



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

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

**Regulación de la respuesta inmune innata de células de epitelio  
mamario bovino por nisina, quitosano y el compuesto nisina-  
quitosano: Un estudio en células infectadas con  
*Staphylococcus aureus***

Tesis

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Biológicas**

Área Temática: Biotecnología Pecuaria

Presenta:

**L.G.A. María Guadalupe Sandoval Flores**

Director:

**Dr. Joel Edmundo López Meza**

Co-director:

**Dr. Pedro Damián Loeza Lara**

Mayo de 2022, Morelia, Michoacán, México.

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-dirección del Dr. Pedro Damián Loeza Lara. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.5) y CONACyT (FP-08-316003 y beca 758843).

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a CONACyt por la beca (758843) otorgada y a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por abrirme las puertas al conocimiento.

Agradezco a mis asesores, el Dr. Joel Edmundo López Meza y el Dr. Pedro Damián Loeza Lara por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para mi formación académica. Además de agradecer el apoyo que me brindaron en el aspecto personal.

Así mismo, al comité sinodal conformado por la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, Dr. Gerardo Vázquez Marrufo y el Dr. Rafael Salgado Garciglia por las aportaciones a este trabajo y contribuir a mi formación académica.

A mis padres que a pesar de las circunstancias que se presentan están apoyándome incondicionalmente. A mis hermanos y familia por el ánimo brindado.

A Omar, mis amigos y compañeros por brindarme su apoyo y hacer de la maestría una experiencia más amena y placentera.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Mastitis bovina.....	6
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.3 Glándula mamaria: respuesta inmune innata.....	9
2.4 Glándula mamaria: infección e internalización de <i>S. aureus</i> .....	10
2.5 Nisina.....	13
2.6 Quitosano.....	17
2.7 Compósito.....	22
III. ANTECEDENTES.....	25
IV. JUSTIFICACIÓN.....	26
V. HIPÓTESIS.....	27
VI. OBJETIVOS.....	27
6.1 General.....	27
6.2 Específicos.....	27
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
7.1 Reactivos y cepas.....	29
7.2 Cultivo celular.....	29
7.3 Viabilidad de células de epitelio mamario bovino (CEMB) y crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	30
7.4 Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB.....	31
7.5 Extracción de ARN y oligonucleótidos para qPCR.....	31
7.6 Análisis estadístico.....	32
VIII. RESULTADOS.....	33
8.1 Efecto de la nisina y el quitosano sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	33
8.2 Efecto de la nisina y el quitosano sobre la viabilidad de las CEMB.....	33
8.3 Efecto del compósito nisina-quitosano sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> y viabilidad de las CEMB.....	37
8.4 Efecto de nisina, quitosano, el compósito nisina-quitosano sobre y/o la infección por <i>S. aureus</i> sobre la producción de NO en las CEMB.....	40

8.5	Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 .....	42
8.6	Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y la quimiocina IL-8 .....	46
8.7	Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la expresión de los péptidos antimicrobianos DEFB1, TAP y BNBD10 .....	49
IX.	DISCUSIÓN .....	53
X.	CONCLUSIÓN .....	63
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
XII.	REFERENCIAS ELECTRÓNICAS .....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Factores de virulencia asociados a la patogenicidad e internalización de <i>S. aureus</i> .....	8
Figura 2. Sistema inmunológico innato y adaptativo .....	10
Figura 3. Reconocimiento e internalización de <i>S. aureus</i> en células de epitelio mamario bovino.....	13
Figura 4. Variantes naturales de la nisina .....	14
Figura 5. Estructura de la nisina A .....	15
Figura 6. Efecto inmunomodulador de la nisina .....	17
Figura 7. Estructura de la quitina y quitosano .....	18
Figura 8. Actividad biológica del quitosano .....	19
Figura 9. Mecanismo de acción inmunomodulador del quitosano .....	22
Figura 10. Interacción del compuesto nisina-quitosano.....	24
Figura 11. Estrategia experimental general desarrollada en el presente trabajo .....	28
Figura 12. Efecto de la nisina sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	34
Figura 13. Efecto del quitosano sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	35
Figura 14. Efecto de la nisina sobre la viabilidad de las CEMB.....	36
Figura 15. Efecto del quitosano sobre la viabilidad de las CEMB.....	36
Figura 16. Efecto del compuesto nisina-quitosano sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> ..	38
Figura 17. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en presencia de la nisina, el quitosano y el compuesto .....	39
Figura 18. Efecto del compuesto nisina-quitosano sobre la viabilidad de las CEMB ....	40
Figura 19. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con nisina, el quitosano y el compuesto. ....	41
Figura 20. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con nisina, quitosano, el compuesto y la infección con <i>S. aureus</i> .....	42
Figura 21. Expresión génica de TNF- $\alpha$ en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto .....	43
Figura 22. Expresión génica de IL-6 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto .....	44
Figura 23. Expresión génica de IL-1 $\beta$ en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto.....	46
Figura 24. Expresión génica de IL-10 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto .....	47
Figura 25. Expresión génica de IL-8 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto. ....	48
Figura 26. Expresión génica de DEFB1 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto .....	50

Figura 27. Expresión génica de TAP en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito .....	51
Figura 28. Expresión génica de BNBD10 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito .....	52
Figura 29. Efecto de la nisina, el quitosano y el compósito sobre la RII en CEMB antes y después de la infección por <i>S. aureus</i> .....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Efectos de la nisina en la expresión de citocinas: estudios <i>in vitro</i> . ....	16
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la evaluación de la expresión génica de los distintos elementos de la RII .....	32



## RESUMEN

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria y *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno responsable, favoreciendo infecciones crónicas. La terapia con antibióticos ha sido deficiente como tratamiento, lo que muestra la necesidad de alternativas, como la nisina y quitosano. El objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto inmunomodulador de nisina, quitosano y el compuesto nisina-quitosano sobre la RII de células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) infectadas con *S. aureus*. Los resultados mostraron que el crecimiento de *S. aureus* (ATCC 27543) no se afectó por la nisina (1, 2.5, 5 µg/mL; 2 y 24 h), quitosano (10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL; 2 y 24 h) o el compuesto nisina-quitosano (1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL; 2 y 24 h). Solo la nisina a concentraciones >10 µg/mL (24 h) afectó el crecimiento de la bacteria. La nisina (1, 2.5, 5 y 10 µg/mL; 24 h), quitosano (10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL; 24 h) o el compuesto (1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL; 24 y 48 h) no afectaron la viabilidad de las CEMB, además, la nisina, quitosano o el compuesto, no modificaron la producción de óxido nítrico (NO) de las CEMB. La nisina (1 µg/mL) durante la infección, aumentó significativamente la producción de NO. Los resultados de RT-qPCR mostraron que el quitosano (10 µg/mL) indujo la expresión de la IL-1β (~2 veces). Por otro lado, la nisina (1 µg/mL), quitosano (10 µg/mL) o el compuesto (1/10 µg/mL), durante la infección, incrementaron la expresión de la IL-10 en ~2, ~4 y ~5 veces, respectivamente. Así mismo, estos compuestos revirtieron la represión sobre la expresión de la IL-8 ejercida por la infección. Además, el compuesto favoreció la expresión de la DEFB1 (~3 veces), ya que fue superior a la ejercida por las moléculas por separado.

**Palabras clave:** Glándula mamaria, mastitis bovina, internalización, crónica, inmunomodulación.

## ABSTRACT

Bovine mastitis is the inflammation of the mammary gland and *Staphylococcus aureus* is the main pathogen responsible, favoring chronic infections. The antibiotic therapy has been deficient as a treatment, showing the need for alternatives such as nisin and chitosan. The objective of this work was to evaluate the immunomodulatory effect of nisin, chitosan, and the nisin-chitosan composite on IIR of bovine mammary epithelial cells (bMECs) infected with *S. aureus*. The results showed that the growth of *S. aureus* (ATCC 27543) was not affected by the nisin (1, 2.5, 5 µg/mL; 2 and 24 h), chitosan (10, 25, 50, 75, and 100 µg/mL; 2 and 24 h), or the nisin/chitosan composite (1/10, 2.5/10 and 5/10 µg/mL; 2 and 24 h). Only nisin at concentrations >10 µg/mL (24 h) affected the growth of the bacteria. The nisin (1, 2.5, 5, and 10 µg/mL; 24 h), chitosan (10, 25, 50, 75, and 100 µg/mL; 24 h) or the composite (1/10, 2.5/10, and 5 /10 µg/mL; 24 and 48 h) did not affected the viability of the bMECs. Also, the nisin, chitosan, or composite did not modify the nitric oxide (NO) production of the bMECs. Nisin (1 µg/mL) together with the infection, significantly increased the production of NO. RT-qPCR analysis showed that the chitosan (10 µg/mL) induced IL-1β expression (~2-fold). On the other hand, the nisin (1 µg/mL), chitosan (10 µg/mL), or the composite (1/10 µg/mL), together with the infection, induced the expression of IL-10 (~2, ~4, and ~5 -fold, respectively). Likewise, they reversed the repression of IL-8 exerted by the infection. In addition, the composite favors a higher expression of DEFB1 (~3-fold) that the exerted by the separate molecules. In conclusion, the nisin, chitosan, or the composite differentially modulate the expression of IIR-related genes in bMECs infected with *S. aureus*.

## I. INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento fundamental en la dieta humana, ya que es una fuente importante de nutrientes que contribuye significativamente a satisfacer las necesidades nutricionales de los individuos, particularmente en la etapa de la niñez. A partir de este alimento se obtienen productos lácteos, es decir, productos alimenticios elaborados de la secreción de la glándula mamaria de animales sanos productores de leche, por ejemplo, ganado bovino. Por lo anterior, la producción y calidad de la leche es imprescindible para el consumo humano; sin embargo, la existencia de diversas patologías que afectan a la glándula mamaria, como la mastitis bovina, es una de las principales limitaciones en la producción y calidad de la leche en los hatos lecheros (Baraki et al., 2021; FDA, 2021).

La mastitis bovina es considerada la patología con mayor prevalencia y costosa en los hatos lecheros de todo el mundo. Esta enfermedad que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria y su incidencia en el ganado bovino lechero, causando pérdidas económicas importantes al comprometer la salud animal y por ende la producción de la leche (Idriss et al., 2021; Jung et al., 2021). Dependiendo de los signos clínicos de la enfermedad, se clasifica en mastitis clínica (con signos visibles) y subclínica (ausencia de signos). Existen diversas causas que generan la mastitis bovina, aunque los patógenos bacterianos son los principales responsables del desarrollo de esta afección. Estos microorganismos pueden ser adquiridos a través de dos vías, siendo la primera la infección ambiental, es decir, por el entorno en el que se encuentra el ganado, en donde el agente etiológico prevalente es la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, generalmente asociada a mastitis clínica; por otro lado, en la infección contagiosa el agente patógeno se trasmite de vacas infectadas a vacas no infectadas, a menudo durante el proceso de ordeño (manual o mecánico), predominando aquí la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, asociada a mastitis subclínica, es decir, a infecciones crónicas (Antanaitis et al., 2021; Jung et al., 2021).

No obstante, a pesar de la diversidad de microorganismos causantes de la mastitis bovina, *S. aureus* es el patógeno responsable de hasta un tercio de los casos de mastitis clínica y subclínica. El éxito de las infecciones recurrentes por

*S. aureus* se debe a la habilidad de este patógeno para evadir la respuesta inmune innata (RII) del hospedero; así como a su capacidad para sobrevivir dentro de diferentes tipos celulares de la glándula mamaria, dando lugar a infecciones crónicas. La patogenicidad de esta bacteria resulta de la acción combinada de diversos factores de virulencia que son expresados en las diferentes fases de la infección, que incluye la colonización, la evasión de la RII, la multiplicación y la diseminación. Por lo anterior, el tratamiento tradicional con antibióticos ha resultado deficiente, dado el proceso mecanicista de la infección por *S. aureus*. Aunado a lo anterior, el uso de dosis y tiempos de administración inadecuados ha favorecido la selección de bacterias con resistencia a los antibióticos (Pereyra et al., 2014; Idriss et al., 2021).

Debido a lo anterior, la búsqueda de moléculas de origen natural con potencial para el control de la mastitis bovina ha tomado auge en los últimos años, tal es el caso de la nisina (péptido antimicrobiano catiónico) y el quitosano (polímero lineal catiónico), compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés). Se ha descrito que ambas moléculas poseen actividad antimicrobiana (Sánchez et al., 2018) y ejercen una actividad inmunomoduladora. En este sentido, la nisina ha sido evaluada en modelos de estudio como leucocitos de sangre periférica en porcinos y en una línea celular epitelial mamaria bovina (BME-UV1) se observó que cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina A, disminuyen la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Malvisi et al., 2016; Malaczewska et al., 2019). Por su parte, el quitosano ha sido evaluado en modelos de estudio como macrófagos peritoneales de pollo de engorda y macrófagos murinos (RAW264.7), favoreciendo la expresión de la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF-  $\alpha$ , la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO); además, en ratones expuestos a una dieta basal complementada con quitosano, su efecto también se asoció con una disminución en la expresión de la interleucina 6 (IL-6), IL-1 $\beta$  y TNF-  $\alpha$  (citocinas pro-inflamatorias) (Li et al., 2014; Ning et al., 2015; Liu et al., 2016).

Por otro lado, el uso de compósitos ofrece bondades interesantes al aprovechar y maximizar las características de cada uno de los constituyentes que lo conforman, lo que da como resultado un material con propiedades que los

constituyentes no pueden alcanzar individualmente. Por ejemplo, se ha reportado el efecto antimicrobiano aditivo en el uso del compósito nisina-quitosano sobre aislados de *S. aureus* asociado a mastitis bovina. Así mismo, distintos compósitos de nanopartículas de quitosano-selenio, han mostrado un efecto inmunomodulador al regular a la baja los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en macrófagos murinos (RAW264.7), además de inducir la expresión del ARNm de la IL-8 en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahim et al., 2021; Sumayya y Muraleedhara, 2021).

Como se puede observar, el uso de moléculas naturales con actividad inmunomoduladora, aunado a las bondades que ofrece el uso de compósitos, se perfila como una alternativa a los tratamientos convencionales en el control de la mastitis bovina. Por todo lo anterior, en este trabajo de investigación se evaluó el efecto inmunomodulador de la nisina, el quitosano y del compósito nisina-quitosano.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Mastitis bovina

La producción y abasto de leche proveniente de ganado bovino se ha considerado como una de las actividades de mayor relevancia en el ámbito alimentario, ya que satisface a alrededor de 6,000 millones de personas en el mundo (FAO, 2019). Sin embargo, la productividad de este alimento se ve comprometida por el desarrollo de patologías en la glándula mamaria bovina como la mastitis (Arif et al., 2015). Esta enfermedad provoca la inflamación de la glándula mamaria, misma que puede resultar de múltiples factores como cambios fisiológicos y metabólicos, lesiones físicas o microorganismos patógenos, siendo este último el factor principal asociado a la enfermedad, la cual también se caracteriza por ser infectocontagiosa a causa de la diseminación de los microorganismos a los cuartos de la glándula mamaria durante el ordeño (Castro et al., 2020). Aunado a lo anterior, esta patología genera pérdidas económicas importantes, con un aproximado de 20 a 220 dólares anual/vaca, que se derivan de los servicios veterinarios, tratamientos, rendimiento reducido y baja calidad de la leche, sacrificio y reemplazo de las vacas infectadas (Hogeveen et al., 2011; Ezzat et al., 2014).

De acuerdo con la evolución de la enfermedad, ésta se presenta como aguda cuando hay un inicio repentino, una manifestación incrementada de signos clínicos y un periodo corto; en contraste, el estado crónico se caracteriza por no presentar signos clínicos por periodos prolongados y progresión lenta. Con base en los signos que presenta se clasifica en clínica y subclínica (Baeza, 2016; Kibebew, 2017). Cuando hay un aumento del tamaño y dolor en la glándula mamaria, una secreción de leche acompañada de grumos, pus y sangre, así como hipertermia en el animal, se sospecha de mastitis clínica. Por el contrario, la mastitis subclínica no presenta signos físicos de inflamación, por lo que es más difícil de detectar, observándose únicamente una disminución en la producción y calidad de la leche (Medina, 2017; Zeryehun y Abera, 2017). Se ha reportado que más del 90% de los casos clínicos y subclínicos de mastitis se deben a bacterias como *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Staphylococcus aureus*. Este último, es el patógeno que con mayor

frecuencia se aísla en casos de mastitis bovina (Hernández et al., 2015; Villanueva y Morales, 2017).

## **2.2 *Staphylococcus aureus***

La especie *S. aureus* es una bacteria Gram positiva, aerobia facultativa, no móvil y de morfología cocoide de aproximadamente 1 µm de diámetro (Medina, 2017; Lee et al., 2018). Este microorganismo patógeno es considerado la principal causa global de infecciones asociadas a hospitales y comunidades; así mismo, su relevancia en enfermedades infecciosas en animales bovinos como la mastitis; lo anterior, representa un desafío importante para la medicina humana y veterinaria (Li et al., 2017).

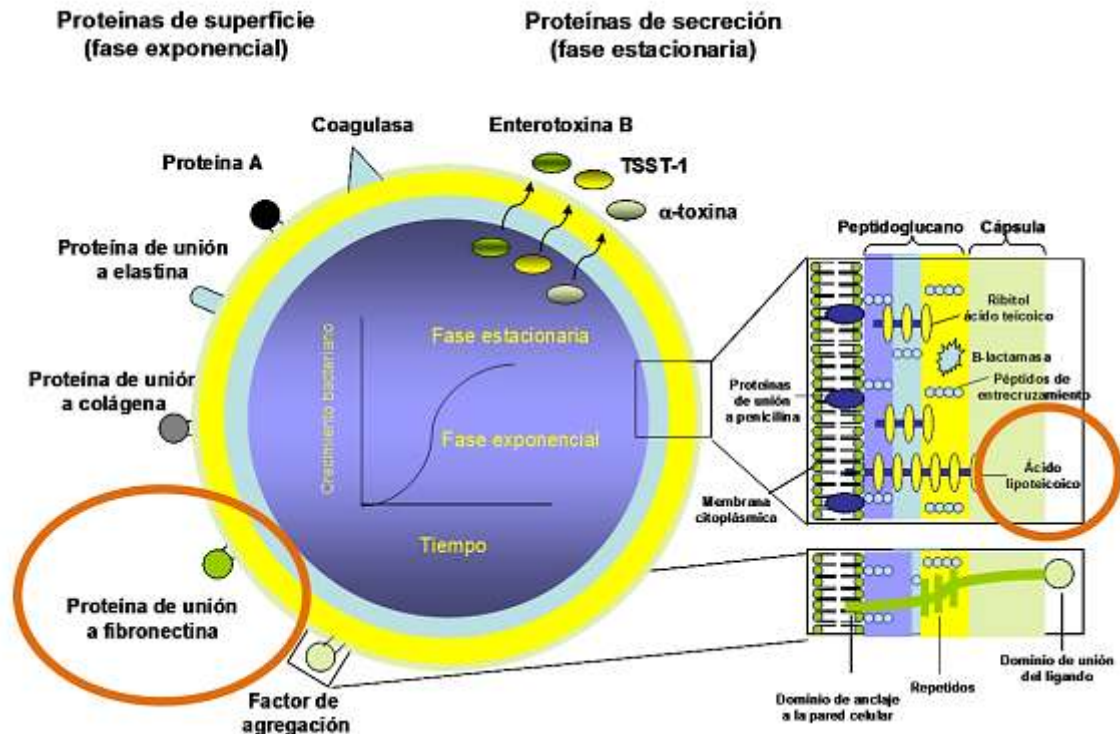
En la mastitis bovina, el uso de tratamiento intramamario con antibióticos ha sido el tratamiento más común para contrarrestar la enfermedad (Mushtaq et al., 2018). Sin embargo, el uso inadecuado de los antibióticos ha favorecido la selección de resistencia en cepas de *S. aureus* a una gran variedad de antibióticos. Esta resistencia se ha dado naturalmente a través de mutaciones genéticas, así como a la selección y adquisición de genes (vía la transferencia horizontal) entre cepas y especies (Pereyra et al., 2014; Castro et al., 2020). Aunado a lo anterior, este microorganismo tiene la habilidad de evadir la respuesta inmune de la célula hospedera y sobrevivir intracelularmente en diferentes tipos celulares, entre ellos, los presentes en la glándula mamaria. Estas características son proporcionadas por los factores de virulencia que se expresan en las distintas fases de crecimiento de la bacteria; los factores presentes en la superficie bacteriana se expresan principalmente en la fase logarítmica, mientras que en la fase estacionaria se producen los factores de secreción (Figura 1) (Camussone y Calvino, 2013).

Los factores de virulencia de *S. aureus* están asociados a:

- i) Producción de polisacáridos capsulares, que le confieren la capacidad de resistir o evadir la fagocitosis.
- ii) Formación de biopelículas, que son comunidades de células bacterianas adheridas a un sustrato o superficie, contenidas en una matriz de polímeros extracelulares que confieren resistencia a antibióticos y le permiten evadir la RII del hospedero.

- iii) Factores de adhesión: factor de agrupación A, adhesina de colágeno y proteínas de superficie de unión a fibronectina, esta última, íntimamente relacionada con la patogénesis e internalización de *S. aureus* al unirse a las proteínas de la matriz extracelular de la célula hospedera. Así mismo, el ácido lipoteicoico, uno de los principales componentes de la pared celular de *S. aureus* implicado en la interacción con receptores tipo Toll (TLRs) de la célula hospedera, esta interacción activa la respuesta inmune de la misma.
- iv) Producción de enzimas y toxinas, por ejemplo, la toxina alfa, cuya principal función es convertir el tejido del hospedero en nutrientes para la bacteria; la toxina beta, que hidroliza la esfingomielinina presente en la membrana provocando un desequilibrio en la permeabilidad y carga de la superficie celular.

Todos estos factores de virulencia están sumamente relacionados con el grado de la infección intramamaria, la capacidad de evadir la RII y la persistencia intracelular (Camussone y Calvinho, 2013; Medina, 2017; Lee et al., 2018).



**Figura 1. Factores de virulencia asociados a la patogenicidad e internalización de *S. aureus*.** El ácido lipoteicoico es uno de los principales componentes de la pared celular de la bacteria, el cual interactúa con receptores TLR de la célula hospedera activando la respuesta inmune de la misma. Mientras que la proteína de unión a fibronectina es la implicada en el proceso de internalización en la célula hospedera (Tomado y modificado de Lowy, 1998).



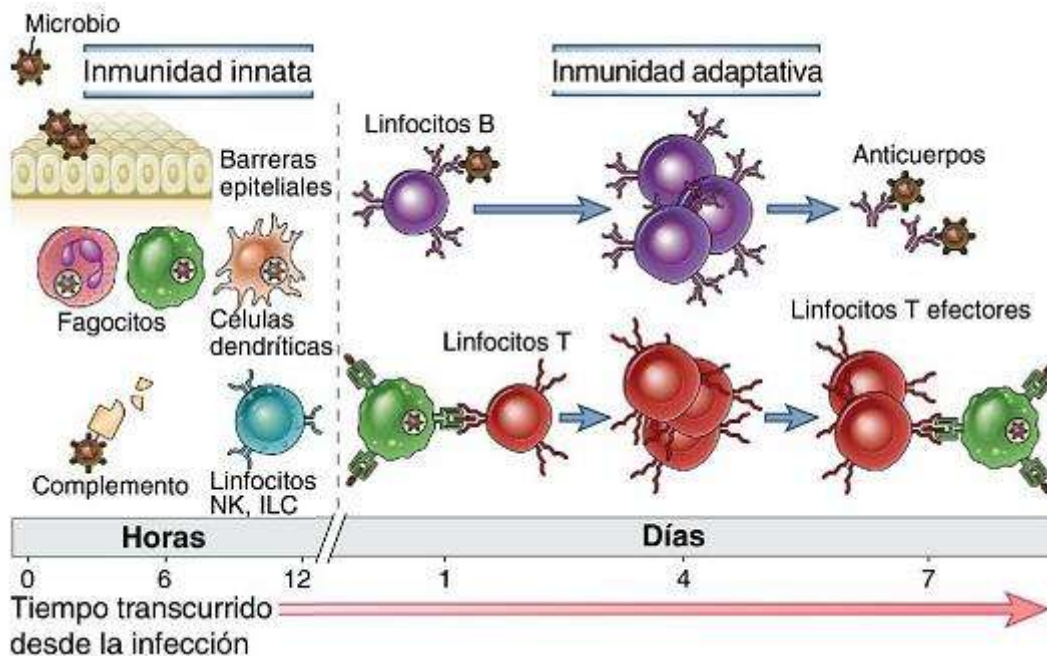
### 2.3 Glándula mamaria: respuesta inmune innata

La glándula mamaria es un órgano epitelial exocrino, es decir, consta de conductos excretores por los cuales se libera el producto; es decir, la leche. A su vez, está conformada por distintos tipos celulares que incluyen a: el mioepitelio que posibilita la contractilidad; los fibroblastos que constituyen el tejido conectivo y el epitelio mamario bovino, productor de los componentes de la leche (Ayadi, 2003; Medina, 2017). Las células epiteliales, además de tener una función estructural y producir los distintos componentes de la leche, juegan un papel importante en el reconocimiento de los microorganismos, de tal manera que éstas pueden “discriminar” a los patógenos de aquellos que no lo son e iniciar una respuesta inmune en la glándula mamaria.

La defensa de la glándula está mediada tanto por la inmunidad innata (RII) como por la inmunidad adaptativa, las cuales actúan conjuntamente para brindar protección a la misma; su eficacia determina la susceptibilidad o protección a la infección por microorganismos patógenos (Figura 2). En etapas tempranas de la infección, la RII es la que predomina y está mediada por macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales y citocinas que actúan como mediadores endógenos esenciales para la protección de la glándula mamaria (Oviedo-Boyso et al., 2006).

