



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS
EN BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PaDef (*Persea americana*) SOBRE
LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE CÉLULAS
EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus*

TESIS QUE PRESENTA:

ARIANA MORALES PÉREZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR DE TESIS: DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

CO-ASESOR DE TESIS: M.C. MARISOL BÁEZ MAGAÑA



Morelia, Michoacán, Octubre de 2018



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS
EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PaDef (*Persea americana*) SOBRE
LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE CÉLULAS
EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus***

TESIS QUE PRESENTA:

ARIANA MORALES PÉREZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



Morelia, Michoacán, Octubre de 2018

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSHN, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-asesoría de la M.C. Marisol Báez Magaña. Para su realización se contó con el apoyo de CONACyT (CIENCIA BÁSICA CB-2013-01-221363).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por llenarme de bendiciones y darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por brindarme la fortaleza y resistencia de lograr todos los proyectos profesionales realizados en mi vida y de vivir experiencias desconocidas que me ayudaron a crecer personalmente.

A mis padres: Humberto Morales Saloma y Sara Pérez Morales, por forjarme a ser una persona de bien, darme los valores, principios y enseñanzas necesarias para salir adelante y lograr todo lo que me proponga en esta vida, por el apoyo económico que me han dado para cumplir mi objetivo más grande en la vida y porque me apoyaron moralmente durante la realización de este trabajo dándome los ánimos necesarios para terminar esta investigación. Con toda gratitud y respeto, Gracias.

A mis hermanos: Missael Morales Pérez y Lizeth Morales Pérez, por apoyarme en todo momento a pesar de la distancia que hay entre nosotros (vivir cada quien en diferentes ciudades), por cuidarme durante mi crecimiento, además de ayudarme a forjarme a ser buena persona, darme momentos gozo y felicidad y por el apoyo moral que me han dado durante la realización de mis estudios y proyectos de vida. Gracias de todo corazón.

A mis sobrinos: Arleth Teniza Morales, Joshua Teniza Morales y Natalia Teniza Morales, por hacerme siempre sonreír y hacer de mi vida más linda y grata.

A mis abuelas: Guadalupe Morales Méndez y Lucia Saloma Lozano, porque siempre me han apoyado emocionalmente dándome ánimos y buenos consejos para enfrentar las dificultades de la vida, además de siempre escucharme y hacerme pasar ratos de risas y alegrías inolvidables.

A mis amigos: Julia Yanin, Yesenia Morales, Ismerarí Sánchez, Viridiana Galván, Mariela Cortes, Daniela Fermin, Melina Jerónimo, Agustín Espino, Jessica Ballesteros, Cecilia Laina, los cuales también forman parte importante en mi vida porque me han brindado su apoyo moral y económico en buenos y malos momentos, hacerme pasar ratos agradables y satisfactorios, por preocuparse por mí y mi familia, y en especial agradezco a mis amigos Martín Ayala y Andrea Viridiana, por haberme brindado los

conocimientos necesarios para crecer en el campo de la Medicina Veterinaria, por alentarme en todo momento para la realización de este trabajo de investigación y hacer de mis malos momentos en agradables.

A Erving Sánchez: por siempre ayudarme a mejorar en mí día con día, a no ser conformista, a ser fuerte a pesar de las adversidades y entender que son cosas que suceden en esta vida, a trabajar cada vez más para conseguir mis objetivos y por el apoyo emocional que me ha brindado.

A la Dra. Zoraya Palomera Sánchez, MC. Elena Velázquez, MC. Marisol Báez Magaña y Dr. Iván Medina: por enseñarme a hacer los experimentos de la mejor manera, por compartirme sus experiencias para realizar adecuadamente este trabajo de investigación, por darme las bases requeridas para trabajar en el área de la ciencia básica y por tenerme la mayor paciencia para enseñarme los conocimientos que generalmente se desconocen en la carrera de la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Dr. Joel Edmundo López Meza y a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa: por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y aceptarme dentro del grupo de trabajo, por despertar mi interés en el área de la Biotecnología, por guiarme y corregirme y por su ejemplo de dedicación, constancia y esfuerzo en el campo científico.

Y a todos ustedes, por tomarse la libertad de leer estas líneas.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL DEL SECTOR GANADERO EN MÉXICO.....	3
2.2. MASTITIS.....	4
2.2.1. Definición.....	4
2.2.2. Salud Pública.....	5
2.2.3. Etiología.....	6
2.2.4. Clasificación.....	7
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.3.1. Características.....	8
2.3.2. Respuesta de la glándula mamaria bovina durante la interacción con <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4. INMUNIDAD INNATA.....	12
2.4.1. Respuesta inmune de la glándula mamaria bovina.....	14
2.5. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	15
2.5.1. Definición.....	15
2.5.2. Clasificación.....	15
2.5.3. Mecanismos de acción.....	17
2.5.4. Propiedades inmunomoduladoras.....	19
2.5.5. Defensina PaDef.....	21
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS.....	25
6.1. Objetivo general.....	25
6.2. Objetivos específicos.....	25
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
8.1. Cultivo celular	27
8.2. La defensina PaDef.....	27
8.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27543.....	27
8.4. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	27
8.5. Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune innata	28
8.6. Análisis estadístico.....	29
9. RESULTADOS.....	30
9.1. Procedimientos previos a la cuantificación de la expresión de genes.....	30
9.2. Efecto de PaDef sobre la expresión de TNF- α en las CEMB.....	31
9.3. Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-10 en las CEMB.....	31
9.4. Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-8 en las CEMB.....	32

9.5.	Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-1 β en las CEMB.....	33
9.6.	Efecto de PaDef sobre la expresión de DEFB1 en las CEMB.....	34
10.	DISCUSIÓN.....	36
11.	CONCLUSIÓN.....	40
12.	REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Figura 2. Mecanismo de entrada de los microorganismos a la glándula mamaria bovina.....	11
Figura 3. Principales estructuras de péptidos antimicrobianos.....	16
Figura 4. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos en el “modelo de barril”	18
Figura 5. Características de la defensina PaDef (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>).....	22
Figura 6. Integridad del RNA total de CEMB tratadas con la defensina PaDef	30
Figura 7. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de TNF- α en las CEMB.....	31
Figura 8. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de IL-10 en las CEMB.....	32
Figura 9. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de IL-8 en las CEMB.....	33
Figura 10. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen IL-1 β en las CEMB.....	34
Figura 11. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de la DEFB1 en las CEMB.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Ejemplos de péptidos antimicrobianos de origen animal que participan en la modulación de la respuesta inmune innata en modelos de mamíferos.....	19
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el análisis de la expresión de genes de la RII en las CEMB	29

EFFECTO DEL PÉPTIDO ANTIMICROBIANO PaDef SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS INFECTADAS CON *Staphylococcus aureus*

Ariana Morales Pérez, Marisol Báez Magaña, Joel Edmundo López Meza.

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

RESUMEN

La mastitis bovina es una de las principales enfermedades que afectan la producción del ganado lechero, causando grandes pérdidas económicas. Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria y la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* es el principal causante de ella. Este patógeno es particularmente un problema debido a su resistencia antimicrobiana y a su capacidad para sobrevivir dentro de las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). Por lo anterior, se buscan tratamientos terapéuticos alternativos con capacidad de modular la respuesta inmune innata (RII) de la célula hospedera. Una alternativa atractiva son los péptidos antimicrobianos (PA). Los PA son producidos por especies de los diferentes reinos, incluyendo a las plantas, los cuales generalmente poseen propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Previamente se demostró por nuestro grupo de trabajo que el PA γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) presentó actividad inmunomoduladora en las CEMB infectadas con *S. aureus*. En la búsqueda de otros PA de plantas que presenten actividad inmunomoduladora, la defensina PaDef de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) presenta características que le permiten ser un buen candidato. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la defensina PaDef sobre la expresión de genes representativos de la RII (TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-8 y DEFB1) en CEMB infectadas con *S. aureus*. Se analizaron diferentes concentraciones de PaDef (5-500 ng/ml). El PA PaDef (500 ng/ml) tuvo un efecto inmunomodulador en las CEMB al inducir la expresión de IL-1 β (~1.2 veces), IL-10 (~2.3 veces) y DEFB1 (~4.4 veces) durante la infección con *S. aureus*; y disminuyó la expresión de TNF- α e IL-1 β antes de la infección. Además, la expresión de IL-8 no mostró un cambio significativo en todas las concentraciones probadas antes y después de la infección. Estos resultados son el primer reporte que sugieren una actividad inmunomoduladora de la defensina PaDef sobre un modelo de interacción hospedero-patógeno.

Palabras clave: mastitis bovina; *Staphylococcus aureus*; péptidos antimicrobianos; aguacate; efecto inmunomodulador.

**EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE PaDef ON THE EXPRESSION OF GENES
FROM INNATE IMMUNE RESPONSE OF BOVINE MAMMARY EPITHELIAL
CELLS INFECTED WITH *Staphylococcus aureus***

Ariana Morales Pérez, Marisol Baez Magaña, Joel Edmundo López Meza.

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of leading diseases that affects the production of dairy cattle. This disease is characterized by the inflammation of the mammary gland and *Staphylococcus aureus* is the main pathogen. This bacterium is a serious problem due to the antimicrobial resistance and its ability to survive within bovine mammary epithelial cells (bMECs). Due to the above, alternative treatments that improve the innate immune response of host cell are desirable. An attractive alternative is the antimicrobial peptides (AMP). The AMP are produced by species from different kingdoms, including plants, which generally shown antimicrobial and antifungal properties. Previously, our group demonstrated that the AMP γ -thionin from chile habanero (*Capsicum chinense*) has immunomodulatory activity on the bMECs infected with *S. aureus*. In the search for other plant AMP with immunomodulatory activity, the defensin PaDef from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) could be a good candidate. The aim of this work was to evaluate the effect of PaDef defensin on the expression of genes representative from the innate immune response (IIR) (TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-8 and DEFB1) of bMECs infected with *S. aureus*. Different concentrations of PaDef were analyzed (5-500 ng/ml). The results showed that PaDef (500 ng/ml) has immunomodulatory activity in the bMECs because the mRNA expression for IL-1 β was up-regulated (~1.2 fold), as well as for IL-10 (~2.3 fold) and DEFB1 (~4.4 fold) after infection; in addition, the expression of TNF- α and IL-1 β was down-regulated before infection. Also, the expression of IL-8 remained unmodified in all of the tested conditions before and after the bacterial infection. This work is the first report that shows an immunomodulatory role for PaDef defensin in a model of host-pathogen interaction.

Keywords: bovine mastitis; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial peptides; avocado; immunomodulatory roles.

1. INTRODUCCIÓN

En el área de la producción lechera en el 2015, México ocupó la novena posición a nivel mundial con una producción de 11 mil millones de litros anuales. Además, en el 2016 la actividad lechera generó una demanda económica de 68 mil millones de pesos (SAGARPA, 2016; SAGARPA, 2018). Sin embargo, la producción de leche bovina en el país aún es heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico (Secretaría de Economía, 2012).

Uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería lechera es la mastitis bovina, debido a que es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas a nivel mundial afectando el bienestar de los animales, la producción, inocuidad, calidad y cantidad de la leche (Secretaría de Economía, 2012; Vakkamäki *et al.*, 2017). La mastitis bovina se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, la cual puede ser causada por un daño físico o por microorganismos (Gonzales, 2009; Vakkamäki *et al.*, 2017). Entre estos agentes se incluyen bacterias, micoplasmas, y en menor cantidad levaduras, algas, hongos y en muy raras ocasiones virus (Strandberg *et al.*, 2005; Nickerson, 2011).

Las dos principales bacterias relacionadas con la mastitis bovina son: 1) *Escherichia coli*, cuyas infecciones se manifiestan con un cuadro clínico de inflamación aguda de la glándula mamaria, y una respuesta inmune exacerbada, y 2) *Staphylococcus aureus*, que genera una mastitis con una respuesta inflamatoria disminuida, que en muchos casos llega a desencadenar infecciones crónicas (Strandberg *et al.*, 2005). En este último caso, los tratamientos con antibióticos son poco exitosos; por lo que se buscan nuevas estrategias de tratamiento.

Existen evidencias que sugieren que los péptidos antimicrobianos (PA) pueden ser alternativas de tratamiento prometedoras, por su actividad antimicrobiana y su capacidad inmunomoduladora (Díaz, 2015). Los péptidos antimicrobianos son producidos por una amplia variedad de organismos que incluye animales, bacterias y plantas. En las plantas se han reportado más de 300 secuencias de PA, los cuales se han agrupado en 12 familias, entre ellas destaca la familia de las defensinas, las cuales son péptidos catiónicos de un tamaño de 45 a 54 aminoácidos. La mayoría

de los PA presentan efectos membranolíticos sobre una amplia gama de bacterias, virus, hongos, levaduras y protozoos. Además, se ha demostrado que algunos PA participan en la quimiotaxis, la modulación de la expresión de citocinas, péptidos antimicrobianos y la activación leucocitaria (Díaz, 2015; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016).

Antecedentes directos del grupo de trabajo demostraron que la defensina γ -tionina de *Capsicum chinense* (químicamente sintetizado) disminuyó la internalización de *S. aureus* en las CEMB hasta un 50%, además moduló la expresión de los genes de la respuesta inmune innata (RII) TNF- α , IL-1 β (citocinas proinflamatorias) y la IL-10 (citocina antiinflamatoria) e indujo la expresión del péptido antimicrobiano endógeno DEFB1 (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Por otra parte, se reportó que la defensina PaDef del fruto de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) expresada en células de endotelio umbilical bovino (BUVEC) presentó actividad antimicrobiana, antifúngica y citotóxica (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Asimismo, se analizó la capacidad citotóxica de PaDef (químicamente sintetizado) sobre líneas celulares cancerosas y sanas, y se reportó que indujo apoptosis en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) con una IC₅₀ de 141.82 μ g/ml, mientras que no presentó citotoxicidad en CEMB (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016). Sin embargo, se desconoce su actividad inmunomoduladora en un modelo de interacción hospedero-patógeno. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la regulación de la expresión de genes representativos de la RII en CEMB tratadas con la defensina PaDef e infectadas con *S. aureus*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL DEL SECTOR GANADERO EN MÉXICO

En el año 2016, México ocupó el noveno lugar en la producción de leche bovina a nivel mundial, aportando tres de cada cien litros producidos en el mundo (SAGARPA, 2016). A nivel nacional, en ese mismo año, la producción de leche se incrementó hasta un 1.9%, siendo los estados de Jalisco, Coahuila y Durango los principales productores de este alimento (SAGARPA, 2016). Asimismo, la producción lechera impacta directamente en la de los alimentos lácteos, la cual es la tercera actividad más importante del país, ya que ésta depende de la disponibilidad de la leche producida (Secretaría de Economía, 2012).

