



**UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE SEMILLA DE AGUACATE Y SUS
DERIVADOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DURANTE LA
INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN CÉLULAS EPITELIALES
MAMARIAS BOVINAS**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Marisol Báez Magaña

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Asesor: Dr. Rafael Salgado Garciglia

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Co-asesor: Dr. Joel Edmundo López Meza

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas

Morelia, Michoacán, Diciembre de 2014.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas y el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Rafael Salgado Garciglia y la coasesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH a través del proyecto CIC-14.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2. Mastitis bovina	7
2.3. Inmunidad innata e inflamación	10
2.3.1. Inmunidad innata	10
2.3.2. Inflamación	12
2.4. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina generada por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5. Internalización de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.6. Control de la mastitis bovina	22
2.6.1. Compuestos inmunomoduladores de origen vegetal	23
2.7. Ácidos grasos de aguacate y compuestos derivados	24
2.7.1. Propiedades medicinales del aguacate	24
2.7.2. Propiedades de la semilla de aguacate	25
2.7.3. Ácidos grasos y derivados de ácidos grasos de aguacate	26
2.8. Antecedentes directos	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30

4.1.	Objetivo general	30
4.2.	Objetivos específicos	30
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1.	Extracción de los ácidos grasos (AG) y sus derivados (DAG) a partir de semilla de aguacate	32
6.2.	Derivatización de los AG y DAG de semilla de aguacate	32
6.3.	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)	33
6.4.	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543	33
6.5.	Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)	34
6.6.	Efectos de los AG y DAG de semilla de aguacate sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
6.7.	Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate sobre la viabilidad de las CEMB	34
6.8.	Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate en la internalización de <i>S. aureus</i> ATCC 27543 en las CEMB	35
6.9.	Análisis de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana por RT-PCR	36
6.10.	Análisis estadístico	37
7.	RESULTADOS	
7.1.	Extracción e identificación de AG y DAG presentes en la semilla de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	38
7.2.	Efecto de los AG y DAG de la semilla de aguacate mexicano sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus</i>	40

	<i>aureus</i> y la viabilidad de las CEMB	
7.3.	Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543 en las CEMB	42
7.4.	Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate en la expresión de genes de la respuesta inmune innata de las CEMB	43
7.4.1.	Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria en las CEMB	44
7.4.2.	Los AG y DAG de semilla de aguacate inducen la expresión de la IL-10 en las CEMB	46
7.4.3.	Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB	47
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIÓN	58
10.	LITERATURA CITADA	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> expresados en las distintas fases de crecimiento.	7
Figura 2. Establecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en la glándula mamaria	9
Figura 3. Células de la respuesta inmune	11
Figura 4. Paradigma de la respuesta inmune e inflamatoria en el daño	14
Figura 5. Respuesta inflamatoria de la glándula mamaria generada por <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Figura 6. Señalización mediada por los receptores tipo Toll (TLR)	17
Figura 7. Internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células fagocíticas no profesionales	22
Figura 8. Cromatograma representativo del perfil de AG y DAG presentes en la semilla de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	40
Figura 9. Los AG y DAG de semilla de aguacate no afectan la viabilidad de <i>S. aureus</i> y de las CEMB	41
Figura 10. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB	43

Figura 11. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria de las CEMB	45
Figura 12. Los AG y DAG de semilla de aguacate inducen la expresión de IL-10 en las CEMB	46
Figura 13. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB	48

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Elementos de la respuesta inmune innata que participan en la mastitis bovina	18
Cuadro 2. Extractos de plantas utilizados como tratamientos alternativos para la mastitis bovina	23
Cuadro 3. Efectos biológicos de extractos y compuestos de semillas de aguacate	25
Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión del ARNm de elementos de la respuesta inmune innata de las CEMB	37
Cuadro 5. Contenido de AG y DAG en la semilla de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	
Cuadro 5. Contenido de AG y DAG en semilla de aguacate mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	39

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria de gran importancia médica debido a que causa infecciones crónicas en humanos y animales, lo cual se ha asociado con su capacidad de internalizarse en las células fagocitas no profesionales, que le permite evadir el sistema inmune del hospedero, además de que dificulta la terapia antimicrobiana. *S. aureus* es el principal patógeno en animales, responsable de la mastitis subclínica bovina crónica, ya que puede internalizarse en las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). Un tratamiento alternativo para controlar a esta bacteria es la modulación de la respuesta inmune innata del hospedero (RII). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena corta y media presentan propiedades inmunomoduladoras en las CEMB infectadas con *S. aureus*. Una fuente de ácidos grasos y moléculas lipídicas es el fruto del aguacatero (*Persea americana*), al que se le atribuyen propiedades inmunomoduladoras; en la medicina tradicional mexicana, la semilla de aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) se utiliza como antiinflamatorio. Para analizar el efecto de los ácidos grasos (AG) y otras moléculas como los derivados de ácidos grasos (DAG) de semilla de aguacate mexicano, se realizó la presente investigación durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB y la expresión de genes de la RII. Mediante extracción hexánica se obtuvieron los AG y DAG, y se analizaron por CG-MS. Las moléculas más abundantes fueron cadenas alifáticas de 16-24 carbonos con grupos hidroxilos. Estos compuestos no afectaron el crecimiento bacteriano, ni la viabilidad de las CEMB (1 ng/mL- 500 ng/mL). Los pre-tratamientos (24 h) de las CEMB con los compuestos (1-100 ng/mL) disminuyeron la internalización bacteriana (60-70%). Los análisis de expresión de genes (qPCR) de la RII de las CEMB mostraron que los pre-tratamientos y la estimulación con la bacteria, modulan la expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF- α , mientras que aumentaron la expresión del ARNm de la citocina antiinflamatoria IL-10, ésto de manera dependiente de la concentración. En presencia de la bacteria, el pretratamiento con 100 ng/mL de AG y DAG incrementó la expresión de IL-10 (~20 veces), relacionándose con la disminución de la internalización bacteriana. Además, la expresión de los péptidos antimicrobianos TAP y BDBD5 mostraron una tendencia a incrementar su expresión de manera dependiente de la concentración. En conclusión, los AG y DAG de la semilla de aguacate inhiben la internalización de *S. aureus* en las CEMB y modulan diferencialmente la RII durante este proceso.

Palabras clave: Semilla de aguacate, ácidos grasos y derivados, mastitis bovina, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a bacterium of great medical importance because it causes chronic infections in humans and animals, which has been associated with its ability to be internalized in nonprofessional phagocytic cells that allows it to evade the host immune system, that difficult antimicrobial therapy. *S. aureus* is the main pathogen in animals, responsible for the chronic bovine subclinical mastitis; this bacterium can be internalized in bovine mammary epithelial cells (BMEC). An alternative to this bacterium control treatment is the modulation of the innate immune response of the host (IIR). In previous studies of our research group has shown that short-chain and media-chain fatty acids have immunomodulatory properties in BMEC infected with *S. aureus*. A sources of fatty acids and lipid molecules is the avocado (*Persea americana*), to which is attributed immunomodulatory properties; in Mexican traditional medicine, Mexican avocado seed (*P. americana* var. *drymifolia*) is used as an anti-inflammatory. To analyze the effect of fatty acids (FA) and other molecules as the derivatives of fatty acids (DFA) of Mexican avocado seed, this research was performed during the internalization of *S. aureus* in BMEC and the expression of genes of the IIR. FA and DFA were obtained by hexane extraction and analyzed by GC-MS. The most abundant molecules were 16-24 carbon aliphatic chains with hydroxyl groups. These compounds did not affect bacterial growth or viability of BMEC (1 ng/mL -500 ng/mL). The pre-treatment (24 h) of BMEC with compounds (1-100 ng/mL) decreased bacterial internalization (60-70%). The analysis of gene expression (qPCR) of the IIR in BMEC showed that pre-treatment and stimulation with bacteria modulate the expression of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , while increased mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10, dependent of the concentration. In the presence of the bacterium, pretreatment with 100 ng/mL of FA and DFA increased expression of IL-10 (~20 times), relating to the reduction of bacterial internalization. Furthermore, expression of antimicrobial peptides BDBD5 and TAP showed a tendency to increase its expression in concentration dependent. In conclusion, the FA and DFA of avocado seed inhibit internalization of *S. aureus* in BMEC and differentially modulate the host immune response during this process.

Keywords: Avocado seed, Fatty acids and derivatives, bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que causa diversas enfermedades en humanos y animales. En animales es el principal agente causal de la mastitis bovina subclínica, esta es una enfermedad que se caracteriza por la infección persistente de la ubre, en la cual la respuesta inmune se encuentra comprometida y la inflamación es asintomática dando lugar a una infección crónica (Dego et al. 2002; Lowy, 2003).

La respuesta inmune innata (RII) es la primera barrera de defensa del hospedero, ésta es una respuesta compleja que involucra elementos físicos y químicos del organismo que censan continuamente el entorno con la finalidad de reconocer y eliminar agentes potencialmente dañinos (Newton et al. 2012). La RII del hospedero es modulada por *S. aureus* provocando infecciones crónicas relacionadas con la internalización en células fagocíticas no profesionales (Fraunholz et al. 2012), afectando el delicado balance entre elementos proinflamatorios y antiinflamatorios, y en consecuencia, la restauración de la homeostasis del sitio del daño (Lawrence et al. 2007).

En bovinos, *S. aureus* puede invadir la glándula mamaria bovina y entrar en contacto con las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), las cuales reconocen al patógeno a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR), principalmente TLR2, que reconocen estructuras bacterianas conservadas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), este reconocimiento lleva a la fagocitosis de *S. aureus* por la CEMB a través del mecanismo tipo "Zipper" (Hauck et al. 2006; Fournier, 2012). El reconocimiento de *S. aureus* por las CEMB no promueve la activación del factor transcripcional NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), el cual es clave en la expresión de genes de la RII (Yang et al. 2008). El bloqueo de la activación de genes de la RII de las CEMB es consistente con la generación de infecciones crónicas causadas por *S. aureus* (Lara-Zarate et al. 2011; López-Meza et al. 2011).

Se ha demostrado que las CEMB son capaces de producir una variedad de mediadores inflamatorios tales como citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y

otros elementos de defensa como el óxido nítrico (NO), los cuales actúan como moléculas mensajeras para el reclutamiento de neutrófilos y linfocitos en la glándula mamaria y mediadores de la RII, además son puentes entre ésta y la respuesta inmune adaptativa (Boulanger et al. 2001; Wellnitz et al. 2004; Wellnitz et al. 2012). Entre las citocinas proinflamatorias sintetizadas por las CEMB están la interleucina-1 (IL-1), interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Strandberg et al. 2005; Lahouassa et al. 2007), además de la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10) (Alva-Murillo et al. 2014). También son sintetizadas las quimiocinas proinflamatorias, interleucina-8 (IL-8), el regulador de la activación de las células T normales expresadas y secretadas (RANTES), la quimiocina (motivo C-C) ligando 2 (CCL2) y la quimiocina (motivo C-X-C) ligando 6 (CXCL6) (Strandberg et al. 2005; Griesbeck-Zilch et al. 2008). Conjuntamente las CEMB producen péptidos antimicrobianos (PA), los cuales presentan potentes actividades antimicrobianas, y que pueden actuar como mediadores entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Entre los PA que se expresan en las CEMB se encuentran las β -defensinas de neutrófilo bovino (BNBD) (Roosen et al. 2004), el péptido antimicrobiano traqueal (TAP) (López-Meza et al. 2009), el péptido antimicrobiano lingual (LAP) y la β -defensina (Swanson et al. 2004).

La mastitis bovina crónica es difícil de controlar debido al éxito de *S. aureus* como patógeno facultativo intracelular en las CEMB. La terapia más utilizada es la combinación de antibióticos y antiinflamatorios durante largos periodos de tiempo, lo que provoca pérdidas económicas significativas, además el éxito de la terapia con antibióticos es pobre. Entre los antibióticos más recomendados para el control de *S. aureus* en bovinos se encuentran la cloxacilina, las quinolonas y la sulfanilamida (Gruet et al. 2001). Así mismo, los tratamientos con antiinflamatorios no esteroideos (AINES), contribuyen elevando la eficacia en la recuperación de la mastitis clínica y mejoran el porcentaje de recuperación de la producción láctea, siendo los más utilizados la flunixinameglumina, el piroxicam y el ketoprofeno, aunque provocan efectos secundarios significativos (Gwynn 1991; Griedrys-Kalembe et al. 1992).

Lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas selectivas y seguras, como son los compuestos que regulan la respuesta inmune (Nicholls et al. 2010). Entre algunas de las nuevas terapias contra la mastitis bovina se han utilizado citocinas como la IL-2, interferón y metabolitos de origen vegetal (Kim et al. 1991; Erskine et al. 1998). Debido al nivel de toxicidad relativamente menor y a la mayor eficacia que pueden presentar los extractos vegetales, se han estudiado las propiedades inmunomoduladoras de diferentes metabolitos de plantas. Los resultados sugieren que las plantas poseen potencialmente nuevos fármacos innovadores con actividad inmunomoduladora con los cuales se pueden llegar a dilucidar mecanismos de acción novedosos (Emmendörffer et al. 1999; Shukla et al. 2014).

Entre las plantas con propiedades inmunomoduladoras se destaca el aguacate (*Persea americana* Mill.), el cual es reconocido también por sus propiedades antimicrobianas (Ding et al. 2007). En particular, se han logrado caracterizar diversas moléculas activas que presentan efectos inmunomoduladores, como los ácidos grasos de cadena larga, que pueden estar involucrados en la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas y resolvinas y en consecuencia pueden dar origen a una respuesta inmune eficiente (Yaqoob et al. 2007).

Las semillas de aguacate contienen una amplia variedad de componentes, pero son particularmente ricas en ácidos grasos (AG) y derivados de éstos (DAG). El aceite de las semillas se ha utilizado por sus propiedades cicatrizantes y analgésicas (Dabas et al. 2013). Se ha reportado que un grupo de DAG de la semilla, los alcoholes grasos polihidroxilados (PFA), regulan la respuesta inflamatoria de queratinocitos humanos ante el daño por luz UV (Rosenblat et al. 2011). Lo anterior coincide con otras investigaciones, donde se reporta que los ácidos grasos de cadena corta, algunos de ellos componentes de la leche, como el propionato, butirato y hexanoato, modulan la RII en las CEMB ante un agente infeccioso como *S. aureus*, preparando a las células para una defensa mejorada ante el ataque del patógeno (Ochoa-Zarzosa et al. 2009; Alva-Murillo et al. 2012; Alva-Murillo et al. 2013). Debido al interés de determinar si los AG y DAG de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) pueden regular la RII en este modelo de

infección, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de estas moléculas en la regulación de la inmunidad innata en las CEMB durante la internalización de *S. aureus*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Staphylococcus aureus*

En 1880 Alexander Ogston presentó el trabajo donde se estableció el papel causal de las bacterias en heridas infectadas y las subsecuentes septicemias, basándose en las enseñanzas de sus contemporáneos Louis Pasteur y Joseph Lister. Ogston observó a través del microscopio la pus de 88 abscesos humanos y notó una bacteria esférica formando estructuras parecidas a “racimos de uvas”, de ahí toma la palabra del griego *Staphylococcus* para llamar al organismo, ahora es conocido como *Staphylococcus aureus* debido a que sus colonias presentan un color dorado cuando es cultivada (Lowy, 1998; Shinefield et al. 2009).

S. aureus es una bacteria coagulasa positiva, anaerobia facultativa que se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo, además causa un amplio espectro de enfermedades en humanos, que van desde infecciones menores en la piel, a infecciones más severas en tejidos blandos e inclusive infecciones sistémicas fatales (Lowy, 1998). Durante la introducción de la penicilina en los años 1940's, este antibiótico se anunció como un fármaco milagroso con el cual se combatiría a *S. aureus*, pero tan solo un par de años después comenzaron a aparecer las primeras cepas resistentes y para 1961 se describió la primer cepa de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), estos antibióticos pertenecen a la familia de beta lactámicos, los cuales inhiben la biosíntesis de la pared celular (Klevens et al. 2007; Gordon et al. 2008; Otto, 2012).

S. aureus es una bacteria que posee una gran cantidad de factores de virulencia, que incluyen proteínas de superficie (adhesinas) y de secreción (hemolisinas, leucocidinas, proteasas, enterotoxinas, toxinas exfoliativas), factores inmunomoduladores y factores de adquisición de hierro, complejos proteicos que evaden la respuesta inmune innata del hospedero y que son determinantes importantes para la especificidad del hospedero, los mejor caracterizados son la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) específico de humanos y un homólogo inhibidor del complemento estafilocócico (Scn) en rumiantes (Lowy, 2003;

Foster, 2005; McCarthy et al. 2013). Estos factores en combinación con la resistencia a antibióticos hacen de *S. aureus* un patógeno peligroso (Garzoni et al. 2009). Estos factores se expresan de forma dependiente del estadio de la infección. Durante la fase exponencial, se sintetizan proteínas de la pared celular o superficie, cuya función es adherir la bacteria a la célula hospedero, lo que da lugar a la colonización, persistencia e invasión (Figura 1) (Papa et al. 2013; Zecconi et al. 2013).

S. aureus es considerada una bacteria intracelular facultativa asociada con enfermedades crónicas. Se ha descrito que logra internalizarse en células fagocíticas profesionales (macrófagos, neutrófilos) y no profesionales (células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, queratinocitos, etc.), proceso que es logrado por diferentes mecanismos que le permiten a la bacteria persistir y sobrevivir dentro de las células (Garzoni et al. 2009; Alva-Murillo et al. 2014). *S. aureus* causa una amplia variedad de infecciones crónicas en humanos, entre ellas la osteomielitis, endocarditis, artritis séptica e inflamación crónica del tracto respiratorio superior, estas infecciones además de ser persistentes son altamente recalcitrantes a tratamientos con antibióticos, y la persistencia a través de variantes en los fenotipos, y la capacidad de evadir el sistema inmune del hospedero lo convierten en un patógeno importante para la medicina humana y veterinaria (Conlon, 2014). En animales domésticos, es el principal agente causal de la mastitis bovina crónica (Kerro-Dego et al. 2002).

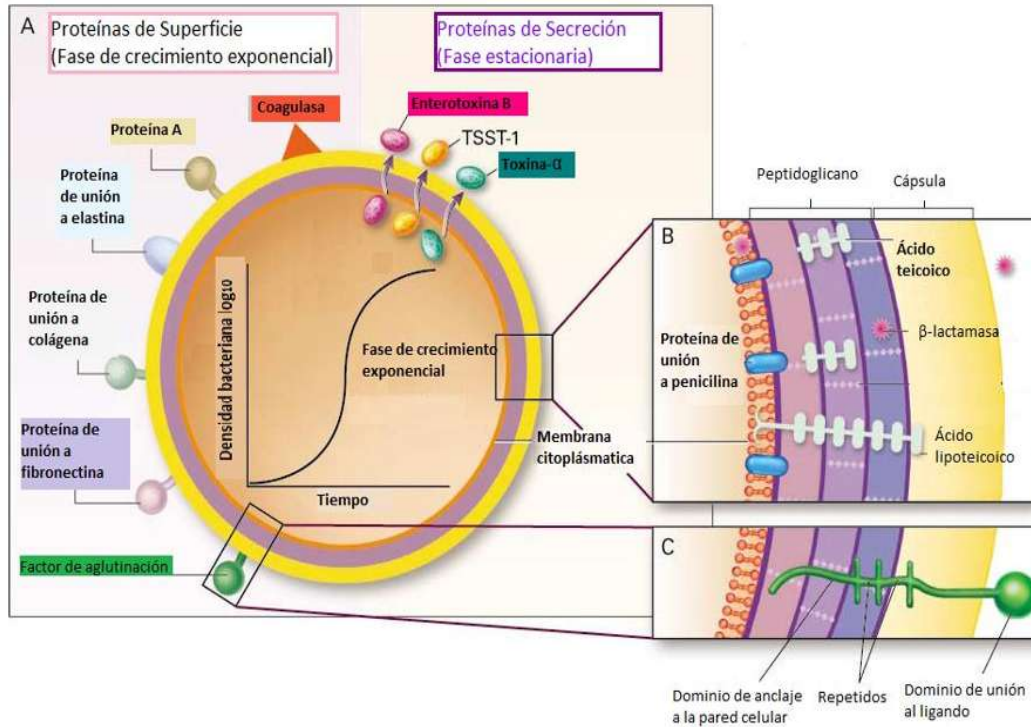


Figura 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* expresados en las distintas fases de crecimiento. (A) Proteínas de superficie y de secreción. La síntesis de algunas de estas proteínas depende de la fase de crecimiento y es controlado por diversos sistemas de regulación. (B) y (C) muestran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

2.2. MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es una enfermedad compleja que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria. Existen diversos factores que provocan el desarrollo de la enfermedad, éstos incluyen a la vaca, las condiciones del establo y el medio ambiente en el que se encuentra y los microorganismos, además el personal juega un papel importante de contagio durante el proceso de ordeño (Wellnitz et al. 2004; Zadoks et al. 2011). Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial, la FAO (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>) reporta que en países desarrollados las pérdidas ascienden a \$134 dólares al año por vaca en promedio, sin embargo, México no cuenta con estimaciones reales de pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina. Además la enfermedad provoca una disminución significativa de la producción de

leche, afecta la inocuidad de ésta, asimismo altera el valor nutricional influyendo en la calidad de los derivados lácteos (Hogeveen et al. 2011).