El inicio de la RII en las células epiteliales está asociado con el reconocimiento del agente patógeno, lo cual realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) particulares dispuestos en la membrana celular y otros en endosomas, que se unen a moléculas específicas situadas en la superficie de la bacteria denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En la familia de los PRR, los receptores TLR están implicados en el reconocimiento de distintos PAMPs. Por ejemplo, los TLR9, que se han caracterizado como un receptor asociado al endosoma, capaz de reconocer el ADN y el ARN bacteriano durante la infección intracelular, los TLR5 reconocen la flagelina, los TLR3 ARN bicatenario, los TLR4 lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas y los TLR2 PAMPs de bacterias Gram positivas, específicamente, el ácido lipoteicoico presente en la pared celular de *S. aureus*. Esta interacción activa vías de señalización citoplasmáticas como las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), elementos de respuesta a interferón (IRFs), rutas dependientes de AKT

y cinasa inhibidora de kappaB (IKK), lo que da lugar a la translocación de factores de transcripción al núcleo para activar la expresión de elementos de la RII (Rasmussen et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2014; Pereyra et al., 2014).



**Figura 2. Sistema inmunológico innato y adaptativo.** El sistema inmune consta de respuestas efectoras que trabajan de manera coordinada para brindar protección. Inmunidad innata; respuesta inmune ejercida en cuestión de horas, considerada la primera línea de defensa y presente en las interacciones tempranas célula hospedera-patógeno. Inmunidad adaptativa; respuesta inmune ejercida en días, lenta en presencia de patógenos nuevos pero eficaz y robusta en presencia de patógenos a los que la célula hospedera fue expuesta previamente (Tomado de Ezzat et al., 2014; Abbas et al., 2015).

## 2.4 Glándula mamaria: infección e internalización de *S. aureus*

La infección por *S. aureus* inicia cuando la bacteria evade la barrera física que proporciona el esfínter del pezón e ingresa a través del canal de éste, posteriormente se establecen interacciones en las células del tejido mamario con la consecuente multiplicación y diseminación de la bacteria, procesos que son favorecidos por los factores de virulencia que expresa el patógeno (Castro et al., 2020). Para contrarrestar la infección, la glándula mamaria desencadena un conjunto de mecanismos de defensa como resultado de la RII, que constituye la primera línea de defensa del hospedero durante las etapas tempranas de la interacción con el microorganismo. En este mecanismo de defensa participa: una

barrera física proporcionada por el esfínter que rodea el canal del pezón con la finalidad de aislar el interior de la glándula mamaria; una barrera química, atribuida a la queratina, producida en el canal del pezón que secuestra y dificulta la migración de microorganismos, además de otras moléculas como ácidos grasos asociados a la queratina con acción bacteriostática, agentes antimicrobianos, lisozimas, proteínas del complemento, citocinas, quimiocinas y elementos celulares (macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales) (Pereyra et al., 2014; Abdelmegid et al., 2019).

Sin embargo, *S. aureus* puede evadir la respuesta inmune e interactuar con diferentes tipos celulares aumentando su patogenicidad. A diferencia de una infección por *E. coli*, donde la respuesta inmune se caracteriza por un incremento de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferón Gamma (INF- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8); es decir una respuesta inflamatoria; en una infección por *S. aureus*, la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 está disminuida, por lo que esta respuesta limitada favorece el establecimiento e infección del patógeno. Lo anterior es posible ya que la bacteria regula negativamente la señalización y activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), imprescindible para la expresión de citocinas, quimiocinas, iNOS, péptidos antimicrobianos entre otros elementos representativos de la RII. Esta falta de señalización y activación podría atribuirse a un incremento del factor transformante del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en la glándula mamaria y, en consecuencia, al bloqueo de la vía de señalización TLR2 dependiente de MyD88; una proteína adaptadora necesaria para la transducción de señales desde el exterior de la célula a proteínas que transmiten señales dentro de la misma. En ese sentido, la falta de expresión de genes representativos de la respuesta inmune podría explicar la deficiencia en la eliminación de *S. aureus* en la mastitis subclínica (Seibert et al., 2010; Pereyra et al., 2014).

Aunado a lo anterior, como parte de la defensa de la célula hospedera, la participación del complemento es un punto clave en el éxito de la eliminación de microorganismos patógenos. Se trata de una cascada proteolítica de proteínas plasmáticas que detectan y opsonizan microorganismos para facilitar su eliminación mediante la participación de células fagocíticas profesionales como

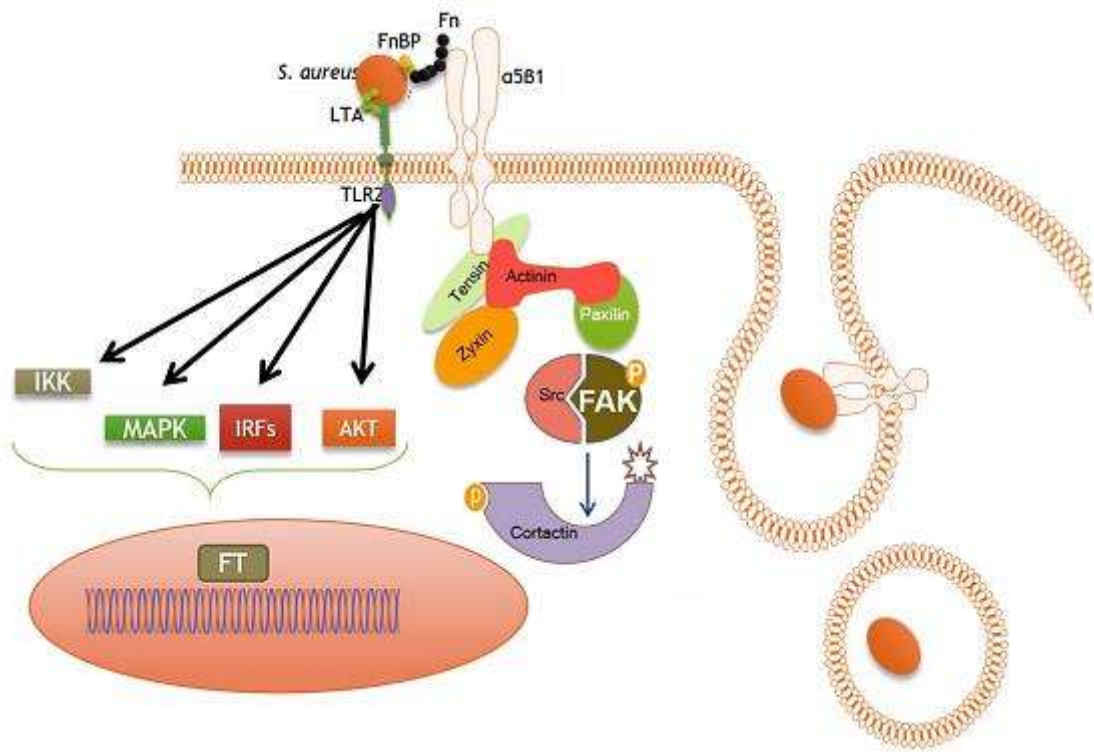
los neutrófilos y macrófagos. No obstante, *S. aureus* secreta diversas proteasas como la estafopaina A (ScpA) y estafopaina B (SspB), serina proteasas (V8 o SspA), proteínas similares a la serina proteasa (SplS) y metaloproteinasas (aureolisina, Aur), que tienen una participación importante en la evasión de la RII al actuar negativamente sobre componentes clave del sistema inmune del hospedero como, el interferir con la deposición del complemento en la superficie bacteriana, inhibir las serina proteasas de neutrófilos necesarias para la regulación en la formación de trampas extracelulares, a través de la proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS) bloquear la función de los receptores C5a y de péptidos formilados necesarios para la quimiotaxis de neutrófilos, comprometer la integridad de la matriz extracelular y las conexiones intercelulares; lo que brinda a la bacteria las herramientas necesarias para colonizar e infectar a la célula hospedera (Pietrocola et al., 2017).

Por otro lado, la internalización de *S. aureus* ocurre primordialmente por el mecanismo denominado “zipper”, con una participación relevante de las integrinas. Estas proteínas son una familia de receptores que constan de una subunidad beta y una alfa, están presentes en la superficie celular, que reconocen el contenido y la rigidez de la matriz extracelular circundante, intervienen en procesos de proliferación, supervivencia y migración de distintos tipos celulares (Alanko e Ivaska, 2016).

Además, las integrinas son otro tipo de receptores con los que *S. aureus* puede interactuar de manera indirecta, lo que es posible ya que las integrinas se unen a ligandos presentes en la matriz extracelular, entre ellos la fibronectina. A través de este ligando es que hay una interacción con la proteína de unión a fibronectina presente en la superficie de la bacteria. La cinasa de adhesión focal (FAK), que está inactiva en el citoplasma, se activa por la integrina, lo que facilita el reclutamiento de un complejo proteico (actina, paxilina, zixina y tensina), que induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la formación del endosoma, lo que favorece que *S. aureus* se internalice en la célula hospedera (Figura 3) (Alva-Murillo et al., 2014; Alanko e Ivaska, 2016; Medina, 2017).

La internalización de *S. aureus* en la célula hospedera le permite persistir intracelularmente y evadir la respuesta inmune del hospedero, así como el efecto de los tratamientos con antibióticos, lo que favorece la mastitis crónica. En ese

sentido, se ha propuesto como alternativa de control de la mastitis el uso de compuestos de origen natural con acción moduladora de la RII, tal es el caso de la nisina y el quitosano.

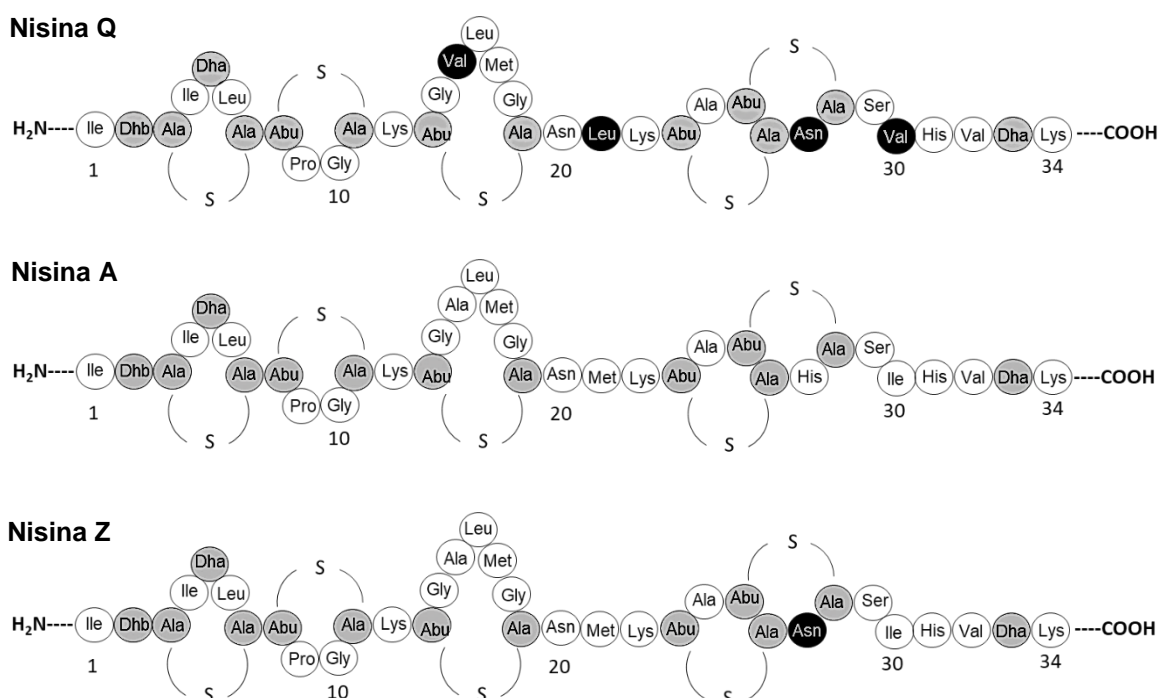


**Figura 3. Reconocimiento e internalización de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino.** El ácido lipoteicoico presente en la pared celular de la bacteria es reconocido por el receptor TLR2, interacción que activa vías de señalización como proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), elementos de respuesta a interferón (IRFs), rutas dependientes de AKT y cinasa inhibidora de kappaB (IKK), que inducen la translocación de factores de transcripción al núcleo para la expresión de elementos de la RII. La internalización de *S. aureus* implica la participación de las integrinas y su ligando fibronectina, que reconoce a la proteína de unión a fibronectina presente en la superficie de la bacteria. La interacción activa a FAK que posteriormente media el reclutamiento de un complejo proteico e induce el rearreglo del citoesqueleto de actina y la consecuente formación del endosoma (Tomado de Rasmussen et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2014; Alanko e Ivaska, 2016; Medina, 2017).

## 2.5 Nisina

La nisina es un péptido catiónico de 34 aminoácidos con un peso molecular de 3.5 kDa producido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* de la que se han descrito distintas variantes naturales que difieren por la sustitución de aminoácidos en posiciones específicas de la molécula. En ese sentido, se han establecido tres variantes naturales como las nisinas A, Q y Z (Figura 4) (Fukao et al., 2008;

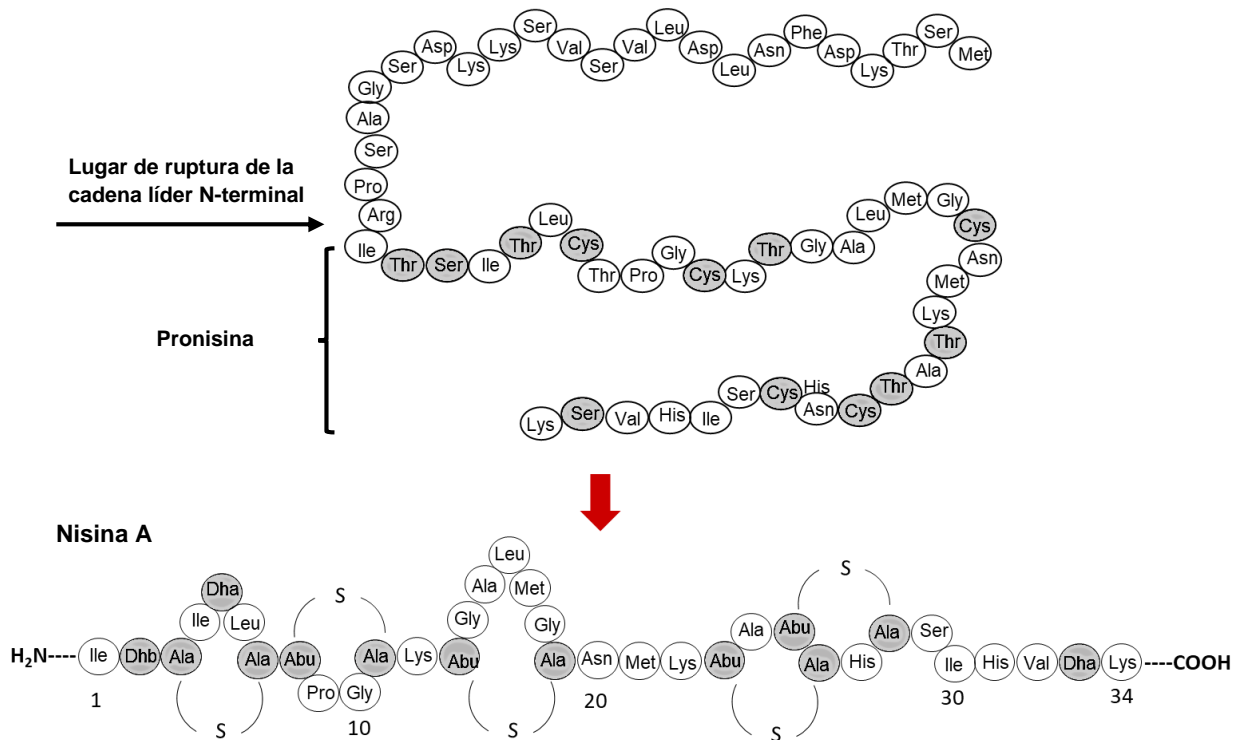
Gharsallaoui et al., 2015; Sánchez et al., 2018). Las variantes de la nisina pertenecen a los lantibióticos de clase I, es decir, son un grupo de antibióticos peptídicos que experimentan modificaciones postraduccionales y se caracterizan por contener aminoácidos poco comunes como la deshidroalanina (Dha) y la deshidrobutirina (Dhb), que resultan de la deshidratación de los residuos de serina y treonina, respectivamente. Los enlaces tioéter formados entre los aminoácidos Dha, Dhb y los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína adyacentes dan lugar a las lantioninas y  $\beta$ -metillantioninas, denominadas conjuntamente como anillos lantionina (Fukao et al., 2008; Gharsallaoui et al., 2015; Hacker et al., 2015).



**Figura 4. Variantes naturales de la nisina.** Todas las variantes mantienen la presencia de residuos de aminoácidos poco usuales como la Dha y Dhb, además de la formación de anillos lantionina; la sustitución de aminoácidos en posiciones específicas de la molécula diferencia una variante de la otra (indicadas en color oscuro) (Fukao et al., 2008).

Particularmente, la nisina A (Figura 5) destaca como un conservador natural de alimentos, declarado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como un aditivo seguro. Interesantemente,

inhibe el crecimiento de un amplio rango de bacterias Gram positivas entre las que destaca *S. aureus* asociado a mastitis bovina (Sánchez et al., 2018).



**Figura 5. Estructura de la nisina A.** La nisina se sintetiza como una molécula precursora que contiene 57 aminoácidos, de los cuales 23 residuos situados en el extremo N-terminal conforman la región líder denominada pronisina y los 34 residuos restantes conforman la región estructural denominada pronisina. Esta molécula precursora experimenta una serie de procesos enzimáticos que dan como resultado la pérdida de la región líder y la deshidratación de los residuos de aminoácidos de serina y treonina de la pronisina, lo que permite la formación de aminoácidos poco usuales como Dha y Dhb, respectivamente, además, de la formación de anillos lantionina (Modificado de Rodríguez, 1996; Gharsallaoui et al., 2015).

Su acción inmunomoduladora, en su mayoría para la variante A, se ha reportado en distintos modelos de estudio *in vitro* (Tabla 1). Por mencionar algunos, se ha evaluado el efecto de la nisina en leucocitos de sangre periférica en porcinos estimulados con mitógenos, donde aumentó la expresión de IL-2, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-6 (citocinas pro y anti-inflamatorias) en una ventana de concentraciones de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  (Malaczewska et al., 2019). Se ha reportado que cepas de *L. lactis* productoras de nisina A favorecen la disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  (citocina pro-inflamatoria) en la línea celular epitelial mamaria bovina BME-UV1 (Malvisi et al., 2016). Además, en células epiteliales uterinas bovinas tratadas con nisina (6.22  $\mu\text{g/mL}$ ) y estimuladas con *S. aureus*,

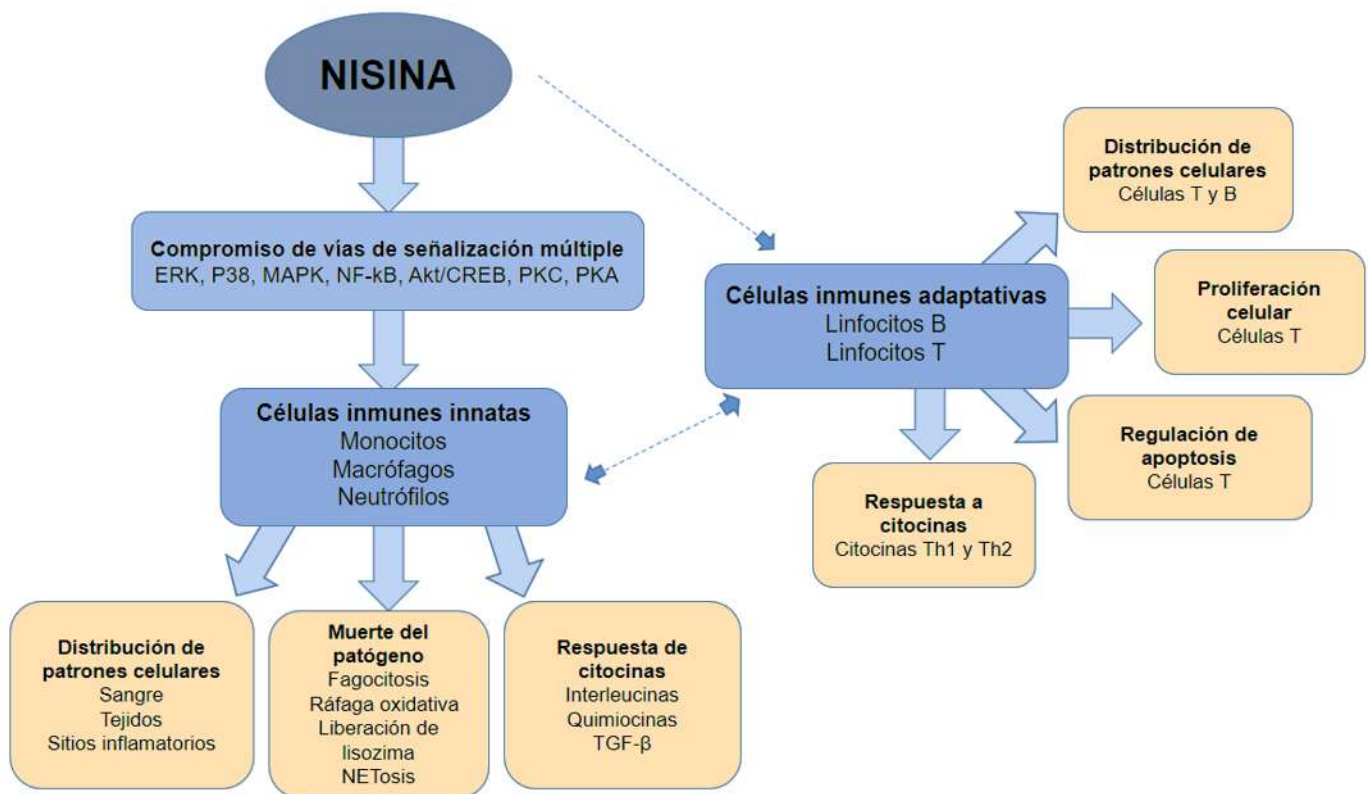
se evidenció un efecto anti-inflamatorio, ya que se incrementaron los niveles de expresión de IL-10 e IL-4, mientras que disminuyeron los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ; así mismo, la nisina en presencia de la infección mejoró la defensa de las células al modular al alza la expresión de IL-2, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-8 (Jia et al., 2019). A partir de estos estudios se ha evidenciado el efecto inmunomodulador de la nisina a través de diferentes vías en distintas poblaciones de células, entre ellas las células inmunitarias (Figura 6) (Malaczewska y Kaczorek, 2021).

**Tabla 1. Efectos de la nisina en la expresión de citocinas: estudios *in vitro*.**

MODELO DE ESTUDIO/CONCENTRACIÓN DE NISINA	ELEMENTO EVALUADO	EFEECTO
Explantos de tejido cervicovaginal de conejo; nisina 484.8 $\mu$ M/g de tejido.	Expresión de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 y participación de GM-CSF	Ninguno
PBMC humanas sin y con estimulación por LPS; nisina Z 50 $\mu$ g/mL.	-Expresión de Gro- $\alpha$ e IL-8 y participación de MCP-1 -Expresión de TNF- $\alpha$ -Expresión de TNF- $\alpha$ inducido por LPS	$\uparrow$ Ninguno $\downarrow$
Esplenocitos de ratón; nisina Z 100 $\mu$ g/mL.	-Participación de múltiples receptores de factores de crecimiento (Receptor del factor de crecimiento nervioso y Receptor del factor de crecimiento epidérmico) -Activación de vías de señalización ERK / MAPK, NF- $\kappa$ B, PKC, PKA	Expresión de IL-6
Queratinocitos humanos HaCaT sin y con estimulación por LPS; nisina 25 $\mu$ g/mL.	-Expresión de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ -Participación de MCP-1 inducida por LPS	$\downarrow$ $\downarrow$
PBMC humanas con estimulación por LPS; nisina 25 $\mu$ g/mL.	Expresión de TNF- $\alpha$	$\downarrow$
Células epiteliales uterinas bovinas estimuladas con <i>S. aureus</i> ; nisina 6.22 $\mu$ g/mL.	-Expresión de IL-2, IFN- $\gamma$ , B7-2, IL-4, TGF- $\beta$ , IL-8 e IL-10 -Expresión de IL-6, TNF- $\alpha$ y CINC1	$\uparrow$ $\downarrow$
Macrófagos de ratón J774; nisina: 10– 100 $\mu$ g/mL.	Expresión de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12	Ninguno

( $\uparrow$ ) Aumento de la expresión genética. ( $\downarrow$ ) Disminución de la expresión genética (Modificado de Malaczewska y Kaczorek, 2021).