En este sentido, el mercado de productos alimenticios nacional e internacional exige a las granjas productoras de leche y a la industria de productos lácteos, buenas técnicas de manufactura durante la extracción de la leche y la elaboración de los productos derivados de ésta, debido a que durante estos procesos los productos lácteos destinados para consumo humano pueden sufrir alteraciones en su composición, afectando su calidad y consecuentemente el rechazo del producto por parte de los consumidores o incluso ocasionando algún daño a su salud (Gonzales, 2009). Además, el mercado nacional e internacional demanda del sector pecuario métodos de producción que agreguen valor económico a sus productos, tales como la implementación del mejoramiento de razas productoras de leche, mejores máquinas de ordeño y la realización de pruebas de calidad de la leche. Todo ello con el fin de incrementar los beneficios económicos del sector pecuario del país (Gonzales, 2009).

Sin embargo, el sector lechero presenta grandes pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades en los animales como es la mastitis bovina, afectando la calidad y cantidad de la leche, el bienestar de la vaca y el periodo de reproducción provocando el desecho temprano de las vacas. Además, los tratamientos a base de antibióticos son costosos para el productor y en muchas ocasiones no ayudan a eliminar la enfermedad, sumado al hecho de que durante el

periodo de tratamiento la leche no puede ser utilizada para su consumo (Lutzow *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2008). Asimismo, esta enfermedad es difícil de detectar y tratar por lo que generalmente pasa desapercibida (Anaya-López *et al.*, 2006b; Figueroa *et al.*, 2008; Sartori *et al.*, 2017). Se debe resaltar que los productores de vacas lecheras tienen poco conocimiento sobre la enfermedad, los métodos de control y prevención, lo que en ocasiones conduce al consumo de leche de mala calidad o contaminada con residuos de antibióticos (Figueroa *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior, se recomienda la implementación de buenas prácticas de manejo, entre ellas las prácticas de higiene, vacunación, aplicación de selladores y tratamientos antimicrobianos controlados en las granjas lecheras con la finalidad de prevenir problemas de salud en las vacas, limitar la resistencia de bacterias que causan mastitis, y como consecuencia reducir la propagación de la enfermedad, lo cual se verá en una mejora de la calidad de la leche, beneficiando el sector lechero en todos los aspectos (Herron *et al.*, 2007; Gonzales, 2009).

En Michoacán, en un estudio sobre la prevalencia de la mastitis subclínica en algunos de los municipios lecheros se reportaron altas prevalencias de mastitis. En el municipio de Tarímbaro se determinó un 43.14% de prevalencia, mientras que en el municipio de Chéran fue de 32.32%; sin embargo, en el municipio de Pátzcuaro se obtuvo la mayor prevalencia con un 83.52%. Asimismo, la cuenca lechera Morelia-Queréndaro mostró un 49.58% de prevalencia, en donde el 90% de las unidades de producción se encontraban ubicadas cerca de las viviendas, con una fuerza de trabajo familiar y una alimentación basada en rastrojo de maíz, avena, alfalfa, granos y concentrados, presentando una producción media de 12 litros de leche diaria (Figueroa *et al.*, 2008). Este estudio refleja claramente la problemática de la región.

2.2. MASTITIS

2.2.1. Definición

La mastitis es una enfermedad que se define como la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria provocada en respuesta a alguna lesión y/o una infección de la misma, principalmente causada por bacterias (Strandberg *et al.*, 2005;

Gonzales, 2009; Zadoks *et al.*, 2011; Vakkamäki *et al.*, 2017). La mastitis bovina es una enfermedad importante en la ganadería lechera, y frecuentemente es causada por la infección de microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. aureus*. El padecimiento se clasifica de dos formas: clínica (normalmente presenta signos) y subclínica (curso generalmente sin signos visibles), en cada caso se manifiesta dependiendo del agente etiológico, el grado de infección y la respuesta inmune que genere el hospedero (Strandberg *et al.*, 2005; Gonzales, 2009). La principal causa de la enfermedad se encuentra estrechamente relacionada con prácticas inadecuadas de manipulación del ganado (Gonzales, 2009). Otros factores que afectan a los animales son la nutrición, el manejo durante el parto, la limpieza de los corrales y primordialmente el manejo durante el ordeño (Lutzow *et al.*, 2008; Gonzales, 2009).

Un método útil en el diagnóstico de la mastitis bovina es el conteo de células somáticas (CCS) presentes en la leche, encontrándose en mayor cantidad los neutrófilos en el cuarto mamario infectado (Strandberg *et al.*, 2005). El recuento de las CCS es proporcional al grado del daño del tejido mamario provocado por la infección bacteriana (Mol y Clegg, 2002). Las pruebas de rutina para detectar mastitis mediante el recuento de CCS, son la Prueba de Mastitis de California (CMT), la Prueba de mastitis Wisconsin y la Prueba de Whiteside (Polat *et al.*, 2010).

2.2.2. Salud Pública

La mastitis bovina constituye un problema para la Salud Pública. El uso ineficiente de los métodos de diagnóstico y antibióticos para el tratamiento de las vacas con mastitis puede llegar a provocar problemas graves en la salud humana. La leche obtenida de animales que den positivo a la pruebas de mastitis, y sean tratadas con productos farmacéuticos, debe ser eliminada con la finalidad de evitar su destino para el consumo humano.

El hallazgo de sustancias con actividad antimicrobiana en los productos lácteos, aún en concentraciones mínimas, puede favorecer el desarrollo de agentes patógenos con resistencia a antibióticos en los consumidores; además se ha comprobado que la leche ingerida en estas condiciones también puede generar una

toxicidad en los humanos (Figuerola *et al.*, 2008; Gonzales, 2009; Polat *et al.*, 2010). Asimismo, la presencia de antibióticos en la leche llega a afectar los procesos de fermentación durante la elaboración de algunos productos, inhibiendo el funcionamiento de los cultivos lácteos empleados principalmente en la fabricación de yogurt y quesos (Gonzales, 2009). Tras el empleo de fármacos en el ganado lechero se debe realizar un periodo de retiro o restricción para eliminar la leche, esto con el fin de evitar que se generen daños tanto en la salud de los consumidores como en la economía de la industria láctea (Gonzales, 2009).

Por otro lado, en las granjas lecheras donde hay ineficientes programas de control y prevención de la mastitis bovina, la leche proveniente de estas vacas puede contaminarse con bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma bovis* y *Staphylococcus aureus*; o con sus toxinas termostables, las cuales son capaces de soportar temperaturas altas que llegan hasta los 100°C. Su presencia tanto en la leche cruda y no pasteurizada como en los productos elaborados a partir de esta, puede causar infecciones e intoxicaciones alimentarias en los consumidores (Figuerola *et al.*, 2008; Gonzales, 2009).

La manera más efectiva y económica para controlar dichos riesgos, es la implementación de programas de buenas prácticas de higiene y sanidad durante los procedimientos operacionales estándar de sanitización como base para el sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos, como se dictamina en la Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. “Leche pasteurizada de vaca, disposiciones y especificaciones sanitarias”, restringiendo de esta forma la comercialización de la leche cruda y/o sus productos procesados (Figuerola *et al.*, 2008; Gonzales, 2009).

2.2.3. Etiología

En general, se sugiere que hay aproximadamente 140 microorganismos diferentes que causan mastitis bovina, los cuales se encuentran en los mismos animales, así como en su entorno (Nickerson, 2011). Sin embargo, los microorganismos que generalmente provocan infecciones intramamarias (IIM) son de origen bacteriano. Los principales microorganismos relacionados a la mastitis

bovina se clasifican como: (1) contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Mycoplasma bovis*), (2) medioambientales (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus ssp* y *Streptococcus uberis*), (3) oportunistas (*Staphylococcus*), y (4) hongos y levaduras (*Candida sp*, *Trichosporon sp*, *Saccharomyces sp* y *Aspergillus sp*) (Nickerson, 2011).

Dentro de esta gama de microorganismos, los agentes más comunes son bacterias patógenas, destacándose *E. coli*, la cual habitualmente genera una mastitis con manifestaciones de forma aguda y es reconocida de forma rápida por el sistema inmune, donde en ocasiones, la infección es eliminada dentro de pocos días (Strandberg *et al.*, 2005). En cambio, la mastitis provocada por infecciones con *S. aureus* frecuentemente se caracteriza por una respuesta inflamatoria disminuida acompañada de signos subclínicos, lo que en varias ocasiones conduce al estado crónico de la infección convirtiéndola en una enfermedad resistente a terapias antimicrobianas convencionales (Strandberg *et al.*, 2005; Löffler *et al.*, 2014).

2.2.4. Clasificación

La mastitis se clasifica en mastitis clínica y subclínica dependiendo de la intensidad de la respuesta de la glándula mamaria ante el factor causante del daño (Zadoks *et al.*, 2011). La mastitis clínica se caracteriza por signos exacerbados de inflamación como tumefacción, rubor, calor y dolor en la ubre; su principal agente causal es la bacteria *E. coli* (Strandberg *et al.*, 2005; Gonzales, 2009). La presencia de *E. coli* se asocia a las malas prácticas de higiene durante el ordeño del animal, los tratamientos se basan en la terapia antimicrobiana presentando una tasa de éxito alta en la mayoría de los casos (Barkema *et al.*, 2006). La leche refleja cambios en su composición afectando la calidad, presencia de sangre, coágulos y disminución dramática en su producción (Harmon, 1994).

En la mastitis subclínica el daño que genera la inflamación de la glándula mamaria no es visible, es decir, los signos de la inflamación están prácticamente ausentes. Las infecciones en este tipo de mastitis son recurrentes y persistentes provocando infecciones crónicas. El principal patógeno asociado a la mastitis

crónica es *S. aureus*, el cual es aislado en el 70% de los casos y está directamente relacionado a infecciones crónicas (Barkema *et al.*, 2006). Este patógeno presenta la capacidad de internalizarse en las células epiteliales mamarias bovinas, donde logra sobrevivir, replicarse y evadir la respuesta inmune innata (Strandberg *et al.*, 2005; McCarthy y Lindsay, 2013). Generalmente los tratamientos a base de antibióticos presentan una baja tasa de éxito, por lo cual, existe la necesidad de encontrar nuevas y potentes estrategias para que ayuden a controlar a esta bacteria (Julie *et al.*, 2016; Dutta y Das, 2016).

2.3. *Staphylococcus aureus*

2.3.1. Características

S. aureus es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Micrococcaceae*. Se encuentra en forma de “cocos” (de 0.5 a 15 μm de diámetro), que llegan a presentarse principalmente en grupos en forma de racimos (Franklin, 1998; Figueroa *et al.*, 2008). Son anaerobios facultativos, no esporulan, no móvil, catalasa positiva, oxidasa negativo y tiene una alta patogenicidad (Sutra y Poutrel, 1994; Franklin, 1998; Figueroa *et al.*, 2008). Esta bacteria se puede distinguir de otras especies de *Staphylococcus* por la formación de colonias de pigmentación dorada, además son positivas a la prueba de coagulasa, manitol, fermentación y desoxirribonucleasa (Franklin, 1998). Es un microorganismo natural de la piel y la mucosa epitelial de los mamíferos; sin embargo, en condiciones adecuadas causa infecciones graves y crónicas en humanos y animales (Sutra y Poutrel, 1994; McCarthy y Lindsay, 2013).

S. aureus posee estructuras que le permiten adaptarse a distintos ambientes. La cápsula es una estructura constituida de polisacáridos que recubre la pared celular favoreciendo la supervivencia del patógeno al interferir en la fagocitosis (Sutra y Poutrel, 1994; Franklin, 1998). La pared celular es otra estructura importante para su supervivencia, está compuesta de unidades de polisacáridos N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces tipo 1 $\rightarrow$ 4, formando así las cadenas de peptidoglicano. Esta capa de peptidoglicano representa el 50% de su peso total y los polisacáridos bacterianos pueden actuar como endotoxinas

(Franklin, 1998). Además, la pared celular contiene otras moléculas llamadas ácidos teicoicos, que se encuentran unidos al peptidoglicano por medio de enlaces covalentes. Los ácidos teicoicos son polímeros de fosfatos de glicerol y son los responsables de mantener unida la capa de peptidoglicano con la membrana citoplasmática. *S. aureus* también produce y secreta enzimas tales como coagulasas, lipasas, hialuronidasas y proteasas, además de toxinas (enterotoxinas, toxina de síndrome de choque tóxico, hemolisinas y leucocidinas) que le ayudarán al establecimiento de la infección (Figura 1) (Alva-Murillo *et al.*, 2014).

Otra característica que posee *S. aureus* es su genoma circular, este consta de aproximadamente 2,800 kb, donde se encuentran los genes de virulencia y la resistencia a antibióticos (Franklin, 1998).

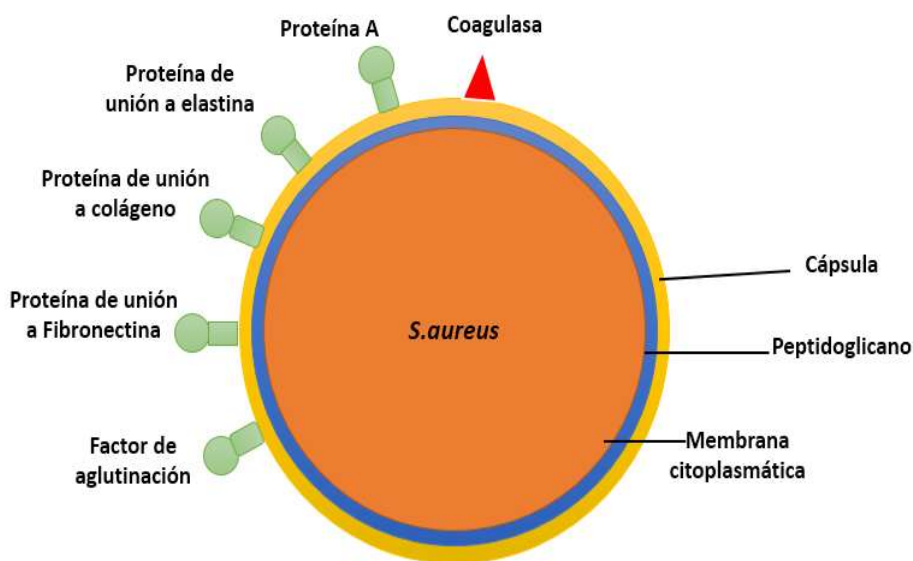


Figura 1. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*. La estructura de *S. aureus* se compone de diferentes secciones de la envoltura celular que cubren a la bacteria. La expresión de las proteínas de superficie es regulada por la fase de crecimiento bacteriano. La síntesis de estas proteínas es controlada por genes reguladores (Modificado de Franklin, 1998).

