



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

“Análisis de la regulación epigenética inducida por prolactina y 17 β -estradiol durante la infección con *Staphylococcus aureus* en un modelo *in vitro* de mastitis bovina”

TESIS

Para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias Biológicas
Opción Biotecnología Molecular

Presenta:
M.C. Marco Antonio Barajas Mendiola

Directora:
Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Co-director:
Dr. Joel Edmundo López Meza

Sinodales:
Dra. María de la Luz Torner Aguilar
Dra. Ma Soledad Vázquez Garcidueñas
Dra. Patricia Nayeli Alva Murillo

Morelia, Michoacán, Septiembre 2023

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y el Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de Investigación Científica (14.1), CONACyT (CB-2016-287210) y la beca con número de registro 743402 para estudios de Posgrado otorgada por CONAHCyT.

Contenido

	Página
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Abreviaturas	vi
I. Resumen	1
II. Abstract	3
III. Introducción	5
3.1 La mastitis bovina	5
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3.2.1 Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
3.2.2 Mecanismos de infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3 Respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina	11
3.3.1 Participación de las células epiteliales mamarias en la inmunidad innata	14
3.3.2 Participación de macrófagos en la inmunidad innata	16
3.4 Relación ente las infecciones intramamarias y el estado fisiológico y reproductivo de los bovinos	17
3.4.1 Prolactina	18
3.4.2 Estrógenos y el 17β-estradiol	21
3.4.3 Efecto inmunomodulador de la prolactina	24
3.4.4 Efecto inmunomodulador del 17β-estradiol	26
3.5 Epigenética	27
3.5.1 Mecanismos epigenéticos relacionados con prolactina y 17β-estradiol	31
3.5.2 Mecanismos epigenéticos relacionados a enfermedades infecciosas	32
3.6. Antecedentes	34
IV. Justificación	37
V. Hipótesis	38

VI. Objetivo	39
6.1 Objetivo general	39
6.2 Objetivos específicos	39
VII. Estrategia experimental	40
VIII. Resultados	42
8.1 Capítulo I. Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with <i>Staphylococcus aureus</i>	43
8.2 Anexo I. Prolactina y 17 β -estradiol regulan la expresión de genes de la respuesta inmune innata a través de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, y la expresión de miARNs en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con <i>Staphylococcus aureus</i>	59
8.3 Capítulo II. Prolactin and 17 β -estradiol modulates the innate immune response through epigenetics mechanisms in bovine macrophages challenged with <i>Staphylococcus aureus</i>	85
8.4 Capítulo III. Enfermedades autoinmunes bajo la influencia de la epigenética	134
IX. Discusión general	143
X. Conclusión general	155
XI. Perspectivas	156
XII. Bibliografía complementaria	157

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Factores de virulencia y patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i> .	8
Figura 2. Ciclo infectivo de <i>S. aureus</i> en células epiteliales.	10
Figura 3. Ciclo infectivo de <i>S. aureus</i> en macrófagos.	11
Figura 4. Respuesta inmunológica de la glándula mamaria frente a patógenos.	14
Figura 5. Quimiotaxis y diferenciación de los monocitos durante la respuesta inmunológica frente a patógenos de la glándula mamaria.	17
Figura 6. Incidencia de la mastitis bovina.	18
Figura 7. Estructura y función de la prolactina y su receptor.	20
Figura 8. Biosíntesis del 17 β -estradiol.	22
Figura 9. Mecanismos de regulación epigenética.	29
Figura 10. Efecto inmunomodulador de la prolactina y 17 β -estradiol en células de epitelio mamario durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	35
Figura 11. Efecto de la mezcla hormonal sobre la regulación de la RII mediada a través de mecanismos epigenéticos en CEMB desafiadas con <i>S. aureus</i> .	36
Figura 12. Esquema representativo de la estrategia establecida para la evaluación de la regulación epigenética inducida por bPRL y E2 en CEMB durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	40
Figura 13. Esquema representativo de la estrategia establecida para la evaluación de la regulación de los elementos de la RII y de los mecanismos epigenéticos inducida por bPRL y E2 en macrófagos bovinos durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	41
Figura 14. Regulación epigenética inducida por E2 y bPRL en CEMB durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	148
Figura 15. Regulación epigenética inducida por E2 y bPRL en macrófagos bovinos durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	154

Figura 1 (Anexo 1). Análisis del enriquecimiento de la marca H3K9ac inducido por prolactina y 17 β -estradiol en la región promotora de los genes de los elementos de la respuesta inmune innata en CEMB desafiadas con <i>S. aureus</i> .	76
Figura 2 (Anexo 1). Análisis del enriquecimiento de la marca H3K9me2 inducido por prolactina y 17 β -estradiol en la región promotora de los genes de los elementos de la respuesta inmune innata en CEMB desafiadas con <i>S. aureus</i>	77
Figura 3 (Anexo 1). Expresión de miARNs inducidos por prolactina y 17 β -estradiol en CEMB durante el desafío con <i>S. aureus</i> .	77

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Factores de virulencia más relevantes de <i>S. aureus</i> .	7

Abreviaturas

BNBD10:	Beta defensina de neutrófilos bovinos 10
CEMB:	Células de epitelio mamario bovino
E2:	17 β -estradiol
ERs:	Receptor de estrógenos
GM:	Glándula mamaria
H3ac:	Acetilación global de la histona H3
H3K9ac:	Acetilación en la lisina (K) 9 de la histona H3
H3K9me2:	Di-metilación en la lisina (K) 9 de la histona H3
HDACs:	Desacetilasas de histona
IL-10:	Interleucina 10
IL-1β:	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
LAP	Péptido antimicrobiano lingual
miRNA:	micro ácido ribonucleico
MRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
PRL:	Prolactina
PRLR:	Receptor de prolactina
RII:	Respuesta inmune innata
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
S100A7:	Proteína S100A7 de unión a calcio
SCC:	Conteo de células somáticas
TAP	Péptido antimicrobiano traquial
TLR2:	Receptor tipo toll-2
TNFα:	Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

Durante la mastitis bovina, una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria (GM) ocasionada principalmente por la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), se induce un desequilibrio de la respuesta inmune innata (RII) del animal y esta se asocia, en parte, a los cambios fisiológicos en la GM que son regulados por las hormonas prolactina (PRL) y 17- β estradiol (E2), las cuales presentan variaciones abruptas durante el periodo del parto, la lactancia y el periodo seco del animal. Además, la GM sufre modificaciones epigenéticas (ej. metilación del ADN, modificaciones en las histonas y por la acción de miRNAs), las cuales se asocian con el desarrollo, función y respuesta inmune de este tejido, por lo que estos cambios también están relacionados al estado de salud de los animales. Concentraciones fisiológicas de PRL (5 ng/mL) y E2 (50 pg/mL) modulan la RII en células de epitelio mamario bovino (CEMB), así como la acetilación global de la histona H3 (H3ac global) y la expresión de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2 durante la infección con *S. aureus*, promoviendo una respuesta pro-inflamatoria y antimicrobiana, respectivamente. En este trabajo se exploró la regulación epigenética inducida por la PRL bovina (bPRL) en células de epitelio mamario bovino (CEMB) desafiadas con *S. aureus*. Se determinó que la marca H3K9ac disminuyó significativamente en las CEMB tratadas (12 h) con bPRL (5 ng/mL) y desafiadas (2 h) con *S. aureus* con una multiplicidad de infección (MOI) de 30:1, mientras que la marca H3K9me2 se incrementó de manera significativa bajo las mismas condiciones. Además, este resultado coincidió con un incremento de la actividad de las desacetilasas de histona (HDACs) en las mismas condiciones. Importantly, la marca H3K9ac se enriqueció en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-10*, y *BNBD10* en las CEMB tratadas con bPRL, mientras que una reducción en el enriquecimiento de esta marca fue observada en las CEMB tratadas con bPRL y desafiadas con *S. aureus*. La marca H3K9me2 fue enriquecida significativamente en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-10*, mientras que, en las células tratadas con bPRL y desafiadas con *S. aureus* el enriquecimiento de esta marca en la región promotora de estos genes fue disminuido. Adicionalmente, la expresión de los miRNAs: Let-7a-5p, miR-21a, miR-30b, miR-155 y miR-7863 fueron regulados positivamente en las CEMB desafiadas con *S. aureus*; sin embargo, se observó una regulación negativa en la expresión de estos miRNAs por PRL (12 h) en las CEMB desafiadas o no con la bacteria. Por otra parte, en este trabajo también se exploró la regulación epigenética inducida por la mezcla de bPRL (5 ng/mL) y 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (2 h) (MOI 30:1). Se determinó que el tratamiento (12 h) con la mezcla hormonal indujo el enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-10*,

BNBD10 y *LAP* en las CEMB. Notablemente, el incremento de la marca H3K9ac en la región promotora de estos genes fue más evidente en las CEMB (previamente tratadas con la mezcla hormonal) desafiadas con *S. aureus*. El enriquecimiento de H3K9ac en estos mismos genes disminuyó en las CEMB desafiadas con la bacteria. Además, la marca H3K9me2 fue enriquecida en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* bajo las mismas condiciones. Adicionalmente, se observó una regulación positiva de la expresión de los miRNAs: miR-155, miR-146a, miR21a, miR-451, miR-23a, miR-30b, miR-7863, miR-144 y Let-7a-5p en las CEMB desafiadas con *S. aureus*; sin embargo, se observó una regulación negativa de estos miRNAs cuando las células fueron tratadas con la mezcla hormonal y después desafiadas con *S. aureus*. bPRL y E2 indujeron diferencialmente cambios significativos en la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-10), de quimiocinas (IL-8) y de péptidos antimicrobianos (*BNBD10* y *S100A7*) en macrófagos bovinos desafiados con *S. aureus*. Estos efectos no fueron dependientes del receptor TLR2. Además, las hormonas (12 h) por separado o en conjunto favorecen la H3ac global en macrófagos desafiados o no con *S. aureus*. Hubo reducción de la marca H3K9ac en macrófagos tratados (12 h) con bPRL y con la mezcla hormonal y posteriormente desafiados con la bacteria; sin embargo, no se observaron cambios en la marca H3K9me2 en las mismas condiciones. Esto coincidió con un incremento de la actividad de las HDACs bajo las mismas condiciones. Adicionalmente, se observó una regulación positiva de la expresión de los miRNAs: miR-451, miR-155 y miR-7863 en macrófagos desafiados con *S. aureus*; sin embargo, esta expresión disminuyó en presencia de las hormonas. Interesantemente, la expresión de miR-146a y miR-21a se incrementó en macrófagos tratados con la mezcla hormonal y desafiados con la bacteria. Las hormonas indujeron una regulación positiva en la expresión de Let-7a-5p, miR.30b y miR23a, mientras que no hubo cambios en la expresión en presencia de *S. aureus*. Estos resultados sugieren que las hormonas bPRL y E2, a través de la modulación epigenética, participan en la regulación de la RII montada por las CEMB y los macrófagos. Sin embargo, bacterias como *S. aureus* pueden desregular la respuesta inmunológica montada por estas células a través de la manipulación de los mecanismos epigenéticos del hospedero, lo cual puede explicar, en parte, la evasión del sistema inmune por la bacteria así como su persistencia en ellas.

Palabras clave: mastitis subclínica, respuesta inmune innata, regulación epigenética, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

During bovine mastitis, an inflammatory disease of the mammary gland (MG) caused mainly by the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), an imbalance of the animal innate response (IIR) is induced, and this is associated to physiologic changes of the GM that are regulated by hormones such as prolactin (PRL) and 17 β -estradiol (E2), which present abrupt changes during peripartum, lactation and dry period. Moreover, the GM undergoes epigenetic modifications (e.g., ADN methylation, histone modifications, or by the action of miRNAs), which are associated with the development, function, and immune response of this tissue; in this sense, the epigenetic modifications are associated with the health status of animals. Previously, it was shown that physiologic concentrations of PRL (5 ng/mL) and E2 (50 pg/mL) modulated the IIR in bovine mammary epithelial cells (bMECs), as well as the global H3 acetylation (H3ac) and the expression of the marks H3K9ac and H3K9me2 during *S. aureus* challenge, promoting a pro-inflammatory and antimicrobial response, respectively. In this work, we explored the epigenetic regulation induced by bovine prolactin (bPRL) in bMECs challenged with *S. aureus*. We determined that the H3K9ac mark (a mark associated to gene expression) showed a significant decrease in bMECs treated 12 h with bPRL (5 ng/mL) and challenged 2 h with *S. aureus* at multiplicity of infection (MOI) of 30:1, while the H3K9me2 mark was increased in the same conditions. Further, this coincided with the increment of the HDAC's activity in the same conditions. Importantly, we showed an increment in the enrichment of the H3K9ac mark in the promoter region of *IL-1 β* , *IL-10*, and *BNBD10* genes in bMECs treated with bPRL. However, a decrease in the enrichment of this mark was observed in bMECs treated with bPRL and then challenged with *S. aureus*, while enrichment of the H3K9me2 mark in the promoter gene of *IL-1 β* , *IL-10*, and *BNBD10* genes was observed in the same conditions. Additionally, the expression of f Let-7a -5p, miR-21a, miR-30b, miR-155 y miR-7863 were up-regulated in bMECs challenged with *S. aureus*, while the presence of bPRL induced a down-regulation of the expression of these miRNAs. On the other hand, we also explored the epigenetic regulation induced by bPRL (5 ng/mL) and 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) in bMECs challenged 2 h with *S. aureus* (MOI 30:1). We determined that the treatment (12 h) with the hormonal mix induced the enrichment of the H3K9ac mark in the promoter region of the *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* in bMECs. Notably, the enrichment of the H3K9ac mark in the promoter region in these genes was more evident in bMECs (pre-treated with the hormonal mix) challenged with *S. aureus*. Significantly, the enrichment of the H3K9ac mark in the promoter region of the *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10* and *LAP* was decreased in bMECs only challenged with the bacteria. Moreover, an increment of the H3K9me2 mark in the promoter region of the *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10*, and

