



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO.**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR  $\alpha$  DEL 17- $\beta$  ESTRADIOL EN EPITELIO  
MAMARIO BOVINO INFECTADO CON *Staphylococcus aureus***

**TESIS DE GRADO**

Para la obtención del Título de:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Presentado por:

**LUCIO HERNÁNDEZ SOBERANIS**

Directora de tesis:

**Doctora en Ciencias  
ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA**

Co- Asesor:

**Doctor en Ciencias  
JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA**

Morelia, Michoacán, Julio del 2015

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto CONACyT-178238, "Regulación hormonal de la respuesta inmune innata del epitelio mamario bovino durante el proceso de internalización de *Staphylococcus aureus*: el papel de la prolactina y del 17- $\beta$  estradiol" con el número de becario 20124.

## Agradecimientos

**A mis padres** - Por darme la vida, por apoyarme en el estudio de mi carrera, por siempre darme todo lo que tuvieron y buscar la forma de darme lo que no tuvieron, por ceder en mi toma de decisiones y dejarme volar alto, a mis hermanas, que me solapan tanto y siempre están ahí para escucharme.

**Al Dr. Joel Edmundo López Meza** - Por ser uno de mis primeros docentes en abrir los panoramas de la ciencia, por permitirme en explorar su laboratorio y promoverme en el entrar a los veranos de la ciencia, por darme la pauta en querer volar alto y por ser un pilar crucial en mi inclinación al área de la investigación.

**A la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa** - La destacada científica, la mención honorífica en todos sus grados académicos, la más glamurosa de todo el centro de investigaciones y que ahora es directora, le agradezco por confiar en mí, por tenerme paciencia, por darme consejos y sugerencias, por regalarme su valioso tiempo y permitirme entrar en su línea de investigación que aunque no fue fácil y por la cual llegue a llorar, terminamos.

**A mis docentes favoritos.**- MC. Salvador Padilla y MC Beatriz Salas que me vieron crecer desde mi primer año y que aportaron tanto en mi formación académica y que agradezco que ahora pertenezcan a mi mesa sinodal.

**A mis compañeros de laboratorio** – Jaqueline, Nayeli, Ivan, Violeta, Marisol, por enseñarme las técnicas, consejos y manejos del laboratorio, porque cada uno de ellos me enseñó lo mejor para poder aplicarlo en mi tesis.

**A mis amigos los Médicos Veterinarios** – Yveet, Suset, Saul, Hazem, Claudia, Fausto Juan Carlos que nos vimos por cinco años y ya no los podré ver, los extrañaré mucho.

*"La medicina cura al hombre, la medicina veterinaria cura a la humanidad"*

Louis Pasteur, 1822-1895

---

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>TABLA DE ABREVIACIONES</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria bovina.....	22
<b>2. 2 La mastitis bovina.....</b>	<b>26</b>
2. 2. 1 Microorganismos patógenos asociados a la mastitis bovina.....	28
2. 2. 2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	29
2. 2. 3 Mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
<b>2. 3 Hormonas.....</b>	<b>31</b>
2. 3. 1 Endocrinología de la lactancia.....	32
2. 3. 2 Regulación de la producción de estradiol .....	33
<b>2. 3. 2. 1 Estrógenos.....</b>	<b>35</b>
2. 3. 2. 2 Síntesis de las hormonas esteroideas.....	36
2. 3. 2. 3 El 17-β Estradiol (E2) .....	37
2. 3. 2. 4 Receptores de E2.....	38
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>40</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
6.1 Objetivos específicos.....	43

<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
7.1 Estrategia experimental.....	44
7.2 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
7.3 Cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB).....	45
7.4 Inmunocitoquímica (ICQ) en cubre objetos .....	46
7.5 Citometría de flujo.....	47
7.6 Análisis de la expresión de gen del ER $\alpha$ .....	48
7.7 Análisis estadístico.....	49
<b>8. RESULTADOS</b> .....	49
8.1 Análisis de la expresión del gen del ER $\alpha$ en epitelio mamario bovino infectado con <i>S. aureus</i> .....	50
8.2 Análisis del ER $\alpha$ en epitelio mamario bovino infectado con <i>S. aureus</i> por inmunocitoquímica .....	51
8.3 Análisis del ER $\alpha$ por citometría de flujo.....	53
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	54
<b>10. CONCLUSIÓN</b> .....	58
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	59

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la anatomía de la glándula mamario..	23
<b>Figura 2.</b> Representación de los alveolos revestidos de epitelio mamario.....	23
<b>Figura 3.</b> Fotografía de ubre con mastitis clínica.....	26
<b>Figura 4.</b> Fotografía de ubre con mastitis subclínica.....	26
<b>Figura 5.</b> Interacciones hormonales en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	34
<b>Figura 6.</b> Ruta de la síntesis del estradiol.....	36
<b>Figura 7.</b> Estructura química del E2.....	37
<b>Figura 8.</b> Dominios de ER $\alpha$ y ER $\beta$ .....	39
<b>Figura 9.</b> Expresión del gen del ER $\alpha$ .....	50
<b>Figura 10.</b> Inmunocitoquímica del ER $\alpha$ en CEMB.....	51
<b>Figura 11.</b> Expresión del ER $\alpha$ evaluada por inmonocitoquímica.....	52
<b>Figura 12.</b> Histograma representativo de la expresión del ER $\alpha$ .....	53
<b>Figura 13.</b> Posible mecanismo de acción de acción de los receptores.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CEMB</b>	Células de Epitelio Mamario Bovino
<b>E2</b>	17- $\beta$ estradiol
<b>ER</b>	Receptor de estradiol
<b>MB</b>	Mastitis bovina
<b>GnRH</b>	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>FSH</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento

## RESUMEN

La mastitis bovina es una patología que es causada principalmente por bacterias, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente causal de la mastitis subclínica ya que este microorganismo puede estar presente de manera intracelular por largos periodos de tiempo en las células del epitelio mamario bovino (CEMB). Esta enfermedad se presenta generalmente durante el parto y el inicio de la lactancia, estadio caracterizado por cambios fluctuantes de hormonas lactogénicas y mamogénicas como el estradiol (E2). En investigaciones recientes se ha señalado la asociación del E2 con la actividad antimicrobiana en un modelo de epitelio uterino humano, donde se ha demostrado que induce un aumento de péptidos bactericidas así como la disminución de inductores de la inflamación. De la misma manera, antecedentes del grupo de trabajo reportan una disminución de la internalización y viabilidad de *S. aureus* en CEMBs tratadas con diferentes concentraciones de E2. Esta hormona lleva a cabo sus efectos mediante la unión a receptores intracelulares específicos, conocidos como ERs que actúan como factores de transcripción y estimulan varias vías de transducción de señales. En la glándula mamaria bovina lactante solo se ha reportado que se expresa la isoforma  $\alpha$ . Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado cómo la infección por *S. aureus* modifica los niveles de expresión de ERs en el epitelio mamario bovino, por ello el objetivo de este trabajo fue establecer los efectos que ejerce la infección por *S. aureus* en CEMB sobre la expresión del receptor del E2 $\alpha$ . Los resultados de la investigación demostraron que las CEMB aumentan la expresión del ARNm y la abundancia nuclear del ER $\alpha$  durante la infección por *S. aureus*, sugiriendo que el E2 pudiera llegar a modular la respuesta inmune innata de las CEMB inhibiendo la internalización de *S. aureus*.

**Palabras clave:** Mastitis, estradiol, inmunidad innata, *Staphylococcus aureus*, receptores de estrógenos.

## ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease mainly caused by bacteria. *Staphylococcus aureus* is the main causal agent of subclinical mastitis, due to its intracellular persistence for long periods of time into the bovine mammary epithelial cells (bMEC). This disease usually occurs during calving and early lactation, stages characterized by changes in the concentrations of mammogenic and lactogenic hormones such as estradiol (E2). Recent research indicates the relation of E2 with antimicrobial activity in a model of human uterine epithelium, where it increased the production of bactericidal peptides whereas decreased the inflammatory response. Similarly, our work group reported a decrease in the internalization and viability of *S. aureus* into bovine mammary epithelial cells treated with different concentrations of E2. Steroid hormones such as E2 exert their function through the binding to specific intracellular receptors (RE) that act as transcription factors and stimulate several signal transduction pathways. It has been reported that the lactating bovine mammary gland only expresses the isoform  $\alpha$ . However, it has not been reported if the infection by *S. aureus* or other bacteria could alter the expression levels of RE $\alpha$  in the bMEC, which was the objective of the present work. The data obtained showed that *S. aureus* increases the expression of the RNAm for RE $\alpha$  in bMEC, as well as its nuclear translocation, suggesting that E2 could modulate the innate immune response of bMEC resulting in the inhibition of *S. aureus* internalization.

**Keywords:** Mastitis, estradiol, innate immunity, *Staphylococcus aureus*, estrogen receptors.

## 1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina (MB) es una de las enfermedades infecciosas más importantes en el ganado lechero a nivel mundial ya que provoca una disminución tanto en la calidad, como en cantidad de la leche producida, lo que genera pérdidas económicas considerables (Brouillette et al., 2003)

Esta enfermedad presenta daños patológicos localizados o generalizados, y dependiendo de la magnitud de los mismos, puede tener manifestaciones clínicas o subclínicas (Kerro-Dego et al., 2002). La enfermedad está relacionada con factores genéticos, nutricionales, ambientales y el manejo durante el ordeño, los cuales predisponen al animal a la enfermedad (Schrick et al., 2001).

La MB es causada principalmente por bacterias, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente causal de la mastitis subclínica ya que este microorganismo puede estar presente por largos periodos de tiempo (Sharif et al., 2009). Parte del éxito de *S. aureus* como patógeno se debe a que ha desarrollado diversas estrategias para adherirse e invadir las células de su hospedero (Wall et al., 2005; Kerro-Dego et al., 2002). Dentro de estas destacan las proteínas de unión a fibronectina, las cuales son adhesinas unidas a la pared celular que reconocen a la fibronectina y ésta a su vez se une principalmente a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , receptor de adhesión localizado en la membrana de las células del hospedero (Yamada et al., 2003). Se ha descrito que *S. aureus* se puede internalizar en diversas células hospedereas, lo que le permite evadir las barreras del sistema inmunológico (Garzoni et al., 2009).

La dificultad para tratar las infecciones relacionadas con *S. aureus* se debe en parte a la resistencia antimicrobiana que esta bacteria presenta, y a que puede permanecer durante largos periodos de tiempo de manera intracelular en las células del epitelio mamario bovino (Gruet et al., 2001; Kerro-Dego et al., 2002).

La MB se presenta con mayor frecuencia durante el parto y el inicio de la lactación, estadios caracterizados por cambios importantes en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales, durante este periodo, los niveles plasmáticos del estradiol (E2) se incrementan en la última semana de la gestación, alcanzando su concentración más alta tres días antes del parto, después del cual, la concentración disminuye rápidamente, hasta llegar a niveles basales (Lamote et al., 2006). Todos estos cambios hormonales pueden estar relacionados con la disminución de la respuesta inmune de la vaca, favoreciendo el desarrollo de infecciones intramamarias, siendo el canal del pezón la vía principal de entrada de las bacterias ya que se encuentra abierto al momento del ordeño y expuesto a una gran cantidad de agentes infecciosos. Al producirse una infección en la glándula mamaria el tejido glandular es el principal blanco de infección, en particular las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) (Miller et al., 2007).

