



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**



**MAESTRÍA INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto inmunomodulador de péptidos antimicrobianos de plantas en  
células de mamífero infectadas con *Staphylococcus aureus***

Tesis que presenta:

**Bióloga Violeta Díaz Murillo**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Biológicas**

**ÁREA TEMÁTICA: Biotecnología Pecuaria**

Directora de Tesis:

**Doctora en Ciencias Biomédicas Alejandra Ochoa Zarzosa**

Co-Asesor de Tesis:

**Doctor en Ciencias Joel Edmundo López Meza**

**Morelia, Michoacán. Agosto del 2015**



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto “Innate immune-modulatory properties of plant antimicrobial peptides on mammalian cells during hostpathogen interactions” Financiado por el INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (ICGEB) No. CRP/MEX13-01. A CONACyT por la beca otorgada No. 286249).

A mis padres, hermanos, familia entera...

Mi mayor ejemplo de fortaleza

¡Gracias totales!

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera especial a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y a el Dr. Joel E. López Meza por la confianza, paciencia y constancia para la realización de éste proyecto.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Carlos Cortes Penagos, Dr. Rodolfo López Gómez y Dr. José Luis Anaya López, por sus observaciones y sugerencias para la realización del proyecto.

A mis compañeros del M3 por los consejos, compañía, apoyo y amistad.

A mis compañeros de generación, por el tiempo y conocimiento compartido.

A mis amigos “Los piojjs” por su amistad incondicional. ¡Muchas gracias!.

# ÍNDICE

	Página
<b>Abstract</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>ÍNDICE</b> .....	<i>i</i>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<i>iv</i>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<i>v</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
<b>2.1 Inmunidad Innata</b> .....	4
<b>2.1.1 Receptores de reconocimiento de patrón (PRRs)</b> .....	5
<b>2.1.2 Componentes celulares y humorales</b> .....	7
<b>2.2 Mastitis Bovina</b> .....	10
<b>2.2.1 Etiología de la mastitis bovina</b> .....	11
<b>2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	12
<b>2.2.3 Mecanismo de internalización de <i>S. aureus</i> en células fagocíticas no profesionales</b> .....	13
<b>2.2.4 Inmunidad de la glándula mamaria bovina</b> .....	14
<b>2.3 Péptidos Antimicrobianos (PAs)</b> .....	19
<b>2.3.1 Características generales</b> .....	19
<b>2.3.2 Clasificación y diversidad</b> .....	19
<b>2.3.3 Péptidos antimicrobianos de plantas (PAPs)</b> .....	20
<b>2.3.4 Tioninas</b> .....	21
<b>2.3.5 Tionina Thi2.1 de <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	22
<b>2.3.6 Defensinas</b> .....	22
<b>2.3.7 Defensinas <math>\gamma</math>-tionina de <i>Capsicum chinense</i></b> .....	23
<b>2.4 Propiedades inmunomoduladoras de los PAs</b> .....	24

2.4.1	Modulación de la respuesta pro- y antiinflamatoria.....	25
2.4.2	Inducción de la quimiotaxis .....	27
2.4.3	Estimulación de la muerte bacteriana.....	28
2.4.4	Estimulación de la diferenciación celular .....	28
2.4.5	Activación de la cicatrización de heridas .....	29
2.4.6	Modulación de la apoptosis y piroptosis.....	30
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
6.1	Objetivo general .....	34
6.2	Objetivos específicos.....	34
<b>7.</b>	<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>35</b>
<b>8.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
8.1	Cultivo primario de Células Epiteliales Mamarias Bovinas (CEMB).....	36
8.2	Péptidos antimicrobianos de plantas sintéticos.....	36
8.3	Cepa bacteriana.....	36
8.4	Ensayos de viabilidad de las CEMB .....	36
8.4.1	Ensayos de exclusión de azul tripano.....	36
8.4.2	Ensayo colorimétrico por reducción metabólica de MTT.....	37
8.5	Ensayo de viabilidad de <i>S. aureus</i> .....	37
8.6	Ensayo de internalización bacteriana.....	38
8.7	Extracción de ARN y síntesis de ADN.....	38
8.8	Análisis de la expresión de genes.....	39
8.9	Cuantificación de citocinas mediante ELISA.....	40
8.10	Cuantificación de NO.....	41

8.11 Citometría de flujo.....	41
8.12 Análisis estadístico.....	42
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
9.1 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de las CEBM.....	44
9.2 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> .....	45
9.3 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la internalización de <i>S. aureus</i> .....	48
9.4 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del receptor TLR2.....	52
9.5 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la expresión de genes de la RII.....	54
9.6 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la secreción de las citocinas proinflamatorias.....	61
9.7 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la producción de NO.....	65
9.8 Modelo del efecto inmunomodulador de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina en CEMB.....	66
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Mecanismo de internalización de <i>S. aureus</i> .....	14
<b>FIGURA 2.</b> Estructura de la glándula mamaria bovina .....	15
<b>FIGURA 3.</b> Clasificación de los PAs en base a su estructura .....	20
<b>FIGURA 4.</b> Dominios de la tionina Thi2.1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
<b>FIGURA 4.</b> Secuencia putativa de aa de la $\gamma$ -tionina de <i>Capsicum chinense</i> determinada a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc .....	23
<b>FIGURA 6.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y de la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB .....	44
<b>FIGURA 7.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> .....	46
<b>FIGURA 8.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la internalización de <i>S. aureus</i> .....	49
<b>FIGURA 9.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del receptor TLR2. ....	53
<b>FIGURA 10.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la expresión de genes de la RII.....	54
<b>FIGURA 11.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la secreción de citocinas .....	61
<b>FIGURA 12.</b> Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la producción de NO .....	65
<b>FIGURA 13.</b> Modelo del efecto inmunomodulador de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la CEMB.....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Agonistas los de receptores tipo-Toll en humano y ratón .....	6
---	---



<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas (PAP) .....	21
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos específicos de genes evaluados en este trabajo .....	39

## Effects of plant antimicrobial peptides on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells infected with *Staphylococcus aureus*

**Keywords:** antimicrobial peptides, innate immunity, mammary epithelium

Antimicrobial peptides (PA) are essential components in the defense mechanisms of living organisms. They are molecules 12-100 a, cationic and amphipathic with antimicrobial and cytotoxic properties. Additionally, immunomodulatory properties attributed to them, therefore, the PA represent a therapeutic alternative against strains of microorganisms with multidrug resistance. However, it is unknown whether the plant PA (PAPs) have this activity in mammals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of PAPs (chemically synthesized) the Thi2.1 thionine of *Arabidopsis thaliana* and  $\gamma$ -methionine defensin *Capsicum chinense* on internalization of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells (bMEC). Bovine mammary epithelial cells (bBMEC) infected with *Staphylococcus aureus*: To do this, a model of host-pathogen interaction is established. For each evaluation BMEC and *S. aureus* were treated with the PAPs (0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) independently. Viability assays (trypan blue exclusion, MTT bBMEC and *S. aureus* growth kinetics, MTT and count CFU) were performed. For bMEC internalization assays were pretreated with PAPs (24 h) prior to infection with *S. aureus*. On gene expression of the innate immune response (RIL) of bMEC (RT-qPCR), secretion of cytokines (ELISA), NO production (NO<sub>2</sub> concentration) and: then the effect was evaluated PAPs presence of the TLR2 receptor (flow cytometry). Based on the results, a cytotoxic effect of PAP Thi2.1 and  $\gamma$ -thionin on the feasibility of the bMEC and *S. aureus* was discarded. The Thi2.1 thionin concentrations of 5 and 10 g / ml inhibited the internalization of *S. aureus* in 20% CMEB. Furthermore,  $\gamma$ -thionin defensin showed an inhibitory effect on the more pronounced (40%) at the concentration of 0.1 mg / ml internalization. Regarding the modulation of the innate immune response of the bMEC, the Thi2.1 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) thionin induces TLR2 abundance membrane (2 Fold), increasing expression of cytokines IL-6 (5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 7 Fold) or TNF- $\alpha$  (10  $\mu\text{g/ml}$  ~ 7 Fold). Furthermore, thionin Thi2.1 induces the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In the presence of infection, thionin Thi2.1 abundance decreases in membrane TLR2 induced by *S. aureus*, leading to decreased expression of TLR2, TNF- $\alpha$ , IL-10 and induced NO production by the bacterium . By contrast, the Thi2.1 thionin increases expression of the chemokine IL-8 (10  $\mu\text{g/ml}$ , ~3 Fold) in infected cells, and secretion of cytokines remains the same as in bMEC uninfected. Furthermore, the defensin  $\gamma$ -thionin (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) increases the abundance membrane TLR2 (~ 3 Fold) driving transcription of the following genes: TNF- $\alpha$  (~ 10 Fold), IL-1 $\beta$  (~ 10 Fold), IL-10 (~ 12 Fold), TLR2 (~ 4 Fold) and NO production (~ 5 Fold). The  $\gamma$ -thionin defensin inhibits secretion of IL-6, while TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  showed no change. In the presence of infection with *S. aureus* the  $\gamma$ -thionin (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) increase defensin membrane TLR2 abundance (~ 6 Fold) and induces transcription of: TNF- $\alpha$  (~ 15 Fold), IL-1 $\beta$  (~ 2 Fold), TLR2 (~ 2 Fold), BNBD5 (~ 2 Fold) while basal levels reduces the expression of IL-10 and NO production. Secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6

cytokine showed no change, no clutch is reduced to secretion induced by *S. aureus*. Therefore, the defensin  $\gamma$ -thionin of *Capsicum chinense* and thionin Thi2.1 *Arabidopsis thaliana* synthetic PAP differentially modulate the innate immune response (RII) of bovine mammary epithelial cells (bMEC), which may be related to the inhibition exercised on internalization

## RESUMEN

### **Efecto inmunomodulador de péptidos antimicrobianos de plantas en células de mamífero infectadas con *Staphylococcus aureus***

**Palabras Clave:** péptidos antimicrobianos, inmunidad innata, epitelio mamario

Los péptidos antimicrobianos (PA) son componentes esenciales en los mecanismos de defensa de los seres vivos. Son moléculas de 12-100 aa, catiónicos y anfipáticos con propiedades antimicrobianas y citotóxicas. Adicionalmente, se les han atribuido propiedades inmunomoduladoras, por lo cual, los PA representan una alternativa terapéutica contra cepas de microorganismos con resistencia a múltiples fármacos. Sin embargo, se desconoce si los PA de plantas (PAPs) tienen esta actividad en los mamíferos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inmunomodulador de los PAPs (sintetizados químicamente) la tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* y la defensina  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* sobre la internalización de *Staphylococcus aureus* en células de epitelio mamario bovino (CEMB). Para ello, se estableció un modelo de interacción hospedero-patógeno: células de epitelio mamario bovino (CEMB) infectadas con *Staphylococcus aureus*. Para cada evaluación las CEMB y *S. aureus* se trataron con los PAPs (0.1-10  $\mu$ g/ml) de manera independiente. Se realizaron ensayos de viabilidad (CEMB: MTT y exclusión de azul tripano; *S. aureus*: cinética de crecimiento, MTT y conteo de UFCs). Para los ensayos de internalización las CEMB se pre-trataron con los PAPs (24 h) previo a la infección con *S. aureus*. Posteriormente se evaluó el efecto de los PAPs: sobre la expresión de genes de la respuesta inmune innata (RII) de las CEMB (RT-qPCR), la secreción de citocinas (ELISA), la producción de NO (concentración de NO<sub>2</sub>) y la presencia del receptor TLR2 (citometría de flujo). Con base en los resultados, se descartó un efecto citotóxico de los PAP Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB y *S. aureus*. La tionina Thi2.1 a las concentraciones de 5 y 10  $\mu$ g/ml inhibe la internalización de *S. aureus* en las CEMB en un 20%. Por otro lado, la defensina  $\gamma$ -tionina mostró un efecto inhibitorio sobre la internalización más pronunciado (40%) a la concentración de 0.1 mg/ml. Con respecto a la modulación

de la respuesta inmune innata de las CEMB, la tionina Thi2.1 (5 µg/ml) induce la abundancia en membrana del TLR2 (2 veces), incrementando la expresión de citocinas IL-6 (5 µg/ml ~7 veces) o del TNF- $\alpha$  (10 µg/ml, ~7 veces). Además, la tionina Thi2.1 induce la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . En presencia de la infección, la tionina Thi2.1 disminuye la abundancia en membrana del TLR2 inducida por *S. aureus*, conduciendo a la disminución de la expresión de TLR2, TNF- $\alpha$ , IL-10 y la producción de NO inducidos por la bacteria. Por el contrario, la tionina Thi2.1 incrementa la expresión de la quimiocina IL-8 (10 µg/ml, ~ 3 veces) en las células infectadas, y la secreción de las citocinas se mantiene igual que en las CEMB sin infectar. Por otro lado, la defensina  $\gamma$ -tionina (0.1 µg/ml) incrementa la abundancia en membrana del TLR2 (~3 veces) conduciendo a la transcripción de los siguientes genes: TNF- $\alpha$  (~10 veces), IL-1 $\beta$  (~10 veces), IL-10 (~12 veces), TLR2 (~4 veces), así como la producción de NO (~5 veces). La defensina  $\gamma$ -tionina inhibe la secreción de IL-6, mientras que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no mostraron cambios. En presencia de la infección con *S. aureus* la defensina  $\gamma$ -tionina (0.1 µg/ml) incrementan la abundancia en membrana del TLR2 (~6 veces) e induce la transcripción de: TNF- $\alpha$  (~15 veces), IL-1 $\beta$  (~ 2 veces), TLR2 (~2 veces), BNBD5 (~2 veces) mientras que, reduce a niveles basales la expresión de IL-10 y la producción de NO. La secreción de la citocina TNF- $\alpha$  e IL-6 no mostraron cambios, sin embargo, se reduce a niveles basales la secreción inducida por *S. aureus*. Por lo anterior, los PAP sintéticos defensina  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* y tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* modulan diferencialmente la respuesta inmune innata (RII) de células de epitelio mamario bovino (CEMB), lo cual puede relacionarse con la inhibición que ejercen sobre de la internalización de *S. aureus* en estas células.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo e inadecuado de los antibióticos convencionales ha traído consigo la selección de cepas de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, tales como las llamadas “superbacterias” por ej. *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina causante de infecciones crónicas recurrentes en humanos como en animales, ocasionando un problema de salud a nivel global (Chambers 2005; Noore *et al.*, 2013).

En la medicina humana *S. aureus*, una bacteria comensal patógena oportunista, es responsable de infecciones nosocomiales, formación de abscesos, infección de heridas, osteomielitis, endocarditis, neumonía, sepsis y/o choque séptico (Foster *et al.*, 2014; Sinha y Fraunholz 2010). En la medicina veterinaria, es el principal agente causal de la mastitis bovina, pero ocasiona también enfermedades en aves de corral, cerdos y caballos (Leonard y Markey 2008). Se conoce que algunas cepas de *S. aureus* tienen la capacidad para internalizarse y persistir dentro de células fagocíticas no profesionales como, el epitelio (Wang *et al.*, 2013), endotelio (Sinha y Herrmann 2005), osteoblastos (Trouillet *et al.*, 2011) y fibroblastos (Hagggar *et al.*, 2003). Esta habilidad le permite a la bacteria evadir la respuesta del sistema inmune innato y sobrevivir en el interior de una amplia variedad de células de mamíferos (Alva-Murillo *et al.*, 2014).

Por lo anterior, las terapias antimicrobianas actuales para tratar enfermedades infecciosas se han vuelto inefectivas trayendo consigo la necesidad de establecer normas que regulen la venta y consumo de antibióticos, así como el estímulo del desarrollo de nuevos fármacos. (Noore *et al.*, 2013). Una alternativa atractiva es el estudio de elementos efectores de la respuesta inmunológica, como lo son las moléculas denominadas Péptidos Antimicrobianos (PA) y sus derivados, debido a sus propiedades antimicrobianas directas e inmunomoduladoras (Mansour *et al.*, 2014).

Los PA son moléculas conservadas evolutivamente implicadas en los mecanismos de defensa de todos los seres vivos (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Una amplia variedad de organismos los produce como su primera línea de defensa: se han aislado de bacterias, hongos, insectos, plantas, anfibios, aves, peces y mamíferos incluyendo a los humanos (Jenssen *et al.*, 2006). La función más reconocida de los PA es proteger a los organismos que los producen contra agentes infecciosos (Hancock y Scott 2000; Hancock y Sahl 2006; Mansour *et al.*, 2014).

Recientemente a los PA de origen animal se les ha reconocido como péptidos de defensa del hospedero (HDPs, por sus siglas en inglés), debido a que además de sus propiedades antimicrobianas directas, también exhiben efectos muy complejos en la respuesta inmune innata, los cuales implican la participación de varios receptores, diferentes vías de señalización y factores de transcripción regulando funciones como, la estimulación de la quimiotaxis, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la producción de citocinas anti y pro-inflamatorias, quimiocinas e incluso en la reparación de tejidos, la angiogénesis o la regulación de la apoptosis (Nijnik *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012).

Hasta el momento, las propiedades inmunomoduladoras de los PA se han determinado básicamente utilizando péptidos endógenos; es decir el efecto inmunomodulador de un PA en particular se ha estudiado en la misma especie que lo produce, o en especies cercanas (Easton *et al.*, 2009). Por lo anterior, se desconocen las propiedades inmunomoduladoras de los PA entre diversos reinos, como por ejemplo el efecto de péptidos antimicrobianos de plantas (PAP) en células de mamíferos.

Las plantas producen una gran variedad de péptidos ricos en cisteína, de los cuales, las tioninas y las defensinas, son los dos grupos más estudiados y ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Jenssen *et al.*, 2006). Reportes de nuestro grupo de trabajo indican que la expresión de PAPs, por ejemplo, la tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana*, y la defensina  $\gamma$ -tionina de chile habanero

*Capsicum chinense* en células endoteliales bovinas, son una herramienta útil para explorar actividades antimicrobianas, fungicidas y citotóxicas, particularmente en contra de bacterias y hongos patógenos de mamíferos (Anaya-López *et al.*, 2006). Además, también se ha demostrado que los medios condicionados (MC) de las células endoteliales bovinas que contienen los PAP  $\gamma$ -tionina y Thi2.1 presentan actividad en contra de *S. aureus* o *C. albicans* intracelulares en modelos de interacción hospedero-patógeno al inducir la producción de óxido nítrico (Loeza-Ángeles *et al.*, 2011), y que estos MC modulan diferentes elementos de la respuesta inmune innata de las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) infectadas con *S. aureus* (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011). Sin embargo, se desconoce si estos efectos son consecuencia de una acción directa de los PAP o si existe alguna participación de los componentes secretados por las CEMB.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inmunomodulador de los PAP sintéticos  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* y Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB.



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata comprende mecanismos evolutivamente ancestrales que proporciona a los organismos protección contra una amplia variedad de microorganismos patógenos y contra lesión tisular. Esta protección se da mediante una respuesta inflamatoria desencadenada por la activación de las células inmunes innatas fagocíticas profesionales y no profesionales (Mogensen 2009). Los mecanismos de la inmunidad innata no generan memoria inmunitaria protectora a largo plazo, aunque son necesarios para que se pueda presentar la inmunidad adaptativa. La respuesta inicial a una infección o daño ocurre en tres fases: 1) la fase innata (inmediata 0 a 4 h), 2) la respuesta innata inducida (temprana 4 a 96 h) y 3) la respuesta inmunitaria adaptativa (tardía > 96 h) (Janeway y Medzhitov, 2002).

Las células inmunes reconocen a los microorganismos patógenos y células lesionadas a través de receptores de reconocimiento de patrones de superficie membranal y citoplasmáticos (PRRs, por sus siglas en inglés). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), a menudo moléculas esenciales para la supervivencia de los microorganismos que incluyen: ácidos nucleicos de bacterias y virus, componentes celulares de hongos como  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ -mananos, la proteína flagelina o componentes de la pared celular de las bacterias como el lipopolisacárido y el ácido lipoteicoico. Además, los PRRs reconocen también a los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) que son moléculas que se encuentran normalmente en células lesionadas durante la necrosis contribuyendo a la inflamación, estas incluyen, a ATP, a la citocina IL-1 $\alpha$ , al ácido úrico, a la unión a calcio y ADN, a las proteínas citoplasmáticas S100A8 y A100A9 y a las proteínas nucleares HMGB1 (Newton y Dixit, 2012).

La respuesta inmune en el caso de una infección consiste en la habilidad para: 1) reconocer al microorganismo a través de PRRs tipo-Toll (TLRs), tipo-Nod (NLRs) y tipo Rig-I (RLRs) que reconocen PAMPs, esenciales para la sobrevivencia del microorganismo; 2) activar los mecanismos efectores liberados por las células inmunes que van a destruir en cuestión de horas a la mayoría de los microorganismos reconocidos como extraños; y 3) si la respuesta inmune innata es inadecuada o si el microorganismo patógeno logra evadir dicha respuesta, se activará y orientará una respuesta inmune adaptativa, a través de la expansión clonal de linfocitos utilizando receptores específicos para reconocer una gran variedad de antígenos generadores de anticuerpos (Shizuo *et al.*, 2006; Beutler, 2004).

### **2.1.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)**

El sistema inmune innato emplea una variedad de PRRs que pueden ser expresados en la superficie celular o en los compartimentos intracelulares, para luego ser secretados en la sangre y fluidos de los tejidos. La principal función de los PRRs incluye la opsonización, la activación del complemento, y la cascada de coagulación, la fagocitosis y activación de la vía de señalización proinflamatoria, y la inducción de apoptosis (Akira *et al.*, 2006).

La mayor familia de PRRs la comprenden los receptores tipo-Toll (TLRs). Ellos consisten en proteínas transmembranales de tipo I que contienen repetidos ricos en leucina (LRRs) y reconocen DAMPs y PAMPs de virus, bacterias, hongos y parásitos (Newton y Dixit, 2012). Los TLRs de mamíferos pertenecen a un sistema de reconocimiento y señalización ancestral, originalmente descubierto como resultado de su participación en el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Después se encontró que participaban en la defensa contra infecciones bacterianas y micóticas en el insecto adulto y que tienen una participación clave en la respuesta a una infección y daño en plantas, insectos y vertebrados (Janeway y Medzhitov 2002). Los TLRs son receptores conservados evolutivamente y están presentes desde el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hasta los humanos. Hasta ahora se han descrito 10 TLRs en humano y

13 en el ratón. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR11 y los heterodímeros TLR2-TLR1 o TLR2-TLR6 se unen a su respectivo ligando en la superficie celular, mientras que TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 y TLR13 se localizan en el endosoma. TLR4 localiza tanto en la membrana plasmática como en el endosoma (O'Neill *et al.*, 2013). Los ligandos identificados para los diferentes TLRs se enlistan en la Tabla 1 (Newton y Dixit, 2012). La señalización de los TLRs se inicia con la dimerización de los receptores inducida por el ligando, lo que activa al dominio TIR del receptor para unirse a las proteínas adaptadoras MYD88 y MAL o TRIF y TRAM. Estas proteínas activan a las cinasas IRAKs y al factor TRAF, lo que conduce a la activación de MAP cinasas (MAPKs) como JNK y P38, lo que desencadena la activación de diversos factores transcripcionales (ej. NF- $\kappa$ B, IRFs, CREB y AP1), los cuales inducen la expresión y producción de los mediadores de la respuesta inflamatoria (O'Neill *et al.*, 2013).

