorio en ambos casos fue más evidente que el reportado

para el butirato de sodio (~50 %) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). La disminución de la invasión fue mayor cuando se utilizó 1 mM de estos AGCC. Se ha reportado la presencia de receptores acoplados a proteína G (GPR41 y GPR43) en las CEMB, los cuales se activan con acetato y propionato (Yonezawa *et al.*, 2009). Por lo que se sugiere, que el efecto del propionato y del hexanoato de inhibir la invasión bacteriana puede deberse a la activación de estos receptores y a su saturación. En nuestro grupo de trabajo se están realizando estudios al respecto con el fin de determinar la participación de estos receptores en la endocitosis de *S. aureus*.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el octanoato de sodio sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB, se decidió eliminar las concentraciones de 5 y 10 mM para los ensayos de invasión. El octanoato en concentraciones de 0.0625-0.5 mM aumentó la invasión bacteriana (35, 43, 41 y 77 %); sin embargo, al utilizar las concentraciones de 0.75, 1, 2 y 3.5 mM esta invasión disminuyó hasta en un 80 % aproximadamente (Fig. 12). Existen varios reportes que indican que los AGCC tienen un efecto inhibitorio en la invasión de patógenos intracelulares. Se sabe que el butirato puede proteger a las células CaCo-2 contra los primeros pasos de la patogénesis de *C. jejuni* (durante la invasión y traslocación), en una forma dependiente de la concentración y del tiempo de incubación (2.5 mM/24 h). Asimismo, la administración de ácido octanoico y su monoacilglicérido en la dieta de conejos les confiere resistencia contra la cepa *E. coli* O128 enteropatógena. En este mismo sentido, estudios llevados a cabo en aves de corral, demuestran que el ácido propiónico y hexanoico disminuyen la invasión de *Salmonella* en las células de epitelio intestinal DIV-1 y en las células de epitelio intestinal T84 (Van Immerseel *et al.*, 2003; Van Immerseel *et al.*, 2004b). Mientras algunos AGCC inhiben la invasión de patógenos intracelulares, se ha observado que otros AGCC (ej. acetato) pueden aumentar la expresión de genes de virulencia en *Salmonella* Typhimurium, lo que puede facilitar la invasión bacteriana (Van Immerseel *et al.*, 2006). Se requieren estudios posteriores para determinar por qué se ve favorecida la internalización de *S. aureus* a bajas concentraciones (0.0625-0.5 mM) y por qué se inhibe a altas concentraciones.

La inmunidad innata es la primera defensa del hospedero durante los estadíos iniciales de la mastitis bovina. La resistencia del hospedero a la infección se debe principalmente al desarrollo de diferentes mecanismos de defensa; como la fagocitosis del microorganismo por neutrófilos o macrófagos, la activación del complemento o la producción de NO (Bogdan *et al.*, 2000). El NO es una molécula efectora del sistema inmune, neuronal y del tejido cardiovascular, y es un mensajero fisiológico importante (Tripathi *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que las CEMB son capaces de producir NO durante la respuesta inflamatoria, esta molécula es producida por la enzima iNOS en la glándula mamaria (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). En el presente trabajo, los AGCC no tuvieron efecto sobre la producción de NO en las CEMB (Figs. 13-15). Estos datos difieren con lo reportado para el butirato de sodio, el cual induce la producción del NO de manera dependiente de la concentración (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Por otro lado, la infección con *S. aureus* aumentó la producción de NO, lo cual coincide con trabajos similares reportados en líneas celulares de ratón y CEMB donde la infección provocó un aumento significativo en la producción del NO (Bolander, 2001; Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Finalmente, el propionato y el hexanoato de sodio disminuyeron la producción del NO durante la infección (Figs. 13 y 14). Sin embargo, cuando las CEMB fueron estimuladas con octanoato y se infectaron se observó un comportamiento distinto. La inducción generada por la infección se mantuvo con los distintos tratamientos de este AGCC (Fig. 15). A pesar de que se observó un aumento en la producción de NO en las CEMB tratadas con octanoato e infectadas, respecto a las CEMB tratadas con el AGCC, este efecto puede atribuirse solamente a la infección bacteriana. Estos resultados no coinciden con los reportados para el butirato de sodio, donde se indica que durante la infección este AGCC estimula la producción del NO en las CEMB, hasta 10 veces (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

