



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

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

PARTICIPACIÓN DE LA RUTA DE INTEGRINAS $\alpha 5\beta 1$ /FAK EN LA INTERNALIZACIÓN DE
Staphylococcus aureus REGULADA POR ÁCIDOS GRASOS EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS
BOVINAS

Tesis

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas
Área temática: Biotecnología Pecuaria

Presenta
LGA. MONICA GUADALUPE SÁNCHEZ CEJA

Asesor
DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

Co-asesora
DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

Sinodales
DR. HORACIO CANO CAMACHO
DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA
DR. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

Morelia, Michoacán, mayo 2019

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 14.5) y del CONACyT (proyecto CB-2013-01-221363 y la beca 618661).

Agradezco a CONACyT por la beca (618661) otorgada durante mis estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Me faltarían páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial mi Madre y mi Padre que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar esta etapa y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

Asimismo, agradezco infinitamente a mis Hermanos que con sus palabras me hacían sentir orgulloso de lo que soy y de lo que les puedo enseñar. Ojala algún día yo me convierta en su fuerza para que puedan seguir avanzando en su camino.

De igual forma, agradezco a mis Directores de Tesis, que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A los Profesores que me han visto crecer como persona, ya que gracias a sus conocimientos hoy puedo culminar esta etapa.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y no solo compartieron sus conocimientos, sino también su amistad no es necesario mencionarlos ustedes saben quiénes son.

CONTENIDO

Página

Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	VIII
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
I.2. Mastitis bovina	5
I.3. Respuesta inmune de la glándula mamaria (GM)	6
I.4. Receptores de tipo integrinas y su participación en la internalización de <i>S. aureus</i> en células fagocíticas no profesionales (CFNP)	8
I.5. La cinasa FAK y su participación en la internalización de <i>S. aureus</i> en CFNP	12
I.6. FAK/PYK2 e isoformas	14
I.7. GTPasas y su participación en la internalización bacteriana	16
I.8. Propiedades fisiológicas de los ácidos grasos	18
II. ANTECEDENTES	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
V.1. Objetivo general	26
V.2. Objetivos específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VI.1. Estrategia experimental	27
VI.2. Materiales	28
VI.2.1. Reactivos y cepas	28
VI.2.2. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino	28
VI.2.3. Oligonucleótidos utilizados para qPCR	29
VI.3. Metodología	29
VI.3.1. Análisis de la expresión relativa de los genes de la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 1$ del receptor de integrinas en las CEMB	29
VI.3.2. Determinación de la adhesión de <i>S. aureus</i> en las CEMB tratadas con AG	30

VI.3.3. Medición de la abundancia del receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana plasmática de las CEMB a través de citometría de flujo	31
VI.3.4. Participación de FAK y Rac ₁ en la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB tratadas con los ácidos grasos.....	32
VI.3.5. Ensayos de Western blot.....	32
VI.3.6. Análisis de datos	33
VII. RESULTADOS.....	34
VII.1. El NaP y NaH regulan diferencialmente la expresión del gen de la subunidad $\alpha 5$ de las integrinas, pero no modifican la expresión del gen de la subunidad $\beta 1$ en las CEMB.....	34
VII.2. El NaP y NaH disminuyen la abundancia del receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana plasmática de las CEMB	35
VII.3. El NaP y NaH disminuyen la adhesión de <i>S. aureus</i> en las CEMB, mientras que el NaB y NaO la aumentan.....	37
VII.4. La cinasa FAK es importante durante la disminución de la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB modulada por AG	38
VII.5. Los AGCC y AGCM modulan de manera diferencial la activación de la cinasa FAK .	39
VII.6. La pequeña Rho GTPasa Rac ₁ participa de manera importante en la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB	41
VII.7. Los ácidos grasos disminuyen la expresión de la GTPasa Rac ₁ en CEMB infectadas con <i>S. aureus</i>	42
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIONES.....	50
X. BIBLIOGRAFÍA	51

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Estructura y activación de los receptores de tipo integrinas.	10
Figura 2. Mecanismo de internalización tipo "zipper" de <i>Staphylococcus aureus</i> en CFNP.	12
Figura 3. Dominios de la cinasa de adhesión focal FAK.	14
Figura 4. Esquema de los dominios de FAK y PYK2.	15
Figura 5. Esquema de la señalización de las GTPasas en la migración por adhesión.	18
Figura 6. Estrategia experimental.	27
Figura 7. Análisis de la expresión de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ de la integrina en las CEMB por efecto de los AG y la infección con <i>S. aureus</i>	35
Figura 8. Efecto de los AG sobre la abundancia en membrana de los receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$ en las CEMB.	36
Figura 9. Efecto de los AG sobre la adhesión de <i>S. aureus</i> en las CEMB.	37
Figura 10. Participación de FAK en la reducción de la internalización de <i>S. aureus</i> regulada por AG.	38
Figura 11. Estado de activación de FAK durante la reducción de la internalización de <i>S. aureus</i> modulada por AG.	40
Figura 12. Participación de la GTPasa Rac ₁ en la disminución de la internalización de <i>S. aureus</i> modulada por AG.	41
Figura 13. Los ácidos grasos regulan la expresión de Rac ₁ en CEMB infectadas con <i>S. aureus</i>	42
Figura 14 Efectos de los AG NaP, NaB, NaH y NaO, sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB a través del mecanismo tipo "zipper".	49

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Isoformas de la cinasa de adhesión focal FAK.....	16
Tabla 2. Efectos de los AGCC y AGCM sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB.....	22
Tabla 3. Oligonucleótidos para qPCR utilizados en el estudio.....	29

ABREVIATURAS

Aa: aminoácidos

AG: Ácidos grasos

AGCC: Ácidos grasos de cadena corta

AGCM: Ácidos grasos de cadena media

AM: Abundancia en membrana

BNBD10: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 10

BNBD4: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 4

BNBD5: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 5

CEMB: Células de Epitelio Mamario Bovino

DEFB1: Defensina Beta 1

FAK: Cinasa de Adhesión Focal

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Fn: Fibronectina

FnBP: Proteínas de unión a fibronectina

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GEF: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina

GM: Glándula mamaria

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LAP: Péptido Antimicrobiano Lingual

LB: Luria Bertani

Lf: Lactoferrina

MDI: Multiplicidad de infección

MEC: Matriz extracelular

NaP: Propionato de sodio

NaB: Butirato de sodio

NaH: Hexanoato de sodio

NaO: Octanoato de sodio

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Células asesinas naturales

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patrones

PBS: Buffer salino de fosfatos

PYK2: Tirosin cinasa 2 rica en prolina

RII: Respuesta Inmune Innata

SCV: Variantes de colonia pequeña

TAP: Péptido Antimicrobiano Traqueal

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

La mastitis bovina es la principal enfermedad que afecta a la ganadería lechera y es de importancia económica a nivel mundial, siendo *Staphylococcus aureus* el principal microorganismo asociado a ella. *S. aureus* tiene la capacidad de internalizarse en fagocitos no profesionales, como las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), a través del mecanismo tipo “zipper”. La internalización le permite al patógeno evadir la respuesta inmune causando infecciones crónicas y recurrentes, además de que dificulta la terapia antimicrobiana. En la búsqueda de alternativas de control, nuestro grupo de trabajo ha evaluado la actividad inmunomoduladora de ácidos grasos (AG) [propionato (NaP), butirato (NaB), hexanoato (NaH) y octanoato (NaO)], demostrando que reducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB; sin embargo, se desconoce si su actividad inhibitoria está relacionada con una afectación directa de la ruta de señalización integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK. El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de los AG sobre la ruta de señalización integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Los resultados mostraron que los AG no modifican la expresión del gen de la subunidad $\beta 1$ de integrinas. Sin embargo, el NaP y NaH disminuyeron la abundancia de los receptores en la membrana (~50%), así como la adhesión bacteriana (47% y 50%, respectivamente); mientras que el NaB y NaO favorecieron la adhesión de *S. aureus* a las CEMB (137% y 129%, respectivamente). Con respecto a la participación de FAK en la internalización de *S. aureus* en las CEMB, los resultados obtenidos demostraron que esta cinasa es necesaria para la internalización de la bacteria, ya que al inhibir su actividad se observó una disminución significativa de la internalización (63%), dicho efecto se incrementó al tratar a las células con los diferentes AG (73-77%). Asimismo, el NaH disminuyó la fosforilación de FAK, mientras que el NaO la favorece; sin embargo, esto se revirtió en presencia del estímulo bacteriano. Por otro lado, se observó que el NaB favoreció la activación de FAK pero el NaP no la modificó. Además, se evaluó la participación de la GTPasa Rac₁ (participa en los procesos involucrados en rearrreglos del citoesqueleto de actina). Los resultados mostraron que esta GTPasa es necesaria para la internalización de *S. aureus*, ya que al inhibir su actividad ésta se redujo significativamente (~69%), y al tratar a las CEMB con los AG el efecto se ve favorecido (~76-78%), ya que el NaH y NaO inhiben significativamente su actividad (80 y 72%, respectivamente). En conclusión, los AG inhiben de manera diferencial la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK durante la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

Mastitis

GTPasas

Infecciones

Inmunomoduladores

Zipper

ABSTRACT

Bovine mastitis is the main disease that affects dairy cattle worldwide causing important economic losses, being *Staphylococcus aureus* the main microorganism associated. *S. aureus* is able to internalize into non-professional phagocytic cells such as bovine mammary epithelial cells (bMEC) through the "zipper" mechanism. In the search for control alternatives, during the last decade our working group has evaluated the immunomodulatory activities of short and medium chain fatty acids (FA) [propionate (NaP), butyrate (NaB), hexanoate (NaH) and octanoate (NaO)], demonstrating that these molecules reduce *S. aureus* internalization into bMEC; however, it is unknown whether their inhibitory activity is related to $\alpha 5\beta 1$ /FAK integrin signaling pathway affectation. Therefore, the aim of this study was to determine the FA effects on the $\alpha 5\beta 1$ /FAK integrin signaling pathway during *S. aureus* internalization into bMEC. The data obtained regarding the FAK participation in *S. aureus* internalization into bMEC showed that the kinase is necessary for bacterial internalization, since by inhibiting its activity a significant internalization reduction was observed (63%), which was increased when cells were treated with different FA (73-77%). Likewise, NaH decreased FAK phosphorylation, whereas NaO favors it; however, this was reversed by bacterial stimulus. On the other hand, NaB favors FAK activation but NaP did not modify it. The participation of GTPase Rac₁ was also evaluated (it participates in processes involved in actin cytoskeleton rearrangements), the results showed that Rac₁ is necessary for internalization, due that when its activity was inhibited, the internalization was significantly reduced (~71%), which was favored in bMEC treated with FA. Also, NaH and NaO significantly inhibit the Rac₁ activity (80 and 72%, respectively). In conclusion, the FA differentially inhibit the $\alpha 5\beta 1$ /FAK integrin pathway during *S. aureus* internalization reduction in bMEC.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria comensal Gram positiva que coloniza de manera persistente alrededor del 20% de la población humana, y se encuentra principalmente en la piel y las mucosas. Sin embargo, tras la penetración de las barreras endoteliales, epiteliales o dérmicas, puede generar enfermedades que van desde infecciones cutáneas superficiales hasta afecciones potencialmente mortales, como la septicemia (Tuchscher et al., 2010; Horn et al., 2017). En mamíferos este patógeno se ha asociado frecuentemente con infecciones intramamarias en las hembras lactantes (mastitis) (Gutiérrez-Barroso et al., 2007).

El éxito de *S. aureus* para causar enfermedades se ha atribuido a su capacidad para producir una variedad de factores de virulencia expresados en la superficie (proteína A, proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina y colágeno) y secretados (hemolisinas, enterotoxinas, proteasas, lipasas y coagulasas), los cuales median la adherencia bacteriana a los tejidos del hospedero permitiéndole colonizar y multiplicarse o destruir células y tejidos (Dinges et al., 2000; Kerro Deogo et al., 2002; Kong et al., 2016). En el caso de cepas facultativas intracelulares, la expresión de las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) se ha descrito como el factor más importante para la invasión, ya que cepas mutantes de *S. aureus* en los genes de FnBP bloquea en gran medida su capacidad de internalizarse en la célula hospedera (Sinha et al., 2000; Ahmed et al., 2001). Una vez dentro de la célula la bacteria puede impedir la maduración del autofagosoma y su fusión con los lisosomas, pudiendo de esta forma persistir por largos periodos de tiempo e incluso replicarse (Löffler et al., 2014). Uno de los mecanismos que utiliza para adaptarse al ambiente intracelular es el cambio de fenotipo a variante de colonia pequeña (SCV), las cuales son una subpoblación de bacterias de crecimiento lento, en general con un metabolismo reducido, solo forman pequeñas colonias en placas de agar y regulan negativamente la expresión de exotoxinas, pero aumentan la expresión de moléculas de adhesión. De esta forma, la bacteria queda protegida de los tratamientos antimicrobianos, así como del sistema inmune del hospedero (Von Eiff et al., 2006; Sendi y Proctor, 2009; Kahl,

2013). Del mismo modo esta persistencia favorece su diseminación, ya que tiene la capacidad de escapar del autofagosoma por medio de la secreción de enzimas que rompen la membrana, lo cual le permite migrar hacia el citoplasma donde recupera su capacidad invasiva (Fraunholz y Sinha, 2012; Löffler et al., 2014).

I.2. Mastitis bovina

La mastitis generalmente se define como la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a una agresión, es una enfermedad costosa y compleja asociada con un origen, gravedad y resultados variables según el medio ambiente, el agente causal y el hospedero (Fernández et al., 2012; Thompson-Crispi et al., 2014). Es una de las enfermedades más importantes que afectan a la ganadería orientada a la producción lechera a nivel mundial, debido a que tiene una prevalencia de hasta el 50% por hato lechero. Además, se estima que las pérdidas económicas ocasionadas representan el 70% de los gastos totales para los ganaderos, resultando en pérdidas de millones de dólares al año. En México, las pérdidas son de hasta \$2500 vaca/año. Los costos de la enfermedad se deben principalmente a la disminución en la producción de leche, al aumento en los gastos por tratamientos clínicos los cuáles no siempre son exitosos, así como al desecho temprano de vacas enfermas (Bedolla, 2008).

Con base en sus manifestaciones clínicas la enfermedad puede clasificarse como subclínica o clínica y de acuerdo a su duración como aguda o crónica. En la mastitis subclínica se presenta una infección sin inflamación local ni signos visibles; sin embargo, hay un aumento en el conteo de células somáticas y puede involucrar casos transitorios de inflamación y leche anormal, si esto persiste durante más de 2 meses se denomina crónica (Thompson-Crispi et al., 2014). La mastitis clínica, por otro lado, es una respuesta inflamatoria que causa cambios visibles en la leche y la ubre. En el caso de mastitis clínica leve o moderada, los cambios en la ubre pueden incluir hinchazón, calor, dolor y enrojecimiento. Se denomina grave si la respuesta incluye afectación sistémica como fiebre, anorexia y shock. La diversidad, así como la variación en la prevalencia y la abundancia de organismos causantes de mastitis, así como la variación en las respuestas del hospedero, hacen de la mastitis una enfermedad compleja que continúa

siendo una carga económica importante para la ganadería lechera (Bedolla y Ponce de León, 2008; Ferreira et al., 2013; Thompson-Crispi et al., 2014).

Se han identificado más de 100 especies de microorganismos causantes de mastitis, que dependiendo de su hábitat y su forma de transmisión, se dividen en patógenos contagiosos y ambientales, siendo *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*, los principales asociados (Abebe et al., 2016). Mediante varios mecanismos, estas bacterias traspasan el canal del pezón, afectando inicialmente a los tejidos que rodean los ductos y cisternas que recogen la leche, causando daño en pequeñas áreas del tejido, eventualmente dichas bacterias afectan al tejido glandular y a los alvéolos causando así daños mayores. Las toxinas producidas por estos patógenos inducen el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de la infección; sin embargo, como parte de la respuesta inflamatoria se dañan las células, lo cual puede causar que el tejido productor de leche se revierta a un estado inactivo llamado involución, donde los alvéolos se reducen en tamaño y disminuyen la producción de la leche. Si las bacterias y sus toxinas se mantienen en contacto con los alvéolos por un periodo prolongado de tiempo, las células productoras de leche son destruidas y reemplazadas por cicatrices como resultado del proceso inflamatorio y consecuentemente el cuarto se convierte en no funcional (Zhao y Lacasse, 2008).

1.3. Respuesta inmune de la glándula mamaria (GM)

La glándula mamaria de los mamíferos consiste en un sistema de alvéolos y túbulos que conducen hacia una cisterna que, a su vez, posee una salida al exterior a través de un pezón. Cada uno de estos alvéolos está revestido de un epitelio que durante el periodo de lactancia produce leche que se acumula en los túbulos y cisternas de la glándula mamaria. Para una bacteria que se encuentra en el exterior, se trata de un sitio completamente lleno de nutrientes, que provee una superficie dónde adherirse y le provee todas las condiciones para reproducirse con significativa rapidez (Hughes y Watson, 2018). Sin embargo, la función del epitelio no se limita a la producción de leche, también funge como parte de la primera línea de defensa de la GM ya que se encarga del reconocimiento de patógenos potenciales a través de sus receptores

de membrana, los cuales al reconocer una señal de alerta desencadenan respuestas celulares, que inducen la producción de mediadores de la inflamación, reclutamiento y activación de leucocitos (que involucran quimiocinas), adhesión firme al endotelio y migración transendotelial de leucocitos (que involucran sistemas de receptores de adhesión), así como la llegada de células especializadas, como fagocitos profesionales (Rainard y Riollot, 2006; Oviedo-Boyso et al., 2007; Tuscherr et al., 2010; Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Además,

La respuesta inmune innata (RII) se inicia cuando receptores de reconocimiento de patrones (PRR) específicos, presentes en la superficie o dentro de las células del hospedero, se unen a moléculas particulares de las bacterias, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés PAMPs) (Pereyra et al., 2014). Estos PAMPs constituyen un conjunto de moléculas conservadas y compartidas por diversos grupos de microorganismos y están presentes en su superficie o se liberan cuando los microorganismos se replican o degradan. Los PRR se expresan en los leucocitos presentes en la leche y en las células epiteliales de la GM (Meglia y Mata, 2001; Thompson et al., 2014). Iniciar la afluencia de fagocitos profesionales es una parte importante del sistema inmune innato, cuyo objetivo es eliminar a las bacterias del sitio de la infección (Tuscherr et al., 2010).