**Tabla 1. Agonistas de los receptores tipo-Toll en humano y ratón**

TLR	Ligando
TLR 1-2	Lipopéptidos triacilados
TLR 2-6	Lipopéptidos diacilados
TLR 3	ARN de doble cadena
TLR 4	Lipopolisacárido
TLR 5	Flagelina
TLR 7	ARN de cadena sencilla
TLR 8	ARN de doble sencilla en humanos
TLR 9	Islas CpG-ADN y hemozoina
TLR 10 <sup>a</sup>	No se conoce
TLR 11 <sup>b</sup>	Bacterias uropatógenicas y proteínas tipo-profilina
TLR 12 <sup>b</sup>	No se conoce
TLR 13 <sup>b</sup>	Bacterias uropatógenicas y ARN ribosomal

<sup>a</sup> Expresado únicamente en humanos

<sup>b</sup> Expresado únicamente en ratón

Por otro lado, hay los receptores de superficie celular expresados en macrófagos que funcionan como PRRs, los cuales median la fagocitosis. El receptor de manosa de macrófagos (MMR) funciona como un receptor fagocítico que reconoce PAMPs de una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram

negativas así como de hongos patógenos. Una vez fagocitados, los microorganismos son liberados en el lisosoma para su fusión con el fagosoma ocasionando la destrucción del patógeno. El receptor recolector de macrófagos (MSR) es otro PRRs fagocítico de macrófagos con alta especificidad de ligandos polianiónicos: ARN de doble cadena, lipopolisacárido y ácido lipoteicoico. El MSR protege a la célula contra el choque inducido por endotoxinas (Taylor *et al.*, 2005).

Los receptores de reconocimiento intracelular se expresan en el citosol y compartimentos intracelulares para detectar patógenos intracelulares e inducir la respuesta que bloquea su replicación (Janeway y Medzhitov 2002). Los receptores tipo-Nod (NLRs), NOD1 y NOD2 son receptores citosólicos que se encuentran censando ARN de doble cadena de virus y componentes del peptidoglicano bacteriano. Estas proteínas presentan un dominio CARD en el amino terminal un dominio central de unión a nucleótidos (NBD) y en el carboxilo terminal una región de repetidos ricos en leucina. El dominio CARD asociado con la cinasa RIP2 activa la señalización de MAP cinasas y NF- $\kappa$ B para conducir a la secreción de las citocinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$  e IL-18. Otra familia de receptores PRRs citosólicos son los receptores tipo-Rig I (RLRs), RIG-I, MDA5 y LGP2. Estas proteínas tienen un dominio central helicasa DExD/H-box y, un dominio carboxilo terminal regulatorio (CTD) de unión a ARN. RIG-I y MDA5 tienen dos dominios amino terminal de activación de caspasas y CARD de reclutamiento, los cuales funcionan como motivos de interacción proteína-proteína. Estos reconocen ARN de doble cadena (Newton y Dixit, 2012).

La activación de la señalización de PRRs promueve la inducción de factores transcripcionales de las células inmunes que conducen a la producción de mediadores y amplificadores de la respuesta inflamatoria desencadenada por un agente infeccioso o lesión (Newton y Dixit, 2012).

### **2.1.2 Componentes celulares y humorales**

En vertebrados, la respuesta inmune innata depende en gran medida de células inmunes de origen mieloide. La maduración y diferenciación de estas

genera a las células fagocíticas profesionales y no profesionales. Los fagocitos profesionales son: leucocitos mononucleares como monocitos, macrófagos y células dendríticas, y polimorfonucleares que incluyen a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Por otra parte, las células fagocíticas no profesionales incluyen: al epitelio, el endotelio, los fibroblastos o los osteoblastos. La comunicación entre las células se lleva a cabo a través de los llamados mediadores de la respuesta inflamatoria, entre los que incluyen citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, histamina y mediadores lipídicos como las prostaglandinas, leucotrienos y el factor activador de plaquetas (Beutler et al., 2004).

Las superficies epiteliales del cuerpo proporcionan una barrera física entre el medio interno y externo. Las células epiteliales se mantienen juntas mediante zonas de oclusión (uniones intercelulares herméticas), que forman un sello eficaz contra el ambiente externo. Los epitelios comprenden la piel y los revestimiento de las estructuras tubulares del cuerpo (tubo digestivo, vías respiratorias, o aparatos urinarios y reproductor). Las infecciones se presentan cuando el patógeno coloniza o cruza esta barrera, como lo es en presencia de heridas, quemaduras, pérdida de la integridad de los epitelios internos del cuerpo (Beutler, 2001; Beutler, 2004; Janeway, 1989).

Los epitelios de superficie son más que barreras físicas para la infección; también producen citocinas, quimiocinas y sustancias microbicidas que inhiben el crecimiento microbiano. Por ejemplo, los epitelios producen las enzimas antibacterianas, lisozima y fosfolipasa A, el pH ácido del estómago, y las enzimas digestivas, las sales biliares, los ácidos grasos y los lisolípidos, que crean una barrera química considerable para la infección. Otros epitelios producen PA como las defensinas y catelicidinas. Los epitelios internos se conocen como epitelios mucosos porque secretan un líquido viscoso llamado moco, que contiene muchas glucoproteínas denominadas mucinas. Cuando los microorganismos quedan cubiertos con moco puede evitarse que se adhieran al epitelio. Además de esta defensa, casi todas las superficies epiteliales se relacionan con una flora normal

de bacterias no patógenas, conocidas como bacterias comensales, que compiten con microorganismos patógenos por nutrientes y por sitios de fijación sobre las células epiteliales. Esta flora también puede producir sustancias antimicrobianas como, el ácido láctico y los PA llamados bacterenecinas (Janeway, 1989).

Si un microorganismo cruza una barrera epitelial y empieza a replicarse en los tejidos del hospedero, se da el reconocimiento inmediato por los PRRs y sumado al daño del tejido, se inicia una respuesta inflamatoria. Esta respuesta se caracteriza por la presencia de dolor, enrojecimiento, aumento de la temperatura e hinchazón en el sitio de la infección, lo que refleja cambios en los vasos sanguíneos locales. La inflamación tiene tres funciones esenciales en el combate de la infección: la primera es suministrar moléculas y células efectoras al sitio de infección: la segunda inducir la coagulación local de la sangre, que proporciona una barrera para la diseminación de la infección en el torrente sanguíneo; y la tercera es promover la reparación del tejido lesionado, una función considerada no inmunitaria (Beutler, 2001; Beutler, 2004).

La respuesta humoral se compone de moléculas aferentes (detección) actuando en todos los organismos multicelulares para percibir una infección y componentes eferentes (efectores) que actúan erradicando la infección. La activación celular estimula la producción de los mediadores de la inflamación. En etapas tempranas de la infección las células producen citocinas proinflamatorias (ej. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  de respuesta inmediata e IL-6 de respuesta; tardía); citocinas antiinflamatorias (ej. IL-10 e IL-4) que modulan la actividad de las citocinas proinflamatorias; las quimiocinas IL-8 e IL-20 que atraen células y moléculas al sitio de infección; PA, (ej. defensinas) que efectúan un actividad antimicrobiana directa e indirecta como inmunomoduladores, y otro componentes antimicrobianos como, NO, lisozimas y el sistema del complemento (Akira *et al.*, 2006).

El estudio de las propiedades inmunomoduladoras de los elementos de la respuesta inmune innata se ha llevado a cabo mediante el establecimiento de modelos de interacción hospedero-patógeno, por ejemplo: la actividad de los PA

se ha evaluado en cultivos celulares y en ratones estimulados con agentes infecciosos causantes de enfermedades en humanos y animales. Para el presente trabajo se empleó como modelo de estudio: células de epiteliales mamarias bovinas (CEMB) infectadas con *S. aureus*, como un ejemplo de infección crónica persistente que permite evaluar el efecto de las moléculas inmunomoduladoras.

## **2.2 MASTITIS BOVINA**

La mastitis bovina es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, es de naturaleza comúnmente infecciosa, pero también puede ser causada por una lesión (herida) y de manera menos frecuente por alergias y neoplasias. Al ser los agentes infecciosos los principales agentes etiológicos, la mastitis bovina, es considerada como una de las infecciones intramamarias (IMM) de mayor importancia a nivel mundial debido a la alta incidencia que tiene en el ganado lechero, ocasiona importantes pérdidas económicas en la ganadería lechera (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Estas pérdidas se deben a la disminución de la producción y bajo valor nutricional de la leche, a los costos en servicios de veterinaria, a la terapia antimicrobiana y al desecho temprano de vacas (Schroeder 2010).

En un estudio realizado en hatos lecheros en el oeste de Francia, se estimó que la mastitis es responsable de pérdidas del orden de 26 € por vaca anualmente, variando de 19 a 32 €/vaca/año para los diferentes tipos de hatos. En Estados Unidos de América las pérdidas ocasionadas son de alrededor de 200 dólares vaca/año y en total las pérdidas anuales han sido estimadas entre 1.5 y 2 billones de dólares. En México, el promedio de las pérdidas por vaca es de \$1,700 a \$2,000 pesos anuales (Bedolla y Ponce de León 2008).

La naturaleza del agente infeccioso determina la magnitud de la respuesta inflamatoria desencadenada en la glándula mamaria. La mastitis se presenta de forma clínica o subclínica. Sin embargo, por cada caso de mastitis clínica, ocurren de 15 a 40 casos de mastitis subclínica (Schroeder, 2010). La mastitis clínica o aguda se caracteriza por la inflamación intensa de uno o varios de los cuartos de

la cisterna, presenta signos evidentes, el animal muestra dolor al tacto y en la leche se incrementa el conteo de células somáticas (CCS) o, se detectan coágulos, descamaciones y en ocasiones sangre. Por otro lado, la mastitis subclínica o crónica es una infección de la glándula donde la respuesta inflamatoria es moderada y no exhibe signos evidentes, como resultado de ello la infección se vuelve crónica persistente, ya que solo puede ser detectada por el aumento en el CCS en la leche (Schukken *et al.*, 2011).

### **2.2.1 Etiología de la mastitis bovina**

La mastitis bovina es una enfermedad de etiología compleja, multifactorial producto de la interacción de los microorganismos, como principales agentes etiológicos, el ganado lechero, como el hospedero, y el ambiente en el que ambos habitan (Schroeder 2010).

Se han aislado más de 100 microorganismos que pueden generar la mastitis bovina, estos incluyen, virus, levaduras, hongos, algas y bacterias, siendo las bacterias los principales agentes infecciosos. Estos patógenos se han clasificado en contagiosos (aquellos que tienen como hábitat el animal) y ambientales (aquellos presentes en el medio ambiente del animal). Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *Staphylococcus 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 *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, y *Enterococcus* spp. (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Rainard y Riollet, 2006).

Sin embargo, se conoce que la mastitis con mayor prevalencia es la generada por agentes contagiosos como *S. aureus*, representando hasta un 70% de los aislamientos de la mastitis subclínica. La mastitis ocasionada por *S. aureus* se caracteriza por una respuesta inflamatoria crónica, debido a que, *S. aureus* ha desarrollado estrategias para evadir los mecanismos de defensa de la glándula mamaria y tiene la capacidad para sobrevivir intracelularmente, favoreciendo la



colonización y establecimiento. Por lo anterior, diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de los mecanismos de acción de *S. aureus* sobre la respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina, con el propósito de poder desarrollar nuevas alternativas terapéuticas.

### **2.2.2 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, coagulasa y catalasa positiva, no esporulada de ~0.5 -1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su nombre se deriva de su morfología microscópica y la coloración que presenta en el cultivo de crecimiento. Esta bacteria es un microorganismo comensal y patógeno oportunista de humanos. En la medicina humana es considerado uno de los principales agentes infecciosos nosocomiales, responsable de la formación de abscesos, infecciones de heridas, endocarditis, osteomielitis, neumonía, sepsis/choque séptico (Foster *et al.*, 2012). En la medicina veterinaria causa enfermedad en el ganado lechero (mastitis), aves de corral, cerdos y caballos (Leonard y Markey 2008). Las terapias antimicrobianas actuales para contrarrestar estas infecciones se han vuelto ineficientes debido a la aparición de cepas multifármaco resistentes por ej. *S. aureus* resistente a la metilina y a la habilidad de la bacteria para desarrollar estrategias de evasión de la respuesta inmunológica del hospedero, permitiendo su sobrevivencia intracelular (Noore *et al.*, 2013).

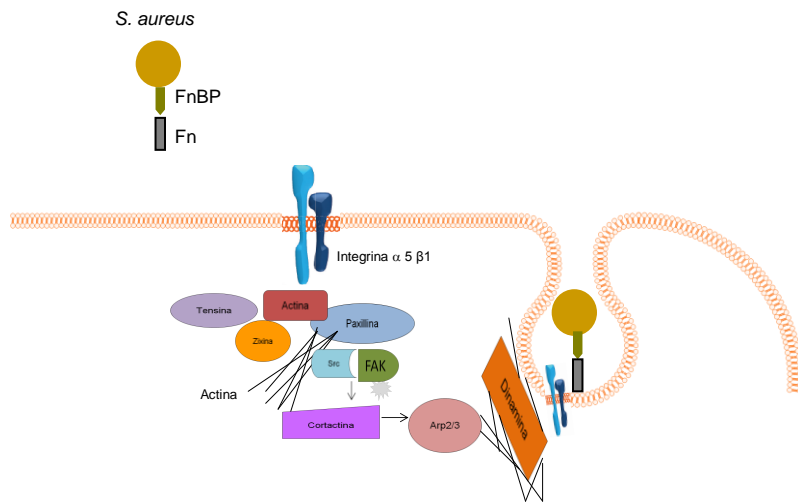
*S. aureus* posee una diversidad de factores de virulencia (adhesinas, invasivas, enzimas, toxinas y componentes superficiales) que contribuyen a la patogénesis de la infección. Esta bacteria expresa adhesinas tales como las, proteínas de unión a fibronectina (FnBPs), proteínas de unión a fibrinógeno, proteínas de unión a elastina, proteínas de unión a colágeno, factor de aglutinación, proteínas de adhesión extracelular (Eap) y la proteína A (Foster *et al.*, 2014). Expresa, también componentes celulares como, el polisacárido capsular, el péptidoglucano y el ácido lipoteicoico, además de componentes de secreción como las enzimas coagulasa, lipasa, hialuronidasa, proteasas y toxinas (enterotoxinas, hemolisinas y leucocidinas). Estos componentes promueven la

evasión de la respuesta inmunológica del hospedero por parte de la bacteria, así como su colonización, diseminación, daño en tejidos y transmisión (Foster 2005). Existen cepas de *S. aureus* que tiene la capacidad para internalizarse y persistir tanto en células fagocíticas profesionales como, no profesionales (Sinha y Fraunholz, 2010).

### **2.2.3 Mecanismo de internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales**

En 1980 se reconoció que la adhesión e internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales ocurre mediante el mecanismo “zipper”, proceso mediado por integrinas, fibronectina y FnBPs dependiente del remodelamiento del citoesqueleto de actina y la dinámica de la membrana. La importancia de la participación de las FnBPs e integrinas para desencadenar el proceso de internalización de *S. aureus* se ha demostrado experimentalmente estableciendo modelos de interacción hospedero-patógeno, los cuales incluyen evaluaciones *in vitro* utilizando como hospedero de la bacteria a células endoteliales, epiteliales, osteoblastos y fibroblastos (Alva-Murillo *et al.*, 2014).

El mecanismo de internalización “Zipper” inicia cuando la FnBP de *S. aureus* se une a la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular, formando un complejo (Fn-FnBP) en la superficie del patógeno, que es reconocido por la integrina  $\alpha 5\text{-}\beta 1$  (receptor de la célula hospedera) a través de secuencias RGD y LVD presentes en el ligando de Fn. La activación y el agrupamiento de la integrina conllevan al reclutamiento de un complejo de proteínas: actina, paxillina, tensina, zyxina (proteínas de unión focal), FAK (cinasa de adhesión focal) y de la cinasa Src al sitio de adhesión de la bacteria. La activación de FAK y Src resulta en la fosforilación de tirosinas en moléculas efectoras como la cortactina, una proteína de unión a actina. La cortactina se asocia con el complejo Arp2/3 para promover la polimerización de actina y la unión de dinamina-2 un regulador de la endocitosis. Finalmente *S. aureus* se internaliza en las células hospederas junto con la integrina (Fig. 1) (Sinha y Herrmann, 2005; Fraunholz y Sinha, 2012).



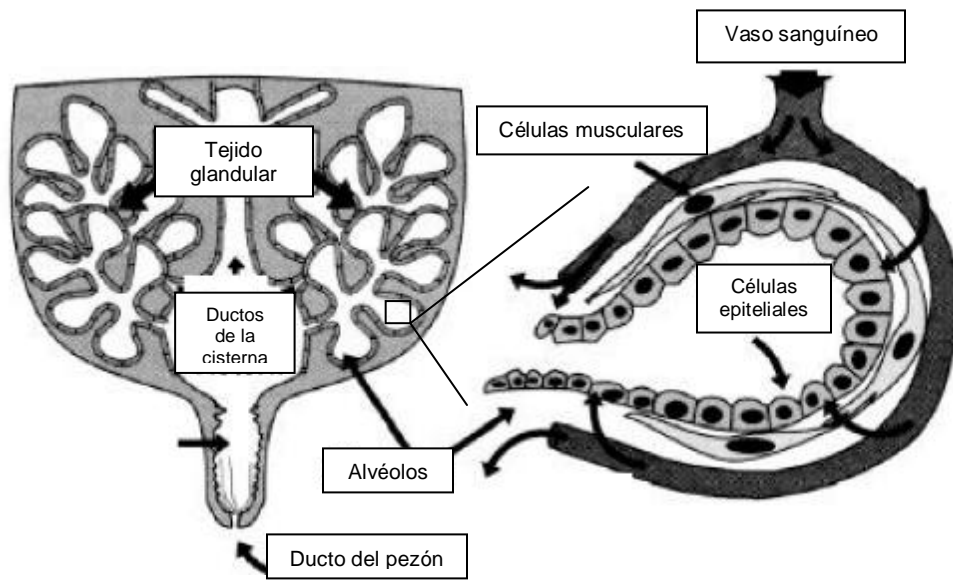
**Figura 1. Mecanismo de internalización de *S. aureus*.** La integrina  $\alpha 5\beta 1$  es la encargada de mediar la internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales. Esta se ancla a secuencias de RGD de la Fn que se encuentra unida a la FnBP de *S. aureus*. La activación y el agrupamiento de las integrinas desencadenan la vía de señalización para el reclutamiento de proteínas de unión focal (actina, paxilina, tensina y zixina), cinasa de adhesión focal (FAK) y de la cinasa Src. Estas a su vez activan a proteínas de unión a actina (cortactina) que conduce al rearrreglo del citoesqueleto. La cortactina se asocia con el complejo Arp2/3 el cual promueve la polimerización de actina y unidas, a la dinamina-2, regulan el proceso de endocitosis (modificada de Alva-Murillo *et al.*, 2014).

Otras moléculas involucradas en el proceso de internalización de *S. aureus*, son las proteínas de choque térmico (Hsps), HSP60 y Hsc70 de células epiteliales que interactúan con la FnBP e hidrolasas de la bacteria. También los receptores TLRs se han relacionado con la internalización de *S. aureus*, principalmente el receptor TLR2 que activa la respuesta inflamatoria en infecciones de *S. aureus*. Aunque no está claro si la internalización mediada por TLR2 es consecuencia de la vía de señalización activada para el reconocimiento de *S. aureus* o si participa directamente en el proceso de fagocitosis e inducción de la respuesta inflamatoria (Alva-Murillo., *et al* 2014).

### 2.2.3 Inmunidad innata de la glándula mamaria bovina

La glándula mamaria bovina está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que comprenden la combinación y coordinación de la

respuesta inmune innata y adquirida. Sin embargo, la inmunidad de la glándula mamaria bovina varía respecto a las etapas de lactación. En etapas entre el periodo seco y el parto presenta típicamente inmunosupresión, incrementando la susceptibilidad a infecciones intramamarias (IIM) (Wellnitz *et al.*, 2012). Durante etapas tempranas de la infección la respuesta inmune innata es activada rápidamente en el sitio de la infección mediada por las características anatómicas de la glándula mamaria que actúan como barreras físicas de defensa (Fig. 2), la respuesta celular y humoral. La naturalidad del agente infeccioso y la eficiencia de los mecanismos de defensa contra un agente en específico, determinarán la resistencia de la glándula mamaria IIM (Sordillo y Streicher, 2002).



**Figura 2. Estructura de la glándula mamaria bovina.** La estructura de la glándula mamaria bovina presenta el pezón, los ductos de la leche, la cisterna y el tejido glandular. El tejido glandular se conforma por sacos microscópicos llamados alvéolos que se encuentran alineados por las células epiteliales productoras de leche y que representan la principal respuesta de defensa celular de la glándula mamaria (modificada de Schroeder, 2010).

El conducto del pezón es una barrera de defensa anatómica de suma importancia debido a que es la vía de entrada de los agentes infecciosos. La barrera física del conducto del pezón es proporcionada por el músculo liso del esfínter que reviste el canal del pezón, esta barrera mantiene el cierre hermético durante el ordeño y de esta manera obstaculiza la penetración de los agentes infecciosos. Una alta permeabilidad de este músculo se relaciona directamente con la incidencia de la mastitis. Adicionalmente, el canal del pezón se encuentra revestido con queratina, derivada del epitelio escamoso estratificado. La estructura de la queratina así como sus agentes antimicrobianos (ácido mirístico, palmitoleico, linoleico, PA catiónicos, la lactoferricina y defensinas) presentes en el canal del pezón permiten la captura y muerte de los microorganismos evitando su migración a la cisterna de la glándula. La pérdida de este revestimiento se correlaciona con la susceptibilidad a la invasión y la colonización bacteriana (Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollet, 2006).

Cuando los agentes infecciosos ingresan por el conducto del pezón y evaden la defensa antimicrobiana del mismo, el conteo de células somáticas (CCS) en la leche se incrementa, estas células comprenden principalmente aquellas del sistema inmune. En la glándula mamaria de manera normal el total del CCS es  $<10^5$ /ml de leche; sin embargo, durante una IIM el CCS en la glándula mamaria es  $>10^6$ /ml de leche, causando una respuesta inflamatoria exacerbada ocasionando un daño severo en el tejido glandular (Fu *et al.*, 2013). La activación e inmunomodulación de la respuesta celular y humoral de la glándula mamaria en etapas tempranas de la patogénesis es crucial para el establecimiento y severidad de las IIM. Si la respuesta inmune de la glándula es inadecuada el daño que ocurre en el tejido glandular reduce la proliferación y la actividad de las células epiteliales mamarias contribuyendo consecuentemente, a la disminución de la producción de la leche (Schukken *et al.*, 2011).

La respuesta de defensa en la glándula mamaria la desempeñan las células residentes y las células que son reclutadas durante etapas tempranas de la patogénesis; éstas comprenden neutrófilos, macrófagos, linfocitos citolíticos (NKs),

células epiteliales y endoteliales. Los neutrófilos son los leucocitos que predominan en el tejido y en la secreción glandular durante la etapa temprana de la infección constituyendo más del 90% del total de leucocitos en la glándula mamaria (Wellnitz *et al.*, 2012).