Los microorganismos son la causa más común de la mastitis bovina y pueden ser agrupados en cuatro categorías: (1) contagiosos entre los que destacan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae* y *Mycoplasma bovis*, (2) medioambientales como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus ssp* y *Streptococcus uberis* (3) oportunistas los microorganismos aislados más frecuentemente son *Staphylococcus* coagulasa negativos y (4) otros como hongos y levaduras entre ellos *Candida sp*, *Trichosporon sp*, *Saccharomyces sp* y *Aspergillus sp*. Algunos microorganismos patógenos causan reacciones inflamatorias agudas con un aumento en el conteo de células somáticas (SCC), mientras que otros solo causan una ligera elevación en las SCC (Nickerson, 2002; Tiwari et al. 2013).

La mastitis se clasifica en mastitis clínica y subclínica dependiendo de la intensidad de la respuesta de la glándula mamaria ante el factor causante del daño (Zadoks, et al. 2011). La mastitis clínica se caracteriza por signos exacerbados de inflamación, generalmente el cuarto que presenta el daño manifiesta dureza, calor, rubor, dolor al tacto y tumoración. La mastitis clínica puede ser causada por daño mecánico e infecciones por bacterias Gram positivas y negativas, micoplasmas y algas (Bradley, 2002). El principal agente causal de la mastitis clínica es la bacteria *Escherichia coli*, y se relaciona con malas prácticas durante el ordeño del animal, en la mayoría de los casos la tasa de cura de la mastitis clínica es alta, a través de la terapia antimicrobiana (Barkema et al. 2006; Burvenich et al. 2007). Por otro lado, en la mastitis subclínica no se presentan signos evidentes de inflamación de la ubre, debido a la ausencia de estos es difícil detectar un animal enfermo. Las características principales de la mastitis subclínica son la disminución en la producción de la leche y conteos elevados de células somáticas en la leche. Frecuentemente es causada por bacterias patógenas persistentes, siendo *S. aureus* el principal microorganismo asociado a la mastitis subclínica, el cual es aislado en el 70% de los casos; sin embargo, también se han descrito otros microorganismos como son *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Corynebacterium spp*. También, se ha

reportado que la prevalencia de *S. aureus* en infecciones intramamarias durante largos periodos de tiempo está directamente relacionado con la mastitis bovina subclínica crónica (Dego, 2002; Barkema et al. 2006; Lutzow et al. 2008; Zadoks et al. 2011). El mecanismo de entrada de *S. aureus* a la glándula mamaria es a través del canal del pezón, el cual es la primera línea de defensa que actúa como una barrera física que previene la penetración de la bacteria. Generalmente el canal del pezón es una barrera eficiente que mantiene el lumen intramamario en un ambiente aséptico, por esto se considera que el epitelio mamario rara vez es estimulado por componentes bacterianos. Sin embargo, las malas prácticas durante el ordeño afectan la integridad del canal del pezón ocasionando daños a sus tejidos, permitiendo la entrada de *S. aureus*. Una vez dentro de la cisterna glandular la bacteria se multiplica y se establece en el tejido de la glándula mamaria, esto ocurre si la respuesta inmune no es la adecuada (Figura 2) (Paape et al. 2000; Rainard et al. 2006; Aitken et al. 2011).

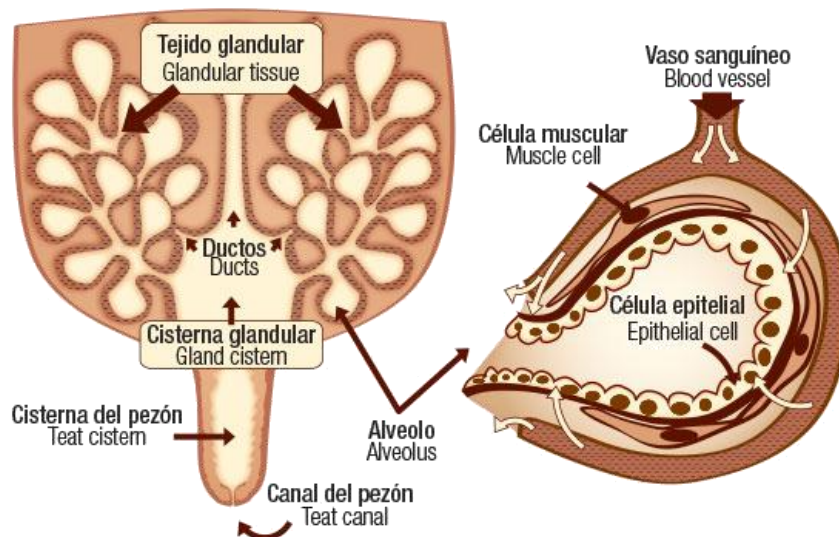


Figura 2. Establecimiento de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria. La vía de entrada de la bacteria es a través del canal del pezón, donde coloniza el canal del pezón, y puede persistir durante semanas ocasionando infecciones intramamarias. El canal del pezón juega un papel especial en la defensa inmune de la glándula mamaria ya que mantiene el lumen intramamario aséptico, cuando esta barrera falla, la bacteria logra ingresar a la cisterna glandular, donde los leucocitos sub- e intra-epiteliales, y las células epiteliales mamarias bovinas, montarían una respuesta para eliminar la bacteria (Rainard et al. 2006).

2.3. INMUNIDAD INNATA E INFLAMACIÓN

2.3.1. Inmunidad innata

Para comprender mejor el funcionamiento del sistema inmune, éste se divide en el sistema inmune adaptativo y el sistema inmune innato o inespecífico. El sistema inmune adaptativo se caracteriza por establecer una respuesta específica a través de anticuerpos por células especializadas que reconocen antígenos propios del patógeno en particular, generando especificidad. Para que se presente una respuesta inmune adaptativa se requiere de la activación de la respuesta inmune innata (Quintin et al. 2014). La presente investigación se centra en la respuesta inmune innata debido a que ésta es la primera barrera de defensa del organismo, es una respuesta compleja que involucra elementos físicos y químicos del organismo, que censan continuamente el entorno con el fin de lograr un reconocimiento rápido y la eliminación de los agentes potencialmente dañinos para éste (Broz et al. 2011; Quintin et al. 2014; Striz et al. 2014). La respuesta inmune innata se encuentra conservada en diferentes organismos como insectos, animales vertebrados e invertebrados y plantas (Mushegian et al. 2001; Zeidler et al. 2004). La respuesta inmune innata es una red compleja de rutas interconectadas con actividades que dependen de muchos factores, dentro de la respuesta inmune innata participan barreras mecánicas como la superficie de las mucosas, las lágrimas, el ácido gástrico, entre otras, cuya acción principal es proteger al hospedero de la entrada de sustancias y microorganismos foráneos (Roitt et al 2001).

Las células de la inmunidad juegan un papel importante (Figura 3), debido a que protegen al hospedero a través de diferentes mecanismos como la fagocitosis, la cual es definida como la ingestión por parte de las células de partículas mayores a 0.5- μm , ésta involucra la unión a receptores de la superficie celular. Los cuerpos foráneos que son fagocitados (bacterias, hongos, etc.) son eliminados; este proceso puede ser llevado a cabo por células fagocitas profesionales (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, etc.) y células fagocitos no profesionales (células epiteliales, fibroblastos, células epiteliales,

etc.). Es un proceso clave en la iniciación de la respuesta adaptativa, ya que los fagocitos profesionales pueden ser presentadoras de antígenos para las células linfoides derivados de la degradación de las partículas endocitadas (Flanagan et al. 2012; Striz et al. 2014). La comunicación entre las células de la inmunidad es mediada a través de moléculas como son las citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, entre otras (Dinarello, 2007; Commins et al. 2010; Hiscott et al. 2011).

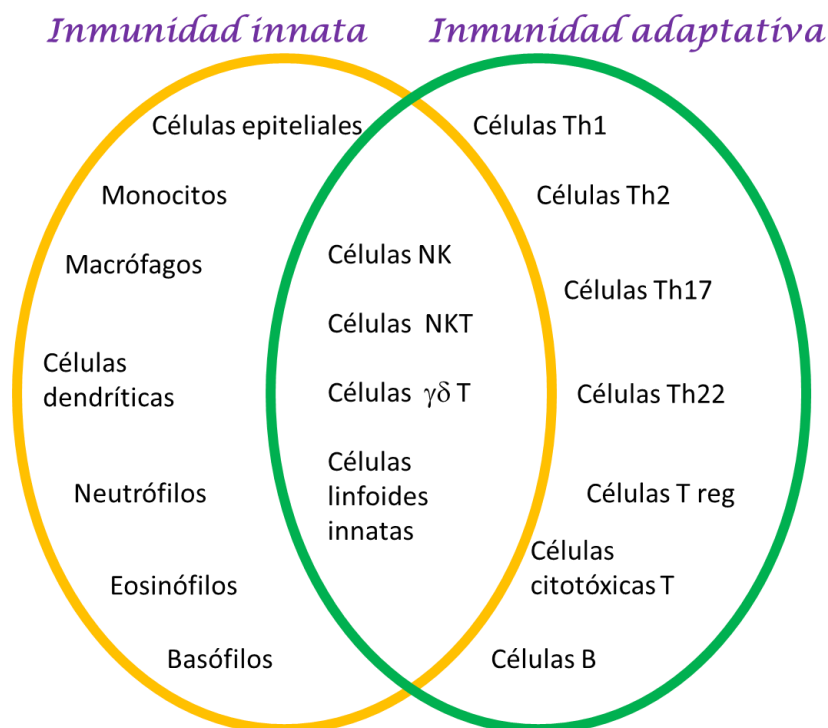


Figura 3. Células de la respuesta inmune. La inmunidad innata y la inmunidad adaptativa mantienen una relación muy estrecha, debido a que comparten características. Células NK (células asesinas naturales), células NKT (células asesinas naturales T), células $\gamma\delta$ T (Células T cuyo receptor de células T está formado por una cadena γ y una cadena δ), células Th1, Th2, Th17, Th9 y Th22 (la denominación de estos linfocitos “T” se debe a que su maduración tiene lugar en el Timo y “h” por “helper” que significa cooperadores, el número los distinguen los tipos de efectores, Células reg T (linfocitos T reguladores), las células B (leucocitos que se diferencian en el hígado, bazo y medula ósea; la “B” proviene del latín *Bursa fabricii*) (modificada de Striz et al. 2014).

Las citocinas son pequeñas moléculas (~4-20 KDa) no estructurales, el término “citocina” comprende interferones, interleucinas, la familia de las quimiocinas, factores de crecimiento mesenquimales, la familia de factores de necrosis tumoral y adipocinas.

Algunas citocinas poseen propiedades proinflamatorias mientras otras no (Dinarello, 2007).

Las quimiocinas son una familia de proteínas de tamaño pequeño (8-10 kDa) que actúan como quimioatrayentes, estas presentan residuos de cisteína conservados y en base al arreglo de éstos en el N-terminal se designan: CXC, CC, CX3X o XC, donde la "X" representa los aminoácidos que separan el primero del segundo residuo de cisteína respectivamente. Las quimiocinas participan también como mediadores entre la inflamación aguda y la inflamación crónica (Zlotnik et al. 2012).

Los péptidos antimicrobianos constituyen una gran familia de moléculas efectoras de la inmunidad, conservadas a través de un amplio rango de especies. El rango de tamaño se encuentra entre 15 y 45 residuos de aminoácidos, la mayoría son de naturaleza catiónica con regiones hidrofóbicas, están genéticamente codificados, aunque pueden sufrir modificaciones postranscripcionales, aunado a esto, la carga positiva es conferida por aminoácidos básicos en su mayoría lisina y arginina, además 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Rivas-Santiago et al. 2006).

Las defensinas son péptidos antimicrobianos que forman parte de la respuesta inmune innata, presentan actividad quimiotáctica y funcionan como vínculos entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Son pequeños péptidos catiónicos (2-6 kDa) y tienen actividad contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos y virus. Su estructura terciaria se caracteriza por presentar tres puentes disulfuro y basados en su posición espacial, las defensinas se pueden clasificar como α -, β -, θ - defensinas (Cormican et al. 2008; Linde et al. 2008).

2.3.2. Inflamación

En condiciones óptimas las células epiteliales regulan considerablemente los mecanismos inmunes amortiguando las respuestas inflamatorias. La inflamación es una respuesta protectora ante un daño, es normal y necesaria. El propósito principal, es eliminar la fuente causante del daño y el tejido dañado, restaurar la homeostasis y regresar los

tejidos a la función normal (Lawrence, et al. 2007). La respuesta inflamatoria inicia en minutos y generalmente se le denomina inflamación aguda; la respuesta se caracteriza por la extravasación de leucocitos, eritrocitos y componentes del plasma al tejido dañado, si la respuesta es la adecuada el problema se logra resolver en horas; sin embargo, si la eficacia de la respuesta no es la adecuada, la inflamación persiste durante semanas, meses o inclusive años, lo que conduce a la inflamación crónica, convirtiéndose en un problema para el organismo (Lawrence et al. 2007; Aoki et al. 2012; Newton et al. 2012).

El balance entre los mediadores pro y anti-inflamatorios es un punto clave en la resolución del daño (Figura 4). Las citocinas pro-inflamatorias tales como las interleucina-1 β (IL-1 β), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), son responsables de la respuesta temprana y la amplificación de la respuesta inflamatoria, mientras que las citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10), presentan un efecto opuesto, limitando la respuesta inflamatoria. La complicación de la respuesta inflamatoria es resultado de tiempos de recuperación prolongados, fallas en el balance de elementos pro y antiinflamatorios, que conducen a respuestas proinflamatorias excesivas, además este proceso se vuelve más complicado al tomar en cuenta otros elementos directamente relacionados en la respuesta como son las quimiocinas, los mediadores lipídicos (eicosanoides), histaminas, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, el sistema del complemento, por mencionar algunos, muchos de los cuales funcionan como puentes entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, afectando la regulación entre la inmunidad y la inflamación, conduciendo a la disfunción orgánica (Tilley et al. 2001; Lawrence 2007; Xiao et al. 2011; Newton et al. 2012; Striz et al. 2014).

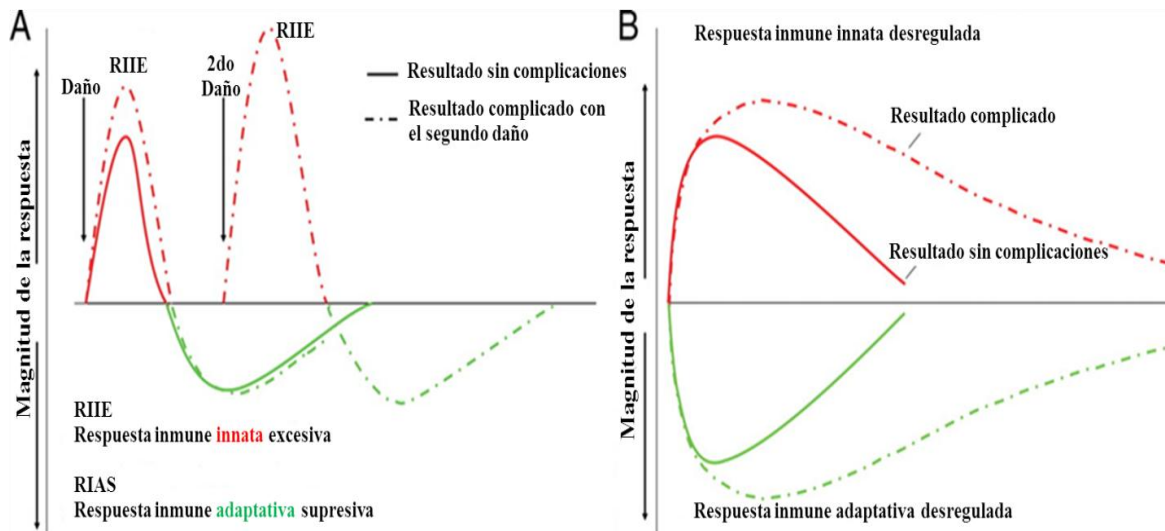


Figura 4. Paradigma de la respuesta inmune e inflamatoria en el daño. (A) El presente paradigma explica las complicaciones de lesiones graves como resultado de las respuestas proinflamatorias excesivas (RIIE), seguida de la compensación de respuestas antiinflamatorias temporales (RIAS) y la supresión de la inmunidad innata adaptativa. Durante la segunda lesión, el fenómeno resulta en daños secuenciales, que conducen a respuestas proinflamatorias excesivas y el fallo en la función del órgano. (B) El nuevo paradigma propuesto involucra una inducción rápida y simultánea de la respuesta inmune innata (genes pro y antiinflamatorios) y la supresión de genes de la inmunidad adaptativa (Xiao et al. 2011).

2.4. RESPUESTA INMUNE INNATA DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA GENERADA POR *S. aureus*

El sistema inmune de la glándula mamaria bovina consiste de factores físicos, celulares y moleculares que participan dentro de la inmunidad innata y adaptativa. El epitelio mamario bovino es un componente importante de la respuesta inmune innata; en diferentes trabajos *in vitro* se ha observado que las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) tienen la capacidad de montar una respuesta inmune innata adecuada ante el estímulo de componentes bacterianos, como el lipopolisácarido (LPS) de bacterias Gram negativas y el ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Strandberg et al. 2005; Lutzow et al. 2008; Aitken et al. 2011). Además, las células endoteliales son claves en la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria; esto debido a las características anatómicas de la glándula, en donde los capilares sanguíneos forman una red alrededor de los alveolos, formando un sitio de intercambio de metabolitos

(nutrientes y hormonas) importantes en la síntesis de la leche; además, el sistema vascular de la glándula mamaria participa en la respuesta inflamatoria en infecciones, debido a que las células endoteliales responden a estímulos relacionados a células de la glándula mamaria, toxinas bacterianas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Langer et al. 2009; Sinha et. 2010; Lee et al. 2011). Sin embargo, las células epiteliales son las primeras en reconocer los patógenos y desencadenar una respuesta inflamatoria. La barrera epitelial de la glándula mamaria se asemeja más al epitelio urinario que al intestinal debido al equipamiento inmune de la glándula mamaria, tales como la presencia de leucocitos sub e intra-epiteliales, y el repertorio de receptores en las células epiteliales mamarias que son estimulados por componentes bacterianos, que son reconocidos como intrusos, lo cual confiere el carácter aséptico en la leche normal; por ello, los cultivo *in vitro* de células epiteliales mamarias bovinas, son muy utilizados como modelos para el estudio de la fisiología de la glándula mamaria, la producción de proteínas y por la capacidad que presentan estas células para censar los microorganismos, son muy utilizadas para estudio de la mastitis bovina (Schleimer et al. 2007; Bougarn et al. 2011; Monzani et al. 2011).

La interacción hospedero-patógeno es a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores son expresados en la superficie celular, o expresados intracelularmente y funcionan reconociendo motivos conservados únicos en microorganismos, que son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos PAMPs diferencian factores bacterianos asociados con bacterias causantes de mastitis (Vance et al. 2009). La activación de los PRR por parte de los PAMPs inicia la producción de moléculas mediadoras de la inflamación, entre ellas las citocinas, las cuales incrementan la vasodilatación que mejora el flujo sanguíneo. A nivel local, las citocinas y los eicosanoides desencadenan la migración de los neutrófilos de la sangre a la glándula mamaria infectada, activando las células endoteliales para expresar E-selectina y P-selectina, que permiten que los neutrófilos se unan eficientemente, esta estimulación promueve la expresión de otras moléculas de adhesión (Mac-1 (moléculas de adhesión celular) e ICAM1 (moléculas de adhesión intercelular). El movimiento de los neutrófilos y

leucocitos es facilitado por gradientes quimiotácticos creados por mediadores inflamatorios localizados en el sitio del daño (Vance et al. 2009; Aitken et al. 2011; Newton et al. 2012) (Figura 5).