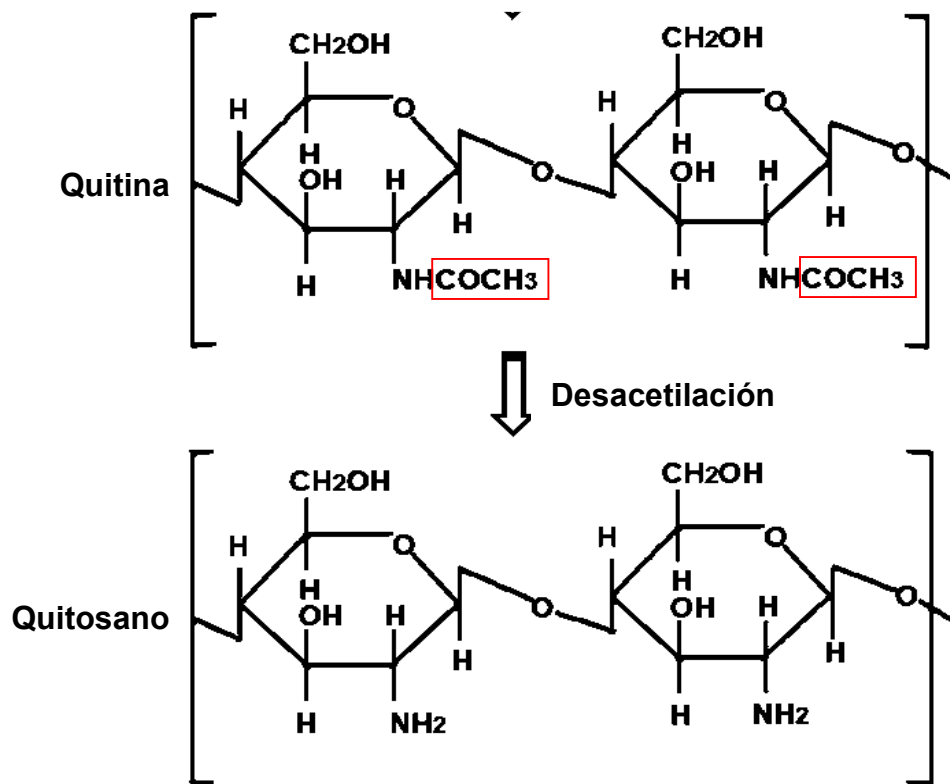




**Figura 6. Efecto inmunomodulador de la nisina.** La nisina activa diversas vías de señalización (ERK, P38, MAPK, NF-kB, Akt/CREB, PKC, PKA) que accionan de manera sincrónica para la expresión de elementos de la RII. Así mismo, activa a células inmunes innatas, entre ellas células fagocíticas profesionales, que en conjunto con otros elementos de la RII coordinan la eliminación de microorganismos patógenos. Aunado a lo anterior, la nisina tiene influencia sobre células inmunes adaptativas como linfocitos T y B (Tomado y modificado de Małaczewska y Kaczorek, 2021).

## 2.6 Quitosano

El quitosano es un polímero lineal (60 a 500 kDa) conformado por unidades de D-glucosamina con uniones  $\beta$  (1-4) como resultado de la desacetilación de la quitina. Se caracteriza por ser un biomaterial con carga positiva, biodegradable, inocuo, biocompatible, de fácil adherencia y capaz de formar compósitos. Debe sus propiedades al grado de desacetilación, peso molecular, pH de la solución, la distribución de los grupos acetilo y amino a lo largo de la cadena, por lo que es una molécula con potencial para su aplicación en diversas áreas como la agricultura, alimentación, biomedicina y biotecnología (Figura 7) (López et al., 2013; Nilsen et al., 2015). Además, el quitosano es considerado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los EE. UU. como un aditivo generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Giraud et al., 2010).

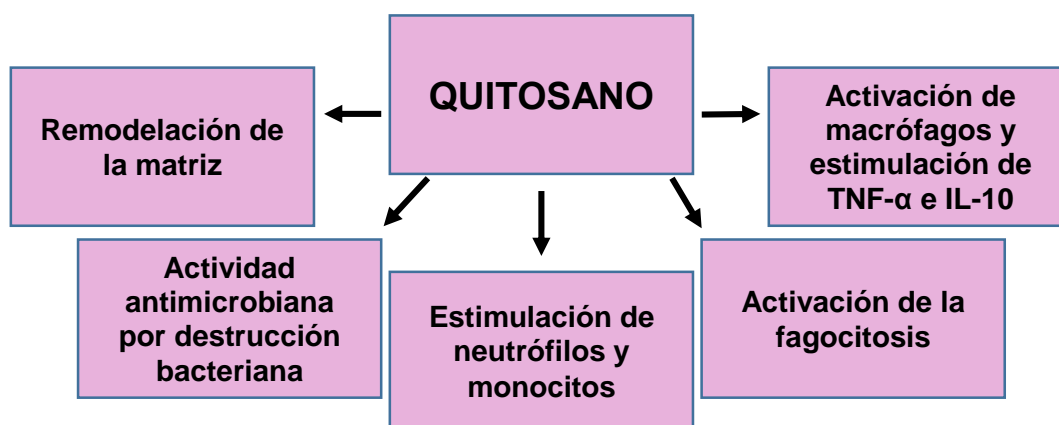


**Figura 7. Estructura de la quitina y quitosano.** El quitosano resulta de la desacetilación de la quitina, está formado por unidades de D-glucosamina con uniones β (1-4) (Modificado de Bretado-Aragón et al., 2016).

Destaca su actividad biológica como agente antimicrobiano sobre un amplio espectro de bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y levaduras (Figura 8) (Sahariah y Másson, 2017), incluyendo aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina tratados con quitosano de bajo peso molecular (60 a 120 kDa) (Sánchez et al., 2018). Así mismo, destaca como un polímero para el diseño de sistemas de administración de fármacos, vía tópica o transdérmica (Saini et al., 2020). Además, su actividad inmunomoduladora ha sido reportada en macrófagos peritoneales de pollo de engorda al estimular y mejorar las funciones inmunes de los pollos a través del aumento en la secreción de iNOS, NO, IL-1β y TNF-α a concentraciones de 40, 80, 160 y 320 μg/mL (Li et al., 2014). Otros estudios han reportado una disminución en la expresión de citocinas pro-inflamatorias en ratones, cuando a éstos se les administró una dieta basal complementada con 300 mg/kg de quitosano con un peso molecular menor a 1

kDa; es decir, el quitosano reguló el proceso inflamatorio que se encuentra exacerbado en la infección por *E. coli* (Liu et al., 2016).

En el mismo sentido, el quitosano de bajo peso molecular favoreció un efecto pro-inflamatorio al evidenciar el incremento de iNOS, NO, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en macrófagos murinos (RAW264.7), empleando concentraciones de 2.5, 10 y 40  $\mu$ g/mL (Ning et al., 2015). Aunado a lo anterior, el quitosano de bajo peso molecular ha mostrado un efecto inmunomodulador (efecto pro-inflamatorio y mejora en la defensa celular) en la expresión de IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en una línea celular MAC-T, que son células epiteliales alveolares mamarias bovinas transfectadas con el virus SV-40, en donde se emplearon concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ g/mL (Felipe, 2016). Particularmente, en células epiteliales intestinales, oligosacáridos de quitosano con peso molecular de 5 a 14 kDa activaron al factor AMPK (proteína cinasa activada por adenosín monofosfato), a través de la liberación de calcio mediada por el canal del receptor CaSR-PLC-IP3. Así mismo, se inhibió la actividad de NF- $\kappa$ B y la respuesta inflamatoria mediada por el mismo (Muanprasat et al., 2015). No obstante, aún no existe información sobre su actividad inmunomoduladora en cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB) durante la infección de *S. aureus*.



**Figura 8. Actividad biológica del quitosano.** Polímero biodegradable, biocompatible y no tóxico, empleado en una gran variedad de aplicaciones como apósito tópico en curación de heridas, agente antimicrobiano e inmunomodulador (Modificado de Saini et al., 2020).

Por otro lado, se ha descrito la importancia del peso molecular, grado de desacetilación, pH y la disposición espacial de los grupos acetilo en la molécula

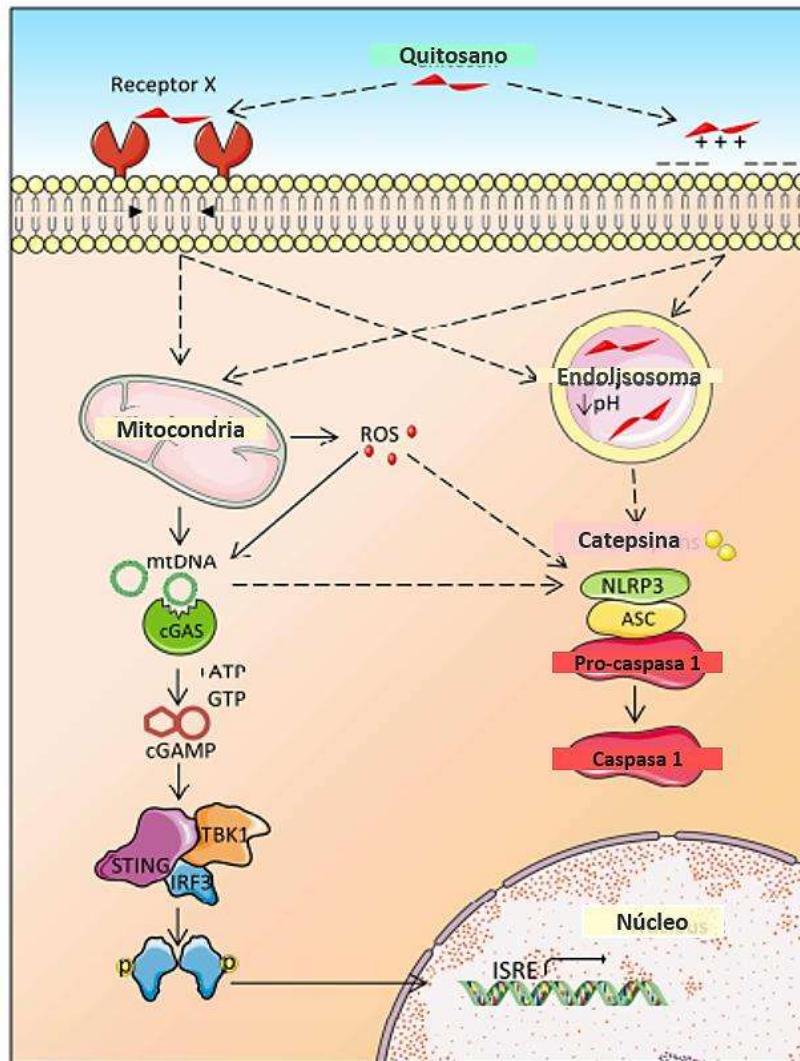
del quitosano; características que contribuyen notablemente en la solubilidad, biodegradabilidad, interacciones celulares, propiedades antimicrobianas e inmunológicas del polímero (Moran et al., 2018). Un ejemplo de lo anterior es lo descrito por Bellich et al. (2016), quienes reportan que la solubilidad del quitosano se ve afectada conforme aumenta el peso molecular. Así mismo, en formulaciones de nanopartículas a base de quitosano y tripolifosfato en la liberación de albúmina de suero bovino (BSA), Xu y Du (2003) señalan que a medida que aumenta el peso molecular del quitosano disminuye el porcentaje de liberación de BSA. Aunado a lo anterior, en condiciones ácidas y a pH de 6-6.5, el quitosano se mantiene en solución. No obstante, cuando hay un aumento de pH más allá del rango 6-6.5, las moléculas de quitosano se vuelven insolubles, por lo que éstas precipitan, lo que en aspectos biomédicos es un inconveniente (Moran et al., 2018). Además, el grado de desacetilación es un factor importante ya que puede correlacionarse directamente con el número de cargas positivas en la molécula; es decir, un aumento en el grado de desacetilación es proporcional a un aumento de cargas positivas, de tal manera que esta particularidad facilita la interacción del quitosano y los componentes de la superficie celular bacteriana. En ese sentido, cuanto más cargada positivamente esté una molécula de quitosano, más fuerte es la interacción con la célula bacteriana (Huang et al., 2004; Szymańska y Winnicka, 2015; Moran et al., 2018).

El mecanismo de interacción entre el quitosano y las células inmunitarias es esencial para entender cómo este polímero promueve la respuesta inmune. Se ha descrito que la captación del quitosano por las células dendríticas se lleva a cabo por fagocitosis. No obstante, queda por dilucidar si el mecanismo de reconocimiento está mediado por receptores específicos, como en el caso de los oligosacáridos de quitina y quitosano, que muestran afinidad por algunas proteínas en la superficie celular, como la lectina galectina-3 y la proteína transmembrana de tipo II; sin embargo, esta afinidad por oligosacáridos no es particular para polímeros como el quitosano (Moran et al., 2018). Aunado a lo anterior, la participación de la dectina-1 se ha implicado en el reconocimiento de la quitina, por tanto, el papel potencial de este receptor en facilitar la captación de quitosano en las células es un aspecto a considerar. Aunque la dectina-1 no

se une directamente a la quitina, se ha reportado que es fundamental para el reconocimiento de la quitina por las células inmunitarias (Schlosser et al., 2009).

Diversos trabajos han demostrado que el quitosano ejerce su función inmunomoduladora a través de la activación de macrófagos y la inducción de la secreción de citocinas en células dendríticas, lo que se ha relacionado con la fagocitosis y la activación de células dendríticas dependiente del interferón de tipo I (IFN). Con base en ello, se sugiere que el quitosano induce estrés mitocondrial con la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno y ADN mitocondrial. Un factor clave en la producción de IFN de tipo I por el reconocimiento del ADN citosólico es la proteína adaptadora STING (proteína estimuladora de genes de interferón), un componente de la vía cGAS-STING. La activación de la vía ocurre en respuesta al ADN bicatenario (dsDNA), mediante el cual, cGAS se une a los ácidos nucleicos de la célula hospedera para la generación de dinucleótidos cíclicos que a su vez se unen a STING en el retículo endoplásmico. STING se asocia con IKK o TBK-1 y se reubica en el aparato de Golgi, lo que en última instancia conduce a la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y el Factor Regulador de Interferón (IRF-3), respectivamente (Figura 9) (Cai et al., 2014; Carroll et al., 2016).

Adicionalmente, el quitosano activa también el inflamasoma NLRP3; se trata de un complejo citosólico de diversas proteínas, compuesto por NLRP3, la proteína adaptadora ASC y la caspasa-1. La actividad del inflamasoma NLRP3 requiere dos pasos, inicialmente el ensamblaje del complejo NLRP3 y la regulación positiva de la expresión de pro-IL 1 $\beta$  y finalmente la escisión de pro-IL-1 $\beta$  por caspasa-1 en su forma bioactiva, activación mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno, salida de iones de potasio (K<sup>+</sup>) y desestabilización lisosomal (Bueter et al., 2011).



**Figura 9. Mecanismo de acción inmunomodulador del quitosano.** En el mecanismo dependiente de la fagocitosis, el quitosano activa macrófagos e induce la secreción de citocinas en células asesinas naturales. Adicionalmente, este polímero conduce a un estrés mitocondrial, y a través de la vía cGAS- STING, la activación dependiente del interferón de tipo I de las células dendríticas. Aunado a lo anterior, el quitosano promueve la activación del inflammasoma NLRP3 (Bueter et al., 2011; Cai et al., 2014; Carroll et al., 2016).

## 2.7 Compósito

La literatura actual define a un compósito como un sistema integrado por la combinación de dos o más micro o macro constituyentes que difieren en su forma, estructura y composición química. Un constituyente desempeña el papel de formar una matriz (cerámica, metal, o polímero) y el otro actúa como fase de fortalecimiento funcional o estructural. Por lo general, la matriz se encuentra en mayor proporción en un compósito y es la que rodea a la otra fase, también denominada fase dispersa. Desde el punto de vista sinérgico o aditivo, el

compósito aprovecha y maximiza las características de cada uno de los constituyentes, lo que da como resultado un material (funcional, térmico, estructural o multifuncional) con propiedades que los constituyentes no pueden alcanzar individualmente. Dichos materiales se diseñan con relación a las propiedades, proporción, distribución y/o morfología de los constituyentes (Espinosa, 2013; Jiménez, 2013; Pérez y Sánchez, 2014).

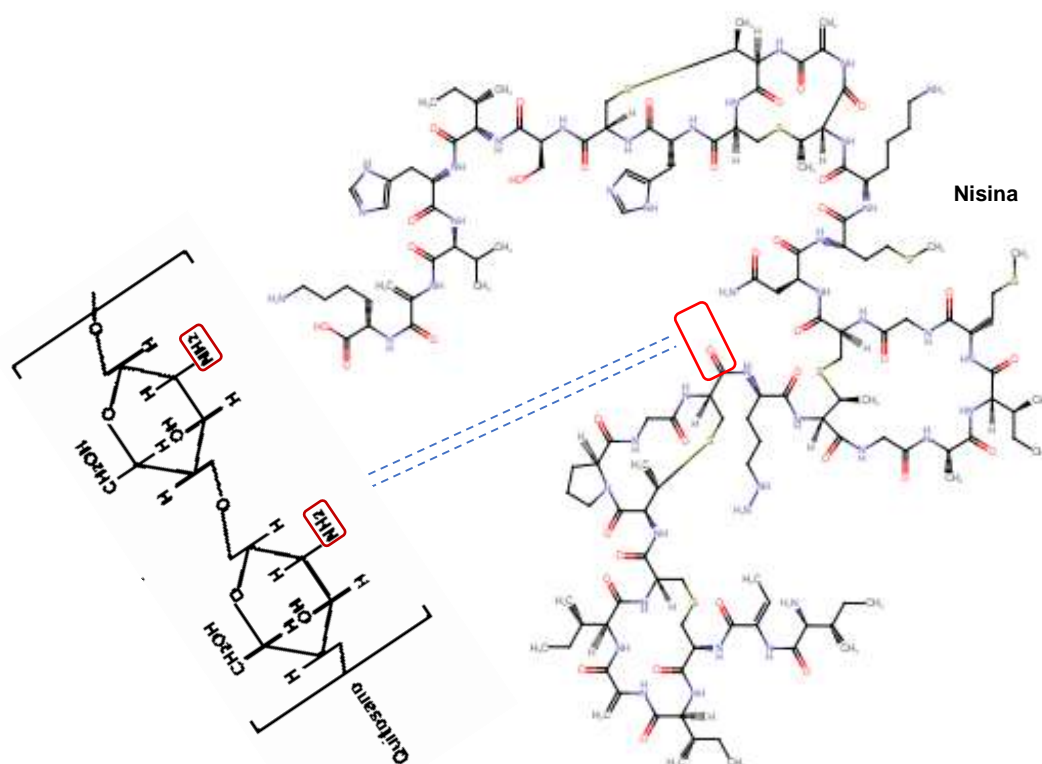
Con base en lo anterior, se ha reportado y propuesto la utilización de compósitos para distintas finalidades; por mencionar algunos ejemplos, el uso de compósitos de nanopartículas de plata-quitosano se postula como una alternativa a terapias antimicrobianas convencionales, destacando las particularidades del quitosano y de las nanopartículas metálicas (Bretado-Aragón et al., 2016). Además, se ha reportado el uso de compósitos de quitosano-ácidos grasos sobre la infección de *Botrytis cinerea* en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en poscosecha, evidenciando un efecto protector y aditivo superior por parte del compósito que el mostrado por las moléculas por separado (Sandoval et al., 2018). Así mismo, se ha estudiado el uso de compósitos de quitosano-aceites esenciales y quitosano-extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos (Correa et al., 2018; Costantini et al., 2018).

Se han propuesto posibles interacciones para compósitos con quitosano evidenciando la importancia de las propiedades fisicoquímicas del biopolímero y la participación de grupos funcionales, como el grupo amino (-NH<sub>2</sub>), que resulta de la desacetilación del grupo acetamido a partir de la quitina. Lo anterior, ha favorecido la interacción del quitosano con otras moléculas, entre ellas, las nanopartículas de plata. Esta interacción da como resultado la estabilización de las nanopartículas evitando su agregación y precipitación durante experimentos en los que se probó el efecto antibacteriano del compósito (Kumar et al., 2015; Muthumeenal et al., 2017; Ryan et al., 2017).

De acuerdo a lo anterior y tomando en cuenta que la plata es una molécula catiónica, es posible proponer la interacción efectuada entre el quitosano y la nisina, ya que esta última es un péptido antimicrobiano catiónico. Interesantemente, esta interacción es confirmada por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se trata de una técnica de onda infrarroja que una vez absorbida por las moléculas de interés, y de acuerdo con los enlaces

químicos y estructurales de las moléculas, permite comprender las estructuras específicas de las mismas a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales. Con esta técnica se estableció que el grupo carboxilo (-COOH) de la nisina interactúa con el grupo amino del quitosano (Figura 10) (Zohri et al., 2010; Mata et al., 2017).

En este contexto, así como el antecedente del efecto antimicrobiano *in vitro* del compuesto nisina-quitosano sobre *S. aureus* asociado a mastitis bovina, el cual fue mayor al efecto observado con cada uno de los biomateriales por separado; el uso de moléculas naturales con acción inmunomoduladora de la RII se perfilan como una posible alternativa para contrarrestar la infección de *S. aureus* asociado a la enfermedad, en donde destaca la propiedad del quitosano de servir como matriz para la formación de compósitos y de la nisina como un constituyente de fortalecimiento funcional.



**Figura 10. Interacción del compuesto nisina-quitosano.** Las moléculas entran en contacto a través de interacciones electrostáticas efectuadas por el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) del quitosano y el grupo carboxilo (-COOH) de la nisina (Modificado y tomado de Zohri et al., 2010; Bretado-Aragón et al., 2016 y [https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound\\_report\\_card/CHEMBL526744/](https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL526744/)).



### III. ANTECEDENTES

Distintos grupos de trabajo han evaluado el efecto de la nisina (Tabla 1) y el quitosano sobre la RII en distintos modelos de estudio. La nisina (50 µg/mL) ha sido evaluada en leucocitos de sangre periférica porcina estimulados con mitógenos y en esta concentración favorece la expresión de IL-2, IL-10, IL-1β e IL-6 (Malaczewska et al., 2019). Aunado a lo anterior, cepas de *L. lactis* productoras de nisina A favorecen la disminución en la expresión de TNF-α en la línea celular epitelial mamaria bovina BME-UV1 (Malvisi et al., 2016). Además, células epiteliales uterinas bovinas tratadas con nisina (6.22 µg/mL) y estimuladas con *S. aureus*, incrementaron los niveles de expresión de IL-2, TGF-β, IL-10, IFN-γ, IL-4, IL-8 y disminuyeron los niveles de expresión de IL-1β, IL-6 y TNF-α (Jia et al., 2019). Finalmente, en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas tratadas con nisina Z (150 µg/mL), se induce la expresión de las quimiocinas IL-8 y Gro-α, la citocina TNF-α y la participación de MCP-1, mientras que en PBMC pre-tratadas con 50 µg/mL por 45 min + 2 ng/mL de LPS se reprime la expresión de TNF-α hasta un 79% (Kindrachuk et al., 2012).

Por su parte, el quitosano (40 µg/mL) favorece el incremento de iNOS, NO, IL-1β y TNF-α en macrófagos murinos (RAW264.7) (Ning et al., 2015). Aunado a lo anterior, el quitosano (100 µg/mL) ha mostrado un efecto inmunomodulador en la expresión de IL-6, IL-8, IL-1β y TNF-α en la línea celular MAC-T a (Felipe, 2016). Además, en macrófagos peritoneales de pollo de engorda, el quitosano (80 y 160 µg/mL) aumenta la expresión de iNOS, IL-1β, TNF-α y la producción de NO (Li et al., 2014). Particularmente, en células epiteliales intestinales, oligosacáridos de quitosano (5 kDa a 14 kDa) activan AMPK a través de la liberación de calcio mediada por el canal del receptor CaSR-PLC-IP3; así mismo, inhiben la actividad transcripcional de NF-κB y la respuesta inflamatoria mediada por el mismo (Muanprasat et al., 2015).

No obstante, no existe información sobre la actividad inmunomoduladora del compuesto nisina-quitosano en cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB) durante la infección de *S. aureus*.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad de relevancia mundial. De acuerdo con Kibebew (2017), se trata de la patología en la ganadería lechera más frecuente y devastadora en el mundo, siendo *S. aureus* el microorganismo causal más común en casos clínicos y subclínicos. Aunado a ello, se considera como la enfermedad más onerosa y con altas pérdidas económicas en la ganadería lechera que derivan principalmente en la producción insuficiente de leche, costos extras por el reemplazo temprano de vacas, sacrificio de animales continuamente infectados, asistencia técnica de veterinarios, costos por tratamientos, medicamentos y sanciones sobre la calidad de la leche (Arif et al., 2015). La terapia basada en antibióticos es una práctica usual para el control de la mastitis bovina; sin embargo, el uso inadecuado, la implementación de dosis incorrectas o tiempos de aplicación inapropiados han dado como resultado la selección de bacterias resistentes a los antibióticos (Villanueva y Morales, 2017). De acuerdo a lo anterior, se requieren tratamientos alternativos más eficientes para contrarrestar esta patología. El uso de compuestos bioactivos de origen natural con actividad biológica antimicrobiana e inmunomoduladora, se ha considerado una buena alternativa para hacer frente a *S. aureus* asociado a mastitis bovina, tal es el caso de la nisina y el quitosano. Por lo tanto, la evaluación del efecto inmunomodulador de nisina, quitosano y el compuesto nisina-quitosano sobre la RII de CEMB durante la infección por *S. aureus*, podría ofrecer nuevas oportunidades para la prevención y tratamiento de la enfermedad.

## **V. HIPÓTESIS**

El compósito nisina-quitosano posee una actividad inmunomoduladora superior a la ejercida por la nisina o el quitosano en células epiteliales mamarias bovinas durante la infección con *Staphylococcus aureus*.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Evaluar el efecto inmunomodulador de la nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre células epiteliales mamarias bovinas durante la infección con *Staphylococcus aureus*.

### **6.2 Específicos**

1. Evaluar el efecto de la nisina, el quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las células epiteliales mamarias bovinas.
2. Determinar la actividad inmunomoduladora de la nisina, quitosano y, el compósito nisina-quitosano en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *S. aureus*.

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se crecieron células de epitelio mamario bovino (CEMB) a una confluencia de 80%. Se colocaron tratamientos de nisina (1-100  $\mu\text{g/mL}$ ), quitosano (10-100  $\mu\text{g/mL}$ ) y el compuesto nisina-quitosano (1/10, 2.5/10 y 5/10  $\mu\text{g/mL}$ ). Se infectaron las CEMB durante 2 h con la cepa ATCC 27543 de *S. aureus* a una multiplicidad de infección de 30 bacterias por célula (Figura 11).

En los cultivos de *S. aureus* y las CEMB sometidos a los tratamientos:

- 1.- Se evaluó el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB.
- 2.- Se cuantificó la producción de NO en el medio condicionado, con y sin infección.
- 3.- Se aisló el ARN y se sintetizó cDNA para evaluar la expresión de genes de la RII.