LAP was observed in the same conditions. Additionally, the expression of the miRNAs: miR-155, miR-146a, miR21a, miR-451, miR-23a, miR-30b, miR-7863, miR-144 y Let-7a-5p in bMECs challenged with *S. aureus*; however, the presence of hormonal mix induced a down-regulation of the expression of these miRNAs. Finally, bPRL and E2 differentially induced significant changes in the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-10), chemokines (IL-8) and antimicrobial peptides (BNBD10 and S100A7) in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Notably, these effects were not dependent on the TLR2 receptor. In addition, the hormones (12 h) separately or together favor global H3ac in macrophages challenged or not with *S. aureus*. Notably, a reduction of the H3K9ac mark was observed in macrophages treated (12 h) with bPRL and with the hormonal mix and subsequently challenged with the bacteria; however, no changes were observed in the H3K9me2 mark in macrophages only treated with the hormones. Furthermore, this coincided with increased HDAC activity in the same conditions. Additionally, an up-regulation of the expression of the miRNAs: miR-451, miR-155, and miR-7863 in macrophages challenged with *S. aureus* was observed; however, this expression was down-regulated in the presence of the hormones. Interestingly, the expression of miR-146a and miR-21a was increased in macrophages treated with the hormonal mix and challenged with the bacteria. In addition, the hormones induced up-regulation in the expression of Let-7a-5p, miR.30b, and miR23a, while there were no changes in the expression of these miRNAs in the presence of *S. aureus*. These findings suggest that the bPRL and E2 hormones participate in regulating the RII of bMECs and macrophages through epigenetic regulation. However, bacteria such as *S. aureus* can deregulate the immune response mounted by these cells through the manipulation of the epigenetic mechanisms of the host, which may explain, in part, the evasion of the immune system mounted by bacteria as well as the persistence in them.

Keywords: subclinical mastitis, innate immune response, epigenetic regulation, *Staphylococcus aureus*.

III. Introducción

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades más frecuente y costosa en los hatos de ganado lechero, debido a que trae como consecuencia una disminución en el volumen de producción y calidad de la leche, lo cual afecta de manera negativa la economía de la ganadería lechera. Esta enfermedad es una inflamación de la glándula mamaria ocasionada principalmente por infecciones microbianas (ej. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), y se con la fisiología del animal (ej. cambios abruptos en las concentraciones de hormonas lactogénicas como prolactina y estradiol). Así mismo, la mastitis se puede convertir en una enfermedad crónica que pone en riesgo la salud y la integridad de los animales.

3.1 La mastitis bovina

La mastitis es una enfermedad que causa un gran impacto en la economía de la ganadería lechera debido a que ocasiona una reducción de la producción de la leche, baja calidad del producto, altos costos en el tratamiento con antibióticos e incluso el sacrificio de los animales (Gussmann *et al*, 2019). Las pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona a nivel mundial ascienden a ~35 billones de USD (Sathiyabarathi *et al*, 2016) y en México se estima una pérdida de \$2,500.00 por vaca por año (Bedolla & León, 2008). Como tal, la mastitis es una inflamación de la glándula mamaria (GM), usualmente como consecuencia de una infección microbiana, y de acuerdo a la duración puede clasificarse en aguda o crónica (Thompson-Crispi *et al*, 2014). Además, dependiendo de los signos clínicos de la infección y del agente patógeno que la ocasiona, se clasifica también en mastitis clínica o subclínica (Ruegg *et al*, 2017). La mastitis clínica se caracteriza por la presencia de signos clínicos de infección como lo son: el enrojecimiento, hinchazón, aumento de la temperatura y dolor al palpar, y es ocasionada principalmente por la bacteria Gram negativa *E. coli*, mientras que la mastitis subclínica se caracteriza por la ausencia de los signos clínicos de infección y solo se puede diagnosticar por el conteo de células somáticas (SCC, por sus siglas en inglés) ($\geq 2.5 \times 10^5$ cel/mL) y es ocasionada principalmente por la bacteria Gram positiva *S. aureus* (Gunter *et al*, 2017). De manera importante, *S. aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado (~70%) de los casos de mastitis subclínica crónica (Dego, 2020).

3.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram positiva en forma de coco que mide entre 0.5-1.5 μm de diámetro, son bacterias anaerobias fermentadoras de glucosa, coagulasa y catalasa positiva y oxidasa negativa (de la Maza *et al*, 2020). *S. aureus* forma parte de la microbiota nasal (coloniza el 30% de la cavidad nasofaríngea en la población adulta sana) y de la piel (Von Eiff *et al*, 2001). Usualmente la colonización de esta bacteria es asintomática, mientras que una infección sintomática puede ocurrir si las barreras de la piel y de las fosas nasales se ven comprometidas (Foster, 2009). La severidad de las infecciones sintomáticas puede ir desde una infección leve sobre la superficie de la piel y tejido suave hasta devastadoras complicaciones como osteomielitis, mastitis, neumonía necrosante, endocarditis, artritis séptica, síndrome de choque tóxico, sepsis (Lowy, 1998; Foster, 2009; Gordon, 2021 Hommes *et al*, 2022). Las infecciones por *S. aureus* son problemáticas debido a su resistencia a los antibióticos. Entre los aislados clínicos más frecuentes se encuentran *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), estas cepas se caracterizan por ser altamente resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos (Ippolito *et al*, 2010; Lee *et al*, 2018). En este sentido, *S. aureus* es un importante problema de salud de relevancia en la medicina veterinaria, ya que es uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina que afecta de manera dramática la economía de la ganadería lechera (Zaatout *et al*, 2020).

3.2.1 Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Durante la infección, *S. aureus* emplea varias estrategias de invasión para evadir la respuesta efectora tanto de las células inmunológicas (ej. células epiteliales, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos) a través de la expresión de diversos factores de virulencia (**Tabla 1**) (Flannagan *et al*, 2015; Horn *et al*, 2018; Pidwill *et al*, 2021).

Tabla 1. Factores de virulencia más relevantes de *S. aureus*

Componentes membranales	Componentes de secreción
Proteínas de superficie: ➤ Proteína de unión a colágeno ➤ Proteína de unión a fibronectina ➤ Proteína de unión a fibrinógeno ➤ Proteína A	Toxinas que tienen actividad sobre membranas: ➤ Hemolisinas α, β, γ, δ ➤ Leucocidina y Leucocidina PVL (Panton-Valentine)
Polisacáridos capsulares: ➤ C5 y C8	Toxinas que tienen actividad de superantígenos: ➤ Toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1) ➤ Enterotoxinas B y C ➤ Epidermolíticas A y B
Componentes en la pared celular: ➤ Ácido teicoico ➤ Ácido lipoteicoico ➤ Peptidoglicano	Enzimas: ➤ Proteasa ➤ Lipasa ➤ Nucleasa ➤ Hialuronidasa ➤ Coagulasa ➤ β-lactamasa ➤ Catalasa

Tomado de Lowy, 1998; Jenul & Horswill, 2019; Zaatout *et al*, 2020; Gordon *et al*, 2021.

Estos factores de virulencia le permiten a *S. aureus* adherirse, internalizar, replicar y evadir la respuesta inmunológica de la célula hospedera, causando infecciones crónicas (Jenul & Horswill, 2019; Zaatout *et al*, 2020). Además, estos

factores de virulencia se expresan de manera diferencial de acuerdo con la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria (Fig. 1). Por ejemplo, las proteínas de adhesión como la proteína de unión a fibrinógeno y fibronectina (FnBPs, por sus siglas en inglés), son proteínas que se expresan durante la fase exponencial de crecimiento de la bacteria y le permiten adherirse a los componentes de la matriz extracelular de la célula hospedera, garantizando el establecimiento y permanencia de la bacteria en el tejido. Mientras que las proteínas de secreción como la α -toxina o leucocidinas, las cuales destruyen leucocitos, son expresadas durante la fase estacionaria (Lowy, 1998; Zaatout *et al*, 2020; Jenul & Horswill, 2019; Gordon *et al*, 2021). Además, la formación de biopelículas y la capacidad de la bacteria de cambiar a su fenotipo a variante de colonia pequeña (SCV, por sus siglas en inglés) son otros factores de virulencia que le permiten a la bacteria persistir, evadir la respuesta inmunológica del hospedero, así como la resistencia a los antibióticos (Flannagan *et al*, 2015; Moredo *et al*, 2019; Zaatout *et al*, 2020; Gordon *et al*, 2021).

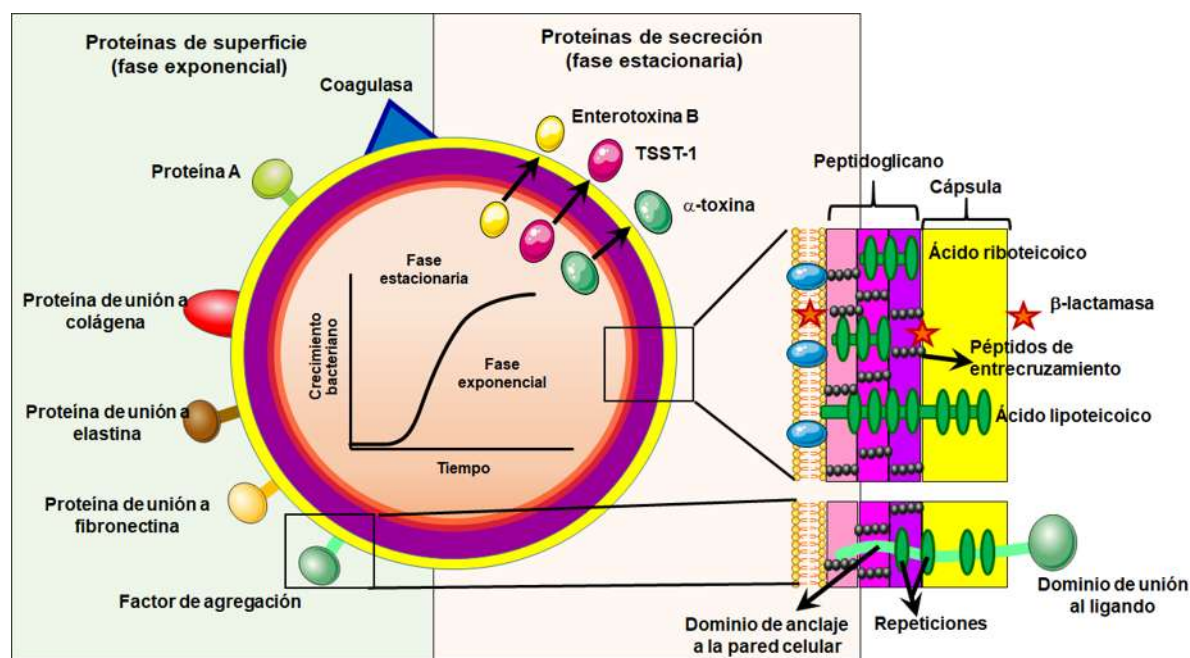


Figura 1. Factores de virulencia y patogenicidad de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* cuenta con un gran arsenal de factores de virulencia que le permiten invadir, internalizar y persistir en varios tejidos, lo cual le ha conferido un gran éxito como bacteria oportunista causando enfermedades crónicas y recurrentes tanto en medicina humana como veterinaria. Estos factores de virulencia se expresan de manera diferencial de acuerdo con la fase de crecimiento de la bacteria. Los factores involucrados en la invasión e internalización, como las proteínas de unión a fibronectina, de unión a colágeno, a elastina y los factores de agregación son expresados durante la fase exponencial, mientras que los factores que le permiten evadir al sistema inmune del hospedero y establecer una infección crónica en el hospedero como la α -toxina y leucocidinas son expresados durante la fase de estacionaria. Además, el ácido lipoteicoico (LTA) presente en la pared bacteriana interactúa con los

receptores tipo Toll (TLRs), lo cual le permite a la célula hospedera reconocer a la bacteria y montar una respuesta inmunológica. TSST-1: toxina 1 del síndrome de choque tóxico. Tomado y modificado de Lowy, 1998.

3.2.2 Mecanismo de infección de *Staphylococcus aureus*

S. aureus puede internalizar, sobrevivir y persistir de manera crónica tanto en células fagocíticas no profesionales como osteoclastos, queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos; y en células fagocíticas profesionales como neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, el ciclo de infección depende del tipo de célula que ha infectado (Zaatout *et al*, 2020; Gordon *et al*, 2021; Hommes, & Surewaard, 2022).