El reconocimiento de microorganismos patógenos se da por parte de los PRRs presentes en las células inmunes fagocíticas profesionales y no profesionales presentes en la glándula mamaria (Akira *et al.*, 2006). El grupo de receptores mejor caracterizado son los receptores TLRs, 10 de los cuales están presentes en las células inmunes de bovinos (Akira y Takeda, 2004). La activación celular en la glándula mamaria estimula la producción de los mediadores de la inflamación como: 1) las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 que promueven la respuesta inflamatoria inmediatamente después de que se detecta al patógeno; 2) las citocinas antiinflamatorias como, IL-10 que modulan la actividad de las citocinas proinflamatorias; péptidos antimicrobianos, que se expresan de manera constitutiva o inducible como las  $\beta$ -defensinas de neutrófilos: BNBD3, BNBD4, BNBD5, BNBD9, BNBD10, BNBD12, DEFB1 ( $\beta$  defensina bovina), EBD ( $\beta$  defensina entérica), TAP (péptido antimicrobiano traqueal) y LAP (péptido antimicrobiano lingual) que efectúan un actividad antimicrobiana directa e indirecta como inmunomoduladores; 4) otros antimicrobianos como, el NO (Wellnitz *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013). La principal respuesta celular en la glándula mamaria está dada por las células epiteliales que interactúan de manera directa con el agente infeccioso. Las células epiteliales presentan PRRs de superficie e intracelulares, que censan la presencia de sustancias extrañas y agentes infecciosos. La célula epitelial al ser activada desencadena la defensa local mediante la transcripción y secreción de mediadores de la respuesta inflamatoria (Gilbert *et al.*, 2013).

La mastitis aguda causada por *E. coli* se caracteriza por un rápido e intenso incremento en el CCS. La severidad de la respuesta celular resulta en signos clínicos evidentes y una respuesta inflamatoria determinada por la cantidad de TNF- $\alpha$  producido por las células epiteliales mamarias al ser activadas por la

interacción del receptor TLR-4 (principalmente) con el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular bacteriana. La respuesta inmune de la glándula mamaria se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*. La respuesta temprana es similar en presencia de LPS o en presencia de la bacteria con todos sus componentes y el rápido e intenso incremento en el CCS es dosis dependiente-LPS o de la densidad de la carga bacteriana (Gilbert *et al.*, 2013; Goldammer *et al.*, 2004). La activación de las células epiteliales conduce a la producción de una gran variedad de inmunomoduladores; entre ellas, las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-2; quimiocinas como IL-2 IL-8, IL-20, y RANTES que atraen principalmente neutrófilos; factores de crecimiento como IGF-1 y CTGF; péptidos antimicrobianos como, la lactoferricina, catelicidina y defensina BNBD10; lisozimas, NO y de mediadores lipídicos, como la ciclooxigenasa-2 y 5-lipooxigenasa (Schmitz *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2013). Otros receptores como CD14 activado por LPS y agonistas de receptores citoplasmáticos como el muramil dipéptido agonista de NOD2, inducen también la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria (Ezzat *et al.*, 2014).

La mastitis crónica causada por *S. aureus* se caracteriza por un moderado y retardado incremento en el CCS por lo que los signos no son evidentes. Si bien la expresión del ARNm de TNF $\alpha$  se incrementa, la concentración de la proteína en la leche es baja (Bannerman *et al.*, 2004). La activación del receptor TLR-2 presente en las células epiteliales, es el principal encargado de reconocer a *S. aureus* o componentes de su pared celular como el, ácido lipoteicoico (LTA), lipoproteínas y péptidoglucano. La producción de los mediadores de la respuesta inflamatoria en las células epiteliales mamarias se da mediante la activación de los factores transcripcionales NF-kB y AP-1, que inducen la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y las quimiocinas IL-2, IL-3, IL-5 IL-20 e IL-8 responsables del reclutamiento principalmente de neutrófilos y la inducción de la producción de sustancias antimicrobianas como el NO (Gilbert *et al.*, 20013; Wellnitz *et la.*, 2006).

El tratamiento empleado para combatir la mastitis ha consistido en la terapia antimicrobiana clásica, es decir a través del uso de antibióticos. Sin embargo, esto

ha ocasionado la selección de resistencia en las bacterias causantes de la mastitis bovina, por lo que es necesario el estudio y comprensión de la respuesta inmune innata de la glándula mamaria para desarrollar estrategias que representen alternativas terapéuticas para tratar las IIM (Wellknitz y Bruckmaier, 2012). En este sentido, se ha considerado el estudio de los PA como alternativa terapéutica, debido a sus propiedades antimicrobianas directas e inmunomoduladoras.

## **2.3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PA)**

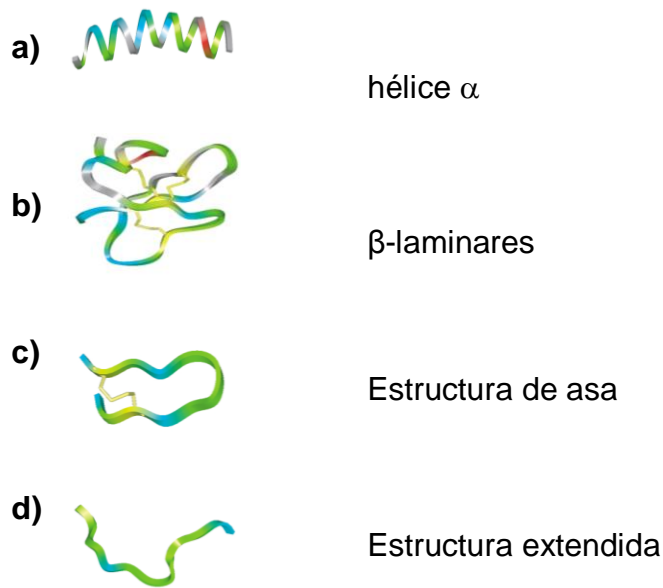
### **2.3.1 Características generales**

Los PA son moléculas anfipáticas de 12-100 residuos de aminoácidos conservadas evolutivamente e implicadas en los mecanismos de la primera línea de defensa en eucariontes, y en procariontes como un estrategia para competir por nutrientes y espacio (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Estos péptidos presentan propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y citotóxicas. Su expresión puede ser constitutiva e inducible (por ej. en un proceso infeccioso). La acción de los PA y sus derivados sintéticos va a depender de su estructura, concentración y tipo celular en el cual actúen. Actualmente se han descrito 2,584 PA reportados en la página The Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) producidos por distintos tejidos y tipos celulares de una gran variedad de especies pertenecientes a todos los reinos. Se han aislado 258 PA de bacterias, 4 de arqueas, 7 PA de protistas, 13 PA de hongos, 319 PA de plantas y 1942 PA de animales (Wang *et al.*, 2009).

### **2.3.2 Clasificación y diversidad**

Los PA se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo a su estructura secundaria: hélice  $\alpha$  (LL-37, cecropinas y magaininas);  $\beta$ -laminares, estabilizados por dos o cuatro puentes disulfuro ( $\alpha$  y  $\beta$ -defensinas humanas, ej. plectasina y protreginas); de estructura extendida ricos en glicina, prolina, triptófano, arginina o histidina (indolicina); y de asa con un puente disulfuro (bactenecina) (Fig. 2) (Hancock y Sahl 2006).





**Figura 3. Clasificación de los PA en base a su estructura.** Estructuras representativas de los cuatro grupos en los que se clasifican a los PA. a) hélice  $\alpha$  (catelicidina); b)  $\beta$ -laminar (beta defensina humana-2; c) estructura de asa (bactenecina); d) estructura extendida (indolicina bovina). (tomada de Hancock y Sahl, 2006).

### 2.3.3 Péptidos antimicrobianos de plantas (PAP)

Las plantas producen PA de 2 a 10 kDa, ricos en cisteínas los cuales pueden presentar 4, 6, 8, o 12 residuos, que les permiten formar enlaces disulfuro confiriéndoles estabilidad estructural y termodinámica bajo condiciones de estrés (ej. infección o deficiencia de nutrientes). Se han aislado de la semilla, raíz, tallo, flor, fruto y hoja. Su expresión puede ser constitutiva o inducible en respuesta a la infección por fitopatógenos (Pelegri *et al.*, 2011). Los PA de plantas (PAP) se han clasificado en 12 familias con base en la secuencia de aminoácidos, identidad, número de residuos de cisteína presentes y el patrón de enlaces disulfuro (Guzmán *et al.*, 2014). Las principales familias de PAP que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal son las defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos (LTP), ciclótidos, esnaquinas, y proteínas tipo heveína. Además de su actividad contra fitopatógenos, se ha descrito su efecto antimicrobiano contra patógenos de humanos, bacterias, virus, hongos, protozoos,

y parásitos, así como efectos citotóxicos contra células neoplásicas (Tabla 2) (Nawrot *et al.*, 2014).

**Tabla 2.** Clasificación de los péptidos antimicrobianos de plantas (PAP)

Familia	Enlaces disulfuro	Propiedades
Tioninas	3–4	Antibacterianas, Antifúngicas y Citotóxicas
Defensinas	3-4	Antibacterianas, Antifúngico y Citotóxico
Ciclótidos	3	Antibacterianas, Antifúngicas , Insecticidas y Citotóxicas
T Knotina	3	Antibacterianas y Antifúngicas
Eferdinas	0 (lLineal)	Antibacterianas y Antifúngicas
MBP-1	2	Antibacterianas y Antifúngicas
Ib-AMPs	2	Antibacterianas y Antifúngicas
LTP	3-4	Antibacterianas y Antifúngicas
Esnaquinas	6	Antibacterianas y Antifúngicas
Tipo Heveina	4	Antibacterianas y Antifúngicas
Barrelinas	6	Antibacterianas y Antifúngicas
2S Albúminas	2	Antibacterianas, Antifúngicas

### 2.3.4 Tioninas

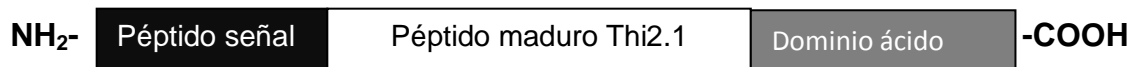
Las tioninas son un grupo de péptidos catiónicos, ricos en cisteína, con propiedades antimicrobianas y tóxicas para algunas células. Son péptidos pequeños de aproximadamente 5 kDa, presentan una estructura tridimensional con un patrón de plegamiento como la letra gamma ( $\gamma$ ), conformada por un par de hélices  $\alpha$  antiparalelas que forman un tallo y una lámina  $\beta$  antiparalela que forma un brazo horizontal (Padovan *et al.*, 2010).

Las tioninas tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias y hongos fitopatógenos, y además se ha descrito su efecto citotóxico contra células de mamíferos normales y cancerosas (Johansson *et al.*, 2003).

### 2.3.5 Tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana*

El genoma de *A. thaliana* codifica para las tioninas Thi2.1 y Thi2.2; PAPs que son regulados diferencialmente (Epple *et al.*, 1995). La tionina Thi2.1 se expresa constitutivamente en altos niveles en flores y silicuas, y es inducible en la semilla en respuesta a la producción de metil jasmonato y a la inoculación del hongo patógeno *Fusarium oxysporum*. La tionina Thi2.2 se expresa constitutivamente en semillas y su expresión no es inducible (Stotz *et al.*, 2013).

El ADNc de la tionina Thi2.1 cuenta con 402 pares de bases (pb). Esta secuencia codifica para un prepropéptido de 134 aminoácidos, formado por tres regiones, un péptido señal de 24 aa, una región central conservada y un dominio ácido C-terminal (Fig. 4). El péptido maduro presenta seis residuos de cisteína y un residuo de tirosina en la posición trece, consta de 47 aa y tiene un peso molecular de 12.36 kDa (Epple *et al.*, 1995).



**Figura 4. Dominios de la tionina Thi2.1.** El prepropéptido Thi2.1 presenta tres dominios. En el extremo N-terminal está el péptido señal, indicado en negro; el péptido maduro (Thi2.1), indicado en blanco y el dominio ácido indicado en gris en el extremo C-terminal.

### 2.3.6 Defensinas de plantas

Las defensinas son una clase de PA ricos en residuos de cisteína, los cuales difieren en su longitud, número de cisteínas, enlaces y patrones de plegamiento. Las primeras defensinas de plantas fueron aisladas de la semilla del trigo y cebada, la  $\gamma$ -purotionina ( $\gamma$ -1P) y la  $\gamma$ -hordotionina ( $\gamma$ -1H) respectivamente (Thomma *et al.*, 2002).

Las defensinas de plantas son péptidos pequeños de 45-54 aa, con un peso molecular aproximado de 5 kDa, catiónicos, y conservan típicamente 8 cisteínas.

Presentan estructuras tridimensionales compuestas por una hélice  $\alpha$  paralela a las 2-3 láminas  $\beta$  presentes, establecidas por puentes disulfuro, formando un motivo característico “Cys-estabilizado hélice  $\alpha$ - $\beta$ -laminar ( $CS\alpha\beta$ )”. Las defensinas de plantas consisten en un patrón  $\beta\alpha\beta\beta$ , mientras que las defensinas de mamíferos contienen un segmento N-terminal hélice  $\alpha$  y en su conjunto forman un patrón  $\alpha\beta\beta\beta$  (Stotz *et al.*, 2013).

Las defensinas de plantas están ampliamente distribuidas en el reino. Por ejemplo, el genoma de *A. thaliana* codifica para más de 300 defensinas, de las cuales el 78% presentan un motivo ( $CS\alpha\beta$ ) (Silverstein *et al.*, 2005).

Las defensinas de plantas presentan actividad contra hongos principalmente. Sin embargo, también se ha demostrado su actividad contra bacterias. Además de su actividad antimicrobiana directa, hay reportes de defensinas que inhiben la síntesis de proteínas, a las proteasas, o la actividad  $\alpha$ -amilasa, presentando también efectos pleiotrópicos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Stotz *et al.*, 2009).

#### 4.3.7 Defensina $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense*

La defensina  $\gamma$ -tionina del chile habanero *C. chinense* se expresa en la raíz, semilla, placenta, tallo, hojas y flores (Aluru *et al.*, 1999). Hasta ahora la proteína  $\gamma$ -tionina no ha sido detectada o aislada, solo se ha sintetizado su ADNc. La secuencia del ADNc consta de 559 pb de los cuales 324 pertenecen a la región traducida. La proteína putativa traducida a partir de la secuencia del ADNc, consiste en 107 aa, con un peso molecular aproximado de 9 kDa y está organizada en tres regiones: un péptido señal en la región N-terminal (1-25 aa) determinado mediante el programa signalP 3.0, una región central con 8 cisteínas espaciadas (28-75 aa) y una región ácida en el C-terminal que comprende los aa 76 al 107 (Fig. 5).

**MARSIYFMAFLVLAVTLFVANGVQGGNNI\*CKTTSKHFKGL\*CFADSKCRKV\*CIQEDKFE  
DGH\*CSKLQRK\*CL\*CTKN\*C\*CVFDNIPNDVGTILVQDAKTLEQALLEEEILGL**

**Figura 5. Secuencia putativa de aa de la  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* determinada a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc.** Las letras en cursivas representan la región correspondiente al péptido señal en el extremo N-terminal, la región central marcada en negritas contiene las 8 cisteínas conservadas de las defensinas de plantas indicadas con un asterisco, y las letras subrayadas corresponden al dominio ácido C-terminal (<https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

## 2.4 Propiedades inmunomoduladoras de los PA

Las propiedades e importancia de los PA en la inmunidad se han reconocido mediante modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, las propiedades inmunomoduladoras de los PA se han determinado básicamente en la misma especie que lo produce, o en su caso en especies cercanas (Easton *et al.*, 2009). Hasta el momento se desconociendo las propiedades inmunomoduladoras de los PA entre diversos reinos, ya que los estudios se han enfocando ampliamente en PA de origen animal y en particular de humanos.

En humanos son generalmente agrupados en dos familias: catelicidinas (LL-37) y defensinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), reconocidas como péptidos de defensa del hospedero (HDPs, por sus siglas en inglés). Además, con la finalidad de conducir la acción de estas moléculas a una función en específico de manera eficiente, se han generado péptidos sintéticos análogos a los naturales tales como los denominados reguladores de la defensa innata (IDRs, por sus siglas en inglés) (Fjell *et al.*, 2011; Hilchie *et al.*, 2013).

Las propiedades inmunomoduladoras que ejercen los HDPs e IDRs comprenden, la modulación de la respuesta pro y anti-inflamatoria a través de la alteración de vías de señalización; estimulan el reclutamiento de células fagocíticas y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (por ej. óxido nítrico), inducen la muerte intracelular y extracelular de bacterias; la maduración y diferenciación de leucocitos, macrófagos y células dendríticas; la cicatrización de heridas, así como la regulación de la apoptosis y piroptosis (Hilchie *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2014).

Estudios en humanos y ratones resaltan la importancia de estas moléculas en los mecanismos de defensa de los organismos. La deficiencia de la expresión de HDPs en células inmunes y en el sitio local de infección conducen a la susceptibilidad a una amplia variedad de agentes infecciosos, como es el caso de personas con el síndrome de Kostmann que tienen una deficiencia de la catelicidina LL-37 y las defensinas de neutrófilos HNP-1 y HNP-3 lo que las hace propensas a sufrir continuamente cuadros infecciosos severos (Putsep *et al.*, 2002). Además, la desregulación de la expresión de estas moléculas puede desencadenar procesos inflamatorios exacerbados, por ejemplo el aumento en los niveles de la catelicidina LL-37 está asociado con la psoriasis (Hilchie *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha demostrado la participación en la modulación de la RII de los HDPs y de derivados sintéticos como el IDR-1. Este último es un derivado de la bacteriocina bovina que no tiene la habilidad para ejercer una actividad antimicrobiana directa, ya que en modelos de ratones infectados con bacterias Gram positivas y negativas promovió una actividad antimicrobiana dependiente de la acción de monocitos y macrófagos, además de modular la respuesta inflamatoria, disminuyendo la producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (Scot *et al.*, 2007).

La eficiencia de los mecanismos que modulan los HDPs e IDRs sobre los elementos de la respuesta inmune innata y adaptativa dependerán de la estructura y concentración del péptido, el tipo celular y su estado de activación, además del agente infeccioso, y en el caso de la administración exógena la vía de administración ya sea, sistémica (intravenosa, intraperitoneal o subcutánea) o tópica (Mansour *et al.*, 2014).

#### **2.4.1 Modulación de la respuesta pro y anti-inflamatoria**

La inmunidad innata como la primera línea de defensa de los organismos es esencial para la sobrevivencia de los mismos. El mecanismo de acción de la defensa innata es la inflamación, que comprende la activación y reclutamiento celular al sitio de la infección o daño. Sin embargo, si esta respuesta inflamatoria es exacerbada puede resultar paradójicamente perjudicial al desencadenar

desórdenes en enfermedades como el cáncer, aterosclerosis, asma, enfermedades inflamatorias dermatológicas e intestinales, artritis o vasculitis. Diversos estudios han demostrado que una terapia antimicrobiana puede proporcionar beneficios clínicos (por ej. Las estatinas en la aterosclerosis). Los HDPs e IDRs han mostrado la habilidad de regular vías de señalización de la respuesta inmune innata (Hilchie et al., 2013; Gardy *et al.*, 2009).

Los HDPs pueden modular la respuesta proinflamatoria desencadenada por la activación de receptores TLRs al reconocer PAMPs. Se ha descrito que la catelicidina LL-37 en macrófagos humanos disminuye la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , desencadenada por la activación de TLRs inducida por el LPS. La catelicidina ejerce esta actividad mediante la inhibición de la traslocación al núcleo de las subunidades p50 y p65 necesarias para la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Además, la catelicidina puede modular la respuesta inflamatoria al inducir la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, y a través de la acción sobre la transcripción, estabilización y transporte del TNF- $\alpha$  (Mookherjee *et al.*, 2006). El efecto de la catelicidina en la disminución de los niveles de citocinas proinflamatorias en respuesta al LPS se ha descrito también en mastocitos humanos, neutrófilos de humanos y ratón y células dendríticas (Niyonsaba *et al.*, 2002; Niyonsaba *et al.*, 2013; Kandler *et al.*, 2006).

Al igual que las catelicidinas la mayoría de las defensinas producidas por las células epiteliales son inducidas durante la respuesta proinflamatoria, las cuales actúan modulando y disminuyendo esta respuesta (Yamashita *et al.*, 1989). La  $\alpha$ -defensina humana, de conejo y conejillo de indias activan la degranulación de mastocitos induciendo la liberación de histamina. Así mismo, la defensina HBD-2 activa mastocitos de ratón conduciendo a la liberación de histamina y la prostaglandina D<sub>2</sub> (Befus *et al.*, 1999). Además, las defensinas de neutrófilos HNP-1 y HNP-3 en monocitos humanos incrementan la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  disminuyendo los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10, actuando probablemente como amplificadores de la respuesta inflamatoria local (Chaly *et al.*, 2000).

Así como los HDPs actúan modulando la respuesta inflamatoria, sus derivados sintéticos los IDRs actúan de manera similar. El IDR-1 (200 µg/ml) fue administrado vía sistémica y local en ratones infectados con *S. aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus* resistente a la vancomicina y *Salmonella typhimurium* estimuló la activación de monocitos y macrófagos induciendo la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 modulando de esta manera la respuesta proinflamatoria desencadenada por los agentes infecciosos (Scott *et al.*, 2007). Además, el IDR-HH2 y el IDR-1018 disminuyeron la inflamación de pulmones de ratón infectados con *M. tuberculosis* y contribuyeron a la eliminación de la carga bacilar (Rivas *et al.*, 2013).

#### **2.4.2 Inducción de la quimiotaxis**

Los HDPs (especialmente las defensinas) han mostrado ejercer una acción quimioatrayente directa e indirecta. Por ejemplo, la β-defensina 2 estimula simultáneamente la respuesta inmune innata y adaptativa. La defensina se une al receptor CCR2 de la quimiocina IL-20 y en conjunto inducen la quimiotaxis de las células presentadoras de antígeno, las células dendríticas, que a su vez atraen a los linfocitos T al sitio local de infección (Röhrli *et al.*, 2010).

A altas concentraciones, los HDPs pueden actuar directamente como quimioatrayentes, reclutando células inmunes y células epiteliales. La catelicidina LL-37 (~ 1µM) atrae neutrófilos y eosinófilos humanos mediante receptores de formil péptido (FPR) (Tjabringa *et al.*, 2006). La defensina de neutrófilos HNP-1 (4 ng-4µg/kg) presentó propiedades antimicrobianas mediadas por la acción quimiotáctica al sitio de infección, al estimular el reclutamiento de macrófagos, granulocitos y linfocitos en ratas infectadas con *Klebsiella pneumoniae*. Además, la defensina HBD-2 (3 µg/ml) estimuló el reclutamiento y activación de mastocitos mediante la vía de señalización de efectores de proteínas G fosfolipasa C (Niyonsaba *et al.*, 2002). Los IDRs poseen también propiedades quimiotácticas. El IDR-1002 induce quimiotaxis de manera indirecta en un modelo de ratas infectadas con *S. aureus* y *E. coli*, además promueve la migración de monocitos y



neutrófilos mediante la integrina  $\beta 1$  dependiente de PI3K-AKT (Nijnik *et al.*, 2010). El IDR-1 (2.5-24mg/ml) estimuló *in vivo* la expresión de quimiocinas como MCP-1, MCP-3, Gro- $\alpha$  e IL-8 en monocitos murinos (Scott *et al.*, 2007).