2.3.2. Respuesta de la glándula mamaria bovina durante la interacción con *Staphylococcus aureus*

La ubre bovina presenta diferentes niveles de defensa que le permiten mantener un ambiente interno aislado del exterior, la primera barrera de defensa es el canal del pezón, el cual es una válvula que mide 10 mm en promedio de longitud y un diámetro de 2 mm. Este canal además de secretar la leche, también actúa como una barrera de defensa contra las infecciones, al proteger la entrada de microorganismos a la glándula mamaria. Otra estructura anatómica, que está involucrada en la defensa, es la queratina del pezón derivada del epitelio escamoso estratificado, se encuentra en forma de red de malla, cuya función es sellar el canal del pezón (Viguiet *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos microorganismos patógenos logran sobrepasar esta barrera de defensa anatómica accediendo a través del conducto a la glándula mamaria (Mol y Clegg, 2002).

Los vasos sanguíneos que se encuentran situados en la pared de los pezones son otra estructura anatómica que influye en la defensa contra procesos patológicos. El suministro sanguíneo que aporta a los tejidos de la glándula mamaria ayuda al funcionamiento óptimo de todos los procesos relacionados en la resistencia a microorganismos (Mol y Clegg, 2002). Cuando se presenta el proceso de inflamación existe un incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y edema, lo que a su vez provocará un incremento del aporte de flujo sanguíneo, permitiendo una mejor migración de leucocitos al sitio de infección (Harmon, 1994). Además, la circulación sanguínea está relacionada con la apertura y cierre del canal del pezón durante el proceso de ordeño, una mala circulación sanguínea evita el cierre del canal del pezón entre los ordeños, influyendo así en el aumento de la contaminación externa de la ubre, y por lo tanto, el movimiento de los microorganismos oportunistas al conducto del pezón (Mol y Clegg, 2002).

Una vez que el patógeno entra por el canal del pezón y encuentra las condiciones ideales para establecerse en la glándula mamaria, se multiplica y daña a las células que recubren internamente los conductos lácteos, la cisterna y los alvéolos (Figura 2). Si la infección es persistente afecta el epitelio mamario ocasionando que los alvéolos de la glándula mamaria se dañen perdiendo integridad

anatómica, esto ocasionará que la barrera sangre-leche se rompa, dando como resultado un incremento en el pH, fluidos extracelulares (iones de cloruro, sodio e hidrogeno de potasio) y contenido de agua que cambian la calidad de la leche, y en algunos casos, varios componentes celulares como eritrocitos, coágulos y células muertas también logran pasar a la leche (Viguier *et al.*, 2009).

La respuesta inflamatoria constante de la glándula mamaria generará una inflamación externa de la ubre, presentándose los primeros signos de la infección en el animal (Viguier *et al.*, 2009). La probabilidad de que el animal se recupere depende de la respuesta inmunitaria por parte de éste, del patógeno y del tratamiento (Barkema *et al.*, 2006).

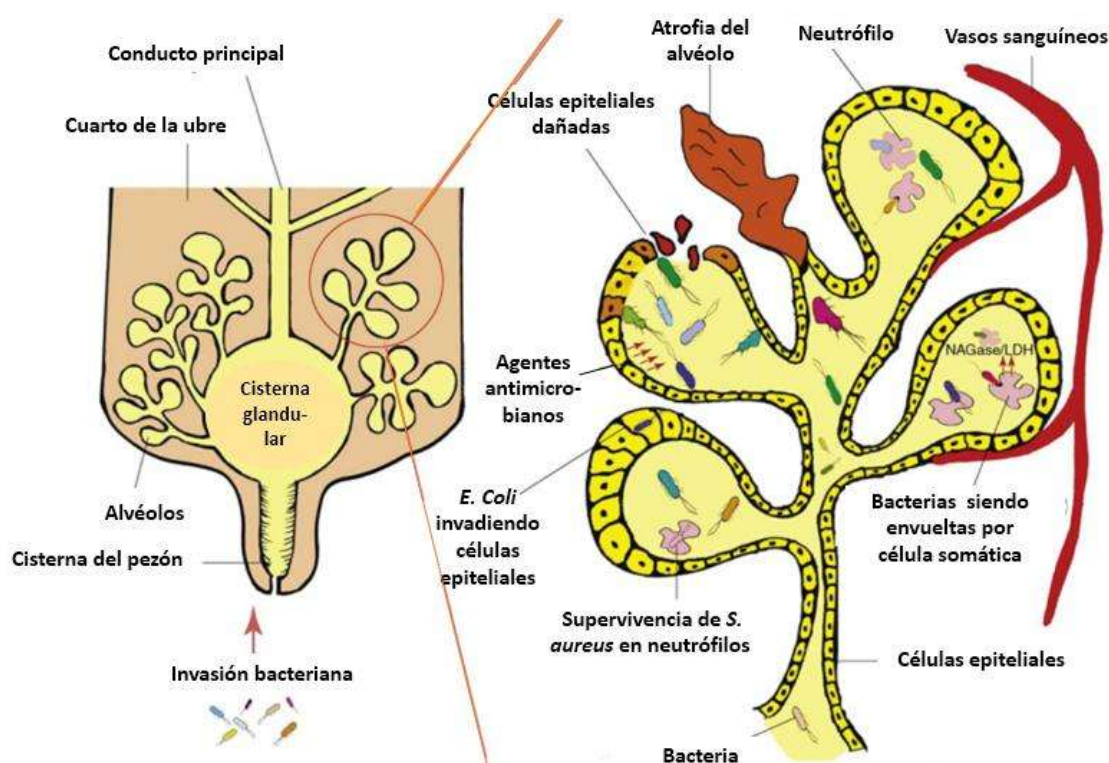


Figura 2. Mecanismo de entrada de los microorganismos a la glándula mamaria bovina. Los microorganismos invasores invaden el cuarto de la ubre a través del canal pezón para lograr la colonización y multiplicación en la cisterna glandular y los alvéolos. Las células epiteliales tienen una participación muy importante en la defensa ya que son grandes productoras de péptidos antimicrobianos y otros elementos de la respuesta inmune innata, los cuales reclutan células polimorfonucleares para eliminar la infección (Modificada de Viguier *et al.*, 2009).

2.4. INMUNIDAD INNATA

El sistema inmune de todos los organismos del hospedero protege del daño causado por agentes biológicos, químicos, físicos y/o mecánicos, para así mantener la homeostasis del organismo (Kim *et al.*, 2008; Quintin *et al.*, 2014). La respuesta del sistema inmune es muy compleja y presenta distintas etapas con la finalidad de eliminar al agente causal. En el caso de los vertebrados, la respuesta del sistema inmune se divide en dos elementos, en respuesta inmune innata (RII) y respuesta inmune adaptativa (Pasare y Medzhitov, 2004).

La RII es la primera línea de defensa frente a un daño, entre los componentes celulares que forman parte del sistema inmune innato se encuentran los fagocitos como granulocitos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (Natural Killer o NK), además, otros tipos celulares juegan un papel muy importante como las células endoteliales y células epiteliales, ya que logran secretar péptidos antimicrobianos, entre los que destacan las defensinas y las citocinas (Menendez y Finlay, 2007). Estas células reconocen un conjunto de estructuras moleculares específicas de los patógenos llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PMAPs) como el lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA) y ácidos nucleicos.

Los PMAPs son reconocidos por receptores celulares denominados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR). Una clase de estos receptores son los tipo Toll (TLRs) (Pasare y Medzhitov, 2004; Lutzow *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Dziarski y Gupta, 2017). Estos receptores desencadenan cascadas de señalización que llevan a la producción de elementos de la RII, como citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Las citocinas son moléculas pequeñas (4 a 10 kDa) de polipéptidos o glicoproteínas que tienen como función primordial la comunicación intercelular durante el proceso de la RII, entre otras actividades. Las citocinas involucran a las interleucinas (IL), factores de crecimiento mesenquimales, factores de crecimiento tumoral y adipocinas. Existen citocinas que tienen la capacidad de ejercer actividades proinflamatorias y antiinflamatorias, con la finalidad de generar un

balance entre los mediadores controlando la inflamación (Dinarello, 2007; Lawrence y Gilroy, 2007). Entre las citocinas proinflamatorias más estudiadas se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β), las cuales son activados en respuesta a la estimulación de los receptores TLRs desencadenada por los PAMPs (Beutler y Cerami, 1989). Sus funciones dentro de la RII es la de activar y amplificar la respuesta inflamatoria a través de la inducción de otras citocinas, por ejemplo la quimiocina IL-8, el reclutamiento de leucocitos y la activación de neutrófilos para fagocitar al agente invasor, degranulación y actividad oxidativa (Beutler y Cerami, 1989; Lawrence y Gilroy, 2007). Mientras que las citocinas antiinflamatorias, como la interleucina 10 (IL-10), actúa inhibiendo el proceso de inflamación, controlando de esta forma la respuesta de las citocinas proinflamatorias (Dinarello, 2007).

Las quimiocinas son una familia de proteínas pequeñas de 8 a 10 kDa que actúan principalmente como moléculas quimioatrayentes. Entre las quimiocinas con mayor interés de estudio es la IL-8 o CXCL8 de acuerdo a la familia perteneciente de las quimiocinas. La IL-8 es un polipéptido que se libera de forma abundante durante los procesos de la inflamación y se une a receptores acoplados a proteína G para iniciar cascadas de la respuesta inmune, actuando así, como activadores celulares para promover la migración celular de las células inmunes (Zlotnik, 2000).

Otros componentes que son parte fundamental de la RII son los péptidos antimicrobianos, ya que también actúan como moléculas efectoras en la respuesta inmune. Estas moléculas son secretadas por las células epiteliales en respuesta a la estimulación de microorganismos que invaden al hospedero con el objetivo de evitar la colonización microbiana (Dutta y Das, 2016; Zupin *et al.*, 2018). Las defensinas β , son péptidos producidos en diferentes regiones del hospedero como parte de esta estimulación, ejerciendo además de capacidades antimicrobianas, quimiotácticas, inmunomoduladoras y citotóxicas. Entre las defensinas β más estudiadas se encuentra la defensina β 1 bovina (DEFB1), la cual se ha reportado como producto principal de las células epiteliales de la glándula mamaria bovina,

tanto en condiciones normales como en respuesta a la infección por *E. coli* (Tetens *et al.*, 2010; Zupin *et al.*, 2018).

2.4.1. Respuesta inmune de la glándula mamaria bovina

En la glándula mamaria la RII juega un papel muy importante, principalmente las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) logran reconocer a las bacterias patógenas a través de los receptores TLRs. La estimulación de estos receptores provocará la producción y liberación de citocinas como TNF- α , las interleucinas IL-8 e IL-1, radicales de oxígeno, eicosanoides (ej. prostaglandina F2 α (PF2 α)), y proteínas de fase aguda (PFA) como haptoglobina (Hp) y amiloide sérica A (ASA) (Harmon, 1994; Pasare y Medzhitov, 2004; Viguier *et al.*, 2009).

Las citocinas y quimiocinas atraen a los leucocitos, principalmente células polimorfonucleares (PMN), al sitio de la infección del tejido mamario bovino de forma rápida. Estos leucocitos fagocitan y destruyen a las bacterias invasoras a través de sus gránulos localizados en su citoplasma que contienen péptidos bactericidas, enzimas como mielo-peroxidasa y proteasas neutras y ácidas tales como elastasa, catepsina G, catepsina B y catepsina D. Sin embargo, algunas CEMB se pueden dañar provocando una disminución en la producción de la leche y la liberación de enzimas, como la N-acetil-b-D-glucosaminidasa (NAGasa) y lactato deshidrogenasa (LDH), que a su vez afectarán la calidad de la leche (Viguier *et al.*, 2009).

Algunas bacterias como *S. aureus* logran evadir la respuesta inmune de la glándula mamaria a través de la internalización en las CMEB. Para que se lleve a cabo el proceso de internalización de *S. aureus* en las CEMB, la bacteria necesita adherirse a los componentes de la matriz extracelular a través de las interacciones de receptores llamadas “componentes de superficie microbiana de reconocimiento de moléculas adhesivas de la matriz (CSMRMAM)” (Cucarella, 2002; Alva-Murillo *et al.*, 2014; Sartori *et al.*, 2017). Estas interacciones le permiten a *S. aureus* interactuar con los receptores de la membrana celular de los epitelios llamados “integrinas” para facilitar su internalización mediante un mecanismo llamado “tipo zipper”. Una vez que se internaliza la bacteria, esta logra sobrevivir dentro de las

CEMB durante grandes periodos de tiempo provocando infecciones crónicas (Alva-Murillo *et al.*, 2014).

2.5. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

2.5.1. Definición

Los péptidos antimicrobianos son moléculas anfipáticas, evolutivamente conservados, son sintetizados por todos los organismos vivos, incluyendo vertebrados, invertebrados, plantas e inclusive por las mismas bacterias. Su principal función es de defensa; sin embargo, algunos péptidos presentan efectos biológicos como la neutralización de endotoxinas, actividades similares a las quimiocinas, propiedades inmunomoduladoras y la estimulación de angiogénesis durante la reparación de heridas (Hancock, 1997; Guaní *et al.*, 2010; Zouhir *et al.*, 2016; Dutta y Das, 2016; Santoro *et al.*, 2017). Actualmente se han descrito ~2,900 PA de diferentes orígenes (bacterias, arqueas, protistas, hongos, plantas y animales) reportados en la página “The Antimicrobial Peptide Database” (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.) (Wang *et al.*, 2016).