La participación de distintas hormonas en el establecimiento de la MB se ha demostrado previamente. Al respecto, en el grupo de trabajo se ha reportado que la hormona prolactina (5 ng/ml) estimula la internalización de *S. aureus* en las CEMB, y en conjunto con la bacteria, regulan elementos de la respuesta inmune innata en estas células (Gutiérrez-Barroso, 2008).

El 17- $\beta$ estradiol (E2), al igual que la prolactina tiene una fuerte participación durante el parto y el inicio de la lactancia, esencialmente para regular la mamogénesis, lactogénesis y galactopoyesis de la glándula mamaria. Se ha demostrado que durante estos estadios el ganado bovino es más susceptible de presentar MB, por lo cual se asocia la presentación de la enfermedad con los cambios en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales (Gutiérrez-Barroso, 2007; Mustafa, 2011).

Los epitelios pertenecen a una de las primeras barreras físicas de la inmunidad innata ante infecciones ya que tienen la capacidad de secretar péptidos antimicrobianos así como citocinas proinflamatorias como coadyuvantes de defensa (Radtke, 2006), recientes investigaciones demostraron la producción de estos en epitelio uterino humano con tratamientos de E2 demostrando un aumento significativo de péptidos así como disminución de inductores de inflamación (Fahey et al., 2008). De la misma manera, antecedentes del grupo de trabajo reportan una disminución de la internalización y viabilidad bacteriana con diferentes tratamientos con E2 (Guijosa-García, 2014).

En este sentido, se ha sugerido que el E2 inhibe la propagación bacteriana a través del aumento de los mecanismos de la respuesta inmune innata del bovino (Lamote et al., 2005), y de hecho se ha asociado a esta hormona con la regulación de la respuesta inmune de la glándula mamaria (Connor et al., 2007). Esto debido a que existen receptores para el E2 (ER), los cuales se localizan en el citoplasma, en el núcleo, o en la membrana plasmática y cuya expresión varía dependiendo del estadio reproductivo del animal.

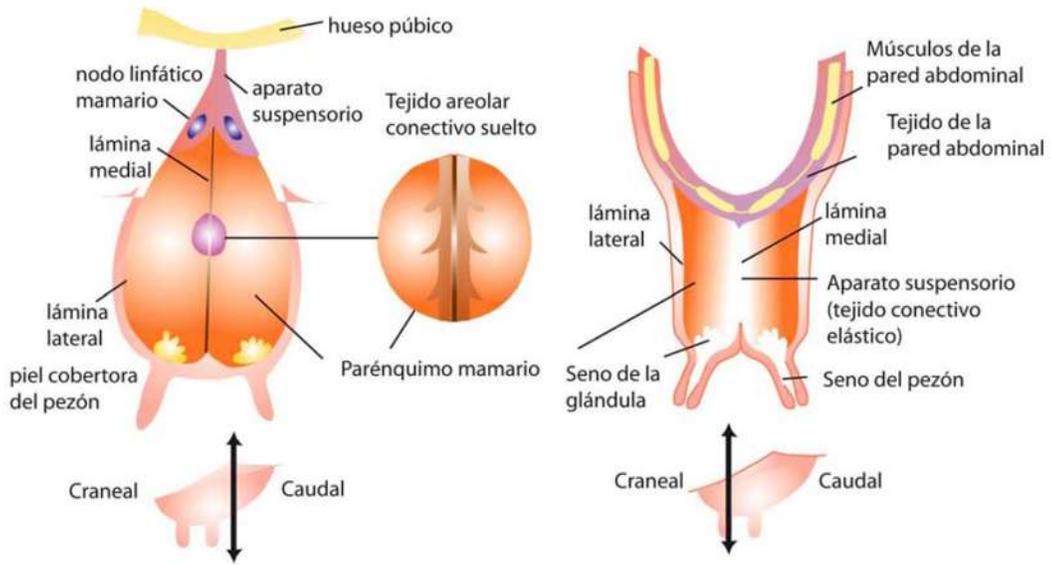
Estos receptores son esenciales para que el E2 pueda llevar a cabo diversos efectos en la glándula mamaria. Las células epiteliales de la glándula mamaria bovina lactante expresan únicamente la isoforma  $\alpha$  del receptor para estrógenos (no se ha encontrado la expresión de la isoforma  $\beta$ ) (Connor et al., 2007). Sin embargo, aún no se ha elucidado la participación del receptor  $\alpha$  del E2 en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria durante el proceso de infección por *S. aureus*. Estos efectos se pretenden estudiar en la presente propuesta.

## 2. MARCO TEÓRICO

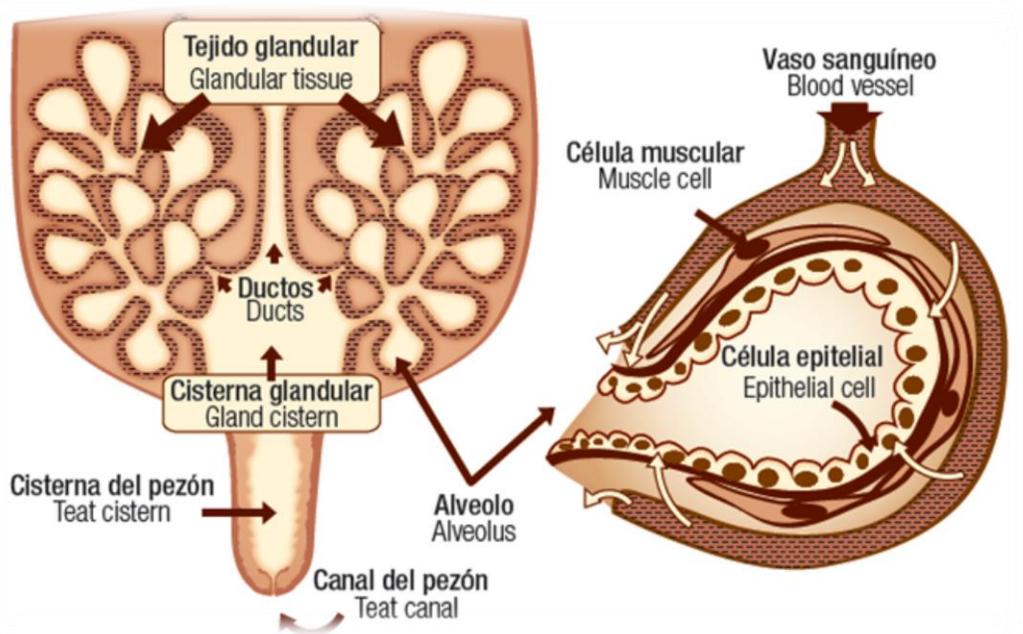
### 2.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria bovina

El desarrollo mamario en los bovinos inicia durante la vida fetal en el ectodermo embrionario formando el tejido glandular (parénquima), después del nacimiento los conductos primarios se ramifican y proliferan a racimos de células alveolares epiteliales organizadas en estructuras esféricas vacías llamadas alvéolos, que son las unidades fundamentales secretoras de la leche (Fig.1). Alrededor del tercer mes se forman los canales mamaros, luego los conductos excretorios y después se forman los alvéolos. El sistema excretorio es completado al final del segundo trimestre de la vida fetal. Durante el primer estadio post-natal, el proceso de crecimiento se presenta a una tasa igual que el resto del cuerpo (crecimiento isométrico). Al comienzo del tercer mes la glándula mamaria comienza a crecer 2-4 veces más rápido que el resto del cuerpo hasta la pubertad (crecimiento alométrico). Previo a la pubertad, el tejido mamario está influenciado por factores de crecimiento y hormonas que regulan su crecimiento, diferenciación y proliferación (Glauber et al., 2007).

La ubre de la vaca se localiza en la región inguinal y consta de cuatro glándulas, cada uno de estos complejos glandulares es completamente independiente con su propia estructura secretora la cual se comunica con el exterior a través de su pezón. El tejido glandular se encuentra dispuesto en lobulillos, cada uno consiste de unos 200 alvéolos, los cuales a su vez se reagrupan en lóbulos (Ruckebusch et al., 2000)



**Figura 1.** Representación esquemática de la anatomía de la glándula mamaria (Ruckebusch et al., 2000)



**Figura 2.** Representación de los alveolos revestidos de epitelio mamario. (Fuente: [www.nmcomLine.org](http://www.nmcomLine.org))

Un grupo de ligamentos y tejido conectivo mantienen a la ubre prácticamente adosada a la pared abdominal. La fortaleza de los ligamentos es deseable debido a que ayudan a prevenir la formación de una ubre colgante; minimiza el riesgo de lesiones; y evitan dificultades cuando se utiliza el equipo de ordeño. La mitades derecha e izquierda de la ubre están separadas claramente, mientras que el cuarto frontal y el trasero rara vez muestran alguna clara división externa (Glauber et al., 2007).

Los alvéolos se encuentran formados por células glandulares con secreción apócrina, rodeados por los conductos de células mioepiteliales contráctiles, células epiteliales alveolares y por los vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos que se ramifican a lo largo del estroma con relación al epitelio (Ruckebusch et al., 2000). La actividad de la célula secretora durante la lactancia incluye tres fases: secreción, excreción y reposo. En la primera de ellas se sintetizan los componentes de la leche que se acumulan en el polo apical de la célula (el más próximo al lumen o luz del alvéolo) (Fig. 2). Durante la fase excretora, los componentes de la leche son vertidos hacia la luz del alvéolo pasando a un sistema de conductos lactíferos, luego se almacenan en la cisterna de la glándula mamaria y por último en la cisterna del pezón hasta que se produce el amamantamiento o el ordeño. El vaciado de la ubre libera a la glándula de la presión intra-alveolar, permitiendo otra vez la síntesis de leche. Además, el vaciado de la ubre estimula la producción de la hormona prolactina (PRL), la cual contribuye al mantenimiento de la lactancia, de modo que mientras que se produzca regularmente el vaciado seguirá habiendo producción de leche (Roginski et al., 2003)

En la edad adulta el ciclo de la lactación puede dividirse en periodos consecutivos: mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis e involución. Cada fase es caracterizada por un estricto control hormonal (Glauber, 2007).

A través de la gestación, la proliferación del epitelio mamario es dependiente de estrógenos y progesterona. Los receptores específicos para esas hormonas se expresan en niveles muy bajos durante la mamogénesis o lactogénesis. Las dos hormonas interactúan y se refuerzan sinérgicamente. Asimismo, los estrógenos también estimulan la secreción de IGF-I (factor de crecimiento tipo insulina I) a partir de las células del estroma de la glándula mamaria y causa el crecimiento de las células epiteliales (Glauber, 2007).