El sistema inmune innato de la GM está conformado por barreras físicas como el esfínter y la queratina del canal del pezón, factores solubles como la lactoferrina (Lf), lisozima, proteínas del complemento, citocinas y quimiocinas. Además, existen elementos celulares que incluyen macrófagos, células dendríticas (CD), mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (NK) (Aitken et al., 2011; Thompson-Crispi et al., 2014; Sordillo, 2018). La inmunidad específica o adaptativa se orquesta en poblaciones celulares que reconocen antígenos particulares de los patógenos y está mediada por linfocitos B, a través de la síntesis de anticuerpos, y por linfocitos T, en forma directa o mediada por la síntesis de factores solubles. Esta respuesta tiene la particularidad de ser más efectiva luego de cada exposición al patógeno y su activación secundaria mediada por linfocitos T y B permitiría su eliminación (Pereyra et al., 2014).

En el caso de las infecciones intramamarias ocasionadas por *S. aureus* estudios *in vivo* e

in vitro han demostrado que la respuesta de las CEMB se ve limitada, a pesar de que existe una activación del receptor TLR2, el cual al reconocer a *S. aureus* a través del ácido lipoteicoico presente en su membrana desencadena la activación de rutas de señalización asociadas con la expresión de componentes de la RII, como péptidos antimicrobianos (LAP, TAP, BNBD4, BNBD5, BNBD10 y DEFB1), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas (IL-8), entre otros; la respuesta es menor y más lenta que cuando las CEMB son estimuladas con *E. coli* (Rainard y Riollot, 2006; Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2012; Téllez-Pérez et al., 2012; Alva-Murillo et al., 2013; Fu et al., 2013; Alva-Murillo et al., 2017). De igual manera, *S. aureus* bloquea la activación del factor transcripcional NF- κ B, el cual sirve como un mediador determinante de la respuesta inflamatoria, lo cual favorece el establecimiento de enfermedades como la mastitis subclínica (Günther et al., 2011; Lara-Zárate et al., 2011; Breyne et al., 2014).

Respecto a la respuesta inmune adaptativa, estudios *in vivo* en modelos de mastitis en murinos y en vacas han demostrado un aumento en el número de linfocitos T helper y T killer, así como un mayor número de linfocitos B en glándulas mamarias inoculadas con *S. aureus* 96 h post infección, así mismo se ha observado un incremento en los porcentajes de células CD4+ y CD8+ a los 5 y 7 días post infección, lo cual sugiere el desarrollo de una respuesta humoral, sin embargo existen cepas de *S. aureus* que pueden invadir y sobrevivir intracelularmente, por lo que la estimulación de células B y el desarrollo de una respuesta humoral en glándulas mamarias infectadas con cepas de *S. aureus* patogénico no es suficiente para eliminar las infecciones ocasionadas por bacterias intracelulares (Grönlund et al., 2006; Zhao et al., 2015; Pereyra et al., 2017).

I.4. Receptores de tipo integrinas y su participación en la internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales (CFNP)

Las integrinas son receptores heterodiméricos transmembranales con una estructura generalmente conservada, que median la adhesión a otras células y a los componentes de la matriz extracelular, poseen un peso molecular que puede variar de 90 a 160 kDa. Se forman por la asociación no covalente de una subunidad α y otra β , de las cuales hasta el momento se han identificado 18 subunidades α distintas (~1000 aa) y 8 subunidades β diferentes (~750 aa) que

pueden ensamblarse en 24 receptores diferentes con diferentes propiedades de unión y distribución tisular. Estos receptores poseen un gran dominio globular extracelular que comprende la porción N-terminal mediante el cual interactúa con los componentes de la matriz extracelular, seguida de un dominio transmembranal y una pequeña cola que comprende el dominio citoplásmico C-terminal (Lee et al., 1995; Hynes, 2002; Calderwood et al., 2013) (Fig. 1).

Estos receptores participan en diferentes procesos fisiológicos como la migración, proliferación, diferenciación, adhesión celular, apoptosis, fagocitosis, polaridad y en la expresión de genes (Hynes, 2002; Martin et al., 2002). No poseen actividad intrínseca de tirosina cinasa y entre sus ligandos están la laminina, la fibronectina (Fn), el fibrinógeno, la vitronectina, la colágena y las moléculas de adhesión intracelular de células adyacentes (Kumar, 1998). Las integrinas completan un ciclo endo-exocítico en el cual se internalizan de la membrana plasmática hacia compartimentos endosomales y después regresan a la superficie celular (Bretscher, 1992). Las integrinas ciclan de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad y son activadas por la unión de ligandos con el dominio extracelular (también conocido como dominio de activación) o por la unión de talina a la cola de la subunidad β lo cual causa una extensión en la conformación de integrinas. Estas uniones promueven la acumulación de los receptores en la membrana celular y la formación de estructuras o focos de adhesión, donde se reclutan proteínas estructurales y de señalización al interactuar con el dominio citoplásmico de la subunidad β , lo que resulta en la transmisión de señales mecánicas y químicas en la célula (Hoffmann et al., 2011; Calderwood et al., 2013).

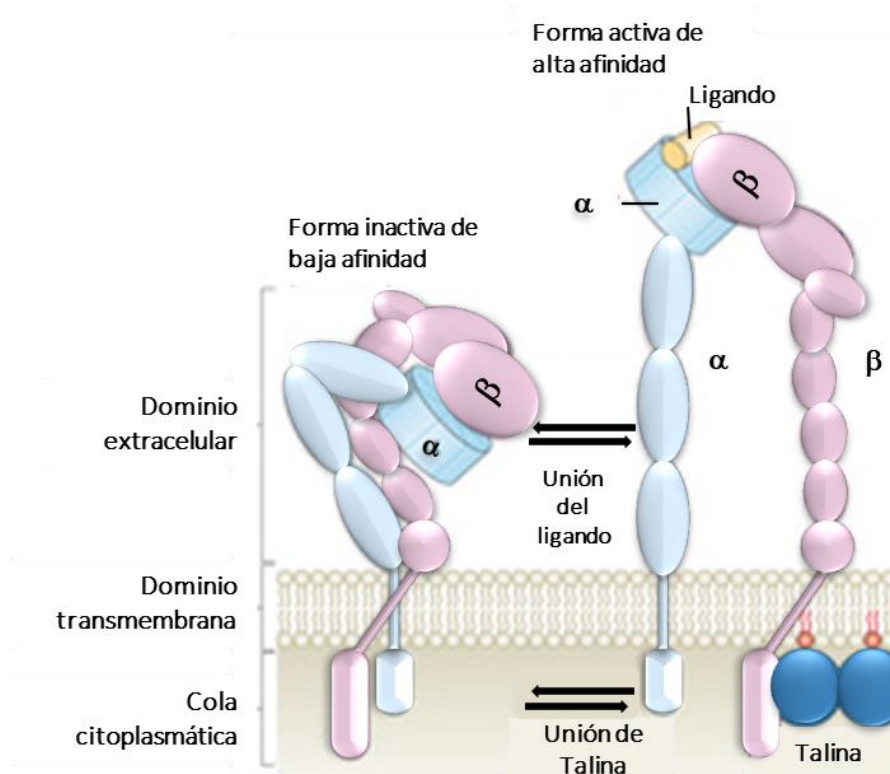


Figura 1. Estructura y activación de los receptores de tipo integrinas. Las integrinas son receptores formados por heterodímeros que comprenden una subunidad α y una subunidad β . Cada subunidad tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática, formados por unidades modulares. Las integrinas ciclan de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad y son activadas por la unión de ligandos con el dominio extracelular (también conocido como dominio de activación), o por la unión de talina a la cola de la subunidad β , lo cual causa una extensión en la conformación de integrinas (Imagen modificada de Calderwood et al., 2013).

Algunas de las proteínas cinasas que se concentran en los focos de adhesión son la cinasa de adhesión focal (FAK), la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa asociada a integrinas. Las integrinas participan en la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como la cinasa regulada por señales extracelulares (ERKs), la cinasa activada por p21 (PAK), la cinasa NH2 terminal c-Jun (JNK) y FAK/Src (Giancotti, 2000). Como respuesta a la activación de las integrinas, se inician rutas de señalización que se asocian con la modificación del citoesqueleto de actina, con la actividad de GTPasas, así como con la expresión de genes de la respuesta inmune temprana como las citocinas IL-1 β , IL-8 y TNF- α (Hynes, 2002; Pellinen e Ivaska, 2006).

La integrina $\alpha 5\beta 1$ es uno de los 24 heterodímeros conocidos de la familia de las integrinas y al igual que todas las subunidades están conformadas por grandes dominios extracelulares, la

subunidad $\alpha 5$ contiene 940 residuos de aminoácidos, mientras que la subunidad $\beta 1$ tiene 630 residuos de aminoácidos, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático corto (Feiya et al., 2003). Además, poseen un dominio de unión extracelular que reconoce secuencias RGD, en ligandos como la fibronectina, la cual es utilizada por *S. aureus* para adherirse e internalizarse en CFNP (Sinha y Herrmann, 2005).

El mecanismo de internalización de *S. aureus* mejor descrito es el denominado “zipper”, en el cual las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) presentes en la superficie bacteriana se unen a la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular, formando un complejo (Fn-FnBP) que es reconocido por los receptores integrinas $\alpha 5 \beta 1$, de esta forma *S. aureus* se adhiere a la célula hospedera y asimismo, induce el agrupamiento de integrinas en la superficie celular y la formación de focos de adhesión en la subunidad β de las integrinas, donde se reclutan proteínas estructurales, que participan en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y en la endocitosis de la bacteria, como la Tensina y Zyxina, y enzimas de señalización como las tirosina cinasas de la familia Src y las cinasas FAK, mismas que favorecen la fosforilación de proteínas efectoras, como la Cortactina, una proteína de unión a actina, que se asocia con el complejo Arp2/3 para promover la polimerización de actina y se une a dinamina-2, un regulador de la endocitosis (Fig. 2) (Sinha y Herrmann, 2005; Alva-Murillo et al., 2014).

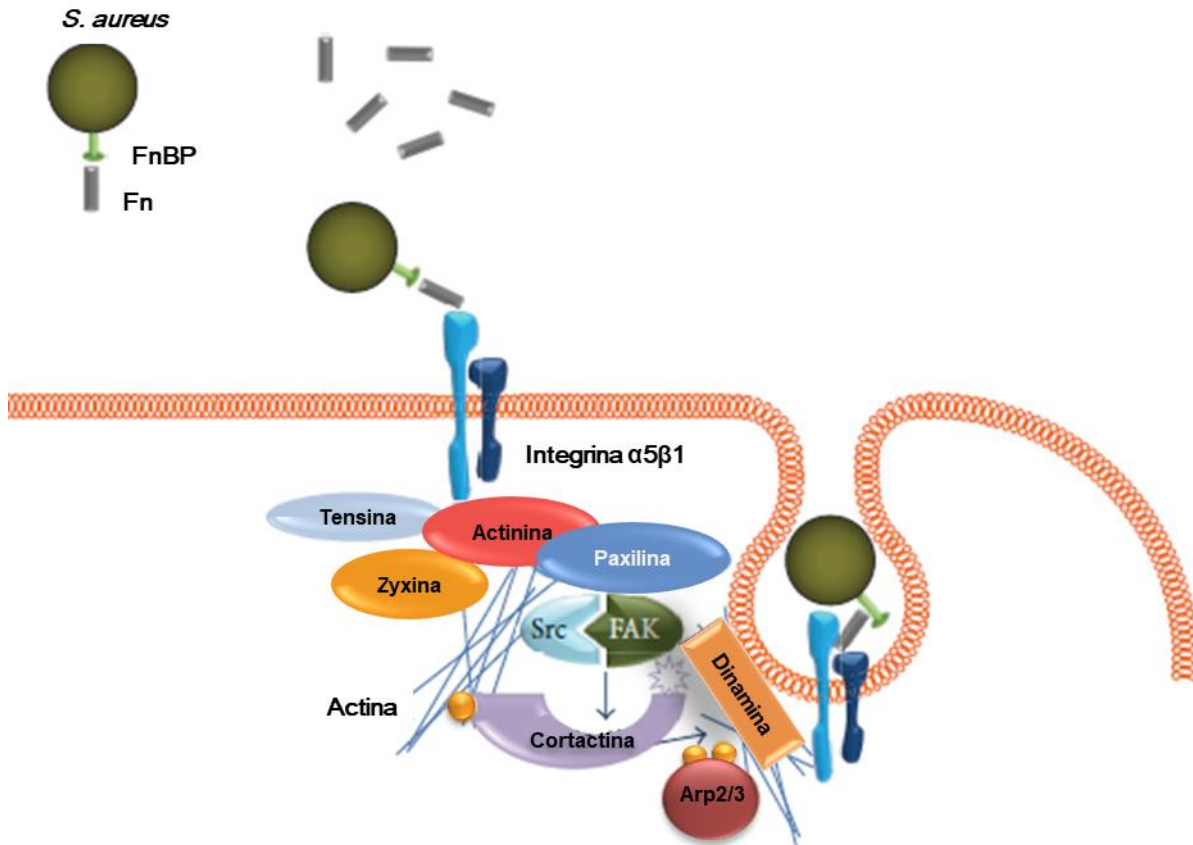


Figura 2. Mecanismo de internalización tipo "zipper" de *Staphylococcus aureus* en CFNP. Las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) presentes en la superficie bacteriana se unen a la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular, formando un complejo (Fn-FnBP) que es reconocido por los receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$, de esta forma *S. aureus* se adhiere a la célula hospedera e induce la formación de focos de adhesión en la subunidad β de las integrinas, donde se reclutan proteínas estructurales, que participan en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la endocitosis de la bacteria, como la cinasa FAK, mismas que favorecen la fosforilación de proteínas efectoras para promover la polimerización de actina y la regulación de la endocitosis (Alva-Murillo et al., 2014).

1.5. La cinasa FAK y su participación en la internalización de *S. aureus* en CFNP

La cinasa de adhesión focal (FAK) y su parálogo PYK2, son los únicos miembros de la familia de FAK de proteínas tirosina cinasas no receptoras. FAK se expresa en la mayoría de los tejidos y tipos celulares; Y es evolutivamente conservado tanto en especies de mamíferos como en organismos eucariotas inferiores incluyendo *Drosophila* y pez cebra (Parsons, 2003). Es una proteína de aproximadamente 125 KDa (forma canónica) que funciona como un "andamio activable" en la transducción de señales dependiente de integrinas (Brunton et al., 2004; Zhao y Guan, 2010). Desempeña un papel importante en la regulación de la migración celular,

adhesión, reorganización del citoesqueleto de actina, proliferación celular y apoptosis (Dunty et al., 2004). Esta cinasa promueve la activación localizada y transitoria de los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), así como las proteínas activadoras de GTPasa (GAP), modulando de este modo la actividad de las GTPasas de la familia Rho (Brunton et al., 2004; Re et al., 2008; Uniprot, 2019).

Contiene un dominio de cinasa central flanqueado por extensiones N y C-terminal largas. Posee un dominio FERM autoinhibitorio, localizado dentro de la región N-terminal, que se asocia con la membrana plasmática a través de su interacción con varios receptores de factores de crecimiento diferentes. La región C-terminal comprende el dominio de focalización de adhesión focal (FAT), el cual se une directamente a la paxilina y la talina, que a su vez se unen a la cola citoplásmica de las integrinas $\beta 1$ en los sitios de agrupamiento de integrinas (Deramaudt et al., 2014; Alanko e Ivaska, 2016; Kleinschmidt y Schlaepfer, 2017) (Fig. 3). Una vez focalizado (unido a las integrinas), FAK se autofosforila en un solo residuo de tirosina (Y397), este sitio de autofosforilación sirve como un sitio de unión de alta afinidad para el dominio SH2 de la familia de proteínas tirosina cinasas Src. Una vez unido a FAK, Src se activa para luego fosforilar a FAK en los residuos Y576 e Y577 dentro de su dominio catalítico (lo cual incrementa la actividad cinasa de FAK hacia sustratos exógenos), y en Y861 y Y925 cerca de su C-terminal. La fosforilación del sitio Y861 promueve la unión de p130Cas a FAK, mientras que el sitio de fosforilación Y925 promueve la unión de Grb2, y otras proteínas adaptadoras y cinasas que contienen dominios SH2 (Fig. 4) (Schlaepfer et al., 2004; Samarel, 2014). La cinasa FAK juega un papel muy importante en la internalización de *S. aureus* (Agerer et al., 2005; Alva-Murillo et al., 2014), ya que regula diversas rutas de señalización de integrinas (Brunton et al., 2004; Zhao y Guan, 2010). Su relevancia durante el proceso de internalización bacteriana se demostró en un estudio donde fibroblastos deficientes de esta cinasa presentaron una disminución considerable de la internalización de *S. aureus*, con relación a fibroblastos silvestres (Agerer et al., 2005).

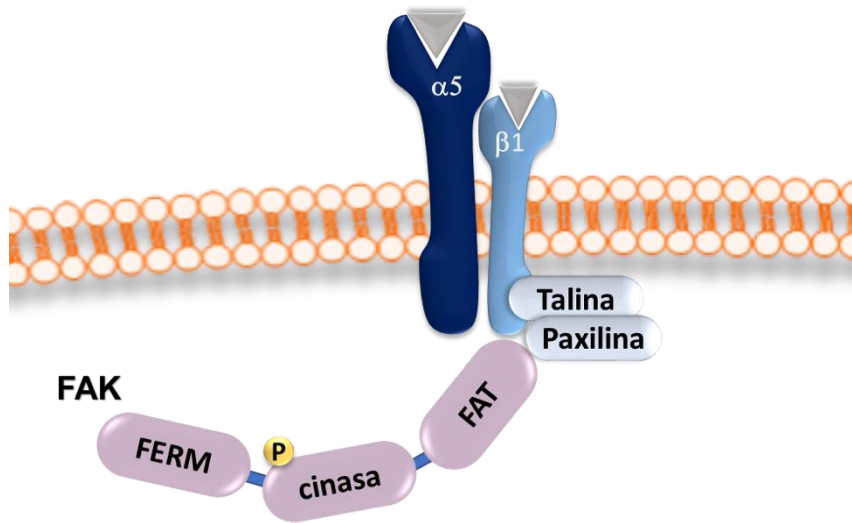


Figura 3. Dominios de la cinasa de adhesión focal FAK. FAK es una cinasa no receptora que contiene un dominio central cinasa, flanqueado por extensiones N y C-terminal largas. Posee un dominio FERM autoinhibitorio, localizado dentro de la región N-terminal, la región C-terminal comprende el dominio de focalización de adhesión focal (FAT), el cual se une directamente a la paxilina y talina, que a su vez se unen a la cola citoplásmica de las integrinas $\beta 1$ en los sitios de agrupamiento de integrinas (imagen modificada de Alanko e Ivaska, 2016).