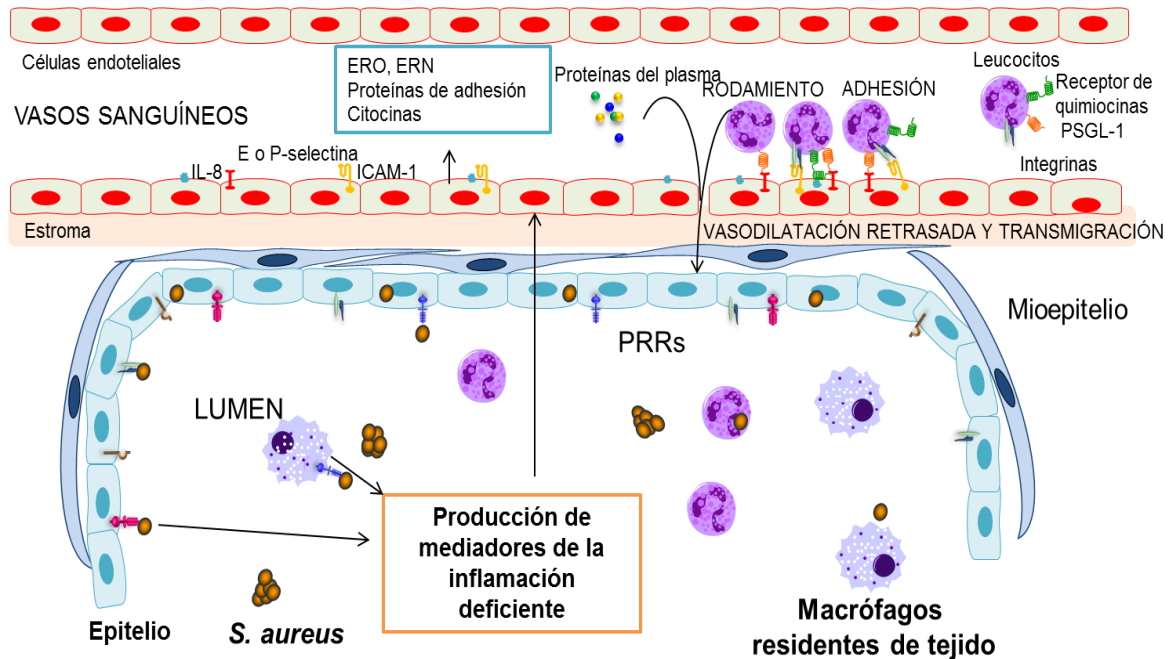


Figura 5. Respuesta inflamatoria de la glándula mamaria generada por *Staphylococcus aureus*. La respuesta de la glándula mamaria ante la invasión de *S. aureus*, se lleva a cabo por el reconocimiento de la bacteria a través de RRP, que se encuentran distribuidos en la membrana de las CEMB y en macrófagos residentes del tejido, esto conduce a una sobreproducción de mediadores proinflamatorios, como TNF- α , quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN), los cuales actúan como factores quimioatrayentes de células de la respuesta inmune. Estos factores proinflamatorios activan las células endoteliales, para que ocurra la adhesión, el rodamiento y la extravasación de neutrófilos, leucocitos y otros fagocitos profesionales al sitio del daño y ocurra la eliminación del patógeno; sin embargo, *S. aureus* se internaliza dentro de las CEMB como mecanismo de evasión de la respuesta inmune ocasionando infecciones crónicas (Modificado de Aitken et al. 2011).

En las células de la respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina, en especial en las CEMB, se expresan una gran cantidad de receptores tipo Toll (TLR), los cuales forman parte de los PRR. La estructura de los TLR consiste de motivos repetidos ricos en leucina que reconocen el PAMP, un dominio transmembranal, y un dominio intracelular interleucina Toll 1 (TIR) para la señalización río abajo. Los TLR reclutan moléculas adaptadoras incluyendo MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM, para la activación del factor transcripcional NF- κ B, el cual en células no estimuladas su translocación nuclear

esta constitutivamente inhibida por I κ B. La activación requiere la fosforilación de I κ B por la I κ B cinasa (IKK), una vez fosforilado I κ B es ubiquitinado y degradado, permitiendo la translocación nuclear de NF- κ B y la consecuente producción de citocinas y mediadores de la RII (Kumar et al. 2011; Newton et al. 2012) (Figura 6).

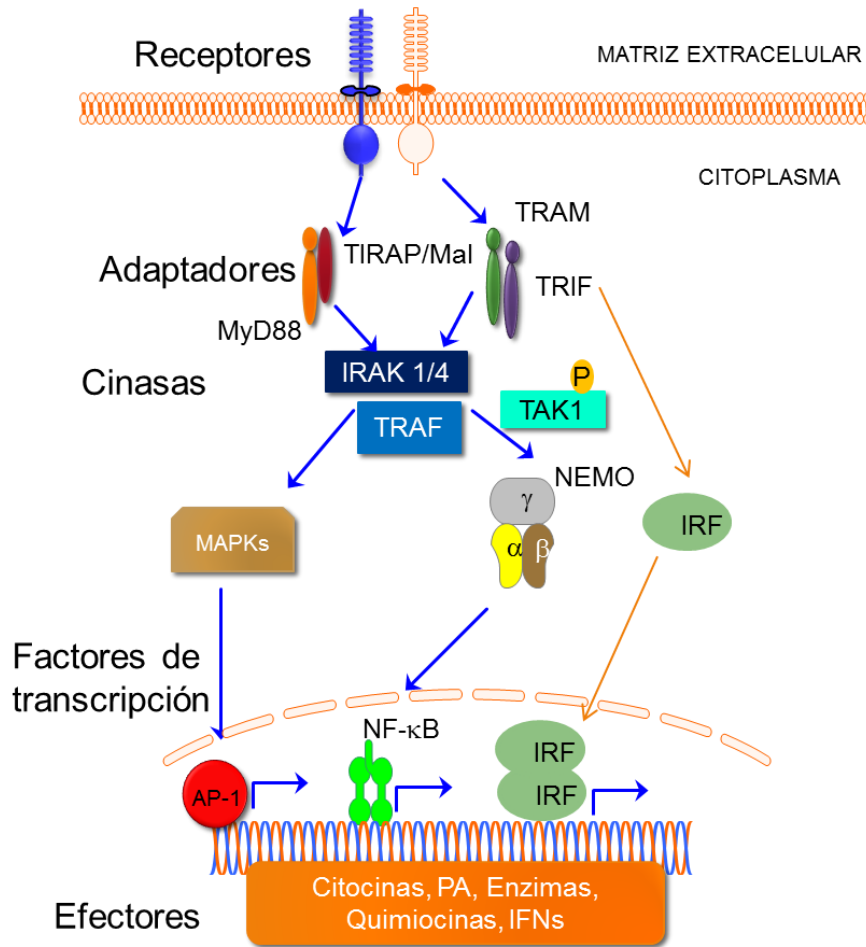


Figura 6. Señalización mediada por los TLR. El reconocimiento de los PAMPs por la membrana de la CEMB es a través de receptores localizados en ella como los receptores tipo-Toll (TLR), los cuales pueden formar dímeros y heterodímeros (TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6, formando un complejo multifuncional). Todos los TLRs, excepto el TLR3, reclutan a MyD88. Los TLRs 1, 2, 4 y 6, reclutan moléculas adaptadoras adicionales, como TIRAP, que reclutan a MyD88. También se ha visto que la molécula adaptadora TRAM activa la señalización dependiente de TRIF, la cascada de señalización dependiente de MyD88 inicia el reclutamiento de moléculas de señalización, como la familia de las proteínas IRAK, TRAF6 y TAK. El complejo MyD88-IRAK engancha la ubiquitin ligasa TRAF, que hace poliubiquitinaciones en la cadena del complejo IKK y lo activa. La activación del complejo IKK activa las subunidades del factor de transcripción NF- κ B, para dar inicio a la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria (Modificado de Kumar et al. 2011; Newton et al. 2012).

Estudios *in vitro* muestran que las CEMB son capaces de sintetizar diversas moléculas mediadoras de la respuesta inmune innata como citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Rainard et al. 2006; Aitken, 2011) (Cuadro 1). Sin embargo, *S. aureus* logra inhibir la activación de NF- κ B, modulando negativamente la RII de la CEMB (Dego, 2002; Gútierrez-Barroso et al. 2008).

Cuadro 1. Elementos de la repuesta inmune innata que participan en la mastitis bovina

FACTOR	NATURALEZA	FUNCIÓN	REFERENCIA
TNF-α	Citocina pro-inflamatoria	Aumenta la regulación de múltiples proteínas proinflamatorias mediante la activación de NF- κ B	Yang et al. 2008
IFN-γ	Citocina producida por linfocitos CD4 ⁺ /CD8 ⁺ y células asesinas naturales (NK)	Es producida en respuesta a estímulos antigénicos y mitogénicos. Activa la respuesta inmune adquirida, linfocitos T y producción de IL-12	Kim et al. 2011
IL-1α; IL-1β	Citocina pro-inflamatoria multifuncional	Regula la expresión de adhesinas por células endoteliales y la quimiotaxis de neutrófilos en infecciones causadas por <i>E. coli</i> . En infecciones causadas por <i>S. aureus</i> es importante solo en los estadios tempranos de la infección	Gunter et al. 2011; Zhan et al. 2013
IL-6	Citocina pleiotrópica	Regula funciones fisiológicas de células inmunes y no inmunes. Está involucrada en el síndrome de choque séptico durante la mastitis causada por coliformes o <i>S. aureus</i>	Gunter et al. 2011
IL-2	Citocina proinflamatoria	Promueve el crecimiento de células T, aumenta la actividad citolítica de las células NK, induce la diferenciación de células reguladoras T e induce la activación de la muerte celular. Alteraciones en la producción de IL-2 causan una disminución de la capacidad de la respuesta inmune de la glándula mamaria que contribuye en enfermedades como la mastitis	Zecconi et al. 2009
IL-10	Citocina anti-inflamatoria	Ejerce efectos antiinflamatorios. Es regulada por todos los subtipos de células Th. Neutraliza las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-6 y TNF- α , previniendo el choque séptico de bacterias Gram negativas. Se expresa en CEMB en presencia de <i>S. aureus</i>	Alva-Murillo et al. 2014

Cuadro 1(Cont.). Elementos de la respuesta inmune innata que participan en la mastitis bovina.

FACTOR	NATURALEZA	FUNCIÓN	REFERENCIA
IL-8	Quimiocina pro-inflamatoria	Importante quimioatrayente de neutrófilos enfocándolos al sitio de infección, resultando en un paso esencial en la defensa de la glándula mamaria contra bacterias invasoras	Yang et al. 2008
RANTES	Quimiocina pro-inflamatoria	Participa en la respuesta a la mastitis atrayendo neutrófilos al sitio del daño, es expresada en niveles altos en presencia de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Se expresa en cultivo primario de CEMB infectadas con <i>S. aureus</i> .	Griesbeck-Zilch et al. 2008; Alva-Murillo et al. 2014
CCL2	Quimiocina pro-inflamatoria	Fuerte actividad quimiotáctica, en la mastitis se ha asociado con el incremento en el conteo de SCC	Strandberg et al. 2005
CXCL6	Quimiocina pro-inflamatoria	Actividad quimiotáctica de monocitos y neutrófilos, es expresada en presencia de LPS y LTA	Strandberg et al. 2005
TAP	Péptido antimicrobiano	Es expresado en las CEMB, el factor transcripcional NF- κ B está involucrado en la ruta de regulación, la expresión disminuye ante la infección con <i>S. aureus</i>	López-Meza et al. 2009
LAP	Péptido antimicrobiano	Juega un papel importante en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina. Incrementa su expresión (~1.5 veces) ante la infección con <i>S. aureus</i>	Swanson et al. 2004; Alva-Murillo et al. 2012
DEFB1, BNBD5, BNBD10	Péptido antimicrobiano	Se expresa en las CEMB, se mantiene la expresión basal ante la infección con <i>S. aureus</i>	Swanson et al. 2004; Alva-Murillo et al. 2012; Alva-Murillo et al. 2013
BNBD4	Péptido antimicrobiano	Mantiene una expresión basal en las CEMB; sin embargo, ante la infección con <i>S. aureus</i> incrementa su expresión (~8 veces)	Alva-Murillo et al. 2013

* En negritas se abrevian los elementos de la RII. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); Interferón gama (IFN- γ); Interleucina 1-alfa (IL-1 α); Interleucina 1-beta (IL-1 β); Interleucina 6 (IL-6); Interleucina 2 (IL-2); Interleucina 10 (IL-10); Interleucina 8 (IL-8), Regulador de la activación de las células T normales, expresadas y secretadas (RANTES); Quimiocina motivo cisteína-cisteína ligando 2 (CCL2); Quimiocina motivo cisteína-X-cisteína ligando 6 (CXCL6); Péptido antimicrobiano traqueal (TAP); Péptido antimicrobiano lingual (LAP); Defensina bovina-1 (DEFB1); Defensina de neutrófilo bovino-5 (BNBD5), Defensina de neutrófilo bovino-10 (BNBD10); Defensina de neutrófilo bovino-4 (BNBD4).

Durante la mastitis bovina crónica el receptor que más se ha descrito en el reconocimiento de *S. aureus* es el TLR2, el cual reconoce el LTA característico de las bacterias Gram positivas, desencadenando la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Sin embargo, también se ha descrito que otras moléculas como el muramil

dipéptido (MDP), constituyente de la pared de bacterias Gram positivas y Gram negativas, actuando solo o en sinergismo con el LTA, son reconocidos por el receptor TLR2 y el receptor domino de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (por sus siglas en ingles NOD2), induciendo la respuesta inmune a través de la producción de quimiocinas dependientes de la activación de NF- κ B (Bougarn et al. 2010).

2.5. INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

El mecanismo de internalización de *S. aureus* más descrito en células fagocitos no profesionales es el mecanismo tipo “Zipper”; el cual consiste de la adhesión e internalización de la bacteria y es dependiente de la remodelación del citoesqueleto de actina y la dinámica de la membrana (Hauck et al. 2006). De manera general el mecanismo es el siguiente: *S. aureus* expresa proteínas de unión a fibronectina (FnBP) que son codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*. Las FnBP se unen a la fibronectina (Fn), la cual es una glicoproteína de la matriz extracelular, la unión provoca la adhesión de la bacteria a la célula, este proceso es mediado por receptores presentes en la membrana de la célula, como son las integrinas, las cuales son receptores transmembranales que reconocen ligandos como la Fn, fibrinógeno, vitronectina y laminina. Las integrinas además participan en diferentes procesos como la adhesión celular, migración, diferenciación, apoptosis, fagocitosis, cicatrización y cáncer. Reportes recientes mencionan que la participación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ es crucial en la invasión de *S. aureus* en las células epiteliales. La activación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ desencadena rutas de señalización y la acumulación del complejo de proteínas de adhesión focal, caracterizado por el reclutamiento de actina, paxilina, zyxina, tensina, la cinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa Src, estas últimas se asocian con el complejo de proteínas relacionadas con la actina (Arp2/3) para promover la polimerización de actina y la unión a la dinamina-2, que es un regulador de la endocitosis (Hauck et al. 2006; Shi et al. 2008; Hoffmann et al. 2011; Alva-Murillo et al. 2014) (Figura 7). Sin embargo se ha reportado que *S. aureus* puede utilizar otros mecanismos de internalización, aunque no se han descrito completamente (Alva-Murillo et al. 2014).

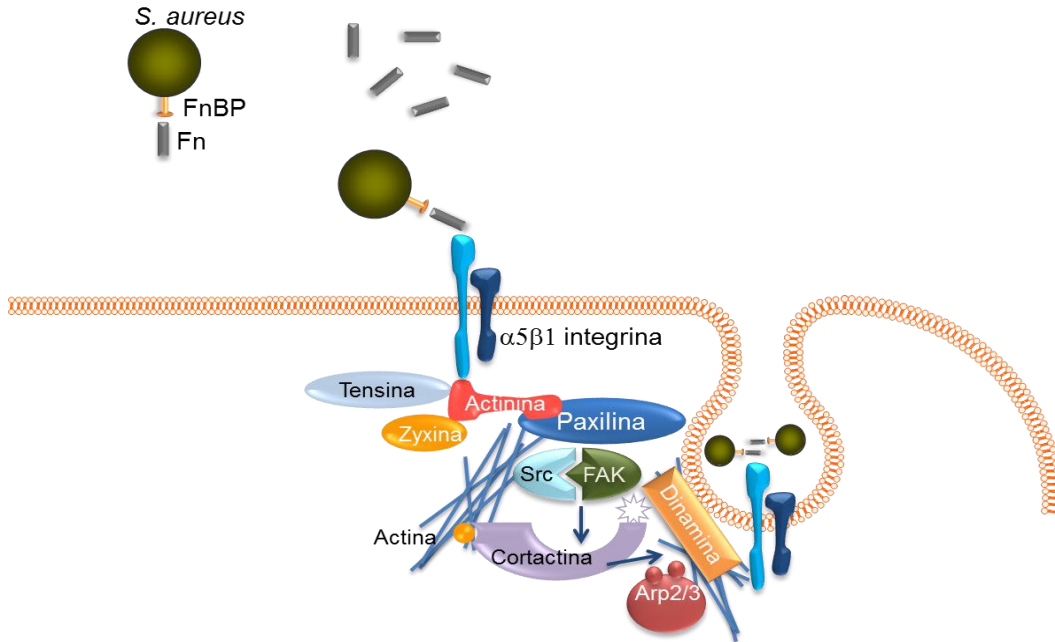


Figura 7. Internalización de *Staphylococcus aureus* mediada por la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en células fagocíticas no profesionales. El motivo RGD en la fibronectina (Fn) es un sitio de unión para los receptores de fibronectina, como las integrinas. La activación y agrupamiento de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ desencadena rutas de señalización y la acumulación del complejo de proteínas de adhesión, en las inmediaciones de la bacteria adherida, caracterizado por el reclutamiento de actina, paxilina, zyxina, tensina, cinasa de adhesión focal (FAK), y la cinasa Src. El paso crucial en estos eventos de señalización es la reorganización del citoesqueleto de actina. La cortactina es una proteína de unión a actina que ha sido identificada como uno de los efectores de activación de las cinasas FAK y Src, que se asocian con el complejo Arp2/3 para promover la polimerización de actina y unirse a dynamina-2, como un regulador de la endocitosis (Alva-Murillo et al. 2014).

Una vez que la bacteria logra internalizarse en la célula puede evadir la muerte lisosomal por diferentes mecanismos, ya dentro del fagosoma logra liberarse formando poros en la membrana del fagosoma y romperlo, liberándose de él con la participación de la δ -toxina estafilocócica, quedando libre en el citoplasma de la célula. Además, *S. aureus* induce mecanismos de muerte celular y pironecrosis, provoca alteraciones en el ciclo celular del hospedero, induciendo la transición a la fase G2, que puede ser usada por la bacteria para su propagación dentro del hospedero; además, la persistencia en la mastitis bovina se ha asociado con la formación del fenotipo de variantes de colonias pequeñas (SCV), como una adaptación a la forma de vida intracelular (Atalla et al. 2010; Garzoni et al. 2011; Fraunholz et al. 2012; Alekseeva et al. 2013).

2.6. CONTROL DE LA MASTITIS BOVINA

S. aureus es el principal patógeno causante de la mastitis subclínica, genera resistencia a antibióticos, logra internalizarse dentro de la glándula mamaria bovina, evade la RII y además se internaliza en las CEMB, logrando persistir durante largos periodos de tiempo ocasionando infecciones crónicas difíciles de tratar.

Los antibióticos son extensamente usados en la ganadería lechera para combatir enfermedades y mejorar el desempeño del animal. Antibióticos como la penicilina, cefalosporina, estreptomicina y tetraciclina son usados para el tratamiento y prevención de enfermedades como la mastitis que afectan al ganado lechero (Gruet et al. 2001). Sin embargo, en la mastitis subclínica esta clase de tratamientos no son redituables económicamente, además se requiere del uso rutinario de antimicrobianos lo que puede seleccionar bacterias resistentes. Asimismo, se ha reportado que los tratamientos presentan bajas tasas de éxito en general, aunque este depende de la estrategia de administración, de la edad de la vaca, la bacteria y si se trata de mastitis crónica. En el caso de la mastitis crónica el pronóstico del éxito del tratamiento es relativamente bajo (Sandgren et al. 2008; De Vlieghe et al. 2012).

Otros tratamientos que presentan mayores tasas de éxito, es la combinación de la terapia antimicrobiana con la terapia antiinflamatoria, como es la flunixinameglumina, el piroxicam, el ketoprofeno, entre otros. Sin embargo, su uso es incierto debido a los efectos secundarios que se presentan (Gwynn, 1991; Griedrys-Kalemba et al. 1992). Dentro de las nuevas estrategias de tratamiento se ha recurrido al uso de compuestos inmunomodulares, como son las vitaminas, el interferón y las citocinas, las cuales en modelos experimentales han presentado resultados prometedores, tal es el caso de las interleucinas IL-1 β y la IL-2, mejorando la respuesta cuando se administran con antibióticos como la cefalosporina; sin embargo, a pesar de estos resultados se requiere seguir investigando debido a los potenciales efectos secundarios, ya que la administración de IL-2 se ha relacionado con abortos (Erskine et al. 1998; Gruet et al. 2001; Zecconi et al. 2009).

2.6.1. Compuestos inmunomoduladores de origen vegetal

En la búsqueda de tratamientos contra la mastitis bovina se ha recurrido a los metabolitos de las plantas. Con la medicina tradicional se conocen muchos remedios cuyo efecto en enfermedades infecciosas ha sido probado, y no solo porque afectan directamente al patógeno, si no por que estimulan de manera natural la respuesta inmune del hospedero, actuando como inmunomoduladores (Shukla et al. 2014). Dentro de las ventajas de la búsqueda de sustancias basadas en la etnofarmacología, está el bajo nivel de toxicidad y una mayor eficacia.