De manera general, se ha descrito que para invadir células fagocíticas no profesionales (ej. células epiteliales) *S. aureus* emplea un mecanismo tipo Zipper. En este participan las FnbA y FnbB, las cuales se unen a la proteína fibronectina (proteína que forma parte de la matriz extracelular de las células epiteliales) formando un complejo que es subsecuentemente reconocido por la integrina $\alpha 5 \beta 1$. La cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés), la cual promueve el reclutamiento de una serie de proteínas que inducen la reorganización del citoesqueleto de actina, la formación de un endosoma y la internalización de la bacteria (Alva-Murillo *et al*, 2014). Una vez dentro del citosol, la bacteria puede escapar del endosoma mediante la ruptura de la membrana endosomal, la cual es mediada por la modulina soluble en fenol alfa (PSM α , por sus siglas en inglés) (Grosz *et al*, 2014). Una vez en el citosol, la bacteria puede sobrevivir y persistir de manera intracelular formando un reservorio intracelular o replicarse para eventualmente lisis la célula hospedera y escapar al espacio extracelular e iniciar nuevamente el ciclo infeccioso (Fig. 2) (Hu *et al*, 2014).

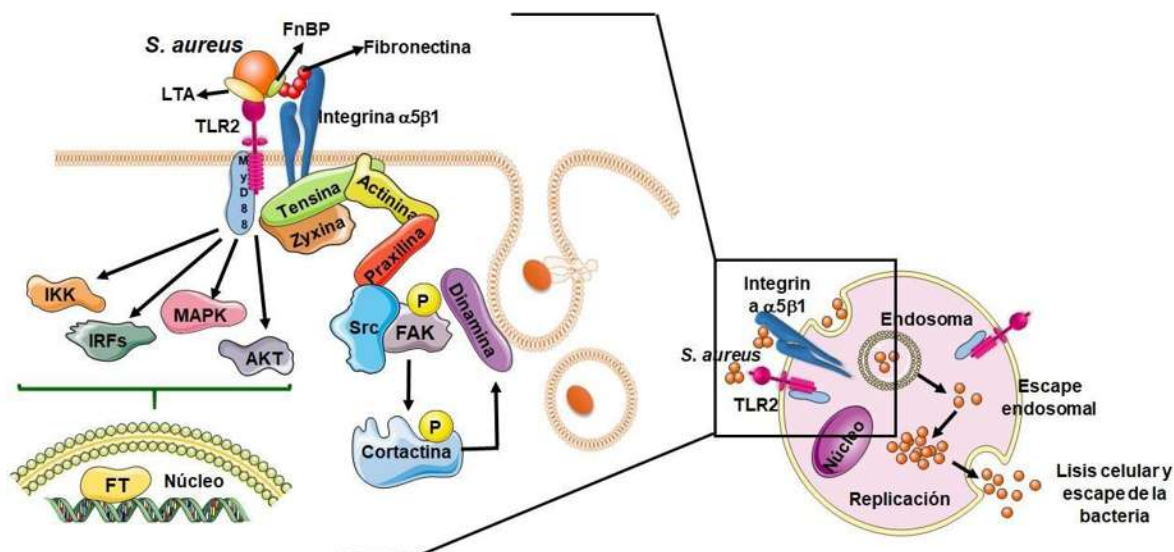


Figura 2. Ciclo infeccioso de *S. aureus* en las células epiteliales. El receptor TLR2 es el principal receptor de reconocimiento de patrones que interactúa con el LTA de *S. aureus*, posterior a la interacción se activan varias rutas de señalización que de manera diferencial inducen la expresión de elementos de la RII. Además, mediante el mecanismo Zipper la bacteria puede internalizarse en la célula hospedera. Este mecanismo involucra elementos de la bacteria (ej. proteína de unión a fibronectina) y la célula hospedera (ej. fibronectina y la integrina $\alpha 5\beta 1$), lo cual da como resultado la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) para inducir un andamiaje proteico que conducirá al rearrreglo del citoesqueleto de actina para formar un endosoma y endocitar a la bacteria. Una vez dentro de la célula, *S. aureus* a través de la expresión de sus factores de virulencia puede escapar del endosoma y persistir manteniendo un reservorio intracelular. Adicionalmente, la bacteria puede iniciar su replicación y lisis a la célula hospedera y escapar al espacio extracelular para infectar otra célula. Tomado y modificado de Alva-Murillo *et al* (2014), y Hommes & Surewaard (2022).

Por otra parte, se ha descrito que células fagocíticas profesionales como los macrófagos son otro reservorio intracelular de *S. aureus*, permitiéndole sobrevivir, replicar y eventualmente escapar para diseminarse en el hospedero (Thwaites *et al*, 2011; Prajsnar *et al*, 2012; Krenkel *et al*, 2017). De manera general, *S. aureus* puede internalizarse en los macrófagos a través de 3 tipos de receptores localizados en la superficie celular: 1) Receptores depuradores (SRs, por sus siglas en inglés) que reconocen el LTA de la pared celular de *S. aureus*, 2) Receptores del complemento 3 y 4 (CR3 y CR4), los cuales reconocen la opsonina iC3b que está en la superficie de *S. aureus*, y 3) Receptores de la fracción cristalizable gamma ($Fc\gamma$) que reconocen a la región Fc de los anticuerpos IgG que han opsonizado a *S. aureus* (Pidwill *et al*, 2021). Tras el reconocimiento, se induce el reordenamiento del citoesqueleto de actina para formar la copa fagocítica la cual se extiende alrededor de la bacteria y después se contrae para formar el fagosoma con la bacteria en el interior (Swanson *et al*, 2008). El fagosoma a través de una serie de pasos madura

y se fusiona con el lisosoma, el cual contiene moléculas microbidas (ej. lisozimas, péptidos antimicrobianos), y forma el fagolisosoma, en donde cerca del 90% de la bacteria muere y el 10% sobrevive (Pollitt *et al*, 2008; Flannagan *et al*, 2009). Estas bacterias que sobrevivieron eventualmente escapan del fagolisosoma y se replican de manera intracelular. Las bacterias pueden lisis la célula hospedera y escapar al espacio extracelular para diseminarse e iniciar nuevamente el ciclo infeccioso (Fig. 3) (Pidwill *et al*, 2021; Hommes & Surewaard, 2022).

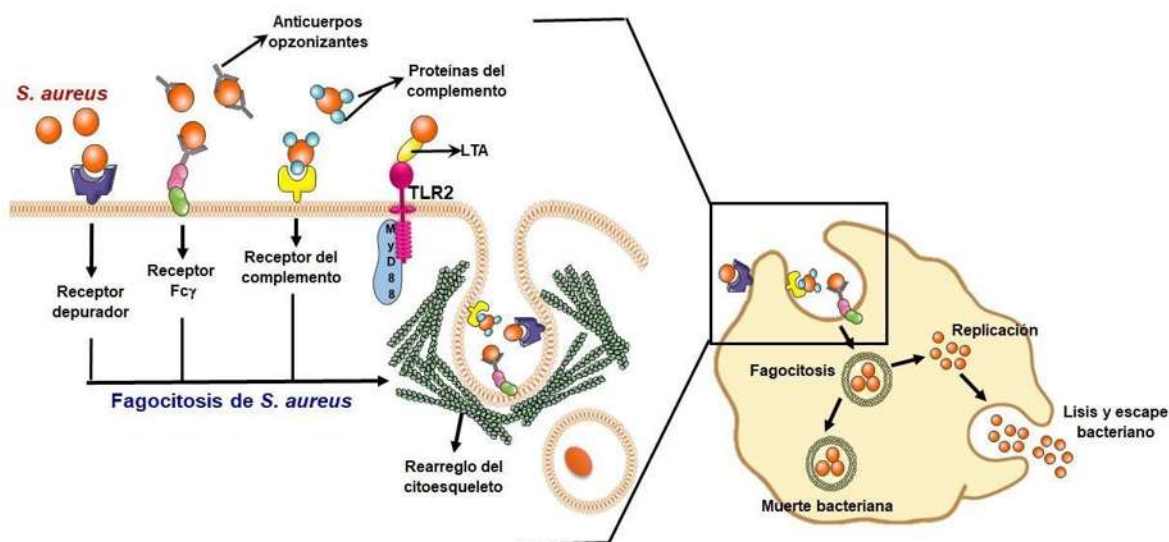


Figura 3. Ciclo infeccioso de *S. aureus* en macrófagos. Además del receptor TLR2, el cual interactúa con el LTA de *S. aureus* y desencadena la señalización de la respuesta inmunológica por parte del hospedero, los macrófagos reconocen a *S. aureus* a través de diferentes receptores que inducen la fagocitosis. Al menos 3 receptores son clave para iniciar este proceso: 1) los receptores depuradores, los cuales reconocen el LTA de la bacteria; 2) los receptores Fc γ que reconocen bacterias opsonizadas por anticuerpos; y 3) los receptores del complemento, los cuales reconocen moléculas del complemento que están unidas a *S. aureus*. Tras el reconocimiento se induce un rearreglo del citoesqueleto de actina para formar la copa fagocítica, endocitar la bacteria y formar el fagosoma, el cual eventualmente se unirá al lisosoma para formar el fagolisosoma. Una vez dentro, *S. aureus* puede evadir la actividad microbida del fagolisosoma y escapar al espacio intracelular para eventualmente replicarse y lisis la célula hospedera y alcanzar el espacio extracelular para infectar otra célula. Tomado y modificado de Pidwill *et al* (2021), y Hommes & Surewaard (2022).

3.3 Respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina

La habilidad de las vacas para resistir infecciones intramamarias depende de la eficiencia de la respuesta inmune de la glándula mamaria (GM). En general, la respuesta inmunológica de la glándula mamaria está compuesta por: 1) factores físicos, 2) componentes celulares, y 3) componentes moleculares que participan de manera importante en la respuesta innata y adaptativa (Aitken *et al*, 2011). Por lo

anterior, se requiere una coordinación de la respuesta efectora de ambos tipos para que la GM monte una efectiva y robusta respuesta en contra de los microorganismos invasores, manteniendo un balance entre la actividad necesaria para eliminar el estímulo nocivo y la respuesta controlada para evitar el daño al tejido del hospedero (Rainard & Riollet, 2006).

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa en los inicios de la infección y participa de manera importante para la detección, localización y eliminación de los microorganismos patógenos, en este sentido la respuesta innata es clave en el resultado de la mastitis (Sordillo, 2018). La respuesta inmune innata de la glándula mamaria está compuesta por: 1) componentes celulares, como los leucocitos (ej. neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células natural killer) o células no inmunes (ej. el epitelio y el endotelio); y 2) componentes solubles como el sistema del complemento, quimiocinas, citocinas, enzimas, péptidos antimicrobianos, entre otros (Oviedo-Boyso, 2007; Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Ferreira, 2013; Sordillo, 2018).

Los mecanismos de la respuesta innata están de forma preexistente en la GM; una vez que los microorganismos patógenos logran atravesar las barreras físicas como el pezón y el canal del pezón, y llegan hasta el lumen de la glándula mamaria, estos mecanismos son activados para combatir a las bacterias invasoras (Wellnitz & Bruckmaier, 2012). En la fase inicial de la infección, los microorganismos invasores son reconocidos por los macrófagos residentes y las células epiteliales mamarias (Oviedo-Boyso, 2007). Las células epiteliales y los macrófagos reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), como por ejemplo el lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés) o el LTA que están presentes en la superficie celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente, a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, por sus siglas en inglés), como los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) (Günther & Seyfert, 2018; Vlasova & Saif, 2021). Una vez que las células epiteliales y los macrófagos han reconocido a las bacterias, a través de los receptores TLR, se desencadenan vías de señalización complejas que promueven la traslocación de factores de transcripción al núcleo y la expresión y síntesis de citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios como el óxido nítrico

(NO) y péptidos antimicrobianos (PA) (Akira *et al*, 2006). Esto inicia la respuesta inflamatoria, la cual se caracteriza por la liberación de los mediadores inflamatorios acompañado de un aumento de la permeabilidad del endotelio vascular (vasodilatación), lo cual permite que estos mediadores migren hacia el torrente sanguíneo (extravasación de fluidos). Una vez en el torrente sanguíneo, estos mediadores promueven la quimiotaxis de leucocitos hacia el sitio de daño acompañado de una elevada actividad metabólica (Sordillo, 2018) (Fig. 4). Cada una de estas respuestas contribuye a los síntomas clínicos de la inflamación, como son el enrojecimiento, hinchazón, aumento de la temperatura y dolor (Sordillo, 2018). La respuesta inflamatoria efectiva termina con la eliminación del patógeno invasor y con el comienzo de la resolución de la inflamación, periodo en el cual el tejido del hospedero es renovado sin sufrir cambios perjudiciales (Medzhitov, 2008; Watanabe *et al*, 2019).