La producción de leche es controlada por las hormonas lactogénicas PRL y la hormona de crecimiento (GH) durante la lactogénesis y lactopoyesis. Estas hormonas son esenciales para la transición de un estado proliferativo a una estado lactante a través del dominio de la GH sobre la PRL durante la galactopoyesis en rumiantes, a diferencia de humanos y cobayos. En el mantenimiento de la producción láctea o galactopoyesis la PRL en la vaca lechera reviste importancia. La acción de la PRL sobre el epitelio mamario se presenta en forma directa o indirecta a través de la activación de factores de transcripción, semejante a la GH que actúa en forma directa en la glándula o indirectamente a través de la producción de IGF-I local o producida en el hígado. Las célula mamarias bovinas presentan receptores para IGF-I y II, receptores de insulina y proteínas de unión IGF (Glauber, 2007).

La ganadería de la producción láctea se ha visto afectada por distintos tipos de enfermedades entre las que destacan las nutricionales, virales y bacterianas, siendo una de las más importantes la mastitis.

## 2. 2 La mastitis bovina

La mastitis bovina (MB) es una patología de etiología compleja, que se puede manifestar de manera subclínica y clínica, generando pérdidas económicas considerables en la ganadería lechera en todo el mundo. Esta patología se caracteriza por la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria ante infecciones por microorganismos, principalmente de origen bacteriano que con frecuencia invaden y destruyen el tejido epitelial de la glándula mamaria (Wanasinghe, 1981). La constitución anatómica de la ubre la expone constantemente a lesiones y a los agentes infecciosos.



Fig. 3. Fotografía de ubre con mastitis clínica  
(Fuente: [www.argentinainvestiga.edu.ar](http://www.argentinainvestiga.edu.ar))



Fig. 4. Fotografía de ubre con mastitis subclínica  
(Fuente: [www.argentinainvestiga.edu.ar](http://www.argentinainvestiga.edu.ar))

La mastitis clínica puede presentarse en forma aguda o crónica. En esta patología la leche tiene apariencia anormal, con presencia de grumos e incluso hasta sangre y secreciones serosas, hay enrojecimiento, tumefacción y dolor en la ubre, con o sin signos sistémicos (Fig.3). La forma subclínica de esta enfermedad no presenta signología (Fig. 4) (Schrick et al., 2001).

Esta enfermedad tiene alta prevalencia en el ganado lechero bovino y es la más importante a nivel mundial, debido al impacto que genera en la ganadería lechera, puesto que disminuye la producción de leche (de un 4% hasta un 30%), altera su valor nutricional y sanitario, influyendo también en la calidad de los derivados lácteos, además de que aumenta el número de tratamientos clínicos, afecta el bienestar animal y genera un desecho temprano de las vacas (Armenteros et al., 2002). En México, la MB genera pérdidas aproximadas de 2.5 millones de pesos anuales, mientras que en los Estados Unidos, se estima un gasto anual de 2 billones de dólares derivados de esta enfermedad (Bedolla, 2008).

Los microorganismos contaminantes en la leche cruda se originan principalmente de: 1) infecciones de la ubre o conducto del pezón; 2) el exterior de la ubre y ambiente; 3) el manejo de la leche y equipo de almacenamiento (Romero, 2004). El grupo de bacterias responsables de la mastitis bovina es diverso. Clásicamente se dividen en patógenos contagiosos y ambientales (Kerro-Dego et al., 2002), y estos se describen a continuación.

### 2. 2. 1 Microorganismos patógenos asociados a la mastitis bovina

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp* y *Mycoplasma spp* (Riffon et al., 2001; Kerro-Dego et al., 2002; Rossitto et al., 2002), mientras que los patógenos ambientales principales son los bacilos entéricos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp.*, que son transmitidos a través de las ordeñas por el ambiente que sirve como su reservorio (Rossitto et al., 2002).

La mastitis por *Streptococcus (agalactiae y dysgalactiae)* presenta formas clínicas y subclínicas. En el caso del *S. agalactiae*, la bacteria vive en los sueros de leche y la ubre; y la formación de coágulos de fibrina en cuartos afectados pueden impedir el drenaje de la misma. El tejido secretor se atrofia rápidamente o se hace fibroso e improductivo en forma permanente. La infección por *S. agalactiae* puede diseminarse rápidamente en hatos libres, aun tras breve exposición, siendo el único reservorio conocido las ubres infectadas o las lesiones del pezón. La mastitis por *S. dysgalactiae* generalmente es subclínica, estas infecciones son transitorias y no causan daños serios. Otros estreptococos, como *S. uberis*, se localizan en piel y superficie de la ubre así como en vejiga y vagina. Generalmente esta bacteria no se transmite de vaca a vaca durante el ordeño (Rossitto et al., 2002).

### 2. 2. 2 *Staphylococcus aureus*

La MB es causada principalmente por bacterias, siendo *S. aureus* el principal agente causal de mastitis subclínica aislado de la ubre, microorganismo que puede estar presente por largos periodos de tiempo (Sharif et al., 2009). Parte del éxito de *S. aureus* como patógeno se debe a que ha desarrollado diversas estrategias para adherirse e invadir las células de su hospedero (Wall et al, 2005; Kerro-Dego et al., 2002). Dentro de estas destacan las proteínas de unión a fibronectina, las cuales son adhesinas unidas en la pared celular que reconocen a la fibronectina, estas a su vez se unen principalmente a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , receptor de adhesión localizado en la membrana de las células del hospedero (Yamada et al, 2003) que le permiten evadir las barreras del sistema inmunológico e invadir a la célula hospedera (Garzoni et al., 2009).

*S. aureus* es el patógeno que con mayor frecuencia se aísla de casos de mastitis bovina (>70%) y su capacidad de infectar el epitelio mamario se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células de epitelio mamario bovino (CEMB) (Kerro-Dego et al., 2002). Se ha descrito que *S. aureus* emplea una diversidad de estrategias para adherirse y/o internalizarse en células hospederas, como las CEMB. Las cepas de *S. aureus* que tienen la capacidad de internalizarse en diversos tipos celulares presentan aún más ventajas para sobrevivir, y en ocasiones multiplicarse en el interior de células fagocíticas no profesionales y profesionales.

En las CEMB se ha descrito un mecanismo de internalización tipo “zipper”, en el cual participan diversos factores expresados en la superficie bacteriana y que, con ayuda de receptores membranales, la bacteria llega a internalizarse con éxito (Qazi et al, 2004).

La internalización de la bacteria le permite persistir intracelularmente, evadir al sistema inmune de manera más eficiente, y a su vez vuelve más compleja la terapia antimicrobiana, generando así infecciones crónicas (Sinha y Hermann, 2002)

### 2. 2. 3 Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*

La mastitis causada por esta bacteria es difícil de controlar con el tratamiento convencional; y por lo tanto el control exitoso se logra mediante medidas preventivas. *S. aureus* genera principalmente mastitis crónica que generalmente es subclínica, y las vacas pueden tener infecciones, especialmente en la etapa del postparto. La bacteria persiste en las glándulas afectadas y es contagiosa, principalmente durante el proceso de ordeño. Una vez establecida, es de difícil tratamiento con antibióticos, por lo que el sacrificio puede ser la única opción para animales con afección crónica. La eficacia del tratamiento es decreciente en medida que las vacas son más viejas. Los niveles de curación para vacas en primera lactación se reportan en el 77-91% de los casos, mientras que, para la 2da y 3ra lactación es del 64 al 74%, en tanto que, para la 4ta lactación sólo del 47 al 50%.

*S. aureus* es considerado el principal agente etiológico de la mastitis bovina subclínica, y la presencia de esta bacteria en la leche representa un riesgo para la salud pública (De Oliviera et al., 2000). El reservorio principal de *S. aureus* está localizado en los cuartos de la glándula mamaria de la vaca y con frecuencia ocurre una propagación de la bacteria entre el ganado durante la ordeña (Sears y McCarthy, 2003)

## 2. 3 Hormonas

Las hormonas son sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endócrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es el de influir en la función de otras células (Pei Show, 2002). Las hormonas inhiben, estimulan o regulan la actividad funcional de un órgano o tejido. Sin embargo, órganos como el útero y el hipotálamo producen hormonas que no satisfacen la definición clásica de estas sustancias. Las hormonas pueden clasificarse según su estructura bioquímica o su forma de acción (Noriga et al., 2008).

Según su naturaleza química, se reconocen tres clases de hormonas:

- ✓ **Derivadas de aminoácidos:** se derivan de los aminoácidos tirosina y triptófano., como ejemplo están las catecolaminas y la tiroxina.
- ✓ **Hormonas peptídicas:** están constituidas por cadenas de aminoácidos, bien oligopéptidos (como la vasopresina) o polipéptidos (como la hormona del crecimiento). En general, este tipo de hormonas no pueden atravesar la membrana plasmática de la célula diana, por lo cual los receptores para estas hormonas se hallan en la superficie celular.
- ✓ **Hormonas lipídicas:** son esteroides (como el estradiol) o eicosanoides (como las prostaglandinas). Dado su carácter lipófilo, atraviesan sin problemas la bicapa lipídica de las membranas celulares y sus receptores específicos se hallan en el interior de la célula diana.

### 2. 3. 1 Endocrinología de la lactancia

El 17- $\beta$  estradiol, al igual que la prolactina, tiene una fuerte participación durante el parto y el inicio de la lactancia, esencialmente para regular la mamogénesis, lactogénesis y galactopoyesis de la glándula mamaria. Se ha demostrado que durante estos estadios el ganado bovino es más susceptible de presentar MB, por lo cual se asocia la presentación de la enfermedad con los cambios en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales (Gutiérrez-Barroso, 2007; Mustafa, 2011).

Se ha propuesto que los cambios en las concentraciones de las hormonas sexuales que participan en los estadios ya mencionados, disminuyen la respuesta inmune del organismo, favoreciendo así la presentación de la MB. El E2 por ejemplo, durante la gestación bovina presenta un pico elevado en la última semana antes del parto y disminuye abruptamente después de este, para posteriormente regresar a un estado basal, sugiriendo que los cambios en las concentraciones de esta hormona sexual pueden comprometer la respuesta inmune innata durante este periodo, favoreciendo así la presentación de infecciones (Lamote et al., 2005).