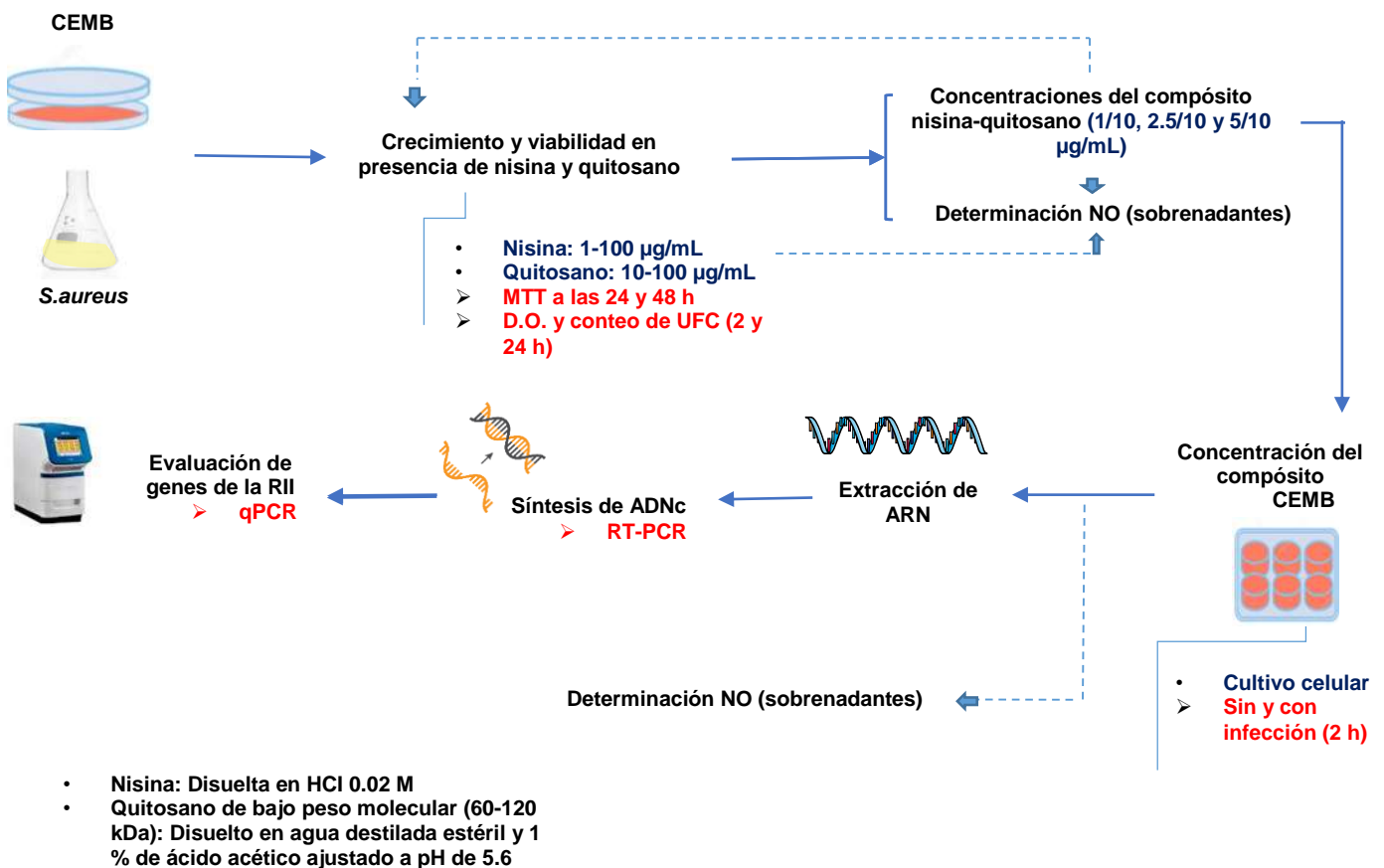


Figura 11. Estrategia experimental general desarrollada en el presente trabajo.

## 7.1 Reactivos y cepas

Se utilizó nisina A (Sigma-Aldrich®) disuelta en HCl 0.02 M, la cual se esterilizó por filtración con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore®). El quitosano de bajo peso molecular (60-120 kDa) (Sigma-Aldrich®) se disolvió en agua destilada y ácido acético glacial (J.T. Baker®) al 1% (p/v), el pH de la solución se ajustó a 5.6 con NaOH (Meyer®) 1 M, la solución se esterilizó a 120 °C, 20 psi, 15 min. Las concentraciones de nisina y quitosano que se trabajaron fueron de 1 a 100 µg/mL y de 10 a 100 µg/mL, respectivamente. Las soluciones se almacenaron en refrigeración a 4°C.

Para el compuesto nisina-quitosano, las concentraciones evaluadas fueron 1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL, respectivamente. Para generar el compuesto, una vez preparadas y esterilizadas ambas soluciones, la concentración correspondiente de nisina se disolvió en la solución de quitosano a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y se agitó vigorosamente por 5 min. Las soluciones se almacenaron en refrigeración a 4°C (Sánchez et al., 2018).

Para el presente estudio se utilizó una cepa certificada de *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) proveniente de un caso de mastitis bovina clínica, con la capacidad de internalizarse en las CEMB (Anaya-López et al., 2006). 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®), y se incubó a 37°C durante 12-14 h. Para los experimentos, el cultivo bacteriano se ajustó a una D.O. de 0.2 (600 nm), la cual equivale a 9.2 x 10<sup>7</sup> UFC/mL (Medina et al., 2017).

## 7.2 Cultivo celular

Se utilizó un cultivo primario de CEMB (pasajes 2-8) obtenido de tejido alveolar de la ubre de una vaca en estado lactante y libre de mastitis bovina. Las CEMB se cultivaron en cajas Petri (Costar-Corning®), con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma-Aldrich®), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Equitech-Bio®), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/mL, GIBCO®), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich®), 10 µg/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich®), 250 ng/mL de anfotericina B (Invitrogen®),

ajustado a un pH de 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Anaya-López et al., 2006).

### **7.3 Viabilidad de células de epitelio mamario bovino (CEMB) y crecimiento de *S. aureus***

Para determinar el efecto de la nisina, quitosano y el compuesto nisina-quitosano en la viabilidad de las CEMB, las células se crecieron en medio DMEM/F12K completo (con suero y antibióticos) en placas de 96 pozos (Costar-Corning®) por 24 h en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Se sembraron 10,000 células/pozo. Completado el tiempo, las células se sincronizaron con medio DMEM/F12K incompleto (sin suero y antibióticos) por 24 h en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionó nisina (1-10 µg/mL), quitosano (10-100 µg/mL) y el compuesto (1-10, 2.5-10 y 5-10 µg/mL, respectivamente), se incubó por 24 h y 48 h en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 10 µL de MTT (5 mg/mL) en buffer salino de fosfatos (PBS, 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, por cada litro de agua) a cada pozo y se incubó durante 4 h en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 µL de isopropanol-HCl 1 M (19:1) para disolver los cristales de formazán. La lectura se realizó en un lector de microplacas (BIO-RAD®) a una longitud de onda de 595 nm (Medina, 2017).

Para analizar el efecto de los compuestos en el crecimiento de *S. aureus*, la bacteria se creció en medio LB, a 37°C. El cultivo bacteriano se ajustó a una D.O. de 0.2 (600 nm). Posteriormente, éste se trató con los compuestos en las concentraciones descritas y se evaluó el crecimiento bacteriano midiendo la D.O. en intervalos de 2 h durante 24 h (2, 4, 6, 8, 11 y 24 h) a 37°C. Al final de las 24 h se realizó una dilución 1:1,000,000 para distribuir el cultivo bacteriano en cajas con agar LB y se dejó incubando a 37°C, durante 24 h. Posteriormente, se realizó el conteo de UFC, mediante un contador automático de colonias (Interscience, Scan500®).

#### **7.4 Efecto de nisina, quitosano y el compuesto nisina-quitosano sobre la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB**

El NO se cuantificó en el medio condicionado obtenido de los ensayos de viabilidad de las CEMB y de los ensayos para la extracción de ARN con los distintos tratamientos de nisina, quitosano y el compuesto, y/o *S. aureus*. Se cuantificó la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) empleando la reacción de Griess (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). El reactivo de Griess se preparó mezclando un volumen de la solución A (10% sulfanilamida y 40% de ácido fosfórico, Sigma<sup>®</sup>) y un volumen de la solución B [1% N-(1- naftiletilendiamida dihidroclorada, Sigma<sup>®</sup>)]. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  se determinó por medio de una curva estándar de  $\text{NaNO}_2$  en PBS estéril (pH 7.4) (0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Se colocaron diluciones 1:1 del reactivo de Griess y de medio condicionado (50  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente). Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas (Varioskan<sup>™</sup> Flash spectral scanning multimode reader).

#### **7.5 Extracción de ARN y oligonucleótidos para qPCR**

La extracción de ARN y posterior síntesis de ADNc de las CEMB tratadas con nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y el compuesto (1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y/o la infección por *S. aureus*, se realizó como se ha descrito por Alva-Murillo et al. (2015). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con el kit qPCRBIO SyGreen Blue Mix Hi-ROX (PCR BIOSISTEM<sup>®</sup>) en el equipo StepOne Plus, mediante el método  $\Delta\Delta\text{CT}$ , con SyberGreen. Para medir la expresión de genes de la RII, se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para amplificar los genes que codifican para: 1) péptido antimicrobiano traqueal (TAP), péptido antimicrobiano lingual (LAP), defensina 10 beta de neutrófilos de bovinos (BNBD10), defensina 1-beta (DEFB1), 2) citocinas pro-inflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$ , 3) citocinas antiinflamatorias y quimiocinas como  $\text{IL-10}$  e  $\text{IL-8}$ , respectivamente. Como control interno (gen endógeno) se utilizó el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Medina, 2017).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la evaluación de la expresión génica de los distintos elementos de la RII.**

Gen (bovino)	Primer	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del amplicón (pb)	T (°C)	Referencia
TAP	D R	GCGCTCCTCTTCCTGGTCCTG GCACGTTCTGACTGGGCATTGA	216	57	Téllez-Pérez et al., 2012
BNBD10	D R	GCTCCATCACCTGCTCCTC AGGTGCCAATCTGTCTCATGA	152	54	Téllez-Pérez et al., 2012
DEFB1	D R	CCATCACCTGCTCCTCACA ACCTCCACCTGCAGCATT	185	54	Téllez-Pérez et al., 2012
IL - 1 $\beta$	D R	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA	198	55	Este trabajo
IL - 6	D R	AACCACTCCAGCCACAAACT GAATGCCAGGAACCTACCACAA	179	57	Alva-Murillo et al., 2014
TNF- $\alpha$	D R	CCCCTGGAGATAACCTCCCA CAGACGGGAGACAGGAGAGC	101	56	Alva-Murillo et al., 2014
IL - 8	D R	TTCCACACCTTTCCACCCAA GCACAACCTTCTGCACCCACTT	149	57	Este trabajo
IL -10	D R	GATGCGAGCACCTGTCTGA GCTGTGCAGTTGGTCTTCATT	129	59	Alva-Murillo et al., 2014
GAPDH	D R	TCAACGGGAAGCTCACTGG CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	57	Alva-Murillo et al., 2014

Abreviaturas: TAP: Péptido Antimicrobiano Traqueal; LAP: Péptido Antimicrobiano Lingual; DEFB1: Defensina 1- Beta; BNBD10: Defensina 10- Beta de Neutrófilos de bovinos; TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ ; IL 1 $\beta$ : Interleucina 1- $\beta$ ; IL-6: Interleucina 6; IL-8: Interleucina 8; IL-10: Interleucina 10; GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

## 7.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos constan de al menos 3 experimentos independientes, por triplicado, los cuales se compararon mediante una *t-student*. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para el análisis de RT-qPCR se consideraron como significativamente diferentes la expresión de ARNm, cuyos valores sean mayores a 2 y menores a 0.5 (Morey et al., 2006).



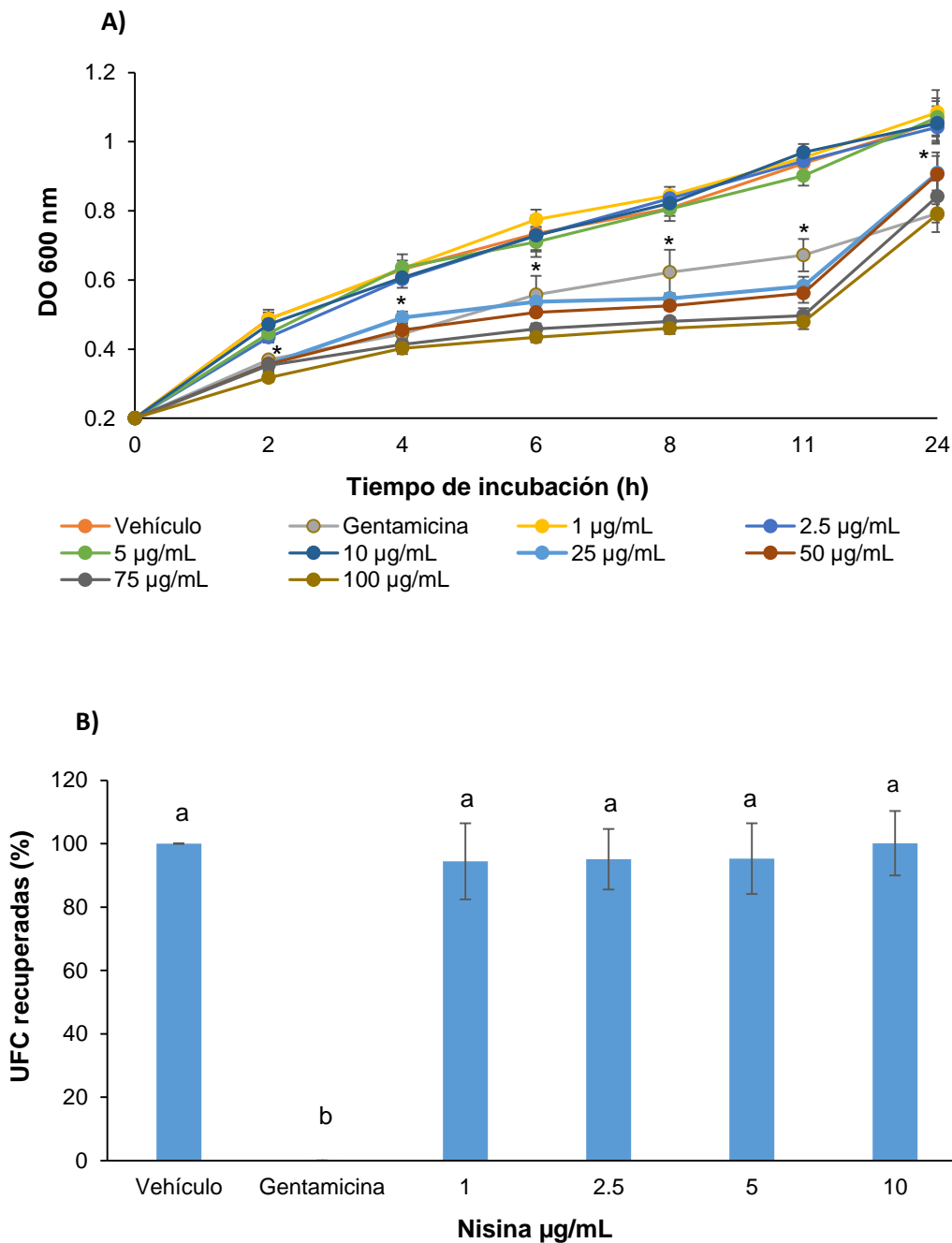
## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Efecto de la nisina y el quitosano sobre el crecimiento de *S. aureus*

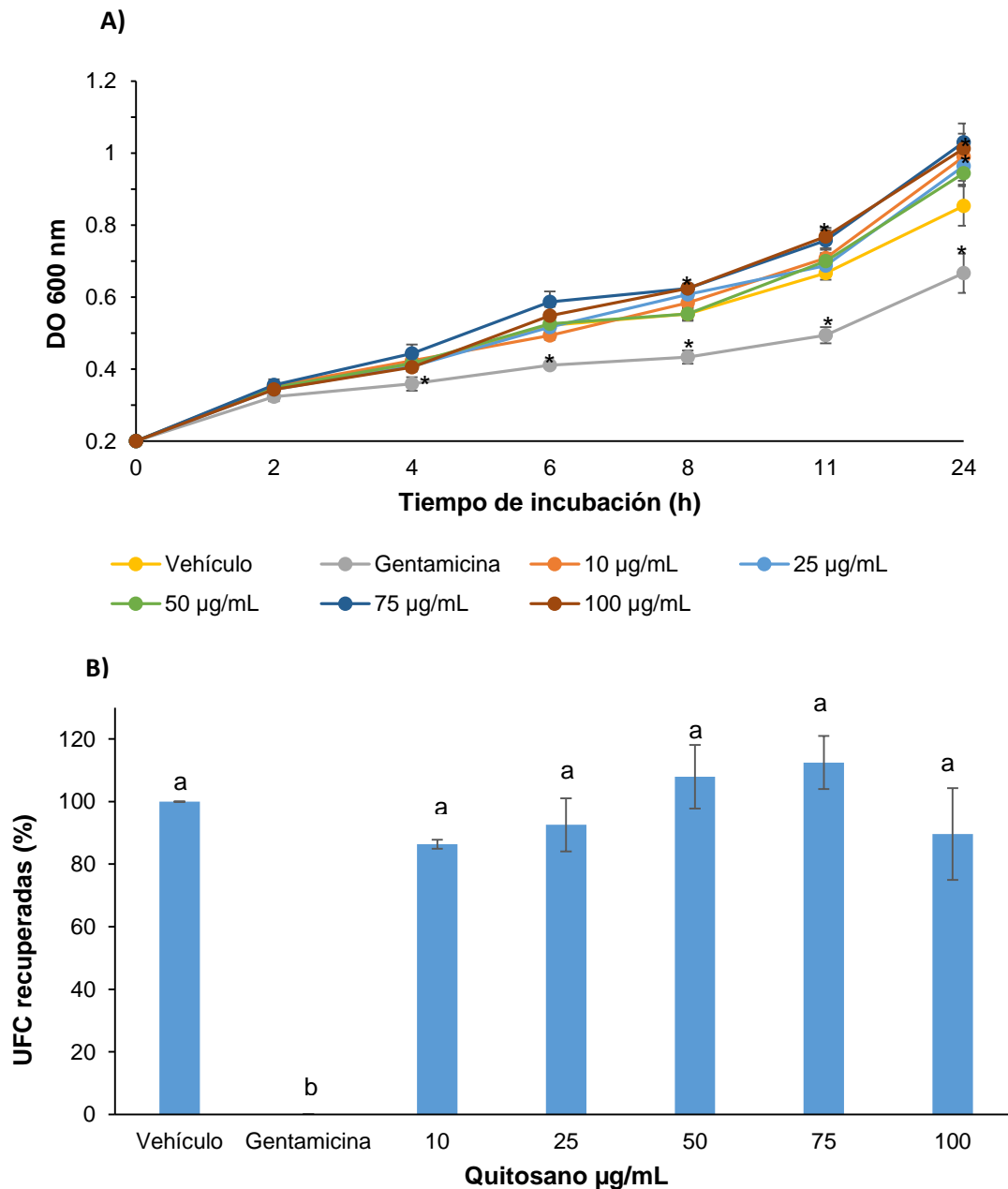
Al tratarse de compuestos antimicrobianos con amplia actividad sobre patógenos causantes de mastitis bovina, entre ellos *S. aureus* y de acuerdo al objetivo del trabajo de evaluar el efecto inmunomodulador de las moléculas, se determinó el efecto de la nisina y el quitosano sobre el crecimiento de la bacteria con la finalidad de seleccionar aquellas concentraciones que no afectaran el crecimiento de *S. aureus*. Se incubó a la bacteria en presencia de diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano (1-100 µg/mL) y el polímero (10-100 µg/mL) por 24 h. En el caso de la nisina, los resultados mostraron que durante las primeras horas de cultivo se presentó un efecto bacteriostático; sin embargo, la bacteria recuperó su crecimiento a partir de las 11 h. Este efecto no se observó en concentraciones menores de 10 µg/mL (Figura 12A). Así mismo, no se observaron diferencias en el porcentaje de UFC recuperadas después de 24 h de tratamiento con la nisina en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 12B). En el mismo sentido, el quitosano no afectó el crecimiento de *S. aureus* durante los tiempos evaluados para las distintas concentraciones de trabajo (Figura 13A). Un comportamiento similar se observó en el porcentaje de UFC, ya que no se afectó en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 13B).

### 8.2 Efecto de la nisina y el quitosano sobre la viabilidad de las CEMB

Para determinar el efecto de la nisina (1-10 µg/mL) y el quitosano (10-100 µg/mL) en la viabilidad de las CEMB, las células fueron tratadas independientemente con las distintas concentraciones establecidas de ambas moléculas durante 24 y 48 h. Los resultados obtenidos a las 24 h mostraron que todas las concentraciones evaluadas para la nisina no afectaron la viabilidad de las CEMB; sin embargo, a las 48 h, la viabilidad de las células disminuyó en las concentraciones de 1 µg/mL (8.21%) y 2.5 µg/mL (9.78%), a diferencia del resto de las concentraciones (5 y 10 µg/mL) en las que no se afectó la viabilidad (Figura 14).



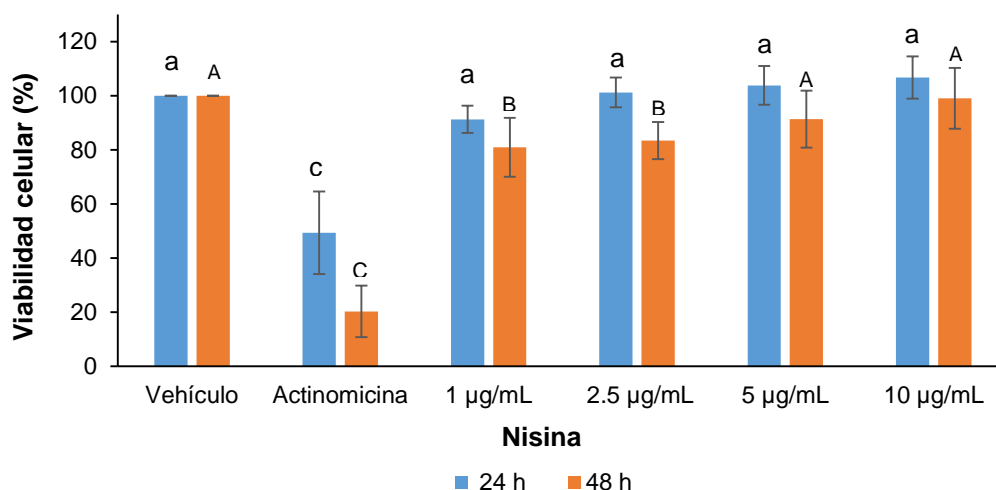
**Figura 12. Efecto de la nisina sobre el crecimiento de *S. aureus*.** (A) Se cultivó *S. aureus* a una DO<sub>600</sub> de 0.2 ( $9.2 \times 10^7$  UFC) y luego se adicionó la nisina a las concentraciones indicadas, se midió la DO<sub>600</sub> a distintos intervalos de tiempo durante 24 h. “\*” indica cambios significativos con respecto al vehículo en el tiempo evaluado (*t-student*,  $p < 0.05$ ). (B) Se determinó el crecimiento bacteriano en presencia de la nisina determinando el porcentaje de UFC de *S. aureus* a las 24 h. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ). Los datos mostrados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido clorhídrico (20 mM); Gentamicina (80 µg/mL).



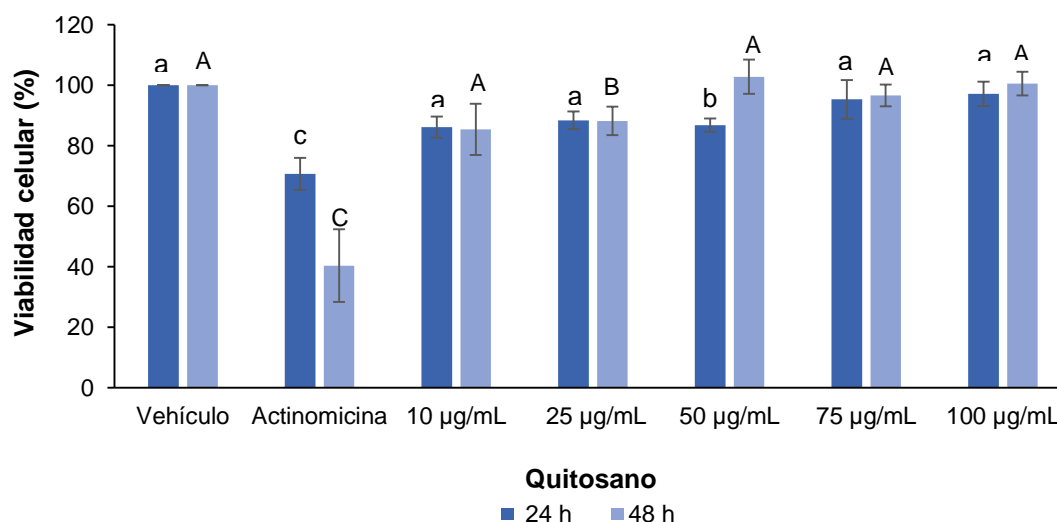
**Figura 13. Efecto del quitosano sobre el crecimiento de *S. aureus*.** (A) Se cultivó *S. aureus* a una  $DO_{600}$  de 0.2 ( $9.2 \times 10^7$  UFC) y luego se adicionó el quitosano a las concentraciones establecidas, se midió la  $D.O_{600}$  a distintos intervalos de tiempo durante 24 h. “\*” indica cambios significativos con respecto al vehículo en el tiempo evaluado (*t-student*,  $p < 0.05$ ). (B) Se determinó el crecimiento bacteriano en presencia del quitosano determinando el porcentaje de UFC de *S. aureus* a las 24 h. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ). Los datos mostrados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido acético (41.63 mM); Gentamicina (80 µg/mL).