I.6. FAK/PYK2 e isoformas

PYK2 es una tirosina cinasa rica en prolina que pertenece a la familia de FAK, siendo esta un parálogo cercano de FAK, la cual se ha demostrado que a menudo puede compensar funcionalmente la pérdida de FAK. Comparten un 46% de identidad en su secuencia (65% de similitud), además tienen los mismos tres dominios de organización: FAT, FERM y cinasa (Naser et al., 2018). Sin embargo, mientras que FAK se expresa en altos niveles virtualmente en todas las células, la expresión de PYK2 puede variar con base en estímulos tanto internos como externos de la célula; no obstante, los sitios de fosforilación en los residuos de tirosina de FAK (Tyr 397, 576, 577, 861 y 925) se conservan en posiciones análogas en PYK2 (Tyr 402, 579, 580, 849 y 881). Además, se ha demostrado que ambas proteínas pueden participar en vías de señalización intracelulares dependientes de integrinas (Fig. 4) (Sieg et al., 1998; Nakamura et al., 2001; Samarel, 2014).

Tanto el gen de FAK (PTK2) como el de PYK2 (PTK2B) pueden producir distintas proteínas que no poseen los dominios FERM y cinasa, estos fragmentos no catalíticos se forman a partir de sitios de transcripción alternativos y son llamados FRNK (no cinasa relacionada con FAK) y

PRNK (no cinasa relacionada con PYK2). Se sugiere que la producción de dichas isoformas conduce a una competición directa entre FRNK o PRNK, y FAK o PYK2 en sitios que captan sus dominios FAT, funcionando como inhibidores endógenos (Naser et al., 2018). Mediante análisis de Western blot se ha demostrado que la fosforilación de FAK, un paso clave en su activación, disminuye cuando los niveles de FRNK se incrementan. Sin embargo, al desplazar FAK o PYK2 se forman complejos de señalización incompletos (formados por FRNK o PRNK) que promueven el desensamblado de adhesiones focales (Fig. 4) (Xiong et al., 1998; Zak et al., 2017).

Hasta el momento se han descrito 7 isoformas de FAK producidas por el uso de promotores alternativos y/o splicing alternativo, asimismo se han mapeado computacionalmente 32 potenciales isoformas (Tabla 1).

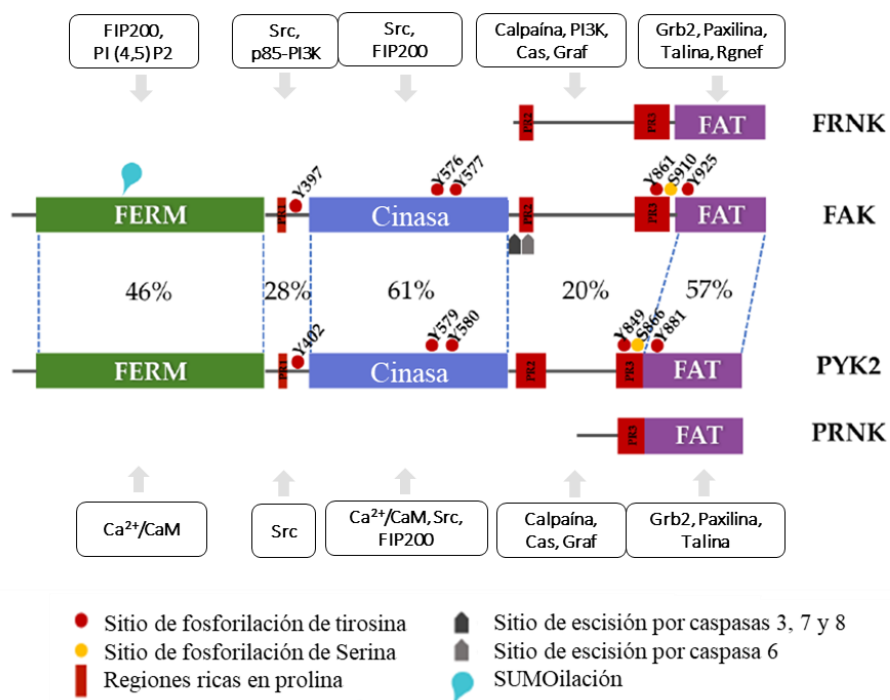


Figura 4. Esquema de los dominios de FAK y PYK2. Los tres dominios de FAK se muestran en verde (FERM), azul (CINASA) y morado (FAT), los porcentajes indican la identidad de secuencia entre FAK y PYK2 y en círculos rojos se indican los sitios de fosforilación conservados entre cada proteína. Los productos de transcritos alternativos FRNK y PRNK, se representan de manera esquemática y las proteínas que interactúan con FAK o PYK2 se muestran arriba o abajo, respectivamente. Modificada de Naser et al., 2018.

Tabla 1. Isoformas de la cinasa de adhesión focal FAK

ISOFORMA	PESO MOLECULAR (Da)	LONGITUD (aa)
1 (Canónica)	119,233	1052
2	99,358	879
3	63,201	554
4	48,967	431
5	120,900	1065
6 (FRNK)	39,874	360
7	114,253	1006

Los datos contenidos en la tabla se obtuvieron de la base de datos de proteínas universales Uniprot, 2019.

I.7. GTPasas y su participación en la internalización bacteriana

Las pequeñas Rho GTPasas son conocidas como reguladores del citoesqueleto de actina que actúan uniendo y activando a los nucleadores de actina y están involucradas en la migración, adhesión y polaridad celular, así como en el tráfico de membranas (Croisé et al., 2014). Las Rho GTPasas se encuentran en todos los organismos eucariotas y en mamíferos hay 22 Rho GTPasas reportadas, muchas de las cuales afectan la morfología celular (Ridley, 2006). La mayoría de estas moléculas actúan como “switch” moleculares, ciclando entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). La regulación de este mecanismo se da por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), encargados de promover el intercambio de GDP por GTP y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) que inactivan las GTPasas potenciando la actividad de hidrólisis de GTP (Schmidt y Hall, 2002) (Fig. 5).

Rac es una GTPasa que pertenece a la superfamilia de RAS de pequeñas proteínas de unión a GTP, los miembros de esta superfamilia regulan diversos eventos celulares como el control del crecimiento celular, la reorganización del citoesqueleto de actina y la activación de proteínas cinasas, estos procesos dependen tanto de los factores de crecimiento solubles como de la adhesión de la célula con la matriz extracelular (MEC) (Pozo, 2002). Cuando la fibronectina se adhiere a las células se forman complejos focales en la periferia celular, lo cual conduce a la fosforilación de FAK y Src, este proceso se lleva a cabo de manera independiente de las GTPasas de la familia Rho. Sin embargo, la posterior fosforilación de FAK y paxilina se produce de una

manera dependiente de Rho (Clark, 1998). La interacción de las integrinas con la matriz extracelular no es suficiente para inducir el agrupamiento de integrinas, así como la formación de complejos focales, asimismo la activación de Rho o Rac₁ por factores de crecimiento extracelulares no conduce a la formación de complejos focales en ausencia de matriz, lo cual indica que son requeridos ambos para que el proceso pueda llevarse a cabo (Hotchin, 1995).

Se ha observado que particularmente Rac₁, Cdc42 y RhoA son las principales GTPasas que participan en los rearrreglos del citoesqueleto de actina (Ridley, 2001). En este sentido se ha estudiado la participación de Rac₁ en la internalización de *Campylobacter jejuni*, donde se observó que una falla en la cascada de señalización fibronectina → integrina β1 → FAK → DOCK180/Tiam1 impide la activación de Rac1, lo cual se asocia con una inhibición importante del proceso de internalización, pues Rac1 necesita estar activo, es decir unido a GTP para inducir los rearrreglos del citoesqueleto de actina que van a permitir la entrada de la bacteria a la célula hospedera (Bohem et al., 2011).

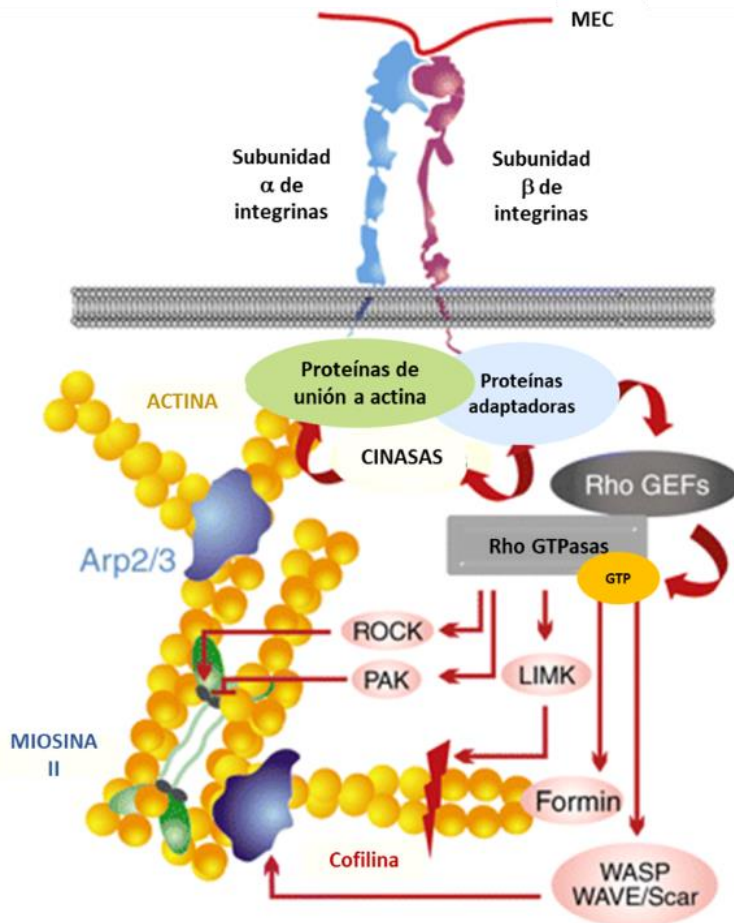


Figura 5. Esquema de la señalización de las GTPasas en la migración por adhesión. La activación de integrinas induce la nucleación de diferentes elementos de señalización, siendo los principales las cinasas, las proteínas adaptadoras no catalíticas y las proteínas de unión a actina, las cuales pueden influir en el reclutamiento y/o activación de otros componentes de adhesión (representados por flechas rojas). La mayoría de la señalización migratoria converge en las Rho GTPasas, que regulan la polimerización y estabilidad de la actina (a través de nucleadores como el complejo Arp2/3 y las forminas, o proteínas que cortan el filamento de la actina, como la Cofilina), la contractilidad de la actomiosina (mediante la fosforilación del MLC) y los microtúbulos. Modificada de Manzanares et al., 2009.

1.8. Propiedades fisiológicas de los ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son moléculas orgánicas formadas por una cadena hidrocarbonada unida a un grupo carboxilo terminal (-COOH). La cadena hidrocarbonada puede estar saturada (sin dobles enlaces) o insaturada (uno o más dobles enlaces), ser lineal o ramificada, o puede tener estructuras cíclicas o grupos hidroxilos. De acuerdo con la longitud de la cadena hidrocarbonada estos compuestos se pueden clasificar en ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que constan de 2-6 carbonos, (ii) ácidos grasos de cadena media (AGCM), que van de 8-14 carbonos, y (iii) ácidos grasos de cadena larga (mayores a 16 átomos de carbono) (Neville

y Picciano, 1997; Bauman y Griinari, 2003).

En la glándula mamaria bovina los AGCC y AGCM se producen por síntesis de *novo*, siendo sus precursores el acetato y el β -hidroxibutirato (Bauman y Griinari, 2003; Mansson, 2008). Ambos se generan en el rumen por la fermentación bacteriana de la fibra dietética. Además de estar presentes en la leche bovina, los humanos obtienen los AGCC y AGCM a partir de otras fuentes. Los AGCC son los principales productos obtenidos del metabolismo bacteriano de la fibra dietética en el colon, por lo que la mayoría de sus efectos se han descrito en el tracto intestinal (Hamer et al., 2008; Canani et al., 2011); mientras que los AGCM se obtienen a partir de alimentos como el yogurt, aceite de coco, mantequilla y queso (Nagao y Yanagita, 2010). Los AGCM, unidos a los triacilglicéridos de los alimentos, son hidrolizados y viajan a través de la vena portal para ser absorbidos por el hígado, sirviendo como fuente de energía (Schönfeld y Wojtczak, 2016).

Los AGCC y AGCM son compuestos que modulan la respuesta inmune de distintos organismos. En un ambiente inflamatorio a nivel intestinal estos AG actúan como antiinflamatorios (Hoshimoto et al., 2002; Meijer et al., 2010; Vinolo et al., 2011). Además, regulan la expresión de genes de péptidos antimicrobianos (Jiang et al., 2013). Se han identificado dos mecanismos principales de señalización de AGCC: 1) la inhibición de las histonas desacetilasas (HDAC), lo cual le permite alterar las marcas epigenéticas de la célula hospedera resultando en un redireccionamiento de la respuesta inmune, así como una reprogramación en la expresión de citocinas y quimiocinas, y 2) activan a receptores acoplados a proteínas G (GPR), particularmente GPR43, GPR41 y GPR109A, los cuales participan en la regulación del metabolismo, la inflamación y la respuesta ante enfermedades infecciosas (Vadivel et al., 2013; Tan et al., 2014; Young et al., 2015). Estos hallazgos destacan el papel de los AGCC como actores principales en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y del sistema inmune. Debido a estas características se les ha utilizado en distintos estudios para evaluar su efecto profiláctico o terapéutico en enfermedades infecciosas del tracto intestinal tanto en animales de granja (conejos, pollos, puercos) como en humanos (Van Immerseel et al., 2006; Skrivanova et al., 2008; Raqib et al., 2012).

Los AGCC son la fuente principal de energía para los rumiantes, ya que pueden llegar a cubrir cerca del 70% de sus requerimientos energéticos, mientras que en los humanos se estima que cubren entre un 5-15% (Bergman, 1990). Adicionalmente, se ha descrito que tanto los AGCC como los AGCM pueden ejercer una actividad antimicrobiana *in vitro* contra patógenos del tracto intestinal (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*) (Skrivanova et al., 2005; Van Immerseel et al., 2006; Van Deun et al., 2008a). En particular, el octanoato y su monoacilglicérido (monocaprilina) actúan también como antimicrobianos contra patógenos de la mastitis bovina, como *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *E. coli* (Nair et al., 2005).

II. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que los AG (propionato, butirato, hexanoato y octanoato) disminuyen la internalización de *S. aureus* en las CEMB, cuando estas células son previamente tratadas con estas moléculas (Tabla 2). En este sentido, el butirato de sodio (0.5 mM) disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB en un ~50%, además regula positivamente elementos de la inmunidad innata durante la infección, como la expresión de los genes del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), y la producción de óxido nítrico. Lo anterior se ha relacionado con el aumento de la acetilación de la histona H3 debido al butirato y al estímulo bacteriano (Ochoa-Zarzosa et al., 2009). Asimismo, el octanoato de sodio (1 mM) disminuye la internalización de *S. aureus* en un ~50% en las CEMB y favorece la expresión de los péptidos antimicrobianos LAP, BNBD4 y BNBD10 durante la infección. Sin embargo, a una concentración de 0.25 mM de octanoato la internalización bacteriana aumenta (~160%), condición en la que prácticamente no se observa respuesta antimicrobiana por parte de las CEMB (Alva-Murillo et al., 2013). En el mismo sentido, las CEMB tratadas con propionato y hexanoato de sodio muestran una reducción en la internalización bacteriana entre 27-55% y 39-65%, respectivamente; además, ambos AGCC regulan positivamente la expresión del ARNm de TAP, el cual podría estar relacionado con la reducción de la internalización bacteriana (Alva-Murillo et al., 2011).

En un estudio posterior, se demostró que los receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$ no están directamente involucrados en la disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB mediada por butirato y octanoato de sodio (Alva-Murillo et al., 2016; Alva-Murillo et al., 2017). Interesantemente, el NaB favoreció el incremento de la abundancia membranal de las integrinas $\alpha 5\beta 1$, lo cual sugiere que podría estar activándose la ruta de señalización regulada por estos receptores. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron las rutas de transducción activadas por las integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK en la internalización de *S. aureus* en las CEMB modulada por los diferentes AG.

Tabla 2. Efectos de los AGCC y AGCM sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

AG	Concentración (mM)	Inhibición (%)	Expresión de genes de RII	Referencia
Propionato	1	57	↑ TAP	Alva-Murillo et al., 2012
Butirato	0.5	50	↑ TAP e iNOS	Ochoa-Zarzosa et al., 2009
Hexanoato	0.25	52	↑ TAP	Alva-Murillo et al., 2012
Octanoato	1	50	↑ LAP, BNBD4 y BNBD10	Alva-Murillo et al., 2013

III. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades que ocasiona mayores pérdidas en la ganadería lechera, siendo *S. aureus* el principal microorganismo aislado de casos de mastitis subclínica. Esta bacteria posee la capacidad de internalizarse en células fagocíticas no profesionales como las CEMB a través de mecanismo tipo “zipper”, donde la bacteria utiliza sus FnBP las cuales secuestran a la Fn de la MEC formando un complejo que es reconocido por las integrinas $\alpha 5\beta 1$, lo cual activa una cascada de señalización que conduce a la fosforilación de FAK y la activación de Rac₁, que culminara con la internalización de *S. aureus*.

Con esta estrategia, el patógeno evade la respuesta inmune de las CEMB, favoreciendo el desarrollo de enfermedades crónicas y recurrentes potencialmente mortales en tanto en humanos como animales, como son la osteomielitis, endocarditis, neumonía, bacteremia, entre otras; Y a su vez dificulta su control con antibióticos, ya que estos no llegan hasta el citoplasma de la célula, lo cual convierte a la mastitis en una enfermedad difícil de tratar. Una alternativa que nuestro grupo de trabajo ha explorado, es el uso de moléculas inmunomoduladoras que mejoren la respuesta de la célula hospedera. En este sentido, cuando las CEMB son pretratadas con diferentes AG (propionato, butirato, hexanoato y octanoato) se ha reportado que existe una disminución en la internalización bacteriana (~50%), lo cual se ha asociado con una activación de las CEMB a través de una mejora de la respuesta inmune innata.