### 2. 3. 2 Regulación de la producción de estradiol

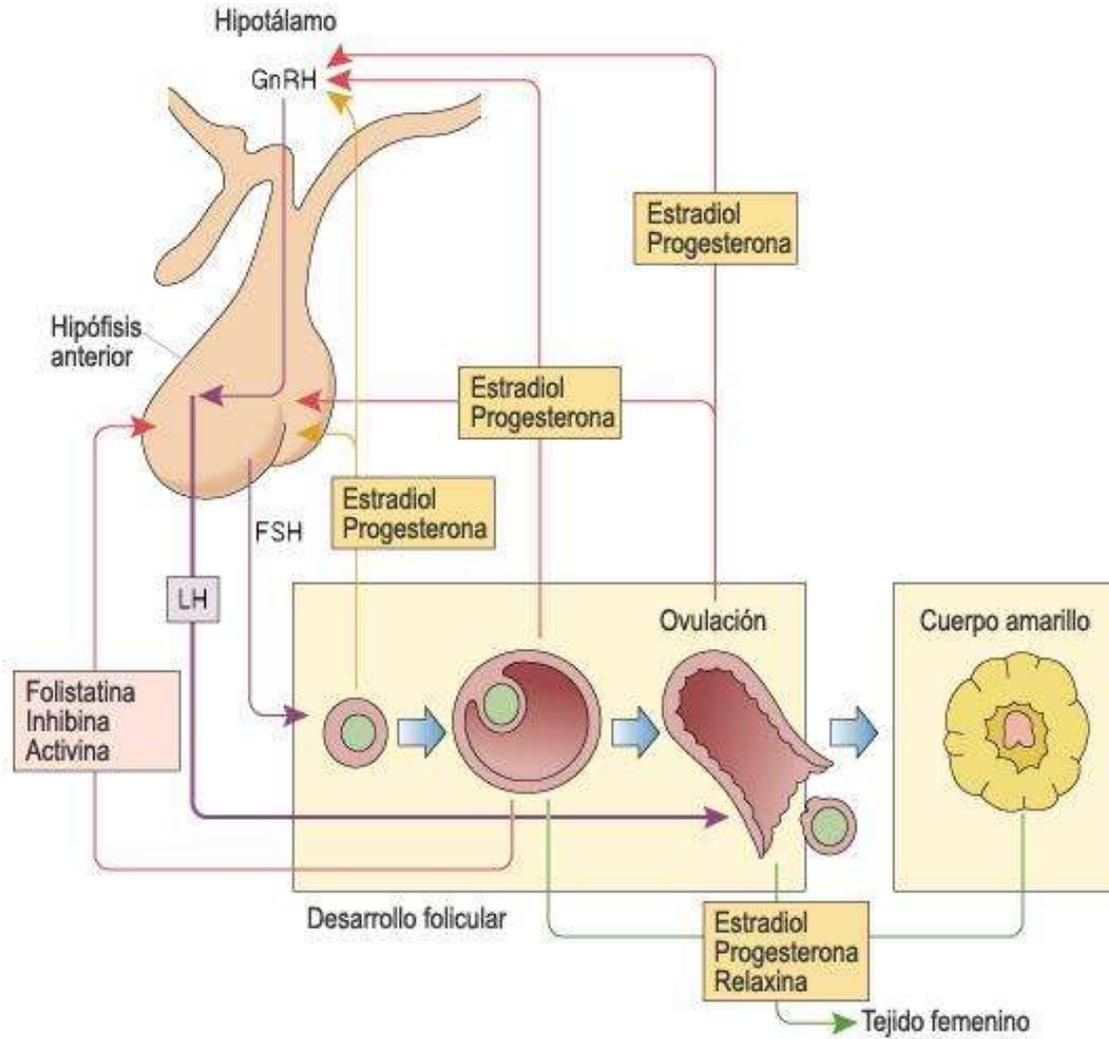
El control de la función reproductora requiere una regulación precisa, cuantitativa y temporal, del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Dentro del hipotálamo, ciertos núcleos liberan hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) con un patrón pulsátil. Se trata de un decapeptido sintetizado por las células peptidérgicas hipotalámicas de la eminencia media, cuya secreción se halla bajo un fuerte control. La secreción de GnRH es pulsátil, siendo dichos pulsos infrecuentes e irregulares, altamente controlados por la retroalimentación de las gonadotropinas. La GnRH actúa sobre una población de células gonadotropas de la adenohipófisis, las cuales liberan gonadotropinas (hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante (FSH)). La liberación pulsátil rápida de esta hormona estimula a la LH, mientras que la lenta favorece la secreción de la FSH.

Se necesita la secreción pulsátil de GnRH para lograr una secreción sostenida de gonadotropinas. Una secreción continua de GnRH reduce rápidamente la secreción de LH y FSH. En el ovario, la FSH y la LH se unen a las células de la granulosa y la teca para estimular la foliculogénesis y la producción ovárica de diversos esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos), péptidos gonadales (activina, inhibina y folistatina) y factores del crecimiento (Fig. 5). Entre otras funciones, estos factores derivados del ovario retroalimentan al hipotálamo e hipófisis para inhibir o aumentar la secreción de GnRH y gonadotropinas.

El ovario tiene tres zonas con capacidad de producción hormonal, secretando:

- ✓ Folículo: estradiol (en mayor cantidad), progesterona y andrógenos.
- ✓ Cuerpo lúteo: progesterona (en mayor cantidad) y estrógenos.
- ✓ Estroma: andrógenos (en mayor cantidad), estrógenos y progesterona.

Asimismo, segrega activina e inhibina, que actúan sobre la hipófisis activando o inhibiendo respectivamente la producción de FSH (Sintex, 2005).



**Fig 5** . Esquema que ilustra las interacciones hormonales entre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Levin, 2005)

### 2. 3. 2. 1 Estrógenos

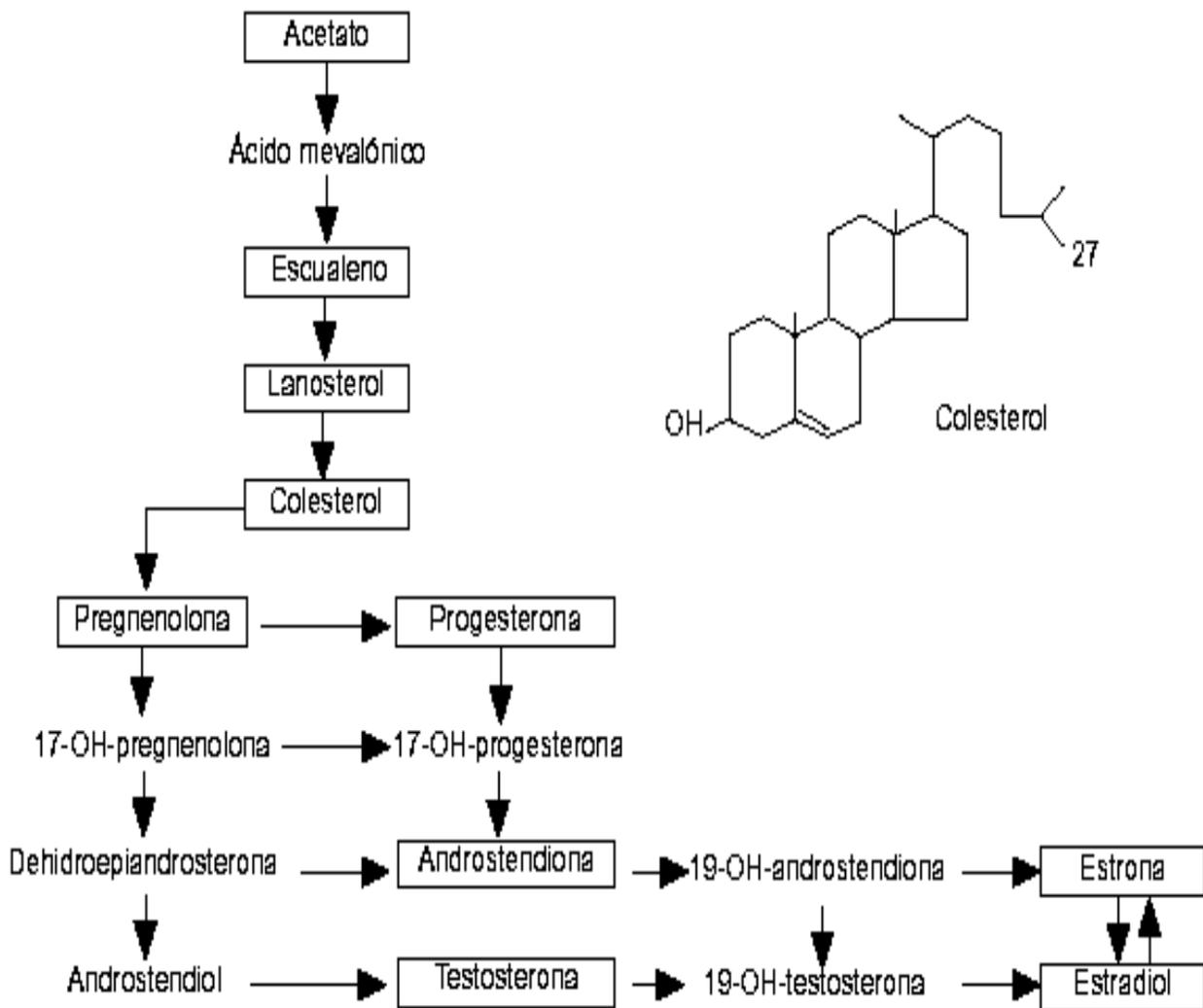
Alcanzan su mayor nivel en el estrógeno. Los estrógenos son hormonas esteroideas, producidos por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos en los que intervienen como son las trompas, el útero, la vagina, la vulva, o el sistema nervioso central en el cual estimulan la conducta de celo (Sintex, 2005).

Los estrógenos actúan sobre el crecimiento y diferenciación celular, desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores, los ciclos de actividad sexual, tienen efectos metabólicos generales en todo el cuerpo tales como el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo que podría ser un marcador de diferencia en la forma corporal y distribución de grasas (Connor et al., 2007).

El estrógeno de primera importancia en la hembra es el E2, aunque pequeñas cantidades de estrona y estriol son también secretados por diferentes partes del ovario (Echeverrías, 2006).

**2. 3. 2. 2 Síntesis de las hormonas esteroideas**

El E2, como otros esteroides, es derivado del colesterol. Después de la división de la cadena lateral y usando la vía delta-5 o delta-4, la androstenediona es el intermediario clave. Una fracción de la androstenediona es convertida a testosterona, que a su vez se somete a la conversión a E2 por una enzima llamada aromatasa. En una vía alternativa, la androstenediona es aromatizada a estrona, que posteriormente es convertida a estradiol (Fig. 6).

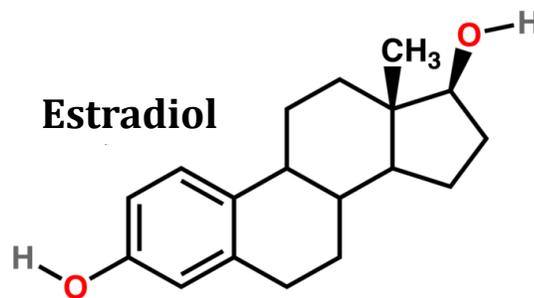


**Fig 6.** Ruta de la síntesis del estradiol (Levin, 2005)

### 2. 3. 2. 3 El 17 $\beta$ -Estradiol (E2)

El estradiol es por definición una hormona esteroide sexual y es el estrógeno predominante durante la vida reproductiva de los mamíferos. Además de sus múltiples funciones sexuales y reproductivas, se le ha asociado con la regulación de la respuesta inmune (Connor et al., 2007). Tiene como función el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular así como con el funcionamiento de tejidos blanco incluyendo el sistema reproductivo con las glándulas mamarias (Kowalski, 2001)

El E2 tiene 18 átomos de C, cuenta con 3 dobles ligaduras en el anillo A, un OH en C3, y otro OH en C17, en posición beta. El estradiol es abreviado E2 ya que tiene dos grupos hidroxilos en su estructura molecular (Fig. 7).