En la literatura hay una amplia variedad de extractos de origen vegetal que han sido propuestos como posibles alternativas en el tratamiento de la mastitis bovina subclínica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Extractos de plantas utilizados como tratamientos alternativos para la mastitis bovina.

Planta	Fuente	Efecto	Referencia
<i>Tymus vulgaris</i>	Aceite	Actividad antibacteriana contra patógenos causantes de mastitis	Fratini et al. 2014
<i>Ocimum sanctum</i>	Extracto acuoso de la hoja	Mejora la inmunidad de la glándula mamaria, posee actividad antibacteriana	Mukherjee et al. 2005
<i>Persicaria senegalense</i>	Extracto de éter de petróleo, acetona y etanol de la hoja	Actividad antimicrobiana	Abaineh et al. 2001
<i>Aloe vera</i>	Emulsión	Actividad antimicrobiana	Dahiya et al. 2012
<i>Azadirachta indica</i>	Extracto hidro-metanólico	Actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria	De et al. 2009

Algunos de los ejemplos mencionados en el cuadro 2 se han utilizado en granjas lecheras orgánicas como alternativas al uso de antibióticos (Ruegg, 2009); sin embargo, aún se desconocen cuáles son los compuestos activos responsables del efecto.

Existen muchas otras plantas de las cuales se ha reportado que presentan propiedades inmunomoduladoras debido a que son ricas en metabolitos secundarios, como los flavonoides que aceleran la fagocitosis por macrófagos modulando la respuesta inmune celular y actividad antiinflamatoria, los terpenos con actividad antiespasmódica, alcaloides que presentan múltiples actividades inmunomoduladoras, péptidos antimicrobianos de plantas, glicoproteínas (lectinas), fenoles y algunos del metabolismo primario como carbohidratos y ácidos grasos (Sánchez et al. 2002; González-Gallego et al. 2010; Mathur et al. 2011).

2.7. ÁCIDOS GRASOS DE AGUACATE Y COMPUESTOS DERIVADOS

2.7.1 Propiedades medicinales del aguacate

Entre las plantas con propiedades inmunomoduladoras se encuentra el aguacate. El aguacate pertenece a la familia de las lauráceas, es nativo de México y de áreas tropicales húmedas (Sánchez-Pérez, 1999). Dentro de las diferentes variedades, cultivares e híbridos de aguacate, el aguacate nativo de México (*Persea americana* var. *drymifolia*) se utiliza para tratar varias afecciones en la salud del ser humano (Bello-González, 2006; Rincón-Hernández et al. 2011). Se le han atribuido desde la época prehispánica diversas propiedades medicinales, tales como emenagogo (fruto), cicatrizante (pulpa de fruto), para infecciones e inflamaciones de la piel (hojas), así como para enfermedades intestinales (hojas). Además, el aceite de la semilla se usa desde hace siglos para el tratamiento del cabello reseco y otros males; también como ungüento para aliviar el dolor y suavizar la piel de las zonas lastimadas (Ramos-Jerz, 2007).

En años recientes la investigación se ha centrado en diversas variedades con fines de estudiar sus efectos medicinales. Se ha reportado que azúcares presentes en aguacate, como la manoheptulosa y el perseitol, pueden inducir la producción de β -defensinas en humanos (HBD-2) y modular la respuesta proinflamatoria inducida por el LPS, además, de regular la invasión de la levadura *Malassezia furfur* en cultivos de queratinocitos (células de la epidermis) humanos (Paoletti et al. 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que una mezcla de aceite de aguacate y soya (ASU, Avocado-Soybean Unsaponificables) es

exitosa como tratamiento de la osteoartritis, debido a que contrarresta el proceso de deterioro relacionado con la inflamación, inhibiendo la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la producción de prostaglandinas (Gabay et al. 2008; Heinecke et al. 2010), ofreciendo una alternativa al uso de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos.

2.7.2. Propiedades de la semilla de aguacate

La semilla de aguacate representa cerca del 16% del peso total del fruto, además de poseer un perfil rico en fitoquímicos. En la mayoría de los cultivares, la semilla de aguacate posee un alto contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, y una cantidad superior de proantocianinas, comparado con la pulpa (mesocarpo) y la piel (exocarpo). También es una fuente de ácidos grasos y de moléculas lipídicas derivadas de éstos (Dabas et al. 2013; Ramos-Jerz et al. 2013). Por lo anterior, se considera que la semilla de aguacate presenta un potencial de compuestos bioactivos y se ha evaluado su participación en diversas actividades biológicas, algunas de éstas se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Efectos biológicos de extractos y compuestos de semillas de aguacate.

Efecto	Modelo	Extracto/ dosis	Efecto principal	Referencia
Anticancerígeno	MDA-MB-231 células de cáncer de mama	Extracto metanólico a concentraciones mayores a 100 µg/ml	Inducción de la apoptosis medida por el incremento de la caspasa-3, caspasa-7 y poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP) de escisión	Lee et al. 2008
Antiinflamatorio	Secreción de PLA ₂	Poliolios lipídicos	Actividad inhibitoria de PLA ₂	Etozioni, 2003
	Queratinocitos <i>in vitro</i>	PFA aislados de la pulpa y semilla	Disminución de mediadores proinflamatorios IL-6, PGE ₂ y dímeros de pirimidina ciclobutano después de la radiación con UVB	Rosenblat et al. 2010
Antidiabético	Ratas diabéticas inducidas con aloxan	450 y 900 mg/kg de (peso corporal) de extracto de semilla tratamiento por 14 días	Reduce los niveles de glucosa en sangre de 47-55%. Restauración en islotes pancreáticos	Edem, 2009
Antihipertensivo	NaCl ratas hipertensivas	200.700 mg/kg (peso corporal) de extracto de semilla acuoso por 5 semanas	Reduce los niveles en sangre dosis dependiente, presión, colesterol, glucosa, urea y los niveles de sodio	Kate y Lucky, 2009
Hipo-colesterolémico	Ratón	125, 250 y 500 mg ASF/kg pc semilla de aguacate seca ("harina") por 6 días	Reducción significativa en TC y LDL-C	Pahua-Ramos et al. 2012

Cuadro 3 (Cont.). Efectos biológicos de extractos y compuestos de semillas de aguacate

Efecto	Modelo	Extracto/ dosis	Efecto principal	Referencia
Usos dermatológicos	Queratinocitos <i>in vitro</i>	Concentraciones ≤ 5 µg/mL de PFA derivados de extracto hexánico de semilla	Incrementa la viabilidad celular; reducción en el número de células con quemaduras solares después de irradiadas; mejora la reparación del DNA	Rosenblat et al. 2010
	Queratinocitos <i>in vitro</i>	10 µg/mL de extracto de semilla agua-acetato de etilo y HSCCC	Proliferación y viabilidad celular	Ramos-Jerz et al. 2007
Antimicrobianos	Bacterias Gram positivas y Gram negativas <i>in vitro</i>	125-250 µg/mL extracto etanólico de semilla	Efectos antimicrobianos mostrados contra <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i>	Raymond et al. 2010
Insecticida	<i>Aedes aegypti</i>	16.7 mg/mL extracto hexánico de semilla; 8.9 mg/mL extracto metanólico	LC ₅₀ contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> (Vector de la fiebre amarilla)	Leite et al. 2009
Tóxico	Ratón	1767 mg/kg peso corporal	Determinado por DL ₅₀	Ramos et al. 2012

Modificado de Dabas et al. 2013.

Desde el punto de vista nutricional el aguacate es una gran fuente de energía por su alto valor calórico, ya que contiene altas cantidades de aceite y en especial el aceite de la semilla, es rico en moléculas lipídicas y ácidos grasos insaturados muchos de los cuales son ácidos grasos esenciales (Bora et al. 2001; Ding et al. 2007).

2.7.3. Ácidos grasos y derivados de ácidos grasos de semilla de aguacate

Los ácidos grasos son elementos claves en todas las células debido a que son una fuente importante de energía y que son componentes estructurales de las membranas celulares; además de llevar a cabo funciones de señalización y reguladores de la expresión de genes (Kachroo et al. 2009). En mamíferos algunos ácidos grasos de cadena larga son precursores para la síntesis de mediadores bioactivos, como prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas y resolvinas, además se ha reportado que los ácidos grasos modifican las actividades y respuesta de células del sistema inmune (Yakoob et al. 2007; Singer et al. 2008; Calder, 2013).

Los ácidos grasos que se han reportado en la semilla de aguacate en mayor proporción son el ácido hexadecanoico (C16:0), el ácido heptadecanoico (C17:0), el ácido

docosanoico (C22:0), el ácido tetracosanoico (C24:0), los ácidos grasos monoinsaturados, ácido 9-hexadecenoico (C18:1) y el ácido 9-octadecenoico (C18:1), además de los ácidos grasos poliinsaturados ácido 9,12-ostadecadienoico (C18:2), el ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3) y el ácido 11,14,17-eicosatrienoico (C20:3); aunque las proporciones varían dependiendo de la variedad de aguacate y el estado de madurez del fruto (Bora et al. 2001) .

Dentro de los derivados de ácidos grasos (DAG) con propiedades inmunomoduladoras presentes en el aguacate se han descrito dos grupos principales: 1) Los alcoholes grasos polihidroxilados (PFA); y 2) las acetogeninas alifáticas, estas últimas son derivadas del metabolismo secundario de plantas de la familia Annonaceae y Lauraceae (Rodríguez-Saona et al. 2001). La característica principal de esta clase de compuestos es una estructura química formada por una cadena alifática R larga de 11-19 carbonos o de 13-17 carbonos, acetilada o etilénica y con varios grupos hidroxilados unidos a ella y en algunos casos insaturaciones o grupos lactonas a lo largo de la cadena (Chávez et al. 1998). Hasta ahora no se ha reportado el papel que desempeñan en la planta, aunque quizás pueden estar jugando un papel junto con los alcoholes grasos.

Las acetogeninas alifáticas presentan propiedades citotóxicas contra diferentes líneas celulares cancerosas. Se reportó que la mezcla de acetogeninas alifáticas inhiben la fosforilación de las cinasas c-RAF y ERK1/2 en células de cáncer oral humano bloqueando la proliferación (D'Ambrosio et al. 2011). También, las persenonas A y B inhibieron la generación de superóxido (O₂) y óxido nítrico (NO) en la línea celular RAW 264.7 y HL-60 (Kim et al. 2000). Asimismo, extractos liposolubles de tallo y hojas de aguacate mexicano presentaron citotoxicidad sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, debido a la actividad de la persina (Valdez-Partida et al. 2011). Por otro lado, los PFA se probaron en células de queratinocitos humanos dañadas por exposición a luz UV y se observó que ejercen un efecto protector y antiinflamatorio ya que disminuyó la secreción de IL-6 y PGE₂ (prostaglandina) (Rosenblat et al. 2011); sin embargo, se desconoce el efecto inmunomodulador en un modelo infeccioso.

2.8. Antecedentes Directos

Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha reportado que el tratamiento profiláctico con moléculas de naturaleza lipídica, como el colecalciferol (vitamina D), ácidos grasos de cadena corta (propiónico, hexanoico y butírico) y el ácido graso de cadena media octanoato, inhiben preferencialmente la internalización de *S. aureus* en la CEMB y modulan diferencialmente la expresión de elementos de la RII (Ochoa-Zarzosa et al. 2009; Téllez-Pérez et al. 2012; Alva-Murillo et al. 2012; Alva-Murillo et al. 2013; Alva-Murillo et al. 2014). En este sentido, la vitamina D (1 - 200 nM) disminuyó la internalización de *S. aureus* (15-74%) en las CMEB e indujo un incremento en la expresión del péptido antimicrobiano BNBD10 (Téllez-Pérez et al. 2012). También se demostró que el propionato y el hexanoato de sodio (0.25-0.5 μ M) reducen la internalización de *S. aureus* hasta un 55 y 65%, respectivamente; asimismo, modularon la expresión del mRNA de diversos péptidos antimicrobianos (Alva-Murillo et al. 2012). Un resultado similar se obtuvo con el butirato de sodio, el cual inhibió la internalización en un 50% (Ochoa-Zarzosa et al. 2009); mientras que, el octanoato de sodio moduló diferencialmente la internalización dependiente de la concentración (Alva-Murillo et al. 2013). Sin embargo, se desconoce el efecto que presentan los ácidos grasos de cadena larga u otras moléculas de naturaleza lipídica en este modelo de interacción patógeno-hospedero.

Por lo anterior, en esta investigación se evaluó el efecto inmunomodulador de los AG y DAG de aguacate en el modelo de interacción CEMB – *S. aureus* que los podría colocar como una opción para el tratamiento de infecciones crónicas, como la mastitis bovina subclínica.

3. HIPÓTESIS

Los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados regulan diferencialmente la expresión de elementos de la inmunidad innata, que conduce a una disminución de la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas.

4. OBJETIVOS

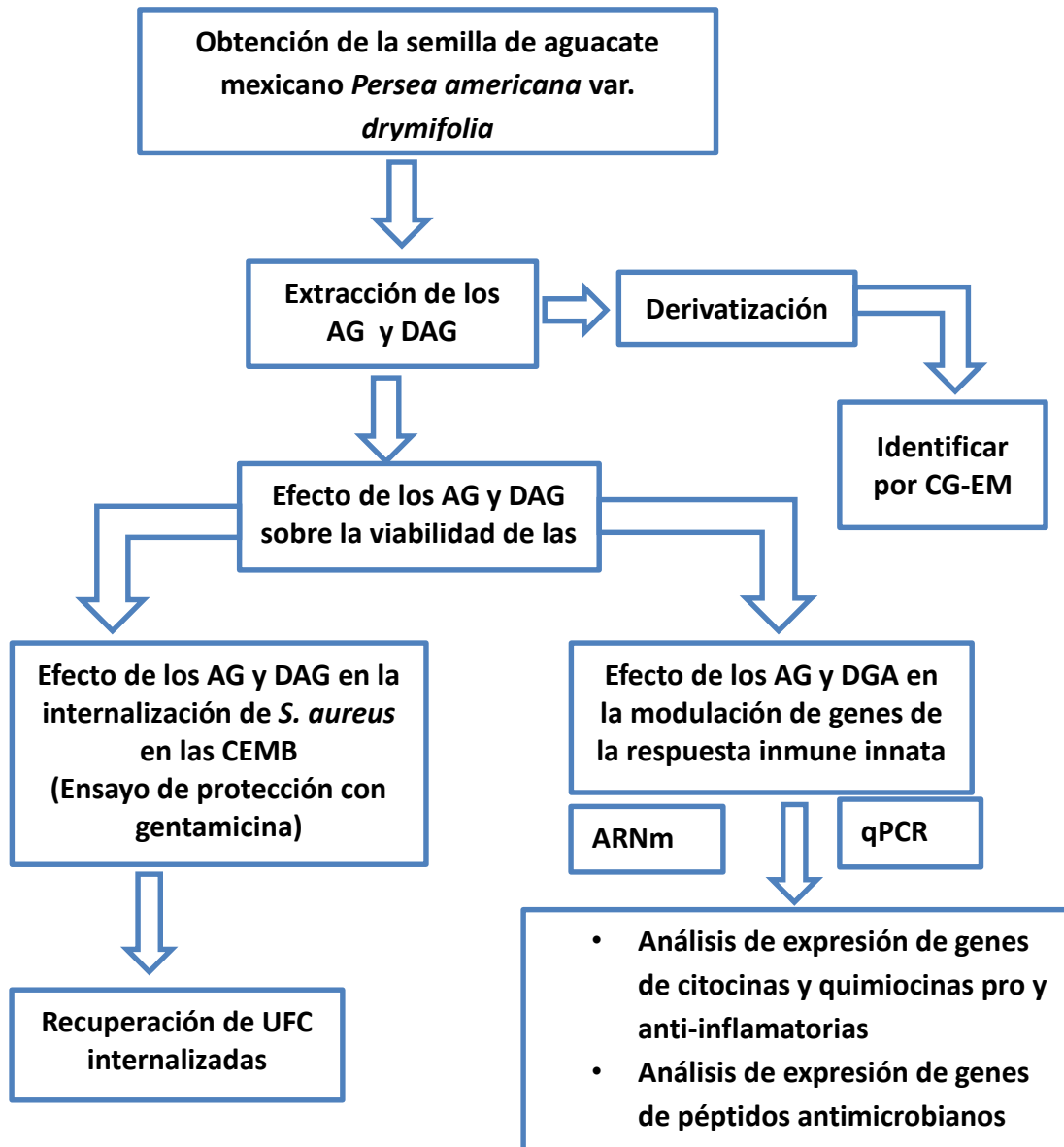
4.1. Objetivo general

Analizar el efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la expresión de elementos de la inmunidad innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células de epitelio mamario bovino.

4.2. Objetivos específicos

- 1.** Identificar los ácidos grasos de semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) y sus derivados.
- 2.** Evaluar el efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino y el crecimiento de *S. aureus*.
- 3.** Determinar si los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados afectan la internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino.
- 4.** Analizar la expresión de genes representativos de citocinas (pro y anti- inflamatorias) y de péptidos antimicrobianos, en células de epitelio mamario bovino tratadas con los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados e infectadas con *S. aureus*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Extracción de los ácidos grasos (AG) y sus derivados (DAG) a partir de semilla de aguacate

Los frutos de aguacate (*P. americana* var. *drymifolia*) en estadio de madurez fisiológica fueron recolectados en el municipio de Tingambato, Michoacán, México. Después de la colecta, el fruto se congeló usando nitrógeno líquido y se separó la semilla de la pulpa. La semilla se pulverizó en una licuadora para obtener el polvo a partir del cual se realizó la extracción de los compuestos en un equipo de extracción Soxhlet. Se utilizó hexano (C₆H₁₄, J.T. Baker) como solvente y se mantuvo en reflujo durante 14 horas. El extracto resultante se colectó y se filtró. Posteriormente se colocó en frío a -18°C por 12 h para la obtención de los cristales de los AG y DAG. Los cristales se recolectaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Por último, los cristales (extracto) se almacenaron a -20°C (Rosenblat et al. 2011). Para las evaluaciones con los AG y DAG en los sistemas biológicos, éstos se resuspendieron en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) al 5%.

6.2. Derivatización de los AG y DAG de semilla de aguacate

La derivatización es un proceso por el cual, a través de reacciones químicas se le inserta un grupo funcional al analito que permite obtener moléculas más volátiles y evitar usar temperaturas demasiado altas en el equipo, aunado a un aumento en la resolución de los análisis. El extracto sometió a sequedad con nitrógeno gaseoso, después se le adicionó 100 µL de diclorometano (CH₂Cl₂, J.T. Baker) y 1 mL de NaOH 0.5 N en metanol. La mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos y se enfrió hasta 30°C. Una vez fría se adicionó 1 mL de trifluoruro de boro (BF₃) en metanol para catalizar la reacción y se calentó nuevamente a 90°C por 10 minutos; se bajó la temperatura hasta alcanzar los 30°C y se le adicionó 1 mL de hexano, la mezcla se agitó en un vortex por 30 segundos y se dejó reposar para permitir la separación de las dos fases, la fase superior corresponde a la fase orgánica y la inferior a la fase acuosa. Se recuperó solo la fase orgánica y se colocó en un tubo de

ensayo, limpio y seco. A la fase acuosa se le adicionó 1 mL de hexano y se repitió el paso anterior; se obtuvo de nuevo la fase orgánica y se adicionó al tubo que solo contenía la fase orgánica. A éste se le agregó 1 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente, luego se recuperó la fase orgánica y se pasó por una columna para cromatografía (Poly-prep, Chromatography columns, Bio-Rad) rellena de NaSO₄. Se recolectó el filtrado y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso (grado HPLC) para ser analizado por CG-EM.

6.3. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)

La identificación de los compuestos presentes en los cristales de AG y DAG de semilla de aguacate criollo mexicano se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a masas. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 series II; Agilent, Foster City, Ca. U.S.A.) con detector de masas 5973 (Agilent Technologies). Se utilizó la columna HP-5MS, con una longitud de 30 metros y un diámetro interno de 250 µm con 0.25 µm de film. El gas acarreador fue helio ultra puro en flujo constante de 1 mL/min. El volumen de inyección de la muestra fue 1 µL, tipo Split a una temperatura del inyector de 270°C, la temperatura del detector fue de 300°C. Las condiciones de operación del horno fueron las siguientes: la temperatura inicial fue de 150°C por 3 min, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C mantenida por 12 minutos (tiempo total de 40.6 minutos) y una post-corrída a 300°C por 3 minutos. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, "Chem Station" Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002) (Velázquez-Becerra et al. 2013).

6.4. Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543

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

ajustaron midiendo (en el cultivo bacteriano) la densidad óptica (DO) a 600 nm. La cepa ATCC 27543 es sensible al antibiótico gentamicina, el cual se utilizó para eliminar las bacterias extracelulares en los ensayos de invasión.