Otros elementos de la inmunidad innata son los péptidos antimicrobianos, los cuales ayudan a limitar la infección microbiana o, en algunas instancias, actúan como un componente en respuesta a la inflamación o a la infección. Se ha reportado que en el epitelio mamario bovino se expresan las  $\beta$ -defensinas (Yang

*et al.*, 2006; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). En este sentido, la expresión de la  $\beta$ -defensina bovina de neutrófilos 5 (BNBD5) se ve fuertemente inducida en las CEMB por infecciones bacterianas (Goldammer *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado la expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB y que ésta puede ser modulada por *S. aureus* (López-Meza *et al.*, 2009). Además, hay reportes que indican que el butirato de sodio induce la expresión de péptidos antimicrobianos, como IL-37, TAP y  $\beta$ -defensina (Kida *et al.*, 2006; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Con base en lo anterior, en el presente trabajo se decidió evaluar el efecto del propionato, hexanoato y octanoato de sodio sobre la expresión de TAP y BNBD5.

Los resultados obtenidos muestran que tanto el propionato como el hexanoato inducen la expresión del ARNm de TAP (Fig. 16A y 17A). Con el octanoato se observó un efecto inhibitorio de 0.5 veces (1 mM), y también un efecto inductor de 0.3 veces (0.5 mM) (Fig. 18A). Previamente se reportó que el butirato de sodio regula positivamente la expresión de TAP en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Además, el propionato induce la transcripción de la catelicidina LL-37 en células de epitelio de colon de humano (SW620) (Schauber *et al.*, 2003). Por otro lado, el tratamiento de las CEMB con los tres AGCC evaluados independientemente, disminuyó la expresión de BNBD5, aún en presencia de la infección (Figs. 16-18). Cabe resaltar que este es el primer reporte que muestra el efecto del hexanoato y octanoato de sodio en la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB.

Asimismo, la infección bacteriana indujo ligeramente la expresión de TAP en las CEMB (Figs. 16-18), este resultado es similar a lo reportado por Ochoa-Zarzosa *et al.* (2009) empleando butirato. Se observó también que la infección, en las CEMB, induce la expresión del ARNm de BNBD5 (Figs. 16-18). Goldammer *et al.* (2004) mostraron que el gen de BNBD5 se expresa en células de epitelio mamario bovino y que la expresión es modulada diferencialmente por bacterias patógenas. De acuerdo a esto, las  $\beta$ -defensinas se expresan en células mamarias como respuesta a infecciones bacterianas (Goldammer *et al.*, 2004; Swanson *et*

*al.*, 2004; Petzl *et al.*, 2008; López-Meza *et al.*, 2009; Tetens *et al.*, 2010). Cuando las CEMB se infectaron y se trataron con propionato (0.25-10 mM), se observó un aumento en la expresión de TAP, excepto a 5 mM (Fig. 16A). El octanoato en conjunto con la infección también indujo la expresión del ARNm de TAP (Fig. 18A). En este sentido, es bien sabido que la expresión de péptidos antimicrobianos es regulada de manera tejido-específica a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona l y que es dependiente del estímulo (Schauber *et al.*, 2003). La inducción en la expresión de los PA correlaciona negativamente con la reducción en la invasión de *S. aureus* en las CEMB tratadas con propionato y octanoato de sodio. Por otro lado, no se observó relación entre la expresión del ARNm de TAP y BNBD5 y la disminución de la invasión bacteriana al utilizar los tratamientos de hexanoato. El mecanismo molecular por el cual actúan estos AGCC no se ha dilucidado completamente, pero se sabe que en las CEMB infectadas con *S. aureus* y tratadas con butirato de sodio (0.25 y 0.5 mM) se incrementa la acetilación de la histona H3, lo que puede conducir a una remodelación de la cromatina (relajamiento), con efectos directos sobre la expresión de genes y alteraciones en las rutas de señalización (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009).