#### **2.4.3 Estimulación de la muerte extracelular e intracelular bacteriana**

Los HDPs inducen la muerte bacteriana de manera directa mediante la alteración de la membrana permitiendo el flujo de salida de nutrientes y iones esenciales. Los péptidos se fijan, alinean e insertan en la superficie aniónica de las bacterias a través de una interacción electrostática. Antes de que puedan interactuar con la membrana plasmática deben atravesar la pared celular de péptidoglucano, la cual contiene lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas y ácido teicoico y lipoteicoico en las bacterias Gram positivas. El grado de alteración de la membrana es específico para cada péptido y directamente proporcional a la concentración del mismo. Los péptidos se unen paralelamente a la bicapa lipídica y forman un poro péptido/lípido. Conforme el diámetro del poro incrementa, los péptidos se orientan perpendicularmente e insertan en la bicapa lipídica, formando poros transmembranales. Se han propuesto varios modelos para explicar la permeabilización de la membrana: el modelo de barril, de carpeta y el del poro toroidal (Hale y Hancock 2007; Fjell *et al.*, 2012). De manera indirecta, los HDPs actúan a través de la inducción de trampas extracelulares derivadas de neutrófilos y mastocitos. Esta formación es desencadenada por la respuesta inflamatoria y la activación de plaquetas. La presencia de los HDPs en las trampas extracelulares permite la destrucción selectiva de biopelículas durante la etapa de crecimiento de las bacterias. Además, los HDPs pueden ejercer una actividad antimicrobiana, actuando intracelularmente. Los HDPs se unen electrostáticamente con el ADN y ARN e inhiben su síntesis, también se unen específicamente con una proteína de choque térmico, la DnaK, afectando el plegamiento correcto de ésta, conduciendo a la pérdida de la actividad de ATPasa. Los HDPs también inhiben la expresión de proteínas y enzimas esenciales para la formación y síntesis de la pared celular (Brogden, 2005).

#### **2.4.4 Estimulación de la diferenciación celular**

Dentro de la acción multifuncional de los HDPs como moléculas efectoras de la respuesta inmune innata y la adaptativa, pueden inducir la diferenciación celular como consecuencia de la habilidad que tienen para modular distintas vías de señalización. La catelicidina LL-37 por ejemplo, promueve la diferenciación y activación de células dendríticas estimulando la actividad endocítica, la expresión de receptores fagocíticos y la expresión de moléculas co-estimuladoras (Davidson *et al.*, 2004). La defensina mBD2 tiene la capacidad de promover la maduración funcional y fenotípica de células dendríticas murinas. El tratamiento con esta defensina estimula la expresión de moléculas co-estimuladoras como, CD40, CD80 y CD86, además, la producción de esta defensina en las células dendríticas estimula la polarización de linfocitos T al estimular la producción de citocinas como, IL-12, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Biragyn *et al.*, 2002). El IDR-1018 por su parte, induce la diferenciación de monocitos a macrófagos (Pena *et al.*, 2013).

#### **2.4.5 Activación de la cicatrización de heridas**

La reparación de heridas es un proceso muy dinámico que implica la relación entrecruzada de mecanismos como: la inflamación, el reclutamiento celular, la formación de tejido (por ej. conectivo y angiogénesis) y la reorganización de la matriz extracelular. La curación de las heridas es primordial debido a que estas brindan condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos que ocasionan heridas crónicas. Se ha descrito que ciertos HDPs e IDRs, pueden favorecer la cicatrización de heridas (Mansour *et al.*, 2014). Por ejemplo, la catelicidina LL-37 presenta funciones importantes en el proceso de cicatrización de heridas, induce la quimiotaxis de células epiteliales y la producción de metaloproteinasas, que son responsables de la reestructuración de la matriz extracelular (Peters *et al.*, 2010). La ausencia de este péptido evita la re-epitelización de heridas crónicas como las úlceras (Hilchie *et al.*, 2013). Diversos estudios reportan que las  $\beta$ -defensinas promueven la migración de queratinocitos a través de la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico

(EGFR) dependiente de STAT1 y STAT3. La catelicidina también actúa a través del receptor formil péptido FPRL-1, el cual conduce a la activación de las cinasas PI3K/AKT y MAPK (Niyonsaba *et al.*, 2007). El péptido HB-107, derivado de la cecropina B, en un modelo *in vivo* estimuló la hiperplasia de queratinocitos y el reclutamiento de leucocitos mediante la inducción de la expresión de la quimiocina IL-8 contribuyendo a la cicatrización de heridas en ratones (Lee *et al.*, 2004).

#### **2.4.6 Modulación de la apoptosis y piroptosis**

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada no inflamatorio, desencadenado por vías de señalización controladas. La finalidad de este proceso es controlar y destruir el desarrollo y crecimiento de células dañadas y con ello evitar la aparición de enfermedades como el cáncer. La producción de HDPs en células dañadas conduce a la estimulación temprana de la apoptosis evitando con ello la diseminación de infección o un daño de tejido/órgano más severo. La catelicidina LL-37 promueve la apoptosis en células epiteliales infectadas con *Pseudomonas aeruginosa* a través de la activación de las caspasas 3 y 9. Contrario a lo anterior, la catelicidina inhibe la apoptosis de neutrófilos, alargando su vida media a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G y el receptor P2X7 (Hilchie *et al.*, 2013). Los HDPs participan en la modulación de la apoptosis, en células epiteliales y neutrófilos (Barlow *et al.*, 2010).

La piroptosis es otra forma de muerte celular programada asociada a la respuesta inflamatoria desencadenada por un agente infeccioso. Este proceso requiere de la participación de receptores intracelulares tipo-Nod que al reconocer PAMPs activan a la caspasa 1, y ésta por su parte activa un complejo intracelular, denominado inflamosoma que induce el procesamiento de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. Esta producción exacerbada de citocinas proinflamatorias sin modulación alguna puede ocasionar daños irreparables en los tejidos. La catelicidina LL-37 inhibe la piroptosis en macrófagos estimulados con LPS a través de la inhibición de la activación de la caspasa 1 y el receptor purinoceptor 7 (P2X7) (Mansour *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014).

### 3. ANTECEDENTES

A los PA de humanos se les ha reconocido como péptidos de defensa del hospedero (HDPs, por sus siglas en inglés), debido a que además de sus propiedades antimicrobianas directas, también exhiben efectos muy complejos en la respuesta inmune innata y adquirida, implicando varios receptores, vías de señalización y factores de transcripción (Nijnik *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012). Sin embargo, las propiedades inmunomoduladoras de los PA se han determinado utilizando péptidos endógenos; es decir el efecto inmunomodulador de un PA en particular se ha estudiado en la misma especie que lo produce, o en su caso en especies cercanas (Easton *et al.*, 2009). Desconociéndose hasta el momento, las propiedades inmunomoduladoras de PA entre diversos reinos.

Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo indican que los PAP pueden efectuar actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras en células de mamífero. Mediante un sistema heterólogo de expresión, usando células endoteliales bovinas, de los PAPs defensina  $\gamma$ -tionina y tionina Thi2.1 se demostró el efecto antimicrobiano del (MC) de las células transfectadas sobre la viabilidad de diversos patógenos de mamíferos (Anaya-López *et al.*, 2006; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008; Loeza-Ángeles *et al.*, 2008; Loeza-Ángeles *et al.*, 2011).

El MC de las células productoras de la defensina  $\gamma$ -tionina exhibe propiedades inhibitorias sobre el hongo *C. albicans* y efectos citotóxicos contra la línea tumoral HeLa (Anaya-López *et al.*, 2006). Por otra parte, el MC de las células productoras de la tionina Thi2.1 presenta actividad contra diversos aislamientos de *S. aureus* de casos de mastitis bovina (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008), y actividad contra bacterias patógenas Gram negativas como *E. coli* enteropatógena (responsables de diarreas en humanos), contra hongos como *C. albicans* y hacia células tumorales de pulmón (A549), de mama (MCF7) y de cervix (HeLa) (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se demostró bajo esta misma estrategia que los MC que contienen los PAP  $\gamma$ -tionina y Thi2.1 presentan actividad en contra de *S. aureus* o

*C. albicans* intracelulares en modelos de interacción hospedero-patógeno al inducir la producción de óxido nítrico (Loeza-Ángeles *et al.*, 2011). Por lo cual surgió la idea de evaluar la participación de los MC sobre la RII de las CEMB.

Para determinar si la actividad de los MC que contienen los PAP  $\gamma$ -tionina y Thi2.1 en contra de patógenos intracelulares era la consecuencia de la estimulación de la RII de las células hospederas, se estableció un modelo de interacción hospedero-patógeno: células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) infectadas con *S. aureus* (internalizado). En este modelo se encontró que los MC que contienen los PAP  $\gamma$ -tionina y Thi2.1 producidos por células endoteliales pueden modular diferentes elementos de la respuesta inmune innata (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque los MC que contienen los PAPs han mostrado propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, el efecto de los péptidos no se puede atribuir directamente a ellos, debido a que el MC contiene otras moléculas secretadas por las células endoteliales. Por lo cual, el estudio del presente trabajo se centró en evaluar el efecto inmunomodulador de los PAPs sintéticos  $\gamma$ -tionina de *C. chinense* y Thi2.1 de *A. thaliana* durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas de salud a nivel mundial lo representa la selección de cepas de microorganismos resistentes a múltiples fármacos, tales como las llamadas “superbacterias” por ej. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, causante de infecciones crónicas recurrentes tanto en humanos (por ej., endocarditis, sepsis/choque séptico) como en animales (mastitis). Por lo anterior, las terapias antimicrobianas actuales para tratar enfermedades infecciosas se han vuelto inefectivas trayendo consigo la necesidad de establecer normas que regulen la venta y consumo de antibióticos, así como el estímulo del desarrollo de nuevos fármacos. De aquí la importancia del estudio de elementos efectores de la respuesta inmunológica como lo son las moléculas denominadas péptidos antimicrobianos (PA) y sus derivados (IDRs), ya que representan una alternativa terapéutica debido a sus propiedades antimicrobianas directas e inmunomoduladoras.

El estudio de los PA e IDRs mediante modelos *in vitro* e *in vivo*, se ha enfocado ampliamente en PA de origen animal, en particular las catelicidinas y defensinas humanas. Además, las propiedades inmunomoduladoras de los PA se han determinado básicamente utilizando péptidos endógenos; es decir el efecto inmunomodulador de un PA en particular se ha estudiado en la misma especie que lo produce, o en su caso en especies cercanas (Easton *et al.*, 2009). Por lo que se desconocen hasta el momento las propiedades inmunomoduladoras de PA entre diversos reinos, como por ejemplo el efecto de PAPs en células de mamíferos. Hasta nuestro conocimiento, el único antecedente relacionado con las propiedades inmunomoduladoras de los PAPS, son los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, donde se demostró el efecto inmunomodulador de los MC células productoras de los PAPs  $\gamma$ -tionina y Thi2.1.

Por lo anterior, se plantea la posibilidad de que los PAP sintéticos  $\gamma$ -tionina y Thi2.1 modulan la RII de CEMB infectadas con *S. aureus* (internalizado).

## 5. HIPÓTESIS

Los PAPs sintéticos Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* y  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* estimulan la respuesta inmune innata (RII) de células de epitelio mamario bovino (CEMB), disminuyendo la internalización de *Staphylococcus aureus*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

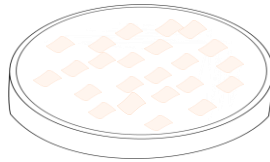
Evaluar el efecto inmunomodulador de los PAP sintéticos Thi2.1 de *A. thaliana* y  $\gamma$ -tionina de *C. chinense* durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.
2. Analizar la abundancia del receptor TLR2 en las CEMB tratadas con los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina e infectadas con *S. aureus*.
3. Evaluar la expresión de genes de elementos representativos de la RII de CEMB tratadas con los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina e infectadas con *S. aureus*.
4. Evaluar la secreción de citocinas en las CEMB tratadas con los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina e infectadas con *S. aureus*.
5. Evaluar la producción de NO en las CEMB tratadas con los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina e infectadas con *S. aureus*.

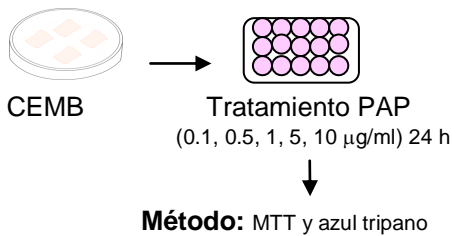
## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 1. Cultivo primario de CEMB

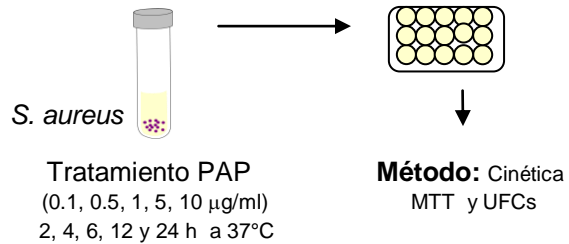


Medio DMEM/F12-Ham  
37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>

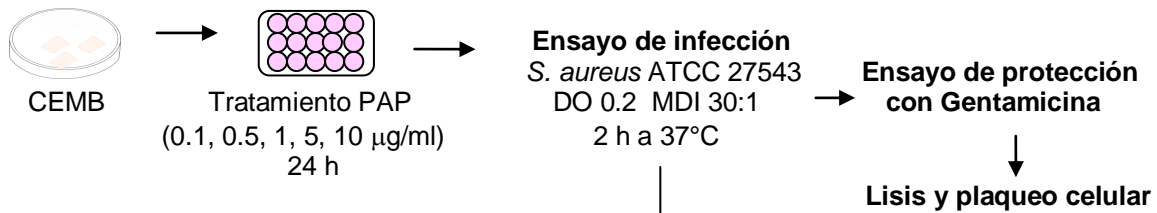
### 2. Ensayos de viabilidad de las CEMB



### Ensayos de viabilidad de *S. aureus*



### 3. Ensayos de Internalización



#### 4. Análisis de la expresión genes de la RII

Evaluación de la expresión por RT-qPCR:

Citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10

Quimiocina: IL-8

Péptidos antimicrobianos: TAP y BNBD5

#### 5. ELISA

Cuantificación de la secreción: TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  e IL-6

#### 6. Citometría de flujo

Evaluación del receptor TLR2 en la membrana celular

### 7. Análisis estadístico

Programa estadístico STATISTICA 7: Prueba t de Student y ANOVA de una vía, seguida de una prueba Post-hoc.



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Cultivo celular**

Se utilizaron CEMB obtenidas de tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, las cuales se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente (Anaya-López *et al.*, 2006b). Las CEMB se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomina (400 U/ml, GIBCO), 10 µg/ml insulina (Sigma), 10 µg/ml hidrocortisona (Sigma), y 250 ng/ml de anfotericina B (Invitrogen) a pH de 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **8.2 Péptidos antimicrobianos de Plantas (PAPs)**

Los PAPs que se utilizaron corresponden a péptidos sintéticos que contemplan la región madura de los péptidos Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* (005B2511-Invitrogen) y  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* (002D0811-Invitrogen). Se realizó una reacción de oxidación para inducir la formación de enlaces disulfuro (Krishnakumari *et al.*, 2006). Los enlaces se determinaron por espectrometría de masas (dato no mostrado).

### **8.3 Cepa bacteriana**

Se utilizó una cepa de *Staphylococcus 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). La bacteria se creció en caldo LB (5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura).

### **8.4 Efecto de los PAP sobre la viabilidad de las CEMB**

#### **8.4.1 Ensayo de viabilidad por exclusión de azul tripano**

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

( $\sim 5 \times 10^5$  células/pozo). Se agregó medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos a cada pozo. Los cultivos se trataron con distintas concentraciones de los PAPs sintéticos (0.1, 0.5, 1, 5, y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) incubándose durante 24 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se despegaron con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) y se recuperaron centrifugando a 2,500 rpm/10 min. La pastilla se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de medio F12K y 100  $\mu\text{l}$  del colorante azul tripano. Finalmente se utilizó la cámara de Neubauer para el recuento celular. Como control se utilizaron las CEMB sin tratamiento con los PAPs.

#### **8.4.2 Ensayo de viabilidad por reducción metabólica de MTT**

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 96 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron las monocapas confluentes de CEMB ( $\sim 1 \times 10^4$  células/pozo). Se agregó medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos a cada pozo. Los cultivos se trataron con distintas concentraciones de los PAPs sintéticos (0.1, 0.5, 1, 5, y 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Se adicionó medio DMEM/F12 con 2% de SFB. Se adicionó el reactivo MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tretazolio), incubándose durante 4 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de isopropanol: ácido clorhídrico, después de 30 min se realizó la lectura de la absorbencia a 600 nm. Como control, se utilizaron las CEMB sin tratamiento con los PAPs.

#### **8.5 Ensayos de viabilidad de *S. aureus***

Se creció la cepa de *S. aureus* ATTC 27543 en caldo LB, incubándose 24 h a 37° C en agitación. Se ajustó la DO (600 nm) del cultivo bacteriano a 0.2 ( $\sim 9 \times 10^7$  UFC/ml) y se adicionó un ml del cultivo en un tubo de 15 ml. Los cultivos se trataron con distintas concentraciones de los PAPs sintéticos (0.1, 0.5, 1, 5, y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron 2, 4, 6, 12 y 24 h a 37°C. Para la lectura en cada condición, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  del cultivo en una caja de cultivo de 96 pozos (Costar-Corning) ajustando a un volumen de 100  $\mu\text{l}$  con caldo LB. Se realizó la lectura de absorbencia de los cultivos a 600 nm. Paralelamente se realizó el ensayo de viabilidad por reducción de MTT para el cual se adicionaron en cajas de

96 pozos (Costar-Corning) 10  $\mu$ l del cultivo ajustando a un volumen de 100  $\mu$ l con caldo LB y se incubaron 2, 4, 6, 12 y 24 h a 37°C. Se adicionó el reactivo MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tretazolio), incubándose durante 4 h a 37°C. Se adicionaron 100  $\mu$ l de isopropanol: ácido clorhídrico, después de 30 min se realizó la lectura de la absorbencia a 600 nm. Finalmente se hicieron diluciones 1:1,000,000 de los cultivos. Se inocularon 200  $\mu$ l en agar LB (caldo LB con agar bacteriológico, BIOXON) y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se realizó el conteo total de las UFCs. Como control se utilizó un cultivo bacteriano sin tratamiento con los PAPs.

### **8.6 Ensayos de internalización**

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 ( $\sim 2 \times 10^3$  células/pozo). Se adicionó medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos a cada pozo. Los cultivos se trataron con distintas concentraciones de los PAP sintéticos (0.1, 0.5, 1, 5, y 10  $\mu$ g/ml) incubándose durante 24 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las CEMB se infectaron 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. (600 nm) 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. Posteriormente las CEMB se lavaron (3 veces) 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. Las células se lavaron 3 veces con PBS estéril, 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 inocularon 200  $\mu$ l en agar LB y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se realizó el conteo total de las UFCs. Como control se utilizó a las CEMB sin tratamiento con los PAPs.

### **8.7 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario**

El ARN total (5-10 µg) 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 el ADNc. La muestra obtenida se trató con DNAsa I (Invitrogen) para remover cualquier contaminación con ADN. La síntesis del ADNc se realizó por la reacción de transcripción reversa (RT) y se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 25 µg/ml de oligo d(T) 15-18 nucleótidos (Invitrogen) y, 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 µl de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditioneitol (Invitrogen) y 2 U/µl de inhibidor de RNAsa (Invitrogen), luego se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante calentamiento a 70°C por 15 min. Se confirmó la integridad del ADNc sintetizado por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Este ADNc se utilizó para establecer los niveles de expresión de genes de la inmunidad innata mediante reacciones de PCR en tiempo real (qPCR).

### 8.8 Análisis de la expresión de genes

La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las reacciones se llevaron a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 0.9 pmol/µl de cada oligonucleótido, 250 ng de ADNc y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que codifican elementos de la inmunidad innata (citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos). Como control interno se utilizó (gen endógeno) GAPDH bovino (Tabla 3).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos específicos de genes evaluados en este trabajo

Especificidad	Secuencia	Tamaño del fragmento (pb)	T° de alineamiento (°c) y	Referencias
---------------	-----------	---------------------------	---------------------------	-------------

TNF- $\alpha$ bovina	D 5' CCCCTGGAGATAACCTCCCA 3' R 5' CAGACGGGAGACAGGAGAGC 5'	101 pb	56 °C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
IL-8 bovina	D 5' TTCCACACCTTTCCACCCCAA 3' R 5' GCACAACCTTCTGCACCCACTT 5'	149 pb	53.5 °C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
IL-1 $\beta$ bovina	D 5' GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG 3' R 5' CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA 3'	198 pb	52 °C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
IL-6 bovina	F 5' AACCACTCCAGCCACAAACT 3' R 5' GAATGCCAGGAACTACCACAA 3'	179 pb	57 °C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
IL-10 bovina	D 5' AAATGAACCGAGAAGTGGTGTT 3' R 5' TTCCATATTCCTCTTGGGGTAGA 5'	129 pb	59°C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
TAP	D 5' GCGCTCCTCTTCTGGTCCTG 3' R 5' GCACGTCTGACTGGGCATTGA 5'	216 pb	57.1°C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2012
BNBD5	D 5' GCCAGCATGAGGCTCCATC 3' R 5' TTGCCAGGGCACGAGATCG 3'	143 pb	55°C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2012
TLR2	D 5' CGACTGGCCGATGACTACC 3' R 5' TGAGCAGGAGCAACAGGAAGAG 3'	146 pb	58.5 °C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
GAPDH	D 5' TCAACGGGAAGCTCACACTGG 3' R 5' CCCAGCATCGAAGGTAGA 3'	237 pb	56.9°C	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2012

## 8.9 Cuantificación de citocinas mediante ELISA

Se cuantificó la proteína del TNF- $\alpha$ , de la IL-1 $\beta$  y de la IL-6 bovina secretadas en el medio de cultivo de las CEMB mediante la prueba de ELISA. Se recolectaron los medios de cultivo de las CEMB tratadas con distintas concentraciones de los PAP sintéticos durante 24 h e infectadas durante 2 h con *S. aureus* ATCC 27543. El medio fue almacenado a -20°C hasta su utilización. La proteínas fueron cuantificadas con kits comerciales de ELISA (sándwich) para cuantificar las proteínas, TNF- $\alpha$  bovina (adquirido de RyD), IL-1 $\beta$  bovina e IL-6 bovina (adquiridos de Thermo Scientific). Las placas se cubrieron con el anticuerpo de captura (TNF- $\alpha$ : 144  $\mu$ l/ml de PBS, IL-1 $\beta$  e IL-6: 110  $\mu$ l por 10.89 ml de buffer de bicarbonato-carbonato) (100  $\mu$ l por pozo). Las placas se sellaron e incubaron protegidas de la luz a temperatura ambiente toda la noche. En el caso del TNF- $\alpha$ , las placas se lavaron con el buffer de lavado (400  $\mu$ l por pozo) dos veces. Se adicionó el buffer de bloqueo (300  $\mu$ l por pozo) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona la muestra en reactivo diluyente (100  $\mu$ l por pozo). Las placas se sellaron y se incubaron durante 2 h para TNF- $\alpha$  y 1 h para el caso de la IL-1 $\beta$  e IL-6, a temperatura ambiente. La placa se lavó con el buffer de lavado (300  $\mu$ l por pozo). Se adicionó el anticuerpo de detección (100  $\mu$ l por pozo). Las placas se sellaron e incubaron durante 2 h para

TNF- $\alpha$  y 1 h para el caso de la IL-1 $\beta$  e IL-6, a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con el buffer de lavado (300  $\mu$ l por pozo). Se adicionó estreptavidina-HRP (para el TNF- $\alpha$  100  $\mu$ l por pozo, y para el caso de IL-1 $\beta$  e IL-6, 30  $\mu$ l por 12 ml de reactivo diluyente). Las placas se sellaron e incubaron a temperatura ambiente durante 20 min para TNF- $\alpha$  y 30 min para IL-1 $\beta$  e IL-6. Se adicionó la solución del sustrato (100  $\mu$ l por pozo). Las placas se sellaron e incubaron durante 20 min para TNF- $\alpha$  y 30 min para IL-1 $\beta$  e IL-6, protegidas de la luz a temperatura ambiente. Se adicionó la solución Stop, para TNF- $\alpha$  (50  $\mu$ l por pozo) y para IL-1 $\beta$  e IL-6 (100  $\mu$ l por pozo). Finalmente se determinó la densidad óptica a 450 nm.