Bajo las mismas condiciones de trabajo se evaluó el efecto del quitosano sobre la viabilidad de las CEMB. Los resultados mostraron que las células expuestas a las concentraciones de 10, 25, 75 y 100 µg/mL a las 24 h no mostraron diferencias significativas con respecto al vehículo; es decir, la viabilidad de las

CEMB no se afectó por estas concentraciones. A las 48 h, las concentraciones de 10, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  no mostraron diferencia significativa con respecto al vehículo, solo en la concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  se observó una ligera disminución de la viabilidad (7.05%) (Figura 15).



**Figura 14. Efecto de la nisina sobre la viabilidad de las CEMB.** Se cultivaron CEMB en presencia de nisina a las concentraciones establecidas (1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 y 48 h. La viabilidad se determinó mediante ensayo de MTT. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ) dentro del tiempo evaluado. Los datos mostrados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido clorhídrico (1 mM); Actinomicina (500  $\mu\text{g/mL}$ ).



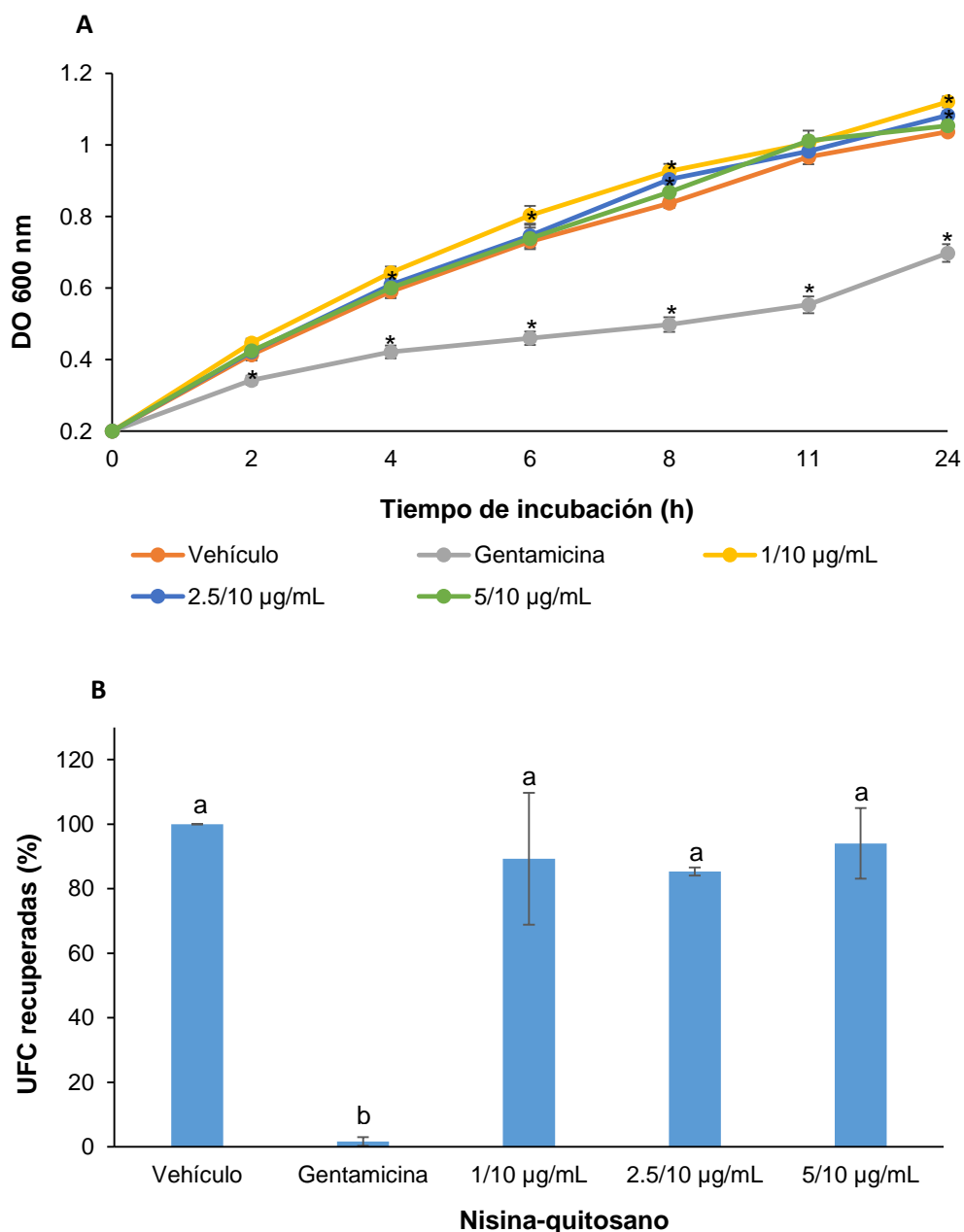
**Figura 15. Efecto del quitosano sobre la viabilidad de las CEMB.** Se cultivaron CEMB en presencia de quitosano y se determinó la viabilidad mediante ensayo de MTT a las 24 y 48 h. Las concentraciones evaluadas fueron 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ) dentro del tiempo evaluado. Los datos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido acético (41.63 mM); Actinomicina (500  $\mu\text{g/mL}$ ).

### **8.3 Efecto del compuesto nisina-quitosano sobre el crecimiento de *S. aureus* y viabilidad de las CEMB**

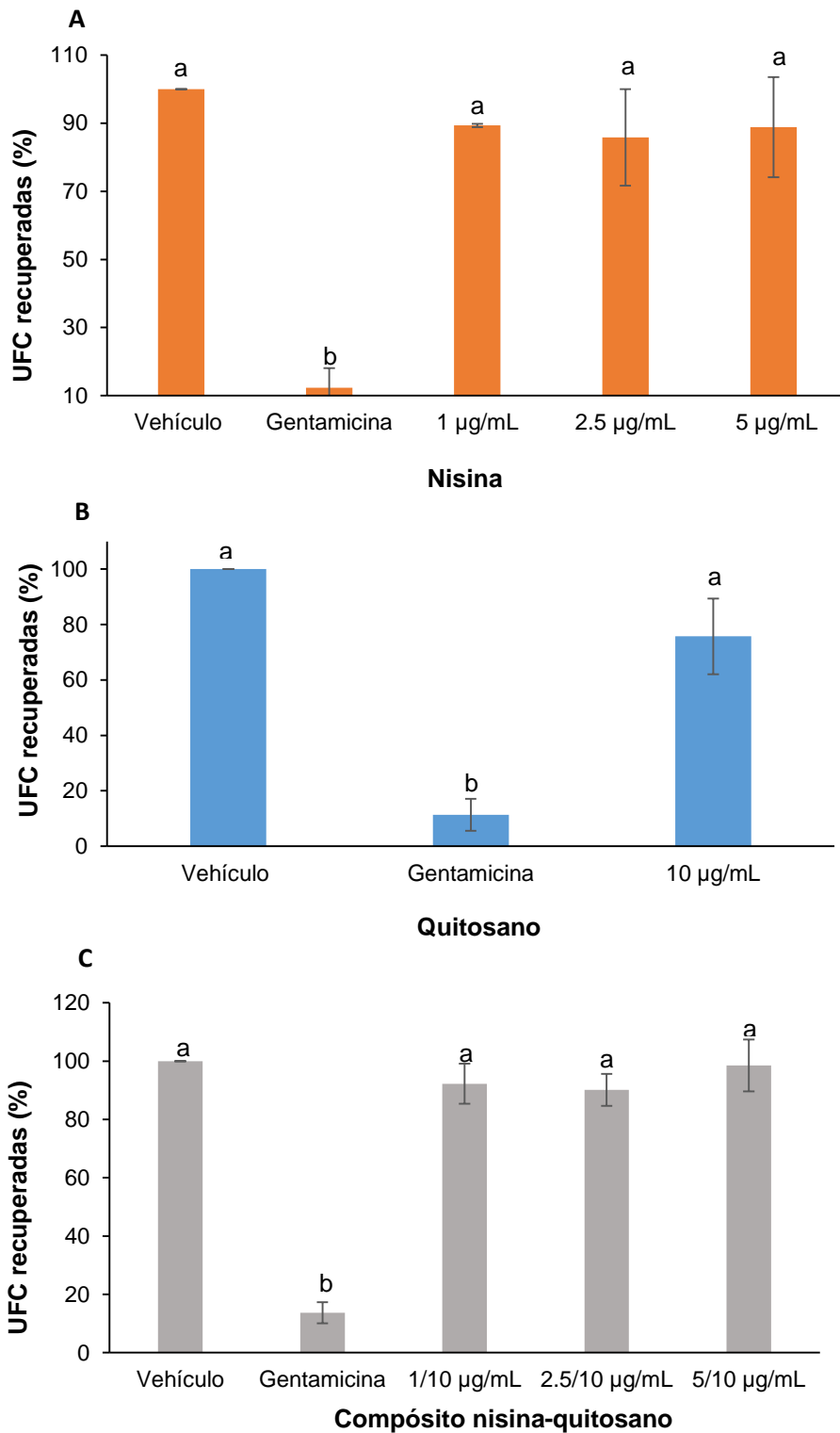
Con base a los resultados obtenidos de los efectos de la nisina y el quitosano en el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB, se seleccionaron tres concentraciones de nisina (1, 2.5 y 5 µg/mL) y una concentración de quitosano (10 µg/mL), con la finalidad de preparar y evaluar el efecto de los siguientes compósitos sobre el crecimiento bacteriano y la viabilidad celular: nisina-quitosano 1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL, respectivamente. Se analizó el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica en intervalos de 2 h durante 24 h y el conteo de las UFC a las 24 h. Los resultados mostraron que el compósito a las concentraciones evaluadas no afectó el crecimiento de la bacteria (Figura 16A). Lo anterior coincidió con el porcentaje de UFC, ya que en ninguna de las concentraciones evaluadas hubo un efecto sobre el crecimiento bacteriano, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto al vehículo (Figura 16B).

Por otro lado, en los ensayos de infección, las CEMB se infectaron con *S. aureus* durante 2 h. Por lo anterior, se determinó también el efecto de la nisina (1, 2.5 y 5 µg/mL), el quitosano (10 µg/mL) y el compósito (1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL) sobre las UFC recuperadas a las 2 h de infección. Los resultados mostraron que tanto la nisina, el quitosano, así como el compósito, no afectaron el crecimiento de la bacteria a las 2 h de incubación (Figura 17A-C).

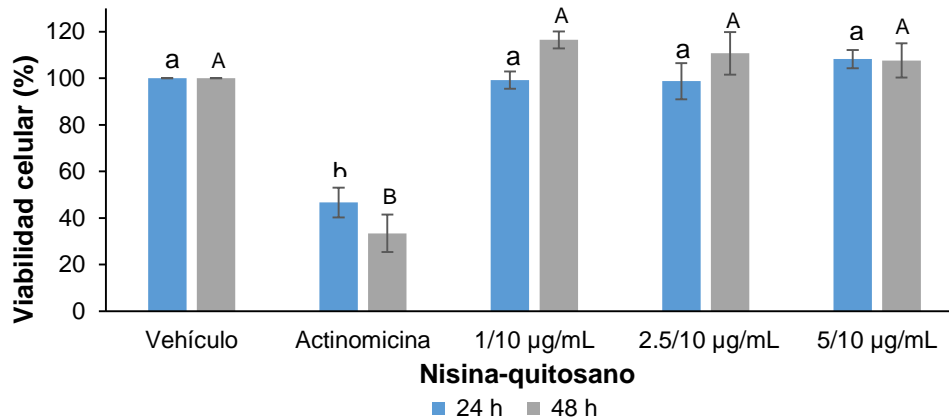
Respecto a las células, éstas fueron tratadas independientemente con las distintas concentraciones establecidas del compósito durante 24 y 48 h. Las concentraciones evaluadas a estos intervalos de tiempo no afectaron la viabilidad de las células, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto al vehículo (Figura 18).



**Figura 16. Efecto del compuesto nisina-quitosano sobre el crecimiento de *S. aureus*.** (A) Se cultivó *S. aureus* a una  $DO_{600}$  de 0.2 ( $9.2 \times 10^7$  UFC) y luego se adicionó el compuesto a las concentraciones establecidas y se midió la  $DO_{600}$  a distintos intervalos de tiempo durante 24 h. “\*” indica cambios significativos con respecto al vehículo en el tiempo evaluado (*t-student*,  $p < 0.05$ ). (B) Se determinó el crecimiento bacteriano en presencia del compuesto determinando el porcentaje de UFC de *S. aureus* a las 24 h. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ). Los datos mostrados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 mM); Gentamicina (80 µg/mL).



**Figura 17. Crecimiento de *S. aureus* en presencia de nisina, quitosano y el compósito.** Se cultivó *S. aureus* a una  $DO_{600}$  de 0.2 ( $9.2 \times 10^7$  UFC) y luego se adicionó la nisina **A**), el quitosano **B**) y el compósito **C**) a las concentraciones establecidas. Se determinó el crecimiento bacteriano determinando el porcentaje de UFC de *S. aureus* a las 2 h. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ). Los datos mostrados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo nisina: ácido clorhídrico (2 mM); Vehículo quitosano: ácido acético (41.63 mM); Vehículo compósito: ácido acético (4.163) y ácido clorhídrico (0.5 mM); Gentamicina (80 µg/mL).

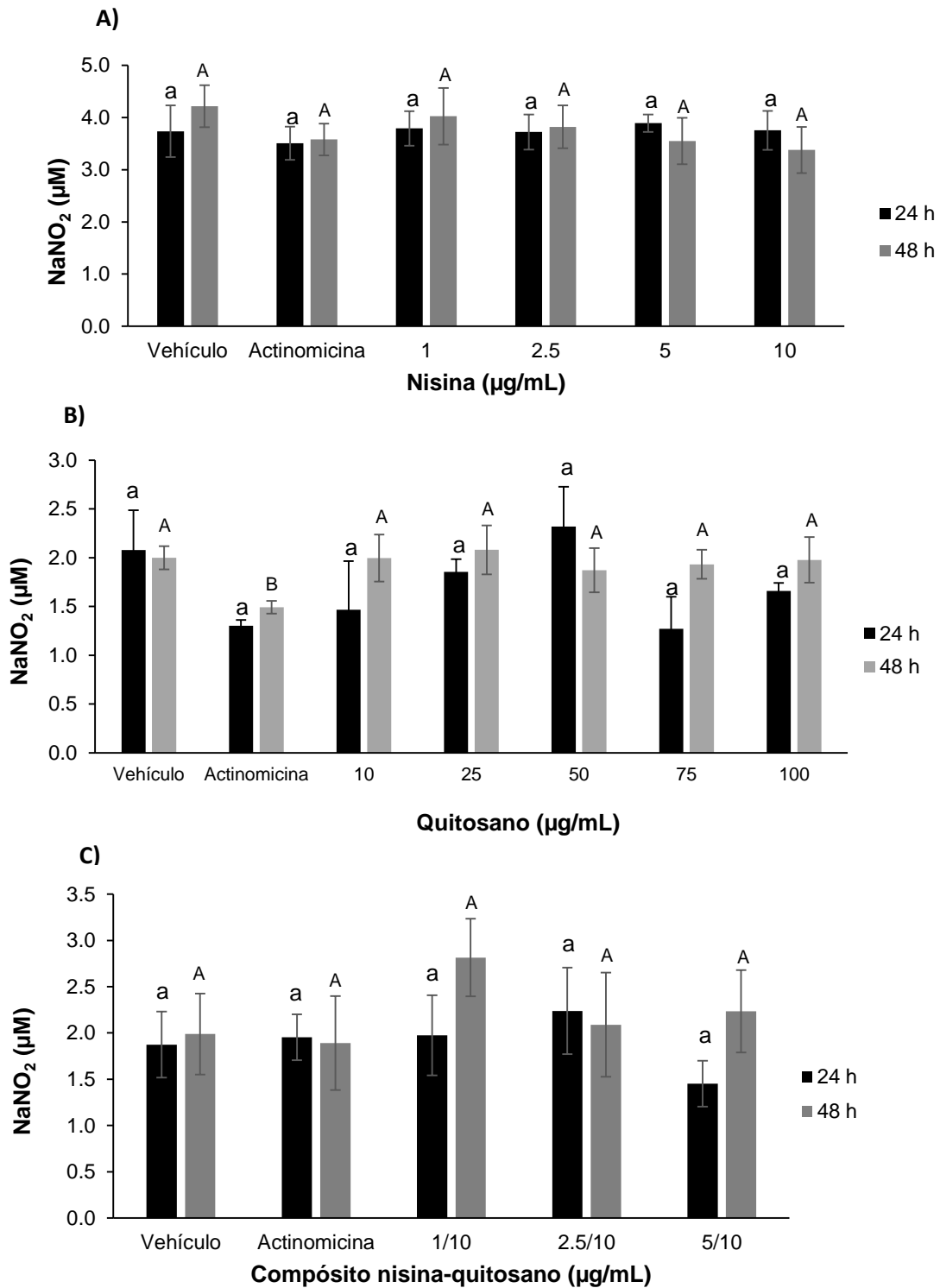


**Figura 18. Efecto del compuesto nisina-quitosano sobre la viabilidad de las CEMB.** Se cultivaron CEMB en presencia del compuesto y se determinó la viabilidad mediante ensayo de MTT a las 24 y 48 h. Las concentraciones evaluadas fueron 1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL de nisina-quitosano. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ) dentro del tiempo evaluado. Los datos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo: ácido acético (4.163 mM) y ácido clorhídrico (0.5 mM); Actinomicina (500 µg/mL).

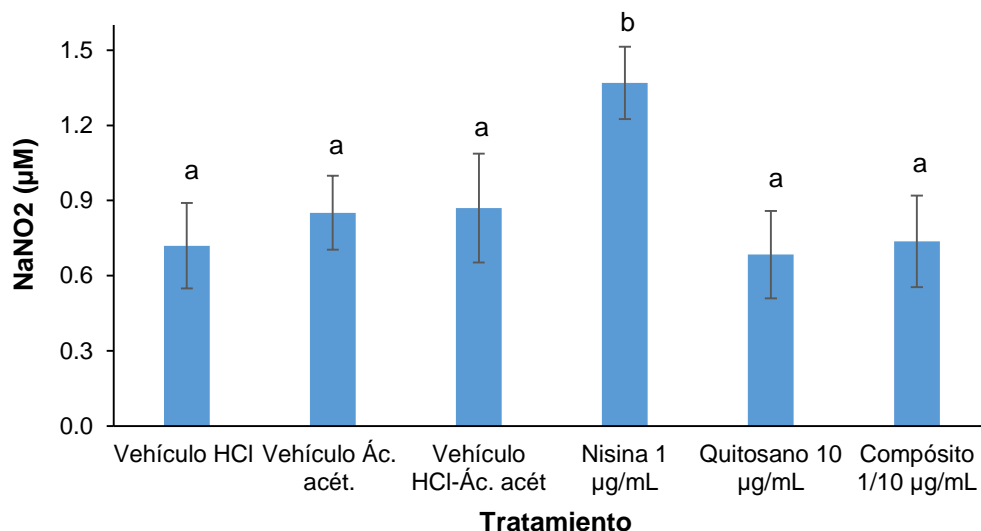
#### **8.4 Efecto de nisina, quitosano, el compuesto nisina-quitosano sobre y/o la infección por *S. aureus* sobre la producción de NO en las CEMB**

La cuantificación de NO se realizó con el medio condicionado de las CEMB, recuperado de los ensayos de viabilidad en el que fueron tratadas a las 24 y 48 h con las distintas concentraciones de nisina, quitosano y el compuesto. Los resultados mostraron una producción similar de NO (1.9 a 2.1 µM) cuando las células se trataron con el vehículo de ácido acético o el vehículo del compuesto (ácido clorhídrico y ácido acético) por 24 y 48 h (Figura 19B,C). El vehículo de ácido clorhídrico promueve una mayor producción de NO (3.8 a 4.2 µM) con respecto a los vehículos mencionados anteriormente (Figura 19A). Sin embargo, la nisina (Figura 19A), el quitosano (Figura 19B) y el compuesto (Figura 19C) no tienen efecto sobre la producción de NO a las 24 y 48 h. Además, se cuantificó la producción de NO por las CEMB tratadas con nisina (1 µg/mL), quitosano (10 µg/mL), el compuesto (1/10 µg/mL) y la infección con *S. aureus* por 24 h. Los resultados mostraron que la infección disminuye la producción de NO en las CEMB (Figura 20) con respecto a los vehículos sin infección (Figura 19A-C). No obstante, cuando las células fueron tratadas con nisina (1 µg/mL) junto con la infección, aumentó significativamente la producción de NO (1.4 µM); mientras que el resto de las condiciones no mostraron diferencias significativas con respecto a los vehículos correspondientes (Figura 20).





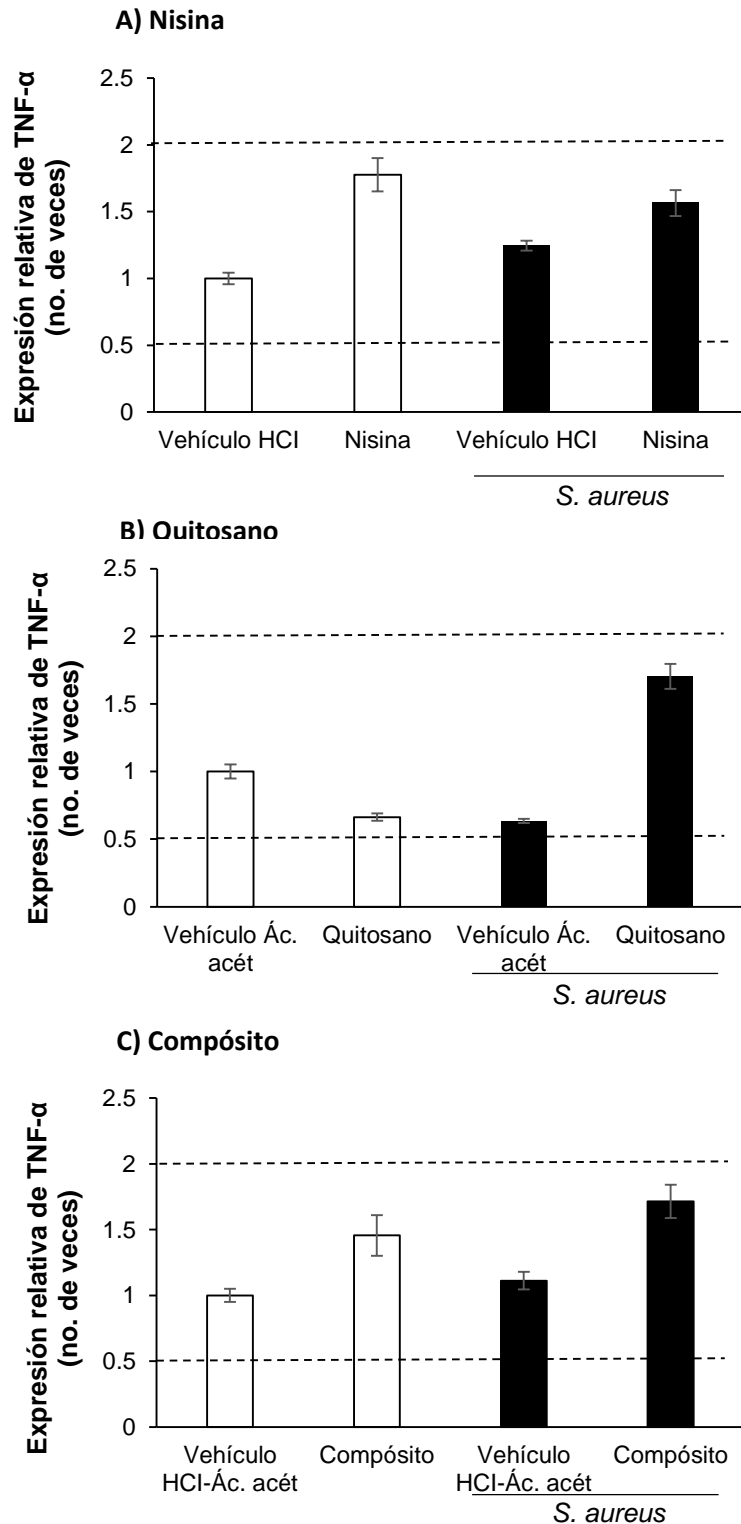
**Figura 19. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto.** Las células fueron tratadas con nisina **A)**, quitosano **B)** y el compuesto **C)**. Se determinó la cantidad de NO producido por las CEMB tratadas con las diferentes concentraciones evaluadas por 24 y 48 h. El NO fue medido como la concentración de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) presente en el medio condicionado. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t*-student, *p*<0.05) dentro del tiempo evaluado. Los datos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado. Vehículo nisina: ácido clorhídrico (1 mM); Vehículo quitosano: ácido acético (41.63 mM); Vehículo compuesto: ácido acético (4.163 mM) y ácido clorhídrico (0.5 mM); Actinomicina (500 µg/mL).