Estudios *in vitro* han demostrado que al inhibir la actividad de la integrina $\beta 1$, se reduce un 40% la internalización de *Listeria monocytogenes* en células HeLa (Auriemma et al., 2010). También se ha reportado que al inhibir la actividad de FAK, se reduce en un 90% la internalización de *Neisseria meningitidis* en células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC) (Slanina et al., 2012), así como fibroblastos deficientes de esta cinasa presentaron una disminución del 80% de la internalización de *S. aureus*, con relación a fibroblastos silvestres (Agerer et al., 2005). Así mismo, una falla en la cascada de señalización fibronectina -> integrina $\beta 1$ -> FAK -> DOCK180/Tiam1 impide la activación de Rac1, lo cual se asocia con una inhibición importante del proceso de internalización (Bohem et al., 2011).

En este sentido, se ha reportado que el NaB inhibe la fosforilación de FAK en macrófagos

estimulados con LPS (Maa et al., 2010) sin embargo, se desconoce si estos AG interfieren en la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK para reducir la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se determinó el papel que juegan los AG sobre la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK involucradas en la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

IV. HIPÓTESIS

Los ácidos grasos (propionato, butirato, hexanoato y octanoato) inhiben la activación de la ruta de señalización integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK, lo cual conduce a una disminución en la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Determinar los efectos de los ácidos grasos (propionato, butirato, hexanoato y octanoato) en la ruta de señalización integrinas $\alpha5\beta1$ /FAK y su relación con la disminución de la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas.

V.2. Objetivos específicos

- Determinar la participación de los receptores integrinas $\alpha5\beta1$ en la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas tratadas con ácidos grasos.
- Analizar el estado de activación de la cinasa FAK en células epiteliales mamarias bovinas tratadas con ácidos grasos e infectadas con *S. aureus*.
- Determinar la participación de la Rho GTPasa Rac₁ en la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas tratadas con ácidos grasos.
- Establecer la relación entre la ruta de señalización integrinas $\alpha5\beta1$ /FAK y la disminución de la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas tratadas con ácidos grasos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Estrategia experimental

Para realizar el presente estudio se siguió la estrategia experimental que se encuentra representada en la figura 6. Se utilizó un cultivo primario de CEMB), mismas que se trataron con los diferentes AG durante 24 h, y se infectaron con *S. aureus* ATCC 27543 durante 2 h (MDI: 30:1), para posteriormente evaluar: 1) Expresión de los genes de las subunidades de las integrinas $\alpha 5\beta 1$, 2) abundancia en membrana del dímero de integrinas $\alpha 5\beta 1$, 3) adhesión de *S. aureus*, 4) participación de FAK en la internalización, 5) estado de fosforilación de FAK, 6) participación de Rac₁ en la internalización, y 7) expresión de Rac₁.

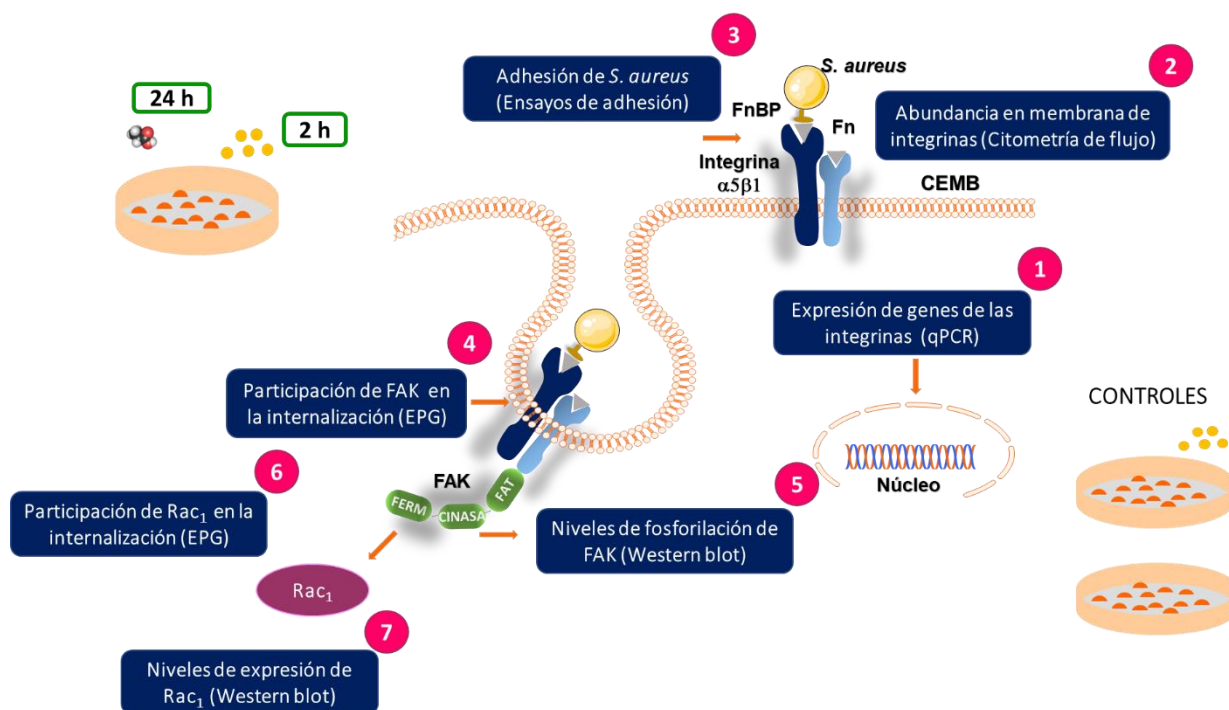


Figura 6. Estrategia experimental.

VI.2. Materiales

VI.2.1. Reactivos y cepas

- Sales de los ácidos grasos: propiónico (1 mM), butírico (0.5 mM), hexanoico (0.25 mM) y octanoico (1 mM) (Sigma). Estas concentraciones corresponden a las reportadas como inhibitorias de la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2011; Alva-Murillo et al., 2013).
- Anticuerpo monoclonal anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ de rata (MAB2514, Chemicon-Millipore). Anticuerpos monoclonales anti-FAK (SC-1688), anti-fosfo-FAK (SC-81493, Y397), anti-GAPDH (SC-47724), anti-Rac₁ (SC-514583) de Santa Cruz biotechnology. Anticuerpos secundarios anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de rábano picante (7076S, Thermo Scientific) y anti-rata (FITC).
- Inhibidores farmacológicos de FAK (PF573228) y de Rac₁ (NSC23766) de Sigma-Aldrich. Para determinar la concentración a utilizar se realizaron pruebas de citotoxicidad mediante ensayos de exclusión por azul tripano utilizando diferentes concentraciones del inhibidor y se eligió aquella que no fuera tóxica para las CEMB (datos no mostrados).
- Cepa de *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) aislada de un caso de mastitis bovina clínica, con capacidad de invadir epitelio y endotelio (Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Ochoa-Zarzosa et al., 2009). La bacteria fue crecida en caldo Luria Bertani (LB) (5 g de NaCl, 10 g de peptona de caseína y 5 g de extracto de levadura, por cada litro de agua, BIOXON), a 37 °C durante 18 h. Para los experimentos el cultivo se ajustó a una D.O. de 0.1 (560 nm), equivalente a 4×10^7 UFC/ml.

VI.2.2. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino

Se utilizaron células de epitelio mamario bovino (CEMB) obtenidas del tejido alveolar de la ubre de una vaca lactante, como se ha descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (Anaya-López et al., 2006). Se utilizaron CEMB del pasaje 3 al 8 y se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma) suplementado con 10% de suero de ternera (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomina

(400 U/ml, GIBCO), 10 µg/ml insulina (Sigma), 10 µg/ml hidrocortisona (Sigma), 250 ng/ml de anfotericina B (Invitrogen), ajustado a un pH de 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

VI.2.3. Oligonucleótidos utilizados para qPCR

La expresión de los genes de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ se cuantificó por medio de qPCR. Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos para qPCR utilizados en el estudio.

ESPECIFICIDAD	PRIMER	SECUENCIA 5' - 3'	FRAGMENTO (pb)	TM (°C)	REFERENCIA
Subunidad $\alpha 5$ de integrinas	DIRECTO	TGCAGTGTGAGGCC GTGTATGAAG	228	58	Medina-Estrada et al., 2015
	REVERSO	CGGGAGGGAGCGTT TGAAGAAT			
Subunidad $\beta 1$ de integrinas	DIRECTO	CAACTGCATTTCCGT GTCTGG	221	59	Medina-Estrada et al., 2015
	REVERSO	AGGGCATCTTCAGGG CTTCATAA			
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	DIRECTO	TCAACGGGAAGCTCA CTGG	237	56.9	Yonezawa et al., 2009
	REVERSO	CCCCAGCATCGAAGG TAGA			

VI.3. Metodología

VI.3.1. Análisis de la expresión relativa de los genes de la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 1$ del receptor de integrinas en las CEMB

Para realizar los experimentos de expresión de genes se evaluaron las siguientes condiciones: CEMB, CEMB + *S. aureus*, CEMB + AG, y CEMB + AG + *S. aureus*. Se extrajo el ARN total (5 µg) de las CEMB usando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del

proveedor y después se sintetizó el ADNc. La muestra obtenida se trató con ADNasa I (Invitrogen) para remover cualquier contaminación con ADN. Se realizó la síntesis de ADNc por la reacción de transcripción reversa (RT) en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 25 μ g/ml de oligo d(T) 15-18 (Invitrogen), 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min y se guardó 5 min en hielo. Posteriormente, se añadieron 4 μ l de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditiotritol (Invitrogen) y 2 U/ μ l de inhibidor de ARNasa (RNAsa Out, Invitrogen), y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/ μ l de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y se incubó a 37°C por 50 min. La reacción se inactivó a 70°C por 15 min. Para confirmar la integridad del ADNc sintetizado se realizó una PCR punto final, usando los oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método $\Delta\Delta$ Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct) en el sistema StepOne Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 0.9 pmol/ μ l de cada oligonucleótido, 250 ng de ADNc y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes que codifican para la subunidad α 5 y β 1 de las integrinas (Tabla 3) (Medina-Estrada et al., 2015). Como control interno (gen endógeno) se utilizó el gen de la GAPDH (Yonezawa et al., 2009).

VI.3.2. Determinación de la adhesión de *S. aureus* en las CEMB tratadas con AG

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron monocapas confluentes de CEMB ($\sim 80 \times 10^3$ células/pozo), y se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos 24 h antes de poner el tratamiento con AG (24 h). Posteriormente, se realizaron a la par ensayos de protección con gentamicina (EPG), (Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Alva-Murillo et al., 2015), y ensayos de adhesión infectando las CEMB con la cepa de *S. aureus*, empleando una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula, durante 2 h a 37°C.. Para el caso de los ensayos de protección se lavaron las CEMB 3 veces con PBS y se agregó gentamicina (40 μ g/ml) para eliminar a las bacterias no internalizadas,

se incubó durante 30 min a 37°C y pasado el tiempo con el antibiótico, se lavaron nuevamente las CEMB 3 veces con PBS. Para los ensayos de adhesión las CEMB sólo se lavaron 3 veces después de la infección y se despegaron del plato con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) (ambos ensayos), posteriormente, se recuperaron por centrifugación (600 x g/10 min), para después lissarlas mediante choque osmótico con 250 µl de agua destilada estéril y obtener así las bacterias que fueron internalizadas y/o adheridas. Se distribuyeron alícuotas de 200 µl del lisado celular en agar LB (caldo LB con 10 g/l de agar bacteriológico, BIOXON), y se incubaron a 37°C por 18 h. Finalmente, se realizó un conteo total de las UFC y al porcentaje de UFCs adheridas se le restó el porcentaje de UFCs internalizadas.

VI.3.3. Medición de la abundancia del receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana plasmática de las CEMB a través de citometría de flujo

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron monocapas confluentes de las CEMB ($\sim 80 \times 10^3$ células/pozo), y se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos 24 h antes de poner el tratamiento con ácidos grasos (24 h). Se llevó a cabo el ensayo de protección con gentamicina y pasado el tiempo requerido se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se despegaron con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco). Posteriormente, se recuperaron las células por centrifugación (600 x g/10 min) a 4°C, y se lavó la pastilla 2 veces con PBS frío por centrifugación (2 min/600 x g) a 4°C, sin resuspender. Las células se fijaron con paraformaldehído (4%) 10 min a 4°C, se lavó dos veces la pastilla y se incubó con suero de caballo al 5% en PBS (para bloquear las uniones inespecíficas), se resuspendió e incubó durante 30 min en hielo. Se recuperó la pastilla y se incubó con el anticuerpo anti-integrina MAB2514 (10 µg/ml) toda la noche a 4°C. Esto se realizó en agitación y evitando el contacto con la luz. A los controles, que solamente llevaban el anticuerpo secundario, no se les adicionó el anticuerpo primario, solo se añadió suero de caballo al 5% en PBS. Cumplido el tiempo, se recuperaron las células por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS frío. Se centrifugó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:50 en PBS). Luego, se resuspendieron las CEMB y se incubaron durante 2 h en agitación, en hielo y cubiertas de la luz. Se recuperó la pastilla por

centrifugación y se lavó 2 veces con PBS, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de PBS frío. Finalmente, se llevó a cabo la medición de la abundancia en membrana de la proteína en un citómetro de flujo Accuri BD C6, midiendo 10,000 eventos por condición. Los datos se analizaron con el software BD Accuri C6.

VI.3.4. Participación de FAK y Rac₁ en la internalización de *S. aureus* en las CEMB tratadas con los ácidos grasos

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron monocapas confluentes de las CEMB ($\sim 80 \times 10^3$ células/pozo), y se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos 24 h antes de poner el tratamiento con AG (24 h). Pasadas las 24 h, se incubaron las CEMB con 10 μ g/ml del inhibidor de la cinasa FAK (PF573228) o 10 mM del inhibidor de Rac₁ (NSC23766) durante 30 min y se realizó el ensayo de protección con gentamicina como se describe en el apartado VI.3.2 (Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Alva-Murillo et al., 2015). Para los ensayos de protección con gentamicina, no se consideraron las bacterias adheridas.

VI.3.5. Ensayos de Western blot

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 60 x 15 mm (Costar-Corning), donde se cultivaron monocapas confluentes de las CEMB ($\sim 1 \times 10^6$ células/pozo), y se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos 24 h antes de poner el tratamiento con AG (24 h). Se llevó a cabo el ensayo de protección con gentamicina y pasado el tiempo requerido, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se procedió a la extracción de proteínas totales usando el buffer RIPA (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Las concentraciones de proteína se determinaron por el método de Bradford, y se analizó 20-30 μ g de cada muestra en un gel SDS-PAGE 10% (Green y Sambrook, 2012). Las muestras se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF) y se bloquearon con leche descremada en PBS (0.5%) por 2 h en agitación, después se incubaron de manera independiente con los anticuerpos primarios anti-FAK, anti-fosfo-FAK o anti-Rac₁ (1:250), toda la noche a 4°C. Como control de carga se utilizó GAPDH, la cual se determinó con

el anticuerpo anti-GAPDH (1:300). Las uniones específicas del anticuerpo se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1/2500) y se potenció por quimioluminiscencia (Luminol, Li-Cor C41008-02). Finalmente, las marcas fueron reveladas en una placa de rayos X.

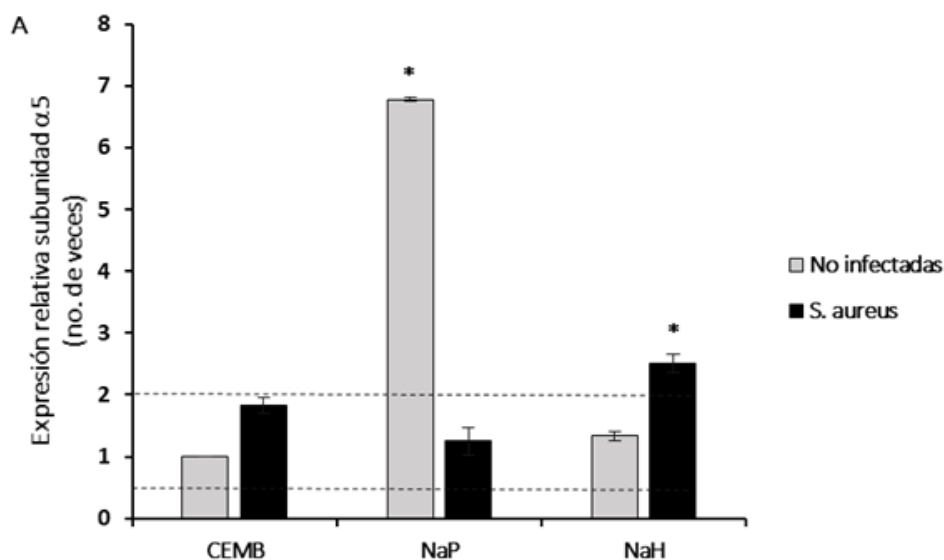
VI.3.6. Análisis de datos

Los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes por triplicado, y se compararon con análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de *t* de student. Los resultados se reportaron como el promedio \pm el error estándar (EE) con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Para el análisis de qPCR los niveles de expresión relativa de genes mayores a 2 o menores a 0.5 se consideraron estadísticamente significativos (Morey et al., 2006).

VII. RESULTADOS

VII.1. El NaP y NaH regulan diferencialmente la expresión del gen de la subunidad $\alpha 5$ de las integrinas, pero no modifican la expresión del gen de la subunidad $\beta 1$ en las CEMB

El mecanismo de internalización tipo “zipper” es el mejor descrito para *S. aureus* y las integrinas $\alpha 5\beta 1$ son moléculas clave en el inicio de este proceso. Diversos estudios de nuestro grupo de trabajo han demostrado que los AGCC y AGCM (NaP, NaB, NaH y NaO) reducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2011; Alva-Murillo et al., 2013). Asimismo, estudios previos han demostrado que el NaB (Alva-Murillo, 2016) y NaO (datos no publicados) no modifican la expresión de los genes de las subunidades de integrinas; sin embargo, se desconoce el efecto que ejercen el NaP y NaH. Por lo anterior, se evaluó el efecto de estos dos AG sobre la expresión de genes de las subunidades de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ en las CEMB. Los resultados mostraron que el NaP indujo significativamente la expresión de la subunidad $\alpha 5$ (~6 veces). Mientras que el NaH favoreció la expresión de la subunidad $\alpha 5$ (~2 veces) solo en presencia del estímulo bacteriano (Fig. 7A). Por otro lado, no se observó una modificación en la expresión de la subunidad $\beta 1$ por efecto de ninguno de los AG evaluados (Fig. 7B).