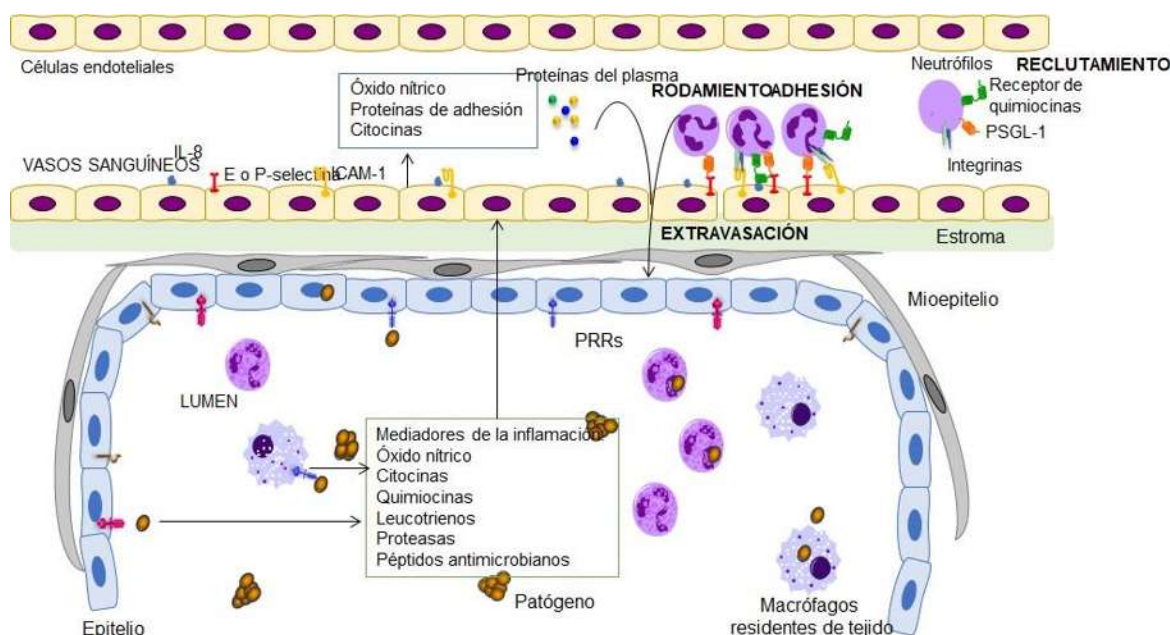


Figura 4. Respuesta inmune de la glándula mamaria bovina frente a patógenos. Una vez que los patógenos atraviesan las barreras físicas como el canal del pezón, el canal de la cisterna y llegan hasta el alvéolo glandular, estos son reconocidos por las células epiteliales mamarias y los macrófagos residentes de tejido. Este reconocimiento a través de los elementos tanto de la bacteria como de la célula hospedera, permite la activación de estos tipos celulares e iniciar la respuesta inflamatoria con la producción de mediadores inflamatorios (como quimiocinas, citocinas, óxido nítrico, entre otros), los cuales activarán al endotelio de la glándula mamaria promoviendo la expresión de moléculas de adhesión (ej. E o P selectina) que le permitirá el reclutamiento de leucocitos (como los neutrófilos), adhesión, rodamiento y extravasación hacia el sitio de la infección, para finalmente contribuir en la eliminación del patógeno en la glándula mamaria. Tomado y modificado de Aitken *et al* (2011).

3.3.1 Participación de las células epiteliales mamarias en la inmunidad innata

La producción de la leche durante la lactancia, es una de las principales funciones de las células epiteliales mamarias (Truchet & Honvo-Houéto, 2017). Sin embargo, se ha demostrado que estas tienen un papel importante en la respuesta inmune de la glándula mamaria (Rainard *et al*, 2022). Las células del epitelio mamario bovino (CEMB) son centinelas capaces de reconocer de manera eficiente perturbaciones en el microambiente, y por su posición y abundancia en la GM, son la primera línea de defensa en contra de patógenos. Las CEMB están equipadas de receptores, como los TLRs, que les permite reconocer a los patógenos invasores y montar una respuesta a través de la producción de mediadores de la RII (ej. citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos) para eliminar a los microorganismos invasores (Fig. 4) (Wellnitz & Bruckmaier, 2012; Larsen *et al*, 2020; Rainard *et al*, 2022).

Las CEMB son capaces de responder diferencialmente al estímulo de PAMPs de patógenos asociados a la mastitis bovina (Günther *et al*, 2017), distintos estudios *in vitro* se han realizado para determinarlo. En este sentido, el lipopolisacárido (LPS, 50 µg/mL) de *E. coli* estimula la expresión de los genes de citocinas pro- inflamatorias (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6), de las quimiocinas (IL-8, CXCL6, CCL2), y del péptido antimicrobiano BNBD5 (β -defensina de neutrófilos bovinos), y del receptor TLR2 en las CEMB, y la secreción de la IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Strandberg *et al.*, 2005; Rainard & Riollot, 2006). El LTA (20 µg/mL) también tiene un efecto inductor en la expresión de los genes antes mencionados, aunque en menor proporción que el generado por el LPS. Por otro lado, *E. coli* favorece una mayor expresión de los genes de TNF α , IL-1 β e IL-8, en comparación con *S. aureus* (Lahouassa *et al*, 2007). Además, *S. aureus* favorece la secreción de la IL-8 (Rainard & Riollot, 2006).

En el caso particular de las infecciones intramamarias generadas por *S. aureus*, la respuesta de las CEMB es moderada o limitada, debido principalmente a que esta bacteria evita la activación de NF- κ B, factor transcripcional centinela de la respuesta inflamatoria (Lara-Zárate *et al*, 2011). Además, las CEMB también muestran una respuesta inflamatoria diferencial (expresión de genes de TNF α , IL-1 β , IL-8, RANTES, TLR2) dependiendo de la cepa de *S. aureus* utilizada y de la carga bacteriana (Petzl *et al*, 2008; Zbinden *et al*, 2014). El estímulo bacteriano con *S. aureus* favorece la expresión de genes de péptidos antimicrobianos (LAP, TAP, BNBD4, BNBD5, BNBD10 y DEFB1) en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al*, 2009; Alva- Murillo *et al*, 2012; Téllez-Pérez *et al*, 2012; Alva-Murillo *et al*, 2013). Adicionalmente, las hormonas sexuales promueven una respuesta diferencial de los elementos de la RII en CEMB infectadas con *S. aureus*. Concentraciones fisiológicas de prolactina bovina (bPRL, 5 ng/mL) inducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB, y en conjunto con la infección, promueve una respuesta inflamatoria (Lara-Zárate *et al*, 2011; Medina-Estrada *et al*, 2015). Por otra parte, concentraciones fisiológicas del 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) reducen la internalización de *S. aureus* y la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria en las CEMB, promoviendo una respuesta anti-inflamatoria y anti-microbiana (Medina-Estrada *et al*, 2016).

Todos estos resultados en conjunto sugieren que la respuesta limitada de las CEMB puede favorecer el establecimiento de enfermedades intramamarias por *S. aureus*.

3.3.2 Participación de los macrófagos en la inmunidad innata

Los macrófagos son células fagocíticas profesionales capaces de detectar y engullir a microorganismos patógenos e iniciar una respuesta robusta para eliminarlos (Varol *et al*, 2016). Estas células se distribuyen en diversos tejidos (hígado, pulmón, cerebro, piel y mucosas) en donde se encuentran como células residentes de tejido totalmente diferenciadas y desempeñando funciones de protección y de renovación, mientras que sus precursores (monocitos) se encuentran circulando en el torrente sanguíneo en donde si no existe ningún estímulo mueren, a menos que sean reclutados por los tejidos para su diferenciación (Gordon & Plüddemann, 2017). Estas células tienen como función principal eliminar microorganismos patógenos y activar a los linfocitos T y B a través de la presentación del antígeno para activar las funciones efectoras de estas células. En este sentido a los macrófagos se les considera un puente entre la inmunidad innata y adaptativa. Además, los macrófagos también juegan un papel importante en la reparación tisular y de heridas, en la homeostasis removiendo células senescentes o muertas, así como en la eliminación de células tumorales (Ginhoux & Jung, 2014; Feng *et al*, 2015; Varol *et al*, 2016; Gordon & Plüddemann, 2017).

Los macrófagos particularmente secretan citocinas como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-10 , IL-12 y quimiocinas como IL-8 , las cuales son liberadas seguido de la activación de los receptores TLR (Fitzgerald & Kagan, 2020; Grassi-Dalyle *et al*, 2020). Además, dependiendo del estímulo mediado por los receptores TLR, y del microambiente en el que se encuentren, pueden montar una respuesta efectora diferente que puede ser específica de tejido (Shapouri-Moghaddam *et al*, 2018). A este proceso fenotípico y funcional se le conoce como polarización (Lee, 2019). Los macrófagos que son activados por mediadores inflamatorios como el LPS bacteriano, y citocinas como el interferón gamma ($\text{INF}\gamma$), IL-6 y $\text{TNF}\alpha$, son llamados macrófagos inflamatorios o M1, los cuales se caracterizan por poseer un fenotipo pro-inflamatorio con una mejorada actividad microbicida. Por el contrario, los

macrófagos activados por mediadores anti-inflamatorios como las citocinas IL-4, IL-13 o infecciones por hongos o helmintos, son llamados macrófagos anti-inflamatorios o M2, los cuales se caracterizan por estar involucrados en el remodelamiento de tejidos, reparación tisular y la resolución de la respuesta inflamatoria (Lee, 2019).

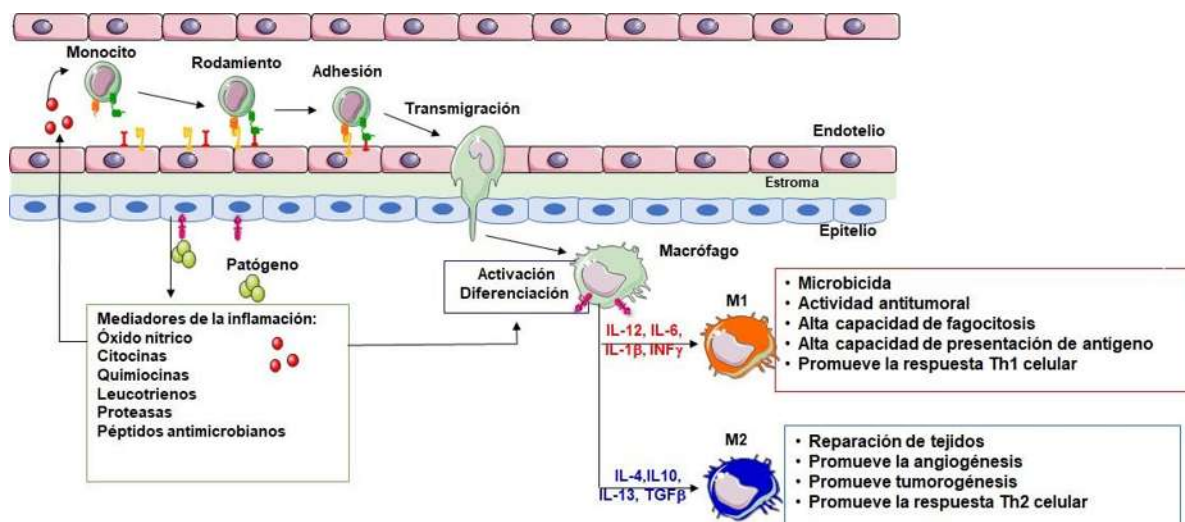


Figura 5. Quimiotaxis y diferenciación de los monocitos durante la respuesta inmunológica frente a patógenos de la glándula mamaria bovina. Además de los neutrófilos, otros componentes importantes de la respuesta inmune innata, como los monocitos, son reclutados al sitio de la infección a través de la activación del endotelio de la glándula mamaria. Los mediadores inflamatorios producidos por la interacción de las células epiteliales y los patógenos inducen la expresión de las proteínas de adhesión en el endotelio para reclutar a los monocitos circulantes al sitio de infección. Una vez llegado al sitio de infección, los monocitos se activan y se diferencian a macrófagos, los cuales dependiendo del micro ambiente celular en el que se encuentren se polarizarían hacia el fenotipo M1 o M2. El fenotipo M1 pro-inflamatorio se caracteriza por montar una eficiente respuesta inflamatoria para destruir patógenos; mientras que, el fenotipo M2 o anti-inflamatorio se caracteriza por montar una respuesta dirigida a la reparación tisular y resolución de la inflamación. Tomado y modificado de Aitken et al (2011), y Lee (2019).

3.4 Relación entre las infecciones intramamarias y el estado fisiológico y reproductivo de los bovinos

Durante el periodo del parto, la lactancia y el periodo seco, las vacas presentan una alta susceptibilidad a desarrollar infecciones intramamarias (IMI), como la mastitis (Lamote *et al*, 2006; Oviedo-Boyso *et al*, 2007; Newman *et al*, 2010). Esta susceptibilidad está relacionada con un desequilibrio en la respuesta inmune innata de la GM, la cual se debe, en parte, a cambios metabólicos, nutricionales y hormonales (Lamote *et al*, 2006). Las hormonas reproductivas, como el 17 β -estradiol y la prolactina, participan de manera importante en el desarrollo,

diferenciación y función de la GM, así como en la producción de la leche (Enger *et al*, 2018). Sin embargo, se ha reportado que cambios abruptos en las concentraciones de estas hormonas están asociadas a un desequilibrio de la respuesta inmune innata de la GM (Fig. 6) (Need *et al*, 2014; Lacasse *et al*, 2019; Alhusien & Dang, 2020).