6.5. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

El cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB) se obtuvo del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, se aisló y cultivó como se ha descrito previamente (Anaya et al. 2006). Para el estudio se utilizaron solo células de pasajes 2 al 8. Las CEMB se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/mL, GIBCO), 10 µg/mL hidrocortisona (Sigma), 250 ng/mL de anfotericina B (Invitrogen) y pH de 7.4. Las células se incubaron en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Para los ensayos con *S. aureus* las CEMB se cultivaron en medio sin antibióticos durante 24 h antes de llevar a cabo los tratamientos.

6.6. Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Para evaluar el efecto de los AG y DAG sobre el crecimiento de *S. aureus*, se cultivó la bacteria en caldo LB y se incubó en agitación constante a 37°C por 18 h. Se ajustó la DO₅₉₀ (espectrofotómetro DAS) del cultivo bacteriano a 0.2 (9x10⁷ UFC), se adicionaron los diferentes tratamientos de los AG y DAG (1- 500 ng/mL), y se crecieron a 37°C con agitación constante. Se monitoreó el crecimiento a las 2, 6, 12 y 24 h midiendo la DO a 590 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.7. Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate sobre la viabilidad de las CEMB

La viabilidad de las células del cultivo primario de epitelio mamario bovino se realizó mediante el ensayo de exclusión con el colorante azul tripano. Se cultivaron 1x10⁴ células por pozo en cajas de 96 pozos (Costar-Corning), con medio DMEM/F12K sin suero y sin

antibióticos, bajo las distintas concentraciones de los AG y DAG (1 – 500 ng/mL) durante 24 y 48 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Posteriormente, las CEMB se lavaron tres veces con PBS estéril y se despegaron con tripsina-EDTA (Gibco) y se recuperaron. Las células se resuspendieron con el colorante azul tripano (Trypan Blue Solution 0.4%, líquido estéril, filtrado, Sigma-Aldrich) en una dilución 1:1, se incubaron a temperatura ambiente por 3 min, y se cargaron 20 µL de la suspensión en un hemocitometro (cámara de Neubauer). Se contaron las células viables y las células no viables en un microscopio óptico invertido a 40X en cinco cuadrantes. Las células no viables se tiñeron de azul, mientras que las células viables no se tiñen con el colorante. Los experimentos se realizaron por triplicado. Para el cálculo de la viabilidad se realizó la siguiente ecuación:

% de células viables = (número de células viables / número de células totales) x 100

6.8. Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate en la internalización de *S. aureus* ATCC 27543 en las CEMB

Los ensayos de internalización se realizaron de acuerdo a un protocolo establecido previamente por nuestro grupo de trabajo (Anaya-López et al. 2006; Gutiérrez-Barroso et al. 2008). Las CEMB se cultivaron hasta monocapas confluentes (~2x10⁵ células/pozo) en cajas cultivo de 24 pozos (Costar-Corning) previamente tratadas con colágena de cola de rata tipo I (6-10 µg/cm², Sigma). Se adicionó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos a cada pozo, además de los AG y DAG (1- 500 ng/mL), incubándose durante 24 h. Se infectaron las CEMB con la cepa de *S. aureus* empleando una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula, para lo cual se realizó el conteo de CEMB de un pozo, ajustando paralelamente la DO₆₀₀ del cultivo bacteriano a 0.2. Las células se infectaron durante 2 h a 37°C en medio DMEM/F12, sin suero y sin antibióticos. Para eliminar las bacterias no endocitadas, las CEMB se trataron con 80 µg/mL de gentamicina incubándose durante 1 h a 37°C. Después, las CEMB se despegaron con tripsina-EDTA

(Gibco) y se recuperaron centrifugando a 2500 rpm/10 minutos. Posteriormente se lisaron con 250 μ L de agua destilada estéril y se distribuyó una alícuota de 200 μ L de una dilución 1:100 de los lisados en cajas con agar LB (caldo LB con 10 g de agar bacteriológico, BIOXON), por triplicado y se incubaron por 18 h a 37°C. El número de UFC recuperadas, correspondientes a las bacterias endocitadas, se determinó por conteo en placa. Como control se utilizaron las CEMB solo con el vehículo (DMSO 5%). Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.9. Análisis de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria y antimicrobiana por RT-PCR

A partir de las CEMB expuestas a *S. aureus* y tratadas o no con los AG y DAG de aguacate, se extrajo el ARN total usando Trizol (Invitrogen), el cual se utilizó para sintetizar el ADN complementario (ADNc). La reacción de transcripción reversa se realizó en un volumen final de 20 μ L conteniendo 25 μ g/mL de Oligo d(T)15-18 (Invitrogen) y 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 minutos e inmediatamente fue transferida a hielo. Se añadió 4 μ L de First Strand Buffer 5X (Invitrogen), ditiotreitól 10 mM e inhibidor de RNAsa 2 U/ μ L (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 minutos. Finalmente se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/ μ L, Invitrogen) y se incubó a 37°C por 50 minutos, seguido de 15 minutos a 70°C para inactivar la reacción. Este ADNc se utilizó para establecer los niveles de expresión de genes representativos de la inmunidad innata mediante reacciones de PCR en tiempo real (qPCR). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para las CEMB (Cuadro 4). Además, se amplificó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para verificar la integridad del ARN y la eficiencia de la RT-PCR. La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. 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.

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión del ARNm de genes de la RII de las CEMB

Especificidad		Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)	Referencia
Péptido antimicrobiano traqueal (TAP)	F R	GCGCTCCTCTTCCTGGTCCTG GCACGTTCTGACTGGGCATTGA	216	57	Alva-Murillo et al. 2012
Defensina 5 de neutrófilo bovino (BNBD5)	F R	GCCAGCATGAGGCTCCATC TTGCCAGGGCAGAGATCG	143	55	Cormican et al. 2008
Interleucina 10 (IL-10)	F R	GATGCGAGCACCCCTGTCTGA GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT	129	59	Alva-Murillo et al. 2014
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	F R	CCCCTGGAGATAACCTCCCA CAGACGGGAGACAGGAGAGC	101	55.5	Mookherjee et al. 2006
Regulador de la activación de células T normales y secretadas (RANTES)	F R	CACCCACGTCCAGGAGTATT CTCGCACCCACTTCTTCTCT	117	54	Nelson et al. 2010
Gliceraldehído 3 fostato deshidrogenasa (GAPDH)	F R	TCAACGGGAAGCTCACTGG CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	56.9	Yonezawa et al. 2009

■ Péptidos antimicrobianos en bovinos
 ■ antiinflamatoria
 ■ Proinflamatoria
 ■ Gen endógeno

6.10. Análisis estadístico

Los resultados se obtuvieron del promedio de tres experimentos independientes por triplicado y se compararon mediante la prueba de *t* de Student. Los datos de qPCR fueron obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado y comparados por análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se reportan con \pm el error estándar promedio. Los valores de $P \leq 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción e identificación de AG y DAG presentes en la semilla de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*)

La extracción de los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano *Persea americana* var. *drymifolia* se realizó por el método reportado por Rosenblat y cols. (2011). Mediante este método se obtienen los AG y DAG en forma de cristales. El rendimiento de AG y DAG obtenidos a partir de la semilla fue de 0.2% (p/p). Posteriormente se identificaron las moléculas presentes en los cristales mediante la técnica de CG-EM. Se identificaron tres grupos de moléculas previamente descritas en aguacate, dos de ellas definidas como DAG: 1) alcoholes grasos polihidroxilados o PFA, y 2) acetogeninas alifáticas; el tercer grupo estuvo conformado por AG de cadena larga (Cuadro 5). Los DAG identificados fueron preferencialmente moléculas con una longitud de cadena de 17-19 carbonos, mientras que los AG más abundantes fueron de cadena larga (16-24 C), con y sin insaturaciones. El compuesto más abundante fue el PFA 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-12,16-dieno (15.4 $\mu\text{g/g}$ de extracto), seguido por el AG saturado hexadecanoico o ácido palmítico (7.1 $\mu\text{g/g}$ de extracto) y la persina (5.09 $\mu\text{g/g}$ de extracto) (Cuadro 5). En la figura 8 se muestra un cromatograma representativo del perfil de AG y DAG presentes en la semilla de aguacate mexicano.

Cuadro 5. Contenido de AG y DAG en la semilla de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*)¹.

Grupo	Compuesto	µg/g de extracto	
PFA	1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-16-eno	3.54	
	1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-16-ino	5.75	
	1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-12,16-dieno	15.40	
	1-Acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-12-eno-16-ino	4.05	
	1-Acetoxi-2,4,15-trihidroxi-heptadec-16-eno	3.54	
	Persina	5.09	
Acetogeninas alifáticas	Persenona-A	5.03	
	Persedieno	4.26	
	1,2,4-Trihidroxi-heptadec-16-ino	4.98	
	1,2,4-Trihidroxi-heptadec-6,16-dieno	2.41	
	1,2,4-Trihidroxi-heptadec-16-eno	3.47	
	1,2,4,15-Tetrahidroxi-heptadec-16-eno	2.35	
	1,2,4-Trihidroxi-heptadec-6-eno-16-ino	2.20	
	1,2,4-Trihidroxi-heptadec-16-ino	2.19	
	1,2,4-Trihidroxi-nonadec-16-eno	2.19	
	1,2,4-Trihidroxi-nonadec-6-eno	2.10	
	1,2,4-Trihidroxi-nonadecano	2.37	
	Ácidos grasos de cadena larga	Ácido tetradecanoico (ác. mirístico)	2.49
		Ácido hexadecanoico (ác. palmítico)	7.10
Ácido 9,12-Octadecadienoico (ác. linoleico)		4.06	
Ácido 9-Octadecenoico (ác. oleico)		5.32	
Ácido octadecanoico (ác. esteárico)		5.06	
Ácido eicosanoico (ác. araquídico)		2.39	
Ácido 13-docosenoico (ác. erúcico)		2.44	
Ácido docosanoico (ác. behénico)		3.63	
Ácido 15-tetracosenoico (ác. nervónico)		2.88	
Ácido tetracosanoico	4.29		

¹ En negritas se indican los más abundantes

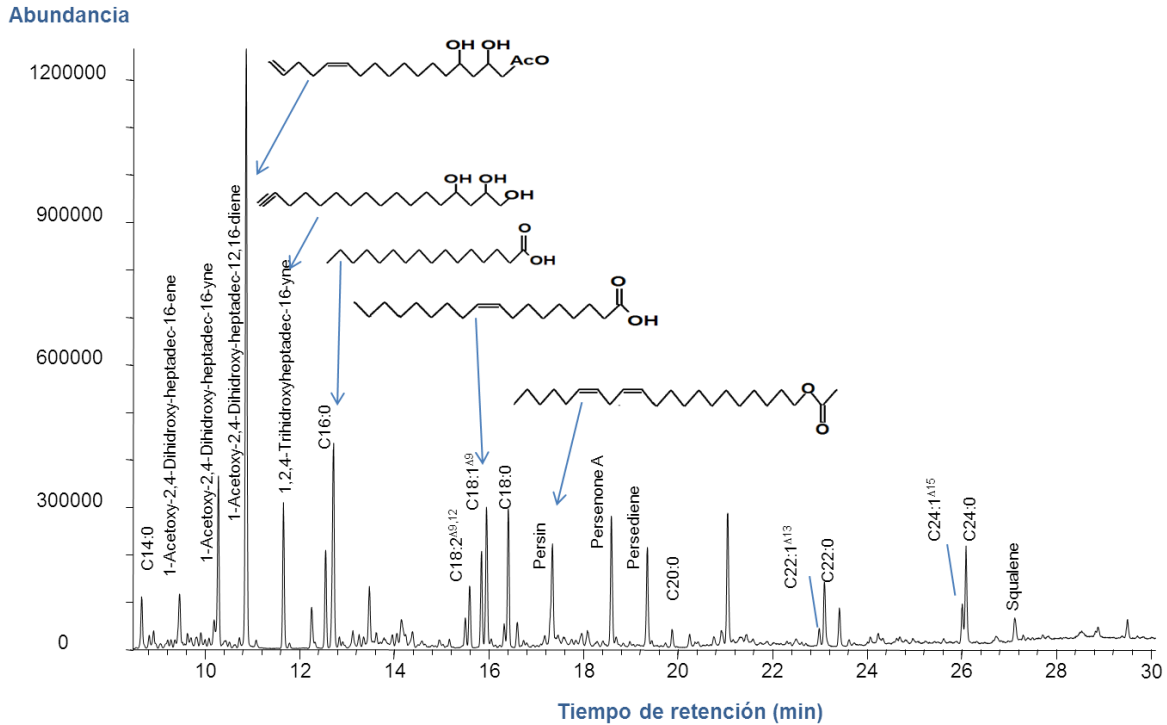


Figura 8. Cromatograma representativo del perfil de AG y DAG presentes en la semilla de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). Se indican las estructuras de las moléculas más abundantes. Éstas se clasificaron en tres grupos: 1) alcoholes grasos polihidroxilados, 2) acetogéninas alifáticas y 3) ácidos grasos. Para la identificación de los AG y DAG fueron transformados en sus metil éster y determinados por CG-EM.

7.2. Efecto de los AG y DAG de la semilla de aguacate mexicano sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB

Está bien establecido que los AG y DAG tienen efectos antimicrobianos y citotóxicos. Por lo anterior, se evaluó si los AG y DAG de la semilla de aguacate mostraban actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, y citotoxicidad en las CEMB. Para el caso de la bacteria, ésta se creció en LB suplementado con los compuestos (1-500 ng/mL) y se monitoreó por turbidimetría durante 24 h. Los resultados mostraron que los tratamientos no afectaron el crecimiento de *S. aureus*, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (vehículo, DMSO 0.1%) (Figura 9 A).

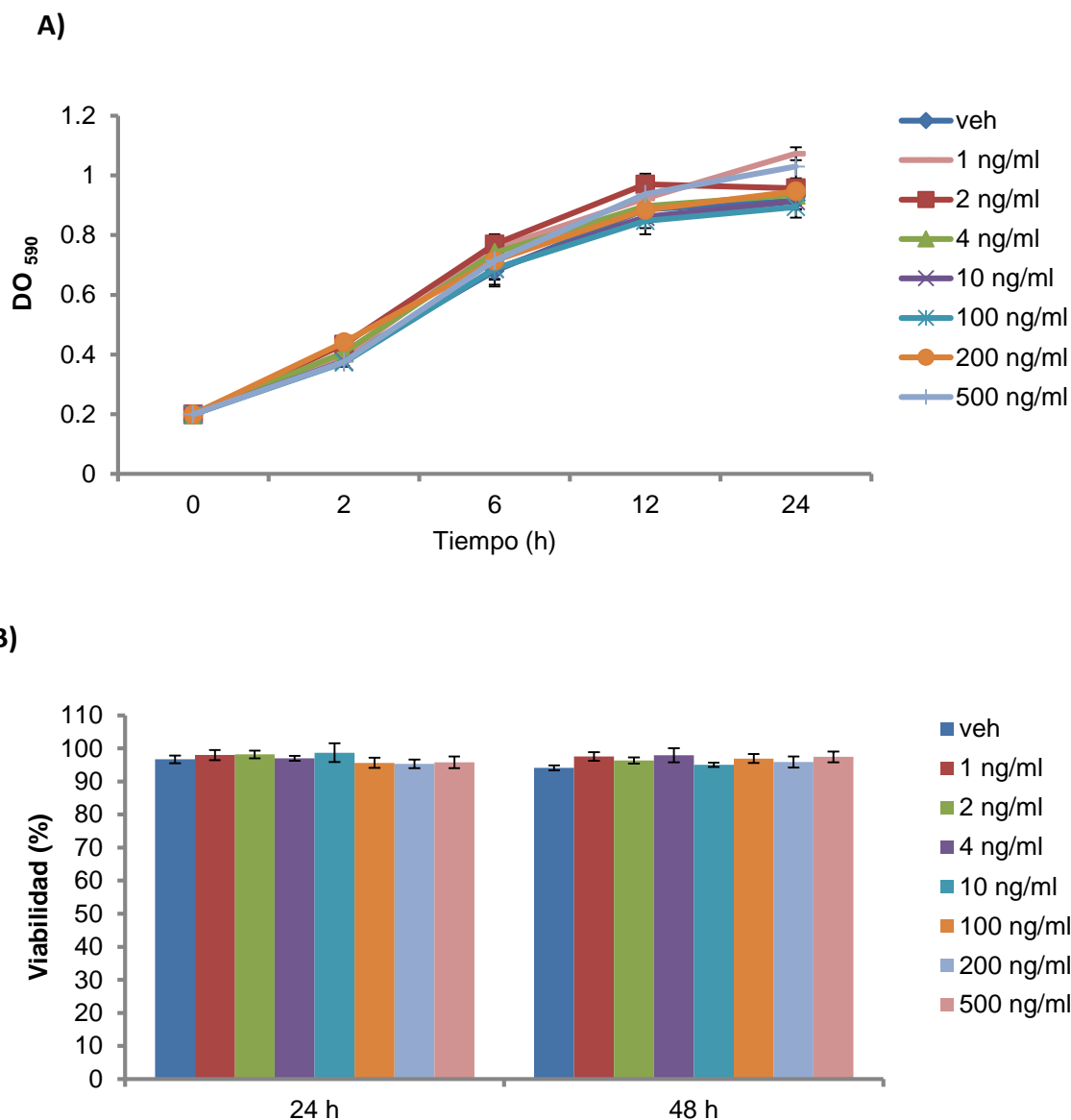


Figura 9. Los AG y DAG de aguacate no afectan la viabilidad de *S. aureus* y de las CEMB. A) *S. aureus* ATCC 27543 se creció en caldo LB a 37°C en agitación durante 18 h y se ajustó la DO a 0.2 (9×10^7 UFC), posteriormente se adicionaron los tratamientos y se determinó la DO a los tiempos indicados. **B)** Para los ensayos de viabilidad de las CEMB (1×10^4), éstas se crecieron en caja de 96 pozos hasta 80% de confluencia, posteriormente se adicionaron los tratamientos y se determinó la viabilidad mediante el ensayo de exclusión por azul tripano, a las 12 y 24 h. Los resultados, en ambos casos, corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Veh= vehículo (DMSO 0.1%) ($p \leq 0.05$, *t*-Student).

Para el caso de los ensayos de viabilidad de las CEMB tratadas con los AG y DAG, la evaluación de la citotoxicidad se realizó a las 24 y 48 h por el ensayo de exclusión con azul tripano. Los resultados mostraron que los AG y DAG (1-500 ng/mL) no afectan la viabilidad de las CEMB (Figura 9B).

7.3. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la internalización de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 en las CEMB

El efecto de los AG y DAG sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB se evaluó mediante ensayos de protección con gentamicina, como se describió en materiales y métodos. Se probaron los AG y DAG en las distintas concentraciones (1 - 500 ng/mL) como tratamiento profiláctico, para ello las CEMB fueron pretratadas 24 h con los compuestos y luego se infectaron con la bacteria. Los resultados mostraron que las concentraciones de 1 a 200 ng/mL inhibieron significativamente la internalización de *S. aureus* (60-80%), comparado con el control (vehículo, DMSO 0.1%); sin embargo, en la concentración de 500 ng/mL se observó un incremento en la internalización (~50%) (Figura 10). En cambio las concentraciones de 1, 4, 10 y 200 ng/mL disminuyeron la internalización en un ~60%, mientras que las concentraciones de 2 y 100 ng/mL lo hicieron hasta un ~80%, aunque no son estadísticamente diferentes. Con estos resultados se demostró que los AG y DAG de semilla de aguacate inhiben preferencialmente la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Por lo anterior, para el resto de las evaluaciones se utilizaron solo dos concentraciones, una condición representativa de la menor inhibición observada (60%, 1 ng/mL), y la de mayor efecto inhibitorio (80%, 100 ng/mL).