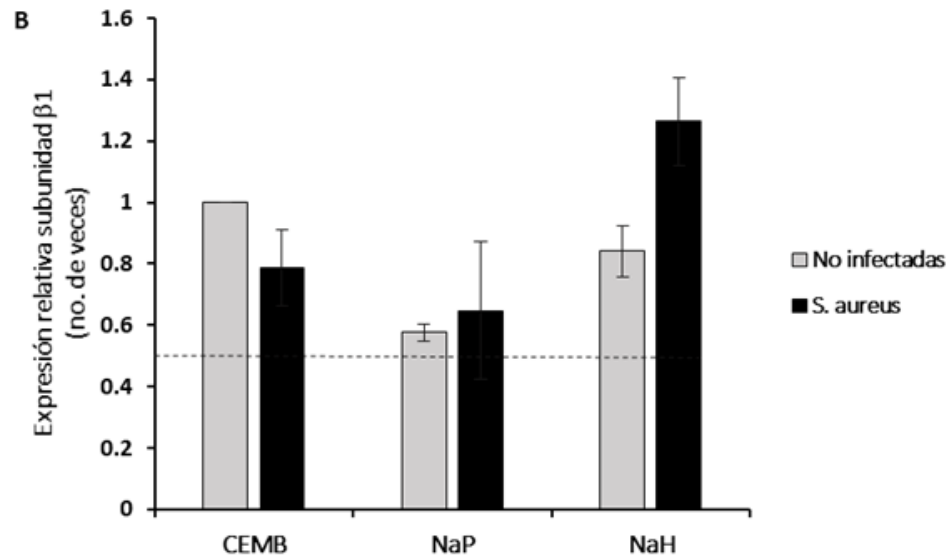


Figura 7. Análisis de la expresión de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ de la integrina en las CEMB por efecto de los AG y la infección con *S. aureus*. Las células se trataron con 1 mM NaP o 0.25 mM NaH por 24 h, posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1). El análisis de la expresión se realizó por RT-qPCR. Se muestra la expresión relativa del gen de la subunidad (A) $\alpha 5$ y (B) $\beta 1$ de la integrina, utilizando como control de referencia a GAPDH. Se consideraron estadísticamente significativos los niveles de expresión relativa de genes mayores a 2 o menores a 0.5 veces.

VII.2. El NaP y NaH disminuyen la abundancia del receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana plasmática de las CEMB

Las integrinas se encuentran tanto a nivel citoplasmático como membranal donde actúan como receptores para proteínas de la matriz extracelular, lo cual les permite mantener una comunicación constante entre el interior de la célula y la matriz extracelular y viceversa. Es a través de estos receptores que *S. aureus* logra internalizarse en las CEMB. Estudios previos del grupo de trabajo han demostrado que el NaB favorece (~2 veces) la AM de integrinas $\alpha 5\beta 1$ (Alva-Murillo, 2016), mientras que el NaO no la modifica (Alva-Murillo, 2013), y en ambos casos el estímulo bacteriano no modifica el efecto obtenido por el tratamiento con AG. Sin embargo, se desconoce el efecto que ejercen el NaP y NaH sobre la AM de integrinas $\alpha 5\beta 1$, por lo que se evaluó si los AG (NaP y NaH) afectan la abundancia en membrana (AM) del heterodímero de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en las CEMB. Los resultados mostraron que el estímulo bacteriano disminuye la AM (~40%), lo cual era esperado debido a que los receptores se internalizan en conjunto con la bacteria. Asimismo, se observa que ambos AG disminuyeron la AM de las integrinas en

las CEMB (~50%), la cual no se modificó significativamente cuando las células fueron infectadas con *S. aureus* (Fig. 8), esto resulta interesante debido a que al no observarse una mayor disminución en la AM cuando las CEMB tratadas con los AG fueron expuestas al estímulo bacteriano, es probable que los AG pudieran estar ejerciendo un efecto sobre elementos río abajo en la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$.

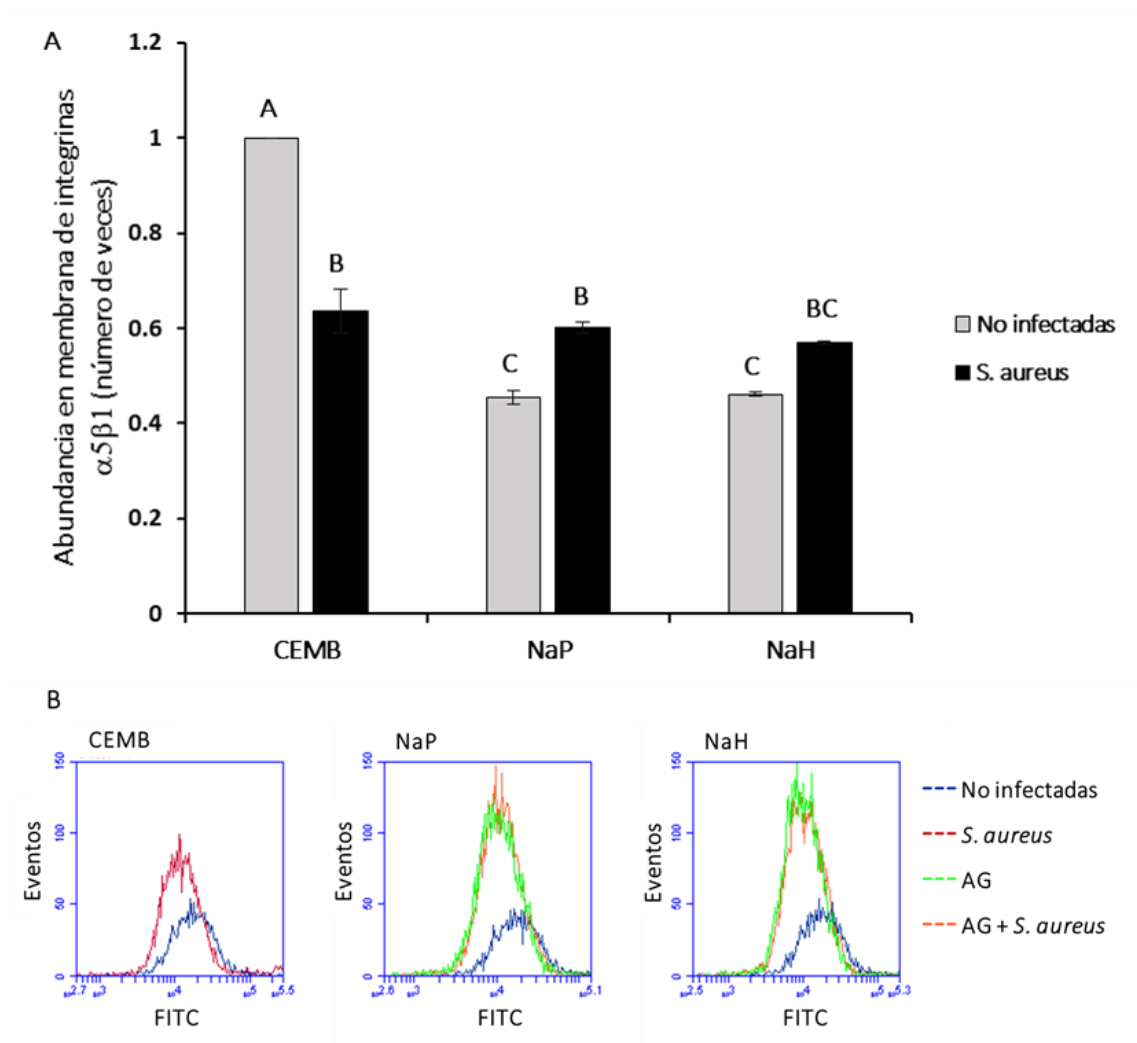


Figura 8. Efecto de los AG sobre la abundancia en membrana de los receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$ en las CEMB. **A)** Abundancia en membrana de los receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$, la cual fue medida por citometría de flujo. **B)** Histogramas representativos. Las células se trataron con 1 mM NaP o 0.25 mM NaH por 24 h, posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1). La intensidad de fluorescencia se estimó a partir de 10,000 eventos por condición. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes por triplicado \pm SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (t- student $P < 0.05$).

VII.3. El NaP y NaH disminuyen la adhesión de *S. aureus* en las CEMB, mientras que el NaB y NaO la aumentan

Por otro lado, se sabe que *S. aureus* se internaliza en las CEMB a través de sus proteínas de unión fibronectina (FnPB) formando un complejo FnPB-Fn que es reconocido por las integrinas $\alpha 5\beta 1$, lo cual le permite adherirse a la célula hospedera y posteriormente internalizarse. Por lo anterior, se evaluó si los AG intervienen en el proceso de adhesión de *S. aureus* en las CEMB. Los resultados mostraron que el NaB y NaO favorecen la adhesión de *S. aureus* en un 38 y 29%, respectivamente. Estos datos sugieren que el efecto inhibitorio de ambos AG en la internalización de *S. aureus* no está relacionado directamente con una disminución de la adhesión bacteriana. Sin embargo, para el caso del NaP y NaH si pudiera tener una relación ya que ambos AG disminuyeron la adhesión de *S. aureus* en ~50% (Fig. 9).

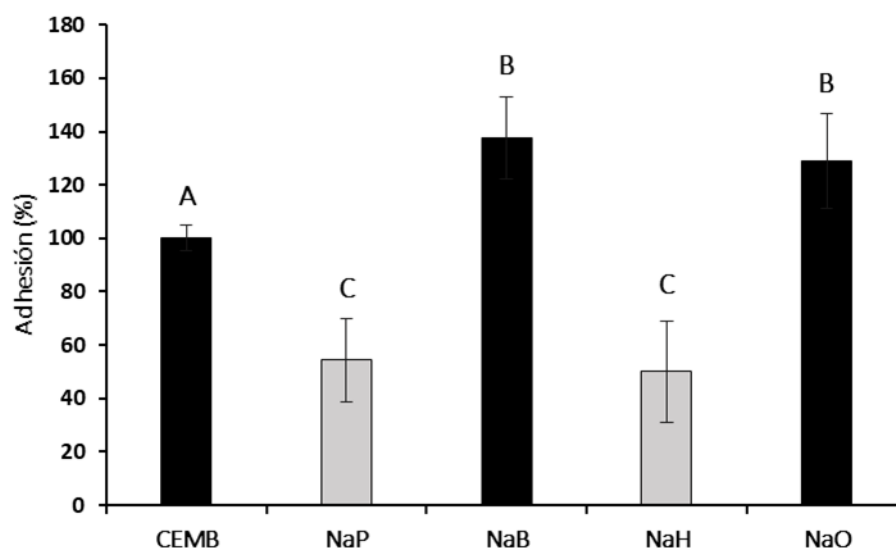


Figura 9. Efecto de los AG sobre la adhesión de *S. aureus* en las CEMB. Las células se trataron con 1 mM NaP, 0.5 mM NaB, 0.25 mM NaH y 1 mM NaO durante 24 h y se infectaron por 2 h (MDI 30:1). El número de bacterias adheridas se representa como el porcentaje de adhesión menos el porcentaje de internalización con base en las UFC recuperadas después de la lisis celular representando como 100% las células incubadas con medio incompleto (CEMB). Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes por triplicado \pm SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

VII.4. La cinasa FAK es importante durante la disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB modulada por AG

FAK es una cinasa que participa de manera importante en el mecanismo de internalización tipo “zipper” ya que al unirse a la subunidad β de las integrinas se autofosforila, y esto le permite activar a otras proteínas que median el rearrreglo del citoesqueleto de actina así como el proceso de endocitosis. Con el objetivo de evaluar la participación de FAK en la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB por efecto de los AG, se realizaron ensayos de protección con gentamicina usando un inhibidor farmacológico de esta cinasa (PF573228). Los resultados mostraron, como se esperaba, que la internalización de *S. aureus* disminuyó al inhibir la actividad de la cinasa (~60%). Interesantemente, este efecto se potenció (~72-77%) al tratar a las células con los diferentes AG en presencia del inhibidor, esto sugiere que la cinasa FAK es necesaria para la internalización y que los AG interfieren en su estado de activación (fosforilación) (Fig. 10).

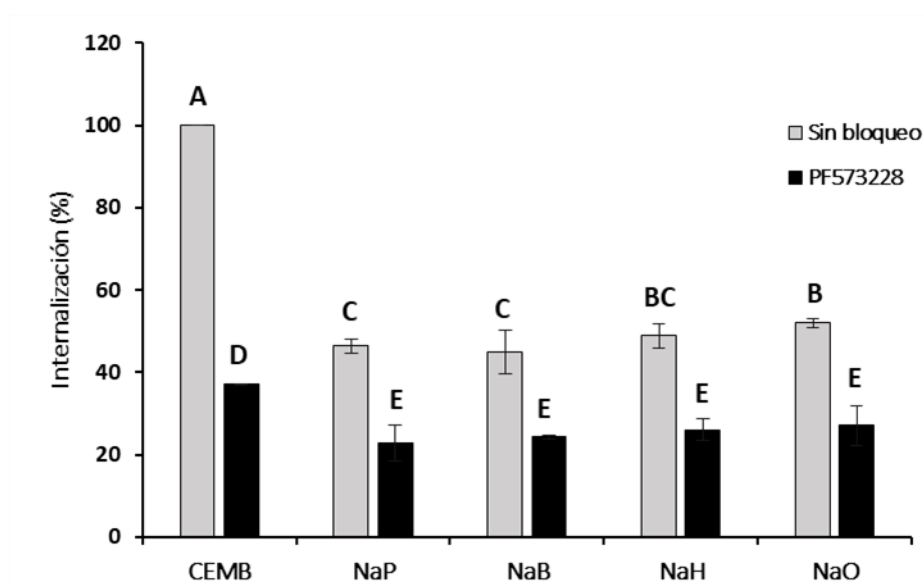


Figura 10. Participación de FAK en la reducción de la internalización de *S. aureus* regulada por AG. Las células se trataron con 1 mM NaP, 0.5 mM NaB, 0.25 mM NaH y 1 mM NaO durante 24 h, después se incubaron con un inhibidor farmacológico de FAK (10 μ g/ml, 30 min). Posteriormente, las células se infectaron por 2 h (MDI 30:1). El número de bacterias internalizadas se representa como el porcentaje de internalización con base en las UFC recuperadas después de la lisis celular, representando como 100% las células incubadas con el vehículo (DMSO 0.1%). PF573228: inhibidor de FAK. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes por triplicado \pm SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

VII.5. Los AGCC y AGCM modulan de manera diferencial la activación de la cinasa FAK

Se ha reportado que FAK es necesaria para la internalización bacteriana en CFNP y que los AG como el NaB intervienen en su estado de activación. Por ello se evaluó su estado de activación durante la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB regulada por AG. Se realizaron ensayos de Western blot detectando la fosforilación del residuo Y397, debido a que es el sitio canónico de activación de FAK cuando este se une a la subunidad β de las integrinas. Los resultados mostraron que hay una mayor fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas; sin embargo, cada AG tiene un efecto distinto sobre el estado de activación de FAK (Fig. 11).

Para el caso del NaP (Fig. 11A), no se observó una modificación significativa en el estado de activación de FAK por efecto del AG respecto a las CEMB. Sin embargo, se observó que el NaP inhibe la fosforilación inducida por el estímulo bacteriano. Por otro lado, el NaB (Fig. 11B) no modificó el estado de activación de FAK respecto al control (CEMB) y tampoco cuando las CEMB fueron infectadas. Interesantemente, el NaH disminuyó de manera considerable la activación de FAK inducida por el estímulo bacteriano (~40%) (Fig. 11C). Finalmente, el NaO (Fig. 11D) favoreció la fosforilación de FAK (~1.5 veces); sin embargo, este efecto se revirtió a los niveles basales cuando las CEMB fueron infectadas con *S. aureus*. Estos datos indican que los AG disminuyen la activación de FAK cuando las CEMB son expuestas al estímulo bacteriano, lo cual se relaciona directamente con la disminución en la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Sin embargo, por si solos cada AG modifica de manera diferencial la actividad de FAK.