2.5.2. Clasificación

Los PA se clasifican en cuatro grupos por la composición de sus aminoácidos, tamaño y estructuras conformacionales y por su actividad: 1) péptidos con estructura hélices α ; 2) estructura hoja β (con múltiples puentes de disulfuro); 3) estructura hélice extendida (poli-hélices, ricos en glicina, prolina, triptófano, arginina y/o histidina); y 4) estructuras de bucle (con un solo puente de disulfuro) (Figura 3) (Guaní *et al.*, 2010; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Dutta y Das, 2016). Además, los PA también se han clasificado en diferentes familias dentro del reino de los mamíferos con base en su estructura y a sus diferentes funciones, designándose como defensinas y catelicidinas, principalmente (Dutta y Das, 2016; Farkas *et al.*, 2017; Gwyer *et al.*, 2013).

Las defensinas son péptidos catiónicos, anfipáticos, estructuradas en triple cadena de hoja β y constituidas aproximadamente por 30 residuos de aminoácidos. Además, estos se subdividen en grupos: α , β y θ (Dutta y Das, 2016; Gwyer *et al.*,

2013). Las α y β , comparten la misma conformación de estar en hoja β -plegada antiparalela; sin embargo, difieren en la organización de los tres enlaces de disulfuro que las confieren. En cambio, las θ defensinas son péptidos circulares y cortos con una serie de enlaces de disulfuro en el péptido maduro, el cual proporciona una mayor estabilidad (Dutta y Das, 2016). La familia de las catelicidinas está conformada por un dominio cathelin conservado y una región C-terminal, el cual, produce un péptido maduro. Se han identificado aproximadamente 35 miembros de las catelicidinas en diferentes especies de mamíferos. En los humanos, se ha encontrado únicamente la expresión de una catelicidina, nombrada “LL-37”, mientras que en otros mamíferos, se ha reportado una gran variedad de catelicidinas (Dutta y Das, 2016; Gwyer *et al.*, 2013).

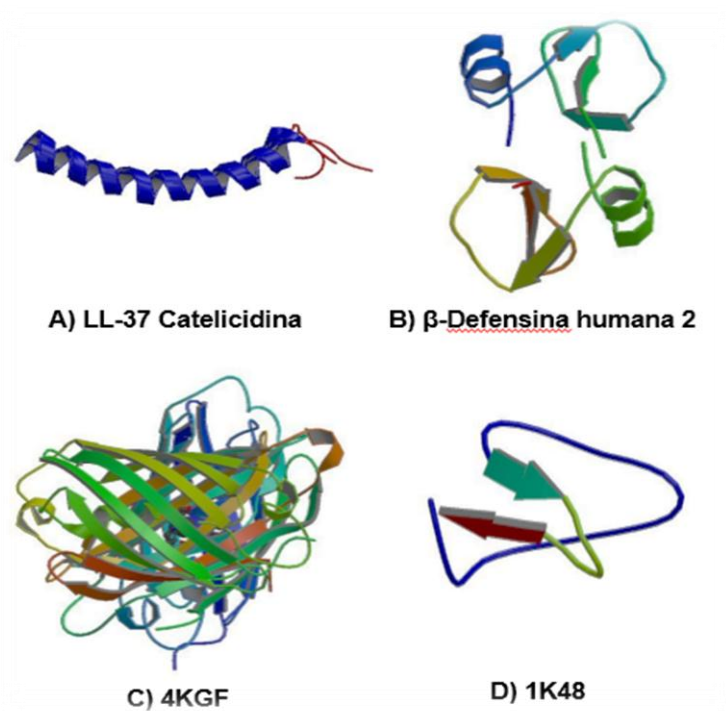


Figura 3. Principales estructuras de péptidos antimicrobianos. A) Estructura hélice α ; B) Estructura Hoja β ; C) Estructura hélice extendida; D) Estructura de bucle. Protein Data Bank (PDB).

Una fuente importante de PA son de origen vegetal. Los PA de plantas son moléculas pequeñas catiónicas con una masa de 2 a 10 kDa, llegan a tener de cuatro y hasta doce residuos de cisteína, formando puentes de disulfuro, lo que les

confiere estabilidad estructural. Además llegan a presentar actividad antifúngica y antibacteriana (Barbosa *et al.*, 2011; Stotz *et al.*, 2013).

Los PA de plantas se han clasificado en 12 familias tomando en cuenta la identidad de secuencia de aminoácidos, el número y la posición de cisteínas que forman los puentes de disulfuro (Díaz, 2015; Farkas *et al.*, 2017). Entre los PA de plantas más estudiados se encuentran las siguientes familias: a) defensinas, b) tioninas y c) ciclótidos. Algunos PA de plantas han demostrado tener propiedades citotóxicas contra células cancerosas. Las defensinas se expresan en toda la planta e incluso desde el estado de germinación (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

Además de los PA encontrados en la naturaleza, en la actualidad se están diseñando PA sintéticos bajo diferentes estrategias, una es a través del diseño basado en PA naturales que puedan tener nuevas aplicaciones o blancos biológicos. Otra estrategia son los PA naturales modificados en algunos residuos de aminoácidos o en su sitio activo con la finalidad de mejorar su eficacia (Dutta y Das, 2016).

Todos los PA aislados de una fuente natural no han demostrado ser económicamente viables para su producción en grandes cantidades, con excepción de las polimixinas y gramicidinas, los cuales son productos de fermentación natural (Hancock, 1997). A pesar de que este tipo de péptidos reflejan una actividad antimicrobiana débil en condiciones fisiológicas, tienen una participación importante en la modulación de la respuesta inmune innata (Hancock y Sahl, 2006).

2.5.3. Mecanismos de acción

Independientemente de su clasificación los PA comparten una característica, la cual es que logran dañar y matar a los microorganismos extraños para el hospedero (bacterias Gram-positivas y negativas, virus y hongos) (Dutta y Das, 2016; Farkas *et al.*, 2017).

Un mecanismo de acción general mediante el cual los PA catiónicos pueden ejercer su acción es la interacción con la membrana bacteriana debido a la afinidad por la bicapa de fosfolípidos aniónicos. La unión entre el PA y la membrana produce

la formación de poros transitorios provocando la salida de componentes intracelulares y un daño en el potencial eléctrico de la membrana bacteriana. Este mecanismo se conoce comúnmente como “modelo de palo de barril” y es el más aceptado (Figura 4); sin embargo, en la mayoría de los casos los PA llegan a provocar la lisis de la bacteria debido al aumento de la permeabilidad y choque osmótico. En las bacterias Gram-negativas, los PA se unen con mayor frecuencia a las cabezas de fosfolípidos cargados negativamente en la membrana bacteriana (Guaní *et al.*, 2010), mientras que en las Gram-positivas, los PA se adhieren a los ácidos teicóicos localizados en la pared celular de estas bacterias (Gwyer *et al.*, 2013).

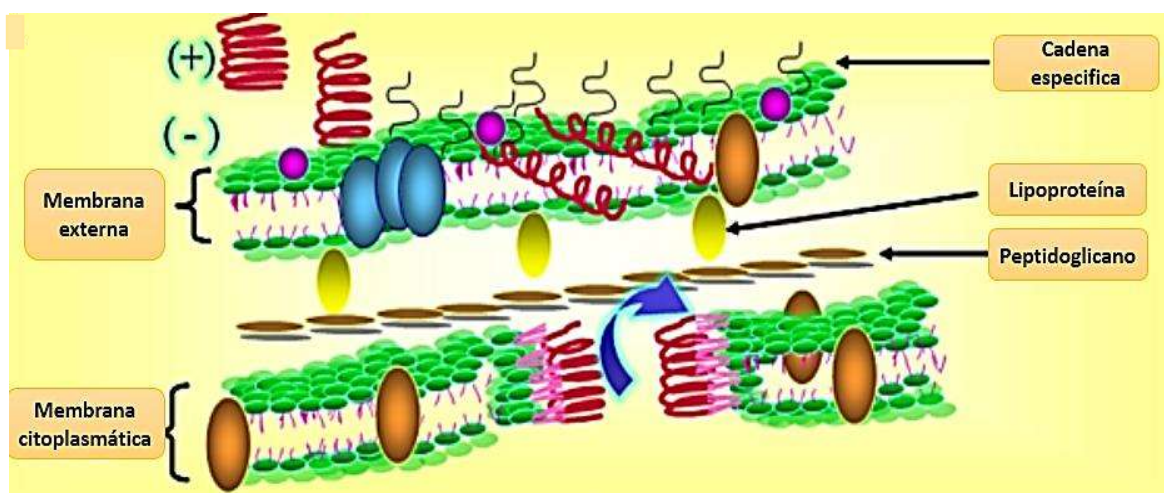


Figura 4. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos a través del “modelo de barril”. Los péptidos con carga positiva (indicados de color rojo) se unen a la membrana celular con carga negativa para insertarse en el núcleo hidrofóbico de la membrana bacteriana formando un poro, y consecuentemente la fuga de material citoplasmático y muerte celular (Guaní *et al.*, 2010).

Una vez que los PA se encuentran dentro de la célula, pueden tener múltiples objetivos como son los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, e inhibir la síntesis de DNA, RNA, o síntesis de la pared celular bacteriana. Generalmente, los objetivos de los PA abarcan la DNA girasa, la proteína de choque térmico DnaK, el precursor del peptidoglicano lípido II y la ATPasa (Farkas *et al.*, 2017).

2.5.4. Propiedades inmunomoduladoras

Una de las propiedades más interesantes de los PA es su actividad inmunomoduladora, ya que es de los primeros mecanismos que realizan durante la defensa del hospedero previo a sus mecanismos de actividad antimicrobiana (Guaní *et al.*, 2010). No obstante, son pocos los reportes que se pueden encontrar de los efectos inmunomoduladoras de los PA, a continuación, en la tabla 1 se muestran algunos ejemplos:

Tabla 1. Ejemplos de péptidos antimicrobianos de origen animal que participan en la modulación de la respuesta inmune innata en modelos de mamíferos.

FACTOR	ORIGEN	FUNCIONES	REFERENCIA
PR-39	Cerdo doméstico	El péptido maduro induce la producción de IL-8 en macrófagos de cerdo, mientras que los péptidos cortos derivados de PR-39 inducen la producción de TNF- α	Veldhuizen <i>et al.</i> , 2014
CATH-2	Gallina	El péptido completo CATH-2 y sus derivados de la porción N-terminal inducen la expresión de CXCLi2/IL-8, MCP-3, CCLi4/RANTES y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos de gallina (MPC-1). Sin embargo, también inhibe la producción de TNF- α , IL-6, IL-8 y IL-10; mientras que sus análogos inhiben IL-1 β	Van Dijk <i>et al.</i> , 2016

En el caso de los mamíferos, las dos principales familias de péptidos que ejercen propiedades inmunomoduladoras son las defensinas y las catelicidinas, además de actuar como un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Guaní *et al.*, 2010; Gwyer *et al.*, 2013). Entre las actividades inmunomoduladoras de las catelicidinas está su acción quimiotáctica directa sobre los monocitos, neutrófilos y linfocitos T CD4+, a través de la estimulación del

receptor formilpeptídico 1 (FPRL-1) acoplado a proteínas G, lo que a su vez induce la transcripción y liberación de quimiocinas como IL-8. Además, este péptido estimula a los mastocitos para que liberen histamina y provocar el aumento de la permeabilidad vascular con la finalidad de favorecer una mejor infiltración de neutrófilos a los tejidos inflamados (Guaní *et al.*, 2010).

En el caso de las defensinas de origen animal, estas tienen la capacidad de ser quimiotácticas en diferentes tipos de células, tales como monocitos, linfocitos T y células dendríticas. En el caso de las α -defensinas las HNP-1, HNP-2 y HNP-3 inducen quimiotaxis en células T y células dendríticas. Asimismo, la HNP-2 estimula la desgranulación de los mastocitos por una vía dependiente de la fosfolipasa C, mediante la participación de otra proteína G. Por otro lado, las β -defensinas inducen la producción de una gran variedad de citocinas, como proteína 3- α inflamatoria de macrófagos (PIM-3), IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α y la proteína inducible por interferón (Guaní *et al.*, 2010).

Al igual que los mamíferos, las plantas expresan PA que tienen efectos antimicrobianos e inmunomoduladores como mecanismo de defensa en respuesta a la invasión de fitopatógenos (Anaya-López *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2011; Sagrero Cisneros, 2013). Algunos PA de plantas han demostrado tener actividad inmunomoduladora contra bacterias patógenas de mamíferos, como por ejemplo *S. aureus* (Barbosa *et al.*, 2011; Sagrero Cisneros, 2013; Díaz-Murillo *et al.*, 2016). La defensina γ -tionina de *Capsicum chinense*, por ejemplo, es capaz de modular la RII de CEMB a través de la inducción de la expresión del RNAm de citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (~ 14 y ~ 8 veces, respectivamente) antes y después de la infección por *S. aureus*, y la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (~ 12 veces). Además, γ -tionina es capaz de activar el receptor de membrana TLR2 y su abundancia a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$, confiriéndoles una mejor defensa a las CEMB. En este sentido, también se reportó la producción de óxido nítrico (NO) antes de la infección y la secreción del péptido antimicrobiano endógeno DEFB1 después de la infección (Díaz-Murillo *et al.*, 2016).

Asimismo, se ha reportado una tionina llamada Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana*, el cual realiza funciones inmunomoduladoras diferentes en la RII de CEMB. En las CEMB pre tratadas con Thi2.1 incrementa la expresión de TNF- α e IL-6 (~ 2 y ~ 7 veces, respectivamente), mientras que reduce la expresión de IL-10 (~ 0.5 veces). Y en condiciones de infección, este PA reduce la expresión de IL-6 e IL-10 así como la producción de NO. Sin embargo, fue capaz de inducir la expresión de TNF- α (~ 10 veces) e IL-8 (~ 3 veces) en estas mismas condiciones (Báez-Magaña *et al.*, 2018).