### **8.10 Cuantificación de NO**

El NO se cuantificó midiendo la concentración de nitrito (NO $_2^-$ ) aplicando la reacción de Griess. Se recolectaron los medios de cultivo de las CEMB tratadas con distintas concentraciones de los PAPs sintéticos durante 24 h e infectadas durante 2 h con *S. aureus* ATCC 27543. El medio fue almacenado a -20°C hasta su utilización. 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-naftiletilendiamida dihidroclorada, Sigma)]. La concentración de NO $_2^-$  se determinó por medio de una curva estándar de NaNO $_2$  (pH 7.4, Sigma) en PBS estéril (1, 5, 10, 40, 60, 80, 100 M). Se colocaron diluciones 1:7 del reactivo de Griess y de medio condicionado (20  $\mu$ l y 140  $\mu$ l, respectivamente). Las lecturas se realizaron midiendo la absorbencia a 550 y 600 nm.

### **8.11 Citometría de flujo**

Las células se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), (~2x10 $^3$  células/pozo) tratadas con colágena tipo I de cola de rata y se incubaron durante 24 h con distintas concentraciones de los PAP  $\gamma$ -tionina y Thi2.1, luego fueron infectadas durante 2 h con *S. aureus* ATCC 27543. Se realizaron lavados con PBS (3 veces) y las células se recuperaron adicionando tripsina (~300  $\mu$ l/pozo). El contenido de cada pozo se recuperó en tubos eppendorf

centrifugando a 2,500rpm/10 min a 4°C. Se adicionó paraformaldehído al 4% para fijar las células (aproximadamente 30 µl, o hasta cubrir la pastilla), y se incubaron 10 min a 4°C. Se obtuvo la pastilla y se realizaron lavados con PBS frío (300 µl por tubo) y, las células se recuperaron por centrifugación (2,500 rpm/4 min) a 4°C. Las células se bloquearon con suero de cabra al 5% en PBS (20-30µl por tubo o hasta que cubriera la pastilla) y se incubaron 30 min en hielo en, agitación protegidas de la luz. Las células se centrifugaron a 2,500rpm/10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió con el anticuerpo primario anti-TLR2 (TL2.1, Abcam) en una dilución de 1:150 en BSA al 0.1% (25-30µl por muestra). Se incubó toda la noche a 4°C en agitación y cubierto de la luz. Cumplido el tiempo las células se recuperaron centrifugando a 2,500rpm/10 min a 4°C, y se realizaron lavados. Las células se incubaron con 20-30 µl del anticuerpo secundario acoplado a FITC (20 µg/ml 1:100 de PBS con BSA) durante 2 h en agitación con hielo y cubierto de la luz. Pasado el tiempo de incubación se recuperó la pastilla por centrifugación a 2,500rpm/10 min a 4°C). Se realizaron lavados con PBS en centrifugación a 4°C. Las células se resuspendieron en 100 µl de PBS frío para su lectura en el citómetro Accuri C6 (BD) evaluándose 10,000 eventos por condición.

### **8.12 Análisis estadístico**

Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes por triplicado y se compararon mediante la prueba *t* de Student (ensayos de viabilidad) y análisis de varianza de una vía seguida de una prueba post-hoc Duncan (ensayo de internalización, expresión de genes, producción de citocinas y NO, y abundancia de receptor) (STATISTICA 7). Los resultados se presentan con  $\pm$  el error estándar considerando los valores de  $P \leq 0.05$  como estadísticamente significativos.

## 9. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Con base en los antecedentes antimicrobianos y citotóxicos que se han descrito para los PAP Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina sobre las CEMB y *S. aureus*, se analizó un posible efecto sobre la viabilidad de las células previo al análisis que corresponde al objetivo general de este trabajo (Anaya-López *et al.*, 2006; Loeza-Ángeles *et al.*, 2008; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008).

### 9.1. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB.

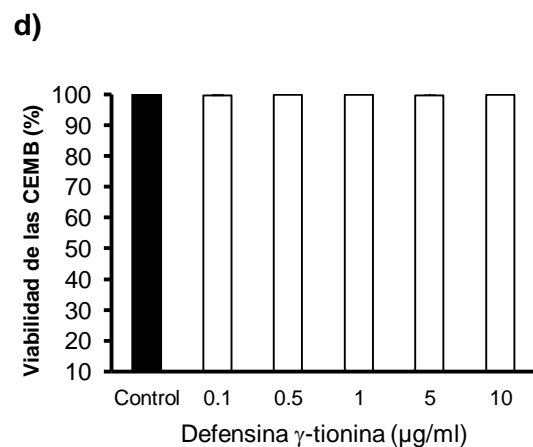
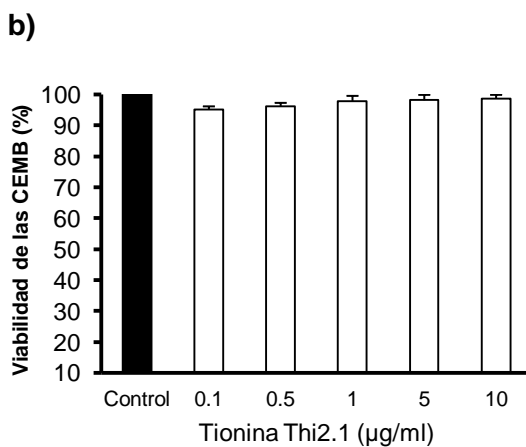
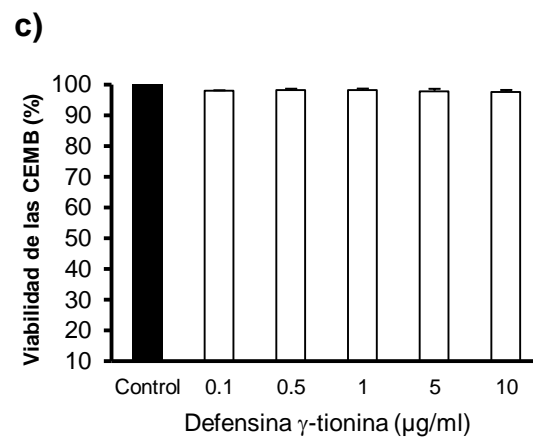
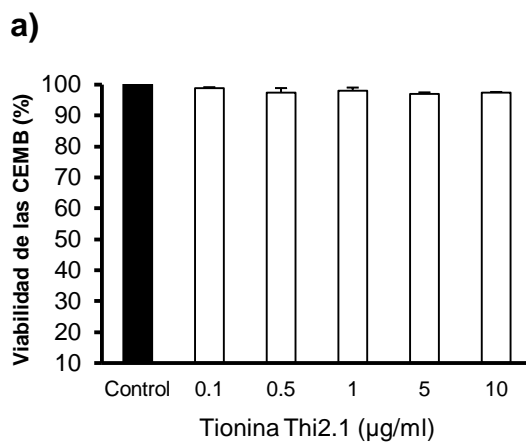
La viabilidad se determinó mediante los ensayos de reducción metabólica del MTT y la exclusión del azul tripano. Los resultados para ambas aproximaciones experimentales mostraron que el tratamiento con los PAPs Thi2.1 (Fig. 6a y b) y  $\gamma$ -tionina (Fig. 6c y d) no tienen efectos citotóxicos sobre las CEMB con relación al tratamiento control (vehículo en el cual se disolvieron los PAPs).

Este efecto puede explicarse con base en las concentraciones utilizadas en este trabajo, las cuales son menores a las reportadas con actividad citotóxica para las tioninas y defensinas de plantas. Por ejemplo, las tioninas Viscotoxina 1-PS, A1, A2, A3, y B son citotóxicas para linfocitos humanos al inducir la producción de ERO y permeabilización de la membrana. La mezcla de estas viscotoxinas a una concentración de 50  $\mu$ g/ml induce apoptosis en linfocitos humanos al activar la caspasa 3 (Büssing *et al.*, 1999). La defensina de *Vigna sequipedalis* a una concentración de 2.5 mg/ml inhibió la proliferación de las líneas celulares MCF-7 y de leucemia M1 (Wong y Ng, 2005). Asimismo, la limenina de *Phaseolus limensis* inhibió la proliferación de la línea celular L1210 a una concentración de 0.1 mg/ml (Wong y Ng 2009). Antecedentes del efecto citotóxico del MC de células endoteliales bovinas transfectadas con el ADNc de Thi2.1, mostraron que el MC a una concentración de 2.5  $\mu$ g/ml de proteína total inhibió la viabilidad de células epiteliales y endoteliales bovinas. Sin embargo, es probable que esta propiedad citotóxica del MC no sea exclusiva de la tionina Thi2.1, ya que puede estar



actuando de forma coordinada con otros componentes secretados por las células endoteliales bovinas (Loeza-Ángeles *et al.*, 2008).

Otro factor importante para el efecto citotóxico de los PAP a considerar es la composición de la membrana de la célula blanco. La mayoría de los estudios de citotoxicidad de los PAP se han realizado contra células cancerosas, las cuales tienen una membrana cargada negativamente por la presencia de moléculas aniónicas como fosfatidilserina, mucinas O-glicosiladas, gangliósidos sialilados y sulfato de heparan, en contraste con la membrana de una célula normal que presenta una membrana con carga neutra principalmente (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).



**Figura 6. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB.** Las células fueron cultivadas en presencia de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de reducción metabólica del MTT (a y c) y mediante el ensayo de exclusión de azul tripano (b y d). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado.  $P \leq 0.05$ , Prueba t de Student. La significancia se estableció, respecto al control (vehículo, DMSO al 0.02%), el cual se consideró como el 100% de viabilidad en ambas aproximaciones.

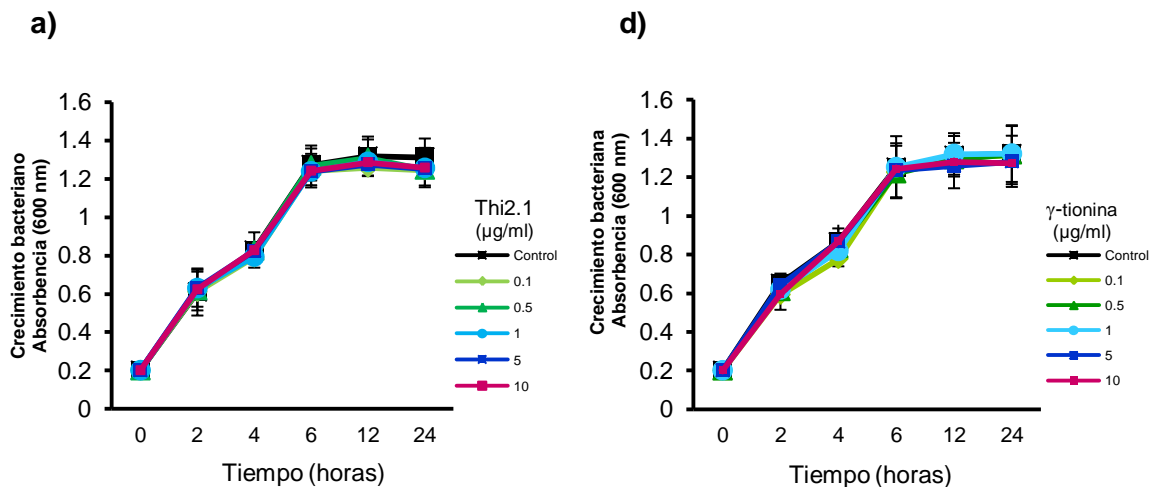
## **9.2 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de *S. aureus***

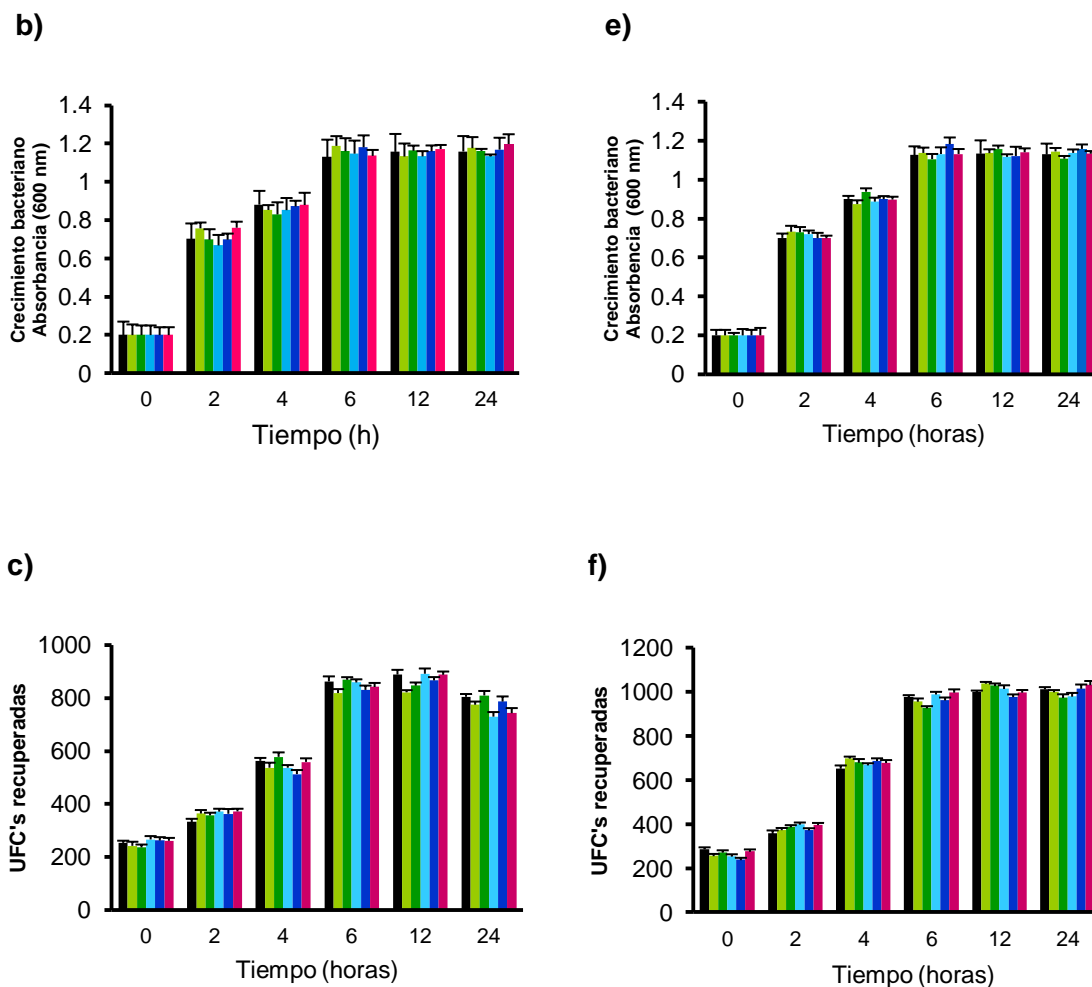
La viabilidad se determinó mediante la lectura de absorbencia en cinéticas de crecimiento, ensayos de reducción metabólica del MTT y conteo de UFCs. De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento con la tionina Thi2.1 (Fig. 7a, b, y c) y la defensina  $\gamma$ -tionina (Fig. 7d, e, y f) no inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, en ninguno de los tiempos y concentraciones evaluados.

Una de las principales funciones de los PAPs es su participación en el sistema de defensa de las plantas. Su actividad ha sido demostrada contra fitopatógenos, así como también, contra microorganismos patógenos de humanos. En general los PAPs actúan mediante la formación de poros ocasionando la liberación de inones y metabolitos conduciendo a la muerte celular (Nawrot *et al.*, 2014). Se ha reportado que las tioninas ejercen principalmente una actividad contra bacterias gram positivas, y en menor medida contra bacterias gram negativas. Por ejemplo, las purotioninas  $\alpha$  y  $\beta$  de *Triticum aestivum* presentaron una actividad contra bacterias gram positivas fitopatógenas, a una concentración de 27  $\mu\text{g/ml}$  inhibieron el crecimiento de *Xanthomonas phaseoli* y a una concentración de 540  $\mu\text{g/ml}$  inhibió el crecimiento de *Erwinia amylovora* (Fernández *et al.*, 1972). Las concentraciones evaluadas de Thi2.1 en el presente son menores respecto a las reportadas con actividad antibacteriana para las tioninas. Sin embargo, antecedentes del MC que contiene a la tionina Thi2.1 a una concentración de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  inhibió el crecimiento de una cepa de *S. aureus* ATCC 27543 y de aislamientos de la misma bacteria provenientes de casos de mastitis

bovina. Esta inhibición se determinó a concentraciones de 3.12  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total presente en el MC (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008). Asimismo, el MC inhibió el crecimiento de patotipos de *E. coli* hasta un 90%. Sin embargo, como se mencionó anteriormente se desconoce si el efecto del MC es consecuencia de una acción directa de la tionina Thi2.1 o si existe alguna participación de los componentes secretados por las células endoteliales bovinas que producen esta tionina.

Por otro lado, la función atribuida principalmente a las defensinas es una actividad antifúngica y citotóxica (Nawrot *et al.*, 2014). Dado lo anterior, el efecto mostrado por la defensina  $\gamma$ -tionina en este trabajo, apoya los datos que demuestran un efecto preferencialmente antifúngico de las defensinas de plantas, y coinciden con reportes previos del laboratorio que demuestran un efecto antifúngico pero no antibacteriano de la defensina  $\gamma$ -tionina producida por células endoteliales bovinas (Anaya-López *et al.*, 2006).





**Figura 7. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la viabilidad de *S. aureus* ATCC 27543.** La bacteria fue cultivada toda la noche. Luego se ajustó a la  $DO_{600}$  a 0.2 ( $9.2 \times 10^7$ /ml), y se adicionó el tratamiento con la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu$ g/ml) durante 2, 4, 6, 12 y 24 h. La viabilidad bacteriana se determinó mediante cinéticas de crecimiento (a y d), el ensayo de reducción metabólica del MTT (b y e), conteo de UFCs (c y f). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado.  $P \leq 0.05$ , Prueba t de Student. La significancia se estableció respecto al tratamiento con el vehículo (control) en el tiempo correspondiente.

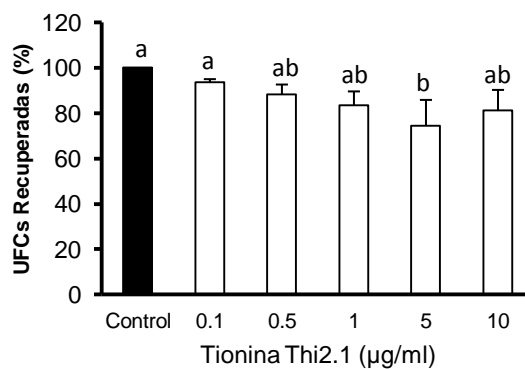
A continuación se presentan los resultados correspondientes al objetivo principal de este trabajo, que consistió en determinar las propiedades inmunomoduladoras de los PAPs en las CEMB durante la internalización de *S. aureus* en CEMB.

### 9.3 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la internalización de *S.aureus* en las CEMB

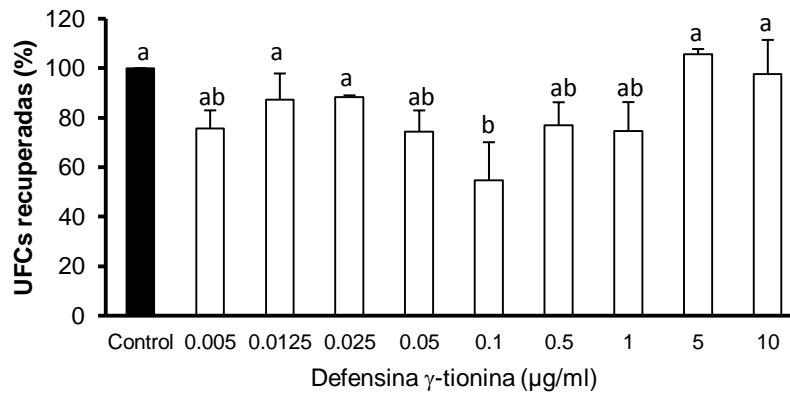
El efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB se determinó mediante ensayos de protección con gentamicina. Los resultados mostraron que los PAPs inhibieron la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Con base en las UFCs recuperadas la tionina Thi2.1 a 5  $\mu\text{g/ml}$  inhibió significativamente la internalización de *S. aureus* hasta en un 20%. Mientras que, el resto de las concentraciones no mostraron diferencias significativas en la inhibición respecto al tratamiento control (Fig. 8). Por otro lado, la defensina  $\gamma$ -tionina a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  inhibió significativamente la internalización de *S. aureus* hasta en un 40%. Al incrementar las concentraciones (0.5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó una reducción en el efecto, alcanzando solo un 20% de inhibición. El resto de los tratamientos no tuvieron efecto (Fig. 9). Debido a que la defensina  $\gamma$ -tionina inhibió la internalización en la menor concentración analizada en los ensayos de viabilidad, para los ensayos de internalización se evaluarán concentraciones aún menores (0.005, 0.0125, 0.025 y 0.05  $\mu\text{g/ml}$ ). De estas últimas, solo las concentraciones de 0.005 y 0.05  $\mu\text{g/ml}$  inhibieron la internalización de *S. aureus* en las CEMB (20%). El resto de las concentraciones no tuvieron efecto (Fig. 9).

Debido a que los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina no mostraron un efecto antibacteriano directo a las concentraciones evaluadas en los ensayos de internalización (Fig. 7), es probable que el efecto de los PAP sobre la inhibición de la internalización de la bacteria sea la consecuencia de la estimulación y modulación de los mecanismos de defensa de las CEMB. Estos resultados coinciden con un reporte previo de nuestro grupo de trabajo en el que se demostró que el MC de células endoteliales productoras de la  $\gamma$ -tionina a una concentración de 3.125  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total inhibe la internalización de *S. aureus* en CEMB mediante la producción de NO (Loeza-Ángeles *et al.*, 2011). Sin embargo, el conocimiento con relación al efecto de los PAPs contra patógenos intracelulares es escaso y se desconoce su efecto inmunomodulador en células de mamífero.