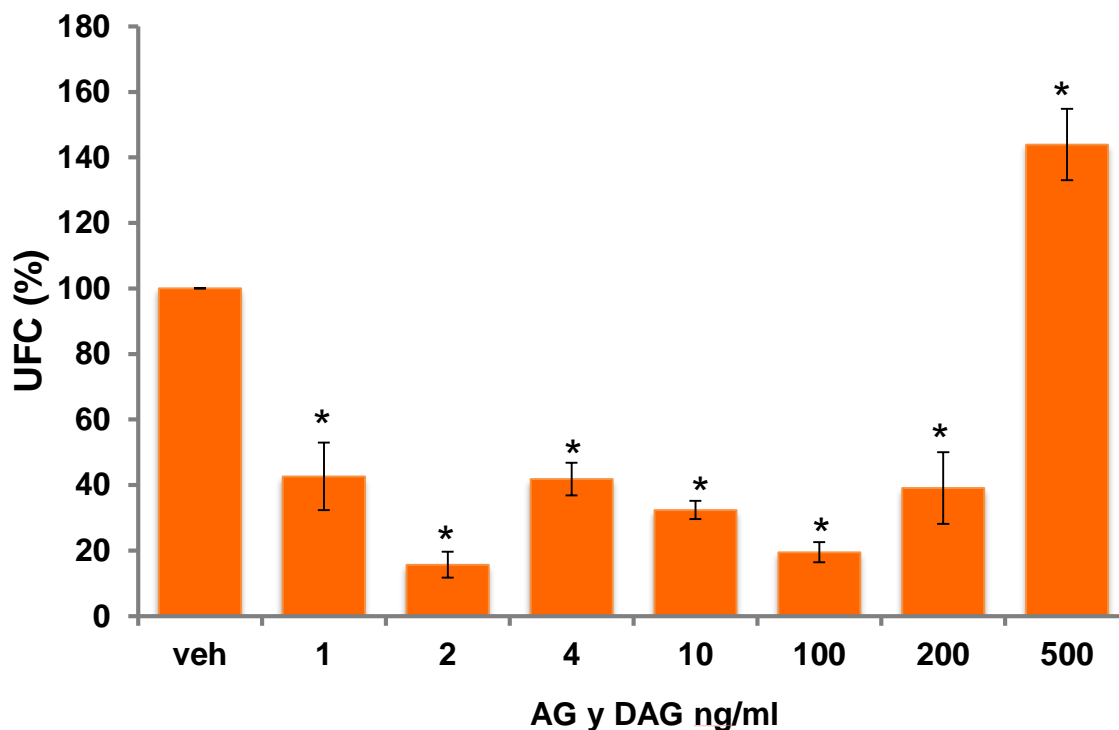


Figura 10. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la internalización de *S. aureus* en las CEMB. El efecto de los AG y DAG en la internalización de *S. aureus* en las CEMB es presentado como el porcentaje de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB. Los valores fueron determinados considerando el vehículo (DMSO 0.1%) como el 100% de la internalización. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La diferencia estadística de los tratamientos es respecto al control ($p \leq 0.05$, t-Student).

7.4. Efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate en la expresión de genes de la respuesta inmune innata de las CEMB

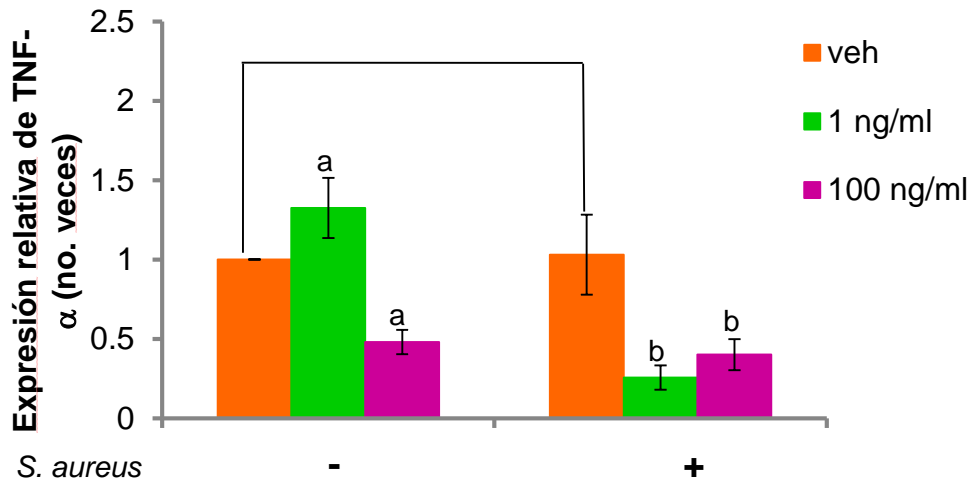
Para evaluar si los AG y DAG modulaban la respuesta inmune innata de las CEMB (con o sin infección) y si ésta se relacionaba con los efectos inhibitorios sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB, se analizó por qPCR la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria (la citocina TNF- α y la quimiocina RANTES), antiinflamatoria (IL-10) y péptidos antimicrobianos (TAP y BNBD5). La selección de los genes se realizó en función de que se ha demostrado su expresión en las CEMB y que ésta es modulada por la infección con *S. aureus*.

7.4.1. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria en las CEMB

Mediante qPCR se analizó la expresión de dos genes de la respuesta proinflamatoria, la citocina TNF- α y la quimiocina RANTES. Las CEMB control (sin tratamiento y sin infección) mostraron una expresión basal del ARNm de TNF- α , la cual no se afectó por el tratamiento con los AG y DAG a 1 ng/mL; sin embargo, el tratamiento de 100 ng/mL disminuyó significativamente la expresión (0.5 veces) (Figura 11 A). Por otro lado, la infección con *S. aureus* no modificó la expresión en relación a las células control (Figura 11 A). Sin embargo, las CEMB pretratadas con los AG y DAG durante 24 h e infectadas disminuyeron significativamente la expresión de TNF- α (0.5 veces), en relación a las células infectadas. Las células tratadas con los AG y DAG e infectadas mostraron una inhibición en la expresión de TNF- α , que se relaciona con la disminución en la internalización de *S. aureus*.

En relación a la expresión relativa del ARNm de la quimiocina RANTES, los tratamientos con los AG y DAG no modificaron su expresión. Un comportamiento similar se observó en las células tratadas con los AG y DAG e infectadas (Figura 11 B).

A)



B)

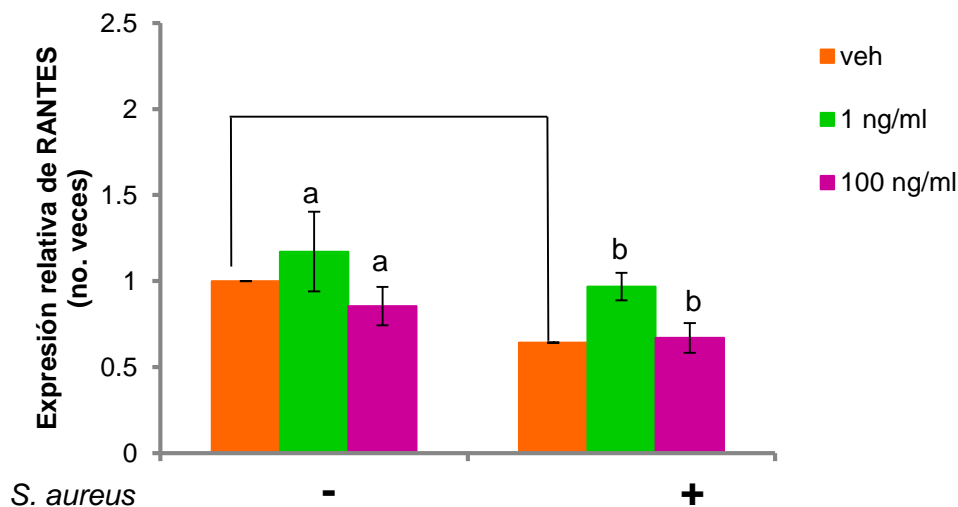


Figura 11. Los AG y DAG modulan la expresión de genes de la respuesta proinflamatoria de las CEMB. Las células fueron tratadas con los AG y DAG disueltos en 0.1% de DMSO (24 h) y después infectadas con *S. aureus* por 2 h. Se realizó la extracción del ARNm total de las CEMB tratadas con los AG y DAG (1 y 100 ng/mL), sin infectar e infectadas con *S. aureus* ATCC 27543, y posteriormente se sintetizó el ADNc de los diferentes tratamientos. Se evaluó la expresión del ARNm de TNF- α (A) y RANTES (B). Se realizó la extracción del ARNm total y posteriormente se sintetizó el ADNc de los diferentes tratamientos. La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando como control endógeno el gen GAPDH. Cada barra muestra tres experimentos independientes por duplicado. El símbolo “*” indica cambios significativos con respecto a las CEMB tratadas con el vehículo. La letra “a” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto las CEMB tratadas solo con vehículo (DMSO 0.1%). La letra “b” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB infectadas.

7.4.2. Los AG y DAG de semilla de aguacate inducen la expresión de la IL-10 en las CEMB

Continuando con el análisis de expresión de genes de la respuesta inmune innata se evaluó el efecto de los AG y DAG sobre la expresión del ARNm de la citocina antiinflamatoria IL-10. Se observó un nivel basal de la expresión de esta citocina en las CEMB control (Figura 12). Los tratamientos con los AG y DAG incrementaron significativamente la expresión de IL-10 (hasta 11 veces) de forma dependiente de la concentración. Además, la infección indujo la expresión del ARNm de IL-10 (~2.7 veces); sin embargo, cuando se trataron las CEMB con los AG y DAG y se infectaron se observó un incremento en la expresión de IL-10, siendo de 10 veces en la concentración de 1 ng/mL y hasta 21 veces para la concentración de 100 ng/mL (Figura 12).

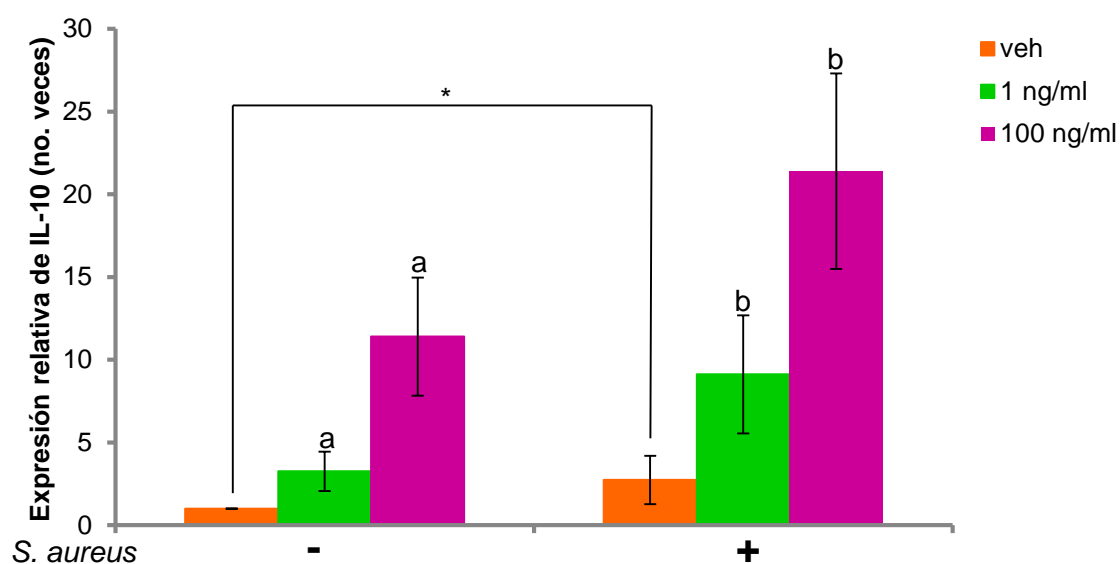


Figura 12. Los AG y DAG inducen la expresión de IL-10 en las CEMB. Las células fueron tratadas con los AG y DAG disueltos en 0.1% de DMSO (24 h) y después infectadas con *S. aureus* por 2 h. Se realizó la extracción del ARNm total de las CEMB tratadas con los AG y DAG (1 y 100 ng/mL), sin infectar e infectadas con *S. aureus* ATCC 27543, y posteriormente se sintetizó el ADNc de los diferentes tratamientos. Se evaluó la expresión relativa del ARNm de IL-10. La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando como control endógeno el gen GAPDH. Cada barra muestra tres experimentos independientes por duplicado. El símbolo “*” indica cambios significativos con respecto a las CEMB tratadas con el vehículo. La letra “a” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto las CEMB tratadas solo con vehículo (DMSO 0.1%). La letra “b” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB infectadas.

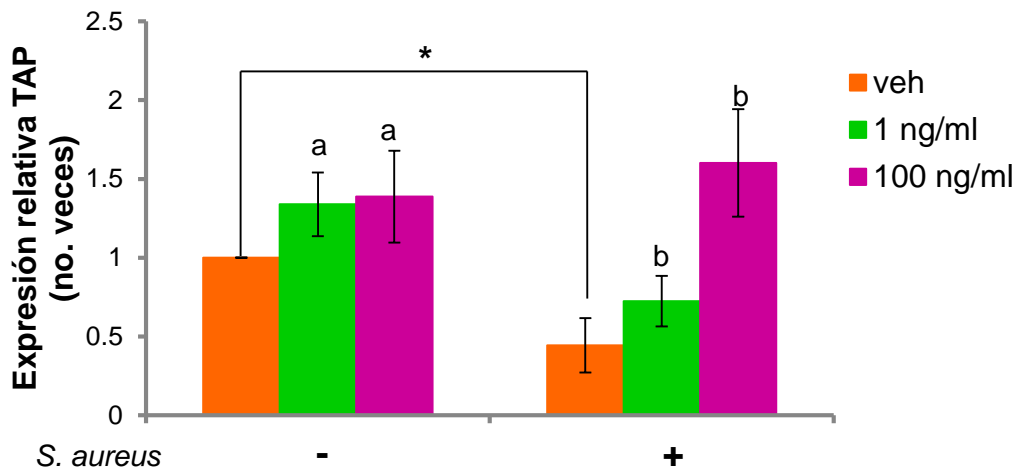
7.4.3. Los AG y DAG de semilla de aguacate modulan la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB

Un componente importante de la respuesta inmune innata son los péptidos antimicrobianos, por lo cual se evaluó el efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate en la expresión relativa del ARNm del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y la defensina de neutrófilo bovino (BNBD5) en las CEMB.

Respecto a la expresión de TAP, las CEMB control mostraron una expresión basal, la cual no se afectó por los tratamientos con los AG y DAG. Sin embargo, la infección disminuyó significativamente la expresión de este péptido (0.5 veces). Interesantemente las CEMB pretratadas con los AG y DAG e infectadas mostraron una tendencia a incrementar la expresión de TAP dependiente de la concentración, alcanzando un incremento de 3 veces en el tratamiento de 100 ng/mL (Figura 13 A).

Por otra parte, la expresión del ARNm de BNBD5 en las CEMB tratadas con los AG y DAG (1 ng/mL) disminuyó significativamente, mientras que la concentración de 100 ng/mL no modificó la expresión de este péptido. Por otro lado, la infección no modificó la expresión relativa de BNBD5 respecto al control; sin embargo, las células tratadas con los AG y DAG e infectadas mostraron un comportamiento diferencial. En el tratamiento de 1 ng/mL la expresión relativa del ARNm se redujo, mientras que en la de 100 ng/mL se incrementó la expresión hasta 4 veces, lo cual puede estar relacionado con el mayor porcentaje de inhibición de la internalización (Figura 13 B).

A)



B)

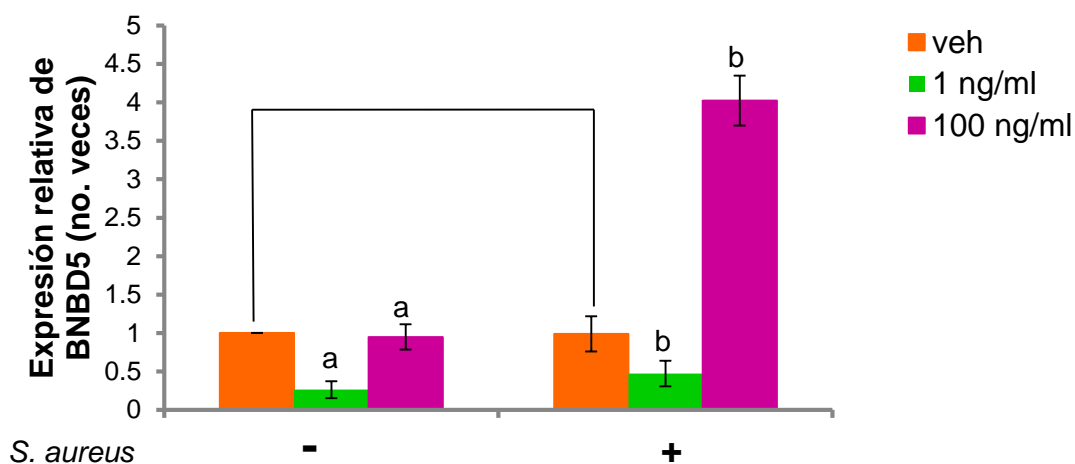


Figura 13. Los AG y DAG modulan la expresión de péptidos antimicrobianos en las CEMB. Las células fueron tratadas con los AG y DAG disueltos en 0.1% de DMSO (24 h) y después infectadas con *S. aureus* por 2 h. Se realizó la extracción del ARNm total de las CEMB tratadas con los AG y DAG (1 y 100 ng/mL), sin infectar e infectadas con *S. aureus* ATCC 27543, y posteriormente se sintetizó el ADNc de los diferentes tratamientos. Se evaluó la expresión relativa del ARNm de TAP (A) y BNBD5 (B). La expresión relativa se realizó por medio de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando como control endógeno el gen GAPDH. Cada barra muestra tres experimentos independientes por duplicado. El símbolo “*” indica cambios significativos con respecto a las CEMB tratadas con el vehículo. La letra “a” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto las CEMB tratadas solo con vehículo (DMSO 0.1%). La letra “b” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB infectadas.

8. DISCUSIÓN

Ácidos grasos y derivados de semilla de aguacate mexicano

Para el control de la invasión de *Staphylococcus aureus* en los procesos de infección en algunos sistemas celulares se ha recurrido a la búsqueda de nuevos tratamientos, una alternativa potencial la presentan los compuestos derivados de las plantas. Entre éstas, se han evaluado los metabolitos secundarios de aguacate (*Persea americana* Mill.), en particular los de la semilla de aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) que presentan propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Ding et al. 2007; Calder, 2013), debido a que contiene una alta cantidad de aceite rico en ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y otras moléculas lipídicas. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y cadena media (AGCM) modulan la invasión de *S. aureus* en las CEMB y la expresión de genes de la respuesta inmune (Ochoa-Zarzosa et al. 2009; Alva-Murillo et al. 2012; Alva-Murillo et al. 2013). Por estos antecedentes, en la presente investigación se realizó la obtención e identificación de AG y DAG obtenidos de la semilla de aguacate mexicano, y se evaluó el efecto de éstos sobre la internalización de *S. aureus* ATCC 27543 en las células de epitelio mamario bovino (CEMB) y en la modulación de la expresión de genes de la inmunidad innata.

La semilla de aguacate es una fuente importante de AG y otras moléculas lipídicas con propiedades antiinflamatorias, citotóxicas y antimicrobianas. La obtención de AG y DAG de semilla de aguacate mexicano se realizó de acuerdo al método reportado para la obtención de moléculas lipídicas de este fruto (Rosenblat et al. 2011). La identificación y cuantificación de los componentes lipídicos de los extractos se realizó utilizando las condiciones de corrida en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) establecidas por nuestro grupo de trabajo (Valdez-partida et al. 2011), ya que no existen espectros de masas en la base de datos NIST de compuestos derivados de AG, como las acetogeninas y los alcoholes grasos polihidroxilados (PFA).

Rosenblat y cols. (2011) reportan solo cinco compuestos principales en el extracto de semilla de aguacate (*Persea gratissima*), los cuales fueron patentados con el nombre de PFA. En el extracto obtenido de *P. americana* var. *drymifolia* se encontraron estos compuestos, siendo el más abundante el 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-heptadec-12,16-dieno. Además de los PFAs, en los extractos de la semilla del aguacate mexicano se identificaron acetogeninas alifáticas y ácidos grasos de cadena larga (Figura 7, cuadro 5). Los AGCL identificados coinciden con los reportados en la literatura para el aguacate, los cuales son: ácido palmítico (C 16:0), ácido palmitoleico (C 16:1), ácido oleico (C 16:1), ácido linoleico (C 18:2), ácido araquídico (C 20:0), ácido eicosadienoico (C 20:2) entre otros, aunque la cantidad varía de acuerdo al estado fenológico del fruto y al genotipo (Bora et al. 2001) La identificación de otras moléculas lipídicas en este extracto además de las reportadas por el método de Rosenblat y cols (2011) puede deberse al método de derivatización utilizado en la presente investigación, ya que por este método se obtienen lípidos metil-esterificados derivados de las moléculas lipídicas presentes, permitiendo aumentar la volatilidad de los análisis, utilizar temperaturas menores en el cromatografo y aumentar la resolución de los análisis (Figura 7). También se ha identificado la persina y otros DAG en hojas y tallos de aguacate criollo mexicano (Valdez-Partida et al. 2011). La persina y otros compuestos lipídicos con estructura química similar se denominan acetogeninas, las cuales son un grupo de compuestos característicos de las familias Lauraceae y Annonaceae (Rodríguez-Saona et al. 2000). En el presente trabajo la acetogenina en mayor abundancia fue la persina (5.09 µg/g de peso seco), resultado que coincide con lo reportado en pulpa de aguacate Hass, mientras que en la semilla no se reporta la cantidad (Rodríguez-Sánchez et al. 2013). Asimismo, el contenido de la acetogenina persenona A (5.03 µg/g de peso seco) coincide con lo reportado en la pulpa y semilla de aguacate (Kim et al. 2000; Rodríguez-Sánchez et al. 2013). Aunque no se ha descrito la ruta de síntesis de estos compuestos, algunos autores mencionan que pueden ser derivados del metabolismo de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico (Kashman et al. 1969). Se sugiere que en la planta estas moléculas son antioxidantes potenciales que ayudan a

combatir el ataque de hongos y estrés oxidativo inducido por factores abióticos (Beno-Moualem et al. 2000).