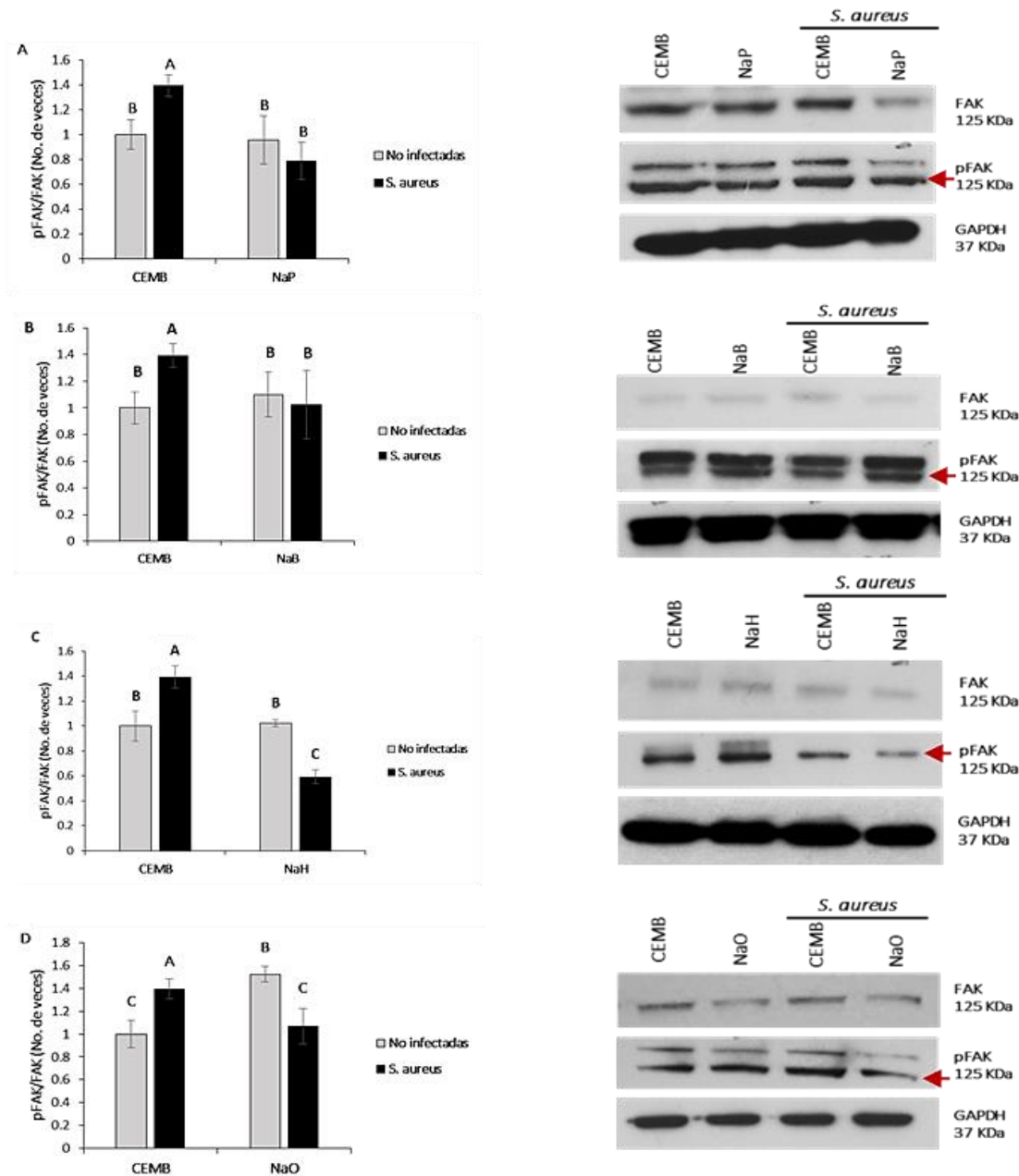


Figura 11. Estado de activación de FAK durante la reducción de la internalización de *S. aureus* modulada por AG. A) NaP disminuye la fosforilación de FAK en presencia del estímulo bacteriano. **B)** NaB disminuye la fosforilación de FAK en presencia del estímulo bacteriano. **C)** NaH disminuye la fosforilación de FAK en presencia del estímulo bacteriano. **D)** NaO induce la fosforilación de FAK, pero el estímulo bacteriano la revierte. A la derecha se muestran imágenes representativas de los datos obtenidos por Western blot. Las células fueron tratadas con los diferentes AG durante 24 h e infectadas con *S. aureus* durante 2 h. Se usaron extractos proteicos totales para evaluar la fosforilación de FAK por Western blot. En el ensayo de Western blot se identificó FAK y pFAK en CEMB tratadas con AG. La activación de FAK fue calculada con un análisis de densitometría (con el software ImageJ), para lo cual se consideró como pFAK la banda indicada con la flecha roja, correspondiente a ~125 kDa. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-GAPDH. Cada barra muestra el resultado de dos experimentos independientes \pm SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

VII.6. La pequeña Rho GTPasa Rac₁ participa de manera importante en la internalización de *S. aureus* en las CEMB

Rac1 es una pequeña Rho GTPasa que participa de manera importante en los rearrreglos del citoesqueleto de actina (formación de lamelipodios), lo cual está directamente relacionado con la internalización bacteriana, además se ha reportado que esta GTPasa es importante en la internalización de *C. jejuni*, por lo que se evaluó su participación en la internalización de *S. aureus* en CEMB tratadas con AG, mediante ensayos de protección con gentamicina y el uso de un inhibidor farmacológico (NSC23766). Los datos obtenidos mostraron que al inhibir la actividad de la GTPasa la internalización se ve inhibida (~71%), dicho efecto aumentó aún más al tratar las CEMB con los AG en presencia del inhibidor (Fig. 12), estos datos demuestran la importancia de la GTPasa Rac₁ durante el proceso de internalización y sugieren que los AG interfieren con su actividad.

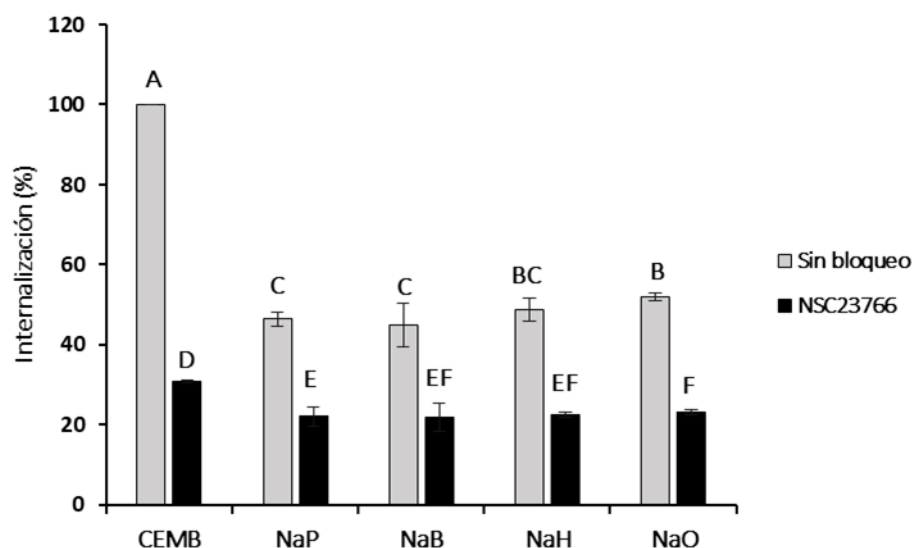


Figura 12. Participación de la GTPasa Rac₁ en la disminución de la internalización de *S. aureus* modulada por AG. Las células se trataron con 1 mM NaP, 0.5 mM NaB, 0.25 mM NaH y 1 mM NaO durante 24 h, después se incubaron con un inhibidor farmacológico de Rac₁ (10 µg/ml, 30 min). Posteriormente, las células se infectaron por 2 h (MDI 30:1). El número de bacterias internalizadas se representa como el porcentaje de internalización con base en las UFC recuperadas después de la lisis celular, representando como 100% las células incubadas con vehículo (DMSO 0.1%). NSC23766: inhibidor de Rac₁. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes por triplicado ± SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, P<0.05).

VII.7. Los ácidos grasos disminuyen la expresión de la GTPasa Rac₁ en CEMB infectadas con *S. aureus*

Rac₁ es una GTPasa de la familia de Rho, las cuales son conocidas como reguladores del citoesqueleto de actina. En este sentido se ha visto que existe una relación entre la activación de FAK y las GTPasas, por lo que se evaluó su actividad en presencia de NaH y NaO, ya que fueron los AG que tuvieron un mayor efecto sobre el estado de activación de FAK. Interesantemente, ambos AG inhibieron significativamente a Rac₁, y este efecto se mantuvo aun en presencia del estímulo bacteriano, lo cual pudiera explicar por qué aunque FAK se esté activando (efecto del NaO, Figura 11), se disminuye la internalización (Fig. 13).

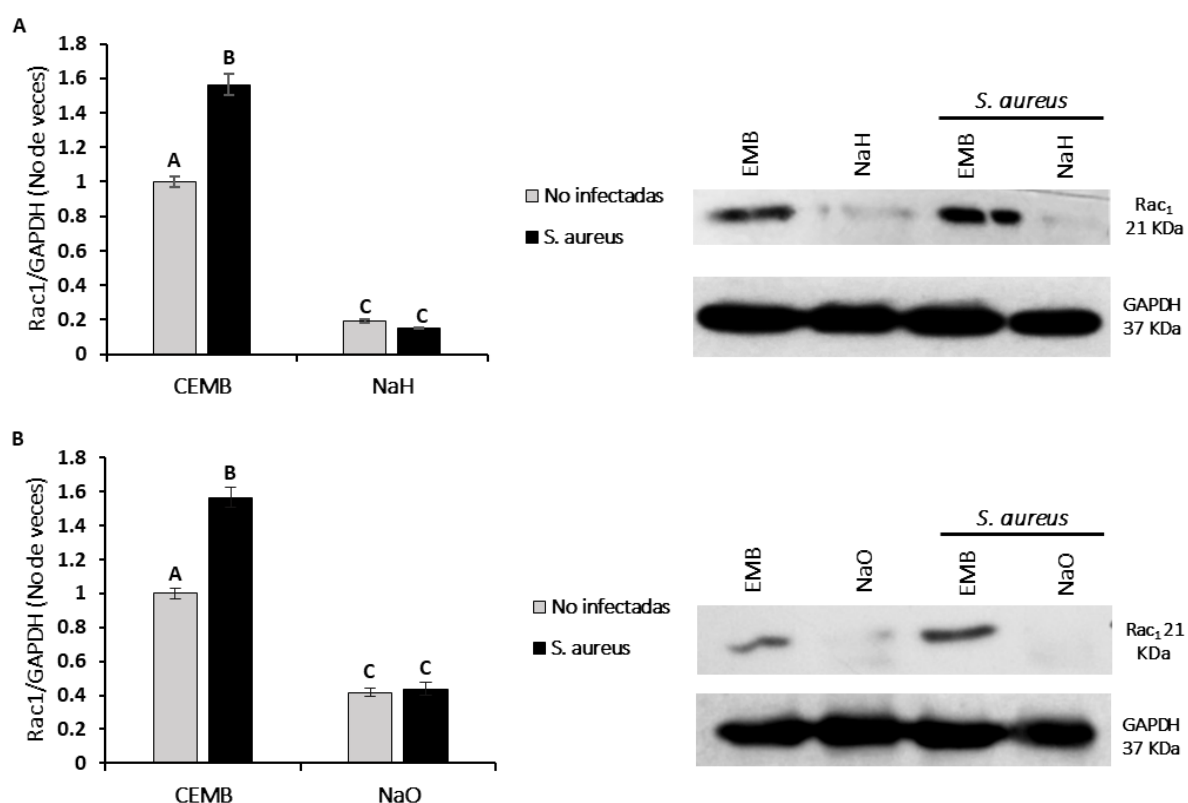


Figura 13. Los ácidos grasos regulan la expresión de Rac₁ en CEMB infectadas con *S. aureus*. El efecto del NaH se muestra en (A), mientras que el efecto del NaO se presenta en (B). A la derecha se muestran imágenes representativas de los datos obtenidos por Western blot. Las células fueron tratadas con los diferentes AG durante 24 h e infectadas con *S. aureus* durante 2 h (MDI 30:1). Se usaron extractos proteicos totales para evaluar la expresión de Rac₁ en las CEMB tratadas con NaH y NaO. La expresión de la proteína fue calculada con un análisis de densitometría (con el software ImageJ). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-GAPDH. Cada barra muestra el resultado de dos experimentos independientes \pm SE. Los grupos conectados por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

La mastitis bovina (MB) se encuentra posicionada entre las enfermedades más costosas de la ganadería lechera a nivel mundial, ya que es una enfermedad altamente prevalente, particularmente la MB subclínica, ya que ésta no muestra signos y solo puede ser detectada a través de pruebas específicas (por ej. Prueba de California). Esto hace que la mastitis subclínica sea una enfermedad difícil de tratar y que su diagnóstico sea complicado, ya que está asociada con infecciones crónicas y recurrentes ocasionadas por *Staphylococcus aureus* (Fernández et al., 2012; Thompson-Crispi et al., 2014). Por lo anterior, se han evaluado alternativas para su control destacando aquellas que evalúan el uso de moléculas inmunomoduladoras con el objetivo de mejorar la respuesta de defensa del hospedero. Entre estas moléculas se encuentran el uso de péptidos antimicrobianos (Báez-Magaña et al., 2018; Díaz-Murillo et al., 2016; Malvisi et al., 2016), enzimas (Breyne et al., 2018), extractos de plantas (Beccaria et al., 2018; Bhatt et al., 2014), vitaminas (Téllez-Pérez et al., 2012; Wei et al., 2014), hormonas (Medina-Estrada et al., 2015; Medina-Estrada et al., 2016), ácidos grasos (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2011; Alva-Murillo et al., 2013; Wei et al., 2017), entre otros.

Diversos reportes han demostrado que los ácidos grasos son moléculas inmunomoduladoras atractivas, ya que actúan como antiinflamatorios (Hoshimoto et al., 2002; Tedelind, 2007; Meijer et al., 2010; Vinolo et al., 2011) y como reguladores de la expresión de genes de la respuesta inmune innata (Meijer, 2010). En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el papel inmunomodulador de AGCC y AGCM en la interacción *S. aureus*-CEMB, demostrado que el NaP, NaB, NaH y NaO reducen la internalización de *S. aureus* en estas células (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2011; Alva-Murillo et al., 2013). Sin embargo, se desconoce el efecto de estos AG sobre la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK y su asociación con la disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Por lo anterior, en este trabajo se determinó el papel que tiene la ruta de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK en la reducción de la internalización de *S. aureus* regulada por AG en las CEMB.

S. aureus es el principal patógeno aislado de casos de MB subclínica, lo cual se ha relacionado con la presencia de cepas facultativas intracelulares que tienen la capacidad de internalizarse en células fagocíticas profesionales y no profesionales como las CEMB (Fraunholz

y Sinha, 2012; Löffler et al., 2014). El mecanismo de internalización mejor descrito para esta bacteria es el tipo “zipper”, donde las FnPB presentes en la superficie de la bacteria forman un complejo con la fibronectina que se encuentra dispersa en la matriz extracelular, este complejo es reconocido por las integrinas $\alpha 5\beta 1$ que se encuentran en la membrana de la célula hospedera. La relevancia de estos receptores en la internalización de *S. aureus* se ha demostrado bloqueando su actividad con anticuerpos funcionales, observándose que se reduce la endocitosis de la bacteria al inhibir su funcionamiento (Alva-Murillo et al., 2016; Medina-Estrada et al., 2013). Es por ello que como un primer acercamiento en este trabajo se evaluó el efecto del NaP y NaH sobre la expresión de los genes de integrinas. Los resultados mostraron que el NaP y NaH en presencia del estímulo bacteriano inducen la expresión de la subunidad $\alpha 5$ (~6 y 2 veces, respectivamente); sin embargo, estos AG no modularon la expresión del gen de la subunidad $\beta 1$, la cual participa de forma activa en la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK. Estos datos concuerdan con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Alva-Murillo et al., 2016), donde el NaB no afectó la expresión de genes de las integrinas. Asimismo, se observó que el estímulo bacteriano generó un ligero aumento en la expresión del gen de la subunidad $\alpha 5$ y una disminución en la subunidad $\beta 1$, efecto reportado previamente (Alva-Murillo et al., 2016; Medina-Estrada et al., 2015).

Por otro lado, se evaluó si la abundancia en membrana de los receptores de integrinas se afectaba por estos AG (NaP y NaH). Los datos obtenidos mostraron que existe una disminución considerable en la AM de estos receptores con ambos AG (~50%) (Fig. 8). Interesantemente, estos datos coinciden con una disminución de la adhesión (~50%) de *S. aureus* en las CEMB favorecida por ambos AG (Fig. 9). Estos resultados sugieren que estos AG afectan la estabilidad del heterodímero de integrinas, causando una menor disponibilidad de receptores en la membrana y por lo tanto un menor porcentaje de adhesión. Esos datos difieren de lo observado para el NaB y NaO, los cuales favorecen el proceso de adhesión (Fig. 9), pero no la internalización. En concordancia con el incremento de la adhesión regulada por el NaB y NaO, Alva-Murillo et al (2016) reportaron que el NaB incrementa la AM de las integrinas y que con el NaO se mantiene sin modificación. Estos resultados sugieren una acción diferencial por parte de los AG sobre el proceso de internalización. Por una parte, el NaP y NaH podrían estar

afectando la estabilidad del heterodímero de integrinas que conduce a una disminución de la adhesión de la bacteria y por eso la disminución en la internalización; pero en el caso del NaB y NaO estos podrían tener un efecto sobre elementos río abajo en la ruta de señalización de integrinas $\alpha5\beta1$ /FAK, ya que se observó una disminución de la internalización de la bacteria no obstante que la adhesión se incrementó, lo cual sugiere que podrían estar afectándose mecanismos que permiten que se lleve a cabo el rearrreglo del citoesqueleto de actina, así como el proceso de endocitosis.

El comportamiento diferencial de los AG sobre la adhesión llevó a analizar río abajo otros elementos del mecanismo de internalización tipo “zipper”, entre ellos la cinasa de adhesión focal (FAK). Esta proteína se une a la subunidad $\beta1$ de las integrinas a través de paxilina y talina, lo cual permite su autofosforilación lo que conduce a la activación de otras proteínas que median el rearrreglo del citoesqueleto de actina, necesario para la internalización bacteriana (Samarel, 2014). Los resultados mostraron que la internalización de *S. aureus* se reduce (~60%) al bloquear la actividad de la cinasa con el inhibidor farmacológico PF573228, estos datos concuerdan con lo reportado en un estudio donde fibroblastos deficientes de FAK reducen su capacidad de internalizar a *S. aureus* (~80%) (Agerer et al., 2005). Por otro lado, se observó que en todas las condiciones donde las células fueron tratadas con AG, el efecto del inhibidor se potenció (Fig. 10), esto refuerza la hipótesis de que los AG interfieren en el estado de activación de FAK. Cabe mencionar que existen otros mecanismos a través de los cuales *S. aureus* se internaliza (Integrinas $\beta1$, $\beta3$, TLR2/TLR6, CD36, entre otros), es por esto que la internalización no es inhibida por completo (Auriemma et al., 2010; Alva-Murillo et al., 2014).

Para corroborar lo anterior se determinó el estado de activación de FAK en presencia de los AG y la infección. Para esto se realizaron ensayos de Western blot detectando la fosforilación de Y397 debido a que es el sitio donde FAK se autofosforila después de unirse con la subunidad $\beta1$ de las integrinas (Alanko e Ivaska, 2016). Los resultados mostraron que, como se esperaba, hay una mayor fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas (Fig. 11), esto concuerda con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Medina-Estrada et al., 2017). Sin embargo, al tratar las CEMB con los AG se observó que estos tienen un efecto diferencial sobre el estado de activación de FAK. Por una parte, el NaP no modificó de manera significativa la

fosforilación de FAK, aunque se observó una ligera disminución de la fosforilación cuando las CEMB fueron expuestas al estímulo bacteriano (~20%). El NaB no modificó la fosforilación de FAK respecto a las CEMB, aunque disminuyó el efecto de la infección. Esto difiere de lo reportado en la literatura, Maa et al (2010) reportan que el NaB disminuye la fosforilación de FAK; sin embargo, esto pudiera deberse a que las concentraciones de NaB no son las mismas (2 mM); además, son modelos diferentes (macrófagos murinos y PEM de rata estimulados con LPS). Esto es importante ya que diversos estudios demuestran que tanto la concentración como el contexto en que se evalué el efecto de los AG, pueden modificar el resultado obtenido. En este sentido se ha reportado que el NaO a diferentes concentraciones puede inducir o inhibir (0.25 mM y 1mM, respectivamente) la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Alva-Murillo et al., 2013). Asimismo, se ha visto que el NaB y NaO actúan como moléculas proinflamatorias en las CEMB (Andoh et al., 2000; Meijer et al., 2010; Sunkara et al., 2012), mientras que en un ambiente inflamatorio, estas moléculas presentan un efecto antiinflamatorio (Hoshimoto et al., 2002; Blais et al., 2007; Weng et al., 2007; Vinolo et al., 2011; Chen et al., 2018).