Existen estudios que demuestran la acción de PAPs contra patógenos intracelulares, pero las evaluaciones se centran en el efecto bactericida que presenta el péptido, sin explorar el efecto inmunomodulador que puede estar ejerciendo sobre los mecanismos de defensa de la célula hospedera. Por ejemplo, las tioninas recombinantes, puroindolinas A y B mostraron una actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* internalizado en la línea celular J774 de macrófagos murinos. La actividad bactericida de la puroindolina A se presentó a una concentración de 125  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que, la puroindolina B ejerció esta actividad a una concentración de 42  $\mu\text{g/ml}$  (Capparelli *et al.*, 2007). Asimismo, se demostró la acción bactericida de la plectasina, una defensina del hongo *Pseudoplectania nigrella* en un modelo de peritonitis murino. La plectasina a una concentración de 17 mg/kg presentó una eficiencia relativa máxima de 1.3 log en la reducción de UFC (Brinch *et al.*, 2009).



**Figura 8. Efecto de la tionina Thi2.1 sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.** Se trataron a las CEMB con la tionina Thi2.1 (0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 24 h previas a la infección con *S. aureus*, la cual se realizó, durante 2 h. Se presenta el número de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB. Los valores fueron determinados considerando la internalización en las células tratadas con el vehículo como el 100% de la invasión. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las letras diferentes indican cambios significativos entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ), y las letras iguales señalan que no hubo diferencias entre los tratamientos. ANOVA una vía, post-hoc Duncan.



**Figura 9. Efecto de la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.**

Se trataron a las CEMB con la defensina  $\gamma$ -tionina (0.005, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 24 h previas a la infección, la cual se realizó por 2 h. Se presenta el número de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB, los valores fueron determinados considerando la internalización en las células tratadas con el vehículo como el 100% de la invasión. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las letras diferentes indican cambios significativos entre los tratamientos ( $P \leq 0.05$ ), y las letras iguales señalan que no hubo diferencias entre los tratamientos. ANOVA de una vía, post-hoc Duncan.

Las propiedades inmunomoduladoras de los PA se han determinado principalmente utilizando PA de origen animal por ejemplo, la catelicidina LL-37 y defensinas humanas (Rosenberger *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2006; Mookherjee *et al.*, 2006; Niyonsaba *et al.*, 2007; Soehnlein *et al.*, 2008; Miles *et al.*, 2009; Ryan y Diamond, 2010; Rivas *et al.*, 2013), y además, su efecto se ha estudiado en la misma especie que lo produce. Sin embargo, estos resultados demuestran que los PAP pueden ejercer efectos inmunomoduladores en células de mamíferos, confirmando la relación evolutiva entre las familias de PAs, razón por la cual es probable que estas moléculas hayan sido seleccionadas como elementos fundamentales en el sistema de defensa de los diferentes tipos de organismos. El hecho de que la defensina  $\gamma$ -tionina haya tenido un mayor efecto inhibitorio sobre la internalización bacteriana en las CEMB que, la tionina Thi2.1, es probable que sea el resultado de una acción inmunomoduladora, y esto puede explicarse con base en la similitud estructural y funcional que tienen las defensinas de plantas con las defensinas humanas en las que se han reportado efectos

inmunomoduladores (Nawrot *et al.*, 2014; Guzmán *et al.*, 2014; Mansour *et al.*, 2014).

Por lo anterior, se planteó evaluar el efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la expresión de elementos de la respuesta inmune innata (RII) para determinar si la inhibición de la internalización de *S. aureus* se relaciona con la estimulación y modulación de esta respuesta en las CEMB. Para ello, se eligieron las cocentraciones que inhibieron significativamente la internalización bacteriana en las CEMB.

Hay estudios que indican que los PA pueden modular la respuesta proinflamatoria desencadenada por la activación de receptores TLRs tras la unión del ligando. Se ha descrito por ejemplo, que la catelicidina LL-37 a concentraciones fisiológicas 0.5-50  $\mu\text{g/ml}$  modula la respuesta inflamatoria a través de receptores TLRs. La catelicidina disminuye la producción de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en monocitos humanos estimulados con agonistas de TLR2 Pam<sub>3</sub>CSK4 y de TLR4 (LTA), indicando que la catelicidina LL-37 disminuye la producción de citocinas proinflamatorias dependiente de la vía de activación de TLR2 y TLR4 (Mookherjee *et al.*, 2009). Adicionalmente, hay evidencias que demuestran la asociación de defensinas, principalmente las  $\beta$ - defensinas con los TLRs, por ejemplo, la  $\beta$ -defensina murina 2 (mBD) activa y modula la vía de señalización dependiente de TLR4. Específicamente, se demostró que la mBD2 puede actuar como un ligando endógeno para la activación de la maduración de células dendríticas dependiente de TLR4 (Biragyn *et al.*, 2002). Sin embargo, los efectos de los PAP sobre la activación de TLRs no se han descrito hasta el momento.

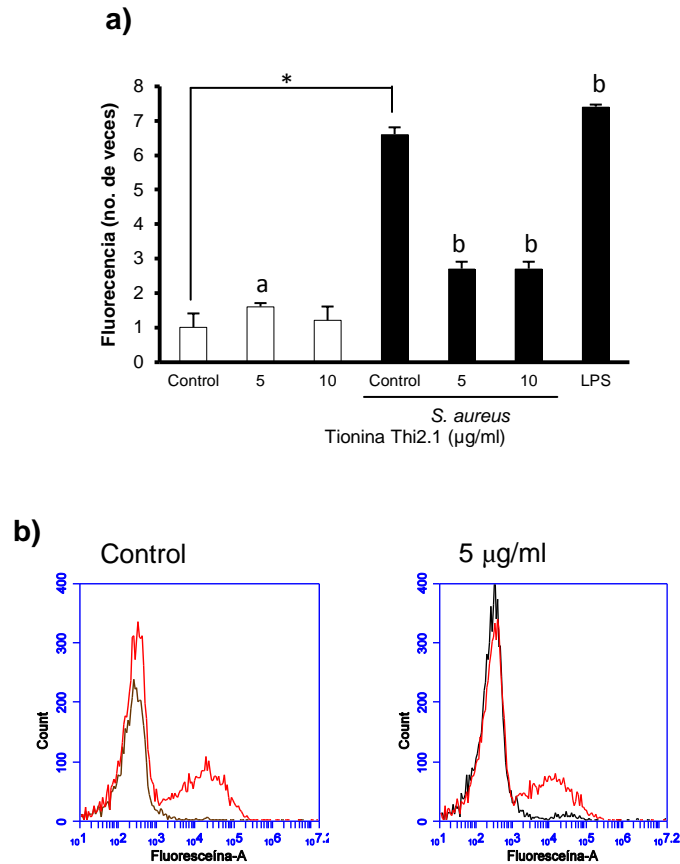
Con base en lo anterior, se evaluó el efecto de los PAPs Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del receptor TLR2 en las CEMB, ya que se ha reportado que este receptor en particular es el encargado del reconocimiento de *S. aureus* en las CEMB y su activación conduce a la estimulación de la RII de las mismas (Gilbert *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2013).



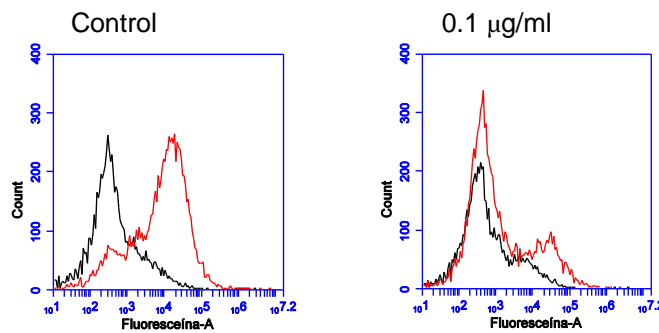
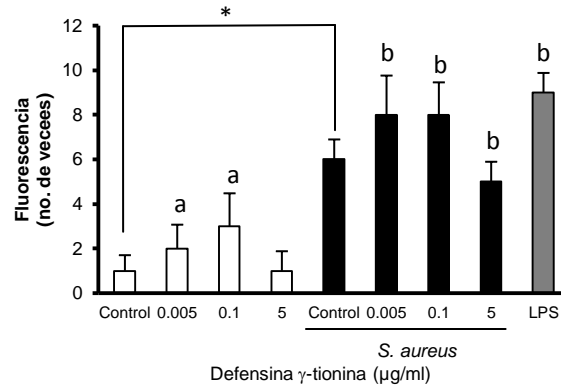
#### 9.4 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del receptor TLR2

El efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del receptor TLR2 en las CEMB se evaluó mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que la tionina Thi2.1 a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  incrementa ligeramente la abundancia del receptor TLR2, mientras que, disminuyó significativamente la abundancia inducida por *S. aureus* en las dos concentraciones analizadas (Fig 10 a). La Figura 10b muestra histogramas representativos de la citometría de flujo de CEMB tratadas con el vehículo (DMSO al 0.02%) en ausencia y presencia de la infección, y de CEMB tratadas con la tionina Thi2.1 a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  en ausencia y presencia de la infección. Como control positivo de abundancia de membrana del TLR2 se empleó LPS. Por otro lado, la defensina  $\gamma$ -tionina a 0.05 y 0.01  $\mu\text{g/ml}$  induce la abundancia del receptor, sin embargo, al igual que que la tionina, disminuyó significativamente la abundancia inducida por la bacteria a la concentración de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ . (Fig. 11a). La Figura 11b muestra histogramas representativos de la citometría de flujo de CEMB tratadas con el vehículo (DMSO al 0.02%) en ausencia y presencia de la infección, y de CEMB tratadas con la defensina  $\gamma$ -tionina a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  en ausencia y presencia de la infección. Si bien el efecto de los PAPs sobre la abundancia de receptores de membrana no ha sido evaluada, el efecto de la defensina  $\gamma$ -tionina demuestra su participación en la inducción de la presencia del receptor TLR2. Además, la disminución del receptor inducida por los PAPs en presencia de la bacteria demuestra su participación en la regulación de la abundancia de este receptor en la membrana, y probablemente esta regulación por parte de los PAPs está involucrada en la modulación de la producción de mediadores de la inflamación dependientes de la vía de activación de los TLRs. Lo cual, hace suponer que el efecto de la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la inhibición de la internalización de *S. aureus* se relaciona con la estimulación de elementos de la RII de las CEMB dependiente de la vía de TLR2. En este sentido, a continuación se muestra el efecto de la tionina Thi2.1 y  $\gamma$ -tionina sobre la inmunomodulación de la

RII de las CEMB en presencia y ausencia de la infección con *S. aureus* (internalizado).



**Figura 10. Efecto de la tionina Thi2.1 sobre la abundancia del TLR2 en las CEMB.** Las CEMB se trataron con la tionina Thi2.1 (5 y 10 µg/ml) durante 24 h. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-TLR2, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. En a) se muestra la gráfica del promedio de la fluorescencia obtenida midiendo 10000 eventos. La barra denominada LPS corresponde a CEMB tratadas con lipopolisacárido (1 µg/ml) y fueron empleadas como un control positivo de la expresión de TLR2. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado. En b) se muestran histogramas representativos de CEMB control en ausencia (negro) o presencia de *S. aureus* (rojo), y de CEMB tratadas con Tionina Thi2.1 (5 µg/ml) en ausencia (negro) o presencia de *S. aureus* (rojo). Se consideró como control a las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.02%). El “\*” indica cambios significativos de células infectadas en presencia de vehículo con respecto a las CEMB control ( $P \leq 0.05$ ). La letra “a” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB control. La letra “b” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB infectadas. ANOVA de una vía. Post-hoc Duncan.



**Figura 11. Efecto de la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la abundancia del TLR2 en las CEMB.** Las CEMB se trataron con la defensina  $\gamma$ -tionina (0.005, 0.1, y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h. Las células se incubaron con un anticuerpo anti-TLR2, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a FITC. En a) se muestra la gráfica del promedio de la fluorescencia obtenida midiendo 10000 eventos. La barra denominada LPS corresponde a CEMB tratadas con lipopolisacárido (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y fueron empleadas como un control positivo de la expresión de TLR2. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado. En b) se muestran histogramas representativos de CEMB control en ausencia (negro) o presencia de *S. aureus* (rojo), y de CEMB tratadas con defensina  $\gamma$ -tionina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) en ausencia (negro) o presencia de *S. aureus* (rojo). Se consideró como control a las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.02%). El "\*" indica cambios significativos de células infectadas en presencia de vehículo con respecto a las CEMB control ( $P \leq 0.05$ ). La letra "a" indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB control. La letra "b" indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB infectadas. ANOVA de una vía. Post-hoc Duncan.

### 9.5 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la expresión de genes de la RII de las CEMB

Se obtuvo el ARN total de las CEMB tratadas con los PAPs e infectadas, y mediante PCR en tiempo real se evaluó la expresión relativa de mediadores de la respuesta inflamatoria como citocinas pro y antiinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e

IL-10), quimiocinas (IL-8), péptidos antimicrobianos (TAP y BNBD5) y el receptor TLR2, utilizando como gen endógeno a GAPDH.

Los resultados mostraron que el tratamiento con la tionina Thi2.1 a la concentración que inhibió la internalización de *S. aureus* en las CEMB (5 µg/ml) únicamente indujo la expresión de manera significativa del gen de la citocina pro-inflamatoria IL-6 (7 veces, Fig. 12c), mientras que inhibió la expresión de IL-10, IL-8 y del PA TAP (~0.5 veces en todos los casos) (Fig. 12d, e y f). Interesantemente, en presencia de la infección Thi2.1 inhibió la expresión inducida por la bacteria en el gen de TNF- $\alpha$  (Fig. 12a) e IL-10 (Fig. 12d), disminuyendo su expresión a niveles basales. La tionina Thi2.1 parece no ser muy eficiente en la inmunomodulación de la RII de las CEMB previo a la presencia de la bacteria, aunque sí parece tener efectos importantes una vez que se ha establecido la infección, y en regular genes tardíos de la RII como la IL-6. El efecto inhibitorio que ejerce la tionina Thi2.1 sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB, no puede explicarse con base en la producción de PA endógenos, ya que la expresión de los genes de los péptidos analizados está disminuida en el caso de TAP (Fig. 12f) y sin modificar considerablemente (menos de dos veces de incremento) en el caso de BNBD5 (Fig. 12g). Sin embargo, en los bovinos, y en particular en la glándula mamaria, se ha reportado la expresión de una gran diversidad de PA, por lo que es necesario hacer un análisis más exhaustivo al respecto para tener una estimación de la contribución de los PAPs en la inhibición de la internalización y correlacionarla con la producción de PA endógenos (Roosen *et al.*, 2004).

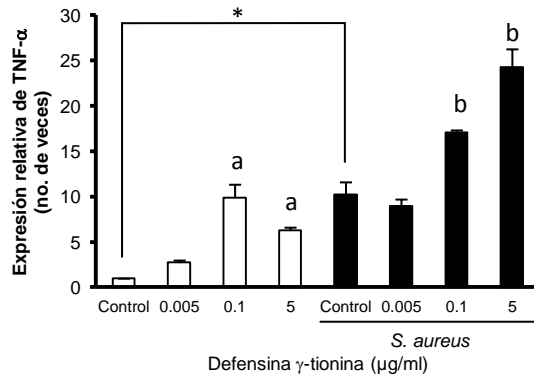
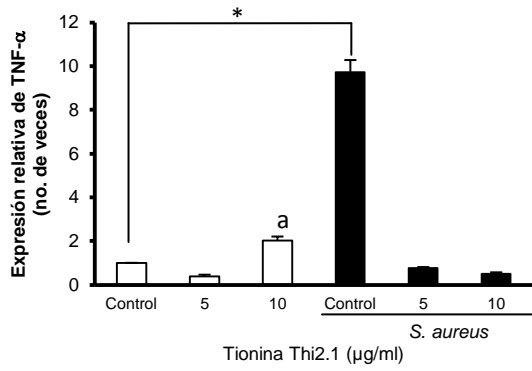
Además, debido a que la tionina Thi2.1 inhibió la internalización bacteriana a concentraciones altas, es probable que la tionina Thi2.1 presente principalmente una actividad antimicrobiana directa dependiente de la concentración. Sin embargo, la tionina Thi2.1 disminuye significativamente la expresión del receptor TLR2, tanto en las células control como en las infectadas, lo cual coincide con la disminución que presenta sobre la RII en general, y que podría explicar el hecho

de que haya menor internalización de *S. aureus* en presencia de esas concentraciones de la tioniina Thi2.1.

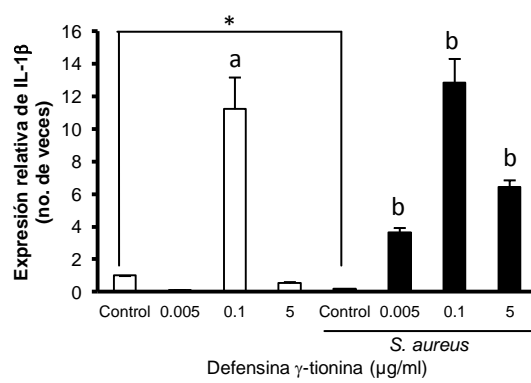
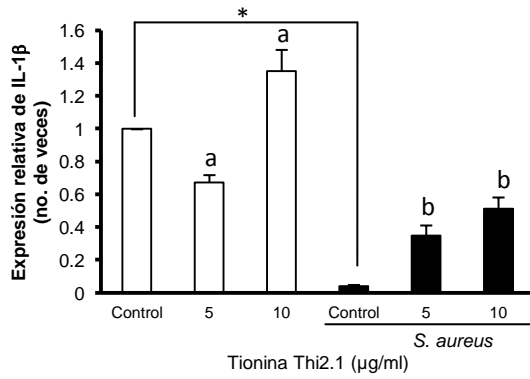
Los resultados mostraron que el tratamiento con la defensina  $\gamma$ -tioniina modularon diferencialmente la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias y del receptor TLR2 en las CEMB (Fig. 12). De las concentraciones evaluadas, la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  del PAP fue la que mostró mayores efectos (concentración que inhibe la internalización de *S. aureus*), ya que estimuló la expresión de los genes de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (10 veces, Fig. 12a), e IL-1 $\beta$  (10 veces, Fig. 12b), y antiinflamatorias como IL-10 (12 veces, Fig. 12d), así como la del receptor TLR2 (4 veces, Fig. 12h). Interesantemente, cuando las CEMB fueron infectadas después de las 24 h de tratamiento con la defensina  $\gamma$ -tioniina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), se observó que la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , se indujo aún más, pero la de IL-10 y el receptor TLR2 se inhibió. Por otra parte, el tratamiento de la defensina  $\gamma$ -tioniina a las concentraciones evaluadas no estimuló la expresión de las citocinas proinflamatorias de respuesta tardía IL-6 (Fig. 12c), de la quimiocina IL-8 (Fig. 12e), ni la de los PA TAP (Fig. 12f) y BNBD5 (Fig. 12g). Sin embargo, la expresión del PA BNBD5 aumentó ~2 veces en presencia de *S. aureus* en CEMB tratadas con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de  $\gamma$ -tioniina. Respecto a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , solo TLR2 fue inducido por el PAP, y cuando las CEMB tratadas con el PAP fueron infectadas incrementó la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Finalmente, con 0.005  $\mu\text{g/ml}$  de  $\gamma$ -tioniina solo se indujo la expresión de TLR2 (2 veces), la cual se incrementó por la infección. Como se estableció con anterioridad, el mayor efecto inhibitorio sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB se observó con la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de  $\gamma$ -tioniina. Interesantemente, la mayoría de los efectos sobre la expresión de genes de la RII se detectaron también en la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  del PAP, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio de este PAP sobre la internalización puede ser consecuencia de la modulación de la RII de las CEMB. De igual manera, dado que no se detectó un aumento considerable en la expresión de genes de PA endógenos en las CEMB tratadas

con la  $\gamma$ -tionina, pareciera que el efecto inhibitorio de la internalización de *S. aureus* no se debe a la introducción de moléculas antimicrobianas. Sin embargo, los antecedentes respecto a los mecanismos empleados por la célula hospedera en contra de patógenos intracelulares se basan en la estimulación y regulación de la expresión de PA. Por ejemplo, la estimulación y regulación de un péptido antimicrobiano de macrófagos murinos análogo a la catelicidina, CRAMP, en estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad de proteasas conduciendo a la inhibición de la replicación intracelular de *Salmonella typhimurium* (Rosenberger *et al.*, 2004). Asimismo, la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por macrófagos de humanos resulta en la inhibición de la replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis*. Mediante un mecanismo de cooperación celular, el macrófago adquiere el contenido antimicrobiano almacenado en los neutrófilos como la mieloperoxidasa, la catelicidina, la defensina HNP-1 y lactoferrinas las cuales ejercen la actividad antimicrobiana contra este patógeno intracelular (Tan *et al.*, 2006). Si bien el efecto inmunomodulador de los PAPs en células de mamífero no se ha estudiado, los resultados obtenidos concuerdan con la acción que ejercen los PA de origen animal, los cuales estimulan y modulan la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos resultados sugieren fuertemente que la  $\gamma$ -tionina puede modular la respuesta inmune innata de células de mamífero antes y durante un proceso infeccioso. Antes del mismo, induce una respuesta de mediadores inflamatorios de fase aguda como TNF- $\alpha$  (Fig. 12a) e IL-1 $\beta$  (Fig. 12b), así como de mediadores anti-inflamatorios IL-10 (Fig. 12d), pero al momento de una infección prevalece la respuesta inflamatoria, inhibiéndose la anti-inflamatoria. También, durante la infección, la defensina  $\gamma$ -tionina puede favorecer la producción de quimiocinas IL-8 (Fig. 12e) y de PA endógenos BNBD5 (Fig. 12g). Los efectos anteriores pueden ser la consecuencia de la activación del TLR2 (Fig. 12h) en presencia de la defensina  $\gamma$ -tionina en las CEMB, dado que la expresión del gen de este receptor se incrementó en todas las concentraciones evaluadas del PAP, lo que coincide con la abundancia del mismo en la membrana (Fig. 12h).