2.5.5. Defensina PaDef

El PA PaDef es una defensina aislada del fruto del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), este se encuentra clasificado dentro de la familia de las defensinas de plantas tipo 1. Tiene un cDNA de 249 pb que codifica para una proteína de 78 aminoácidos (5.2 kDa). Contiene un péptido señal de 31 aminoácidos que al eliminarse produce un péptido maduro de 47 aminoácidos. Posee 8 cisteínas que forman 4 puentes de disulfuro y los motivos CS $\alpha\beta$ y núcleo- γ (relacionado con su actividad antifúngica) siguiendo un patrón de $\beta\alpha\beta\beta$, característico de las defensinas (Figura 5) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Además, PaDef posee actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. coli*; sin embargo, no se ha reportado su actividad antifúngica. Por otro lado, PaDef presentó actividad citotóxica en células de cáncer de mama y leucemia mediante la inducción de apoptosis (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

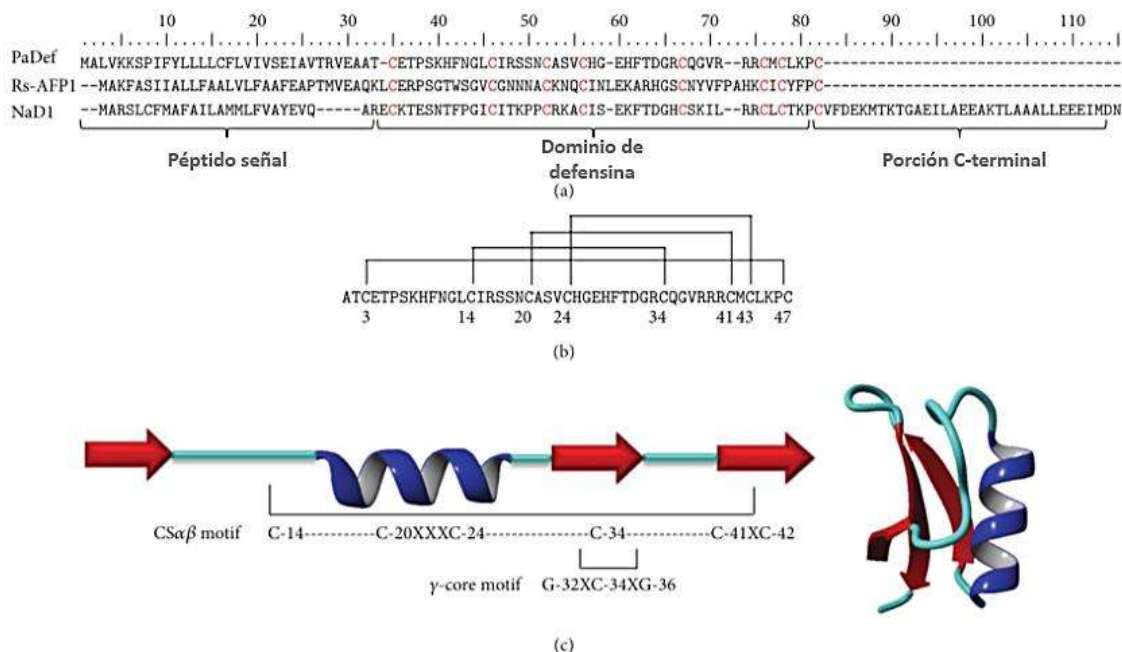


Figura 5. Características de la defensina PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*). (a) Alineación de la defensina PaDef con la defensina holotipo tipo 1 (*R. sativus* Rs-AFP1) y la defensina holotipo tipo 2 (*N. alata* NaD1). En rojo se encuentran las 8 cisteínas conservadas. (b) Se aprecia los puentes de disulfuro de PaDef. (c) Estructura del péptido PaDef. En el lado izquierdo se muestra la estructura secundaria con el motivo característico CSαβ y el núcleo-γ de las defensinas. Las flechas rojas indican las hojas β. En el lado derecho se muestra el modelo tridimensional de la defensina PaDef (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Previamente en nuestro grupo de trabajo se evaluó el efecto del PA γ -tionina de chile habanero (químicamente sintetizado) sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB y se reportó que en la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó la internalización de *S. aureus* en las CEMB hasta un 50%. Al analizar los elementos de la respuesta inmune innata de estas células se observó que γ -tionina induce la expresión de genes que codifican para las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (~14 y 8 veces, respectivamente), y antiinflamatorias como IL-10 (~12 veces) antes y después de la infección, y la abundancia del receptor TLR2 en la membrana de las CEMB (~3 veces), además de la producción y secreción de DEFB1 durante la infección (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Un resultado similar se obtuvo al evaluar el efecto del PA Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata sobre las mismas CEMB infectadas con

S. aureus. Thi2.1 demostró tener capacidad de inhibir la internalización de *S. aureus* de un 25 hasta un 50%, respectivamente. Con respecto a la RII se observó que induce la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (~2 y ~7 veces, respectivamente) y reduce la citocina antiinflamatoria IL-10 (~0.5 veces) antes de la infección, mientras que después de la infección, induce la expresión de IL-8 (~3 veces) y TNF- α (~10 veces); al igual que reduce la expresión de IL-6 e IL-10; la producción de NO y la expresión del gen TLR2 y su abundancia en la membrana (Báez-Magaña *et al.*, 2018). Además de estos dos PA, la defensina PaDef obtenida del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) mostró actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo, no existen reportes sobre la actividad inmunomoduladora de esta defensina en el modelo de interacción CEMB-*S. aureus*.

4. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad que afecta con mayor frecuencia al ganado lechero en México y en el mundo, debido a la reducción en la producción y aprovechamiento de la leche, así como también en la inversión del costo de tratamientos prolongados, lo que resulta en elevadas pérdidas económicas (Viguiet *et al.*, 2009). *S. aureus* es el principal agente causal de mastitis bovina subclínica, y en la mayoría de los casos, cursa hacia el estado crónico (Sutra y Poutrel, 1994). Actualmente, el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos convencionales, ha provocado la aparición de cepas resistentes. Consecuentemente se buscan tratamientos alternativos contra la enfermedad (Figueroa *et al.*, 2008; García, 2009; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013; Sartori *et al.*, 2017).

En este sentido, se han reportado evidencias sobre los efectos biológicos que tienen los PA, entre los cuales se destaca sus efectos inmunomoduladores en la RII. Por esta razón, los PA se han propuesto como candidatos atractivos para fines terapéuticos en la resolución de problemas que afectan la salud de los animales con finalidad zootécnica (Guaní *et al.*, 2010; Striz *et al.*, 2014). Sin embargo, existen pocas evidencias sobre las propiedades inmunomoduladoras de PA de plantas en un modelo de mamífero.

La defensina γ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) y Thi 2.1 de *Arabidopsis thaliana*, por ejemplo, han demostrado tener efectos inmunomoduladores sobre la RII de células epiteliales mamarias bovinas, además de disminuir la internalización de *S. aureus* y ejercer actividades antimicrobianas frente a bacterias patógenas. Es por ello que en este trabajo se analizó las propiedades inmunomoduladoras del PA PaDef de aguacate sobre CEMB infectadas con *S. aureus*, las cuales, son células que se encuentran en contacto íntimo con una amplia variedad de microorganismos invasores (Díaz-Murillo *et al.*, 2016).

5. HIPÓTESIS

La defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) regula diferencialmente la expresión de genes de la respuesta inmune innata en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.

6. OBJETIVOS

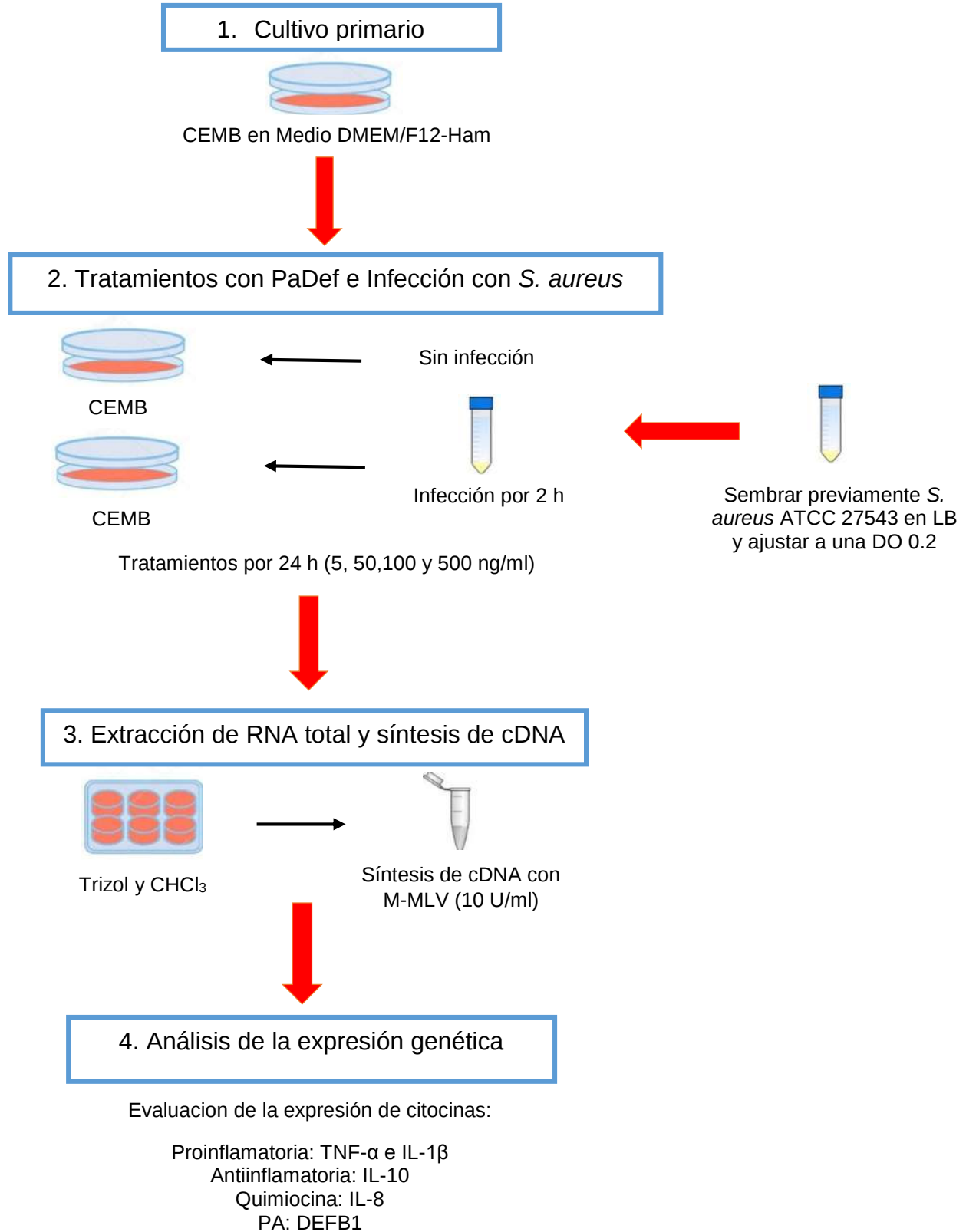
6.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la defensina PaDef sobre la expresión de genes de la RII en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.

6.2. Objetivo específico

1. Evaluar la expresión de genes de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-10, IL-8) y péptidos antimicrobianos (DEFB1) en CEMB tratadas con la defensina PaDef y/o infectadas con *Staphylococcus aureus*.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Cultivo celular

Se utilizó un cultivo primario de células epiteliales mamarias bovinas (CMEB), aisladas del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes (Anaya-López *et al.*, 2006). Para este trabajo se utilizaron células de pasajes 4 y 5. Las CEMB se cultivaron en cajas Petri con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/mL, Corning), 10 µg/mL hidrocortisona (Sigma), 10 µg/mL de insulina (Sigma), 250 ng/mL de anfotericina B (Invitrogen) y pH 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Para los ensayos con *S. aureus* las CEMB se cultivaron en medio sin antibióticos durante 24 h antes de llevar a cabo los tratamientos.

8.2. La defensina PaDef

El péptido antimicrobiano que se utilizó en este trabajo contempla la región madura (47 aa) del péptido PaDef del aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), el cual fue sintetizado químicamente y obtenido de BIOMATIK. El rango de concentraciones que se utilizaron fue de 5-100 ng/ml. Se utilizó como control el vehículo (DMSO 0.02%) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016).

8.3. *Staphylococcus aureus* ATCC 27543

Se utilizó una cepa de *S. aureus* ATCC 27543 aislada de un caso de mastitis clínica con capacidad de internalizarse en células de epitelio mamario bovino. La bacteria se creció en caldo Luria Bertani (LB) por 14 a 18 h a 37°C en agitación. Posteriormente el cultivo bacteriano se ajustó a una DO₆₀₀ = 0.2 equivalente a 9.2x10⁷ UFC/ml.

8.4. Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Se extrajo el RNA total de las células usando Trizol (Invitrogen), el cual se utilizó para sintetizar el DNA complementario (cDNA). La reacción de transcripción reversa se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 25 µg/ml de Oligo d(T)15-18 (Invitrogen) y 10 mM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a

65°C por 5 minutos e inmediatamente fue transferido en hielo. Se añadió 4 µl de First Strand Buffer 5X (Invitrogen), ditiotritol 10 mM e inhibidor de RNasa 2 U/µl (Invitrogen) y se incubó a 37°C por 2 minutos. Finalmente se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/µl, Invitrogen) y se incubó a 37°C por 50 minutos, seguido de 15 minutos a 70°C para inactivar la reacción. Además, se amplificó el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para verificar la integridad del RNA y la eficiencia de la RT-PCR. El cDNA se utilizó para establecer los niveles de expresión de genes representativos de la inmunidad innata mediante reacciones de PCR en punto final y tiempo real (qPCR).