Las células epiteliales también son capaces de responder a la intrusión bacteriana por medio de la producción de citocinas, teniendo mayor participación en el inicio de la inflamación (mastitis bovina) (Lahouassa *et al.*, 2007). Previamente se ha reportado la expresión de citocinas en epitelio mamario bovino (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Al evaluar la expresión del gen del TNF- $\alpha$  se observó una expresión basal en las CEMB, la cual aumentó 14 veces por la invasión de *S. aureus* (Figs. 19-21). Lahouassa *et al.* (2007) demostraron que el estímulo bacteriano induce la expresión del ARNm del TNF- $\alpha$ , la cual varía según la cepa bacteriana utilizada. Está inducción también se observó al infectar a las CEMB con *S. aureus* (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). Las CEMB tratadas con los AGCC en general mostraron una inhibición en la expresión del gen de esta citocina pro-inflamatoria, solo el hexanoato y el octanoato a 0.5 mM tuvieron un efecto inductor (Figs.19-21). Se sabe que los AGCC tienen un efecto antiinflamatorio sobre células endoteliales, de epitelio de colon y en neutrófilos,



disminuyendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias (como el TNF- $\alpha$ ) al inhibir el factor NF- $\kappa$ B (Tedelind *et al.*, 2007; Zapolska-Downar y Naruszewicz, 2009; Meijer *et al.*, 2010; Canani *et al.*, 2011). Un estudio realizado en macrófagos de murino (RAW 264.7) demostró que el propionato y el butirato de sodio ejercen actividad antiinflamatoria al inhibir la expresión de la iNOS, el TNF- $\alpha$  y la IL-6 inducida por el INF- $\gamma$ , mientras que aumentan la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, involucrando las rutas de señalización de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B y ERK (Park *et al.*, 2007). En este estudio se demostró que los AGCC no permiten que *S. aureus* estimule la expresión del gen del TNF- $\alpha$ .

Los cambios en la expresión del TNF- $\alpha$  en las CEMB infectadas y tratadas con los AGCC también fueron cuantificados a nivel de proteína. Las CEMB mostraron una liberación basal de la proteína al sobrenadante, la cual aumentó con la infección bacteriana hasta 1.7 veces (Figs. 19-21). Los datos anteriores concuerdan con un estudio previo, donde se indica que la infección bacteriana de las CEMB induce hasta 2 veces la liberación del TNF- $\alpha$  (Lahouassa *et al.*, 2007). Las CEMB tratadas con propionato aumentaron la liberación de la proteína (Fig. 19B). Mientras que con el hexanoato y el octanoato se observó un efecto inhibitorio, aunque en algunas condiciones no se observó modificación (Figs. 20B y 21B). Tedelind *et al.* (2007) demostraron que los AGCC (acetato, propionato y butirato) disminuyen la liberación del TNF- $\alpha$  al medio de cultivo estimulada por LPS. Al evaluar la producción del TNF- $\alpha$  liberado al MC de las CEMB tratadas con los AGCC e infectadas, se observó un comportamiento general, en donde no se modificó el efecto inductor generado por la infección (Figs. 19-21). Por lo que se sugiere que los tres AGCC empleados en este estudio no afectan la liberación del TNF- $\alpha$  inducida por *S. aureus*.

No se presentó relación entre la expresión del gen del TNF- $\alpha$  y la producción de la proteína, excepto en las CEMB infectadas con *S. aureus*. La concentración celular de una proteína es determinada por el balance entre distintos procesos (ej. la transcripción, las modificaciones post-transcripcionales, la

síntesis de proteínas, las modificaciones post-traduccionales, el transporte de la proteína y la degradación de la misma). El mecanismo por el cual se produce el TNF- $\alpha$  inicia con un estímulo (ej. LPS), el cual induce una ruta de señalización que resulta en la activación del inhibidor kappa-B quinasa (I $\kappa$ B quinasa), este último fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$  para su posterior degradación, permitiendo que el factor NF $\kappa$ B se transloque al núcleo. Ya en el núcleo, el NF $\kappa$ B se une al promotor del gen del TNF- $\alpha$ , permitiendo la transcripción del ARNm y la traducción del precursor de la citocina (pro-TNF) en el citoplasma. El péptido maduro se genera por la acción de la enzima convertidora del TNF- $\alpha$ , lo que culmina en la liberación del TNF- $\alpha$  al espacio extracelular (Cairns *et al.*, 2000). En este trabajo los tres AGCC no afectaron la liberación del TNF- $\alpha$  al MC inducida por la bacteria; este efecto posiblemente se debe a modificaciones post-traduccionales, que estimulan la generación del TNF- $\alpha$  maduro y su liberación al MC.