Los datos obtenidos para el NaH muestran que este AG no modificó significativamente la fosforilación de FAK, aunque se observó una disminución de la fosforilación en las CEMB infectadas (~50%) cuando las CEMB fueron tratadas con NaH y expuestas al estímulo bacteriano. Por otro lado, el NaO en presencia del estímulo bacteriano disminuyó la fosforilación de FAK, mientras que el AG solo la favoreció (~1.5 veces), esto pudiera deberse a que existen diversos mecanismos de activación de FAK, uno de ellos es a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Schlaepfer et al., 2004). Se sabe que los AGCC y AGCM interactúan a nivel de membrana con los receptores GPR41 y GPR43 (Tang et al., 2011); sin embargo, se requiere de experimentos adicionales para evaluar la participación de los receptores GPCR en este proceso. En el mismo sentido, se sabe que FRNK (no cinasa relacionada a FAK) es una isoforma de FAK que actúa como un inhibidor endógeno, no contiene el dominio cinasa y compite por el sitio de unión a adhesiones focales (FAT), y a su vez al unirse a dichas adhesiones promueve su desensamble (Zac et al., 2017; Naser et al., 2018), lo cual pudiera estar asociado a la disminución en la AM de integrinas, por lo que sería interesante determinar el efecto de los AG sobre la expresión de FRNK.

Los resultados experimentales indican que los AG actúan de manera diferencial sobre la ruta de señalización de integrinas $\alpha 5\beta 1$ /FAK; sin embargo, todos inducen una disminución en la internalización de *S. aureus* en las CEMB. En este sentido se ha reportado que cuando la fibronectina se adhiere a las células (a través de las integrinas) se forman complejos focales favoreciéndose la fosforilación de FAK, lo cual se produce de manera independiente de las GTPasas de la familia Rho. Sin embargo, la posterior fosforilación de FAK se produce de una manera dependiente de las GTPasas Rho (Clark, 1998). Esto permite sugerir que si todos los AG disminuyen la internalización de *S. aureus* (efecto potenciado en presencia del inhibidor de FAK), pero no se presenta en todos los casos una disminución de la fosforilación de FAK, es probable que estos AG estén interviniendo en la actividad de las GTPasas dependientes de Rho, como Rac1, lo cual estaría impidiendo que se den los rearrreglos del citoesqueleto necesarios para la endocitosis de la bacteria.

Por lo anterior, se evaluó la participación de la GTPasa Rac₁ en el proceso de internalización. Los datos mostraron que al inhibir la actividad de esta GTPasa hay una disminución considerable de la internalización (~71%), la cual se incrementa al tratar las CEMB previamente con los AG (Fig. 12); sin embargo, no se inhibe completamente ya que existen otros mecanismos de internalización (Auriemma et al., 2010; Alva-Murillo et al., 2014). Además, interesantemente la inhibición de la internalización fue similar a los datos obtenidos inhibiendo FAK, lo cual sugiere que existe una relación importante FAK → Rac₁, ya que ambas son importantes durante el proceso de internalización. Estos resultados indican que efectivamente Rac₁ tiene una participación importante en el proceso de internalización y que los AG interfieren con su actividad.

Para demostrar si los AG afectan la actividad de la GTPasa Rac₁ se determinó su presencia en CEMB tratadas con NaH y NaO, ya que fueron los AG que tuvieron un mayor efecto sobre el estado de activación de FAK. Se observó que ambos AG inhiben casi en su totalidad la presencia de la GTPasa Rac₁, lo cual permite dar una posible explicación al hecho de que, a pesar de que FAK está activándose, hay una reducción en el proceso de internalización, ya que esta GTPasa participa de forma importante en los rearrreglos del citoesqueleto que median los procesos de endocitosis. Además, previamente se ha reportado que esta GTPasa es importante en el

proceso de internalización de *S. aureus* y *C. jejuni* (Bohem et al., 2011; Sayedyahosseini et al., 2018).

Todos estos datos en conjunto muestran que existe una relación importante entre las integrinas $\alpha 5\beta 1 \rightarrow \text{FAK} \rightarrow \text{Rac}_1 \rightarrow$ internalización de *S. aureus*, pues si bien es cierto que las integrinas son necesarias para que *S. aureus* pueda internalizarse a través de sus proteínas de unión a fibronectina, también es necesario que FAK se active para que a su vez active a los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Dock_{180} y Tiam_1), que van a ciclar a Rac_1 a un estado activo, es decir unido a GTP y de esa manera se van a dar los rearrreglos en el citoesqueleto de actina necesarios para la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Fig. 14).

Diversos estudios se han enfocado en la inhibición de elementos del mecanismo tipo “zipper” mediante el uso de anticuerpos, inhibidores farmacológicos, mutaciones, entre otros para determinar la importancia de estos sobre la internalización en diversos modelos; sin embargo, no existen estudios donde evalúen el uso de moléculas orgánicas como inhibidores de elementos del mecanismo tipo “zipper”, esto es relevante ya que los AG son compuestos que se encuentran en la leche y a través de la alimentación pudiera favorecerse la producción de los mismos en el ganado lechero, lo cual tendría un impacto importante en la mejora de los mecanismos de defensa ante patógenos.

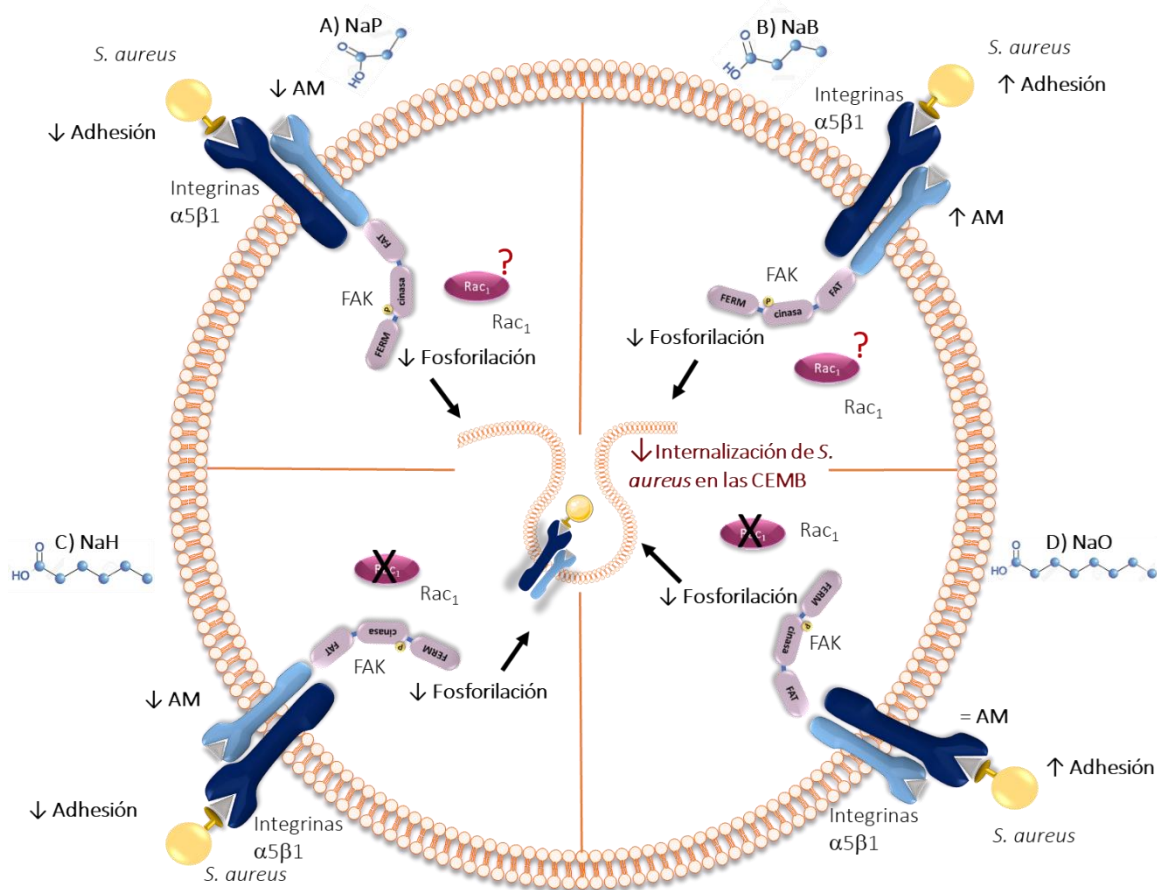


Figura 14. Efectos de los AG (NaP, NaB, NaH y NaO) sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB a través del mecanismo tipo "zipper". A) El NaP disminuye la AM de los receptores de integrinas $\alpha5\beta1$, lo cual a su vez ocasiona una disminución en la adhesión de *S. aureus*, asimismo induce una menor fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas con *S. aureus*. B) El NaB induce la AM de los receptores de integrinas $\alpha5\beta1$, lo cual a su vez ocasiona un aumento en la adhesión de *S. aureus*, asimismo induce una menor fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas con *S. aureus*. C) El NaH disminuye la AM de los receptores de integrinas $\alpha5\beta1$, lo cual conduce a una disminución en la adhesión de *S. aureus* e induce una reducción considerable de la fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas con *S. aureus*, así como una inhibición en la actividad de Rac_1 . D) El NaO no modifica la AM de los receptores de integrinas $\alpha5\beta1$, además favorece la adhesión de *S. aureus* e induce una reducción de la fosforilación de FAK cuando las CEMB son infectadas con *S. aureus*, así como una inhibición en la actividad de Rac_1 . Estos datos en conjunto muestran que cada AG afecta diferentes mecanismos que conducen a una disminución de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

IX. CONCLUSIONES

Los ácidos grasos (propionato, butirato, hexanoato y octanoato) inhiben de manera diferencial la ruta de señalización integrinas $\alpha5\beta1$ /FAK, lo cual conduce a una disminución en la internalización de *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B. and Asmare, K. 2016. Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Isolation of *Staphylococcus aureus* in Dairy Herds at Hawassa Milk Shed, South Ethiopia. BMC Vet Res. 12:1-11. 10.1186/s12917-016-0905-3.
- Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen and K., Hauck, C.R. 2005. Cellular Invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a Functional Link between Focal Adhesion Kinase and Cortactin in Integrin-mediated Internalization. J Cell Sci. 15:2189-2200. 10.1242/jcs.02328.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell. 124:783–801. 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry A.J. and Oliver, S.P. 1996. *Staphylococcus aureus* Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells. J Dairy Sci. 79:1021-1026. 10.3168/jds.S0022-0302 (96)76454-8.
- Alanko, J., and Ivaska, J. 2016. Endosomes: Emerging Platforms for Integrin-Mediated FAK Signalling. Trends Cell Biol. 26:391-398. 10.1016/j.tcb.2016.02.001.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. 2012. Short Chain Fatty Acids (propionic and hexanoic) Decrease *Staphylococcus aureus* Internalization into Bovine Mammary Epithelial Cells and Modulate Antimicrobial Peptide Expression. Vet Microbiol. 155:324-331. 10.1016/j.vetmic.2011.08.025.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J. E. 2013. Effects of Sodium Octanoate on Innate Immune Response of Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. Biomed Res Int. 1-9. 10.1155/2013/927643.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E. 2014. Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in *Staphylococcus aureus* Internalization. Biomed Res Int. 1-10. 10.1155/2014/538546.
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., and López-Meza, J.E. 2015. The Activation of the TLR2/P38 Pathway by Sodium Butyrate in Bovine Mammary Epithelial Cells is involved in the Reduction of *Staphylococcus aureus* Internalization. Mol Immunol. 68:445-455. 10.1016/j.molimm.2015.09.025.
- Alva-Murillo, N. 2016. Análisis de las Rutas de Señalización Involucradas en la Internalización De *Staphylococcus aureus* en las Células Epiteliales Mamarias Bovinas Regulada por Ácidos Grasos. Tesis doctoral. UMSNH. Michoacán, México.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J.E. 2017. Sodium Octanoate Modulates the Innate Immune Response of Bovine Mammary Epithelial Cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 Pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization. Front Cell Infect Microbiol. 78:1-7. 10.3389/fcimb.2017.00078.
- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R.J., Henderson, B., Brock, J.H. and Nair, S.P. 2001. *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Proteins are Essential for Internalization by Osteoblasts but do not Account for Differences in Intracellular Levels of Bacteria. Infect Immun. 69:2872-2877. 10.1128/IAI.69.5.2872-2877.2001.
- Aitken, S.L., Corl, C.M. and Sordillo, L.M. 2011. Immunopathology of Mastitis: Insights into Disease Recognition and Resolution. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 16:291–304. 10.1007/s10911-011-9230-4.

- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E. and Valdéz-Alarcon, J.J. 2006. Invasive Potential of Bacterial Isolates Associated with Subclinical Bovine Mastitis. *Res Vet Sci* 81:358-361. 10.1016/j.rvsc.2006.02.002.
- Auriemma, C., Viscardi, M., Tafuri, S., Pavone, L.M., Capuano, F., Rinaldi, L., Morte, R.D., Iovane, G., and Staiano, N. 2010. Integrin Receptors Play a Role in the Internalin B dependent Entry of *Listeria Monocytogenes* into Host Cells. *Cell Mol Biol Lett*. 15:496-506. 10.2478/s11658-010-0019-z.
- Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2018. Immunomodulatory Effects of Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on Bovine Mammary Epithelial Cells. *Int Immunopharmacol*. 57:47-54. 10.1016/j.intimp.2018.02.001.
- Bauman, D.E. and Griinari, J.M. 2003. Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis. *Annu Rev Nutr*. 23:203-227. 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Beccariaa, C., Silvestrinia, P., Rennaa, M.S., Ortegaa, H., Calvinhoc, L.F., Dallarda, B.E. and Baravallea, C. 2018. Panax Ginseng Extract Reduces *Staphylococcus aureus* Internalization into Bovine Mammary Epithelial Cells but does not Affect Macrophages Phagocytic Activity. *Microb Path*. 1:63-72. 10.1016/j.micpath.2018.06.010.
- Bedolla, C.C. and Ponce de León, M.E.R. 2008. Pérdidas Económicas Ocasionadas por la Mastitis Bovina en la Industria Lechera. *Rev Elect Vet*. 9:1695-7504.
- Bergman, E.N. 1990. Energy Contributions of Volatile Fatty Acids from the Gastrointestinal Tract in Various Species. *Physiol Rev*. 70:567-590. 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
- Boehm, M., Krause-Gruszczynska, M., Rohde, M., Tegtmeyer, N., Takahashi, S., Oyarzabal, O. and Backert, S. Major Host Factors Involved in Epithelial Cell Invasion of *Campylobacter jejuni*: Role of Fibronectin, Integrinbeta1, FAK, Tiam-1, and DOCK180 Inactivating Rho GTPase Rac1. *Front Cell Infect Microbiol*. 1:1-13. 10.3389/fcimb.2011.00017.
- Bretscher, M.S. 1992. Circulating Integrins: Alpha 5 Beta 1, Alpha 6 Beta 4 and Mac-1, but not Alpha 3 Beta 1, Alpha 4 Beta 1 or LFA-1. *EMBO J*. 11:405-410.
- Breyne, K., Cool, S.K., Demon, D., Demeyere, K., Vandenberghe, T., Vandabeele, P., Carlsen, H., Van Den Broeck, W., Sanders, N.N. and Meyer, E. 2014. Non-classical proIL-1beta activation during mammary gland infection is pathogen-dependent but caspase-1 independent. *PLoS One*. 9:1-12. 10.1371/journal.pone.0105680.
- Breyne, K., Steenbrugge, J., Demeyere, K., Lee, C.G., Elias, J.A., Petzl, W., Smith, D.G.E., Germon, P. and Meyer, E. 2018. Immunomodulation of Host Chitinase 3-Like 1 During a Mammary Pathogenic *Escherichia coli* Infection. *Front Immun*. 9:1-12. 10-3389/fimmu.2018.01143.
- Brunton, V.G., MacPherson, I.R.J. and Frame, M.C. 2004. Cell Adhesion Receptors, Tyrosine Kinases and Actin Modulators: a Complex Three-Way Circuitry. *Biochim Biophys Acta*. 5:121-144 10.1016/j.bbamcr.2004.04.010.
- Calderwood, D.A., Campbell, I.D. and Critchley, D.R. 2013. Talins and kindlins: Partners in Integrin-Mediated Adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:503-517. 10.1038/nrm3624.
- Canani, R.B., Costanzo, M.D., Leone, L., Pedata, M., Meli and R., Calignano, A., 2011. Potential Beneficial Effects of Butyrate in Intestinal and Extraintestinal Diseases. *World J Gastroenterol*. 17:1519-1528. 10.3748/wjg.v17.i12.1519.

- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M. and Hynes, R.O. 1998. Integrin-Mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases. *J Cell Biol.* 142:573-586.
- Díaz-Murillo, V., Medina-Estrada, I., López-Meza J.E. and Ochoa-Zarzosa A. 2016. Defensin γ -*thionin* from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides.* 78:109-18. 10.1016/j.peptides.2016.02.008.
- Dinges, M.M., Orwin P.M. and Schlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 13: 16-34.
- Fernández-Bolaños, O.F., Trujillo-Graffe, J.E., Peña-Cabrera, J.J., Cerquera-Gallego, J. and Granja-Salcedo, Y.T. 2012. Mastitis Bovina: Generalidades y Métodos de Diagnóstico. *Rev Electrón Vet.* 13:1-20.
- Ferreira, A.M., Bislev, S.L., Bendixen, E. and Almeida, A.M., 2013. The mammary Gland in Domestic Ruminants: A Systems Biology Perspective. *J Proteomics.* 6:110-123. 10.1016/j.jprot.2013.09.012.
- Fraunholz, M. and Sinha, B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and Let Die. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:1-10. 10.3389/fcimb.2012.00043.
- Ganapathy, V., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Martin, P.M. and Singh, N. 2013. Transporters and Receptors for Short-Chain Fatty Acids as the Molecular Link between Colonic Bacteria and the Host. *Curr Opin Pharmacol.* 13:869–874. 10.1016/j.coph.2013.08.006.
- Giancotti, F.G. 2000. Complexity and Specificity of Integrin Signalling. *Nat Cell Biol.* 2:13-14. 10.1038/71397.
- Green, M.R. and Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Grönlund, U., Johannisson, A., Waller, K., 2006. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 80:147–154. 10.1016/j.rvsc.2005.05.002.
- Günther J., Esch K., Poschadel N., Petzl W., Zerbe H., Mitterhuemer S., Blum H. and Seyfert H.M. 2011. Comparative Kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Specific Activation of Key Immune Pathways in Mammary Epithelial Cells Demonstrates that *S. aureus* Elicits a Delayed Response Dominated by Interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or Tumor Necrosis Factor Alpha. *Infect Immun.* 79:695-707. 10.1128/IAI.01071-10.
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-Lopez, J.L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2008. Prolactin Stimulates the Internalization of *Staphylococcus aureus* and Modulates the Expression of Inflammatory Response Genes in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 15:113-122. 10.1016/j.vetimm.2007.09.007.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ and Brummer RJ. 2008. The Role of Butyrate on Colonic Function. *Aliment Pharmacol Ther.* 15:104–119. 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.
- Hoffmann, C., Ohlsen, K. and Hauck, C.R. 2011. Integrin-Mediated Uptake of Fibronectin-Binding Bacteria. *Eur J Cell Biol.* 90:891–896. 10.1016/j.ejcb.2011.03.001.
- Horn, J., Stelzner, K., Rudel T. and Fraunholz, M. 2017. Inside Job: *Staphylococcus aureus* Host-Pathogen Interactions. *Int J Med Microbiol.* 308:607-624 10.1016/j.ijmm.2017.11.009.
- Hoshimoto, A., Suzuki, Y., Katsuno, T., Nakajima, H. and Saito, Y. 2002. Caprylic Acid and

- Medium-Chain Triglycerides Inhibit IL-8 Gene Transcription in Caco-2 Cells: Comparison with the Potent Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A. *Br J Pharmacol.* 136:280-286. 10.1038/sj.bjp.0704719.
- Hotchin, N.A. and Hall, A. 1995. The Assembly of Integrin Adhesion Complexes Requires Both Extracellular Matrix And Intracellular Rho/Rac GTPases. *J Cell Biol.* 131:1857-1865.
- Hughes, K. and Watson, C.J. 2018. The Mammary Microenvironment in Mastitis in Humans, Dairy Ruminants, Rabbits and Rodents: A One Health Focus. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 23:27–41. 10.1007/s10911-018-9395-1.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* 110, 673-687.
- Jiang, W., Sunkara, L.T., Zeng, X., Deng, Z., Myers, S.M. and Zhang, G. 2013. Differential Regulation of Human Cathelicidin LL-37 by Free Fatty Acids and Their Analogs. *Peptides.* 50:129-138. 10.1016/j.peptides.2013.10.008.
- Kahl, B. 2013. Small Colony Variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*: A Bacterial Survival Strategy. *Infect Genet Evol.* 21:515-522. 10.1016/j.meegid.2013.05.016.
- Kerro Deogo, O., van Dijk, J.E. and Nederbragt, H. 2002. Factors Involved in the Early Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis with Emphasis on Bacterial Adhesion and Invasion. *Vet Q.* 24:181-198. 10.1080/01652176.2002.9695135.
- Kleinschmidt, E.G. and Schlaepfer, D.D. 2017. Focal Adhesion Kinase Signaling in Unexpected Places. *Curr Opin Cell Biol.* 45:24-30. 10.1016/j.ceb.2017.01.003.
- Kong, C., Neoh, H. and Nathan, S., 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel).* 8:1-21. 10.3390/toxins8030072.
- Kumar, A., Zhang, J. and Yu, F.S. 2004. Innate Immune Response of Corneal Epithelial Cells to *Staphylococcus aureus* Infection: Role of Peptidoglycan in Stimulating Proinflammatory Cytokine Secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:3513-3522. 10.1167/iovs.04-0467.
- Lara-Zárate L., López-Meza J.E. and Ochoa-Zarzosa A. 2011. *Staphylococcus aureus* Inhibits Nuclear Factor Kappa B Activation Mediated by Prolactin in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Microb Pathog.* 51:313-8. 10.1016/j.micpath.2011.07.010.
- Lee, J.O., Bankston, L.N., Arnaout, M.A. and Liddington, R.C. 1995. Two Conformations of the Integrin A-domain (I-domain): A Pathway for Activation? *Structure.* 3:1333-1340. 10.1016/S0969-2126(01)00271-4.
- Löffler, B., Tuchscher, L., Niemann, S. and Peters, G. 2014. *Staphylococcus aureus* Persistence in Non-Professional Phagocytes. *Int J Med Microbiol.* 4:170-176. 10.1016/j.ijmm.2013.11.011.
- Maa, M.C., Chang, M.Y., Hsieh, M.Y., Chen, Y.J., Yang, C.J. and Chen, Z.C. 2010. Butyrate Reduced Lipopolysaccharide-Mediated Macrophage Migration by Suppression of Src Enhancement and Focal Adhesion Kinase Activity. *J Nutr Biochem.* 21:1186-1192. 10.1016/j.jnutbio.2009.10.004.
- Malvisi, M., Stuknyté, M., Magro, G., Minozzi, G., Giardini, A., De Noni and Piccinni, R. 2016. Antibacterial Activity and Immunomodulatory Effects on a Bovine Mammary Epithelial Cell Line Exerted by Nisin A-Producing *Lactococcus lactis* Strains. *J Dairy Sci* 99:2288–2296. 10.3168/jds.2015-10161.
- Mansson, H.L. 2008. Fatty Acids in Bovine Milk Fat. *Food Nutr Res.* 52:1-3. 10.3402/fnr.v52i0.1821.
- Martin, K.H., Slack, J.K., Boerner, S.A., Martin, C.C. and Parsons, J.T. 2002. Integrin Connections

- Map: to Infinity and Beyond. *Science*. 296:1652-1653. 10.1126/science.296.5573.1652.
- Medina-Estrada, I. 2013. Participación de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en el Proceso de Internalización de *Staphylococcus aureus* en Células de Epitelio Mamario Bovino Estimulado por Prolactina. Tesis de maestría. UMSNH. Michoacán, México.
- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., Lopez-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2015. Non-classical Effects of Prolactin on the Innate Immune Response of Bovine Mammary Epithelial Cells: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Microb Pathog*. 89:43-53. 10.1016/j.micpath.2015.08.018.
- Medina-Estrada, I., Lopez-Meza, J.E. and Ochoa-Zarzosa, A. 2016. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of Estradiol in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Mediators Inflamm*. 2016:1-16.10.1155/2016/6120509.
- Meglia, G.E. and Mata, H.T. 2001. Mecanismos Específicos e Inespecíficos de Defensa, con Referencia a la Glándula Mamaria de los Bovinos Productores de Leche. *Ciencia Vet*. 2001:29-40.
- Meijer, K., de Vos, P. and Priebe, M.G. 2010. Butyrate and Other Short-Chain Fatty Acids as Modulators of Immunity: What Relevance for Health? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13:715-721. 10.1097/MCO.0b013e32833eebe5.
- Morey, J.S., Ryan, J.C. and Van Dolah, F.M. Microarray Validation: Factors Influencing Correlation between Oligonucleotide Microarrays and Real-Time PCR. *Biol Proced Online*. 8:175–193. 10.1251/bpo126.
- Nagao, K. and Yanagita, T. 2010. Medium-Chain Fatty Acids: Functional Lipids for the Prevention and Treatment of the Metabolic Syndrome. *Pharmacol Res*. 61:208-212. 10.1016/j.phrs.2009.11.007.
- Nair, M.K., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T.A. and Venkitanarayanan, K.S. 2005. Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens. *J Dairy Sci*. 88:3488-3495. 10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2.
- Nakamura, K., Yano, H., Schaefer, E. and Sabe, H. 2001. Different Modes and Qualities of Tyrosine Phosphorylation of Fak and Pyk2 Puring Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation and Cell Migration: Analysis of Specific Phosphorylation Events Using Site-Directed Antibodies. *Oncogene*. 20:2626 – 2635. 10.1038/sj.onc.1204359.
- Naser, R., Aldehaiman, A., Díaz-Galicia, E. and Arold, S.T. 2018. Endogenous Control Mechanisms of FAK and PYK2 and Their Relevance to Cancer Development. *Cancers (Basel)*. 10:1-28. 10.3390/cancers10060196.
- Neville, M.C., Picciano, M.F. 1997. Regulation of Milk Lipid Secretion and Composition. *Annu Rev Nutr*. 17:159-183. 10.1146/annurev.nutr.17.1.159.
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H. and López-Meza, J.E. 2009. Sodium Butyrate Inhibits *Staphylococcus aureus* Internalization in Bovine Mammary Epithelial Cells and Induces the Expression of Antimicrobial Peptide Genes. *Microbial Path*. 47:1-7. 10.1016/j.micpath.2009.04.006.
- Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J.J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Bravo-Patiño A. and Baizabal-Aguirre V.M. 2007. Innate Immune Response of Bovine Mammary Gland to Pathogenic Bacteria Responsible for Mastitis. *J Infect*. 54:399-409.

- 10.1016/j.jinf.2006.06.010.
- Parsons, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* 116:1409-1416. 10.1242/jcs.00373
- Pellinen, T and Ivaska, J. 2006. Integrin traffic. *J Cell Sci.* 119:3723-3731. 10.1016/j.jinf.2006.06.010.
- Pereyra, E.A.L., Dallard, B.E. and Calvinho, L.F. 2014. Aspects of the Innate Immune Response to Intramammary *Staphylococcus aureus* Infections in Cattle. *Rev Arg Microb.* 46:363-75 10.1016/S0325-7541(14)70096-3.
- Pereyra, E.A.L., Sacco, S.C., Duré, A., Baravalle, C., Renna, M.S., Andreotti, C.S., Monecke, S., Calvinhoe, L.F., Dallard, B.F. 2017. Immune response of *Staphylococcus aureus* strains in a mouse mastitis model is linked to adaptive capacity and genotypic profiles. *Vet Microbiol.* 204:64-76. 10.1016/j.vetmic.2017.04.009.
- Raqib, R., Sarker, P., Mily, A., Alam, N.H., Arifuzzaman, A.S. and Rekha, R.S. 2012. Efficacy of Sodium Butyrate Adjunct Therapy in Shigellosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *BMC Infect Dis.* 12:111-122. 10.1186/1471-2334-12-111.
- Rainard, P. and Riollet, C. 2006. Innate Immunity of the Bovine Mammary Gland. *Vet Res.* 37: 369-400. 10.1051/vetres:2006007.
- Ridley A.J. 2001. Rho Proteins: Linking Signaling with Membrane Trafficking. *Traffic.* 2:303-10.
- Samarel, A.M. 2014. Focal Adhesion Signaling in Heart Failure. *Pflugers Arch.* 466:1101–1111. 10.1007/s00424-014-1456-8.
- Sayed-yahosseini, S., Xu, S.X., Rudkouskaya, A., McGavin, M.J., McCormick, J.K. and Dagnino, L. 2014. *Staphylococcus aureus* Keratinocyte Invasion is Mediated by Integrin-Linked Kinase and Rac1. *FASEB J.* 29:711-23. 10.1096/fj.14-262774.
- Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K., Ilic, D. 2004. Control of Motile and Invasive Cell Phenotypes by Focal Adhesion Kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1692:77-102. 10.1016/j.bbamcr.2004.04.008.
- Schönfeld, P. and Wojtczak, L. 2016. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res.* 57:943-954. 10.1194/jlr.R067629.
- Schmidt, A., Hall, A. 2002. Guanine Nucleotide Exchange Factors for Rho GTPases: Turning on the Switch. *Genes Dev.* 16:1587-1609. 10.1101/gad.1003302.
- Sendi, P. and Proctor, R. 2009. *Staphylococcus aureus* as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants. *Trends Microbiol.* 17:54-58. 10.1016/j.tim.2008.11.004.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R. and Schlaepfer, D.D. 1999. Required Role of Focal Adhesion Kinase (FAK) for Integrin-Stimulated Cell Migration. *J Cell Sci.* 112:2677-2691. 10413676.
- Slanina, H., Hebling, S., Hauck, C.R. and Schubert-Unkmeir, A. 2012. Cell Invasion by *Neisseria meningitidis* requires a Functional Interplay between the Focal Adhesion Kinase, Src and Cortactin. *PLoS ONE.* 7:1-15. 10.1371/journal.pone.0039613.
- Sinha B., Francois P., Que, Y.A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P., Lew, D., Krause, K.H., Peters, G. and Herrmann, M. 2000. Heterologously Expressed *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Proteins are Sufficient for Invasion of Host Cells. *Infect immun.* 68:6871-6878. 11083807.
- Sinha, B. and Herrmann, M. 2005. Mechanism and Consequences of Invasion of Endothelial Cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost.* 94:266-277. 10.1160/th05-04-0235.
- Skrivanova, E., Molatova, Z. and Marounek, M. 2008. Effects of Caprylic Acid and Triacylglycerols

- of both Caprylic and Capric Acid in Rabbits Experimentally Infected with Enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Vet Microbiol.* 126:372-376. 10.1016/j.vetmic.2007.07.010.
- Sordillo, L.M. 2018. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 34:507–523. 10.1016/j.cvfa.2018.07.005.
- Stuart, L.M., Deng, J. and Silver, J. M. 2005. Response to *Staphylococcus aureus* Requires CD36-Mediated Phagocytosis Triggered by The COOH-Terminal Cytoplasmic Domain. *J Cell Biol.* 170:477–485. 10.1083/jcb.200501113.
- Téllez-Pérez, A.D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and Lopez-Meza, J.E. 2012. Cholecalciferol (vitamin D) Differentially Regulates Antimicrobial Peptide Expression in Bovine Mammary Epithelial Cells: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Vet Microbiol.* 9:91-98. 10.1016/j.vetmic.2012.05.007.
- Thompson-Crispi, K., Atalla. H., Miglior, F. and Mallard, BA. 2014. Bovine mastitis: Frontiers in Immunogenetics. *Front Immunol.* 5:1-10. 10.3389/fimmu.2014.00493.
- Tuchscher, L., Heitmann, V., Hussain, M., Viemann, D., Roth, J., Eiff, C., Peters, G., Becker, K. and Löffler, B. 2010. *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Adapted Phenotypes for Intracellular Persistence. *J Infect Dis.* 202:1031-1040. 10.1086/656047.
- Van Deun, K., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. 2008. Short-Chain Fatty Acids and L-lactate as Feed Additives to Control *Campylobacter jejuni* Infections in Broilers. *Avian Pathol.* 37:379-383. 10.1080/03079450802216603.
- Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L. and Pasmans, F. 2006. The Use of Organic Acids to Combat *Salmonella* in Poultry: A Mechanistic Explanation of the Efficacy. *Avian Pathol.* 35:182-188. 10.1080/03079450600711045.
- Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Hatanaka, E., Sato, F.T., Sampaio, S.C. and Curi, R. 2011. Suppressive Effect of Short-Chain Fatty Acids on Production of Proinflammatory Mediators by Neutrophils. *J Nutr Biochem.* 22:849-855. 10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.
- Von Eiff, C., Peters, G. and Becker, K. 2006. The Small Colony Variant (SCV) Concept. The Role of Staphylococcal SCVs in Persistent Infections. *Injury.* 2:26-33. 10.1016/j.injury.2006.04.006.
- Wei, Z., Fu, Y., Zhou, E., Tian, Y., Yao, M., Li, Y., Yang, Z. and Cao, Y. 2014. Effects of Niacin on *Staphylococcus aureus* Internalization into Bovine Mammary Epithelial Cells by Modulating NF- κ B Activation. *Microb Pathog.* 71:62-67. 10.1016/j.micpath.2014.03.005.
- Wei, Z., Xiao, C., Guo, C., Zhang, X., Wang, Y., Wang, J., Yang, Z. and Fu, Y. 2017. Sodium Acetate Inhibits *Staphylococcus aureus* Internalization into Bovine Mammary Epithelial Cells by Inhibiting NF- κ B Activation. *Microb Pathog.* 107:116-121. 10.1016/j.micpath.2017.03.030.
- Wellnitz, O. and Bruckmaier, R.M. 2012. The Innate Immune Response of the Bovine Mammary Gland to Bacterial Infection. *Vet J.* 192:148-52. 10.1016/j.tvjl.2011.09.013.
- Xiong, W.C., Macklem, M. and Parsons, J.T. 1998. Expression and Characterization of Splice Variants of PYK2, a Focal Adhesion Kinase-Related Protein. *J Cell Sci.* 111:1981–1991. 9645946.
- Yang, Z., Fu, Y., Liu, B., Zhou, E., Liu, Z., Song, X., Li, D. and Zhang, N. 2013. Farnesol Regulates

- Antimicrobial Peptide Expression and Reduces *Staphylococcus aureus* Internalization into Bovine Mammary Epithelial Cells. *Microb Pathog.* 65:1-6. 10.1016/j.micpath.2013.08.002.
- Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K., and Obara, Y. 2009. Short-Chain Fatty Acid Signaling Pathways in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Regul Pept.* 153:30-36. 10.1016/j.regpep.2008.11.01.
- Young, M., Zoete, M., Putten, J., Strijbis, K. 2015. Redirection of Epithelial Immune Responses by Short-Chain Fatty Acids through Inhibition of Histone Deacetylases. *Front Immun.* 6:1-11. 10.3389/fimmu.2015.00554.
- 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. and Yang, Z. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Elicit Different Innate Immune Responses from Bovine Mammary Epithelial Cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155:245-252. 10.1016/j.vetimm.2013.08.003.
- Zac, T.J., Koshman, Y.E., Samarel, A.M. and Robia, S.L. 2017. Regulation of Focal Adhesion Kinase through a Direct Interaction with an Endogenous Inhibitor. *Biochemistry.* 5:4722-4731. 10.1021/acs.biochem.7b.
- Zhao, X. and Lacasse, P. 2008. Mammary Tissue Damage during Bovine Mastitis: Causes and Control. *J Anim Sci.* 86:57-65. 10.2527/jas.2007-0302.
- Zhao, Y., Zhou, M., Gao, Y., Liu, H., Yang, W., Yue, J. and Chen, Dekun. 2015. Shifted T helper cell polarization in a murine *Staphylococcus aureus* mastitis model. *PLoS One.* 10:1-15. 10.1371/journal.pone.01347