8.5. Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune innata

Para analizar los niveles de RNAm, se utilizaron oligonucleótidos específicos para los genes que codifican IL-1 α , TNF- α , IL-10, IL-8 y DEFB1 bovina (Tabla 2). La cuantificación relativa de la expresión de los genes TNF- α e IL-10 se realizó con el método Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) con 0.9 pmol/ml de cada oligonucleótido, 250 ng de cDNA y agua grado biología molecular. Para la cuantificación de la expresión de los genes IL-1 α , IL-8 y DEFB1 bovina se utilizó el método de PCR punto final. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel agarosa 1.5% (0.45 g de agarosa, 30 ml de buffer TBE 1X y 0.75 µl de SYBR green). Una vez finalizada la corrida, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se tomó un registro fotográfico. Posteriormente se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de los genes por densitometría con el software ImageJ. Como control se usó el gen endógeno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH bovino).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el análisis de la expresión de genes de la RII en las CEMB.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón	Referencia
IL-1 β	Directo	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG	52	198 pb	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
	Reverso	CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA			
TNF- α	Directo	5'-CCCCTGGAGATAACCTCCCA- 3'	55.5	101 pb	Mookherjee <i>et al.</i> , 2006
	Reverso	5'-CAGACGGGAGACAGGAGAGC- 3'			
IL-10	Directo	5'-GATGCGAGCACCTGTCTGA- 3'	59	129 pb	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
	Reverso	5'-GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT- 3'			
IL-8	Directo	5'- TTCCACACCTTTCCACCCCAA- 3'	53.5	149 pb	Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2014
	Reverso	5'- GCACAACCTTCTGCACCCACTT- 3'			
DEFB1	Directo	CCATCACCTGCTCCTCACA	54	185 pb	Akers, 2006
	Reverso	ACCTCCACCTGCAGCATT			
GAPDH	Directo	5'- TCAACGGAAGCTCACTGG -3'	56.9	237 pb	Yonezawa <i>et al.</i> , 2008
	Reverso	5'- CCCCAGCATCGAAGGTAGA -3'			

IL-1 β : Interleucina 1 β ; TNF- α : Factor de necrosis tumoral α ; IL-10: Interleucina 10; IL-8: Interleucina 8; DEFB1: Defensina beta 1 bovina; GAPDH; Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

8.6. Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos de dos experimentos independientes y muestran el promedio de triplicados. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de *t* de Student, y los resultados fueron reportados con la media $\pm$ EE. Los valores de *P* $\leq$ 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

9.1. Procedimientos previos a la cuantificación de la expresión de genes

Para la evaluación del efecto inmunomodulador de la defensina PaDef se colocaron diferentes tratamientos (5, 50, 100 y 500 ng/ml) durante 24 h a las CEMB infectadas (2 h) y no infectadas con *S. aureus*. Como control se utilizó a las CEMB sin PaDef y sin infección. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del RNA total. En la figura 6 se muestra el corrimiento electroforético del RNA total obtenido de todas las condiciones evaluadas. Se observa que el RNA fue de buena calidad ya que se observan claramente las bandas representativas de los RNA ribosomales 18S y 28S.

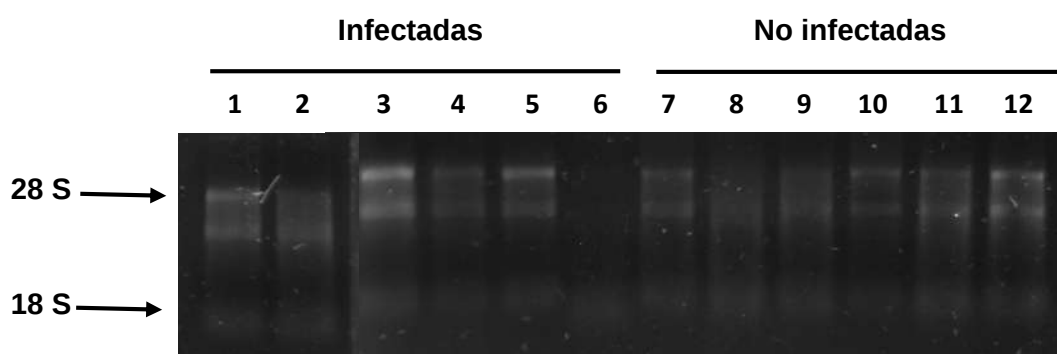


Figura 6. Integridad del ARN total de CEMB tratadas con PaDef, extraído a las 24 h después de emplear el tratamiento. 1: CEMB; 2: CEMB + Vehículo; 3: CEMB + 5 ng/ml; 4: CEMB + 50 ng/ml; 5: CEMB + 100 ng/ml; 6: CEMB + 500 ng/ml; 7: CEMB + *S. aureus*; 8: CEMB + Vehículo + *S. aureus*; 9: CEMB + *S. aureus* + 5 ng/ml; 10: CEMB + *S. aureus* + 50 ng/ml; 11: CEMB + *S. aureus* + 100 ng/ml; 12: CEMB + *S. aureus* + 500 ng/ml; y (-): control negativo (agua). El vehículo usado fue DMSO a 0.02%.

Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA a partir del RNA total extraído de las CEMB y se analizó la expresión de genes representativos de la RII para determinar el efecto de PaDef sobre éstos.

9.2. Efecto de PaDef sobre la expresión de TNF- α en las CEMB

En la figura 7 se muestran los resultados relacionados con la expresión del RNAm de TNF- α . Se observó que los tratamientos de PaDef no afectaron los niveles de expresión del RNAm de TNF- α en las CEMB, excepto a la concentración de 100 ng/mL, donde se mostró una reducción de ~0.4 veces, mientras que en las CEMB infectadas se indujo la expresión de TNF- α (~2.3 veces). Sin embargo, PaDef (100 ng/ml) disminuyó la inducción provocada por la infección para esta citocina (~0.4 veces). El resto de las condiciones se mantuvo sin modificación.

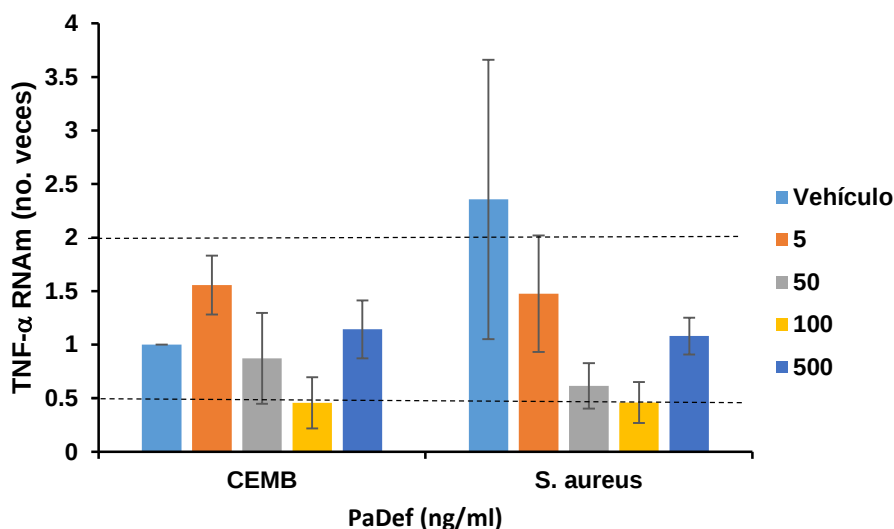


Figura 7. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de TNF- α en las CEMB. Las CEMB fueron tratadas con 5, 50, 100 y 500 ng/ml de PaDef por 24 h y la expresión fue analizada por RT-qPCR. La gráfica muestra el efecto sobre la expresión del gen TNF- α en CEMB no infectadas (izquierda) e infectadas con *S. aureus* por 2 h (derecha). La expresión relativa se determinó utilizando como gen endógeno GAPDH. Cada barra representa el promedio de 2 experimentos por triplicado $\pm$ EE. Los valores mayores de 2 veces o menores de 0.5 veces se consideraron significativos. El vehículo usado fue DMSO a 0.02%.

9.3. Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-10 en las CEMB

Al analizar el efecto de PaDef sobre la expresión del gen IL-10, se observó que las concentraciones de 100 ng/ml y 500 ng/ml de PaDef incrementaron la expresión de IL-10 (~36 veces y ~25 veces, respectivamente), aunque en el resto de las condiciones no se observaron cambios significativos. En el caso de las CEMB infectadas con *S. aureus*, la bacteria no modificó la expresión. Sin embargo, en

presencia de la bacteria PaDef a 50 y 500 ng/ml mantuvo una inducción de la expresión de IL-10 (~7.2 y 2.3 veces, respectivamente), pero esta fue menor que la mostrada antes de la infección (Figura 8).

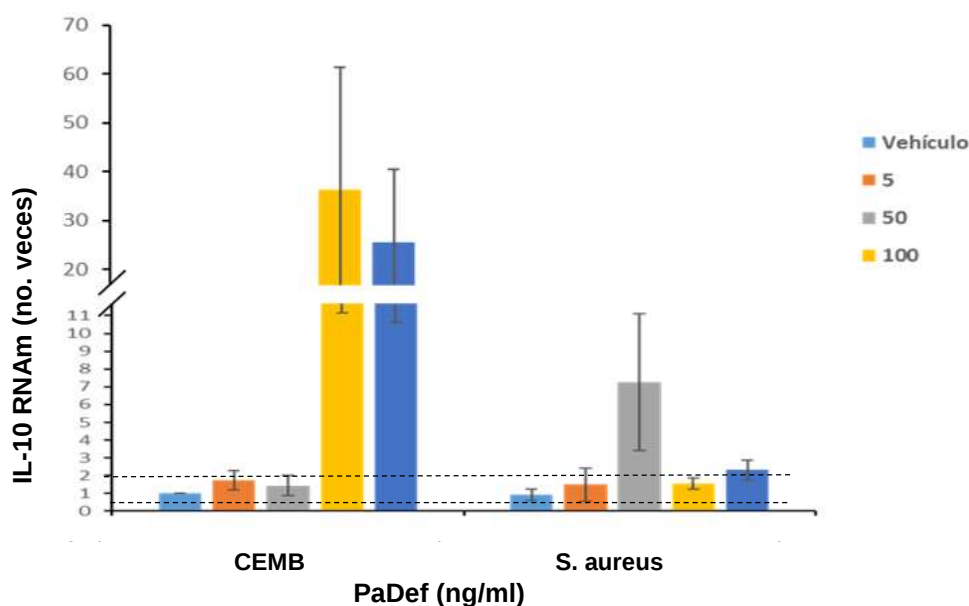


Figura 8. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de la IL-10 en las CEMB. Las CEMB fueron tratadas con 5, 50, 100 y 500 ng/ml de PaDef por 24 h y la expresión fue analizada por RT-qPCR. La gráfica muestra el efecto sobre la expresión del gen IL-10 en CEMB no infectadas (izquierda) e infectadas con *S. aureus* por 2 h (derecha). La expresión relativa se determinó utilizando como gen endógeno GAPDH. Cada barra representa el promedio de 2 experimentos por triplicado $\pm$ EE. Los valores mayores de 2 veces o menores de 0.5 veces se consideraron significativos. El vehículo usado fue DMSO a 0.02%.

9.4. Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-8 en las CEMB

En la figura 9 se muestra el efecto de PaDef sobre la expresión de la quimiocina IL-8. Se observó que el péptido no modificó la expresión de esta quimiocina, estos resultados fueron obtenidos por PCR semicuantitativa.

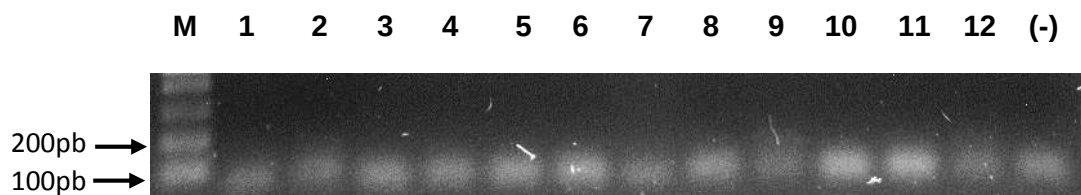
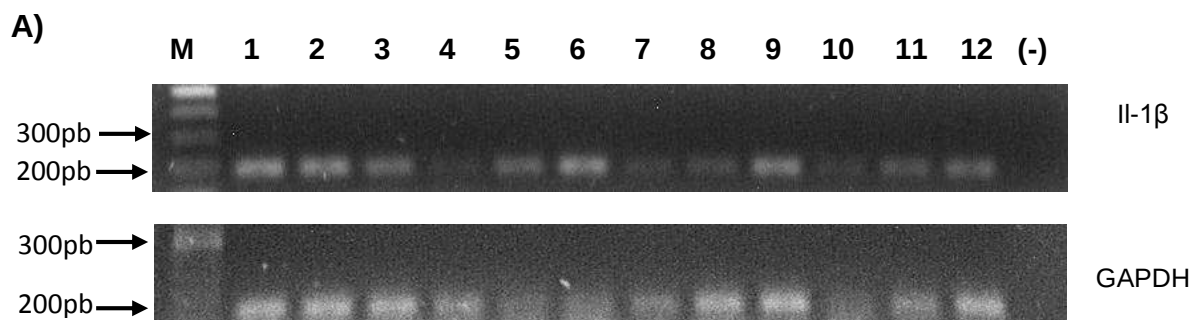


Figura 9. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de la IL-8 en las CEMB. Las CEMB fueron tratadas con PaDef a 24 h. Para el análisis de PCR semicuantitativo, primeramente, se realizó una PCR en punto final y se capturó la imagen en el fotodocumentador (Kodak Gel Logic 100 System), el análisis densitométrico se realizó usando el software ImageJ. Las condiciones analizadas fueron las siguientes: M: Marcador 1 kb DNA plus ladder; 1: CEMB; 2: CEMB + Vehículo; 3: CEMB + 5 ng/ml; 4: CEMB + 50 ng/ml; 5: CEMB + 100 ng/ml; 6: CEMB + 500 ng/ml; 7: CEMB + *S. aureus*; 8: CEMB + Vehículo + *S. aureus*; 9: CEMB + *S. aureus* + 5 ng/ml; 10: CEMB + *S. aureus* + 50 ng/ml; 11: CEMB + *S. aureus* + 100 ng/ml; 12: CEMB + *S. aureus* + 500 ng/ml y (-): control negativo (agua). El vehículo usado fue DMSO a 0.02%.

9.5. Efecto de PaDef sobre la expresión de IL-1 β en las CEMB

También se analizó la expresión de la citocina proinflamatoria IL-1 β . De acuerdo al análisis se observó que PaDef a 50 ng/ml disminuyó la expresión de esta citocina (~ 0.2 veces), en comparación con las células control, la cual no fue modificada aun cuando las células se infectaron (Figura 10). En el resto de las condiciones no se modificó la expresión de IL-1 β (Figura 10).



B)

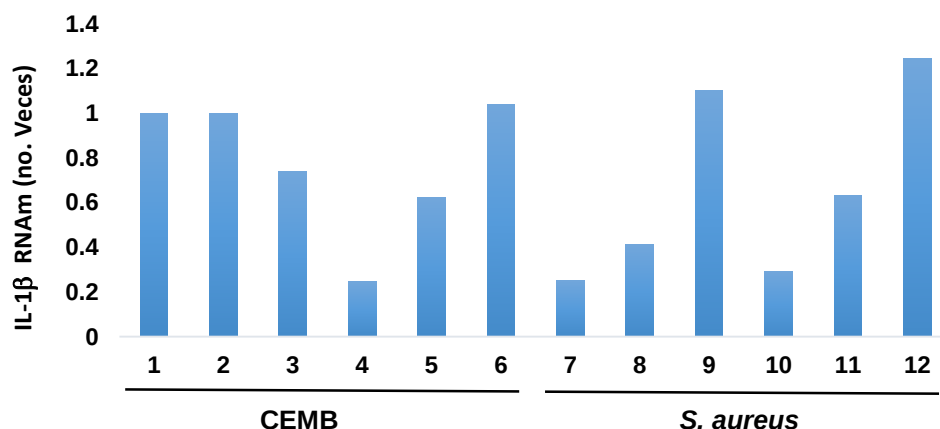


Figura 10. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del RNAm del gen de la IL-1β en las CEMB.