Las CEMB son centinelas de la respuesta inmune de la ubre, formando parte esencial de la defensa contra los patógenos invasores. Estas células, en respuesta a estímulos bacterianos, secretan citocinas (como el TNF- $\alpha$ ) y quimiocinas (Günther *et al.*, 2011). Las consecuencias inmunológicas de la disminución en la inducción del TNF- $\alpha$  durante la infección pueden ser muy severas. El TNF- $\alpha$  no sólo induce la síntesis de otras citocinas (ej. IL-8), ayuda al reclutamiento y activación de neutrófilos en el sitio de la infección y facilita la formación de granulomas, los cuales ayudarán en la eliminación del patógeno. Es importante mencionar que esta citocina ejerce un efecto sobre las rutas de señalización de los factores AP-1 y NF- $\kappa$ B, por lo cual una deficiencia en la inducción del TNF- $\alpha$  puede afectar la activación del NF- $\kappa$ B, lo que desconectaría una arma importante de la inmunidad (Yang *et al.*, 2008). Los AGCC al mantener la producción del TNF- $\alpha$  en las CEMB infectadas pueden estar favoreciendo la respuesta inmune.

Con base en los resultados que se obtuvieron en este trabajo se puede concluir que los tres AGCC favorecen la disminución de la invasión de *S. aureus*

en las CEMB. No se observó relación entre la producción de NO y la disminución de la invasión bacteriana. El propionato y el octanoato regulan positivamente la expresión de TAP, lo cual puede relacionarse con la disminución en la invasión bacteriana. Los tres AGCC inhiben a nivel transcripcional la expresión del TNF- $\alpha$ . El mecanismo por el cual estos compuestos ejercen efectos inmunomoduladores en las CEMB, no ha sido dilucidado, aunque se sabe que son capaces de activar diferentes rutas de señalización a través de los GPR's.

## 9. CONCLUSIONES

El propionato, hexanoato y octanoato de sodio disminuyen la invasión de *S. aureus* en las CEMB y modula la expresión de genes de la respuesta inmune. Los resultados obtenidos sugieren que los AGCC pueden actuar como moduladores efectivos de la expresión de genes de la inmunidad innata de la glándula mamaria, lo que lleva a una mejor defensa contra la infección bacteriana.

## 10. REFERENCIAS

- Aguirre, E., López-Bernardo, E. and Cadenas, S. 2011. Functional evidence for nitric oxide production by skeletal-muscle mitochondria from lipopolysaccharide-treated mice. *Mitochondrion*. [doi:10.1016/j.mito.2011.05.010].
- Ahmad, M.S., Krishnan, S., Ramakrishna, B.S., Mathan, M., Pulimood, A.B. and Murthy, S.N. 2000. Butyrate and glucose metabolism by colonocytes in experimental colitis in mice. *Gut*. 46: 493-499.
- Al-Lahham, S.H., Peppelenbosch, M.P., Roelofsen, H., Vonk, R.J. and Venema, K. 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*. 1801: 1175-1183.
- Alexander, E.H. and Hudson, M.C. 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 361-366.
- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J. and Oliver, S.P. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79: 1021-1026.
- Almeida, R.A. and Oliver, S.P. 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathogen.* 31: 205-212.
- Almeida, R.A., Patel, D., Friton, G.M. and Oliver, S.P. 2007. Intracellular killing of mastitis pathogens by penethamate hydriodide following internalization into mammary epithelial cells. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30: 151-156.
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdéz-Alarcón, J.J. and Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 8: 358-361.