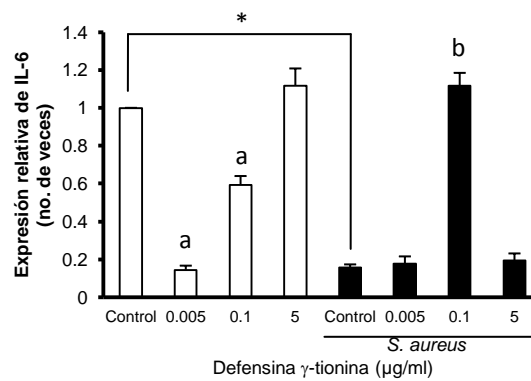
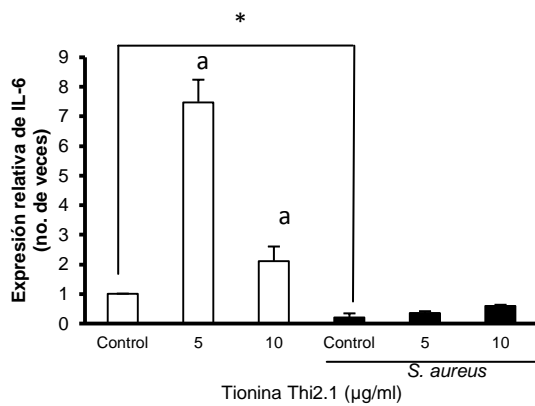
**a)**



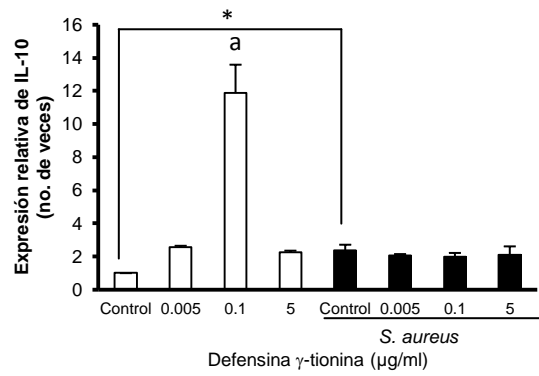
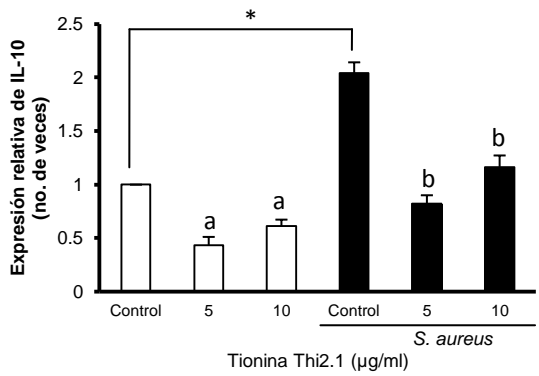
**b)**



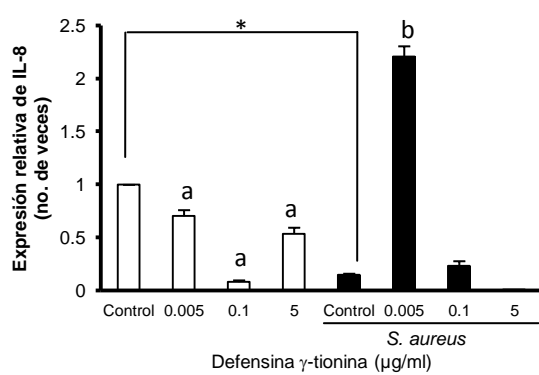
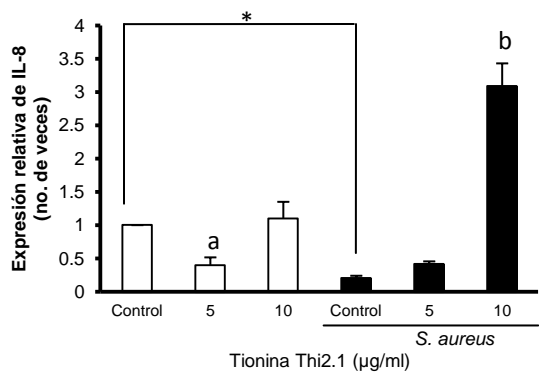
**c)**



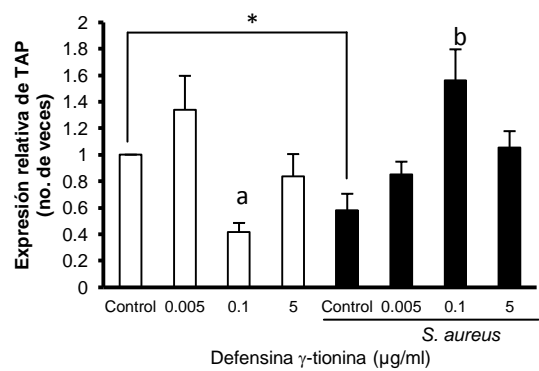
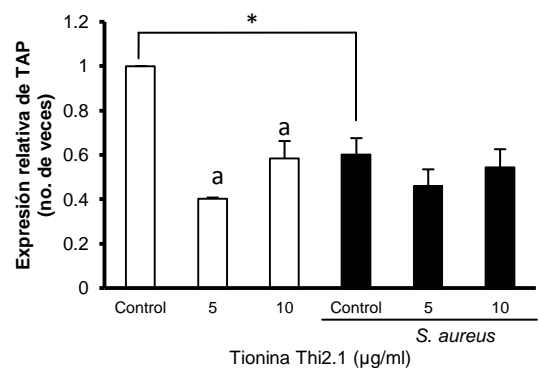
d)



e)

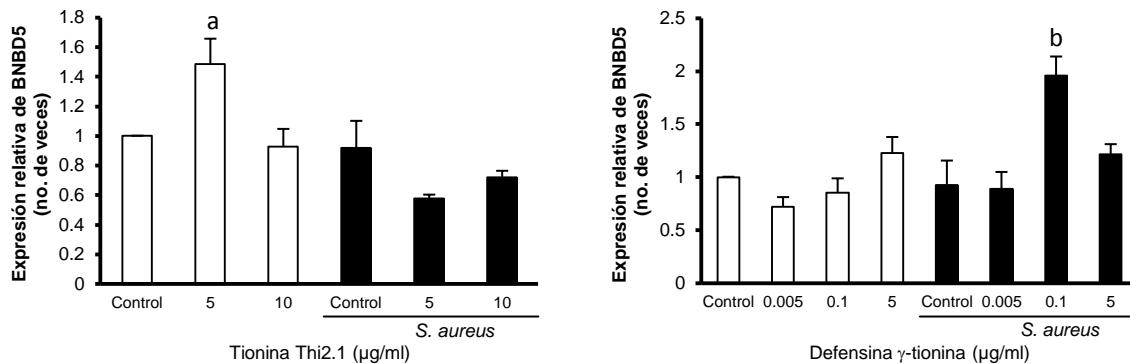


f)

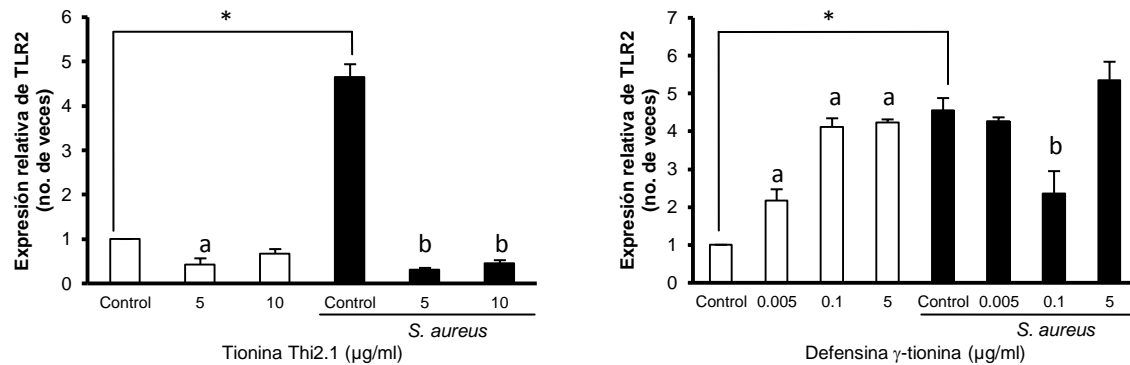




g)



h)



**Figura 12. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la expresi3n de genes de la RII de las CEMB.** Las CEMB fueron pre-tratadas con la tionina Thi2.1 (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.005, 0.1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) 24 h previas a la infecci3n. Se evalu3 la expresi3n de los genes de citocinas pro y anti-inflamatorias, quimiocinas y p3ptidos antimicrobianos: a) TNF-a, b) IL-1b, c) IL-6, d) IL-10, e) IL-8, f) TAP, g) BNBD5, y h) TLR2. La expresi3n relativa se determin3 por medio de RT-PCR en tiempo real utilizando como control end3geno GAPDH, y el m3todo de  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Se consider3 como 1, la expresi3n de las c3lulas tratadas con el veh3culo (DMSO 0.02%), las cuales fueron las c3lulas control. El “\*” indica cambios significativos de c3lulas infectadas 3nicamente con respecto a las CEMB control ( $P \leq 0.05$ ). La letra “a” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB control. La letra “b” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB infectadas. ANOVA de una v3a. Post-hoc Duncan. Se muestra el promedio de tres experimentos, realizado en cuatriplicados.

Estos resultados concuerdan, con la actividad inmunomoduladora que ejercen los PA de origen animal. Por ejemplo, la catelicidina LL-37, a concentraciones fisiol3gicas 0.5 a 50  $\mu\text{g/ml}$  mostr3 una actividad anti-endotoxina en las c3lulas de monocitos humanos THP-1 estimulados con LPS. A una

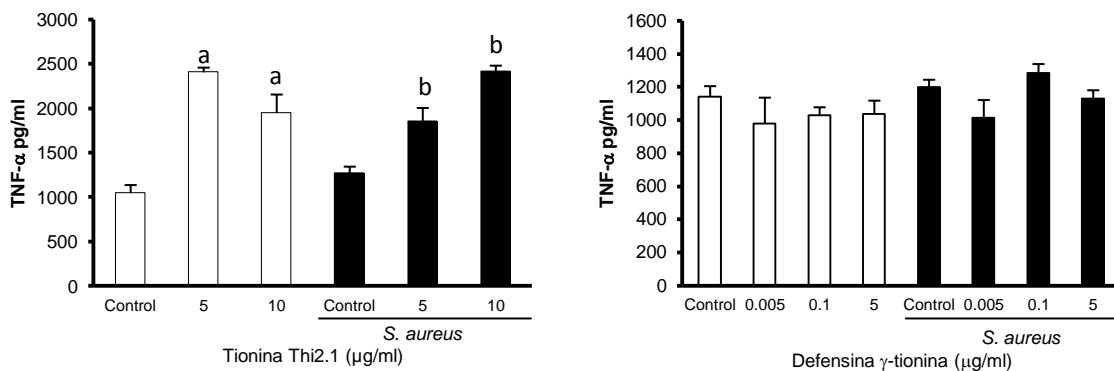
concentración de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  la catelicidina inhibió hasta un 50% la secreción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. El efecto inhibitorio de la catelicidina se incrementó a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  en un 80%, y a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  inhibió totalmente la secreción de TNF- $\alpha$ . Además, estos resultados mostraron que la catelicidina LL-37 disminuye significativamente la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 dependiente de la activación de TLR2 y TLR4 (Mookherjee *et al.*, 2009). Asimismo, el MC de neutrófilos apoptóticos, inhibió la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1 y la producción de NO en macrófagos humanos estimulados con LPS. La  $\alpha$  defensina presenté en el MC, a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  inhibió la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en monocitos estimulados con *Pseudomonas aeruginosa* (Miles *et al.*, 2009). Con base en estos antecedentes, y los resultados del efecto de los PAPs sobre la modulación diferencial de la expresión de elementos de la RII de las CEMB, se planteó evaluar el efecto de los PAPs sobre la secreción de citocinas proinflamatorias y la producción de NO.

### **9.6 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la secreción de citocinas proinflamatorias**

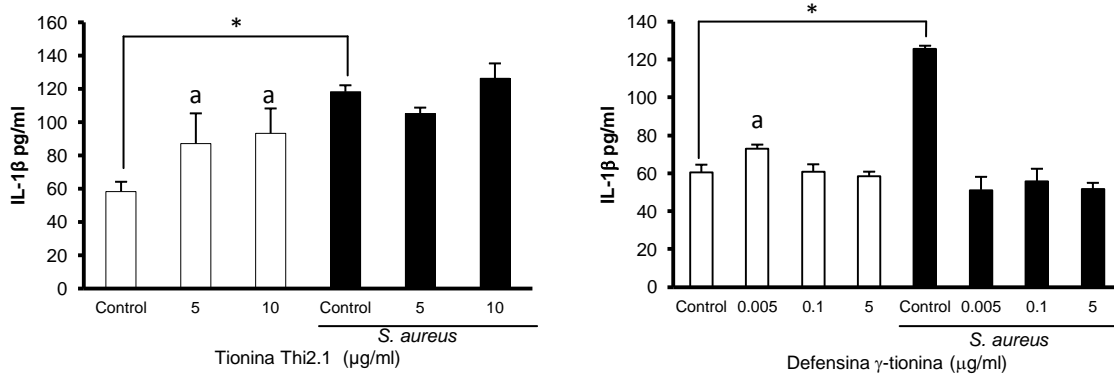
La secreción de citocinas se determinó mediante kits de ELISA comerciales para citocinas de origen bovino. La tionina Thi2.1 a las dos concentraciones evaluadas estimuló la secreción del TNF- $\alpha$ , la cual permaneció elevada aún en presencia de la infección, que por si sola no tuvo ningún efecto sobre la secreción de esta citocina (Fig. 13a). Al tiempo evaluado del tratamiento (24 h), la secreción del TNF- $\alpha$  no corresponde con la expresión del gen que la codifica en la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , ya que la expresión del gen se mantiene sin cambios en presencia de la tionina Thi2.1. Para la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  si coincide la expresión del gen y la secreción del TNF- $\alpha$ . En este caso es necesario explorar otros tiempos de tratamiento con la tionina Thi2.1, para determinar si la secreción que se está detectando corresponde a la acumulación de la proteína resultante de la expresión del gen, o si se debe a un mecanismo diferente de la regulación poost-traducciona. Con relación a la citocina IL-1 $\beta$  (Fig. 13b), la tionina Thi2.1

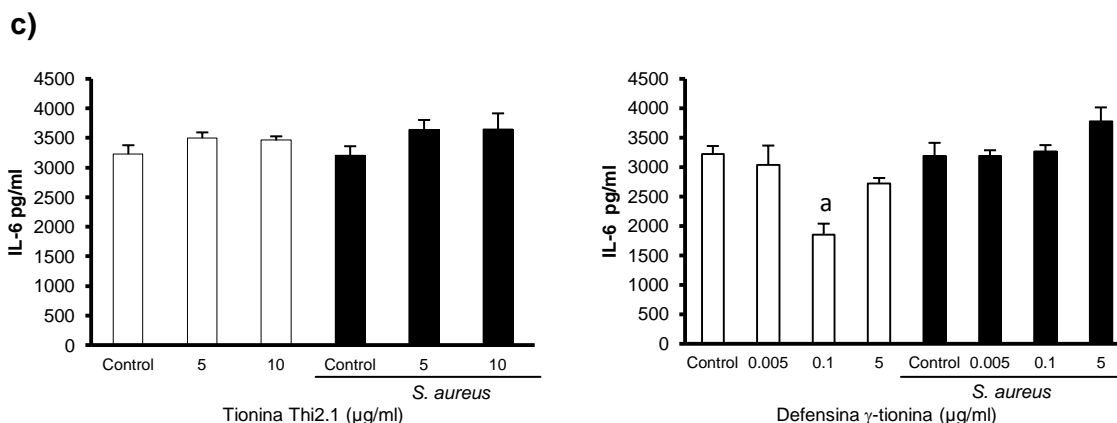
estimula su secreción a las dos concentraciones evaluadas, mientras que no modificó la secreción a las dos concentraciones evaluadas, mientras que no modificó la secreción estimulada por *S. aureus*. Adicionalmente, la secreción de esta citocina no corresponde a los resultados obtenidos con la expresión del gen. Esto puede deberse a la activación de otros mecanismos como el del inflammasoma, el cual puede inducir la secreción de IL-1 $\beta$  a través de un mecanismo post-traducciona l independiente de la expresión génica, mecanismo que requiere de futura investigación en el modelo utilizado. Por otra parte, la secreción de IL-6, esta permaneció sin cambios para todos los tratamientos en los que se empleó la tionina Thi2.1 (Fig. 13c), hecho que no corresponde con la expresión aumentada del gen que se detectó a la concentración de 5  $\mu$ g/ml de tionina Thi2.1. Es posible que al tratarse ésta de una citocina de respuesta tardía, sea necesario evaluar su secreción a tiempos posteriores.

a)



b)





**Figura 13. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la secreción de citocinas en las CEMB.** Las CEMB se trataron con la tionina Thi2.1 (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.005, 0.1, y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h. La secreción de las citocinas se evaluó mediante ELISA utilizando kits comerciales (RyD) para las citocinas bovinas: a) TNF- $\alpha$ , b) IL-1 $\beta$  y c) IL-6. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Se consideró como control a las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.02%). El “\*” indica cambios significativos de células infectadas en presencia de vehículo con respecto a las CEMB control ( $P \leq 0.05$ ). La letra “a” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB control. La letra “b” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB infectadas. ANOVA de una vía. Post-hoc Duncan.

Con relación a los tratamiento con la defensina  $\gamma$ -tionina defensina, los resultados mostraron que no presentó cambios sobre la secreción de TNF- $\alpha$  en ninguna condición (Fig. 13a). Al respecto, y considerando los resultados de expresión del gen del TNF- $\alpha$ , habría que evaluar la secreción de esta citocina a tiempos menores de incubación. Sin embargo, la defensina  $\gamma$ -tionina estimuló ligeramente la secreción de IL-1 $\beta$  (en la concentración de 0.005  $\mu\text{g/ml}$ , inhibiendo, por otra parte, la secreción inducida por *S. aureus* en todas las concentraciones evaluadas. La secreción de IL-6 inhibió en las CEMB tratadas con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de la defensina  $\gamma$ -tionina (Fig. 13c). La correlación del efecto de la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la expresión de genes de citocinas y la secreción de las proteínas se observó únicamente para la IL-6, en la que se detectó una disminución tanto en la expresión del gen como en la secreción de la proteína a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . Esto puede deberse a que al tratarse de una citocina de respuesta tardía, es posible detectarla a las 24 h de haber aplicado los tratamientos, mientras que para el caso de la IL-1 $\beta$ , o del TNF- $\alpha$ , los cambios en la secreción de la

concentración de las proteínas pueden no detectarse debido a que son de respuesta inmediata, y el péptido puede ya no estar acumulado en el medio a las 24 h de tratamiento. En todos los casos, los medios para determinar la concentración de las citocinas se recuperaron a las 24 horas de incubación con la defensina  $\gamma$ -tionina, por lo que es posible, que sea necesario realizar valoraciones a tiempos más cortos en estudios futuros.

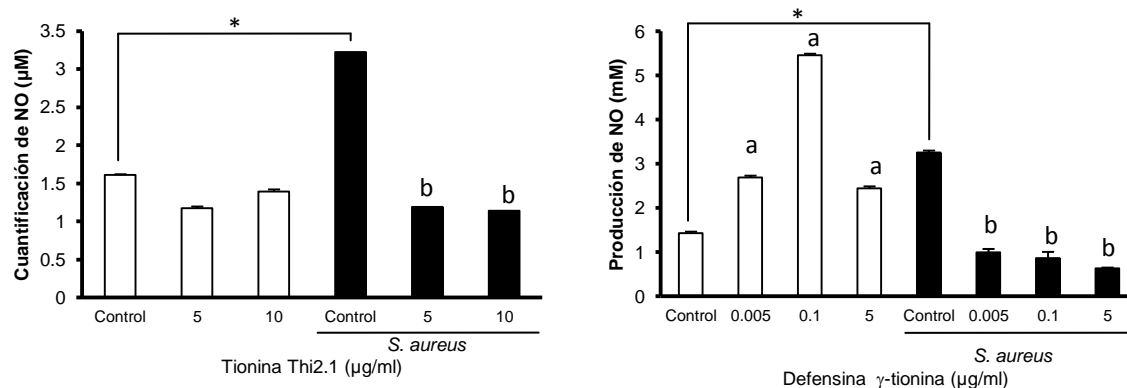
Adicionalmente, al igual que el efecto detectado para la tionina Thi2.1, la secreción de IL-1 $\beta$  puede generarse por un mecanismo independiente a la expresión de genes, el cual consiste en la proteólisis de un propéptido de IL-1 $\beta$  que se genera cuando se activa una cascada de señales asociadas con el inflammasoma. Se ha descrito que *S. aureus* induce el inflammasoma en epitelio mamario murino en modelos *in vivo* (Breyne *et al.*, 2014). Esta puede ser una explicación de porqué se encuentra aumentada la secreción de IL-1 $\beta$  en las CEMB infectadas, y por lo tanto se vuelve relevante el hallazgo de que en presencia de la defensina  $\gamma$ -tionina se inhiba la secreción de la citocina.

Se conoce que las células fagocíticas profesionales, como los macrófagos o neutrófilos tienen gránulos delimitados por una membrana que contienen enzimas y péptidos (péptidos antimicrobianos) además de especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico, anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Janeway 1989). Este contenido, una vez liberado al fusionarse el fagosoma con el lisosoma, ayuda a destruir a los microorganismos patógenos intracelulares, aunque también hay liberación extracelular. Se ha reportado también que las células fagocíticas no profesionales como el epitelio y endotelio producen PA y óxido nítrico al ser estimuladas por componentes bacterianos como LPS y LTA, así como por la infección por microorganismos patógenos (Loeza-Ángeles *et al.*, 2011; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Dado lo anterior, la producción de NO constituye un elemento importante de la RII por lo que se decidió evaluar el efecto del tratamiento de los PAPs sobre la producción del mismo en las CEMB.

## 9.7 Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina sobre la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB

La producción del NO se determinó evaluando la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) presente en el medio condicionado recuperado del cultivo celular. Los resultados mostraron que la tionina Thi2.1 no estimula la producción de NO en las CEMB (Fig. 14). En presencia de la infección, Thi2.1 inhibió la producción de NO estimulada por la bacteria. Estos hallazgos sugieren que la producción del NO no es el mecanismo por el cual se podría explicar un menor número de bacterias internalizadas en las CEMB en presencia de la tionina Thi2.1. Por otro lado, el tratamiento con la defensina  $\gamma$ -tionina estimuló la producción del NO en las CEMB (Fig. 14), siendo mayor el aumento a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (5 veces). Este hecho puede ayudar a explicar también que existe una menor internalización de *S. aureus* en esta concentración, ya que posiblemente esté matando a la bacteria. Adicionalmente, y como ya se ha reportado previamente por el grupo de trabajo y otros reportes, *S. aureus* induce la secreción de NO, la cual se inhibe en presencia de la defensina  $\gamma$ -tionina (Loeza-Ángeles *et al.*, 2011).

Este resultado coincide con reportes del grupo de trabajo en los que se determinó una inducción en la producción de NO en las CEMB en presencia del MC de células endoteliales productoras de la defensina  $\gamma$ -tionina (Loeza-Ángeles 2011).



**Figura 14. Efecto de la tionina Thi2.1 y la defensina  $\gamma$ -tionina sobre la producción de NO en las CEMB.** Las CEMB se trataron 24 h con la tionina Thi2.1 (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.005, 0.1, y 5  $\mu\text{g/ml}$ ). La producción de NO se determinó mediante la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) presente en el medio condicionado. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Se consideró como control a las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.02%). El “\*” indica cambios significativos de células infectadas en presencia de vehículo con respecto a las CEMB control ( $P \leq 0.05$ ). La letra “a” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB control. La letra “b” indica cambios significativos ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a las CEMB infectadas. ANOVA de una vía. Post-hoc Duncan.