**Fig 7.** Estructura química del 17 $\beta$ -Estradiol  
*Fuente:lookfordiagnosis.com*

Las hormonas esteroideas ejercen su función mediante la unión a receptores intracelulares específicos, conocidos como ERs que actúan como factores de transcripción y estimulan varias vías de transducción de señales.

#### 2. 3. 2. 4 Receptores de E2

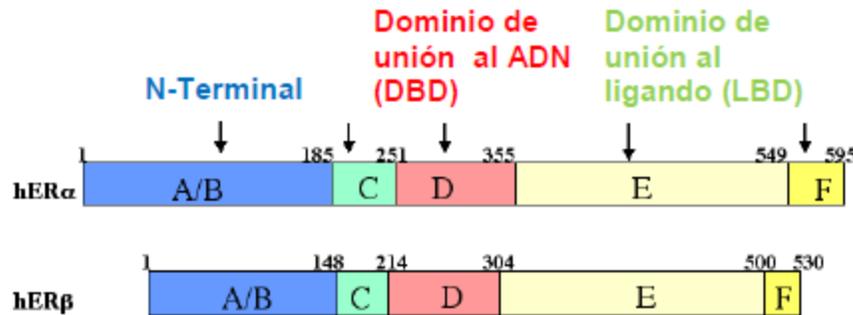
El mecanismo por el cual el E2 ejerce sus efectos es a través de la activación de sus receptores específicos, su activación no requiere necesariamente a su ligando natural (Heldrin et al., 2007). Existen 3 receptores para el E2, el receptor de estradiol alfa ( $ER\alpha$ ), receptor de estradiol beta ( $ER\beta$ ) y el receptor GPR30, sin embargo este último sólo se ha encontrado en cáncer de mama humano. Los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  tienen un papel importante en la señalización para activar genes participantes en la proliferación celular del sistema nervioso, pulmón, próstata, útero, ovario y glándula mamaria (Heldrin et al., 2007). Estos receptores de estrógenos se localizan en la parte citoplásmica y nuclear de sus células blanco (epitelio mamario, por ejemplo. En los bovinos la expresión de los ER varía de acuerdo al estadio reproductivo (Schams et al., 2003).

En ausencia de hormona, los receptores de estrógeno se encuentran localizados principalmente en el citoplasma. El estrógeno, al ser una hormona esteroidea, puede atravesar la membrana plasmática de la célula, con lo que los receptores no necesitan estar anclados a membrana para unir el estrógeno, existen dos tipos de activaciones la genómica y no genómica (Levin, 2005).

**Genómica:** La unión de la hormona al receptor pone en funcionamiento un cierto número de eventos que comienzan con la migración del receptor desde el citoplasma al núcleo celular, la dimerización del receptor y la unión de este dímero a unas secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a hormonas. El complejo receptor/ADN recluta entonces otras proteínas implicadas en la transcripción de los genes diana y así expresar determinadas proteínas que darán lugar a variaciones en la función celular. Los receptores de estrógeno también tienen un dominio de unión a ADN y pueden actuar como factores de transcripción para regular la producción de proteínas.

**No genómica:** Algunos receptores de estrógeno se asocian con la superficie de la membrana celular y pueden ser rápidamente activados por exposición de las células al estrógeno.

La conformación activada del receptor de estrógeno forma un dímero y, puesto que ambas variantes son coexpresadas en diversos tipos de células, los receptores pueden formar homodímeros del tipo ER $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) o ER $\beta$  ( $\beta\beta$ ), o heterodímeros del tipo ER $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ ). Los receptores de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$  muestran una significativa similitud de secuencia, y ambos se componen de siete dominios (Heldrin et al., 2007) (Fig. 8).



**Fig 8.** Dominios de ER $\alpha$  y ER $\beta$ , incluyendo algunos de los sitios de fosforilación conocidos implicados en la regulación independiente de ligando (Ribeiro et al, 1995).

Los ER, una vez activados, pueden unirse directamente a regiones del ADN de respuesta a estrógenos y regular la expresión de los diferentes genes diana, actuando como factores transcripcionales. La expresión y actividad de los ER se ve regulada durante los distintos estadios del desarrollo de la glándula mamaria bovina, con la finalidad de modular la mamogénesis, lactogénesis y galactopoyesis. En la glándula mamaria bovina, es predominante la expresión del ER $\alpha$  (Connor et al., 2007)

### 3. ANTECEDENTES

A través del tiempo se ha podido comprobar que los esteroides gonadales regulan la respuesta inmune de tipo humoral y celular, ello con base a que los órganos responsables de la respuesta inmune poseen receptores específicos para los esteroides gonadales; y la respuesta inmune se modifica durante el periodo de gestación, cuando la concentración de hormonas esteroides sexuales se incrementa. Sin embargo, además de que el sistema inmune es regulado en gran medida por los esteroides gonadales, los niveles circulantes de éstos también pueden ser afectados por la función del sistema inmune (Kerro-Dego et al., 2002).

El E2 tiene una relevante función sobre la proliferación y diferenciación del epitelio mamario bovino, en el que ejerce acciones directas a través de receptores específicos. Las células epiteliales de la glándula mamaria bovina lactante expresan únicamente la isoforma  $\alpha$  del receptor para estrógenos (no se ha encontrado la expresión de la isoforma  $\beta$ ) (Connor et al., 2007). Por otra parte, con base en los datos que demuestran una mayor incidencia de infecciones intramamarias bovinas durante el parto y el establecimiento de la lactancia, se han analizado las concentraciones de diversas hormonas, tratando de correlacionar las mismas con el desarrollo y persistencia de la mastitis. La participación de distintas hormonas en el establecimiento de la MB se ha demostrado previamente. Al respecto, en el grupo de trabajo se ha reportado que la hormona prolactina (5 ng/ml) estimula la internalización de *S. aureus* en las CEMB, y en conjunto con la bacteria, regulan elementos de la respuesta inmune innata en estas células (Gutiérrez-Barroso, 2008).

El E2, al igual que la prolactina tiene una fuerte participación durante el parto y el inicio de la lactancia, esencialmente para regular la mamogénesis, lactogénesis y galactopoyesis de la glándula mamaria. Se ha demostrado que durante estos estadios el ganado bovino es más susceptible de presentar MB, por lo cual se asocia la presentación de la enfermedad con los cambios en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales (Gutiérrez-Barroso, 2007; Mustafa, 2011).

Los epitelios pertenecen a una de las primeras barreras físicas de la inmunidad innata ante infecciones ya que tienen la capacidad de secretar péptidos antimicrobianos así como citocinas proinflamatorias como coadyuvantes de defensa (Radtke, 2006). Recientes investigaciones demostraron la producción de estas moléculas en epitelio uterino humano tratado con E2, demostrándose un aumento significativo de la producción de péptidos antimicrobianos así como la disminución de inductores de la inflamación (Fahey et al., 2008). De la misma manera, antecedentes del grupo de trabajo reportan una disminución de la internalización bacteriana en diferentes tratamientos con E2 en epitelio mamario bovino (Guijosa-García, 2014). A pesar de las evidencias anteriores, hasta el momento no se ha reportado cómo la infección por *S. aureus* u otras bacterias modifican los niveles de expresión de los ER en el epitelio mamario bovino.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una patología que se presenta generalmente durante el parto y el inicio de la lactancia, estadio caracterizado por cambios fluctuantes de hormonas lactogénicas y mamogénicas como el E2. En recientes investigaciones se ha señalado la asociación de esta hormona con la actividad antimicrobiana en epitelio uterino humano demostrando un aumento significativo de péptidos bactericidas así como disminución de inductores de inflamación (Fahey et al., 2008). De la misma manera, antecedentes del grupo de trabajo reportan una disminución de la internalización y viabilidad de *S. aureus* en epitelio mamario bovino con diferentes tratamientos con E2 (Guijosa-García, 2014). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado cómo la infección por *S. aureus* u otras bacterias modifican los niveles de expresión de los receptores ER en el epitelio mamario bovino.

## 5. HIPÓTESIS

La infección por *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas promueven la expresión del receptor de estrógenos alfa.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Establecer los efectos de la infección por *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas sobre la expresión del receptor alfa del 17 $\beta$ -estradiol.

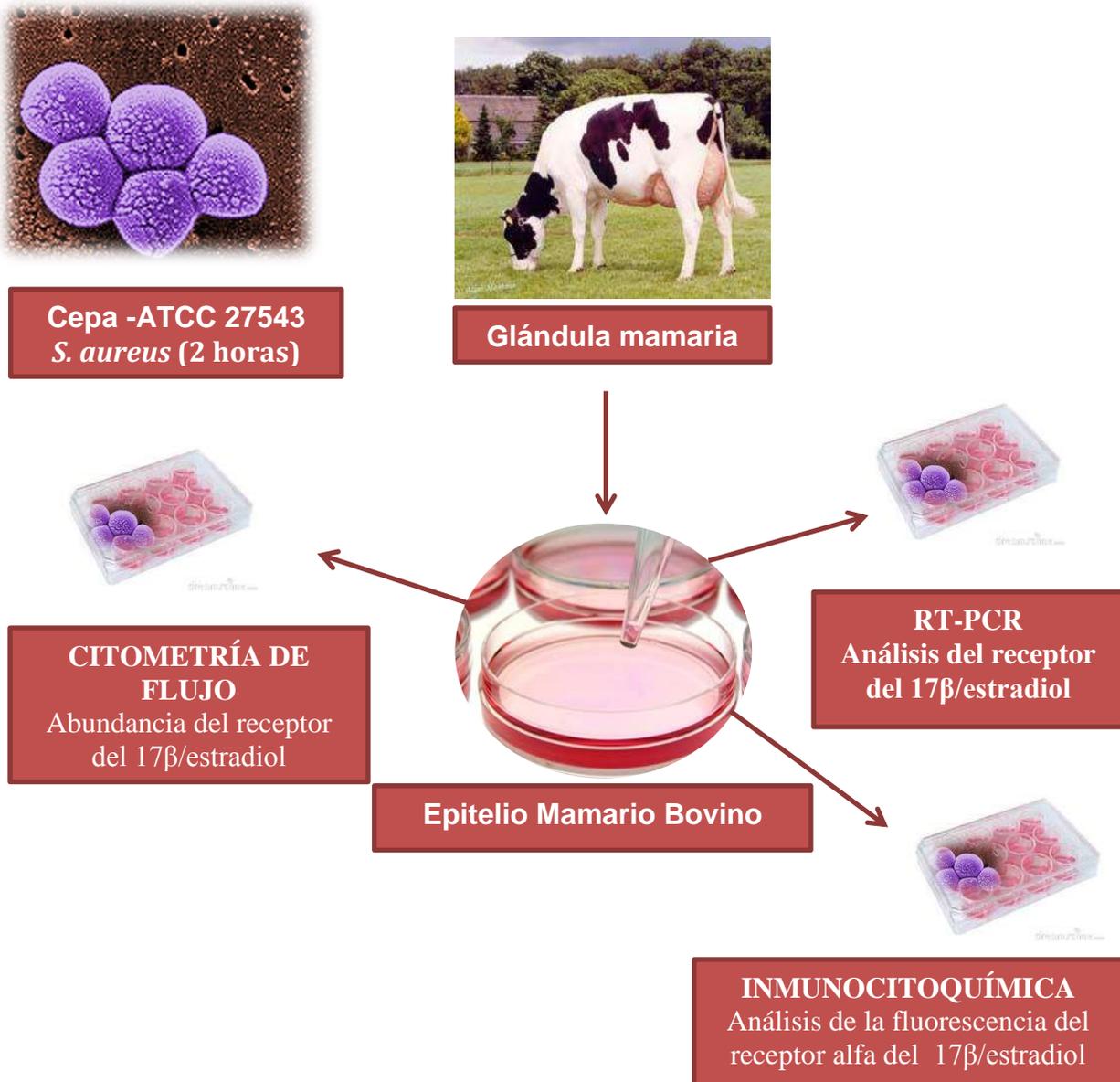
### 6.2 Objetivos particulares

1. Analizar la expresión del gen del receptor alfa para el 17 $\beta$ -estradiol en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus*.
2. Analizar la expresión de la proteína del receptor alfa para el 17 $\beta$ -estradiol en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la UMSNH.