- Armenteros, A., Peña, J., Pulido, J.L. and Linares, E. 2002. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 24: 99-105.
- Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z. and Schwartz, B. 2002. Different molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J. Nutr.* 132: 1812-1818.
- Bauman, D.E. and Griinari, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 203-227.
- Bergman, E.N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70: 567-590.
- Blowey, R. and Edmondson, P. 2009. *Mastitis Control in Dairy Herds*. 2<sup>nd</sup> edition. United Kingdom. CABI Publishing. 266 pp.
- Bogdan, C., Rölinghoff, M. and Diefenbach, A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173: 17-26.
- Bolander, F.F. 2001. The role of nitric oxide in the biological activity of prolactin in the mouse mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174: 91-98.
- Boulanger, V., Bouchard, L. and Zhao, X. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J. Dairy Sci.* 84: 1430-1437.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Vanparys, A., Volf, J., Mahu, M., Van Immerseel, F., Rychlik, I., Dewulf, J., Ducatelle, R. and Pasmans, F. 2008. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet. Microbiol.* 132: 319-327.
- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P. and Talbot, B.G. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin binding proteins. *Microb. Pathogen.* 35:159-168.

- Buda, A., Qualtrough, D., Jepson, M.A., Martinez, D., Paraskeva, C. and Pignatelli, M. 2003. Butyrate downregulates  $\alpha_2 \beta_1$  integrin: a possible role in the induction of apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Gut*. 52: 729-734.
- Butzner, J.D., Parmar, R., Bell, C.J. and Dalal, V. 1996. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*. 38: 568-573.
- Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L. and Sordelli, D. O. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 75: 886-891.
- Cairns, C.B., Panacek, E.A., Harken, A.H. and Banerjee, A. 2000. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. *Acad. Emerg. Med.* 7: 930-941.
- Canani, R.B., Di Costanzo, M., Leone, L., Pedata, M., Meli, R. and Calignano, A. 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 17: 1519-1528.
- Chakravorty, D., Koide, N., Kato, Y. Sugiyama, T., Mu. M.M., Yoshida, T. and Yokochi, T. 2000. The inhibitory action of butyrate on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 murine macrophage cells. *J. Endotoxin Res.* 6: 243-247.
- Chapman, M.A., Grahn, M.F., Boyle, M.A., Hutton, M., Rogers, J. and Williams, N.S. 1994. Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut*. 35: 73-76.
- Chen, J.S, Faller, D.V., and Spanjaard, R.A. 2003. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr. Cancer Drug Targets.* 3: 219-236.

- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhabg, G., Gresham, H. and Xiong, Y-Q. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40: 1-9.
- Cormican, P., Meade, K.G., Cahalane, S., Narciandi, F., Chapwanya, A., Lloyd, A.T. and O'Farrelly, C. 2008. Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine  $\beta$ -defensins. Immunogenetics. 60: 147-156.
- Easton, D.M., Nijnik, A., Mayer, M.L. and Hancock, R.E.W. 2009. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. Trends Biotechnol. 27: 582-590.
- Emenaker, N.J., Calaf, G.M., Cox, D., Basson, M.D. and Qureshi, N. 2001. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating nPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. J. Nutr. 131: 3041S-6S.
- Foster, T.J. 2005. Immune evasion by staphylococci. Nat. Rev Microbiol. 3: 948-958.
- German, J.B. and Dillard, C.J. 2006. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46: 57-92.
- Goldammer T., Zerbe H., Molenaar A., Schuberth H.J., Brunner R.M., Kata S.R. and Seyfert, H.M. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 174-185.
- Günther, J., Liu, S., Esch, K., Schuberth, H.J. and Seyfert, H.M. 2010. Stimulated expression of TNF- $\alpha$  and IL-8, but not of lingual antimicrobial peptide reflects the concentration of pathogens contacting bovine mammary epithelial cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 135: 152-157.



- Günther, J., Esch, K., Poschadel, N., Petzl, W., Zerve, H., Mitterhuemer, S., Blum, H. and Seyfert, H.M. 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*- specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 79: 695-707.
- Guo, W., Xie, W. and Han, J. 2006. Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: involvement of reactive oxygen species. *Nutr. Metab.* 3:30.
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, 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.
- Hague, A. and Paraskeva, C. 1995. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. *Eur. J. Cancer Prev.* 4: 359-364.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. and Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.* 29:18-31.
- Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J. and Brummer, R.J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27: 104-119.
- Harig, J.M., Soergel, K.H., Komorowski, R.A. and Wood, C.M. 1989. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N. Engl. J. Med.* 320: 23-28.
- Inan, M.S., Rasoulpour, R.J., Yin, L., Hubbard, A.K., Rosenberg, D.W. and Giardina, C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology.* 118: 724-734.