A) Las CEMB fueron tratadas con PaDef a 24 h. Para el análisis de PCR semicuantitativo, primeramente, se realizó una PCR en punto final y se capturó la imagen en el fotodocumentador (Kodak Gel Logic 100 System). **B)** Análisis densitométrico de la expresión relativa de IL-1β con respecto a la expresión de GAPDH usando el software ImageJ. Los resultados representan al estudio por densitometría de 1 experimento. El vehículo usado fue DMSO a 0.02%. 1: CEMB; 2: CEMB + Vehículo; 3: CEMB + 5 ng/ml; 4: CEMB + 50 ng/ml; 5: CEMB + 100 ng/ml; 6: CEMB + 500 ng/ml; 7: CEMB + *S. aureus*; 8: CEMB + Vehículo + *S. aureus*; 9: CEMB + *S. aureus* + 5 ng/ml; 10: CEMB + *S. aureus* + 50 ng/ml; 11: CEMB + *S. aureus* + 100 ng/ml; 12: CEMB + *S. aureus* + 500 ng/ml; y (-): control negativo (agua).

9.6. Efecto de PaDef sobre la expresión de DEFB1 en las CEMB

Además, se analizó el efecto de PaDef sobre la expresión del PA defensina 1 bovina (DEFB1). Los resultados mostraron un efecto concentración dependiente, en el cual a mayor concentración de PaDef se incrementó la expresión de DEFB1, observando que en la concentración de 500 ng/ml de PaDef la inducción de la expresión fue de ~2.3 veces. Por otro lado, en las CEMB infectadas no se observó una relación dependiente de la concentración; sin embargo, PaDef (500 ng/ml) indujo la expresión hasta ~4.4 veces (Figura 11). Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para determinar si resultados son significativos.

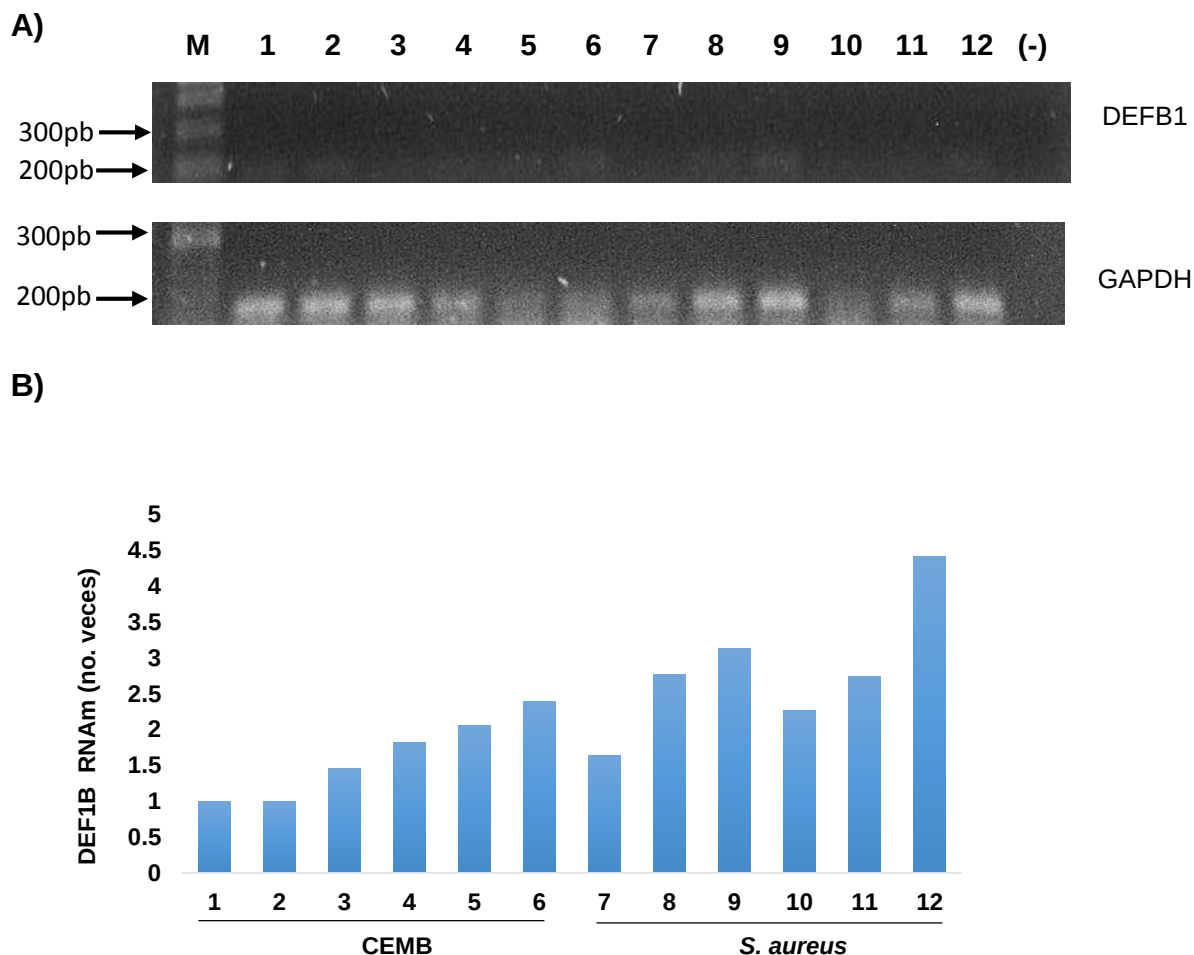


Figura 11. Efecto del PA PaDef sobre la expresión del gen DEFB1 en las CEMB. **A)** Las CEMB fueron tratadas con PaDef a 24 h. Para el análisis de PCR semicuantitativo, primeramente, se realizó una PCR en punto final y se capturó la imagen en el fotodocumentador (Kodak Gel Logic 100 System). **B)** Análisis densitométrico de la expresión relativa de DEFB1 con respecto a la expresión de GAPDH usando el software ImageJ. Los resultados representan al estudio por densitometría de 1 experimento. El vehículo usado fue DMSO a 0.02%. 1: CEMB; 2: CEMB + Vehículo; 3: CEMB + 5 ng/ml; 4: CEMB + 50 ng/ml; 5: CEMB + 100 ng/ml; 6: CEMB + 500 ng/ml; 7: CEMB + *S. aureus*; 8: CEMB + Vehículo + *S. aureus*; 9: CEMB + *S. aureus* + 5 ng/ml; 10: CEMB + *S. aureus* + 50 ng/ml; 11: CEMB + *S. aureus* + 100 ng/ml; 12: CEMB + *S. aureus* + 500 ng/ml; y (-): control negativo (agua).

10. DISCUSIÓN

Durante los últimos años, la mastitis bovina se ha caracterizado por ser la enfermedad más común y de mayor importancia económica en las granjas lecheras a nivel mundial. La economía del sector lechero se ve afectada considerablemente debido a la disminución de la producción de leche, así como su aprovechamiento, el alto costo de antibióticos para el tratamiento de los animales, el periodo de producción, el sacrificio de vacas con infecciones crónicas, e incluso penalizaciones en la calidad de la leche (Seegers *et al.*, 2003; Vakkamäki *et al.*, 2017).

S. aureus es uno de los principales patógenos causantes de mastitis bovina, el cual tiene la capacidad de invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales mamarias bovinas, generando una inflamación moderada, que puede desarrollarse de forma crónica y subclínica (Strandberg *et al.*, 2005). Debido a esta problemática en la búsqueda de nuevas terapias alternativas se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos de origen vegetal. Dentro de las actividades de los PA de origen vegetal en la planta está la defensa, mientras que en otros organismos se han descrito diferentes propiedades como lo es la actividad antimicrobiana contra bacterias entre ellas *S. aureus*, hongos y levaduras, además se ha reportado que presentan actividad inmunomoduladora y citotóxica en células de mamífero (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013; Sagrero Cisneros, 2013; Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Por esta razón, se ha considerado a los PA de plantas como candidatos potenciales para mejorar el funcionamiento de la RII, controlando de esta forma las enfermedades infecciosas (Finlay y Hancock, 2004).

Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo han demostrado los efectos inmunomoduladores en el modelo de mastitis bovina de dos péptidos antimicrobianos de origen vegetal, el primer PA reportado es una defensina que se encuentra en el chile habanero (*Capsicum chinense*) llamada γ -tionina, y el segundo PA es obtenido de *Arabidopsis thaliana*, una pequeña planta originaria de Eurasia y África muy utilizada en la investigación de la biología de las plantas, este PA es una tionina llamada Thi2.1. En ambos PA se demostró que son capaces de inhibir la internalización de *S. aureus* en CEMB de un 25 hasta un 50%, respectivamente.

Además, se reportó la capacidad de regular la expresión de genes de la RII (citocinas, quimiocinas, y PA antes y después de la infección con *S. aureus*) (Díaz-Murillo *et al.*, 2016; Báez-Magaña *et al.*, 2018). En este sentido, la defensina PaDef del fruto de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) ha demostrado tener actividades antimicrobianas, antifúngicas y citotóxicas sobre líneas celulares cancerosas (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconocen las actividades inmunomoduladoras que podría ejercer sobre un modelo mamífero.

En este trabajo se evaluó el efecto de PaDef (5- 500 ng/mL) sobre la capacidad inmunomoduladora en las CEMB infectadas con *S. aureus*. Para lo cual, primero se analizó que en las concentraciones elegidas no se presentara actividad citotóxica contra las CEMB y antimicrobiana contra *S. aureus*. Además, se demostró que la concentración de 100 ng/ml disminuyó la internalización de *S. aureus* hasta un 50% (datos no publicados). Al comparar el rango de concentración utilizado para PaDef en este trabajo con los datos del PA γ -tionina (100 ng/ml) en el mismo modelo, se observó que la concentración a la cual disminuyó la internalización es la misma. Estos resultados pueden ser atribuidos a la naturaleza similar entre ambas defensinas, ya que son PA catiónicos con cargas eléctricas similares, PaDef tiene una carga neta de +4.17, mientras que γ -tionina posee una carga de +5.99. Cabe destacar que en ambas defensinas la concentración en la cual se presenta el efecto es baja, esto puede ser atribuido a que la estructura de las defensinas de plantas es muy similar a las de mamíferos; mientras que al comparar el efecto con el péptido Thi2.1 (5 μ g/ml) en el mismo modelo la dosis fue 50 veces mayor, posiblemente este efecto se puede atribuir a la diferencia estructural que presentan las tioninas con respecto a las defensinas (Díaz-Murillo *et al.*, 2016; Báez-Magaña *et al.*, 2018).

La respuesta inmune innata es la primera barrera de defensa de los organismos, en ella participan diferentes elementos como son las citocinas y quimiocinas, estas son proteínas pequeñas cuyas funciones son actuar como moléculas proinflamatorias, antiinflamatorias y quimiotácticas, entre otras. Dentro de las citocinas proinflamatorias la citocina más representativa es TNF- α . En este

trabajo se observó que en las CEMB tratadas con PaDef (100 ng/ml) la expresión de TNF- α mostró una disminución de ~ 0.4 veces y se mantuvo después de la infección, mientras que en el resto de las condiciones no se mostró ningún cambio significativo. Estos resultados son opuestos a los reportados para la defensina γ -tionina (100 ng/ml) en el mismo modelo de mastitis bovina, en el cual se reportó que este PA incrementó la expresión de TNF- α hasta 14 veces manteniendo el efecto después de la infección (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Sin embargo, en el mismo modelo, pero tratando a las CEMB con la tionina Thi2.1 se reportó que disminuyó la expresión de TNF- α hasta 0.4 veces antes y después de la infección (Báez-Magaña *et al.*, 2018). Por otra parte, se reportó que ratones tratados con la β defensina-3 humana (hBD3) y estimulados con LPS (*in vitro* e *in vivo*) mostraron una disminución de la producción de TNF- α , por lo que se propuso que el PA hBD3 presenta una actividad antiinflamatoria potencial (Semple *et al.*, 2010).

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria que forma parte de la RII. En las CEMB PaDef (50 ng/ml) disminuyó la expresión de IL-1 β (~ 0.2 veces). En el caso de la defensina γ -tionina (100 ng/ml) esta incrementó significativamente la expresión del gen IL-1 β (~ 8 veces), mientras que después de la infección γ -tionina incrementó la expresión de IL-1 β en todas las concentraciones probadas (0.005 a 10 μ g/ml). (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). A pesar de que γ -tionina incrementó los niveles de expresión de IL-1 β , no todo el RNAm que se transcribe es necesariamente traducido, ya que están controlados por los mecanismos de regulación postranscripcional y postraducciona, lo que puede retardarlos o incluso impedir la secreción de la proteína (Alva-Murillo *et al.*, 2012). PaDef parece ejercer un efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión de IL-1 β , incluso aún en presencia de la infección en las CEMB; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para determinar los niveles de proteína secretada. Interesantemente, en ambos péptidos (PaDef y γ -tionina) la concentración de 100 ng/ml reguló la expresión de TNF- α e IL-1 β antes y después de la infección, y en ambos PA esta es la concentración en la que se observó que la internalización disminuyó significativamente.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que ayuda a mantener el equilibrio en la respuesta inflamatoria. Interesantemente PaDef (100 y 500 ng/ml) indujo la expresión de IL-10 en las CEMB (~36 veces y ~7.2 veces, respectivamente), este efecto se mantuvo aún en las CEMB infectadas ya que la expresión de IL-10 se incrementó a 50 y 500 ng/ml (~7.2 y 2.3 veces, respectivamente). Esto coincide con lo reportado por Díaz-Murillo y col. (2016), donde se demostró que el PA γ -tionina promueve la expresión de IL-10 a 100 ng/ml en las CEMB antes de la infección con *S. aureus*, la cual se incrementa hasta ~12 veces. En cambio, el PA Thi2.1 disminuyó la expresión de esta citocina (0.5 veces) antes y después de la infección (Báez-Magaña *et al.*, 2018).