Efecto de AG y DAG en *Staphylococcus aureus*

Los AGCL presentan propiedades antimicrobianas contra *S. aureus* aunque el mecanismo de acción anti-estafilocócico se desconoce, se ha propuesto que inhiben las glucosiltransferasas, favorecen la precipitación del peptidoglicano, inducen el estrés peroxidativo y alteran la permeabilidad y fluidez de la membrana (Kenny et al. 2009). Se ha reportado que el ácido oleico (C 18:1, cis-9) y el ácido láurico (C 12:0) a partir de 70 µg/mL presentan efectos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (Chen et al. 2011). Además, las acetogeninas obtenidas de la semilla de aguacate también presentan efectos bactericidas contra *Clostridium sporogenes*, una bacteria Gram positiva, a partir de 7.8 µg/mL (Rodríguez-Sánchez et al. 2013). En este trabajo, los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano no afectaron el crecimiento de *S. aureus* ATCC 27543. Este resultado no es extraño ya que las concentraciones que se utilizaron en la presente investigación son inferiores (1-500 ng/mL) a las reportadas con actividad antibacteriana (Figura 9A).

Efecto de AG y DAG sobre CEMB

Se ha establecido que algunos AG, como el ácido oleico, promueven el crecimiento *in vitro* de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama humano (MDA-MB-231) a la concentración de 0.25 µg/mL (Rose et al. 1990). Por otra parte, el ácido docosahexaenoico (30 µM) induce la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3 (Sun et al. 2011). Mientras que las acetogeninas alifáticas presenta efectos citotóxicos contra diferentes líneas celulares cancerosas a partir de 30 µM (Ding et al. 2007; D'Ambrosio et al. 2011; Valdez-Partida et al. 2011). Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano sobre la viabilidad de las CEMB

hasta las 48 h. Los resultados mostraron que a las concentraciones probadas de los AG y DAG (1-500 ng/mL) no afectaron la viabilidad de las CEMB, medida a través del ensayo de exclusión con azul tripano. Adicionalmente, se analizó la viabilidad por ensayo de reducción del MTT y tampoco se observaron cambios en la viabilidad celular (datos no mostrados) (Figura 9B). Estos resultados pueden deberse a que las concentraciones utilizadas de AG y DAG son muy bajas (1-500 ng/ml), debido a que se ha reportado para que los AG saturados y poliinsaturados presenten efectos citotóxicos contra células bovinas de epitelio del cristalino e induzcan la muerte por apoptosis en la línea celular H9c2 (mioblastos de ratón) se requieren concentraciones de al menos 100 mM, ya que concentraciones menores de AG poliinsaturados no presentan efectos citotóxicos (Nguyen et al. 2000; Samokhvalov et al, 2014).

Propiedades inmunomoduladoras de AG y DAG

S. aureus es el principal patógeno que causa mastitis bovina crónica debido a que es capaz de internalizarse en las CEMB, sobrevivir y replicarse dentro de ella, evadiendo al sistema inmune del hospedero (Deogo, 2002; Gutiérrez-Barroso et al. 2008). En nuestro grupo de trabajo se reportó que las CEMB tratadas con AGCC durante 24 h modulan la internalización de *S. aureus*. El propionato de sodio (1-5 mM) disminuyó la invasión bacteriana en las CEMB ~65% (Alva-Murillo et al. 2012), mientras que el butirato (0.25 mM) la inhibió ~50% (Ochoa-Zarzosa et al. 2009). Asimismo, el hexanoato (0.25 – 5 mM) la disminuyó ~60% (Alva-Murillo et al. 2012). En el caso del octanoato, las concentraciones de 0.0625-0.5 mM aumentaron la invasión bacteriana; en cambio, a las concentraciones de 0.75-3.5 mM la invasión disminuyó hasta ~80% (Alva-Murillo et al. 2013). Por las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de los AGCL y otros derivados de lípidos, como los PFA y las acetogeninas alifáticas, éstas fueron consideradas como candidatas para evaluar la respuesta inmunomoduladora de la CEMB ante un agente infeccioso como *S. aureus*, particularmente durante su internalización en las CEMB.

Los AG y DAG de semilla aguacate modularon la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Las concentraciones de 1-200 ng/mL disminuyeron la internalización bacteriana (~80%), este efecto es mayor al reportado para los AGCC y el hexanoato (Ochoa-Zarzosa et al. 2009; Alva-Murillo et al. 2012), y equivalente al octanoato (Alva-Murillo et al. 2013). Sin embargo, al aumentar la concentración a 500 ng/mL, la internalización aumentó significativamente (140%), un comportamiento también reportado para el octanoato (Alva-Murillo et al. 2013) (Figura 10). Interesantemente, se observó que la curva de inhibición de la internalización presentó dos picos máximos de inhibición, una 2 ng/mL y el otro a 100 ng/mL. Este comportamiento de la curva de puede deberse a la mezcla de moléculas lipídicas que se encuentran en el extracto (PFAs, acetogeninas y AG) (Figura 10, Cuadro 5). Lo cual sugiere que los picos pueden deberse a un efecto diferencial de los componentes del extracto.

Una posible explicación para el efecto inhibitorio de los AG y DAG en la en la internalización de *S. aureus* puede deberse a la regulación de mecanismos de supervivencia de la bacteria, debido a que se ha reportado que los AGCL regulan la expresión de genes relacionados con la estabilización de la membrana y la formación de la cápsula (Kenny et al. 2009). En el mismo sentido, el ácido linoleico (200 µg/mL) disminuyó considerablemente la invasión de *Listeria monocytogenes* en una línea celular de cáncer de colon humano (Caco) (Petrone et al. 1998). Por lo anterior, es claro que los AGCL presentan un papel activo en procesos de internalización bacteriana.

Por otra parte, se ha descrito que los AGCL son ligandos de receptores acoplados a proteínas G (Yonezawa et al. 2008), receptores TLR y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Straus et al. 2007). El ácido láurico induce la activación de TLR4 y TLR2, como consecuencia se activa la ruta de señalización de MyD88/IRAK/TRAF6 y PI3K/AKT, induciendo la fosforilación de la subunidad p65 del factor transcripcional NF-κB, desencadenando la respuesta inflamatoria (Lee et al. 2003; Huang et al. 2012). Por otro lado, los AGCL ω-3 inhiben la expresión y activación de TLR2/TLR4 contribuyendo a la respuesta antiinflamatoria (Huang et al. 2012). Asimismo, la unión de AG a PPARs inhibe la activación de NF-κB, resultando en la activación de diferentes rutas

asociadas con la inflamación y la homeostasis (Wahli et al. 2012). En este sentido, no se ha reportado el efecto de los DAG de aguacate sobre procesos de internalización microbiana. Sin embargo, los PFA de aguacate (100 ng/mL) presentan efectos antiinflamatorios en un sistema de daño físico, causado por la incidencia de luz UV sobre queratinocitos humanos, ya que inhiben la secreción de la IL-6 y la PGE₂ (Rosenblat et al. 2011). Además, la persenona A (1.4 μM) y la persenona B (1.8 μM) actúan como inhibidores de la síntesis de superóxido y óxido nítrico (Kim et al. 2000). De tal manera que estos resultados sugieren un papel activo de los AG y DAG en procesos inmunomoduladores, los cuales podrían explicar en alguna medida los efectos inhibitorios sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Finalmente, se requiere realizar más estudios con la finalidad de determinar qué grupo de compuestos en la mezcla del extracto de semilla de aguacate mexicano es el responsable del efecto observado.

Efecto de AG y DAG en mediadores inflamatorios

Se ha demostrado que cuando las CEMB interactúan con *S. aureus* son capaces de sintetizar una variedad de mediadores inflamatorios, como las citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, entre otros metabolitos (Aitken et al. 2011).

Para demostrar el efecto de los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano sobre la respuesta inflamatoria, se determinó la expresión de los genes representativos de la RII, entre ellos el de la citocina proinflamatoria TNF- α y la quimiocina RANTES, además de la citocina antiinflamatoria IL-10 y los péptidos antimicrobianos TAP y BNBD5. TNF- α es una citocina proinflamatoria de respuesta rápida expresada en las CEMB y que juega un papel importante en el proceso de mastitis. Se ha demostrado que el estímulo bacteriano induce la expresión de TNF- α (Strandberg et al. 2005). Además dependiendo de la cepa de *S. aureus* es la intensidad de la respuesta (Zbinden et al. 2014). Como un control interno se midió la expresión basal del ARNm de las CEMB con o sin infección (2 h) con *S. aureus*. La infección indujo la expresión de TNF- α hasta 11 veces (datos no mostrados), estos resultados coinciden con lo que se ha reportado por nuestro grupo de trabajo en diversos

reportes (Gutiérrez-Barroso et al. 2008; Ochoa Zarzosa et al. 2009; Alva-Murillo et al. 2012). Sin embargo, las CEMB tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%) e infectadas por 2 h con *S. aureus* mantuvieron la expresión basal del ARNm de TNF- α (Figura 11A). Este efecto puede ser debido a que el DMSO tiene efectos antiinflamatorios, como los reportados en las células Caco-2 (Hollebeeck et al. 2011), y en células de queratinocitos humanos (HaCat). El tratamiento de las CEMB con los AG y DAG (1 ng/mL) no modificó la expresión basal del ARNm de TNF- α , pero el tratamiento de 100 ng/mL disminuyó la expresión de esta citocina (Figura 11A). Estos resultados coinciden parcialmente con otros estudios, en donde el pretratamiento de la línea celular RAW 264.7 con una emulsión de AG ω -3 y ω -6, y sin estímulo inflamatorio, no modificó significativamente la producción de TNF- α (Novak et al. 2003). Por otro lado, en condrocitos bovinos tratados durante 72 h con un producto obtenido de aguacate (ASU, avocado soybean unsaponificables), la expresión del ARNm de TNF- α tampoco se modificó (Au et al. 2007). Recientemente, nuestro grupo reportó que el pretratamiento de las CEMB durante 24 h con el colecalciferol (una molécula lipídica) inhibe también la expresión de TNF- α (Alva-Murillo et al. 2014). De acuerdo a los resultados de la expresión del ARNm de TNF- α , los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano pueden inhibir su expresión en las CEMB. Esto no coincide con lo reportado para AGCC, los cuales inducen la expresión del ARNm de TNF- α en las CEMB (Alva-Murillo et al. 2012). De igual forma, el ácido palmítico (C16:0) induce la expresión del ARNm de TNF- α en células de músculo liso vascular asociándolo al proceso de arterosclerosis (Wu et al. 2014). Asimismo, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico, provenientes de la semilla de ajonjolí, inducen la expresión de TNF- α en hígado de ratón (Chavali et al. 1998).

RANTES es una quimiocina involucrada en la respuesta proinflamatoria, además es un factor quimiotáctico muy importante que atrae neutrófilos y linfocitos T al sitio del daño (Appay et al. 2001). Durante la mastitis bovina RANTES juega un papel importante en el mantenimiento de la inflamación. En las CEMB es responsable de inducir la migración de mastocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y linfocitos T, contribuyendo al desarrollo de la inflamación crónica (Griesbeck-Zilch et al. 2008). Los tratamientos con AG y DAG de semilla de aguacate mexicano (1 ng/mL y 100 ng/mL) no modificaron la expresión del

ARNm de RANTES (Figura 11B). Lo mismo ocurrió en las CEMB tratadas con los AG y DAG e infectadas, este efecto puede deberse a la mezcla de moléculas lipídicas que están modulando la respuesta proinflamatoria, evitando la expresión de RANTES. En diversas investigaciones se ha demostrado que los AG modulan la expresión de RANTES, en un modelo *in vitro* de asma utilizando las células epiteliales alveolares A549, se demostró que las células tratadas con los ácidos ω -linoleico, linoleico oleico (10 μ g/mL) no modificaron la producción de RANTES, mientras que los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico inhibieron la producción de esta quimiocina. Estos datos son congruentes con lo observado para los AG y DAG de aguacate en las CEMB.

La IL-10 es una citocina directamente involucrada en la respuesta anti-inflamatoria, aunque se ha reportado que la IL-10 no se expresa en células epiteliales mamarias bovinas (Okada, et al. 1997). Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo se reportó que la infección con *S. aureus* ATCC 27543 indujo la expresión de IL-10 (~6 veces) en las CEMB, y que los tratamientos con colecalciferol logran modular su expresión (Alva-Murillo et al. 2014). En el mismo sentido, los AG poliinsaturados inducen la expresión y secreción de IL-10 en adipocitos de murino (Bradley et al. 2012); además de un incremento en la expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, inhibiendo la activación de NF- κ B (Loscher et al. 2005). Las CEMB tratadas con los AG y DAG mostraron un incremento en la expresión de IL-10 dependiente de la concentración, mientras que en las CEMB tratadas e infectadas se incrementó la expresión de IL-10 (~20 veces) en la concentración de 100 ng/mL (Figura 12). Este efecto se relacionó directamente con la disminución en la internalización de *S. aureus*. Además, el incremento en la expresión del ARNm de IL-10 puede estar relacionado con la inhibición de la expresión de TNF- α , ya que como se ha reportado los AG inhiben al factor NF- κ B a través de los PPARs (Straus, et al. 2007; Singer, et al. 2008). Los resultados de este trabajo son coincidentes con lo reportado por Lee y col. (2014), quienes reportan que los ácidos grasos ω -3 (ácido linoleico, ácido α -linoleico y el ácido docosahexaenoico) inhiben la expresión de la quimiocina proinflamatoria IL-8 y diferentes factores transcripcionales (entre ellos NF- κ B y AP-1) en células epiteliales gástricas, infectadas con *Helicobacter pylori*, presentando efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores.

Respecto a los péptidos antimicrobianos, éstos son moléculas que contribuyen activamente en la RII por la acción directa contra la infección microbiana y como parte de la respuesta inflamatoria (Cormican et al. 2008). Se ha reportado que las CEMB expresan diversos péptidos antimicrobianos, entre ellos las β -defensinas. Durante la RII de la glándula mamaria bovina ante infecciones bacterianas se ha reportado que la expresión de la β -defensina de neutrófilo bovino se incrementa significativamente (Roosen et al. 2004; Swanson et al. 2004; Ochoa-Zarzosa et al. 2009). Otro péptido antimicrobiano que se ha relacionado con la respuesta de las CEMB ante el ataque de bacterias, en especial *S. aureus*, es el péptido antimicrobiano traqueal (TAP) (López-Meza et al. 2009). Los tratamientos con los AG y DAG de aguacate mexicano no indujeron la expresión de TAP en las CEMB, sin embargo, en CEMB infectadas con *S. aureus* se indujo la expresión hasta 3 veces de forma dependiente de la concentración (Figura 13A). De acuerdo a estos resultados se sugiere que el aumento en la expresión de TAP está relacionado con la inhibición de la internalización de *S. aureus*, debido al efecto antimicrobiano que éste presenta (Roosen et al. 2004). Sin embargo, se requieren más experimentos para determinar el mecanismo por el cual los AG y DAG inducen la expresión de TAP si esto se relaciona con la eliminación de la bacteria.

Por otro lado, las β -defensinas se expresan en la glándula mamaria en respuesta a infecciones bacterianas. La defensina de neutrófilo bovino 5 (BNBD5) se expresa en la glándula mamaria bovina, en especial en las CEMB, y la intensidad de la expresión depende del estímulo bacteriano (Goldammer et al. 2004). En las CEMB tratadas con los AG y DAG de aguacate mexicano e infectadas con *S. aureus*, se observó un aumento de la expresión del ARNm de esta defensina de forma dependiente de la concentración (Figura 13B). Estos resultados coinciden con lo observado para TAP. En este sentido, el incremento en la expresión del ARNm de los dos péptidos antimicrobianos evaluados sugiere que la menor internalización de la bacteria en las CEMB podría ser debida a la actividad antimicrobiana de estas moléculas (Figura 10).

9. CONCLUSIÓN

Los AG y DAG de semilla de aguacate mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhiben preferencialmente la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Además, modulan diferencialmente la respuesta inmune innata ya que ejercen una actividad antiinflamatoria, debido a que mantienen o inhiben la expresión de TNF- α y RANTES, pero inducen la expresión de IL-10 y la de los péptidos antimicrobianos TAP y BNBD5.

10. LITERATURA CITADA

Abaineh, D. y A. Sintayehu (2001). "Treatment trial of subclinical mastitis with the herb *Persicaria senegalense* (Polygonaceae)." Trop Anim Health Prod 33(6): 511-519.

Aitken, S. L., C. M. Corl y L. M. Sordillo (2011). "Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution." J Mammary Gland Biol Neoplasia 16(4): 291-304.

Alekseeva, L., L. Rault, S. Almeida, P. Legembre, V. Edmond, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even, F. Taieb, Y. Arlot-Bonnemains, Y. Le Loir y N. Berkova (2013). "*Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency." PLoS One 8(5): e63279.

Alva-Murillo, N., J. E. López-Meza y A. Ochoa-Zarzosa (2014). "Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization." Biomed Res Int 2014: 538546.

Alva-Murillo, N., A. Ochoa-Zarzosa y J. E. López-Meza (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(2-4): 324-331.

Alva-Murillo, N., A. Ochoa-Zarzosa y J. E. López-Meza (2013). "Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization." Biomed Res Int 2013: 927643.

Alva-Murillo, N., A. D. Téllez-Pérez, I. Medina-Estrada, C. Álvarez-Aguilar, A. Ochoa-Zarzosa y J. E. López-Meza (2014). "Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization." Microb Pathogenesis 77: 24-30.

Alva-Murillo, N., A. D. Téllez-Pérez, E. Sagrero-Cisneros, J. E. López-Meza y A. Ochoa-Zarzosa (2012). "Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells." Cell Immunol 280(1): 108-112.

Anaya-López, J. L., O. E. Contreras-Guzmán, A. Carabez-Trejo, V. M. Baizabal-Aguirre, J. E. López-Meza, J. J. Valdez-Alarcón y A. Ochoa-Zarzosa (2006). "Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis." Res Vet Sci 81(3): 358-361.

Aoki, T. y S. Narumiya (2012). "Prostaglandins and chronic inflammation." Trends Pharmacol Sci 33(6): 304-311.

Appay, V. y S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." *Trends Immunol* 22(2): 83-87.

Atalla, H., B. Wilkie, C. Gyles, K. Leslie, L. Mutharia y B. Mallard (2010). "Antibody and cell-mediated immune responses to *Staphylococcus aureus* small colony variants and their parental strains associated with bovine mastitis." *Dev Comp Immunol* 34(12): 1283-1290.

Au, R. Y., T. K. Al-Talib, A. Y. Au, P. V. Phan y C. G. Frondoza (2007). "Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages." *Osteoarthr Cartilage* 15(11): 1249-1255.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken y R. N. Zadoks (2006). "Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis." *J Dairy Sci* 89(6): 1877-1895.

Bello-González, M. A. (2006). "Catálogo de plantas medicinales de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México." Libro técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan, CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México: 138 p.

Beno-Moualem, D. y D. Prusky (2000). "Early events during quiescent Infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits." *Phytopathology* 90(5): 553-559.

Bora, P. S., N. Narain, R.V.M., Rocha y M. Q., Paulo (2001). "Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits." *Grasas y Aceites* 52: 171-174.

Bougarn, S., P. Cunha, F. B. Gilbert, F. Meurens y P. Rainard (2011). "Technical note: Validation of candidate reference genes for normalization of quantitative PCR in bovine mammary epithelial cells responding to inflammatory stimuli." *J Dairy Sci* 94(5): 2425-2430.

Bougarn, S., P. Cunha, A. Harmache, A. Fromageau, F. B. Gilbert y P. Rainard (2010). "Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells." *Clin Vaccine Immunol* 17(11): 1797-1809.

Boulanger, V., L. Bouchard, X. Zhao y P. Lacasse (2001). "Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes." *J Dairy Sci* 84(6): 1430-1437.

Bradley, A. J. (2002). "Bovine Mastitis: An Evolving Disease." *Vet J* 164(2): 116-128.

Broz, P. y D. M. Monack (2011). "Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections." *Immunol Rev* 243(1): 174-190.

Bryan, D. L., K. D. Forsyth, P. H. Hart y R. A. Gibson (2006). "Polyunsaturated fatty acids regulate cytokine and prostaglandin E2 production by respiratory cells in response to mast cell mediators." *Lipids* 41(12): 1101-1107.

Burvenich, C., D. D. Bannerman, J. D. Lippolis, L. Peelman, B. J. Nonnecke, M. E. Kehrli, Jr. y M. J. Paape (2007). "Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period." *J Dairy Sci* 90 Suppl 1: E39-54.

Calder, P. C. (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?" *Br J Clin Pharmacol* 75(3): 645-662.

Commins, S. P., L. Borish y J. W. Steinke (2010). "Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines." *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S53-72.

Conlon, B. P. (2014). "*Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease." *Bioassays* 36(10): 991-996.

Cormican, P., K. G. Meade, S. Cahalane, F. Narciandi, A. Chapwanya, A. T. Lloyd y C. O'Farrelly (2008). "Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine beta-defensins." *Immunogenetics* 60(3-4): 147-156.