### 7.1 Estrategia experimental



## **7.2 Cultivo de *Staphylococcus aureus***

Se empleó la cepa patógena de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso de mastitis clínica y con capacidad de invadir células de epitelio mamario (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008; Lara-Zárate *et al*, 2011). Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB, Difco; 5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura, agua c.b.p. 1000 mL, BIOXON) a 37°C. El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de cultivos crecidos durante 16 h a 37°C. La cepa ATCC 27543 es sensible al antibiótico gentamicina, el cual se utilizará para eliminar las bacterias extracelulares en los ensayos de internalización.

## **7.3 Cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB)**

Se utilizaron CEMB obtenidas de tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, las cuales se aislarán y cultivarán como se ha descrito previamente (Anaya-López *et al*, 2006). Para su cultivo se empleó la mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma), suplementado con penicilina estreptomycinina (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente), 10% de suero fetal bovino, insulina e hidrocortisona (10 µg/mL de cada una).

#### 7.4 Inmunocitoquímica (ICQ) en cubre objetos

Se sembraron aproximadamente 20,000 CEMB en cubreobjetos redondos cubiertos con colágena de cola de rata tipo I (6-10  $\mu$  g/cm<sup>2</sup>, Sigma) y se colocaron sobre cajas de cultivo de 12 pozos. Se cultivaron las CEMB hasta que alcanzaron la confluencia (1 o 2 días) en medio DMEM/F12 adicionado con suero fetal bovino y antibiótico. Una vez esto, se incubaron con medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos durante 24 h. Las células fueron infectadas de acuerdo a como se describió anteriormente. Se fijaron durante 10 minutos con paraformaldeído al 4% en PBS y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS Triton (PBT 3.0%). Los cubreobjetos se colocaron en una cámara húmeda; seguido de esto se bloquearon con suero de cabra (1:100 en PBT ó PBS) durante 20 min, para evitar uniones inespecíficas. Posteriormente se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda, con el anticuerpo contra receptores fosforilados (Phospho-Estrogen Receptor (Ser118) (16J4) Mouse mAb) de Cell signal (1:50 en PBT). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBT, y se incubaron con el segundo anticuerpo acoplado a rodamina (Chemicon-Millipores 1:50 en PBT ó PBS). Se lavaron 3 veces con PBT y se incubaron con 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI 1:1000 en PBS) por 5min. Finalmente las células se lavaron 3 veces con PBT, los cubreobjetos fueron montados en una solución PBS-Glicerol 1:1 y se observaron al microscopio de epifluorescencia (Zeiss).

## 7.5 Citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo (CF), siguiendo la estrategia de cultivo celular utilizada para la ICQ, pero una vez alcanzando la confluencia celular, se llevaron las células a las diferentes condiciones establecidas, se lavaron las células con PBS y se les añadió 1 ml de tripsina-EDTA (0.25%-0.5 nM respectivamente, Sigma) para despegarlas de los pozos. Se inactivó la tripsina con el mismo volumen de medio DMEM/F12 más suero fetal bovino y se colocó todo el contenido del pozo en tubos de eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugaron por 10 min a 2,500 rpm. Se recuperó la pastilla (células) y se realizaron 3 lavados en centrifuga a 4° C con 100  $\mu$  l de PBS frío. Posteriormente se bloqueó con suero de cabra al 5% en PBS por 30 min en hielo y después se incubó con el anticuerpo primario (anti ER $\alpha$ ) a una concentración de 10  $\mu$  g/ml, durante 2 h en hielo, en agitación y diluido en PBS con albumina al 0.1%. Pasadas la 2 h de incubación, se realizaron 3 lavados en centrifugación y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a rodamina (TrITC 20  $\mu$  g/ml 1:50 de PBS con albumina) por 1 h en agitación con hielo y cubierto de la luz. Terminado el tiempo, se hicieron 2 lavados más; para fijar con formaldehído al 4% en PBS durante 10 min en hielo. Se lavaron 3 veces para quitar el excedente de formaldehído y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 en donde se contaron 10,000 eventos por tratamiento (Becton-Dickinson).

## 7.6 Análisis de la expresión de gen del ER $\alpha$

El ARN total de las CEMB se extrajo de todas las condiciones evaluadas usando Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y después se usó para sintetizar ADN complementario (ADNc). La muestra obtenida se trató con DNAsa I (Invitrogen) para remover cualquier contaminación con ADN. La síntesis del ADNc se realizó por la reacción de transcripción reversa (RT) y se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$  l conteniendo 25  $\mu$  g/ml de oligo d(T)15-18 (Invitrogen), 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min y después 5 min en hielo. Se centrifugó y se añadieron 4  $\mu$  l de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditiotretitol (Invitrogen) y 2 U/ $\mu$  l de inhibidor de RNAsa (Invitrogen), luego se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/ $\mu$  l de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min.

Se confirmó la integridad del ANDc sintetizado por medio de una PCR de punto final empleando oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)(Tabla 1).

Este ADNc se utilizó para establecer los niveles de expresión del ER $\alpha$ , como control interno (gen endógeno) se utilizará GAPDH (Tabla 1).

Especificidad	Oligonucleótido	Secuencia
$\alpha$ receptor estrógeno	Sentido	5'-GACCCTACCAGACCTTTCAGTG-3'
	Reverso	5'-TGCTCCATGCCTTTGTTGC-3'
GAPDH	Sentido	5'-TCAACGGGAAGCTCACTGG-3'
	Reverso	5'-CCCCAGCATCGAAGGTAGA-3'

Tabla 1. Oligonucleótidos que ese empleó en este trabajo

### 7.7 Análisis estadístico

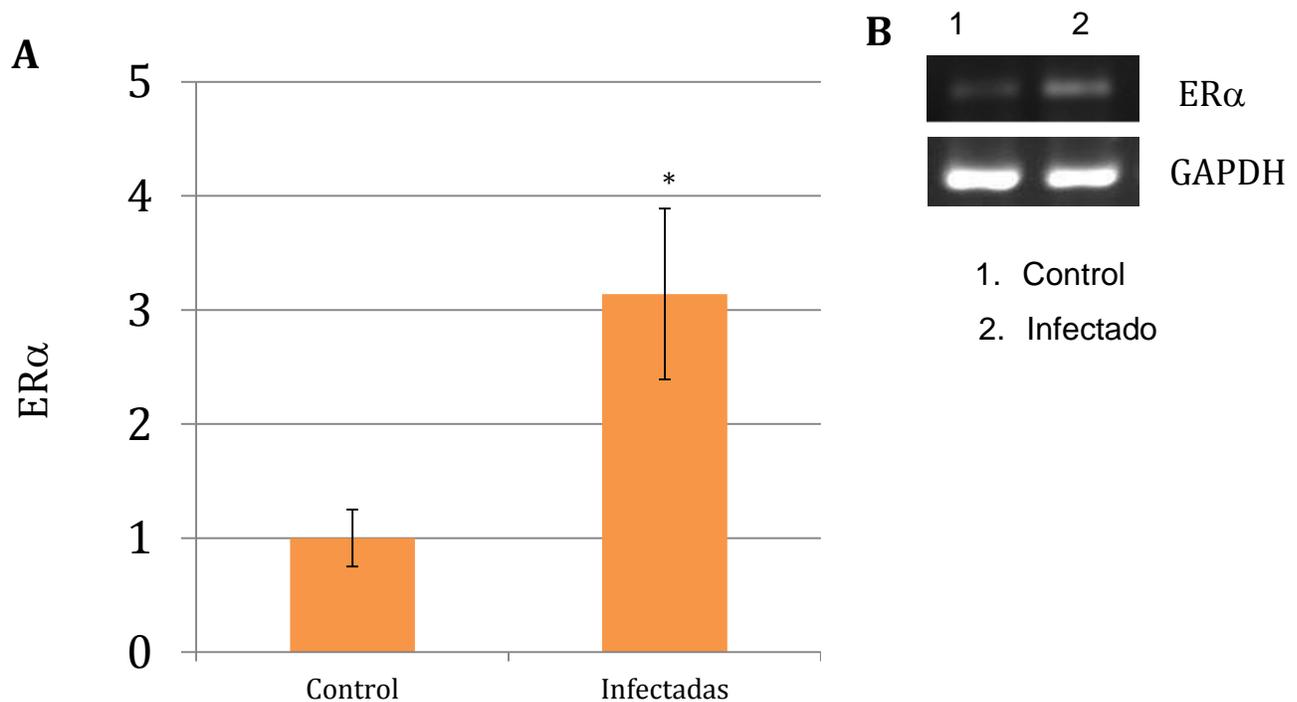
Los datos se sometieron a una comparación mediante de T de student y se reporta la media con  $\pm$  el error estándar. Se consideraron diferencias significativas cuando  $P \leq 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión del ER $\alpha$  para el 17- $\beta$  estradiol en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus*. Para esto, se realizó un análisis de la expresión del gen del ER $\alpha$ , al igual que un análisis de la expresión de la proteína con dos aproximaciones diferentes: inmunocitoquímica y citometría de flujo, tanto en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus* como no infectadas.