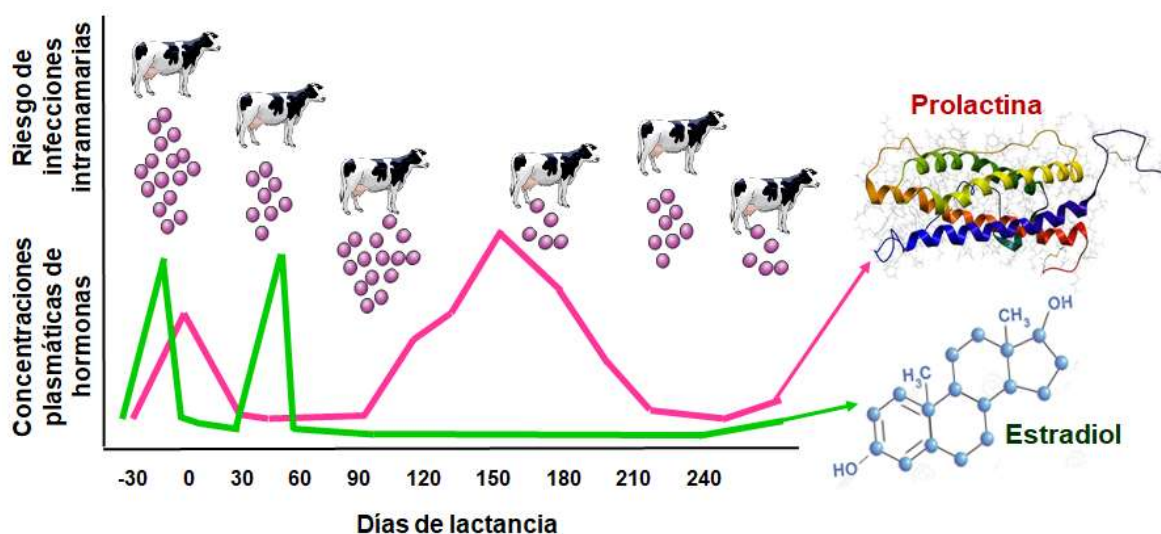


Figura 6. Incidencia de la mastitis bovina. Durante el parto, la lactancia y el periodo seco, las vacas son susceptibles a desarrollar infecciones intramamarias como la mastitis. Además, esta susceptibilidad está asociada a cambios abruptos de hormonas reproductivas, como prolactina y estradiol, las cuales inducen un desequilibrio de la respuesta inmune innata comprometiendo la salud e integridad de la glándula mamaria. Tomado y modificado de Lamote *et al* (2006), y Lacasse *et al* (2019).

3.4.1 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de aproximadamente 23 kDa que se secreta principalmente en la glándula pituitaria a través del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (Borba *et al*, 2018). Como tal, la PRL se expresa como una pro-hormona que está conformada de 227 aminoácidos. Durante el procesamiento, el péptido señal de 28 aminoácidos es cortado de manera proteolítica para dar como resultado la forma madura de 199 aminoácidos, dando lugar a una proteína 23 kDa con una estructura secundaria de alfa-hélice con 3 puentes disulfuro localizados de manera intramolecular (Cys⁴-Cys¹¹, Cys⁵⁸-Cys¹⁷⁴ y Cys¹⁹¹-Cys¹⁹⁹) y una estructura terciaria de forma globular (Teilum *et al*, 2005; Binart, 2017) (Fig. 7A). La PRL hipofisaria es una hormona muy conservada con una

homología del 97% entre primates y un 56% entre primates y roedores, varía ligeramente de tamaño dependiendo de la especie, por ejemplo: en ratas y ratones es de 197 aminoácidos, mientras que en ovejas, cerdos, bovinos y humanos es de 199 aminoácidos (Binart, 2017). Además, esta hormona puede ser producida en sitios extra hipofisarios como la decidua, ovario, próstata, glándula mamaria, tejido adiposo, cerebro y células inmunológicas como linfocitos y macrófagos, en donde pueden presentar diferentes isoformas y desempeñar funciones distintas (Binart, 2017; Borba *et al*, 2018).

Por otra parte, además de la PRL hipofisaria de 23 kDa, existen otras formas moleculares en humanos, que puede ser generadas por: 1) proceso alternativo del transcrito original, 2) proteólisis o 3) por modificaciones post-traduccionales (Freeman *et al*, 2000). La variante de 16kDa se produce por un corte proteolítico y contiene el N-terminal de la proteína madura y solo se une a las células endoteliales donde tiene propiedades anti-angiogénicas (Triebel *et al*, 2015). Además, existen otras 2 isoformas de la proteína, una de ellas es la isoforma presenta un peso molecular de 48-56 kDa y es llamada "big"-prolactina, y otra que es un complejo entre la prolactina de 23 kDa y anticuerpos IgG que presenta un peso molecular de >100 kDa llamada macro prolactina, estas dos últimas isoformas presentan una actividad biológica disminuida (Bole-Feysot *et al*, 1998; Binart *et al*, 2017). En mujeres la concentración de PRL en suero puede variar entre 15 a 25 ng/mL en condiciones basales, algunas variaciones fisiológicas pueden estar asociadas con el ciclo circadiano. Sin embargo, durante el embarazo los niveles de PRL sérica incrementan progresivamente hasta alcanzar niveles de 300 a 600 ng/mL (Majundar & Mangal, 2015).

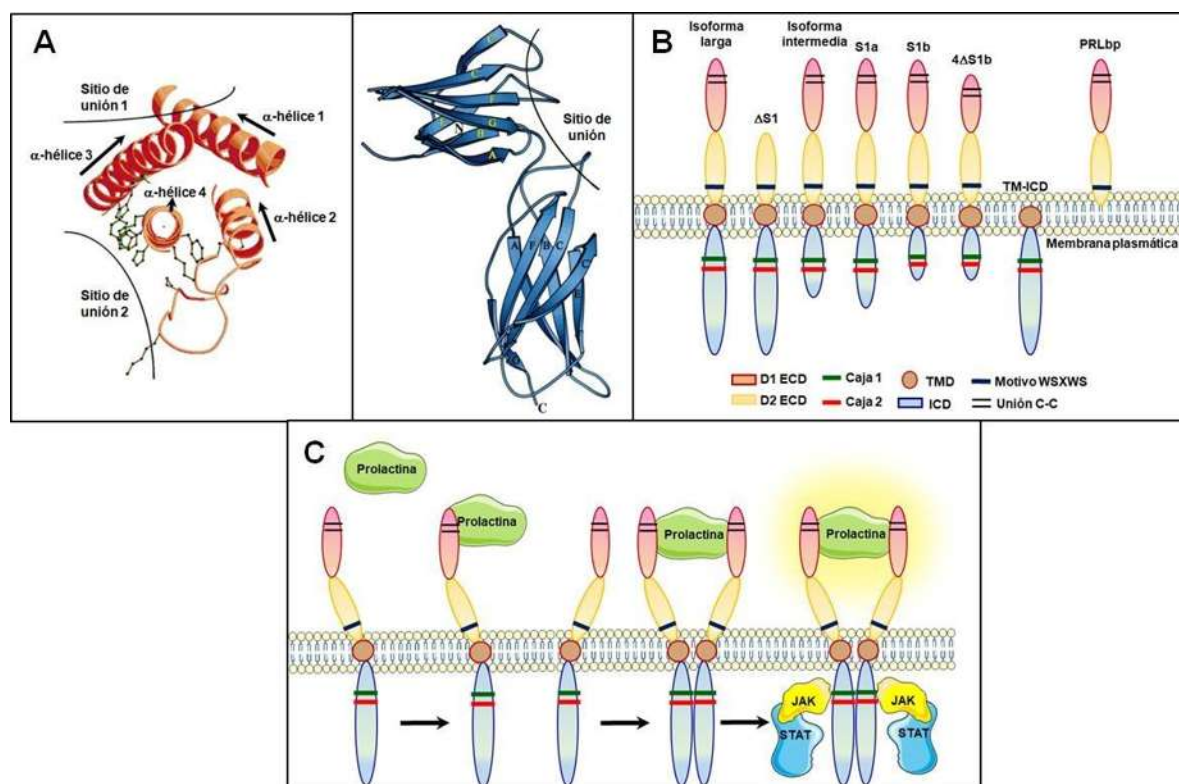


Figura 7. Estructura y función de la prolactina y su receptor. **A)** La prolactina presenta una estructura terciaria con 4 dominios α -hélice, se indican los sitios de unión a su receptor. **B)** El receptor de prolactina presenta dos dominios β -plegada, se señala el sitio de unión a la prolactina. Además, se muestran las diferentes isoformas del receptor de prolactina producidos por edición alternativa, se muestra que la mayoría de las isoformas presentan el dominio extracelular 1 (D1 ECD) y 2 (D2 ECD), transmembranal (TMD), intracelular (ICD), la caja 1, la caja 2, y el motivo WSXWS. **C)** La activación del receptor de prolactina obedece a una estequiometría de 1:2 (1 molécula de PRL por 2 monómeros del receptor que se dimerizan). La prolactina se une a un primer monómero formando un complejo inactivo. Luego este complejo se une a un segundo monómero, formando un segundo complejo inactivo, el cual finalmente es activado cuando las moléculas JAK y STAT son reclutadas en el ICD del receptor. Tomado y modificado de Bole-Feysot *et al* (1998), y Binart *et al* (2017).

A la PRL se le han atribuido más de 300 funciones fisiológicas como la osmorregulación, el metabolismo, procesos reproductivos, la lactación, el comportamiento materno y la modulación inmunológica (Freeman *et al*, 2000). Además, por sus acciones se le ha atribuido un efecto de citocina del tipo Th1 (Suárez A., L. P., *et al*; 2015). Estas funciones biológicas son mediadas a través de un receptor específico, el receptor de PRL (PRLR, por sus siglas en inglés). La edición alternativa del PRLR genera diversas isoformas de este receptor que incluyen las isoformas larga, intermedia y pequeña (Fig. 7B). En bovinos se encuentran las isoformas corta y larga. Estos receptores constan de un dominio

extracelular (donde se presenta la unión con su ligando) y se encuentra conservado en todas las variantes de los PRLR, además de una región transmembranal y un dominio intracelular de longitud variable (Oakes *et al*, 2008; Binart, 2017).

La activación del PRLR se lleva a cabo de manera secuencial, primero una molécula de PRL se une a través del sitio de unión 1 al PRLR formando un complejo inactivo, este complejo induce la dimerización del receptor a través de la unión del sitio de unión 2 de PRL con el segundo receptor, formando el complejo activo. Esto indica que la activación del PRLR obedece a una estequiometría de 1:2 (1 molécula de PRL por 2 monómeros del receptor) (Fig. 7C). Después de la dimerización del receptor, se induce una señalización que activa factores de transcripción (ej. STAT5, c-Jun y c-Myc) involucrados en la proliferación y sobrevivencia celular (Bernard *et al*, 2015; Binart, 2017).

Los estudios funcionales realizados desde el descubrimiento de la PRL han establecido claramente que el papel principal de esta hormona en los mamíferos es inducir la diferenciación de las glándulas mamarias durante el embarazo, permitiendo la proliferación de las células del epitelio mamario y asegurar la producción de la leche después del parto. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la señalización del PRLR conduce a la regulación de muchas funciones que se extienden más allá de la mamopoyesis y lactopoyesis, entre las que se incluyen: la reproducción femenina, el recambio óseo, homeostasis hipofisaria, tolerancia a la glucosa, el comportamiento materno y la modulación de la respuesta inmunológica (Binart, 2017; Borba *et al*, 2018; Lacasse *et al*, 2019).

3.4.2 Estrógenos y el 17 β -estradiol

Los estrógenos son hormonas esteroideas que regulan de manera importante muchos de los aspectos de desarrollo y función, tanto en machos como en hembras de distintas especies. Los estrógenos son producidos principalmente en las gónadas, en las hembras son producidos en los folículos ováricos, cuerpo lúteo y la placenta. Además, también son producidos en menor cantidad en tejidos no reproductivos como la glándula suprarrenal, tejido adiposo, mama e hígado. Por otra parte, en los machos un 20% de los estrógenos es producido en los testículos y el resto en el tejido adiposo, huesos, piel y cerebro (López & Tena-Sempere, 2015;

Cook *et al*, 2017; Yang *et al*, 2017).