Chavez, D. y R. Mata (1998). "Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*." *J Nat Prod* 61(5): 580-584.

Chen, C. H., Y. Wang, T. Nakatsuji, Y. T. Liu, C. Zouboulis, R. Gallo, L. Zhang, M. F. Hsieh y C. M. Huang (2011). "An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a therapy concordant with evolutionary medicine." *J Microbiol Biotechnol* 21(4): 391-399.

D'Ambrosio, S. M., C. Han, L. Pan, A. D. Kinghorn y H. Ding (2011). "Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 409(3): 465-469.

Dabas, D., R. M. Shegog, G. R. Ziegler y J. D. Lambert (2013). "Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals." *Curr Pharm Des* 19(34): 6133-6140.

Dahiya, P. y S. Purkayastha (2012). "Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates." *Indian J Pharm Sci* 74(5): 443-450.

De, U. K. y R. Mukherjee (2009). "Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis." *Trop Anim Health Prod* 41(2): 189-197.

De Vlieghe, S., L. K. Fox, S. Piepers, S. McDougall y H. W. Barkema (2012). "Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control." *J Dairy Sci* 95(3): 1025-1040.

Dinarello, C. A. (2007). "Historical insights into cytokines." *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S34-45.

Ding, H., Y. W. Chin, A. D. Kinghorn y S. M. D'Ambrosio (2007). "Chemopreventive characteristics of avocado fruit." *Semin Cancer Biol* 17(5): 386-394.

Dreher, M. L. y A. J. Davenport (2013). "Hass avocado composition and potential health effects." *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(7): 738-750.

Donnarumma, G., E. Buommino, A. Baroni, L. Auricchio, A. De Filippis, V. Cozza, P. Msika, N. Piccardi y M. A. Tufano (2007). "Effects of AV119, a natural sugar from avocado, on *Malassezia furfur* invasiveness and on the expression of HBD-2 and cytokines in human keratinocytes." *Exp Dermatol* 16(11): 912-919.

Emmendorffer, A., H. Wagner y M. L. Lohmann-Matthes (1999). "Immunologically active polysaccharides from *Echinacea purpurea* plant and cell cultures. Immunomodulatory Agents from Plants." *Prog Inflamm Res*: 89-104.

Erskine, R. J., P. C. Bartlett, S. R. Tavernier, L. H. Fowler, R. D. Walker, J. H. Seguin y D. Shuster (1998). "Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation." *J Dairy Sci* 81(1): 107-115.

Flannagan, R. S., V. Jaumouille y S. Grinstein (2012). "The cell biology of phagocytosis." *Annu Rev Pathol* 7: 61-98.

Foster, T. J. (2005). "Immune evasion by staphylococci." *Nat Rev Microbiol* 3(12): 948-958.

Fournier, B. (2012). "The function of TLR2 during staphylococcal diseases." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 167.

Fratini, F., S. Casella, M. Leonardi, F. Pisseri, V. V. Ebani, L. Pistelli y L. Pistelli (2014). "Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis." *Fitoterapia* 96: 1-7.

Fraunholz, M. y B. Sinha (2012). "Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die." *Front Cell Infect Microbiol* 2: 43.

Gabay, O., M. Gosset, A. Levy, C. Salvat, C. Sánchez, A. Pigenet, A. Sautet, C. Jacques y F. Berenbaum (2008). "Stress-induced signaling pathways in hyalin chondrocytes: inhibition by Avocado-Soybean Unsaponifiables (ASU)." *Osteoarthritis Cartilage* 16(3): 373-384.

Gallo, R. L. y L. V. Hooper (2012). "Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine." *Nat Rev Immunol* 12(7): 503-516.

Garzoni, C. y W. L. Kelley (2009). "*Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence." *Trends Microbiol* 17(2): 59-65.

Garzoni, C. y W. L. Kelley (2011). "Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*." *EMBO Mol Med* 3(3): 115-117.

González-Gallego, J., M. V. García-Mediavilla, S. Sánchez-Campos y M. J. Tunon (2010). "Fruit polyphenols, immunity and inflammation." *Br J Nutr* 104 Suppl 3: S15-27.

Gordon, R. J. y F. D. Lowy (2008). "Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5: S350-359.

Griedrys-Kalemba, S., M., Pietrzac-Nowacka, J., Halasa, y J., Lutomski (1992). "Influence of a flavonoid asponoside complex from the seeds of *Digitalis purpurea* L., on some immunological indices in experimental animals." *Herba-Polonica*: 129-136.

Griesbeck-Zilch, B., H. H. Meyer, C. H. Kuhn, M. Schwerin y O. Wellnitz (2008). "*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells." *J Dairy Sci* 91(6): 2215-2224.

Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot y V. Kaltsatos (2001). "Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives." *Adv Drug Deliv Rev* 50(3): 245-259.

Gutiérrez-Barroso, A., J. L. Anaya-Lopez, L. Lara-Zarate, P. D. Loeza-Lara, J. E. Lopez-Meza y A. Ochoa-Zarzosa (2008). "Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells." *Vet Immunol Immunopathol* 121(1-2): 113-122.

Gwynn, P. (1991). "Some alternatives to antibiotics, British mastitis conference" Proceedings of the 4th British Mastitis Conference Stonelieigh, UK: 36-41.

Hauck, C. R. y K. Ohlsen (2006). "Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*." *Curr Opin Microbiol* 9(1): 5-11.

Heinecke, L. F., M. W. Grzanna, A. Y. Au, C. A. Mochal, A. Rashmir-Raven y C. G. Frondoza (2010). "Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate." *Osteoarthritis Cartilage* 18(2): 220-227.

Hoffmann, C., K. Ohlsen y C. R. Hauck (2011). "Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria." *Eur J Cell Biol* 90(11): 891-896.

Hogeveen, H., K. Huijps y T. J. Lam (2011). "Economic aspects of mastitis: new developments." *N Z Vet J* 59(1): 16-23.

Hollebeeck, S., T. Raas, N. Piront, Y. J. Schneider, O. Toussaint, Y. Larondelle y A. During (2011). "Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the in vitro intestinal Caco-2 cell model." *Toxicol Lett* 206(3): 268-275.

Huang, S., J. M. Rutkowski, R. G. Snodgrass, K. D. Ono-Moore, D. A. Schneider, J. W. Newman, S. H. Adams y D. H. Hwang (2012). "Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways." *J Lipid Res* 53(9): 2002-2013.

Kachroo, A. y P. Kachroo (2009). "Fatty Acid-derived signals in plant defense." *Annu Rev Phytopathol* 47: 153-176.

Kashman, Y., I. Néeman y A. Lifshitz (1969). "New compounds from avocado pear." *Tetrahedron* 25(18): 4617-4631.

Kenny, J. G., D. Ward, E. Josefsson, I. M. Jonsson, J. Hinds, H. H. Rees, J. A. Lindsay, A. Tarkowski y M. J. Horsburgh (2009). "The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications." *PLoS One* 4(2): e4344.

Kerro Dego, O., J. E. van Dijk y H. Nederbragt (2002). "Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review." *Vet Q* 24(4): 181-198.

Kim, H. K., J. Y. Lee, H. S. Han, Y. J. Kim, H. J. Kim, Y. S. Kim, H. M. Kim, S. G. Ko, H. J. An, Y. J. Lee y W. Park (2012). "Immunomodulatory effects of *Liriope platyphylla* water extract on lipopolysaccharide-activated mouse macrophage." *Nutrients* 4(12): 1887-1897.

Kim, K. W., J. Im, J. H. Jeon, H. G. Lee, C. H. Yun y S. H. Han (2011). "*Staphylococcus aureus* induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE y NF- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34(4): 347-354.

Kim, O. K., A. Murakami, Y. Nakamura, N. Takeda, H. Yoshizumi y H. Ohigashi (2000). "Novel Nitric Oxide and Superoxide Generation Inhibitors, Persenone A and B, from Avocado Fruit." *J Agr Food Chem* 48(5): 1557-1563.

Kim, Y., H. Atalla, B. Mallard, C. Robert y N. Karrow (2011). "Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*." *BMC Vet Res* 7: 51.

Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin y M. I. Active Bacterial Core surveillance (2007). "Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States." *JAMA* 298(15): 1763-1771.

Kumar, H., T. Kawai y S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* (30): 16-34.

Lahouassa, H., E. Moussay, P. Rainard y C. Riollet (2007). "Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." *Cytokine* 38(1): 12-21.

Langer, H. F. y T. Chavakis (2009). "Leukocyte-endothelial interactions in inflammation." *J Cell Mol Med* 13(7): 1211-1220.

Lara-Zarate, L., J. E. López-Meza y A. Ochoa-Zarzosa (2011). "*Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells." *Microb Pathog* 51(5): 313-318.

Lawrence, T. y D. W. Gilroy (2007). "Chronic inflammation: a failure of resolution?" *Int J Exp Pathol* 88(2): 85-94.

Lee, J. Y., J. Ye, Z. Gao, H. S. Youn, W. H. Lee, L. Zhao, N. Sizemore y D. H. Hwang (2003). "Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and

phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids." J Biol Chem 278(39): 37041-37051.

Lee, W. L. y W. C. Liles (2011). "Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections." Curr Opin Hematol 18(3): 191-196.

Linde, A., C. R. Ross, E. G. Davis, L. Dib, F. Blecha y T. Melgarejo (2008). "Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine." J Vet Intern Med 22(2): 247-265.

López-Meza, J. E., A. Gutiérrez-Barroso y A. Ochoa-Zarzosa (2009). "Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells." Res Vet Sci 87(1): 59-63.

Loscher, C. E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K. H. Mills y H. M. Roche (2005). "Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction." J Immunol 175(8): 4990-4998.

Lowy, F. D. (1998). "*Staphylococcus aureus* Infections." New Engl J Med 339(8): 520-532.

Lowy, F. D. (2003). "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*." J Clin Invest 111(9): 1265-1273.

Lutzow, Y. C., L. Donaldson, C. P. Gray, T. Vuocolo, R. D. Pearson, A. Reverter, K. A. Byrne, P. A. Sheehy, R. Windon y R. L. Tellam (2008). "Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection." BMC Vet Res 4: 18.

Majtan, J. y V. Majtan (2011). "Dimethyl sulfoxide attenuates TNF-alpha-induced production of MMP-9 in human keratinocytes." J Toxicol Environ Health A 74(20): 1319-1322.

McCarthy, A. J. y J. A. Lindsay (2013). "*Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: a bioinformatics study." Infect Genet Evol 19: 7-14.

Monzani, P. S., F. F. Bressan, L. G. Mesquita, J. R. Sangalli y F. V. Meirelles (2011). "beta-casein gene expression by in vitro cultured bovine mammary epithelial cells derived from developing mammary glands." Genet Mol Res 10(2): 604-614.

Mukherjee, R., P. K. Dash y G. C. Ram (2005). "Immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* (L) in bovine subclinical mastitis." Res Vet Sci 79(1): 37-43.

Mushegian, A. y R. Medzhitov (2001). "Evolutionary perspective on innate immune recognition." J Cell Biol 155(5): 705-710.

Nakatsuji, T., M. C. Kao, L. Zhang, C. C. Zouboulis, R. L. Gallo y C.-M. Huang (2010). "Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating [beta]-defensin-2 expression." *J Invest Dermatol* 130(4): 985-994.

Newton, K. y V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(3).

Nicholls, E. F., L. Madera y R. E. Hancock (2010). "Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy." *Ann N Y Acad Sci* 1213: 46-61.

Novak, T. E., T. A. Babcock, D. H. Jho, W. S. Helton y N. J. Espat (2003). "NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1): L84-89.

Ochoa-Zarzosa, A., E. Villarreal-Fernandez, H. Cano-Camacho y J. E. López-Meza (2009). "Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes." *Microb Pathog* 47(1): 1-7.

Okada, H., T. Ito, H. Ohtsuka, R. Kirisawa, H. Iwai, K. Yamashita, T. Yoshino y T. J. Rosol (1997). "Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*." *J Vet Med Sci* 59(7): 503-507.

Otto, M. (2012). "MRSA virulence and spread." *Cell Microbiol* 14(10): 1513-1521.

Otuki, M. F., O. Schwob, A. Silveira Prudente, I. Zaltsman, S. Meretski, J. Segal, S. Yedgar y G. Rosenblat (2011). "Attenuation of experimental TPA-induced dermatitis by acetylenic acetogenins is associated with inhibition of PLA(2) activity." *Eur J Pharmacol* 672(1-3): 175-179.

Paape, M. J., K. Shafer-Weaver, A. V. Capuco, K. Van Oostveldt y C. Burvenich (2000). "Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells." *Adv Exp Med Biol* 480: 259-277.

Paoletti, I., E. Buommino, L. Tudisco, C. Baudouin, P. Msika, M. A. Tufano, A. Baroni y G. Donnarumma (2010). "Patented natural avocado sugars modulate the HBD-2 expression in human keratinocytes through the involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases." *Arch Dermatol Res* 302(3): 201-209.

Papa, R., M. Artini, A. Cellini, M. Tilotta, E. Galano, P. Pucci, A. Amoresano y L. Selan (2013). "A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by

the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*." *Microb Pathog* 63: 44-53.

Petrone, G., M. P. Conte, C. Longhi, S. Di Santo, F. Superti, M. G. Ammendolia, P. Valenti y L. Seganti (1998). "Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*." *Lett Appl Microbiol* 27(6): 362-368.

Quintin, J., S. C. Cheng, J. W. van der Meer y M. G. Netea (2014). "Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms." *Curr Opin Immunol* 29: 1-7.

Rainard, P. y C. Riollot (2006). "Innate immunity of the bovine mammary gland." *Vet Res* 37(3): 369-400.

Ramos-Jerz Mdel, R. (2007). "Phytochemical analysis of avocado seed (*Persea americana* Mill, Cv. Hass." *Cuvllier Verlag Göttingen* p. 11-47.

Robert, A., H. Seegers y N. Bareille (2006). "Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows a quantitative analysis of published data." *Vet Res* 37(1): 25-48.

Rodríguez-Sánchez, D., C. Silva-Platas, R. P. Rojo, N. García, L. Cisneros-Zevallos, G. García-Rivas y C. Hernández-Brenes (2013). "Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*)." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 942-943: 37-45.

Rodríguez-Sánchez, D. G., A. Pacheco, M. I. García-Cruz, J. A. Gutiérrez-Urbe, J. A. Benavides-Lozano y C. Hernández-Brenes (2013). "Isolation and structure elucidation of avocado seed (*Persea americana*) lipid derivatives that inhibit *Clostridium sporogenes* endospore germination." *J Agric Food Chem* 61(30): 7403-7411.

Rodríguez-Saona, C. y J. T. Trumble (2000). "Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells." *Curr Org Chem* 4(12): 1249-1260.

Roosen, S., K. Exner, S. Paul, J. M. Schroder, E. Kalm y C. Looft (2004). "Bovine beta-defensins: identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue." *Mamm Genome* 15(10): 834-842.

Rose, D. P. y J. M. Connolly (1990). "Effects of fatty acids and inhibitors of eicosanoid synthesis on the growth of a human breast cancer cell line in culture." *Cancer Res* 50(22): 7139-7144.

- Rosenblat, G., S. Meretski, J. Segal, M. Tarshis, A. Schroeder, A. Zanin-Zhorov, G. Lion, A. Ingber y M. Hochberg (2011). "Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells." *Arch Dermatol Res* 303(4): 239-246.
- Ruegg, P. L. (2009). "Management of mastitis on organic and conventional dairy farms." *J Anim Sci* 87(13 Suppl): 43-55.
- Sánchez-Pérez, J. d. I. L. (1999). "Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* Mill.) y especies afines en México." *Revista Chapingo serie horticultura* 5: 7-18.
- Sánchez C., M. Gupta, y A. I., S. (2002). "Actividad inmunomoduladora de las plantas (I)." *Revista de fitoterapia* 2(2): 151-153.
- Sandgren, C. H., K. P. Waller y U. Emanuelson (2008). "Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation." *Vet J* 175(1): 108-117.
- Schleimer, R. P., A. Kato, R. Kern, D. Kuperman y P. C. Avila (2007). "Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses." *J Allergy Clin Immunol* 120(6): 1279-1284.
- Shi, F. y J. Sottile (2008). "Caveolin-1-dependent beta1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover." *J Cell Sci* 121(Pt 14): 2360-2371.
- Shinefield, H. R. y N. L. Ruff (2009). "Staphylococcal infections: a historical perspective." *Infect Dis Clin North Am* 23(1): 1-15.
- Shukla, S., V. Bajpai y M. Kim (2014). "Plants as potential sources of natural immunomodulators." *Rev Environ Sci and Bio/Technology* 13(1): 17-33.
- Singer, P., H. Shapiro, M. Theilla, R. Anbar, J. Singer y J. Cohen (2008). "Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective." *Intensive Care Med* 34(9): 1580-1592.
- Sinha, B. y M. Fraunholz (2010). "*Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events." *Int J Med Microbiol* 300(2-3): 170-175.
- Strandberg, Y., C. Gray, T. Vuocolo, L. Donaldson, M. Broadway y R. Tellam (2005). "Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells." *Cytokine* 31(1): 72-86.

Straus, D. S. y C. K. Glass (2007). "Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms." *Trends Immunol* 28(12): 551-558.

Striz, I., E. Brabcova, L. Kolesar y A. Sekerkova (2014). "Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy." *Clin Sci (Lond)* 126(9): 593-612.

Sun, H., Y. Hu, Z. Gu, R. T. Owens, Y. Q. Chen y I. J. Edwards (2011). "Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway." *Carcinogenesis* 32(10): 1518-1524.

Swanson, K., S. Gorodetsky, L. Good, S. Davis, D. Musgrave, K. Stelwagen, V. Farr y A. Molenaar (2004). "Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis." *Infect Immun* 72(12): 7311-7314.

Téllez-Pérez, A. D., N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa y J. E. Lopez-Meza (2012). "Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization." *Vet Microbiol* 160(1-2): 91-98.

Tilley, S. L., T. M. Coffman y B. H. Koller (2001). "Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes." *J Clin Invest* 108(1): 15-23.

Valdez-Partida, J. (2011). "Determinación del contenido, variación fenológica y efecto citotóxico de persina de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)." Tesis de maestría IIQB U.M.S.N.H. p 1-69
<http://hdl.handle.net/123456789/6439>.

Vance, R. E., R. R. Isberg y D. A. Portnoy (2009). "Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system." *Cell Host Microbe* 6(1): 10-21.

Velázquez-Becerra, C., L. I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, I. Flores-Cortez, G. Santoyo, C. Hernández-Soberano y E. Valencia-Cantero (2013). "The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*." *Protoplasma* 250(6): 1251-1262.

Wahli, W. y L. Michalik (2012). "PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation." *Trends Endocrinol Metab* 23(7): 351-363.

Wellnitz, O. y R. M. Bruckmaier (2012). "The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection." *Vet J* 192(2): 148-152.

Wellnitz, O. y D. E. Kerr (2004). "Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection." *Vet Immunol Immunopathol* 101(3-4): 191-202.

Xiao, W., M. N. Mindrinos, J. Seok, J. Cuschieri, A. G. Cuenca, H. Gao, D. L. Hayden, L. Hennessy, E. E. Moore, J. P. Minei, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, B. H. Brownstein, P. H. Mason, H. V. Baker, C. C. Finnerty, M. G. Jeschke, M. C. Lopez, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. Arnoldo, W. Xu, Y. Zhang, S. E. Calvano, G. P. McDonald-Smith, D. A. Schoenfeld, J. D. Storey, J. P. Cobb, H. S. Warren, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, S. F. Lowry, R. V. Maier, R. W. Davis y R. G. Tompkins (2011). "A genomic storm in critically injured humans." *J Exp Med* 208(13): 2581-2590.

Yang, W., H. Zerbe, W. Petzl, R. M. Brunner, J. Gunther, C. Draing, S. von Aulock, H. J. Schuberth y H. M. Seyfert (2008). "Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF-alpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder." *Mol Immunol* 45(5): 1385-1397.

Yaqoob, P. y P. C. Calder (2007). "Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms." *Br J Nutr* 98 Suppl 1: S41-45.

Yonezawa, T., S. Haga, Y. Kobayashi, K. Katoh y Y. Obara (2008). "Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 367(4): 729-735.

Zadoks, R. N., J. R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm y Y. H. Schukken (2011). "Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16(4): 357-372.

Zbinden, C., R. Stephan, S. Johler, N. Borel, J. Bunter, R. M. Bruckmaier y O. Wellnitz (2014). "The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype." *PLoS One* 9(1): e87374.

Zecconi, A., R. Piccinini, S. Fiorina, L. Cabrini, V. Dapra y M. Amadori (2009). "Evaluation of interleukin-2 treatment for prevention of intramammary infections in cows after calving." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32(5): 439-451.

Zecconi, A. y F. Scali (2013). "*Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases." *Immunol Lett* 150(1-2): 12-22.

Zeidler, D., U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler y J. Durner (2004). "Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide

synthase (NOS) and induce defense genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15811-15816.

Zlotnik, A. y O. Yoshie (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* 36(5): 705-716.