### 8.1 Análisis de la expresión del gen del ER $\alpha$ en epitelio mamario bovino infectado con *S. aureus*

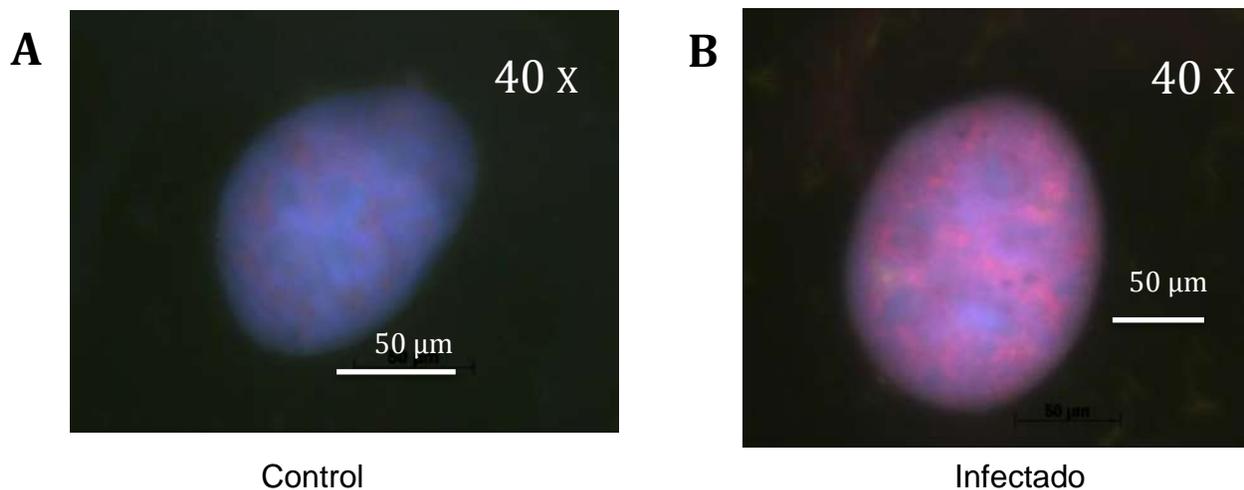
Para evaluar la expresión del gen ER $\alpha$  en el epitelio mamario bovino infectado por *S. aureus* durante 2 horas, se realizó un análisis de RT-PCR en punto final en células infectadas y no infectadas. En la Figura 9A se muestra el análisis densitométrico del producto de PCR correspondiente al gen del ER $\alpha$  con respecto a la expresión del gen endógeno empleado que consistió en GAPDH (Glyceraldehyde-3-fosfato deshidrogenasa). El ARNm del ER $\alpha$  aumentó significativamente en las células infectadas con *S. aureus* (~3 veces,  $P < 0.05$ ) con respecto a las células sin infectar.



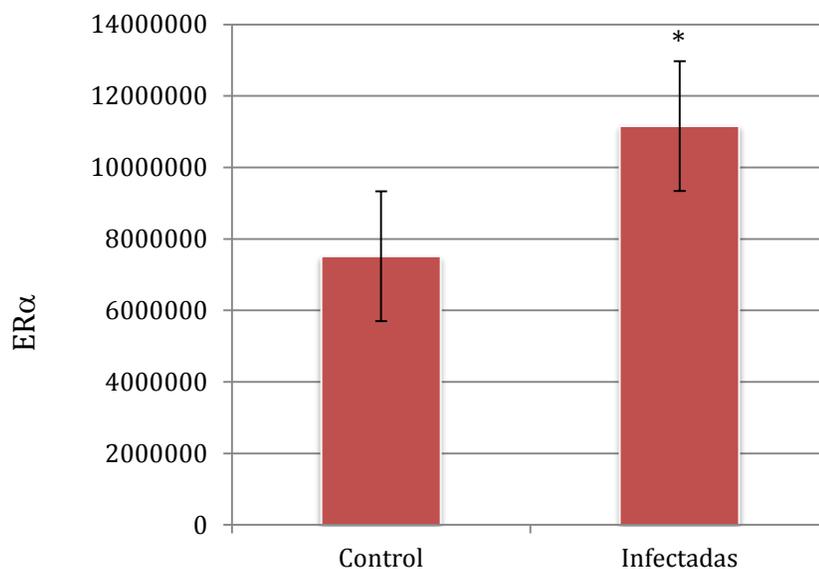
**Fig 9.** Expresión del ER $\alpha$  evaluada por RT-PCR en punto final en células de epitelio mamario bovino infectadas con *S. aureus* durante dos horas. **A)** Análisis densitométrico de la expresión del ER $\alpha$ , con respecto a la expresión de GAPDH. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de los productos de RT-PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para el ER $\alpha$ , y GAPDH. Los datos de las gráficas son resultado del promedio de 3 ó más experimentos independientes. Se muestra la media con sus respectivos errores estándar y se representa con \* ( $p < 0.05$ ) las diferencias significativas. La densitometría se analizó con el programa Imagej.

## 8.2 Análisis del ER $\alpha$ en epitelio mamario bovino infectado con *S. aureus* por inmunocitoquímica

Para evaluar la expresión de la proteína del ER $\alpha$  en el epitelio mamario bovino infectado con *S. aureus* y sin infectar, se determinó la expresión de la proteína intranuclear empleando anticuerpos específicos mediante inmunocitoquímica. Una figura ilustrativa de la inmunotinción se muestra en la Figura 10. Se analizaron 60 células, a las que se les determinó la intensidad de fluorescencia empleando el programa ImageJ. En la Figura 11 se muestra la intensidad de fluorescencia relativa obtenida en células inmunoteñidas para el ER $\alpha$  de las 60 células analizadas, detectándose un aumento significativo del ER $\alpha$  en el núcleo de las células infectadas comparadas con las células control ( $P < 0.05$ ). Cabe señalarse que el anticuerpo empleado detecta el ER $\alpha$  fosforilado sugiriendo el ER $\alpha$  ha sido activado y por lo tanto translocado al núcleo. □



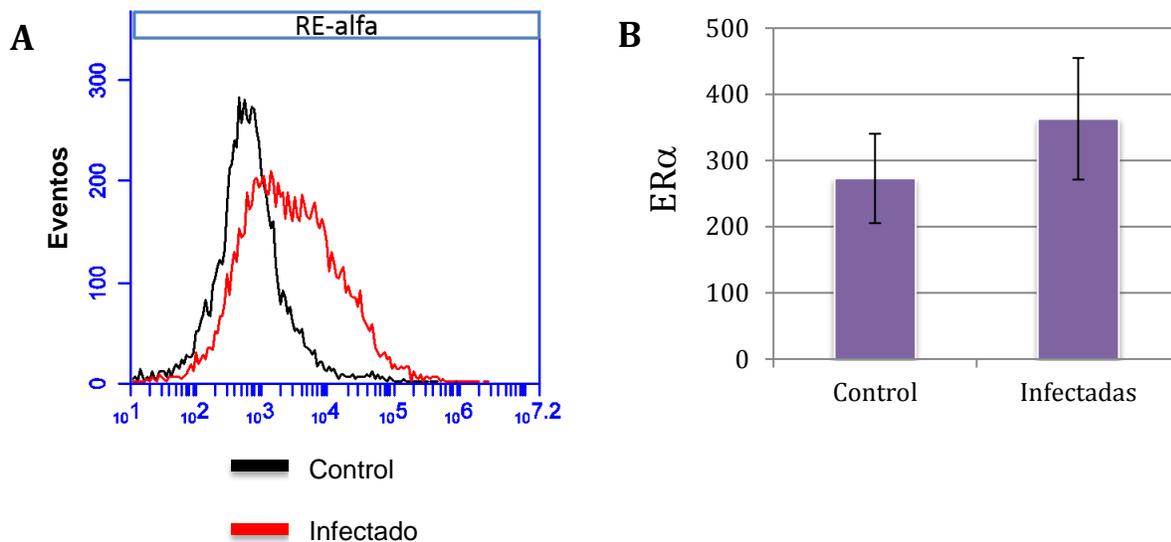
**Fig 10.** Fotografías representativas de la inmunotinción positiva del ER $\alpha$  estradiol evaluada por inmunocitoquímica en células no infectadas (A) y tratadas con *S. aureus* (B). Las células se analizaron en un microscopio de epifluorescencia contra tiñendo el núcleo con DAPI. Se observa una mayor localización del ER $\alpha$  en el núcleo de las células infectadas (B).



**Fig 11.** Inmunotinción positiva del ER $\alpha$  evaluada por inmunocitoquímica en células no infectadas y tratadas con *S. aureus*. Se analizaron 60 células, a las que se les determinó la intensidad de fluorescencia empleando el programa ImageJ. Se muestra la intensidad de fluorescencia relativa obtenida en células inmunoteñidas para el ER $\alpha$ . Se representa con un \* las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los dos tratamientos.

### 8.3 Análisis del ER $\alpha$ por citometría de flujo

La expresión del ER $\alpha$  en epitelio mamario bovino se determinó también por citometría de flujo. En la Figura 12A se muestra un histograma representativo de las CEMB positivas para la presencia del ER $\alpha$  fosforilado intracelular. Se aprecia que hay una mayor cantidad de células fluorescentes en el tratamiento con *S. aureus*, en comparación con el control. En la Figura 12B se muestra el análisis de las medias de la citometría. Aunque no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos, se observa una tendencia de mayor expresión del ER $\alpha$  en las CEMB infectadas.



**Fig 12** . Citometría de flujo de CEMB que expresan el ER $\alpha$ . A) Histograma representativo de la expresión del ER $\alpha$  en las CEMB. Se midieron 10,000 eventos por condición, donde el histograma negro representa células control, mientras que el rojo representa CEMB infectadas durante 2 h con *S. aureus*. Los experimentos fueron realizados por triplicado. B) Media de la fluorescencia de las CEMB analizadas por citometría de flujo. Se muestran triplicados.

## 9. DISCUSION

La mastitis bovina (MB) es una de las enfermedades infecciosas más importantes en el ganado lechero a nivel mundial, provocando una disminución tanto en la calidad, como en cantidad de la leche producida, lo que genera pérdidas económicas considerables (Brouillette et al., 2003). Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia durante el periodo de lactancia (Schrick et al., 2001). Para su control se recurre principalmente al uso de antibióticos; sin embargo, el uso inadecuado de los mismos ha llevado a la selección de microorganismos resistentes causantes de la mastitis, lo que ha resultado en la disminución de la eficacia de la terapia antimicrobiana (Kerro-Dego et al., 2002).

Se han reportado más de 135 microorganismos implicados como causantes de infección intramamaria, pero el principal agente causal de la mastitis en bovinos es *Staphylococcus aureus*, el cual tiene la capacidad de invadir las células del epitelio mamario bovino y sobrevivir dentro de ellas, permitiéndole evadir el sistema inmune del hospedero (Kerro-Dego et al., 2002). En los países subdesarrollados *S. aureus* tiene un papel preponderante como agente causal de la mastitis bovina subclínica (Castañeda et al, 2011; Giannechini et al, 2002; Shitandi y Sternesjö, 2004; Valero et al, 2010). Para el establecimiento y mantenimiento del proceso infeccioso, *S. aureus* puede producir más de 30 factores de virulencia (Haveri et al.,2008), además cuenta con una gran capacidad de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal con otras especies, lo que le permite ser un agente exitosos y fácil de adaptarse a diferentes ambientes y a terapias antimicrobianas a través de adquirir diversos factores de resistencia antibióticos y de evasión de la respuesta inmune (Huletsky et al., 2004). Tal resistencia hace difícil contrarrestar esta enfermedad.