La estructura química de los estrógenos se caracteriza por la presencia de cuatro anillos: 1) un grupo fenólico (anillo A), 2) dos ciclohexanos y 3) un anillo ciclopentano (anillo D). Existen 4 tipos de estrógenos: estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) y estetrol (E4) (Thomas & Potter, 2013; Medina-Estrada *et al*, 2018). Los estrógenos son sintetizados a partir del colesterol de donde se derivan los andrógenos como la testosterona, esta última es convertida por la aromatasa (P450aro o CYP19), la cual elimina un carbono (C19) y aromatiza el anillo A, para dar origen al 17 β -estradiol (E2) (Fig. 8) (Medina-Estrada *et al*, 2018). Otra vía de síntesis se presenta a través de la conversión de la androstenediona a estrona (E1), la cual es catalizada por la aromatasa, y a su vez la E3 es convertida a 17 β -estradiol, reacción catalizada por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (17 β -HSD1, por sus siglas en inglés) (Thomas & Potter, 2013; Medina- Estrada I., *et al*, 2018)

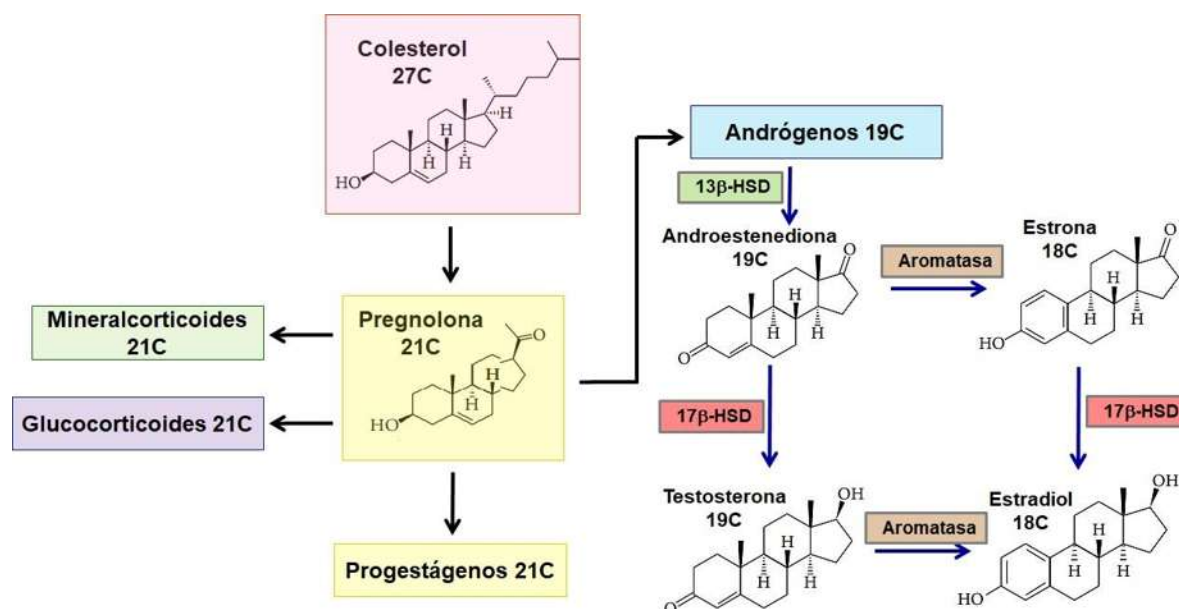


Figura 8. Biosíntesis del 17 β -estradiol. La síntesis de los estrógenos se da a partir del colesterol, el cual es un precursor de todos los esteroides. El colesterol es transformado a pregnolona (21C), el cual es un precursor de mineralcorticoides (21C), glucocorticoides (21C) y andrógenos (19C). La pregnolona es transformada a androstenediona (C19), través de una serie de reacciones en cuyo paso final la 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) participa de manera importante. Después, por acción de la 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), la androstenediona es transformada en testosterona (C19) y esta a su vez es transformada, por actividad de la aromatasa en 17 β -estradiol (C18). Además, a partir de la androstenediona se produce la estrona, por actividad de la aromatasa, y después es producido el 17 β -estradiol, por actividad de la 17 β -HSD. Tomado y modificado de Medina-Estrada I., *et al*, 2018.

El E2 es sintetizado principalmente en los ovarios y es el estrógeno más potente y abundante en la etapa reproductiva de las hembras. El rango de concentración en suero varía según la especie, pero oscila entre los 50 pg/mL (concentraciones basales) llegando alcanzar hasta los 1,500 pg/mL (concentraciones suprafisiológicas) durante la fase pre-ovulatoria (Lamote *et al*, 2006; Medina-Estrada *et al*, 2018), y en el periodo gestacional oscila entre 100- 200 ng/mL (Kumar & Mangon, 2012).

Los principales efectos del E2 están asociados con las funciones reproductivas o sexuales, aunque también está involucrados en el desarrollo de diferentes patologías, tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y procesos infecciosos, en donde la respuesta inmune puede ser alterada por esta hormona (Nadkarni & McArthur, 2013; Barakat *et al*, 2016).

Los principales blancos de E2 son los órganos reproductivos femeninos (ovario, útero y glándula mamaria). Además, E2 actúa sobre una gran variedad de poblaciones celulares; sin embargo, su principal blanco son las células epiteliales, en donde regula procesos como la diferenciación, proliferación y apoptosis celular, procesos asociados al ciclo reproductivo de las hembras como la ovulación y la lactancia. Además, esta hormona participa de manera importante en la regulación de otros procesos como el metabolismo (distribución de grasa en el cuerpo), hemodinámica (tono vascular), reproducción (ovulación, desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios, crecimiento e involución de la glándula mamaria), y procesos patológicos como el cáncer y enfermedades infecciosas, en donde la respuesta inmunológica se ve comprometida (Medina-Estrada *et al*, 2018).

Los efectos del E2 son mediados por el receptor de estrógenos (ERs, por sus siglas en inglés) y se clasifican como ER α (565 aminoácidos) y ER β (530 aminoácidos), descubiertos por primera vez en 1973 en el útero de rata (Proznits *et al*, 2007). La distribución y la función de estos receptores varía en función del tejido en el que se encuentren (Cheskis *et al*, 2007). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales funcionan como factores transcripcionales o asociados con otros factores de transcripción para regular la expresión de genes relacionados a las funciones ya descritas por el E2. Además de los receptores nucleares, existe un tercer ER, llamado GPR30, el cual pertenece a

la familia de los receptores acoplados a proteínas G. Este receptor es localizado en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico y está asociado principalmente a respuestas no genómicas (modificaciones en el flujo de calcio, liberación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno) (Medina-Estrada *et al*, 2018).

Los ERs α y β se mantienen inactivos a través de formar un complejo con proteínas de choque térmico (Hsp70 y Hsp90). Una vez que se une a su ligando (ej. E2), se induce un cambio conformacional que permite que el complejo inactivo se disocie y se fosforile, lo cual promueve su activación y su posterior traslocación al núcleo. En el núcleo, el ER interactúa con los elementos de respuesta a estradiol (EREs, por sus siglas en inglés) presentes en la secuencia del ADN (una secuencia de repeticiones palindrómica de 5'-GGTCAnnTGACC-3'). La señalización a través de EREs puede desencadenar la activación de elementos asociados al crecimiento y proliferación celular (*c-fos*, *c-myc*, EGF, p21, IGF1 y Raf) (Farzaneh & Zarghi, 2016). Adicionalmente, la señalización derivada de los ERs puede inducir la producción de óxido nítrico, la secreción de la PRL, modular el flujo de los canales de calcio y regular la respuesta inmunológica a través de las vías de señalización de MAPKs, AKT y PKC (Monteiro *et al*, 2014; Medina- estrada *et al*, 2016). Además, la interacción del ER α con las MAPKs favorece la fosforilación de co-activadores como SRC3, RIIP 140, p300 y CREB1, promoviendo el relajamiento de la cromatina y la interacción con los EREs (Simpson & Santen, 2015), lo cual favorece la transcripción de los genes.

3.4.3 Efecto Inmunomodulador de la prolactina

Las hormonas lactogénicas como la PRL, además de estar asociadas a los cambios estructurales y funcionales de la glándula mamaria durante el periodo seco y el inicio de la lactancia en bovinos, también tiene un papel relevante en la respuesta inmunológica (Suárez *et al*, 2015; Savino *et al*, 2017) . Se ha reportado ampliamente que la PRL es producida por diversas células de la respuesta inmunológica (ej. macrófagos, células NK, linfocitos y células epiteliales) en donde modula diferentes procesos como la quimiotaxis, fagocitosis y funciones efectoras como la producción de citocinas y quimiocinas (Suárez *et al*, 2015; Alhussien & Dang,

2020). En estudios realizados en una línea celular inmortalizada de epitelio mamario bovino (MAC-T) se demostró que la PRL dispara una respuesta pro-inflamatoria a través de la activación del factor transcripcional NF- κ B, además de promover la quimiotaxis de polimorfonucleares al sitio de la infección, resaltado un papel importante de esta hormona en la mastitis crónica (Boutet *et al*, 2007). En línea con lo anterior, en un modelo *in vitro* de mastitis bovina empleando un cultivo primario de células de epitelio mamario bovino, la PRL a concentraciones fisiológicas (5 ng/mL) y *S. aureus* regulan de manera negativa la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, como β -defensinas y citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , así como la producción de óxido nítrico (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2007). Además, en este mismo modelo de estudio se demostró que la PRL funciona como un regulador de la respuesta inmune innata a través de la activación del receptor TLR2 y no por la vía canónica (activada a través del PRLR), resaltando la relevancia de que la hormona promueve la internalización de la bacteria (Medina-Estrada *et al*, 2015). De manera importante, y tomando en cuenta las funciones inmunomoduladoras de la PRL, se ha implementado el uso de agonistas de la dopamina (por ejemplo: bromocriptina, cabergolina y quinagolida) como terapia prometedora de infecciones intramamarias como la mastitis en el ganado bovino, debido a que su uso en vacas en el periodo de lactancia tardía y en el periodo de secado disminuyen las concentraciones de la PRL, reduciendo de manera importante el riesgo de contraer infecciones en la glándula mamaria (Lacasse *et al*, 2019).

Por otra parte, en ensayos realizados con macrófagos peritoneales de murino se demostró que la PRL a concentraciones de 300 ng/mL mejora de manera significativa la expresión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-12p40, e IFN- γ) a través de las vías JAK/STAT y JNK/MAPKs. A concentraciones supra fisiológicas (1000 ng/mL) la concentración de las citocinas pro-inflamatorias se reduce de manera significativa, pero la expresión de citocinas anti-inflamatorias (IL-10), mediada por la sobre expresión de STAT3, mejora significativamente (Sodhi & Tripathi, 2008). Lo anterior resalta las propiedades inmunomoduladoras de la PRL por lo que es considerada como una citocina, debido a que comparte diversas características con estas moléculas como: 1) participar en la respuesta inmune, 2)

ser sintetizada por múltiples tipos celulares, 3) ser pleiotrópica, 4) actuar en conjunto con otras citocinas para producir efectos sinérgicos o antagónicos (Suárez A *et al*, 2015).

3.4.4 Efecto Inmunomodulador del 17 β -estradiol

La evidencia experimental sugiere que el E2 ejerce sus efectos inmunomoduladores a través de la regulación de los TLRs. Por ejemplo, en el tracto reproductivo humano durante el inicio del ciclo gestacional, E2 (10^{-8} M) a través de ER α modula la vía de señalización desencadenada por el TLR3 (el cual reconoce RNA de doble cadena). El incremento de E2 reduce la abundancia del TLR3 favoreciendo un microambiente anti-inflamatorio (Lesmeister *et al*, 2005). Además, altos niveles de E2 reducen la abundancia de los TLRs en el epitelio endometrial humano afectando directamente la interacción patógeno- hospedero (Kovats, 2015). De manera importante, río abajo de la señalización del TLR2, en el epitelio endometrial de roedores se demostró que el E2 disminuye la secreción de IL-6, esto debido a que E2 inhibió la actividad de las cinasas ERK y p38 (cinasas encontradas en la ruta de señalización de las MAPKs) (Breithaupt *et al*, 2013). Además, en el oviducto de bovino, se encontró que la estimulación con LPS induce la expresión de los receptores TLR4 y TLR2 incrementando los niveles de secreción de IL-1 β y de TNF α ; sin embargo, la adición de E2 (1 ng/mL) revierte los efectos inflamatorios del LPS (Kowsar *et al*, 2013). En el mismo sentido, la producción de óxido nítrico a través de daño mecánico o por la estimulación de LPS en el epitelio intestinal de rata es disminuida por el E2 (Hirata *et al*, 2007; Patel *et al*, 2013). De manera importante se describió que E2 (50 ng/mL) induce una respuesta anti-inflamatoria en células de epitelio mamario bovino desafiadas con *S. aureus* a través de la señalización de ER α , y bajo las mismas condiciones disminuye la internalización la bacteria en las células epiteliales (Medina-Estrada *et al*, 2016). Por otra parte, E2 también regula la actividad de diferentes factores de transcripción. Por ejemplo, se ha descrito que en el músculo liso de ratas y en hepatocitos de ratón, el E2 revierte el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la producción de óxido nítrico, además incrementa la expresión y del inhibidor del factor transcripcional NF- κ B (I κ B), este incremento evita la activación y la traslocación al núcleo de dicho factor y la subsecuente expresión

de genes inflamatorios. Además, en el útero de humano y en células epiteliales del tracto urinario, E2 puede modular la activación de otros factores de transcripción como SP1, STAT, AP-1 y el receptor de vitamina D (VDR, por sus siglas en inglés), los cuales también participan en la regulación de la RII. En este sentido, E2 inhibe la fosforilación de STAT y promueve la activación del VDR a través de la vía de señalización de las MAPKs (Buitrago *et al*, 2007; Villajo *et al*, 2012). Aunado a los efectos anti-inflamatorios del E2, en algunos modelos se ha reportado su actividad antimicrobiana contra distintos patógenos, mediante la producción de péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, en células de epitelio mamario bovino tratado con E2 se demostró la expresión de moléculas antimicrobianas como: la beta defensina 1 (DEFB1, por sus siglas en inglés), beta defensina de neutrófilos bovinos 5 (BNBD5, por sus siglas en inglés) y la psoriasina 100A7 (S100A7). Estos efectos fueron logrados a través de la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF1; además, estos eventos se relacionaron con la disminución de la internalización de *S. aureus* (Medina-Estrada *et al*, 2016).