- Isaacs, C.E., Litov, R.E. and Thormar, H. 1995. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *J. Nutr. Biochem.* 6: 362-366.
- Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. and Oono, T. 2006. Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression. *J. Dermatol. Sci.* 42: 203-214.
- Kanauchi, O., Andoh, A., Iwanaga, T., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Toyonaga, A. and Bamba, T. 1999. Germinated barley foodstuff attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 1173-1179.
- Karaki, S., Tazoe, H., Hayashi, H., Kashiwahara, H., Tooyama, K., Suzuki, Y. and Kuwahara, A. 2008. Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J. Mol. Hist.* 39: 135-142.
- Kerro-Dego, O., van Dijk, J.E. and Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24:181-198.
- Kida, Y., Shimizu, T. and 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: 1972-1981.
- Jensen, R.G. and Newburg, D.S. 1995. Bovine milk lipids. In: *Handbook of milk composition*, Jensen R.G. (ed) London, UK: Academic Press; p.543-575.
- Lahouassa, H., Moussay, E., Rainard, P. and Riollet, C. 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine.* 38: 12-21.
- 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.
- Li, C.J. and 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: 89-97.
- Li, R.W. and Li, C.J. 2006. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics.* 7: 234.
- Li, C.J., Li, R.W., Wang, Y. and Elsasser, T.E. 2007. Pathway analysis identifies perturbation of genetic networks induced by butyrate in a bovine kidney epithelial cell line, *Funct. Integr. Genomics.* 7: 193-205.
- López-Meza, J.E., Gutiérrez-Barroso, A. and Ochoa-Zarzosa, A. 2009. Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* 87: 59-63.
- Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.
- Luenser, K. and Ludwig, A. 2005. Variability and evolution of bovine  $\beta$ -defensin genes. *Genes Immun.* 6: 115-122.
- Lutzow, Y.C., Donaldson, L., Gray, C.P., Vuovolo, T., Pearson, R.D., Reverter, A., Byrne, K.A., Sheehy, P.A., Windon, R. and Tellam, R.L. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infections. *BMC Vet. Res.* 4: 18.
- Mandal, M. and Kumar, R. 1996. Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cell. *Cell Growth Differ.* 7: 311-318.

- Meijer, K., de Vos, P. and Priebe, M.G. 2010. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 13: 715-721.
- Miller, G.D., Jarvis, J.K. and McBean, L.D. 2007. *Handbook of dairy foods and nutrition.* Boca Raton, F.L.: National Dairy Council.
- Mookherjee, N., Wilson, H.L., Doria, S., Popowych, Y., Falsafi, R., Yu, J., Li, Y., Veatch, S., Roche, F.M., Brown, K.L., Brinkman, F.S.L., Hokamp, K., Potter, A., Babiuk, L.A., Griebel, P.J. and Hancock, R.E.W. 2006. Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1563-1574.
- Nair, M.K.M., Vasudevan, J.J., Hinckley, L., Hoagland, A. and Venkitanarayanan, K.S. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 88: 3488-3495.
- Nakajima, I., Muroya, S. and Chikuni, K. 2003. Growth arrest by octanoate is required for porcine preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309: 702-708.
- Nakao, S., Moriya, Y., Furuyama, S., Niederman, R. and Sugiya, H. 1998. Propionic acid stimulates superoxide generation in human neutrophils. *Cell. Biol. Int.* 22: 331-337.
- Neville, M.C. and Picciano, M.F. 1997. Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annu. Rev. Nutr.* 17: 159-184.
- 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.
- Parodi, P. W. 2004. Milk fat in human nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.* 59: 3-59.

- Parodi, P.W. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.* 127: 1055-1060.
- Park, J.S., Lee, E.J., Lee, J.C., Kim, W.K. and Kim, H.S. 2007. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- $\gamma$  stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: involvement of NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* 7: 70-77.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Sayfert, H-M., Nürenberg, G., Schuberth, H-J. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 39: 18.
- Rainard, P. and Riollet, C. 2006. Innate immunity on the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369-400.
- Raqib, R., Sarker, S., Bergma, P., Ara, G., Lindh, M., Sack, D.A., Nasirul-Islam, K.M., Gudmundsson, G.H., Andersson, J. and Agerberth, B. 2006. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 9178-9183.
- Ricke, S.C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 82: 632-639.
- Sakurazawa, T. and Ohkusa, T. 2005. Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cell. *J. Gastroenterol.* 40: 600-609.
- Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H. and 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: 735-741.