El ciclo estral bovino está regulado por hormonas, viajan por la sangre hacia tejidos blanco que contienen receptores específicos para las mismas (Lamb et al., 2009). Dentro de los mensajeros químicos intracelulares se encuentran las hormonas esteroideas, estas hormonas son importantes ya que regulan cambios metabólicos, morfológicos y de comportamiento en el bovino (Miller, 1988).

El 17-  $\beta$  estradiol forma parte del grupo de las hormonas esteroideas, es producido por los ovarios y tiene acción directa sobre la glándula mamaria. Actúa regulando crecimiento, desarrollo, diferenciación celular y está asociado con la regulación de la respuesta inmune (Connor et al., 2007). La incidencia más elevada de mastitis se presenta durante los periodos secos y en el periparto, estos eventos fisiológicos se caracterizan por un aumento en los niveles plasmáticos de la hormona 17-  $\beta$  estradiol en la última semana de la gestación, alcanzando su concentración más alta tres días antes del parto, después del cual, la concentración disminuye rápidamente, hasta llegar a niveles basales (Lamote et al., 2006). Para que pueda existir una conexión célula-hormona es esencial que se exprese un receptor específico de la hormona, los receptores actúan como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula. Se ha reportado que la glándula mamaria bovina solo expresa la isoforma  $\alpha$  ER (Connor et al., 2007).

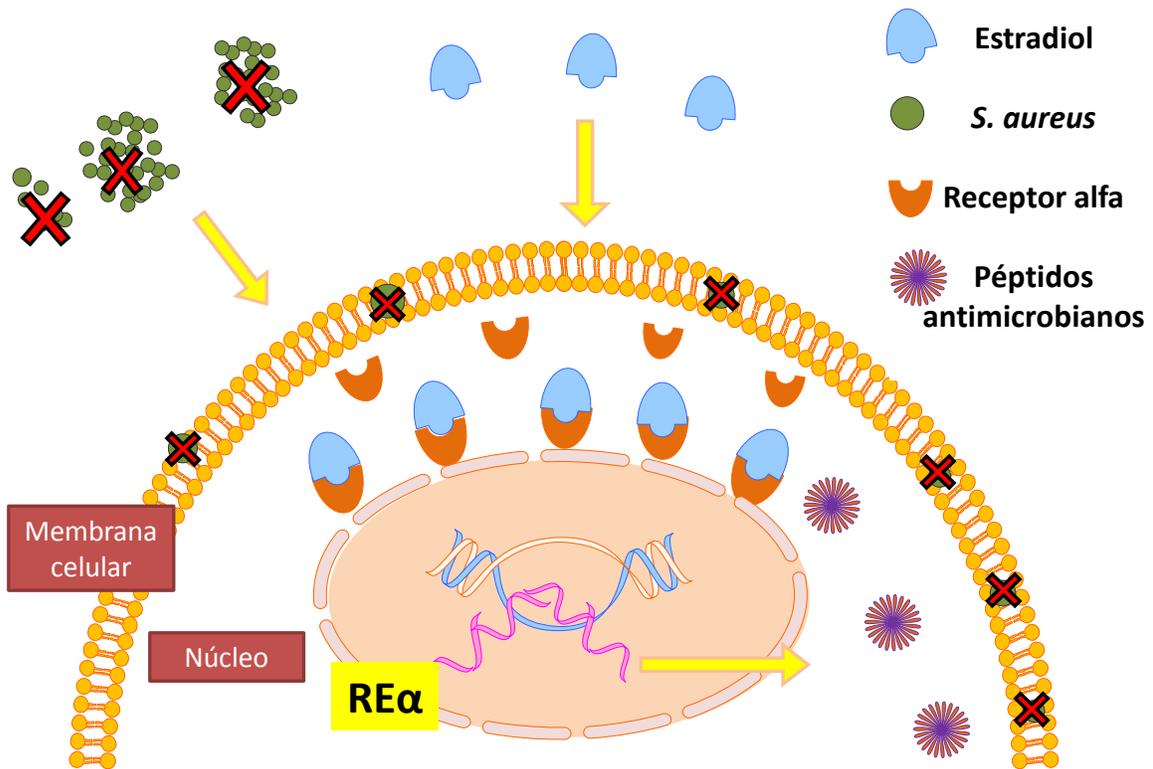
El presente trabajo se enfocó en evaluar la expresión del receptor alfa de estrógenos ( $ER\alpha$ ) en las células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *S. aureus*, teniendo como antecedente que la mastitis se asocia con los cambios en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales (Gutiérrez-Barroso, 2007; Mustafa, 2011). Existen investigación que confirman que durante la mastitis clínica experimental ocasionada por *Streptococcus uberis*, no se detectan cambios en los niveles circulantes de 17  $\beta$ -estradiol entre vacas control y vacas infectadas (Hockett et al., 2000).

A pesar de las evidencias anteriores, hasta el momento no se ha reportado como la infección por *S. aureus* u otras bacterias modifican los niveles de expresión del  $ER\alpha$  en el epitelio mamario bovino.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se detectó un aumento significativo en la expresión de los receptores  $\alpha$  de estrógenos por medio de la RT-PCR (~3 veces), hecho que coincide con la expresión detectada por inmunocitoquímica. Sin embargo, los estudios analizados por citometría de flujo no mostraron resultados significativos, aunque parece existir una tendencia en el incremento de expresión del ER $\alpha$  en CEMB infectadas.

Los resultados sugieren que en los tratamientos con *S. aureus*, la célula está regulando componentes que activan a los receptores  $\alpha$ . Este efecto puede deberse a la generación de un mecanismo de defensa contra la bacteria, ya que previas investigaciones de viabilidad e internalización bacteriana en CEMB tratadas con E2, muestran reducción de la internalización bacteriana (Guijosa-García, 2014). De igual manera distintas investigaciones demuestran la modulación del sistema inmune innato asociado al E2 en el epitelio uterino humano (EUH) ante la presencia de *S.aureus* y lipopolisacáridos. Estas células producen citocinas y quimiocinas para reclutar células inmunes así como activar diversos mecanismos inflamatorios ante diferentes tratamientos de 24 y 48 horas con E2. Los autores de este trabajo establecieron que el E2 inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que aumenta la producción de péptidos antimicrobianos generando efectos bactericidas en este modelo (Fahey et al., 2008.)

Estos resultados confirman el importante papel que juega la activación de los receptores ER $\alpha$  como un mecanismo de protección ante ataques bacterianos, sugiriendo que el E2 activa mecanismos inmunes de defensa ante la presencia de bacterias, comprometiendo así la regulación de la respuesta inmune de la glándula mamaria. Hasta el momento este es la única investigación que demuestra el aumento de los ER $\alpha$  en la infección de epitelio mamario bovino por *S.aureus*. En la Figura 13 se muestra un modelo que explicaría el efecto de la infección por *S. aureus* sobre la expresión del ER $\alpha$  en las CEMB.



**Fig. 13.** Posible mecanismo de acción de la infección por *S. aureus* en las CEMB sobre la expresión de ER $\alpha$  basado en Yamilet, 2008.

## 10. CONCLUSIÓN

Estos resultados en conjunto muestran que las CEMB aumenta la expresión de los ER $\alpha$  durante la infección de *S. aureus*, sugiriendo que el E2 inhibe la presentación de la MB a través de la activación de la respuesta inmune innata del bovino.

## 11. REFERENCIAS

Akers, R.M., 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J Dairy Sci* 89, 1222-1234.

Armenteros, A., Peña, J., Pulido, J.L. y Linares, E. 2002. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba. *Rev Salud Anim.* 24: 99-105.

Anaya-Lopez, J.L., Contreras-Guzman, O.E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., Lopez-Meza, J.E., Valdez-Alarcon, J.J., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Rev Vet Sci* 81, 358-361.

Bedolla, C. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Rev Electron Vet.* 9: 1695-7504

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

Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P. y Talbot, B.G. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathogen.* 35:159-168.

Connor, E.E., Meyer, M.J., Li, R.W., Van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R., Capuco, A.V., 2007. Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids. *J Dairy Sci* 90 Suppl 1, E55-65.

DeGraves, F.J., Fetrow, J., 1993. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9, 421-434.

De Oliviera, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A. y Aarestrup, F.M. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83: 855-862.

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

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

Glauber, 2007. Fisiología de la lactación en la vaca lechera. *Producción Animal.* 24(234):274-281

Fahey, JA Wright, L Shen, JM Smith, M Ghosh, RM Rossoll and CR Wira, 2008. Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Nature immunology.*1:317-325.

Hafez, E.S.E and B. Hafez. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Séptima Edición. Editoriar Interamerican McGraw- Hill. México pp. 70-96;163-175; 415-420.

Hockett, M.E., Hopkins, F.M., Lewis, M.J., Saxton, A.M., Dowlen, H.H., Oliver, S.P., Schrick, F.N., 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim Reprod Sci* 58, 241-251.

Hovey, R.C., Trott, J.F., Vonderhaar, B.K., 2002. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 17-38.

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

Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., Burvenich, C., 2006. Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. *Vet Res* 37, 61-74.

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

Lavon, Y., Leitner, G., Klipper, E., Moallem, U., Meidan, R., Wolfenson, D., 2011. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domest Anim Endocrinol* 40, 98-109.

Lavon, Y., Leitner, G., Voet, H., Wolfenson, D., 2010. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci* 93, 911-921.

Ma. Yamitet Noriega-Reyes y Elizabeth Langley McCarron, 2008. Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología* 3:29-40

Neville, M.C., McFadden, T.B., Forsyth, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 49-66.

Pei Show Juo, 2002. Concise dictionary of Biomedicina and Molecular Biology. Crc Press. 2: 557.

Romero, A.T. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. 122-134 p.

Svennersten-Sjaunja, K., Olsson, K., 2005. Endocrinology of milk production. *Domest Anim Endocrinol* 29, 241-258.

Sears, P.M., y McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim.* 19: 171-185.

Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxto, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. y Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407-1412.

Sinha, B. y Herrmann, M. 2005. Mechanism and consequences of invasión endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb Haemost.* 94:266-77.

Ruckebusch, Y., Phaneuf, L.P. and Dunlop, R. 2000. Fisiología de pequeñas y grandes especies. *Manual Moderno.* 769-775.

Roginski, H., Fox, F.P. and Fuquay, W.J. 2003. *Encyclopedia of dairy sciences.* Ed. Advisory board. 3: 1680-1751.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé, J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2584-2589.

Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J. L. Y Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.* 85: 132-138.

Wanasinghe, D. 1981. Adherence as a Prerequisite for Infection of the Bovine Mammary Gland by Bacteria. *Acta Vet Scand.* 22:109-117.

Yamada, K.M., Pankov, R. y Cukierman, E. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:959-966.