Lo anterior remarca de manera importante los efectos del E2 sobre la regulación de la respuesta inmunológica en los epitelios del tracto reproductor de las hembras, debido a: 1) que es uno de los blancos principales por parte de esta hormona, 2) por sus funciones íntimamente asociadas a la reproducción, y 3) por la relevancia que presentan en la defensa del hospedero.

3.5 Epigenética

El término epigenética fue descrito por primera vez por Conrad Waddington en 1942 para referirse al estudio de las interacciones entre los genes y el ambiente que se producen en los organismos. Waddington, a través de sus estudios en embriología, la definió como el estudio de todos los eventos que llevan el complejo proceso de desarrollo que media entre genotipo y fenotipo (Conrad, 1939). Posteriormente, Huxley en 1956 redefinió el término cuando en sus estudios observó que la variación en la especificación del fenotipo celular no necesariamente está relacionada con la secuencia del gen. Además, con base a los trabajos de Waddington y Huxley, en 1958 David Nanney usó el termino epigenética para distinguir entre diferentes tipos de control celular, proponiendo que los componentes

genéticos que son los responsables del mantenimiento de los genes (expresados o no expresados) son mediados por los mecanismos auxiliares que controlan la expresión de genes específicos. Desde entonces la definición del término epigenética ha evolucionado gradualmente con el tiempo (Deans & Maggert , 2015). Hoy en día la epigenética puede ser definida como una serie de cambios en el fenotipo, lo cuales pueden ser heredados (en células somáticas) y que son provocados por diferentes mecanismos que generan cambios en la cromatina, en donde regulan procesos moleculares del ADN como la replicación, transcripción y reparación sin producir cambios en la secuencia de nucleótidos del material genético y que pueden ser reversibles, además de ser mediados por el medio ambiente en el que se encuentra la célula (Allis & Jenuwein, 2016).

Las células eucariotas poseen una gran cantidad de ADN que se encuentra confinado en el núcleo de forma compacta en una estructura conocida como cromatina, la cual esta plegada en un complejo proteína-ADN llamado nucleosoma. Este nucleosoma está constituido por un octámero de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que están recubiertas por 146 pb de ADN, y estas unidades nucleosomales están conectadas por la histona H1 (Luger *et al*, 1997). Además, estas estructuras pueden sufrir modificaciones tanto a nivel de ADN como de las histonas, generando regiones del ADN expuestas en menor o mayor grado a la maquinaria transcripcional, y estos cambios son regulados por mecanismos epigenéticos que incluyen: 1) metilación del ADN, 2) modificaciones postraduccionales de las histonas, 3) remodelado de la cromatina, 4) ARN no codificante y 5) dinámica nuclear (Yan *et al*, 2010).

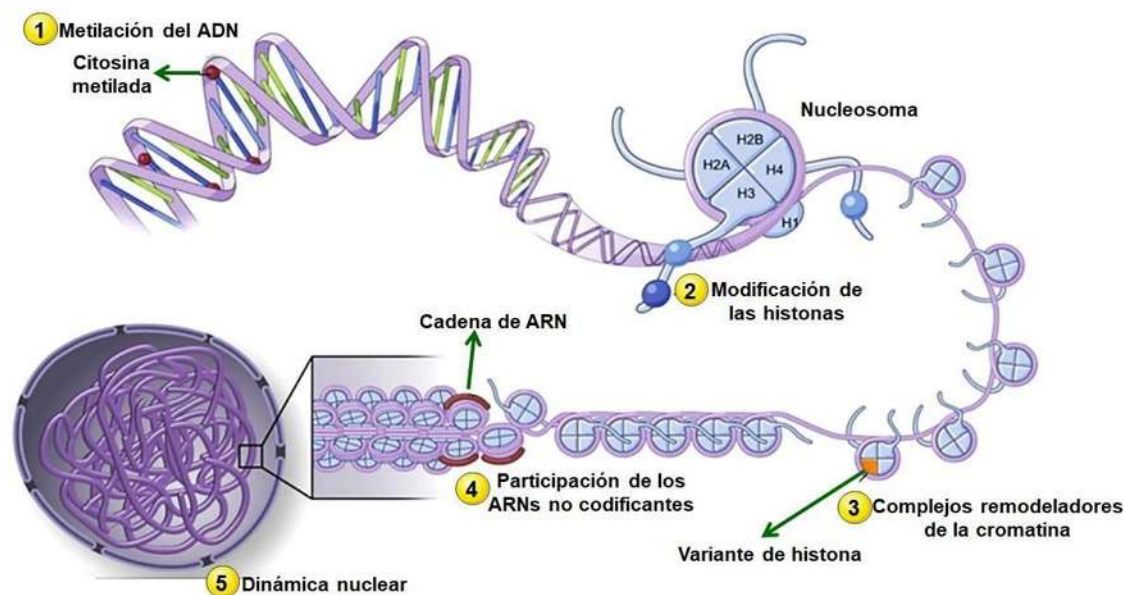


Figura 9. Mecanismos de regulación epigenética. La regulación de la expresión génica está regulada a diferentes niveles por mecanismos epigenéticos, los cuales incluyen: 1) metilación del ADN, 2) modificaciones postraduccionales (principalmente acetilación y metilación) en las histonas, 3) actividad de los complejos remodeladores de la cromatina, 4) actividad de ARNs no codificantes (como miARNs), y 5) la dinámica nuclear. Tomado y modificado de Yan *et al* (2010).

El primer nivel de regulación es la metilación del ADN y se lleva a cabo en regiones del ADN conocidas como islas CpG (regiones ricas en los dinucleótidos citosina-guanina), en el cual un grupo metilo es transferido a la posición 5' del anillo de citosina generando 5-metilcitosina. Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMTs, por sus siglas en inglés), las cuales se encuentran agrupadas en 2 familias: DNMT1 y DNMT3 (3a y 3b). Generalmente este mecanismo está asociado a la represión de los genes debido a que genera una compactación de la cromatina haciendo inaccesible a la maquinaria transcripción en los sitios de inicio de la transcripción, regulando procesos como la gametogénesis, el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Krause *et al*, 2016; Allis & Jenuwein, 2016; Chen *et al*, 2017; Zhang & Cao, 2019).

En el segundo nivel de la regulación epigenética se encuentran las modificaciones postraduccionales en las histonas, estas son modificaciones químicas covalentes que se llevan a cabo generalmente en los residuos de lisina (K) de los tallos de las histonas y participan en el control de la regulación de la cromatina y la expresión génica. Entre las modificaciones más estudiadas se encuentran la acetilación y la metilación. La acetilación de las histonas involucra la

transferencia de un grupo acetilo al grupo amino de la lisina, lo cual promueve que las cargas positivas de las lisinas se neutralicen, alterando las interacciones electrostáticas en la cromatina favoreciendo el relajamiento de esta estructura y permitiendo la expresión de genes. Esta reacción es realizada por un grupo de enzimas llamadas acetiltransferasas de histona (HATs, por sus siglas en inglés). Como parte de la regulación de la acetilación, las desacetilasas de histona (HDACs, por sus siglas en inglés) son enzimas que quitan los grupos acetilo de los residuos de lisina y se han descrito 4 clases (HDACI, II, III y IV). De manera importante, la actividad de las HDACs está relacionada con el silenciamiento de genes, progresión del ciclo celular, diferenciación y a la respuesta inducida por el daño al ADN (Krause *et al*, 2016; Allis & Jenuwein, 2016; Chen *et al*, 2017; Zhang & Cao, 2019).

Por otra parte, los residuos de lisina también pueden sufrir metilaciones. El efecto de esta modificación no está relacionado con un resultado definido debido a que depende del residuo en donde se lleve a cabo la metilación y del grado de metilación (mono, di o tri-metilado) de dicho residuo. Por ejemplo, la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3) está asociada a la expresión de genes, mientras que la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3) está asociada a la represión de genes. De igual manera, el grupo metilo puede ser removido por la actividad de las enzimas desmetilasas de histona (HDMTs, por sus siglas en inglés) (Krause *et al*, 2016; Allis & Jenuwein, 2016; Chen *et al*, 2017; Zhang & Cao, 2019).

En el tercer nivel de regulación epigenética se encuentra el remodelamiento de la cromatina, un proceso dependiente de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés). En este proceso la interacción del ADN-histonas es parcialmente liberada permitiendo que las histonas se deslicen fácilmente sobre la cadena de ADN, reestructurando los nucleosomas. Además, este proceso permite el remplazo de las histonas H2 modificadas y no modificadas, lo cual conlleva a una apertura de la cromatina. Cuatro complejos reguladores de la cromatina han sido descritos (SWI/SNF, ISWI, CHD y INO80) y están relacionados con la progresión del ciclo celular, supresión de tumores, replicación del ADN, diferenciación y regulación del cromosoma X (Clapier *et al*, 2017; Zhang & Cao X, 2019).

El cuarto nivel de regulación está conformado por ARN no codificantes,

dentro de estos los micro ARN (miRNAs, por sus siglas en inglés) son los más estudiados. Los miRNAs son pequeñas moléculas de ARN (18-22 pb) que interactúan con la región no traducible (UTR, por sus siglas en inglés) del extremo 3' del ARN mensajero (ARNm) blanco para inducir la degradación de dicho ARNm o inhibir la traducción de la proteína. Sin embargo, se ha reportado que algunos miRNAs interactúan en otras regiones, por ejemplo, en el extremo 5'UTR, secuencias codificantes y en los promotores de los genes (Ha & Kim, 2014; O'Brien *et al*, 2018; Zhang & Cao, 2019).

Finalmente, en el quinto nivel de regulación epigenética se encuentra la dinámica nuclear. Está formada por dos sitios, uno de ellos es la lámina nuclear, en donde existe poca densidad de genes y por lo tanto una baja actividad transcripcional, mientras que, en la zona central, donde se encuentra el núcleo, se ha identificado una mayor actividad transcripcional y por lo tanto una mayor expresión génica (Yan *et al*, 2010).

3.5.1 Mecanismos epigenéticos relacionados con la prolactina y el 17 β -estradiol

De manera general se ha descrito que la glándula mamaria de varias especies de mamíferos sufre cambios epigenéticos durante su diferenciación y desarrollo a lo largo de la vida (Holliday *et al*, 2018; Ivanova *et al*, 2021). En bovinos, se ha reportado que la PRL genera modificaciones epigenéticas asociadas con la expresión de genes de proteínas de la leche, como la κ -caseína, β -lactoglobulina o proteína ácida del suero (WAP, por sus siglas en inglés en el ganado bovino y su producción se ve influenciada por factores como la nutrición, salud de la ubre, frecuencia de ordeña, fotoperiodo, enfermedades intramamarias como la mastitis y por la concentración de las hormonas lactogénicas (Bulger & Groudine, 2010; Singh *et al* 2010). Además, existe una correlación negativa entre la expresión de genes que codifican para las proteínas de la leche y la metilación del ADN, ya que cuando la región promotora de estos genes se encuentra hipometilada, permite que la expresión de dichos genes se lleve a cabo (Vanselow *et al*, 2006; Singh *et al*, 2010; Rijnkels *et al*, 2013). En línea con lo anterior, en estudios en ratones se demostró que cuando el gene de la α -caseína está hipermetilado, su expresión se reprime,

asociando este evento a la involución de la glándula mamaria y el cese de la lactancia (Nguyen *et al*, 2014). De manera importante, el efecto de las hormonas lactogénicas sobre la expresión de genes que codifican para las proteínas de leche como las caseínas, están asociados con cambios en las modificaciones en las histonas y en el reclutamiento de factores transcripcionales (Lemay *et al*, 2013; Ivanova *et al*, 2021).

Por otra parte, el efecto de las hormonas lactogénicas como PRL y E2 sobre la expresión de genes relacionados con la producción de la leche se ha descrito en células epiteliales mamarias de murinos y bovinos, en donde se encontró incrementos en la acetilación global de la histona H3 (H3ac) y en la metilación de la marca H3K9me2 (marca relacionada al relajamiento de la cromatina); ambas marcas se encontraron en la región promotora modulando la expresión de genes que codifican para proteínas como la caseína y la proteína WSP; además de la lactosa (Montazer-Torbati *et al*, 2008; Rijnkels *et al*, 2013). Recientemente se demostró en un modelo *in vitro* de mastitis subclínica bovina que las hormonas PRL y E2 regulan la expresión de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2 durante la infección con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Lo anterior demuestra que la regulación epigenética de los genes involucrados en los procesos fisiológicos (por ejemplo, la lactancia y la respuesta inmunológica) están regulados por hormonas lactogénicas. Además, evidencia que demuestre lo anterior, hasta el momento es escasa.