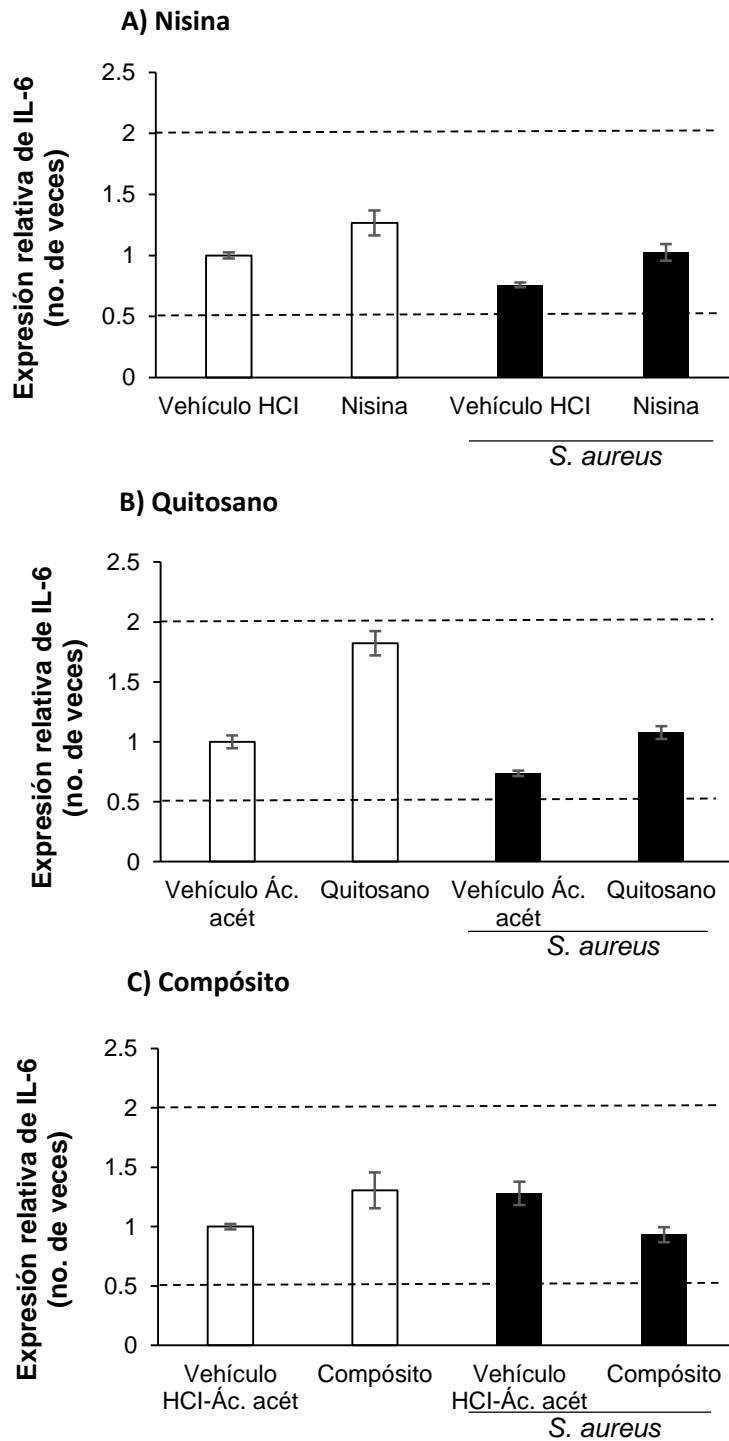
**Figura 20. Cuantificación de la producción de NO en las CEMB tratadas con nisina, quitosano, el compósito y la infección con *S. aureus*.** Se determinó la cantidad de NO producido por las CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito en conjunto con la infección. El NO fue medido como la concentración de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) presente en el medio condicionado. Letras diferentes indican cambios significativos con respecto al vehículo (*t-student*,  $p < 0.05$ ). Los datos corresponden a dos experimentos independientes por cuadruplicado. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét.: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét.: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 mM).

### 8.5 Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6

Con la finalidad de determinar si las moléculas por separado, así como el compósito, modulan la defensa de las CEMB antes y después de la infección por *S. aureus*, se evaluó la expresión de distintos genes de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Las CEMB mostraron una expresión basal de todas las citocinas pro-inflamatorias evaluadas. Además, las células tratadas con nisina (1  $\mu\text{g/mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g/mL}$ ) y el compósito (1/10  $\mu\text{g/mL}$ ) no modificaron los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 21A-C) e IL-6 (Figura 22A-C). Así mismo, la infección no indujo la expresión de estas citocinas; incluso, cuando las células fueron tratadas con nisina (1  $\mu\text{g/mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g/mL}$ ) o el compósito (1/10  $\mu\text{g/mL}$ ) en conjunto con la infección la expresión de TNF- $\alpha$  (Figura 21A-C) e IL-6 (Figura 22A-C) no se modificó.

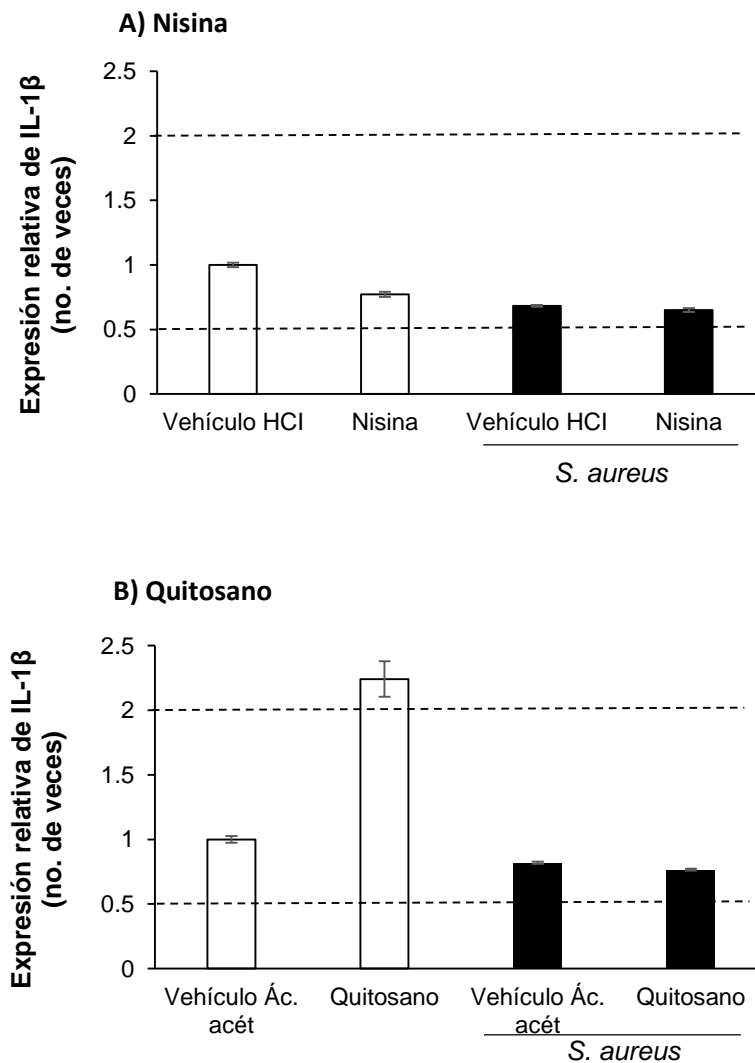


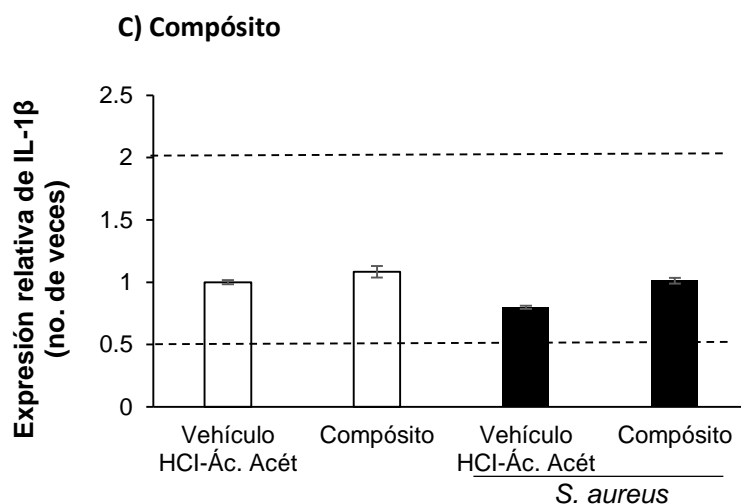
**Figura 21. Expresión génica de TNF- $\alpha$  en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión del ARNm de TNF- $\alpha$ . Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1  $\mu\text{g/mL}$ ), **B)** quitosano (10  $\mu\text{g/mL}$ ) y **C)** compósito (1/10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 mM).



**Figura 22. Expresión génica de IL-6 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión del ARNm de IL-6. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1 µg/mL), **B)** quitosano (10 µg/mL) y **C)** compósito (1/10 µg/mL) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados ± EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 Mm).

Por otro lado, en la figura 23 se muestra los resultados obtenidos del análisis de expresión de la IL-1 $\beta$ . Se observó que al estimular las CEMB con quitosano (10  $\mu$ g/mL) la expresión de la citocina aumentó (~2.2 veces) en relación con el vehículo, no obstante, este efecto se revirtió en conjunto con la infección, ya que se observó una disminución similar a la de las células infectadas (Figura 23B). La infección por sí sola no indujo la expresión de la IL-1 $\beta$ ; así mismo, el tratamiento con la nisina (1  $\mu$ g/mL) y el compuesto (1/10  $\mu$ g/mL) sin y con la infección no promovieron la expresión del ARNm de esta citocina en las CEMB (Figura 23A,C).



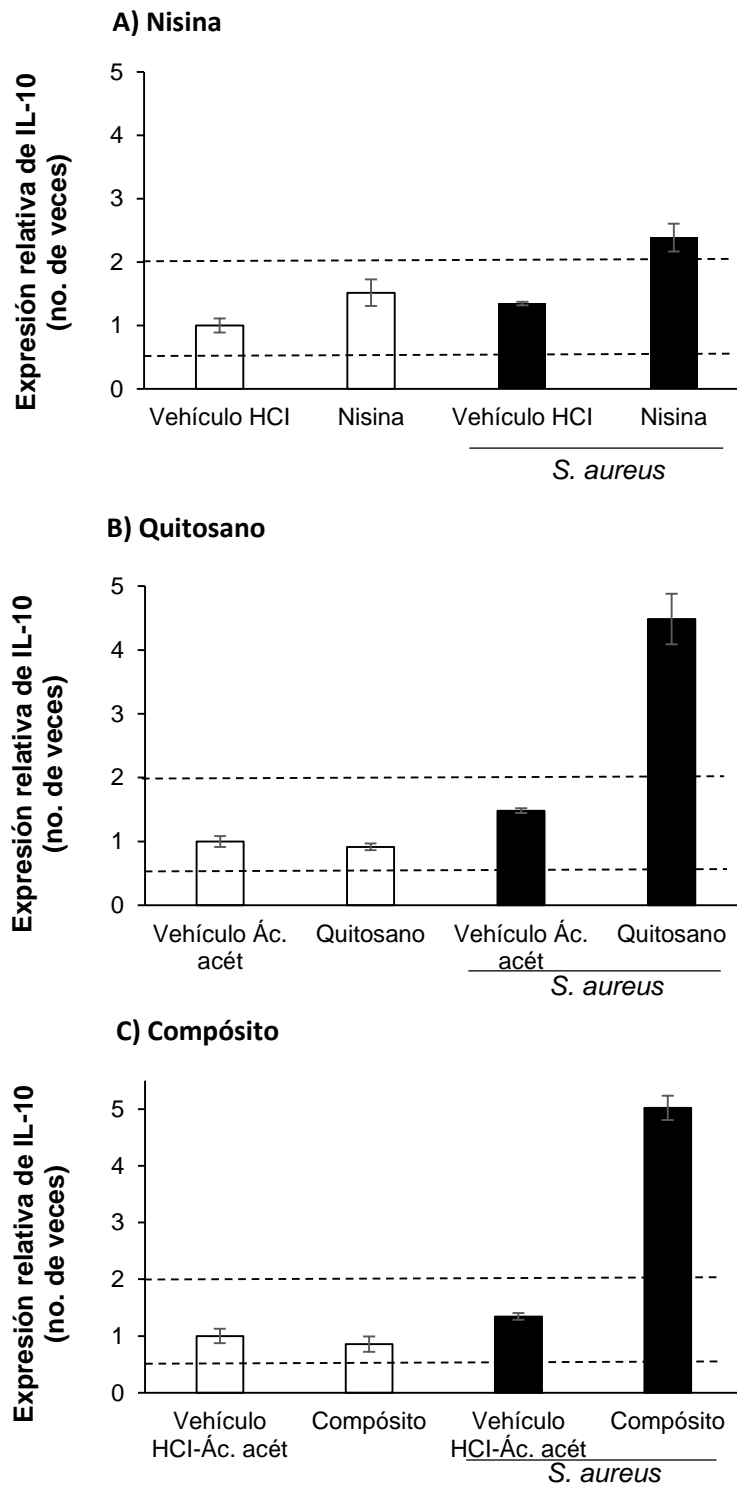


**Figura 23. Expresión génica de IL-1 $\beta$  en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-1 $\beta$ . Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1  $\mu$ g/mL), **B)** quitosano (10  $\mu$ g/mL) y **C)** compósito (1/10  $\mu$ g/mL) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 Mm).

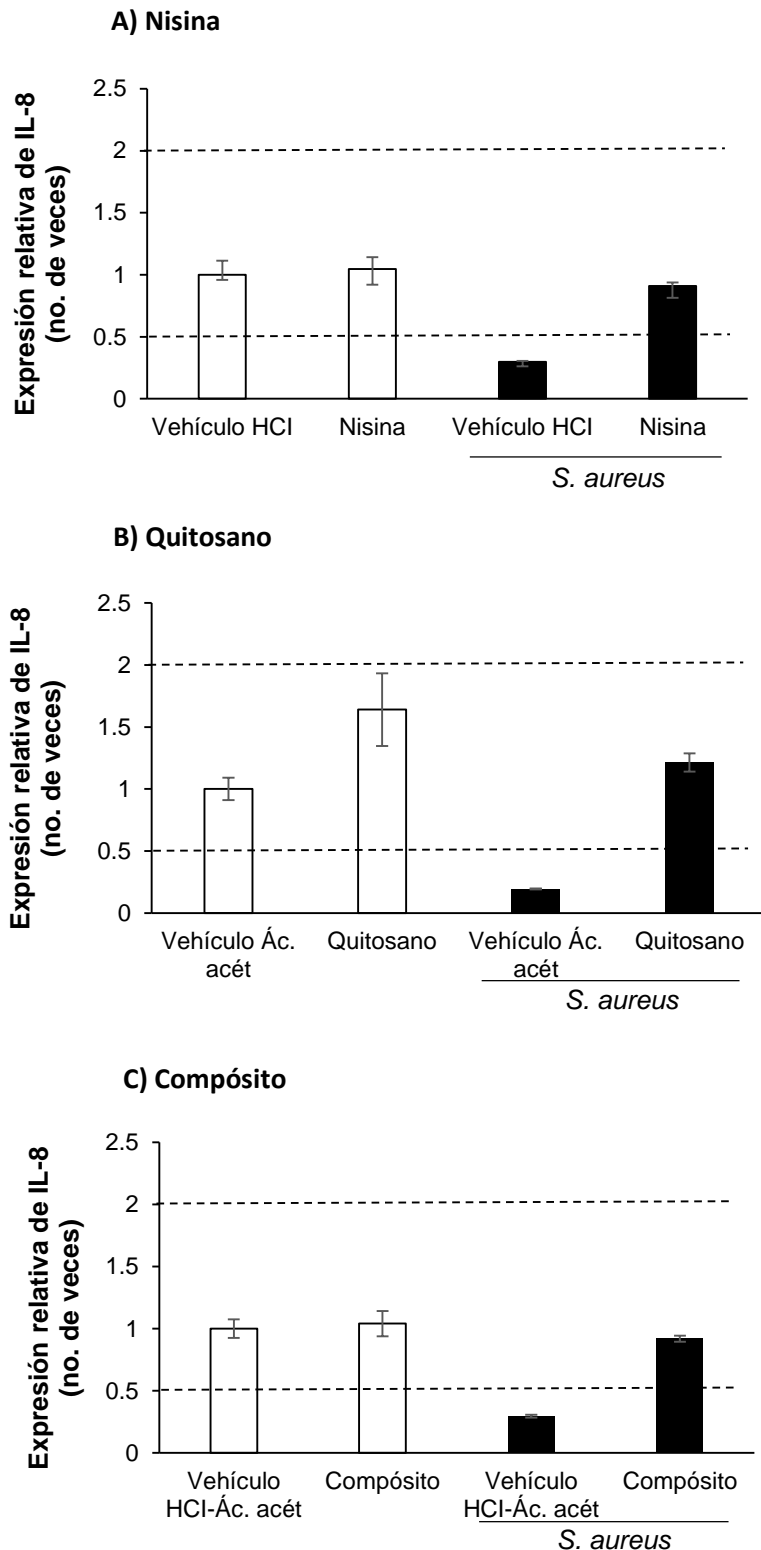
### 8.6 Efecto de nisina, quitosano y el compósito nisina-quitosano sobre la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y la quimiocina IL-8

Con base en lo anterior, se evaluó si las moléculas en estudio modifican la respuesta anti-inflamatoria y quimiotáctica en las CEMB, previo y posterior a la infección. En cuanto a la IL-10, los tratamientos con la nisina (1  $\mu$ g/mL), quitosano (10  $\mu$ g/mL) y el compósito (1/10  $\mu$ g/mL) no modificaron su expresión (Figura 24A-C). Cuando las CEMB se desafiaron con *S. aureus* no cambió la expresión de la IL-10; interesantemente, la infección en conjunto con la nisina (1  $\mu$ g/mL), el quitosano (10  $\mu$ g/mL) y el compósito (1/10  $\mu$ g/mL) indujo la expresión de esta citocina hasta ~2.3, ~4.4 y ~5 veces, respectivamente (Figura 24A-C).

Por su parte, la expresión de la IL-8 no se modificó con la nisina (1  $\mu$ g/mL), el quitosano (10  $\mu$ g/mL) o el compósito (1/10  $\mu$ g/mL). Sin embargo, la infección reprimió la expresión de la quimiocina. Notoriamente, este efecto se revirtió cuando las CEMB se trataron previo a la infección con nisina (1  $\mu$ g/mL), quitosano (10  $\mu$ g/mL) y el compósito (1/10  $\mu$ g/mL) (Figura 25A-C). Lo anterior, podría sugerir un papel anti-inflamatorio y quimiotáctico para las moléculas por separado y el compósito, durante la infección por *S. aureus*.



**Figura 24. Expresión génica de IL-10 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-10. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), **B)** quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y **C)** compósito (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 Mm).



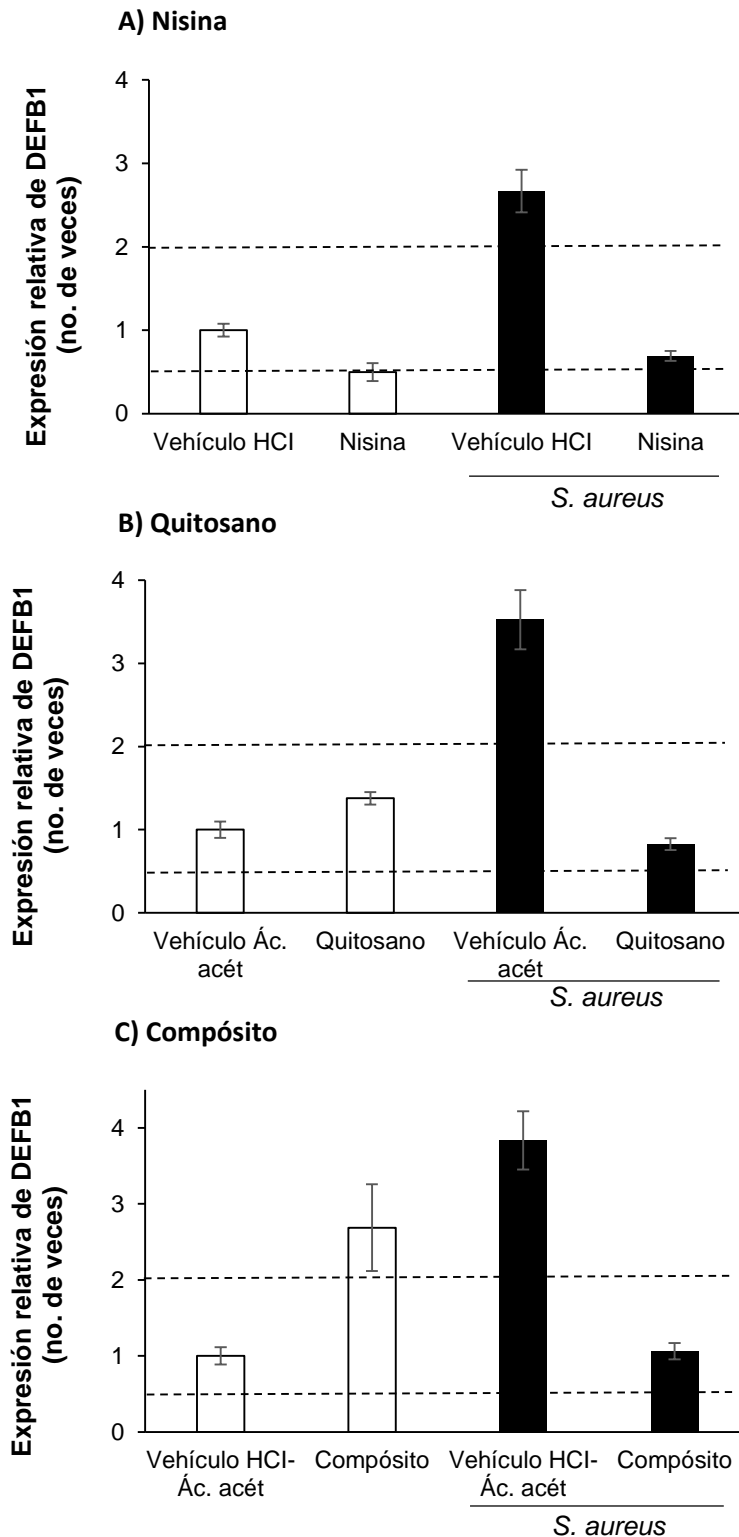
**Figura 25. Expresión génica de IL-8 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de IL-8. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), **B)** quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y **C)** compósito (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 Mm).



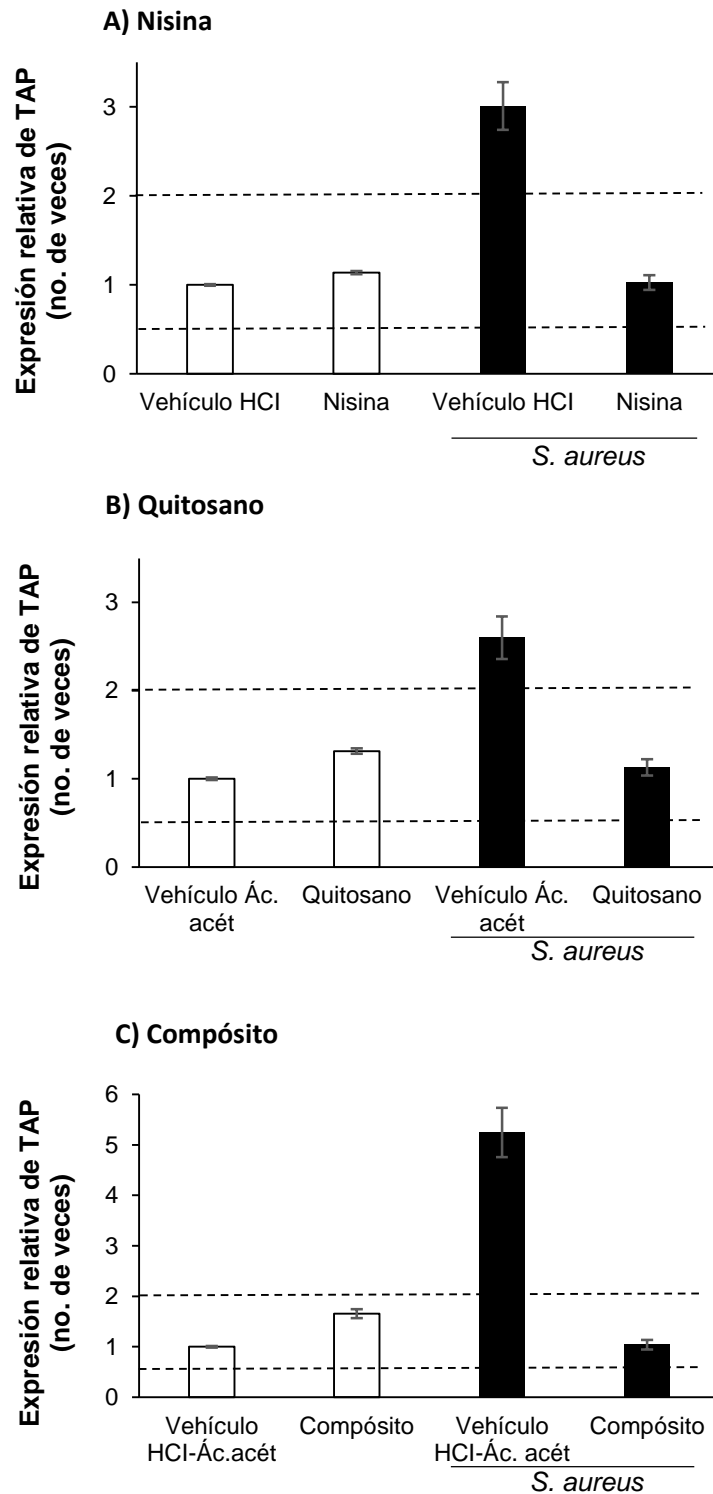
### **8.7 Efecto de nisina, quitosano y el compuesto nisina-quitosano sobre la expresión de los péptidos antimicrobianos DEFB1, TAP y BNBD10**

Durante un proceso infeccioso, como parte de la RII, la célula hospedera, además de citocinas y quimiocinas, también expresa péptidos antimicrobianos. Por ello, se analizó la expresión relativa de los péptidos antimicrobianos DEFB1, TAP y BNBD10. Las CEMB sin infectar mostraron una expresión basal para todos los péptidos antimicrobianos evaluados. La expresión de la DEFB1 no se modificó en las células tratadas con quitosano (10 µg/mL); mientras que el tratamiento con nisina (1 µg/mL) reprimió la expresión del péptido antimicrobiano (~0.5 veces). Interesantemente, el compuesto indujo un efecto superior en la expresión de la DEFB1 (~2.6 veces) que el obtenido con las moléculas por separado (Figura 26C). Por otro lado, la infección por sí sola indujo la expresión de la DEFB1 (~2.5 a ~4 veces). En los tratamientos con nisina (1 µg/mL), quitosano (10 µg/mL) o el compuesto (1/10 µg/mL) junto con la infección, se observó una disminución en la expresión del ARNm de la DEFB1 (~0.6, ~0.8 y ~1 veces, respectivamente) en comparación con la infección sin tratamiento. (Figura 26A-C).