Por otro lado, PaDef no modificó la expresión del gen de la IL-8, antes y después de la infección. Estos resultados reflejan que PaDef podría no tener efecto sobre gen de IL-8. De la misma forma, Díaz-Murillo y col. (2016) reportaron que la defensina γ -tionina no modificó la expresión de IL-8 en las CEMB antes de la infección, excepto a 100 ng/ml, donde se redujo la expresión; pero en las CEMB infectadas con *S. aureus*, solo se mostró una reducción a 100 ng/ml y 5 μ g/ml de γ -tionina.

Los péptidos antimicrobianos juegan un papel importante como mediadores de la respuesta inmune innata. Se ha reportado que en bovinos se encuentra un repertorio diverso de genes de defensinas (Meade *et al.*, 2014). Respecto a la expresión de los péptidos antimicrobianos se analizó la defensina que contribuye con la RII bovina, la defensina beta 1 bovina (DEFB1). En el tratamiento de las CEMB con PaDef se observó que se induce la expresión del gen DEFB1 en todas las concentraciones, siendo mayor el efecto en el tratamiento de 500 ng/ml (~2.3 veces); incluso después de la infección con *S. aureus* se aumentó su expresión (~4.4 veces). Estos resultados coinciden con el efecto reportado de γ -tionina sobre la secreción de la molécula DEFB1 en el mismo modelo de interacción hospedero-patógeno. En las CEMB se detectaron bajos niveles de secreción de DEFB1, pero este se incrementó significativamente a 0.1 y 5 μ g/ml en las células infectadas (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). De la misma forma, otras investigaciones han reportado una

expresión basal de péptidos antimicrobianos tanto en cultivos celulares como en modelos *in vivo* (parénquima de la glándula mamaria bovina) en ausencia de bacterias patógenas. Sin embargo, la expresión de defensinas, entre ellas la DEFB1, se incrementa en el parénquima de la glándula mamaria bovina en infecciones crónicas causadas por *Staphylococcus* coagulasa-positiva o coagulasa-negativa (Ko *et al.*, 2014). Con estos resultados se propone que PaDef ejerce una función inmunomoduladora en presencia de *S. aureus*.

Finalmente, de acuerdo a los resultados de este trabajo se establece que PaDef en el modelo de interacción patógeno-hospedero utilizado regula la expresión de varios elementos de la RII (a excepción de IL-8). En este sentido, PaDef podría favorecer la respuesta de la glándula mamaria bovina en presencia de agentes patógenos que generen un daño agudo como crónico, lo que soporta la propuesta de evaluar a los PA como moléculas alternativas para el tratamiento de la mastitis bovina.

11. CONCLUSIÓN

La defensina PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) modula diferencialmente la expresión de los genes de las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 y el péptido antimicrobiano bovino DEFB1 en las células de epitelio mamario bovino antes y después de la infección con *S. aureus*, mostrando así potenciales efectos inmunomoduladores.

12. REFERENCIAS

Akers, R. M. (2006). "Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy Cows." *Journal of Dairy Science* 89(4): 1222–1234.

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

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

Alva-Murillo, N., J. E. López-Meza and A. Ochoa-Zarzosa (2014). "Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization." *BioMed Research International* 2014: 1-9.

Anaya-López, J. L., J. E. López-Meza, V. M. Baizabal-Aguirre, H. Cano-Camacho and A. Ochoa-Zarzosa (2006)a. "Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells." *Biotechnology Letters* 28(14): 1101–1108.

Anaya-López, J. L., O. E. Contreras-Guzmán, A. Cáramez-Trejo, V. M. Baizabal-Aguirre, J. E. López-Meza, J. J. Valdez-Alarcón and A. Ochoa-Zarzosa, (2006)b. "Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis." *Research in Veterinary Science* 81(3):358–361.

Báez-Magaña, M., V. Díaz-Murillo, J. E. López-Meza and A. Ochoa-Zarzosa (2018). "Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells." *International Immunopharmacology* 57: 47–54.

Barbosa, P. P., R. P. del Sarto, O. Silva, O. Franco and M. Grossi (2011). "Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work." *Biochemistry Research International* 2011: 1-9.

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

Beutler, B. and A. Cerami (1989). "The biology of cachectin/tnf- a primary mediator of the host response." *Annual Reviews Immunology* (December): 625-655.

Cucarella, C., M. Á. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, Í. Lasa, T. J. Foster and J. R. Penadés (2002). "Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process." *Infection and Immunity* 70(6): 3180–3186.

Díaz-Murillo, V., I. Medina-Estrada, J. E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa (2016). "Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization." *Peptides* 78: 109–118.

Díaz Murillo, V. (2015). "Efecto inmunomodulador de péptidos antimicrobianos de plantas en células de mamífero infectadas con *Staphylococcus aureus*." (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.

Van, D. A., M. Eldik, E. J. Veldhuizen, H. L. Bokhoven, M. de Zoete, F. Bikker and H. Haagsman (2016). "Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides." *PLOS ONE* 11(2): 1–16.

Dinarello, C. A. (2007). "Historical review of cytokines." *European Journal of Immunology* 37(Suppl 1): S34–S45.

Dutta, P. and S. Das (2016). "Mammalian antimicrobial peptides: Promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16(1): 99–129.

Dziarski, R. and D. Gupta (2017). "How innate immunity proteins kill bacteria and why they are not prone to resistance." *Current Genetics Springer Berlin Heidelberg* 2017.

Farkas, A., G. Maróti, A. Kereszt and É. Kondorosi (2017). "Comparative analysis of the bacterial membrane disruption effect of two natural plant antimicrobial peptides." *Frontiers in Microbiology* 8(Jan): 1–12.

Figueroa, P. G. y J. L. Bedolla (2008). "Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California." *Revista Electrónica de Veterinaria* 1695-7504 IX(10): 1–34.

Finlay, B. B. and R. Hancock (2004). "Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?" *Nature Reviews Microbiology* 2(6): 497–504.

Flores-Alvarez, L. J., J. J. Guzmán-Rodríguez, R. López-Gómez, R. Salgado-Garciglia, A. Ochoa-Zarzosa and J. E. López-Meza (2018). "PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 99: 10–18.

Franklin, D. L. M. (1998). "*Staphylococcus aureus* Infections." *The New England Journal of Medicine* 339: 520-532.

García P. R. (2009). "Diagnóstico microbiológico y cultivo de *Mycoplasma bovis* en vacas lecheras con mastitis". (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". División regional de ciencia animal. Torreón, Coahuila, México.

Gonzales, J. (2009). "Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de leche bovina." *Senascia* 1: 1–112.

Guaní, E., T. Mendoza, S. O. Reyes and L. M. Terán (2010). "Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease." *Clinical Immunology* 135(1): 1–11.

Guzmán-Rodríguez, J. J., R. López-Gómez, L. M. Suárez-Rodríguez, R. Salgado-Garciglia, L. C. Rodríguez-Zapata, A. Ochoa-Zarzosa and J. E. López-Meza (2013). "Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*." *BioMed Research International* 2013: 1-9.

Guzmán-Rodríguez, J. J., A. Ochoa-Zarzosa, R. López-Gómez and J. E. López-Meza (2015). "Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents." *BioMed Research International* 2015(1): 1-11.

Guzmán-Rodríguez, J. J., R. López-Gómez, R. Salgado-Garciglia, A. Ochoa-Zarzosa and J. E. López-Meza (2016). "The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7." *Biomedicine & Pharmacotherapy* SAS 82: 620–627.

Gwyer, F., S. Currie and D. Davidson (2013). "Cationic host defence peptides: Potential as antiviral therapeutics." *BioDrugs* 27(5): 479–493.

Hancock, R. E. (1997). "Peptide antibiotics." *Lancet* 349(9049): 418–422.

Hancock, R. E. and H. G. Sahl (2006). "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies." *Nature Biotechnology* 24(12): 1551–1557.

Harmon, R. J. (1994). "Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts." *Journal of Dairy Science* 77(7): 2103–2112.

Herron, O., J. R. Fitzgerald, J. M. Musser and V. Kapur (2007). "Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*." *PLOS ONE* 2(10):1-13.

Julie, C. G., E. Brouillette, N. Obradović, C. Ster, B. G. Talbot and F. Malouin (2016). "Characterization of a *vraG* mutant in a genetically stable *Staphylococcus aureus* small-colony variant and preliminary assessment for use as a live-attenuated vaccine against intramammary infections." *PLOS ONE* 11(11): 1–23.

Kim, I. K., D. Bedi, C. Denecke, X. Ge and S. G. Tullius (2008). "Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance." *Transplantation* 86(7): 889–894.

Kościuczuk, E., P. Lisowski, J. Jarczak, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski and E. Bagnicka (2014). "Expression patterns of β -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*." *BMC Veterinary Research*: 10:246.

Lawrence, T. and D. W. Gilroy (2007). "Chronic inflammation: A failure of resolution?" *International Journal of Experimental Pathology* 88(2): 85–94.

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

Löffler, B., L. Tuchscher, S. Niemann and G. Peterset (2014). "*Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes." *International Journal of Medical Microbiology* 304(2): 170–176.

Mccarthy, A. J. and J. A. Lindsay (2013). "*Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study." *Infection, Genetics and Evolution* 19: 7–14.

Meade, K. G., P. Cormican, F. Narciandi, A. Lloyd and C. O'Farrelly (2014). "Bovine β -defensin gene family: Opportunities to improve animal health?" *Physiological Genomics* 46(1): 17–28.

Menendez, A. and B. Finlay (2007). "Defensins in the immunology of bacterial infections." *Current Opinion in Immunology* 19(4): 385–391.

Mol J. A. and C. 2002. *Biology of the mammary gland*. Ed. Board. New York, United States of America. p. 1-314.

Mookherjee, N., H. Wilson, S. Doria, Y. Popowych, R. Falsafi, J. Yu, Y. Li, S. Veatch, F. M. Roche, K. L. Brown, F. S. Brinkman, K. Hokamp, A. Potter, L. A. Babiuk, P. J. Griebel and R. E. Hancock (2006). "Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide." *Journal of Leukocyte Biology* 80(6): 1563–1574.

Nickerson S. C. 2002. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Ed. Elsevier Science. Virginia, United States of America. p. 408–414.

Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity." *Microbes and Infection* 6(15): 1382–1387.

Polat, B., A. Colak, M. Cengiz, L. E. Yanmaz, H. Oral, A. Bastan, S. Kaya and A. Hayirli (2010). "Sensitivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows." *Journal of Dairy Science* 93(8): 3525–3532.

Quintin, J., S. Cheng, J. Meer and M. Netea (2014). "Innate immune memory: Towards a better understanding of host defense mechanisms." *Current Opinion in Immunology* 29: 1–7.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2016). "Panorama de la leche en México." Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: 1-9.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2018). "Ganadería a la mexicana." SAGARPA. Disponible en : <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/ganaderia-a-la-mexicana>.

Sagrero Cisneros, E. (2013). "Modulación de la respuesta inmune innata de células de mamífero por los medios condicionados que contienen los péptidos antimicrobianos Thi2 . 1 de *Arabidopsis thaliana* y γ -tionina de *Capsicum chinense*." (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.

Santoro, D., K. Ahrensa, R. Vesnya, C. Navarrob, H. Gattoc and R. Marsellaa (2017). "Evaluation of the in vitro effect of Boldo and Meadowsweet plant extracts on the expression of antimicrobial peptides and inflammatory markers in canine keratinocytes." *Research in Veterinary Science* 115(December 2016): 255–262.

Sartori, C., R. Boss, I. Ivanovic and H. U. Graber (2017). "Development of a new real-time quantitative PCR assay for the detection of *Staphylococcus aureus* genotype B in cow milk, targeting the new gene adlb." *Journal of Dairy Science*: 100(10): 7834-7845.

Secretaría de Economía (2012). "Análisis del Sector Lácteo en México." Secretaría de Economía: 1–29. Disponible en: http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/inform

acionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf.

Seegers, H., C. Fourichon and F. Beaudeau (2003). "Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds Henri." *Saudi Medical Journal* 35(9): 1143–1146.

Semple, F., S. Webb, H. Li, H. B. Patel, M. Perretti, I. J. Jackson, M. Gray, D. J. Davidson and J. R. Dorin (2010). "Human β -defensin 3 has immunosuppressive activity *in vitro* and *in vivo*." *European Journal of Immunology* 40(4): 1073–1078.

Stotz H. U., F. and K. 2013. *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. Ed. Springer Basel. Wuerzburg, Germany. p. 29–52.

Strandberg, Y., C. Gray, T. Vuocolo, L. Donaldson, M. Broadway and R. Tellam (2005). "Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells." *Cytokine* 31(1): 72–86.

Striz, I., E. Brabcova, L. Kolesar and A. Sekerkova (2014). "Cytokine networking of innate immunity cells: A potential target of therapy." *Clinical Science* 126(9): 593–612.

Sutra, L. and B. Poutrel (1994). "Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*." *Journal of Medical Microbiology* 40(2): 79–89.

Tetens, J., J. J. Friedrich, A. Hartmann, M. Schwerin, E. Kalm and G. Thaller (2010). "The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder." *Journal of Dairy Science* 93(2): 775–783.

Vakkamäki, J., S. Taponen, A. Heikkilä and S. Pyörälä (2017). "Bacteriological etiology and treatment of mastitis in finnish dairy herds." *Acta Veterinaria Scandinavica* 59(1): 1-33.

Veldhuizen, E. J., V. A. Schneider, H. Agustindari, A. V. Dijk, J. L. Bokhoven, F. J. aBikker and H. P. Haagsman (2014). "Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides." *PLOS ONE* 9(4): 1–7.

Viguier, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck and R. O’Kennedy (2009). “Mastitis detection: Current trends and future perspectives.” *Trends in Biotechnology* 27(8): 486–493.

Wang, G., X. Li and Z. Wang (2016). “APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education.” *Nucleic Acids Research* 44(D1): D1087–D1093.

Yonezawa, T., S. Haga, Y. Kobayashi, K. Katoh and Y. Obara (2008). “Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367(4): 729–735.

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

Zlotnik, A. and D. Rossi (2000). “The biology of the chemokines and their receptors.” *Annual Review of Entomology* 47(1): 917–949.

Zouhir, A., A. Nefzi, J. B. Hamida and K. Sebei (2016). “Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by antimicrobial peptides (AMPs) and plant essential oils.” *Pharmaceutical Biology* 54(12): 3136–3150.

Zupin, L., F. Celsib, M. Brescianib, E. Orzanc, D. L. Grassoc and S. Crovella (2018). “Human beta defensin-1 is involved in the susceptibility to adeno-tonsillar hypertrophy.” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 107(February): 135–139.