### **9.8 Modelo del efecto inmunomodulador de la tionina Thi2.1 y la defensina $\gamma$ -tionina en CEMB infectadas con *S. aureus* (internalizado).**

En la Figura 15a se muestra una integración de los efectos inmunomoduladores más relevantes de la tionina Thi2.1 sobre las CEMB en ausencia o presencia de la infección con *S. aureus* reportado en el presente trabajo. La tionina a la concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  induce la abundancia en membrana del TLR2 (2 veces). Además, incrementa la expresión de genes para citocinas como el de IL-6 (5  $\mu\text{g/ml}$ , ~ 7 veces) o del TNF- $\alpha$  (10  $\mu\text{g/ml}$ , ~ 2 veces). De igual forma, la tionina a las 2 concentraciones evaluadas induce la secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Tras la infección con *S. aureus* a las dos concentraciones evaluadas la tionina Thi2.1 disminuye la abundancia en membrana del TLR2 inducida por *S. aureus* a niveles basales, lo que puede resultar en la inhibición de la expresión de los siguientes genes también inducidos por la bacteria: TLR2, TNF- $\alpha$  e IL-10. La tionina Thi2.1 también inhibe la producción de NO inducida por la bacteria. Por el contrario, a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de Thi2.1, se incrementa la expresión de la quimiocina IL-8 (~ 3 veces) en las células infectadas. La secreción de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se mantiene igual que en las CEMB sin infectar. Finalmente, la disminución de la abundancia del TLR2 puede ayudar a explicar la menor cantidad de bacterias internalizadas que se recuperan a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de tionina Thi2.1, ya que se estaría inhibiendo el reconocimiento de la CEMB por la bacteria.

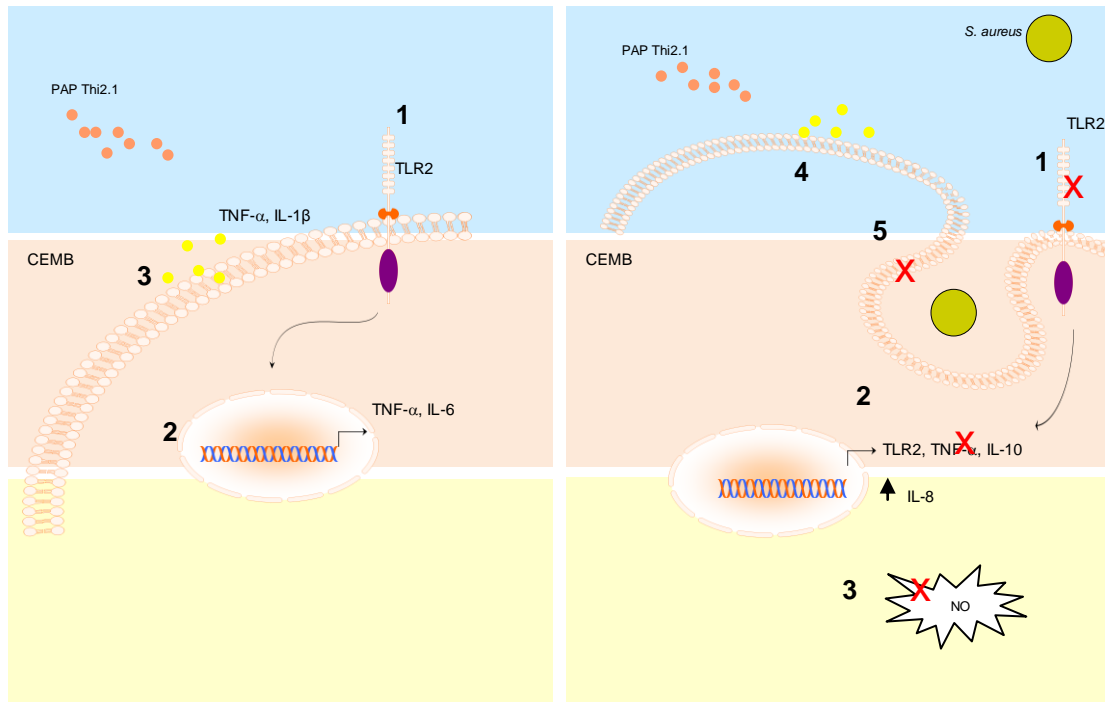
En la Figura 15b se describe la integración de los efectos inmunomoduladores de la defensina  $\gamma$ -tionina sobre las CEMB infectadas con *S. aureus* o en condiciones basales. Para este caso, y dado que fue la condición que mostró el mayor efecto

inhibitorio sobre la internalización de *S. aureus*, se describen solo los resultados obtenidos con la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . Las CEMB tratadas con la defensina  $\gamma$ -tionina incrementan la abundancia en membrana del TLR2 (~ 3 veces), el cual puede activar la transcripción de los siguientes genes: TNF- $\alpha$  (~ 10 veces), IL-1 $\beta$  (~ 10 veces), IL-10 (~ 12 veces), TLR2 (~ 4 veces), así como la producción de NO (~ 5 veces). La defensina  $\gamma$ -tionina inhibe la secreción de IL-6, mientras que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no mostraron cambios. En presencia de la infección con *S. aureus* y la defensina  $\gamma$ -tionina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) las CEMB incrementan la abundancia en membrana del TLR2 (~ 6 veces), e inducen la transcripción de los siguientes genes: TNF- $\alpha$  (~ 15 veces), IL-1 $\beta$  (~ 12 veces), TLR2 (~ 2 veces) y BNBD5 (~ 2 veces. De igual forma, reducen a niveles basales la expresión de IL-10 y la producción de NO. La secreción de la citocina TNF- $\alpha$  e IL-6 no mostraron cambios, sin embargo, se reduce a niveles basales la secreción de IL-1 $\beta$  inducida por *S. aureus*. La significativa respuesta inflamatoria que induce este PAP en las CEMB, puede resultar en la inhibición de la internalización de *S. aureus*, la cual puede también ser la consecuencia de la producción de moléculas antimicrobianas como BNBD5 o NO.



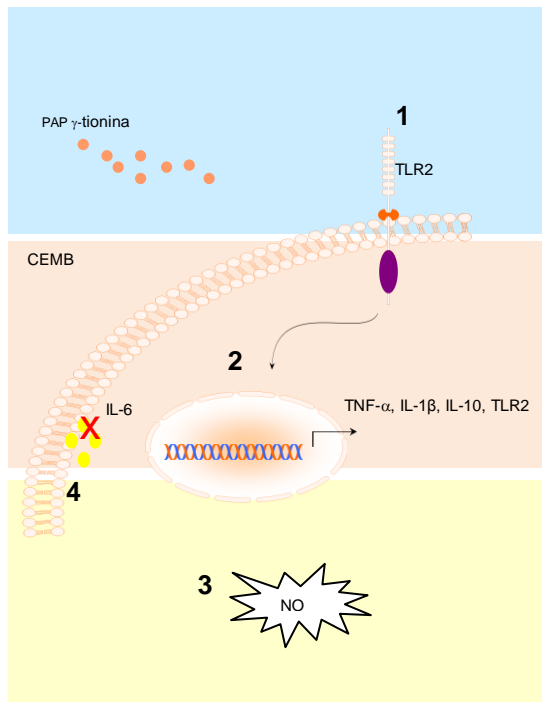
### CEMB sin Infectar

### CEMB infectadas

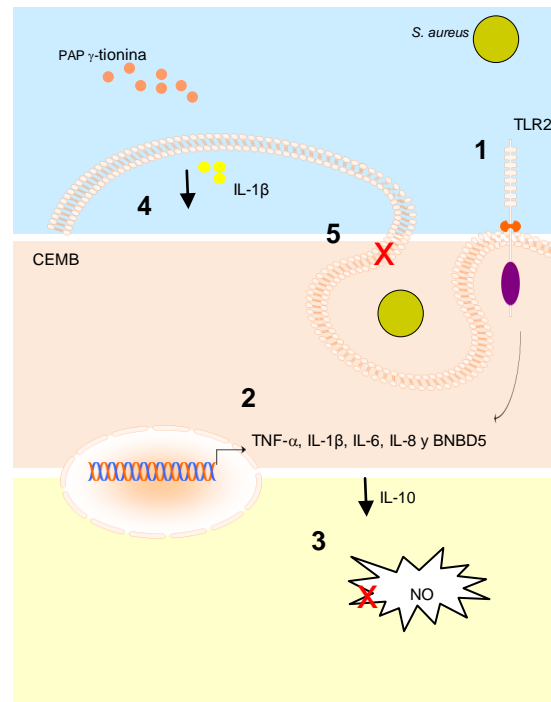


**Figura 15a. Efecto inmunomodulador de la tionina Thi2.1 en CEMB infectadas con *S. aureus* (internalizado).** En ausencia de la infección la tionina Thi2.1: 1) induce la abundancia en membrana del TLR2, 2) incrementa la expresión de citocinas IL-6 o del TNF- $\alpha$ , 3) induce la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . En presencia de la infección, la tionina Thi2.1: 1) disminuye la abundancia en membrana del TLR2 inducida por *S. aureus*, 2) disminución de la expresión de TLR2, TNF- $\alpha$ , IL-10, 3) disminuye la producción de NO inducidos por la bacteria e incrementa la expresión de la quimiocina IL-8 en las células infectadas. 4) La secreción de las citocinas se mantiene. 5) La tionina Thi2.1 inhibe la internalización de *S. aureus* Como consecuencia de la modulación de elementos de la RII de las CEMB.

## CEMB sin Infectar



## CEMB infectadas



**Figura 15b. Efecto inmunomodulador de la defensiva  $\gamma$ -tionina en CEMB infectadas con *S. aureus* (internalizado).** En ausencia de la infección la defensiva  $\gamma$ -tionina: 1) incrementa la abundancia en membrana del TLR2, 2) induce la transcripción de los siguientes genes: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, TLR2, 3) induce la producción de NO. 4) inhibe la secreción de IL-6, mientras que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no mostraron cambios. En presencia de la infección con *S. aureus* la defensiva  $\gamma$ -tionina: 1) incrementa la abundancia en membrana del TLR2, 2) induce la transcripción de: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TLR2, BNBD5, 3) reduce a niveles basales la expresión de IL-10 y la producción de NO, 4) reduce a niveles basales la secreción de IL-1 $\beta$  inducida por *S. aureus*. 5) La defensiva  $\gamma$ -tionina estimula una significativa respuesta inflamatoria y como consecuencia de la modulación de elementos de la RII, inhibe la internalización de *S. aureus* en las CEMB

## 10. CONCLUSIONES

Los PAP sintéticos defensina  $\gamma$ -tionina de *Capsicum chinense* y tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* modulan diferencialmente la respuesta inmune innata (RII) de células de epitelio mamario bovino (CEMB), lo cual puede relacionarse con la inhibición que ejercen sobre de la internalización de *S. aureus* en estas células.

La defensina  $\gamma$ -tionina induce una mayor expresión del receptor TLR2 y de genes pro- y antiinflamatorios, así como un incremento en la producción de óxido nítrico, en comparación con la tionina Thi2.1 que induce la expresión genes de respuesta tardía, y no favorece la producción de óxido nítrico. Lo anterior resulta en que la defensina  $\gamma$ -tionina presente un mayor efecto inhibitorio sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB que la tionina Thi2.1.

## 11. REFERENCIAS

- Armstead AL y Li B., 2011. Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens. *Int J Nanomed.* 6: 3281-3293.
- Akira S, Takeda K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4: 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 4: 783-801.
- Aluru M, Curry J, O'Connell MA., 1999. Defensin or gamma-thionin-like gene (Accession No. AF128239) from Habanero Chili. *Plant Physiol.* 120: 633.
- Anaya-López JL, López-Meza JE, Baizabal-Aguirre VM, Cano-Camacho H, Ochoa-Zarzosa A., 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol Lett* 28: 1101-1108.
- Alva-Murillo N, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A., 2014. Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Res Int.* 1-9.
- Alva-Murillo N, Téllez-Pérez AD, Medina-Estrada I, Álvarez-Aguilar C, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE., 2014. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathog.* 77: 24-30.
- Alva-Murillo N, Téllez-Pérez AD, Sagrero-Cisneros E, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A., 2012. Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cell Immunol.* 280: 108-112.
- Barlow PG, Beaumont PE, Cosseau C, Mackellar A, Wilkinson TS, Hancock RE, Haslett C, Govan JR, Simpson AJ, Davidson DJ., 2010. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 43: 692-702.
- Banneman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P., 2004. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 463-472.

Bedolla CC y Ponce de León MER., 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera . REDVET.: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.

Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A., 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol.* 163: 947-53.

Beutler B., 2001. Sepsis begins at the interface of pathogen and host. *Biochem Soc Transact.* 29: 853-859.

Beutler B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 40: 845-859.

Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW., 2002. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298: 1025-1029.

Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Loir Le, Even S., 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cell by contact with live *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol.* 79: 877-85.

Breyne K, Cool SK, Demon D, Demeyere K, Vandenberghe T, Vandenaabeele P, Carlsen H, Van Den Broeck W, Sanders NN, Meyer E., 2014. Non-classical proIL-1beta activation during mammary gland infection is pathogen-dependent but caspase-1 independent. *PLoS One.* 9: e105680.

Brinch KS<sup>1</sup>, Sandberg A, Baudoux P, Van Bambeke F, Tulkens PM, Frimodt-Møller N, Høiby N, Kristensen HH., 2009. Plectasin shows intracellular activity against *Staphylococcus aureus* in human THP-1 monocytes and in a mouse peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 11: 4801-4808.

Brogden AK., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol.* 3: 238-50.

Büssing A, Schaller G, Pfüller U., 1999. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album*. *L Anticancer Res.* 18: 4292-4296.

Capparelli R, Ventimiglia I, Palumbo D, Nicodemo D, Salvatore P, Amoroso MG, Iannaccone M., 2007. Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris). *J Biotechnol.* 128: 606-614.

Chaly YV, Paleolog EM, Kolesnikova TS, Tikhonov II, Petratchenko EV, Voitenok NN., 2000. Neutrophil defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw.* 11: 257-66.

Choi KY, Chow LN, Mookherjee N., 2012. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun* 4: 361-370.

Chambers HF., 2005. Community-associated MRSA-resistance and virulence converge. *N Engl J Med*. 352: 1485-1487.

Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE, Speert DP., 2004. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*. 172: 1146-1156.

Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock RE., 2009. Potential of Immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol* 27: 582-590.

Epple P, Apel K, Bohlmann H., 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*. 3: 813-20.

Ezzat MA, Quintela-Baluja M, Böhme, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calomata P, Barros-Velázquez J., 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Vet Med*. 1-31.

Fernández De Caleyá R, Gonzales-Pascual B, García-Olmedo F, Carbonero P., 1972. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to heat purpurothionins in vitro. *Appl Microbiol*. 23: 998-1000.

Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G., 2011. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 11: 37-51.

Fraunholz M y Sinha B., 2012. Intracellular Staphylococcus: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol*. 2: 1-10.

Foster TJ., 2005. Immune evasion by Staphylococci. *Nat Rev Microbiol*. 3: 948-958.

Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 12: 49-62.

Fu Y, Zhou E, Liu Z, Li F, Liang D, Liu B, Song X, Zhao F, Fen X, Li D, Cao Y, Zhang X, Zhang N, Yang Z., 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 4: 245-252.

Ganz T., 2003. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *Interg Comp Biol.* 43: 300-304.

García F, Molina A, Alamillo MJ, López E, Berrocal M, Poza C., 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 2: 219-222.

Gardy JL, Lynn DJ, Brinkman FS, Hancock RE., 2009. Enabling a systems biology approach to immunology: focus on innate immunity. *Trends Immunol.* 30: 249-262.

Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P., 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.* 44: 1-22.

Goldammer T, Zerbe H, Moleenar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM., 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: 174-85.

Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM., 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135: 1–11.

Guzmán-Rodríguez Jaquelina Julia, Ochoa-Zarzosa Alejandra, López-Gómez Rodolfo and López-Meza Joel E. 2014. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *Biomed Res Int.* 1-12.

Haggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI., 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun.* 71: 2310–2317.

Hale JD y Hancock RE., 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 951–959.

Hammami R, Ben-Hamida J, Vergoten G, Fliss I., 2008. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acid research.* 37:963-968.

Hancock REW y Scott GM., 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 8856-8861.

Hancock RE y Sahl HG., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat biotechnol.* 24: 1551-57.

Hilchie AL, Wuerth Kelli, Hancock REW., 2013 Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol.* 9: 761-768.

Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Kuwahara-Arai K, Iba T, Nagaoka I., 2014. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS ONE* 9: e85765.

Janeway Jr., C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1:1-13

Janeway CA Jr y Medzhitov R., 2002. Innate immune recognition. *Annue Rev Immunol.* 20: 197-216.

Jenssen H, Hamill P, Hancock RE., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19: 491-511.

Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Ek B, Thunberg E, G Samuelsson, Larsson R, Bohlin L, Claeson P., 2003. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. *Cell Moll Life Sci.* 60: 165-175.

Kandler K. et al., 2006 The anti-microbial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands. *Int Immunol.* 18: 1729-1736

Kerro Dego O, van Dijk JE, 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.

Kin NW, Chen Y, Stefanov EK, Gallo RL, Kearney JF., 2011. Cathelin-related antimicrobial peptide differentially regulates T- and B-cell function. *Eur J Immunol.* 41: 3006-3016.

Krishnakumari V, Singh S, Nagaraj R., 2006. Antibacterial activities of synthetic peptides corresponding to the carboxy-terminal region of human  $\beta$  defensins 1-3. *Peptides* 27: 2607-2613.

Lee PH, Rudisill JA, Lin KH, Zhang L, Harris SM, Falla TJ, Gallo RL., 2004. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen.* 12: 351-358.

Leonard FC y Markey BK., 2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J.* 175: 27-36.



López-Meza JL, Ochoa-Zarzosa A, Aguilar JA, Loeza-Lara DP., 2011. Antimicrobial peptides: Diversity and perspectives for their biomedical application. En: Biomedical Engineering, Trends, Researches and Technologies cap. 12: 275-304.

Loeza-Ángeles, H., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., 2011. Antimicrobial effects of plant defence peptides expressed by bovine endothelial cells on intracellular pathogens. Electronic Journal of Biotechnology Vol.14, <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-1>.

Loeza-Ángeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Lara-Zárate, L., Villagómez-Gómez, E., Lopez-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2008. Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. Biotechnol Lett 30: 1713-1719.

Mansour SC, Pena OM, Hancock REW., 2014. Host defense peptides: front-line immunomodulators. Trends Immunol. 35: 443-450.

Miles K, Clarke DJ, Lu W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Gray M., 2009. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. J Immunol 183: 2122-2132.

Mogensen TH., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev. 22: 240-273.

Mookherjee N, Brown KL, Boudish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Briankman FS, Hancock RE., 2006. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. J Immunol. 176: 2455-2464.

Nawrot R, Barylski J, Nowicki G., 2014. Plant antimicrobial peptides. Folia Microbiol. 59: 181-196.

Newton K y Dixit VM., 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. Col Spring Harb Perspect Biol. 4: a006049

Nijnik A y Hancock REW, 2009. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. Emerg Health Threats J. 2: e1.

Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, Mayer ML, Mullaly SC, Kindrachuk J, Jenssen H, Hancock RE., 2010. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. J Immunol. 184: 2539-2550.

Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock RE., 2013. The innate defense regulator peptides IDR- HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J Leukoc Biol.* 94: 159-170.

Niyonsaba, Fet al., 2007. Antimicrobial peptides human b-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol.* 127: 594-604.

Niyonsaba F, et al., 2002. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology.* 106: 20-26.

Noore J, Noore A, Li B., 2013. Cationic antimicrobial peptide LL-37 is effective against both extra- and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* 57:1283-1290.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG., 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 6:453-460.

Padovan L, Scocchi M, Tossi A., 2010. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 11:210–219.

Pelegri BP, Perseguini del Sarto R, Nascimento SO, Luiz FO, Grossi-de-Sa MF., 2011. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochem Res Int.* 1-9.

Pena OM, Afacan N, Pistolic J, Chen C, Madera L, Falsafi R, Fjell CD, Hancock RE., 2013. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PLoS ONE* 8: e52449.

Peters MB, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA., 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?. *PLoS Pathog.* 6: e1001067.

Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M., 2002. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 360: 1144-1149.

Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Ángeles H, Lara-Zárate L, Sagrero-Cisneros E, Villagómez-Gómez E, López-Meza JE., 2008. Antibacterial activity of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 127: 425-430.

Ochoa-Zarzosa A, Sagrero-Cisneros E, López-Meza JE., 2011. Effects of plant antimicrobial peptides on innate immune response of mammary epithelium infected with *Staphylococcus aureus*. 51st ICAAC Congress. 17-20 de septiembre. Chicago, USA.

Rainard P y Riollet C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37: 369-400.

Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook, González-Curiel I, León-Contreras JC, Enciso-Moreno JA, del Villar V, Mendez-Ramos J. Hancock RE, Hernandez-Pando R., 2013. Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models. *PLoS One* 8: e59119.

Röhl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans, T., 2010. Human b-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol.* 184: 6688-6694.

Rosenberg CM, Gallo RL, Finlay B., 2004. Interplay between antimicrobial effectors: A macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *PNAS.* 101: 12422-2427.

Roosen S, Exner K, Paul S, Schroder JM, Kalm E, Looft C., 2004. Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm Genome.* 15: 834-42.

Scott MG, Dullaghan E, Mookherjee N, Glavas N, Waldbrook M, Thompson A, Wang A, Lee K, Doria S, Hamill P, Yu JJ, Li Y, Donini O, Guarna MM, Finlay BB, North JR, Hancock RE., 2007. An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat Biotechnol.* 25: 465-472.

Shizuo A, Satoshi U, Osamu T., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124: 783-801.

Sinha B y Fraunholz M., 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int Med Microbiol.* 3: 170-175.

Sinha B y Herrmann M., 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost.* 94: 266-277.

Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, VandenBosch KA., 2005., Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 600-610.

Schroeder JW: Bovine mastitis and milking management. Extension Bulletin AS-1129.: North Dakota State University; 2010. Available online at [http:// www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf](http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf).

Sordillo LM, Streicher KL., 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7: 135-46.

Stotz HU, Waller F, Wang K., 2013 Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides. Springer Basel. 29-59.

Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM., 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144: 270-289.

Tan BH, Meinken C, Bastian M, Heiko B, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T. 2006. Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *J Immunol.* 177: 1864-1871.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brow GD, Gordon S., 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annue Rev Immunol.* 23: 901-44

Thomma BP, Cammue BP, Thevissen K., 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.

Tjabringa GS, Ninaber DK, Drijfhout JW, Rabe KF, Hiemstra PS., 2006. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol* 140: 103-112.

Trouillet S, Rasigade JP, Lhoste Y, Ferry T, Vandenesch F, Etienne J, Laurent F., 2011. A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *J Microbiol Methods.* 86: 145-149.

Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl HG., 2012. Antimicrobial host defensins-specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Front Immunol* 3: 249.

Wang JH, Zhang K, Wang N, Qiu XM, Wang YB., 2013. Involvement of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathway in beta1 integrin-mediated internalization of *Staphylococcus aureus* by alveolar epithelial cells. *J Microbiol.* 51: 644-650.

Wang Z, Wang G., 2009. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research* 32: 590-592.

Wong JH y Ng TB., 2005. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides.* 26: 1120-1126.

Wong JH y Ng TB., 2009. Limenin, a defensin-like peptide with multiple exploitable activities from shelf beans. *Journal of Pept Sci* 12: 341346.

Wellnitz O y Bruckmaier RM., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192: 148-152.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ., 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 23: 291-96

Yamashita T, Saito K., 1989. Purification, primary structure, and biological activity of guinea pig neutrophil cationic peptides. *Infect Immun.* 57: 2405-9

Yang D, Chertov O. Oppenheim JJ., 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* 69: 691-697.

Yeaman MR y Yount NY., 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptides Action and Resistance. *Pharmacol Rev* 55: 27-55.

Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolic J, Li Y, Rehaume L, Hancock RE., 2007. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol.* 179: 7684-7691.

Zasloff M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 145: 389-395.