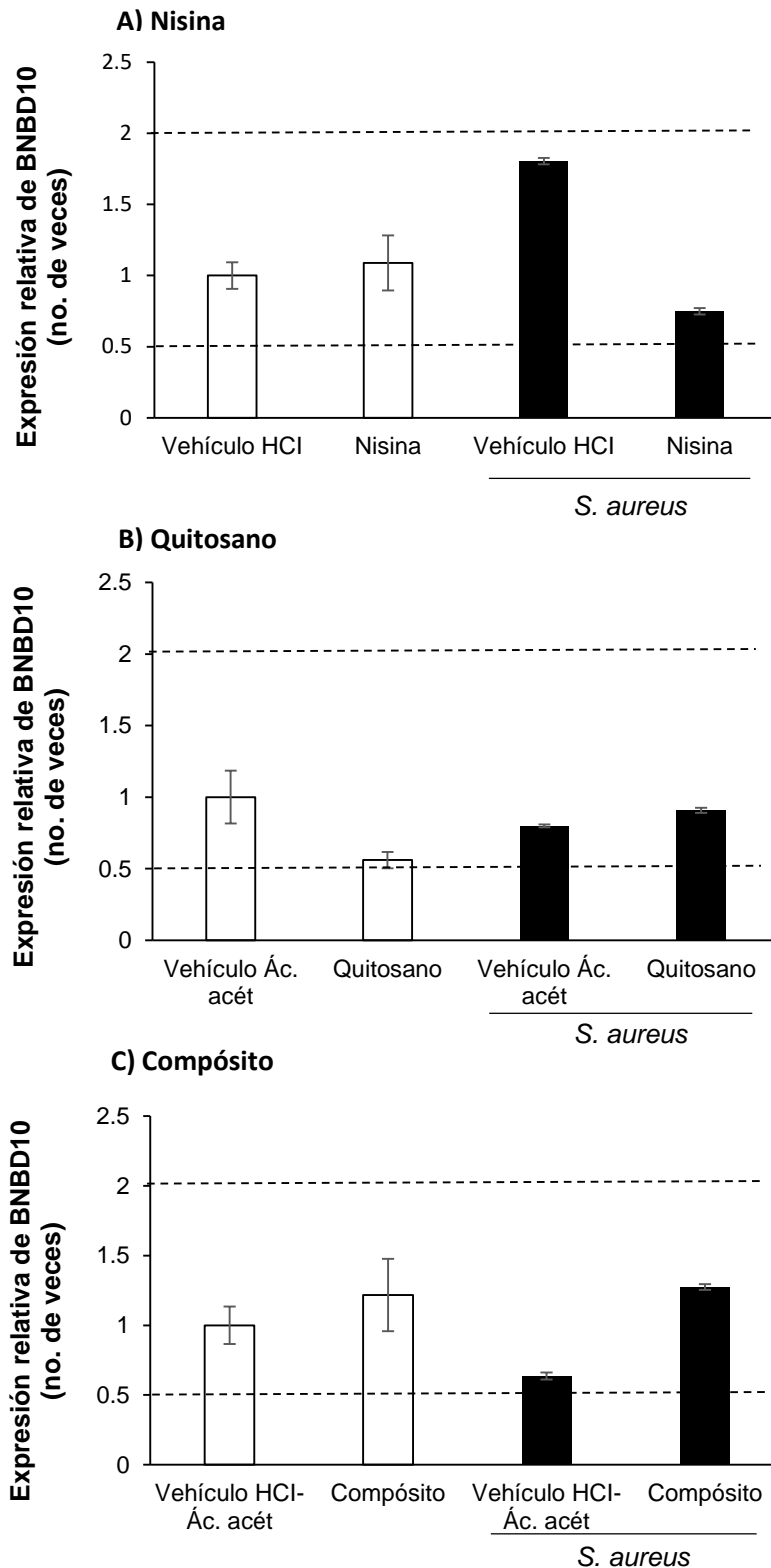
En lo que respecta a TAP y BNBD10, la nisina (1 µg/mL), el quitosano (10 µg/mL) y el compuesto (1/10 µg/mL) no indujeron la expresión del ARNm previo a la infección (Figura 27A-C y Figura 28A-C). La infección, por su parte, promovió la expresión de TAP, pero no de BNBD10; en combinación con la nisina (1 µg/mL), quitosano (10 µg/mL) o el compuesto (1/10 µg/mL) se revirtió el efecto de la infección, ya que disminuyó la expresión de TAP, mientras que para BNBD10 se mantuvo sin cambios con respecto a las CEMB infectadas (Figura 27A-C y Figura 28A-C).



**Figura 26. Expresión génica de DEFB1 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de DEFB1. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1 µg/mL), **B)** quitosano (10 µg/mL) y **C)** compósito (1/10 µg/mL) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados ± EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 Mm).



**Figura 27. Expresión génica de TAP en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compósito.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de TAP. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), **B)** quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y **C)** compósito (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados  $\pm$  EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 mM).



**Figura 28. Expresión génica de BNBD10 en CEMB tratadas con nisina, quitosano y el compuesto.** Análisis de RT-qPCR que muestra los niveles de expresión de ARNm de BNBD10. Las CEMB se trataron con: **A)** nisina (1 µg/mL), **B)** quitosano (10 µg/mL) y **C)** compuesto (1/10 µg/mL) durante 24 h y luego se desafiaron con *S. aureus* durante 2 h. Cada barra muestra la media de cuadruplicados ± EE de dos experimentos independientes. Los valores de expresión superiores a 2 o inferiores a 0.5 se consideraron ARNm expresados diferencialmente significativos. Vehículo HCl: ácido clorhídrico (0.5 mM); Vehículo Ác. acét: ácido acético (4.163 mM); Vehículo HCl-Ác. acét: ácido clorhídrico (0.5 mM) y ácido acético (4.163 mM).

## IX. DISCUSIÓN

La producción y calidad de la leche es imprescindible para el consumo humano; no obstante, su producción es afectada por la presencia de infecciones intramamarias como la mastitis bovina. Esta es una enfermedad de relevancia mundial, recurrente en numerosos hatos lecheros y responsable de pérdidas económicas importantes (Idriss et al., 2021; Jung et al., 2021). *S. aureus* es el microorganismo causal más común en casos clínicos y subclínicos de esta patología y dada su capacidad para internalizarse y sobrevivir en diferentes tipos celulares, es responsable de causar infecciones crónicas. El uso de antibióticos como tratamiento para el control de la afección ha sido deficiente debido a la aplicación de dosis incorrectas o errores en los tiempos de aplicación inapropiados, lo que ha resultado en la selección de bacterias resistentes, por lo que se continúa la búsqueda de alternativas de control (Pereyra et al., 2014; Idriss et al., 2021).

La nisina y el quitosano son moléculas de origen natural con propiedades antimicrobianas sobre una amplia variedad de microorganismos patógenos, entre ellos *S. aureus* (Sánchez et al., 2018); además, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de algunos hospederos y mediar la defensa de los mismos (Kindrachuk et al., 2012; Bellich et al., 2016). Interesantemente, en la actualidad no hay reportes acerca del efecto inmunomodulador del quitosano en un cultivo primario de CEMB. Aunado a lo anterior, en un estudio realizado por Sánchez et al. (2018), se reportó un efecto antimicrobiano aditivo del compuesto nisina-quitosano sobre aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina. Por lo anterior, evaluar el efecto del compuesto en la RII de las CEMB es atractivo. En este trabajo se evaluó el efecto de las moléculas por separado y el compuesto en la modulación de la expresión de genes de la inmunidad innata en CEMB durante la infección con *S. aureus* ATCC 27543. Se observó que la nisina (1 µg/mL) en conjunto con la infección aumenta la producción de NO. El quitosano (10 µg/mL) modula al alza la expresión de la IL-1β; además, la nisina (1 µg/mL), el quitosano (10 µg/mL) o el compuesto (1/10 µg/mL) en conjunto con la infección inducen la expresión de la IL-10 e IL-8. Finalmente, el compuesto (1/10 µg/mL) ejerce un efecto superior en la expresión de la DEFB1.

Estudios previos realizados por Sánchez et al. (2018), evidenciaron el efecto antibacteriano de la nisina, quitosano y el compósito sobre *S. aureus* ATCC 27543 a 1750 µg/mL, 1500 µg/mL y 1500-1250 µg/mL, respectivamente. Así mismo, otros grupos de trabajo han reportado el efecto antibacteriano de la nisina a 6.22 µg/mL (Jia et al., 2019) y del quitosano a 100 y 400 µg/mL sobre *Staphylococcus* spp. y *S. aureus* V329 (Felipe, 2016). Por lo anterior se evaluó si las concentraciones inmunomoduladoras propuestas para nisina, quitosano y el compósito tenían un efecto antibacteriano. Los resultados obtenidos mostraron que la nisina (Figura 12A-B y Figura 17A), el quitosano (Figura 13A-B y Figura 17B) y el compósito (Figura 16A-B y Figura 17C), no afectaron el crecimiento de la bacteria. La nula actividad antimicrobiana se puede explicar debido a que en este trabajo se utilizaron concentraciones inferiores a las reportadas por Sánchez et al. (2018) y porque se usó otra cepa de *S. aureus* con lo reportado por Jia et al. (2019) y Felipe, 2016), la cual, puede ser inhibida a concentraciones de nisina y quitosano diferentes.

Respecto a la viabilidad de las CEMB, la nisina (Figura 14) y el quitosano (Figura 15) no fueron citotóxicos para las CEMB; es decir, las concentraciones evaluadas para estas moléculas no indujeron la muerte celular en los tiempos de exposición evaluados, a excepción de 1 y 2.5 µg/mL de nisina y 50 µg/mL de quitosano a las 48 h. Estos datos son consistentes con resultados disponibles en la literatura, por ejemplo, se ha observado que la viabilidad de macrófagos J774 no se afectó cuando fueron tratados con la nisina (25, 50 y 100 µg/mL) (Moein et al., 2018). Aunado a lo anterior, Małaczewska et al. (2019) determinaron que la nisina, en el rango de 1.6–50 µg/mL, no fue citotóxica para leucocitos de sangre periférica porcina. Además, estudios realizados en PBMC humanos, demostraron que la nisina no fue citotóxica para estas células en concentraciones de hasta 200 µg/mL (Kindrachuk et al., 2012). No obstante, a concentraciones más altas (168 y 725 µg/mL) y a tiempos de exposición superiores a las 24 h, la viabilidad de las células se vio afectada por el péptido, como se ha reportado en linfocitos polimorfonucleares humanos de sangre periférica, así como en líneas celulares leucémicas humanas Jurkat (células T) y Molt-4 (linfoblastos T), con una concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) de 725 µg/mL (Begde et al., 2011). Así mismo, en la línea celular HL-60 de mieloblastos humanos (células

precursoras de granulocitos), después de 48 h de exposición a 168 µg/mL de nisina, se observó una disminución en la viabilidad (Cruz et al., 2006).

En cuanto al quitosano, se ha reportado que a concentraciones de 0.1-100 µg/mL no disminuye la viabilidad de células MAC-T a las 24 h (Felipe, 2016); así mismo, Ning et al. (2015), determinaron que a concentraciones de 2.5, 10 y 40 µg/mL de quitosano de bajo peso molecular no se observó un efecto citotóxico en macrófagos murinos (RAW264.7). Lo anterior concuerda para la mayoría de las concentraciones evaluadas; sin embargo, difiere para la concentración de 50 µg/mL a las 24 h y con la de 25 µg/mL, a las 48 h, ya que éstas presentaron un efecto citotóxico para las células.

Por otro lado, el compósito (1/10, 2.5/10 y 5/10 µg/mL) no mostró un efecto citotóxico para las CEMB a las 24 y 48 h (Figura 18). Este resultado es el esperado ya que, al tratarse de un compósito, el efecto conjunto de ambas moléculas puede repercutir sobre la viabilidad de las células, lo cual quedó descartado para las concentraciones evaluadas. Hasta donde hemos podido documentar, este es el primer trabajo en evaluar el efecto del compósito nisina-quitosano sobre la viabilidad celular. No obstante, hay reportes de compósitos a base de quitosano con otras moléculas de interés, tal como lo reportan Mengchen y Yi-Cheng (2019); quienes reportaron que las nanopartículas de quitosano-fucoidano (este último, un polisacárido aniónico sulfatado extraído de algas pardas) cargadas con proteínas de membrana de cáscara de huevo, no afectan la viabilidad de macrófagos murinos (RAW264.7) en concentraciones de 200 y 400 µg/mL a las 24 h. Así mismo, nanogeles de quitosano-carboximetil celulosa cargados con aceite de *Nigella sativa* (Comino Negro) no son citotóxicos a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/mL a las 48 h de exposición en fibroblastos dérmicos humanos (Bagheri et al., 2021).

En etapas tempranas de la infección, la RII es la que predomina y en ésta participan mediadores endógenos esenciales para la protección de la glándula mamaria, entre ellos la producción de NO; se trata de una molécula producida por la enzima iNOS que asume un papel importante en la respuesta inflamatoria (Oviedo-Boyso et al., 2006). Aunado a lo anterior, se ha reportado que las CEMB son capaces de producir NO durante la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). Los resultados mostrados en este

trabajo indican que las concentraciones evaluadas para nisina (Figura 19A) y quitosano (Figura 19B) no modifican la producción basal de NO en las CEMB. Estos resultados difieren con lo reportado por Ning et al. (2015), quienes observaron que el quitosano de bajo peso molecular (3 y 50 kDa) incrementa significativamente la producción de NO en macrófagos murinos (RAW264.7) de una manera dependiente de la concentración (2.5, 10 y 40  $\mu\text{g/mL}$ ). Además, se ha reportado una ligera inducción en la producción de NO en macrófagos peritoneales de pollo de engorda a concentraciones de 40, 80 y 160  $\mu\text{g/mL}$  de quitosano (Li et al., 2014). Esta discrepancia puede explicarse teniendo como base que los macrófagos son células fagocíticas profesionales con funciones especializadas en la respuesta inmune innata y adaptativa; entre ellas, la generación enzimática de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como parte de un mecanismo de eliminación microbiana (Abbas et al., 2015).

Aunado a lo anterior, la producción de NO por las CEMB disminuyó con la infección, lo que puede sugerir una débil defensa de las células en un proceso infeccioso. No obstante, estos resultados difieren con lo reportado por el grupo de trabajo, ya que Medina-Estrada et al. (2016) y Báez-Magaña et al. (2018) reportaron que la infección por *S. aureus* incrementa la producción de NO (3.2 y 85  $\mu\text{M}$ , respectivamente) en las CEMB. La disminución de la producción de NO en las CEMB durante la infección puede explicarse debido a que los sobrenadantes utilizados para cuantificar NO se recuperaron de los ensayos de extracción de ARN, en donde la inducción de TNF- $\alpha$  en las CEMB no se observó con la infección. En ese sentido, el uso de pasajes más avanzados repercutió en la producción de NO. La influencia del número de pasaje ya se ha reportado en distintos modelos de estudio como en células adrenocorticales bovinas y fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide, en donde se ha evidenciado que conforme aumenta el número de pasaje en el cultivo celular la expresión de genes cambia (Hornsby et al., 1992; Neumann et al., 2010).

Así mismo, se observó que el compuesto (Figura 19C y Figura 20) con y sin infección no promovió un cambio en la producción de NO en las concentraciones evaluadas con respecto al respectivo vehículo (vehículo con y sin infección). Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Meng-chen y Yi-Cheng (2019), señalan que el compuesto de nanopartículas de quitosano-



fucoidano cargadas con proteínas de membrana de cáscara de huevo, reduce significativamente la producción de NO en macrófagos murinos (RAW264.7) inducidos por lipopolisacáridos (LPS). Así mismo, el compósito a base de hidroxiapatita (mineral de fosfato de calcio)-alginato-quitosano-fucoidano no ejerció un cambio en la producción de NO en macrófagos murinos (RAW264.7), aún con la infección por LPS (Sumayya y Muraleedhara, 2021). Por otro lado, la nisina (Figura 20) en conjunto con la infección aumentó la producción de NO, evidenciando que las CEMB en un proceso infeccioso pueden defenderse mejor al aumentar la producción de un componente clave de la RII, el cual actúa como un antimicrobiano sobre patógenos. Hasta donde sabemos este es el primer reporte que demuestra que la nisina induce la producción de NO durante un proceso infeccioso.

La RII no solo se limita a la producción de NO, existen otros elementos clave en la defensa del hospedero como las citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, moléculas que fueron objeto de estudio en este trabajo. De acuerdo con los resultados obtenidos, la nisina y el compósito no modularon la expresión de la IL-1 $\beta$ . Interesantemente, el quitosano indujo la expresión del ARNm de la IL-1 $\beta$  hasta ~2.2 veces en las CEMB (Figura 23B). En concordancia, Felipe (2016) reportó el efecto del quitosano de bajo peso molecular (10  $\mu$ g/mL) en la expresión al alza de la IL-1 $\beta$  en células MAC-T. Lo anterior tiene relevancia ya que la IL-1 $\beta$  es un mediador importante de la respuesta inflamatoria; además de ser un inductor de la transcripción de genes dependientes de NF- $\kappa$ B que favorece la expresión de moléculas de adhesión (ICAM I y II) para el reclutamiento de células inmunes, y modula las respuestas inmunes adaptativas (linfocitos T) (Aarreberg et al., 2019).

Por otro lado, en el grupo de trabajo se ha reportado que la infección por *S. aureus* modula la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  en las CEMB. Alva-Murillo (2011) reportó que la infección induce hasta ~14 veces la expresión de TNF- $\alpha$ . Así mismo, Medina-Estrada et al. (2016) reportaron una inducción de ~4.5 veces de esta misma citocina. Los resultados anteriores difieren con lo observado en este trabajo de investigación, ya que la expresión relativa de TNF- $\alpha$  se mantuvo sin cambios con la infección (Figura 21A-C). Esta discrepancia se puede relacionar con el hecho de que los estudios realizados

previamente se hicieron con un lote de CEMB distinto; además de que el cultivo celular de un pasaje más temprano puede responder mejor a estímulos en comparación con un pasaje más avanzado.

En este sentido, Hornsby et al. (1992) reportaron que la expresión de hidroxilasas de esteroides disminuye en función del número de pasaje en células adrenocorticales bovinas, específicamente en las células de pasaje medio y posterior. De manera similar, se ha evaluado el efecto que tiene el número de pasaje (1 al 8) en la expresión de genes relacionados a la adhesión, apoptosis, proliferación, citocinas y receptores en un cultivo de fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide. Los resultados indicaron que a partir del pasaje 5 y 6 se evidencian cambios en la expresión génica (7 al 10% genes expresados diferencialmente), siendo más notorio en los pasajes posteriores (Neumann et al., 2010). Además, Gunja y Athanasiou (2007) reportaron que del pasaje 1 al 4, la expresión génica del colágeno II (molécula de la matriz extracelular) disminuyó significativamente en fibrocondrocitos de meniscos bovinos.

Por otra parte, no se modificó la expresión del ARNm de la IL-6 e IL-1 $\beta$  (Figura 22A-C y Figura 23A-C, respectivamente) con la infección. Lo anterior concuerda con lo reportado por Báez-Magaña et al. (2018), en donde la infección de CEMB no indujo cambios en la expresión de la IL-1 $\beta$  e IL-6, mientras que Medina-Estrada et al. (2016) no reporta un cambio en la expresión de la IL-6 por la infección con *S. aureus*. Así mismo, la falta de inducción en la expresión de citocinas pro-inflamatorias en las CEMB se mantuvo con los tratamientos de nisina, quitosano y el compósito en conjunto con la infección.

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, se analizó el efecto de los compuestos sobre la expresión de genes relacionados con citocinas anti-inflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. De acuerdo con los resultados obtenidos, la nisina (1  $\mu\text{g/mL}$ ), el quitosano (10  $\mu\text{g/mL}$ ) y el compósito (1/10  $\mu\text{g/mL}$ ) junto con la infección, indujeron la expresión de IL-10 hasta ~2.3, ~4.4 y ~5 veces, respectivamente (Figura 24A-C). Estos resultados sugieren que la nisina, el quitosano y el compósito tienen un papel anti-inflamatorio en las CEMB durante la infección por *S. aureus*.

En congruencia con estos resultados, Jia et al. (2019), observaron que en células epiteliales uterinas bovinas tratadas con nisina (6.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y estimuladas con *S. aureus*, se incrementaron los niveles de expresión de IL-10 y disminuyeron los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por su parte, el quitosano se ha relacionado mayoritariamente con un efecto pro-inflamatorio; sin embargo, reportes previos han evidenciado el papel anti-inflamatorio y ¿han evidenciado? que el polisacárido de 72 a 156 kDa inhibió la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en macrófagos murinos (RAW264.7) (Chang et al., 2019). No obstante, no se evaluó la expresión de la IL-10 para sustentar este efecto.

Aunado a lo anterior, se ha reportado el efecto anti-inflamatorio del compósito a base de hidroxiapatita-alginato-quitosano-fucoidan, al regular a la baja los niveles de expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en macrófagos murinos (RAW264.7) (Sumayya y Muraleedhara, 2021). En el mismo sentido, Zhou et al. (2021) reportaron que el compósito de ácido hialurónico-quitosano-dexametasona (medicamento anti-inflamatorio), reprimió la expresión de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH-3T3). Sin embargo, estos resultados no quedan del todo sustentados, ya que no se evaluó la expresión de la IL-10.

Por su parte, la infección de las CEMB con *S. aureus* reprimió la expresión de la IL-8, efecto que coincide con lo reportado por Alva-Murillo et al. (2014), quienes señalan que la infección con esta bacteria reguló negativamente la expresión de la IL-8 en estas células. Interesantemente, el pretratamiento de las CEMB con la nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y el compósito (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), revierte el efecto de la infección, restableciendo la expresión basal de esta quimiocina (Figura 25A-C). Lo anterior, tiene relevancia en un modelo de mastitis por *S. aureus*, ya que este patógeno reprime la expresión de la IL-8; lo cual, puede repercutir en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. No obstante, la represión de esta quimiocina por la infección se revierte cuando las CEMB son tratadas con nisina, quitosano y el compósito, sugiriendo un papel quimiotáctico para estas moléculas.

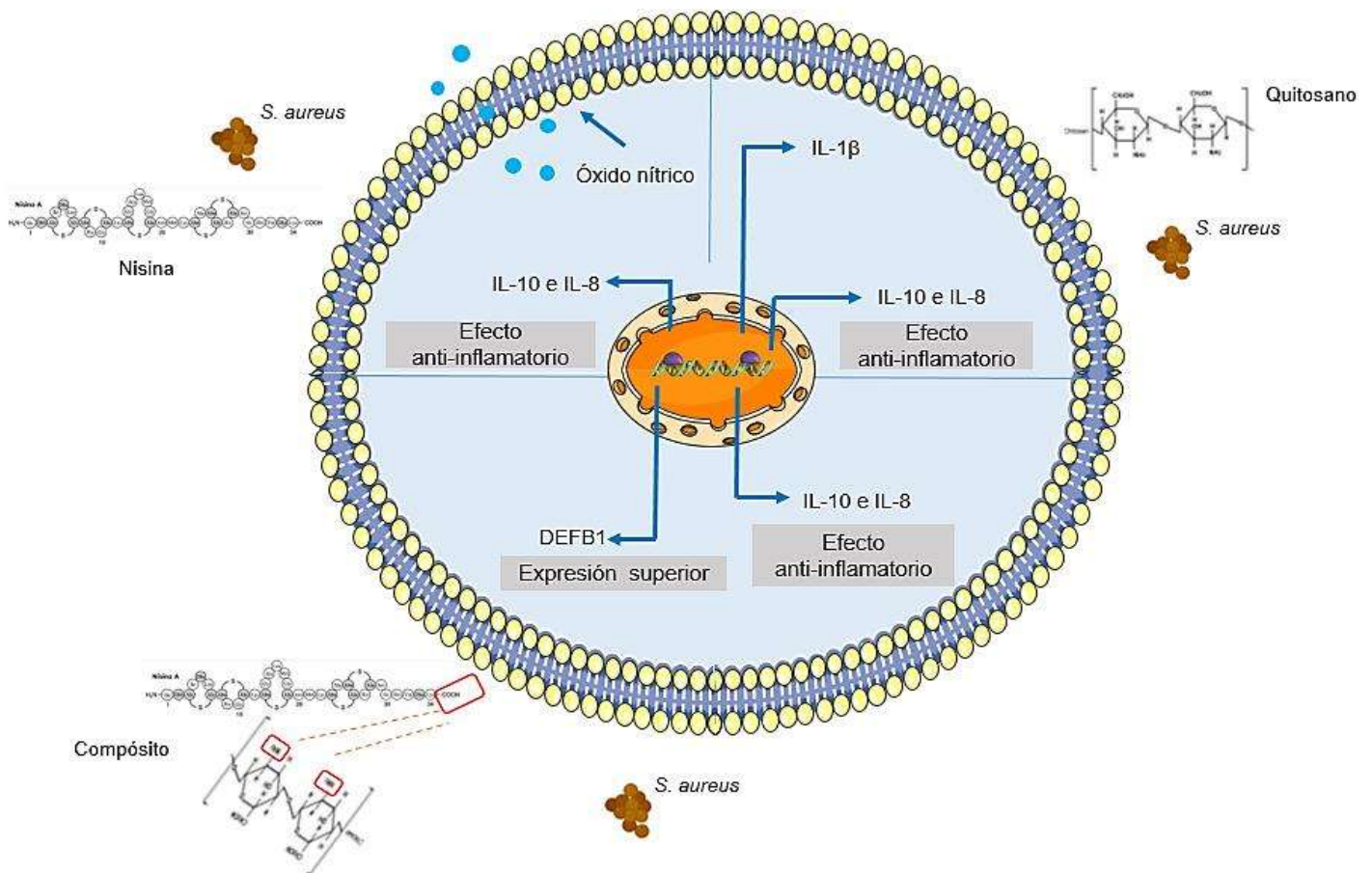
Estos datos concuerdan con lo observado por Kindrachuk et al. (2012) en células mononucleares de sangre periférica y con lo reportado por Jia et al. (2019) en

células epiteliales uterinas bovinas, en donde la nisina (150 y 6.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) promovió la expresión de la IL-8. En el mismo sentido, se ha observado que el quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) moduló la expresión al alza de esta quimiocina hasta  $\sim 1.3$  veces en células MAC-T junto con la infección por *S. aureus* V329 (Felipe, 2016). También, la literatura indica que la dieta complementada con el compuesto de quitosano-selenita (mineral), indujo la expresión del ARNm de la IL-8, de manera dependiente de la dosis, en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Ibrahim et al., 2021).