- Schrack, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.I., Dowlen, H.H. and Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407-1412.
- Schwab, M., Reynders, V., Shastri, Y., Loitsch, S., Stein, J. and Schröder, O. 2007. Role of nuclear hormone receptors in butyrate-mediated up-regulation of the antimicrobial peptide cathelicidin in epithelial colorectal cells. *Mol. Immunol.* 44: 2107-2114.
- Sears, P.M. and McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19: 171-185.
- Sina, C., Gavrilova, O., Förster, M., Till, A., Derer, S., Hildebrand, F., Raabe, B., Chalaris, A., Scheller, J., Rehmann, A., Franke, A., Ott, S., Häsler, R., Nikolaus, S., Fölsch, U.R., Rose-John, A., Jiang, H.P., Li, J., Schreiber, S. and Rosenstiel, P. 2009. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J. Immunol.* 183: 7514-7522.
- Sinha, B., François, P.P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M. and Krause, K-H. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$ . *Cell. Microbiol.* 1: 101-117.
- Sinha, B. and Herrmann, M. 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* 94: 266-277.
- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K., Schukken, Y.H., Kruse, J.V., Bradley, A.J., Zadoks, R.N. and Dowson, C.G. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4737-4743.
- Sordillo, L.M. and Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7:135-146.

- Sřivanová, E., Molatova, Z., Sřivanová, V. and Marounek, M. 2009. Inhibitory activity of rabbit milk and medium-chain fatty acids against enteropathogenic *Escherichia coli* O128. *Vet. Microbiol.* 135: 358-362.
- Susamo, H. and Ocampo, L. 1992. Pharmacological basis of treatment of bovine mastitis review. *Int. J. Vet. Med.* 47: 127-235.
- 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.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M. and Vidal, A. 2007. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 13: 2826-2832.
- Tetens, J., Friedeich, J.J., Hartmann, A., Schwerin, M., Kalm, E. and Thaller, G. 2010. The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *J. Dairy Sci.* 93: 775-783.
- Tosi, M.F. 2005. Innate immune response to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 241-249.
- Tripathi, P., Tripathi, P., Kashyap, L. and Singh, V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *Immunol. Med. Microbiol.* 51: 443-452.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. 2008a. Short chain fatty acids and L-lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers. *Avian Pathol.* 37: 379-383.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., Sevcik, M., Rychlik, I., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2004b. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hliA

- suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3582-3587.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., De Smet, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2004a. Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated *Salmonella* with chicken primary cecal epithelial cells in vitro. *Avian Dis.* 48: 384-391.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2003. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 237-248.
- Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F. Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* 35: 182-188.
- 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. *J. Dairy Sci.* 92: 2696-2705.
- Wang, L.L. and Johnson, E.A. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:624-629.
- Yang, W., Molenaar, A., Kurts-Ebert, B. and Seyfert, H-M. 2006. NF- $\kappa$ B factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine  $\beta$ -defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol. Immunol.* 43: 210-225.
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R.M., Günther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schuberth, H.J. and Seyfert, H.M. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- $\kappa$ B in mammary epithelial cells and to quickly



- induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45: 1385-1397.
- 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.
- Yonezawa, T., Yonekura, S., Sanosaka, M., Hagina, A., Katoh, K. and Obara, Y. 2004. Octanoate stimulates cytosolic triacylglycerol accumulation and CD36 mRNA expression but inhibits Acetyl coenzyme A carboxylase activity in primary cultured bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Res.* 71: 398-404.
- Zapolska-Downar, D. and Naruszewicz, M. 2009. Propionate reduces the cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression by inhibiting nuclear factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) activation. *J. Physiol. and Pharmacol.* 60:123-131.
- Zhao, X. and Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86: 57-65.
- Ziebuhr, W. 2001. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib. Microbiol.* 8: 102-107.