En cuanto a la expresión de péptidos antimicrobianos, a excepción de BNBD10, la infección por sí sola moduló al alza la expresión de TAP y DEFB1 (entre  $\sim 2.8$  y  $\sim 5.5$  veces) (Figura 27A-C y Figura 26A-C). Esto coincide con lo reportado por Alva-Murillo et al. (2014), en cuyo trabajo, la infección indujo la expresión de péptidos antimicrobianos. No obstante, este efecto no se mantuvo cuando se aplicaron los tratamientos de nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o el compuesto (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que sugiere que tanto las moléculas por separado como el compuesto no modulan la expresión de péptidos antimicrobianos durante la infección. Interesantemente, en ausencia de la infección, el compuesto (1/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tuvo un efecto mayor que las moléculas por separado, ya que favoreció la expresión del ARNm de la DEFB1 hasta  $\sim 2.6$  veces (Figura 26A-C) proporcionando a la célula una herramienta de defensa previo a una infección. Hasta donde hemos podido documentar, no hay reportes de compósitos a base de quitosano que modulen la expresión de péptidos antimicrobianos, por lo que este es el primer reporte que muestra el efecto del compuesto nisina-quitosano en la expresión al alza de la DEFB1, uno de los principales péptidos antimicrobianos de la RII.

Los resultados obtenidos en este trabajo se integran en la Figura 29. Un modelo que representa a una célula epitelial mamaria bovina, la cual fue expuesta a nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y el compuesto (1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), previo y posterior a la infección por *S. aureus*. En el modelo se incluyen los principales efectos observados sobre la RII de las CEMB, los cuales se indican a continuación: la nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en conjunto con la infección aumentó significativamente la producción de NO. El quitosano (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) indujo la expresión de la IL-1 $\beta$  ( $\sim 2$  veces). Por otro lado, la nisina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el quitosano

(10 µg/mL) y el compuesto (1/10 µg/mL), junto con la infección, incrementaron la expresión de la IL-10 en ~2, ~4 y ~5 veces, respectivamente. Así mismo, estos compuestos revirtieron la represión de expresión de la IL-8 ejercida por la infección. Además, el compuesto favoreció la expresión de la DEFB1 (~3 veces), ya que fue superior a la ejercida por las moléculas por separado. Cabe destacar que este es el primer reporte que muestra propiedades novedosas del quitosano en un cultivo primario de CEMB. Así mismo, en esta investigación se trabajó por primera vez el compuesto nisina-quitosano con un enfoque inmunomodulador. No obstante, sería interesante evaluar el efecto de las moléculas por separado, así como el compuesto, en la internalización de *S. aureus*, además de estudiar las rutas de transducción de señales que se activan o analizar qué marcas epigenéticas son reguladas por la nisina, quitosano, el compuesto y/o la infección por *S. aureus*. Lo anterior con la finalidad de tener datos más robustos del efecto de estos compuestos en la modulación de la RII, previo y posterior a la infección por *S. aureus*.



**Figura 29. Efecto de nisina, quitosano y el compósito sobre la RII en CEMB antes y después de la infección por *S. aureus*. A)** La nisina junto con la infección por *S. aureus* aumenta la secreción de NO en las CEMB, ejerce un efecto anti-inflamatorio al regular al alza la expresión de la IL-10, además de que promueve la expresión de la IL-8. **B)** El quitosano incrementa la expresión de la IL-1 $\beta$  y, en presencia de la infección, ejerce un efecto anti-inflamatorio regulando al alza la expresión de la IL-10 e induce la expresión a valores basales de la IL-8, la cual es reprimida por la infección. **C)** El compósito mantiene la expresión al alza de la IL-10 ejerciendo un efecto anti-inflamatorio durante la infección, induce la expresión de la IL-8 durante la infección y regula la expresión al alza de la DEFEB1, siendo mayor al efecto obtenido por las moléculas por separado.

## **X. CONCLUSIÓN**

La nisina, el quitosano o el compósito modulan la expresión de elementos de la inmunidad innata favoreciendo un efecto anti-inflamatorio en células epiteliales mamarias bovinas. Además, el compósito mejora la expresión del gen de la DEFB1 respecto a las moléculas individuales, pero no la del resto de los genes evaluados.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarreberg, L., Esser-Nobis, K., Driscoll, C., Shuvarikov, A., Roby, J. y Gale, M. (2019). Interleukin-1 $\beta$  induces mtDNA release to activate innate immune signaling via cGAS-STING. *Molecular Cell*, 74, 801-815. DOI: [10.1016/j.molcel.2019.02.038](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.038)
- Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, Shiv. (2015). *Imunología molecular y celular*. (8° ed.). Barcelona: Elsevier Inc.
- Abdelmegid, S., Murugaiyan, J., Abo, M., Caswell, J., Kelton, D. y Kirby, G. (2019). Mass spectrometry data from identification of host-defense related proteins using label-free quantitative proteomic analysis of milk whey from cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal Data in Brief*, 22, 909-913. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.01.013>
- Alanko, J. e Ivaska, J. (2016). Endosomes: Emerging platforms for integrin mediated FAK signalling. *Trends in Cell Biology*, 26 (6), 391–398. DOI: [10.1016/j.tcb.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.001)
- Alva-Murillo, P. (2011). Efecto de los ácidos grasos de cadena corta sobre la invasión de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Alva-Murillo, P., López-Meza, J. y Ochoa-Zazorsa, A. (2014). Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Research International*, 2014, 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/538546>
- Alva-Murillo, P., Medina-Estrada, R., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A. y López-Meza, J. (2015). The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Molecular Immunology*, 68 (2), 445–455. DOI: [10.1016/j.molimm.2015.09.025](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.025)
- Alva-Murillo, P., Téllez-Pérez, A., Medina-Estrada, I., Álvarez-Aguilar, C., Ochoa-Zarzosa, A. y López-Meza, J. (2014). Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial Pathogenesis*, 77, 24–30. DOI: [10.1016/j.micpath.2014.10.006](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.006)
- Anaya-López, J., Contreras-Guzmán, O., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V., López-Meza, J., Valdez-Alarcón, J. y Ochoa-Zarzosa, A. (2006) Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 81 (3), 358-361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.02.002>
- Antanaitis, A., Juozaitienė, V., Jonike, V., Baumgartner, W. y Paulauskas, A. (2021). Milk lactose as a biomarker of subclinical mastitis in dairy cows. *Animals*, 11 (6), 2-11. DOI: [10.3390/ani11061736](https://doi.org/10.3390/ani11061736)
- Arif, A., Husain, I., Bhat, S., Rehman, M., Razak, A., Bilal, S. y Mir, M. (2015). Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *International Journal of Current Research and Review*, 7 (5), 48-55.
- Ayadi, M. (2003). Evaluación de la estructura interna de la ubre mediante ecografía y efectos de la frecuencia de ordeño en vacas lecheras. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Baeza, C. (2016). Acute, subclinical, and subacute mastitis: Definitions, etiology, and clinical management. *Clinical Lactation*, 7 (1), 7-10 DOI: [10.1891/2158-0782.7.1.7](https://doi.org/10.1891/2158-0782.7.1.7)



- Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J. y Ochoa-Zarzosa, A. (2018). Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. *International Immunopharmacology*, 57, 47–54. DOI: [10.1016/j.intimp.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.001)
- Bagheri, F., Darakhshan, S., Mazloomi, S., Shiri, B. y Tahvilian, R. (2021). Dual loading of *Nigella sativa* oil-atorvastatin in chitosan–carboxymethyl cellulose nanogel as a transdermal delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 47(4), 569–578. DOI: [10.1080/03639045.2021.1892742](https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1892742)
- Baraki, A., Teklue, T., Atsbha, T., Tesfay, T. y Wayou, S. (2021). Prevalence and risk factors of bovine mastitis in southern zone of Tigray, northern Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2021, 1-6. DOI: [10.1155/2021/8831117](https://doi.org/10.1155/2021/8831117)
- Begde, D., Bundale, S., Mashitha, P., Rudra, J., Nashikkar, N., y Upadhyay, A. (2011). Immunomodulatory efficacy of nisin-a bacterial lantibiotic peptide. *Journal of Peptide Science*, 17, 438–444. DOI: <https://doi.org/10.1002/psc.1341>
- Bellich, B., D'Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A. y Cesàro, A. (2016). “The good, the bad and the ugly” of chitosans. *Marine Drugs*, 14 (5), 1-31. DOI: [10.3390/md14050099](https://doi.org/10.3390/md14050099)
- Bretado-Aragón, L., Jiménez-Mejía, R., López-Meza, J. y Loeza-Lara, P. (2016). Compósitos de nanopartículas de plata-quitosano: Una fuente potencial de nuevas terapias antimicrobianas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47 (4), 7-25. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956612001>
- Bueter, C., Lee, C., Rathinam, V., Healy, G., Taron, C., Specht, C. y Levitz, S. (2011). Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (41), 35447-35455, DOI: [10.1074/jbc.m111.274936](https://doi.org/10.1074/jbc.m111.274936)
- Cai, X., Chiu, Y. y Chen, Z. (2014). The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Molecular Cell*, 54 (2), 289-96. DOI: [10.1016/j.molcel.2014.03.040](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.040)
- Camussone, C. y Calvino, L. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociado con infecciones mamarias en bovinos: Relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 45 (2), 119-130. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Carroll, E., Jin, L., Mori, A., Muñoz, N., Oleszycka, E., Moran, H., Mansouri, S., McEntee, C., Lambe, E., Agger, E., Andersen, P., Cunningham, C., Hertzog, P., Fitzgerald, K., Bowie, A. y Lavelle, E. (2016). The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons. *Immunity*, 44 (3), 597-608. DOI: [10.1016/j.immuni.2016.02.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004)
- Castro, V., da Costa, G., Guimarães, A., Heinemann, M., Pereira, A. y Seles, E. (2020). Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>
- Chang, S., Lin, Y., Wu, G., Huang, C. y Tsai, G. (2019). Effect of chitosan molecular weight on anti-inflammatory activity in the RAW264.7 macrophage model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 167–175. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.02.06](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.06)
- Correa, Z., Bautista, S., Hernández, M. y Marquina, M. (2018). Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Revista*

*Mexicana de Fitopatología*, 36 (3), 457-467. DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1803-2>

- Costantini, R., Ventura, R., Hernández, M., Bautista, S. y Barrera, L. (2018). Potencial antifúngico de nanopartículas de quitosano y extracto de Arándano sobre *Colletotrichum fragariae* en fresa. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19, (1), 46-50. DOI: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612004>
- Cruz, L., Puertollano, M., Puertollano, E., de Cienfuegos, G. y de Pablo, M. (2006). *In vitro* biological activities of magainin alone or in combination with nisin. *Peptides*, 27, 1201–1209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.11.008>
- Espinosa, C. (2013). Preparación de materiales compuestos mediante la funcionalización covalente de nanotubos de carbono (CNTs) con polímero. Tesis de doctorado. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. San Luis Potosí, México.
- Ezzat, M., Quintela, M., Böhme, K., Fernández, I., Caamaño, S., Calo, P. y Barros, J. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2 (14), 1-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/659801>
- FAO. (2019). Animales lecheros. Recuperado el 14 de agosto de 2019 de: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/productiondairy-animals/es/>
- Felipe, V. (2016). Respuesta inmunológica e interacción microbiana en glándula mamaria bovina (*Bos taurus*): efecto del polisacárido quitosano. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Food and Drug Administration (FDA). (2021). Definición FDA para “Productos lácteos”. Recuperado el 20 de julio de 2021 de: [U.S. FDA Definition of Milk Products | Registrar \(registrarcorp.com\)](https://www.fda.gov/food/food-labeling/food-labeling-requirements/food-labeling-requirements-2021/food-labeling-requirements-2021-07-20)
- Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J. y Sonomoto, K. (2008). Complete covalent structure of nisin Q, new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (7), 1750–1755. DOI: [10.1271/bbb.80066](https://doi.org/10.1271/bbb.80066)
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. y Degraeve, P. (2015). Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 (8), 1262-1274 DOI: [10.1080/10408398.2013.763765](https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765)
- Giraudó, M., Ugarte, M., Scollo, D., Nonzioli, A. y Sánchez, H. (2010). Carbohidratos en los alimentos funcionales. Quitosano como suplemento diario, aditivo y nutracéutico. *Actualización en Nutrición*, 11 (4), 315-320.
- Gunja, N. y Athanasiou, K. (2007). Passage and reversal effects on gene expression of bovine meniscal fibrochondrocytes. *Arthritis Research and Therapy*, 9 (5), R93. DOI: [10.1186/ar2293](https://doi.org/10.1186/ar2293)
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P., López-Meza, J. y Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121 (1-2), 113-122. DOI: [10.1016/j.vetimm.2007.09.007](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.007)

- Hacker, C., Christ, N., Duchardt, E., Korn, S., Göbl, C., Berninger, L. y Wöhnert, J. (2015). The solution structure of the lantibiotic immunity protein nisl and its interactions with nisin. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (48), 28869–28886. DOI: [10.1074/jbc.m115.679969](https://doi.org/10.1074/jbc.m115.679969)
- Hernández, J., Angarita, M., Benavides, D. y Prada, C. (2015). Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Revista de Investigación en Salud*, 2 (2), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.24267/23897325.135>
- Hogeveen, H., Huijps, K. y Lam, T. (2011). Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59, 16-23. DOI: <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>
- Hornsby, P., Cheng, C., Lala, D., Maghsoudlou, S., Raju, S. y Yang, L. (1992). Changes in gene expression during senescence of adrenocortical cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43 (8), 951–960. DOI: [10.1016/0960-0760\(92\)90323-b](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90323-b)
- Huang, M., Khor, E. y Lim, L. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-53. DOI: [10.1023/b:pham.0000016249.52831.a5](https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016249.52831.a5)
- Ibrahim, D., Neamat, A., Ibrahim, S., Eissa, H., Fawzey, M., Mostafa, D., y Khater, S. (2021). Dual effect of selenium loaded chitosan nanoparticles on growth, antioxidant, immune related genes expression, transcriptomics modulation of caspase 1, cytochrome P450 and heat shock protein and *Aeromonas hydrophila* resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 110, 91–99. DOI: [10.1016/j.fsi.2021.01.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.01.003)
- Idriss, A., Lu, X., Abdalla, I., Idris, A., Chen, Z., Li, M., Mao, Y., Xu, T. y Yang, Z. (2021). Metformin inhibits lipoteichoic acid-induced oxidative stress and inflammation through AMPK/NRF2/NF-κB signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1-12. DOI: [10.3389/fvets.2021.661380](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.661380)
- Jia, Z., He, M., Wang, C., Chen, A., Zhang, X., Xu, J., Fu, H. y Liu, B. (2019). Nisin reduces uterine inflammation in rats by modulating concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines. *American Journal of Reproductive Immunology*, e13096, 1-11. DOI: [10.1111/aji.13096](https://doi.org/10.1111/aji.13096)
- Jiménez, P. (2013). Preparación de compuestos poliméricos de politereftalato de etilenglicol con óxido de grafeno reducido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León.
- Jung, D., Park, S., Ruffini, J., Dussault, F., Dufour, S. y Ronholm, J. (2021). Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* isolates from cases of bovine clinical mastitis identifies nine specific pathotype marker genes. *Microbial Genomics*, 7, 1-10. DOI: [10.1099/mgen.0.000597](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000597)
- Kibebew, K. (2017). Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7 (2), 1-5.
- Kindrachuk, J., Jenssen, H. y Elliott, M. (2012). Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: Lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate immunity*, 19 (3), 315-327. DOI: [10.1177/1753425912461456](https://doi.org/10.1177/1753425912461456)
- Kumar, S., Prokhorov, E., Hernández, M., Mota, J., Vázquez, M., Kovalenko, Y., Sanchez, I. y Luna, G. (2015). Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic

- antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal*, 67, 242–251. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.066>
- Lee, A., Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra, M., Peschel, A. y Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 1-23. DOI: [10.1038/nrdp.2018.33](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33)
- Li, H., Shi, B., Yan, S., Zhao, T., Li, J. y Guo, X. (2014). Effects of chitosan on the secretion of cytokines and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in peritoneal macrophages of broiler chicken. *International Journal Biology and Technology*, 57 (4), 466-471. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201401903>
- Li, T., Lu, H., Wang, X., Gao, Q., Dai, Y., Shang, J. y Li, M. (2017). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1-10. DOI: [10.3389/fcimb.2017.00127](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00127)
- Liu, G., Chen, S., Guan, G., Tan, J., Al-Dhabi, N., Wang, H., Duraipandiyar, V. y Fang, J. (2016). Chitosan modulates inflammatory responses in rats infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mediators of Inflammation*, 1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432845>
- López, M., Ruiz, S., Silva, N., Ornelas, J., Zamudio, P. y Burrueal, S. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, 18 (11), 13735–13753. DOI: [10.3390/molecules181113735](https://doi.org/10.3390/molecules181113735)
- Lowy, F. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339 (8), 520-532.
- Małaczewska, J. y Kaczorek, E. (2021). Nisin-A lantibiotic with immunomodulatory properties: A review. *Peptides*, 137, 1-8. DOI: [10.1016/j.peptides.2020.17047](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.17047)
- Małaczewska, J., Kaczorek, E., Wójcik, R., Rękawek, W. y Siwicki, A. (2019). *In vitro* immunomodulatory effect of nisin on porcine leucocytes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103, 882-893. DOI: [10.1111/jpn.13085](https://doi.org/10.1111/jpn.13085)
- Malvisi, M., Stuknyte, M., Magro, G., Minozzi, G., Geardini, A., De Noni, I. y Piccinini, R. (2016). Antibacterial activity and immunomodulatory effects on a bovine mammary epithelial cell line exerted by nisin A-producing *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*, 99 (3), 2288-2295. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10161>
- Mata, M., Guerrero, C., Rojas, M., Delgado, R., González, C., Sánchez, V., Pérez, D. y Vázquez, G. (2017). Componentes principales mediante espectroscopia FTIR como técnica de caracterización innovadora durante la diferenciación de células madre pluripotentes a células pancreáticas. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38 (1), 225-234. DOI: [10.17488/rmib.38.1.17](https://doi.org/10.17488/rmib.38.1.17)
- Medina, R. (2017). Efecto anti inflamatorio y antimicrobiano del 17  $\beta$ -Estradiol, en células de epitelio mamario bovino, durante la internalización de *Staphylococcus aureus*. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Medina-Estrada, R., López-Meza, J. y Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Anti-Inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2-4. DOI: [10.1155/2016/6120509](https://doi.org/10.1155/2016/6120509)
- Meng-Chen, L. y Yi-Cheng, H. (2019). Soluble eggshell membrane protein-loaded chitosan/fucoidan nanoparticles for treatment of defective intestinal epithelial cells.

- International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 949-958. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.03.113](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.113)
- Moein, M., Imani, A. y Mahmoodzadeh, H. (2018). Determining the effects of green chemistry synthesized Ag-nisin nanoparticle on macrophage cells. *Microbial Pathogenesis*, 114, 414-419. DOI: [10.1016/j.micpath.2017.12.034](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.034)
- Moran, H., Turley, J., Andersson, M. y Lavelle, E. (2018). Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2018.08.054](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.054)
- Morey, J., Ryan, J. y Van Dolah, F. (2006). Microarray validation: Factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8 (1), 175–193. DOI: <http://doi.org/10.1251/bpo126>
- Muanprasat, C., Wongkrasant, P., Satitsri, S., Moonwiryakit, A., Pongkorpsakol, P., Mattaveewong, T., Pichyangkura, R. y , V. (2015). Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. *Biochemical Pharmacology*, 96 (3), 225-236. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.016>
- Mushtaq, S., Manzoor, A., Shah, A., Ahmad, S., Hussain, A., Parvaiz, Q. y Niamat, M. (2018). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*, 114, 357-361. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.024>
- Muthumeenal, A., Sundar, S. y Nagendran, A. (2017). Biopolymer composites in fuel cells. *Biopolymer Composites in Electronics*, 185–217. DOI: [10.1016/b978-0-12-809261-3.00006-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809261-3.00006-1)
- Neumann, E., Riepl, B., Knedla, A., Lefèvre, S., Tarner, I., Grifka, J. y Müller, U. (2010). Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*, 12 (3), R83. DOI: [10.1186/ar3010](https://doi.org/10.1186/ar3010)
- Nilsen, J., Strand, S., Varum, K., Draget, K. y Nordgard, C. (2015). Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers*, 7 (3), 552-579. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym7030552>
- Ning, W., Zheng, W., Xing, X., Yan, H., Yang, G. y You-Le, Q. (2015). Immunostimulative activity of low molecular weight chitosans in RAW264.7 macrophages. *Journal Marine Drugs*, 13, 6211-6222. DOI: [10.3390/md13106210](https://doi.org/10.3390/md13106210)
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J., Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V. (2006). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54 (4), 399–409. DOI: [10.1016/j.jinf.2006.06.010](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010)
- Pereyra, E., Dallard, B. y Calvinho, L. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (4), 1-14. DOI: [10.1016/S0325-7541\(14\)70096-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70096-3)
- Pérez, M. y Sánchez, M. (2014). Fundamentos de la mecánica de los materiales compuestos. 1-32. DOI: [10.3926/oms.210](https://doi.org/10.3926/oms.210)
- Pietrocola, G., Nobile, G., Rindi, S. y Speziale, P. (2017). *Staphylococcus aureus* manipulates innate immunity through own and host-expressed proteases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7 (166), 1-15. DOI: [10.3389/fcimb.2017.00166](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00166)
- Rasmussen, S., Reinert, I. y Paludan, S. (2009). Innate recognition of intracellular pathogens: Detection and activation of the first line of defense. *Acta Pathologica et*

- Microbiologica Scandinavica*, 117 (5-6), 323–337. DOI: [10.1111/j.1600-0463.2009.02456.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02456.x)
- Rodríguez, J. (1996). Revisión: Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modelo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos Internacional*, 2 (2), 61-68. DOI: [10.1177/108201329600200202](https://doi.org/10.1177/108201329600200202)
- Ryan, C., Alcock, E., Buttimer, F., Schmidt, M., Clarke, D., Pemble, M. y Bardosova, M. (2017). Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 18 (1), 528–540. DOI: [10.1080/14686996.2017.1344929](https://doi.org/10.1080/14686996.2017.1344929)
- Sahariah, P. y Másson, M. (2017). Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: a review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules*, 18 (11), 3846–3868. DOI: [10.1021/acs.biomac.7b01058](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058)
- Saini, S., Dhiman, A. y Nanda, S. (2020). Immunomodulatory properties of chitosan: impact on wound healing and tissue repair. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20 (10). DOI: [10.2174/1871530320666200503054605](https://doi.org/10.2174/1871530320666200503054605)
- Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martínez, M., Sandoval-Flores, M. Alva-Murillo, P., Jiménez-Mejía, R. y Loeza-Lara, P. (2018). Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos y asociado a mastitis bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 19 (4), 794-806. DOI: <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4468>
- Sandoval, M., Jiménez, R., Santoyo, G., Alva, Patricia., López, J. y Loeza, P. (2018). Compósitos de quitosano-ácidos grasos reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha. *Nova Scientia*, 10 (21), 1-24. DOI: <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1599>
- Schlosser, A., Thomsen, T., Bonnet, J. y Nielsen, O. (2009). Characterization of FIBCD1 as an Acetyl Group-Binding Receptor That Binds Chitin. *The Journal of Immunology*, 183 (6), 3800-9. DOI: [10.4049/jimmunol.0901526](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901526)
- Seibert, A., Mex, P., Köhler, A., Kaufmann, S. y Mittrücker, H. (2010). TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Immunology Letters*, 127 (2), 126-34. DOI: [10.1016/j.imlet.2009.10.008](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.10.008)
- Sumayya, A. y Muraleedhara, G. (2021). *In vitro* anti-inflammatory potential of marine macromolecules cross-linked bio-composite scaffold on LPS stimulated RAW264.7 macrophage cells for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32 (8), 1040–1056. DOI: [10.1080/09205063.2021.1899590](https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1899590)
- Szymańska, E. y Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13 (4), 1819-46. DOI: [10.3390/md13041819](https://doi.org/10.3390/md13041819)
- Téllez-Pérez, A., Alva-Murillo, P., Ochoa-Zarzosa, A. y López-Meza, J. (2012). Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Veterinary Microbiology*, 160 (1-2), 91–98. DOI: [10.1016/j.vetmic.2012.05.007](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.007)

- Villanueva, T. y Morales, S. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínica en bovinos de crianza intensiva. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18 (12), 1-12.
- Xu, Y. y Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 250 (1), 215–226. DOI: [10.1016/s0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00548-3)
- Zeryehun, T. y Abera, G. (2017). Prevalence and bacterial isolates of mastitis in dairy farms in selected districts of eastern harrarghe zone, Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine*, 2 (17), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6498618>
- Zhou, Z., Zhang, Q. y Wang, Y. (2021). Preparation and characterization of antibacterial and anti-inflammatory hyaluronic acid-chitosan-dexamethasone hydrogels for peri-implantitis repair. *Journal of Biomaterials Applications*, 36 (7). DOI: <https://doi.org/10.1177/08853282211047939>
- Zohri, M., Alavidjeh, M., Haririan, I., Ardestani, M., Ebrahimi, S., Sani, H. y Sadjadi, S. (2010). A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2 (4), 258–266. DOI: [10.1007/s12602-010-9047-2](https://doi.org/10.1007/s12602-010-9047-2)

## XII. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

[https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound\\_report\\_card/CHEMBL526744/](https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL526744/)