3.5.1 Mecanismos epigenéticos relacionados a enfermedades infecciosas

De manera importante se ha demostrado en investigaciones de la interacción hospedero-patógeno, que microorganismos como las bacterias han desarrollado estrategias sofisticadas que le permiten remodelar el epigenoma del hospedero y evadir la respuesta inmune (Jurdziński *et al*, 2018; Fischer, 2020; Fol *et al*, 2020). Por ejemplo, en estudios en cáncer gástrico relacionado a la infección por *Helicobacter pylori* se identificó alteraciones en la metilación del ADN en la región promotora de genes supresores de tumores. Interesantemente, *Mycobacterium leprae* indujo la reprogramación de células de Schwann (células tipo glial que rodean el contorno de los axones) en células tipo tallo que están asociadas con alteraciones en la metilación y en la promoción de la diseminación del bacilo. Además, las

bacterias pueden modular las marcas epigenéticas del hospedero de manera indirecta a través de sus efectos sobre la señalización promovida por las MAPKs. Por ejemplo, *Bacillus anthracis* y *M. tuberculosis* modulan cambios en la fosforilación y acetilación de la histona H3 dependientes de las MAPKs, causando cambios en la activación de la respuesta inflamatoria por parte de las células epiteliales y de macrófagos (Jurdziński *et al*, 2018). Así mismo, la modulación de la expresión de los miRNAs asociados a procesos biológicos como la respuesta inmune, es otro de las estrategias adoptadas por las bacterias para sobrevivir en las células hospederas (Das *et al*, 2016). Por ejemplo, *M. tuberculosis* regula de manera negativa la expresión del miRNA Let-7f, el cual tiene como objetivo el ARNm de la proteína A20, un inhibidor del factor transcripcional de NF-κB. La regulación negativa de Let-7f fue acompañada por una sobre expresión de la proteína A20 inhibiendo la respuesta pro-inflamatoria en ratones infectados con la bacteria. Esto refleja que *M. tuberculosis* manipula la expresión de Let-7f para sobrevivir dentro de las células hospederas (Kumar *et al*, 2015). Lo anterior refleja que los patógenos pueden inducir cambios epigenéticos en las células hospederas a través de la manipulación de las vías de señalización activadas durante el proceso de infección, resaltando una íntima comunicación entre los eventos epigenéticos y de señalización que les proporciona a los microorganismos patógenos una ventaja sobre la célula hospedera en su capacidad de evadir el sistema inmune de manera exitosa.

En lo particular, la regulación epigenética ocasionada por *S. aureus* en un modelo murino de mastitis indujo la hiperacetilación de las histonas H3K9 y H3K14, así como la modulación de miRNAs que están relacionados con la expresión de genes pro y anti-inflamatorios (Modak *et al*, 2014). Además, en linfocitos provenientes de vacas con mastitis subclínica, se observaron altos niveles de la marca H3K27me3, una marca estrechamente relacionada con la compactación de la cromatina y el silenciamiento de genes relacionados a la respuesta inmune innata (He *et al*, 2016). Así mismo, *S. aureus* puede modular otros mecanismos epigenéticos como los miRNAs. Mediante análisis transcriptómicos y acercamientos moleculares, se ha descrito la presencia de más de 350 miRNAs que están directamente relacionados, además de otros procesos, con la respuesta inmunológica asociada a la infección con *S. aureus*, los cuales pueden estar

modulando la respuesta inmunológica montada por el hospedero que le permite evadir dicha respuesta, favoreciendo su éxito en el establecimiento de la infección (Lai *et al*, 2020; Do, 2021; Tucker *et al*, 2021).

3.6. Antecedentes

En el grupo de trabajo se ha demostrado la importancia de la prolactina y el 17 β -estradiol en el establecimiento de la infección de las CEMB por *S. aureus*. En este sentido, se ha demostrado que la PRL a concentraciones fisiológicas (5 ng/mL) promueve la internalización de *S. aureus* (Ochoa-Zarzosa *et al*, 2007; Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008), lo que se relaciona con la expresión y el incremento de la abundancia en la membrana del receptor TLR2 y de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Medina-Estrada *et al*, 2015). Así mismo, PRL induce la activación de los factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, promoviendo la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-1 β , TNF α , IL-6 y de mediadores inflamatorios como el NO a través de la activación de la iNOS, inhibiendo la expresión de genes anti-inflamatorios (IL-10) y de péptidos antimicrobianos (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008; Lara-Zarate *et al*, 2011; Medina-Estrada *et al*, 2015). Notablemente, *S. aureus* inhibe el perfil pro- inflamatorio desencadenado por la PRL (Gutiérrez-Barroso A., *et al*, 2008; Lara- Zarate L., *et al*, 2011; Medina-Estrada I., *et al*, 2015) (Fig. 10A).

Por otra parte, E2 a concentraciones fisiológicas (50 pg/mL) disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Medina-Estrada *et al*, 2016). Además, induce la activación de factores de transcripción como AP-1, NF1 y ER reduciendo la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-1 β , TNF α , IL-6 (de forma basal o inducidos por *S. aureus*), promoviendo una respuesta anti- inflamatoria a través de la expresión de IL-10 y favoreciendo una respuesta antimicrobiana mediante la expresión de péptidos antimicrobianos (DEFB1, DEFB5 y S100A7) (Medina-Estrada *et al*, 2016; Medina Estrada *et al*, 2018). A pesar de que E2 induce la expresión del receptor TLR2, no promueve la abundancia en la membrana de este, un efecto similar fue observado cuando se evaluó la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Medina-Estrada *et al*, 2016). Aunado a esto, E2 puede bloquear la señalización del mecanismo tipo Zipper a través de la inhibición de la actividad de la cinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés), resultando en la disminución de la internalización de la bacteria

(Fig. 10B) (Medina-Estrada *et al*, 2018).

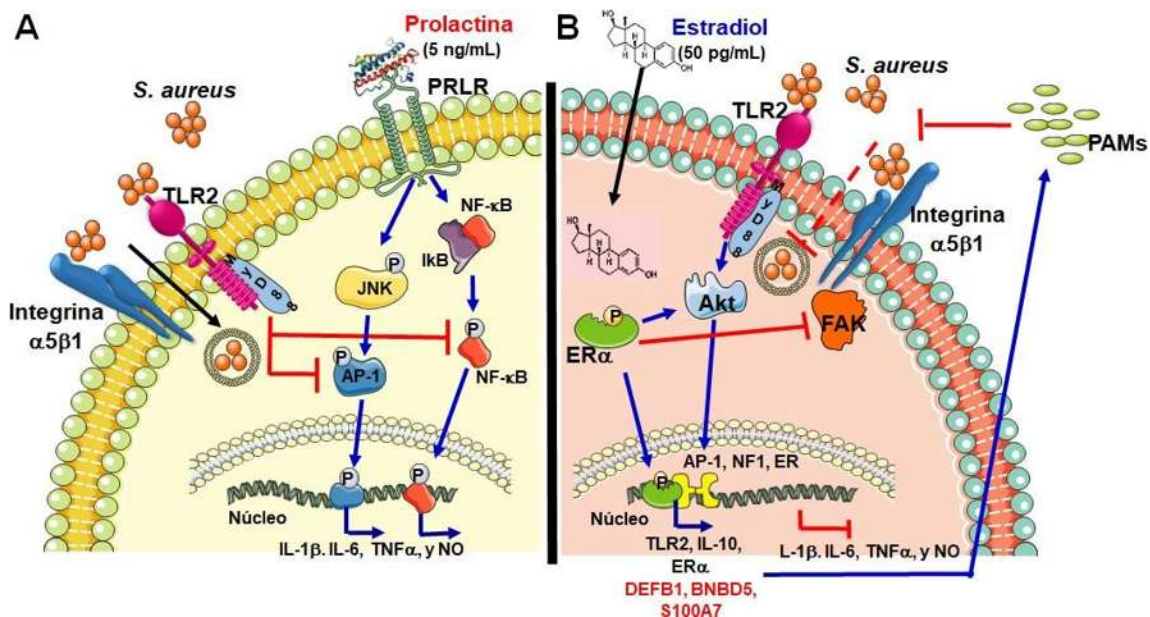


Figura 10. Efecto Inmunomodulador de la prolactina y 17β-estradiol en células de epitelio mamario durante el desafío con *S. aureus*. A) La prolactina a concentraciones fisiológicas (5 ng/mL) induce la internalización de *S. aureus*, la cual es mediada por la integrina α5β1. Además, induce una respuesta inflamatoria a través de la activación de diferentes factores de transcripción (AP-1 y NFκB), la producción de NO y la abundancia en la membrana del receptor TLR2 en las CEMB. B) El 17β-estradiol a concentraciones fisiológicas (50 pg/mL) reduce la internalización de *S. aureus* a través de la inhibición de la cinasa de adhesión focal (FAK). Además, mediada por el receptor de estrógenos alfa (ERα) induce una respuesta anti- inflamatoria y antimicrobiana y la abundancia en la membrana del receptor TLR2 e inhibe la respuesta inflamatoria.

Recientemente en el grupo de trabajo se demostró que el tratamiento con la mezcla hormonal (PRL + E2) en CEMB durante la infección con *S. aureus*, reduce la internalización de la bacteria. Además, esta mezcla hormonal promueve la expresión y la abundancia en la membrana del receptor TLR2 y una regulación positiva de la expresión de elementos de la respuesta inmune innata (IL-8, IL-6, TNFα e IL-10) y de la respuesta antimicrobiana (LAP y BNBD10). Así mismo, la mezcla hormonal regula mecanismos epigenéticos como la acetilación global de la histona H3 y las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2. Estos datos se relacionaron con una disminución de la actividad de las HDACs y de las HDMs, las cuales son importante en la regulación de la expresión de H3K9ac y H3K9me2, respectivamente (Fig. 11) (Salgado-Lora *et al*, 2020). Estos resultados sugieren que PRL y E2 pueden modular la expresión de genes de la respuesta inmune innata y de péptidos antimicrobianos a través de la regulación de la regulación de estas

marcas epigenéticas.

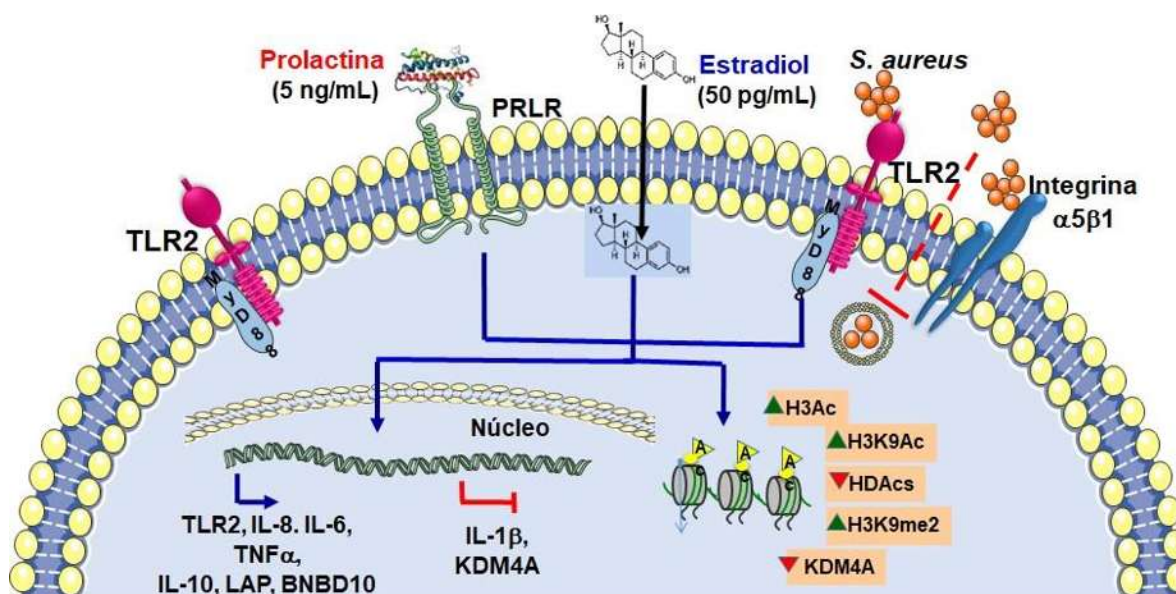


Figura 11. Efecto de la mezcla hormonal sobre la regulación de la RII mediada a través de mecanismos epigenéticos en CEMB desafiadas con *S. aureus*. Prolactina (5 ng/mL) y 17 β -estradiol (50 pg/mL) inducen una reducción en la internalización de *S. aureus* y la abundancia en la membrana del receptor TLR2, y favorece la respuesta anti-inflamatoria y antimicrobiana en las CEMB. Además, la mezcla hormonal favorece la acetilación global de la histona H3 (H3ac) y la expresión de las marcas epigenéticas H3K9ac (marca asociada a la expresión de genes) y H3K9me2 (marca asociada a la represión de genes) y disminuye la actividad de las enzimas epigenéticas HDACs (enzimas que remueven grupos acetilo de las histonas) y KDMs (enzimas que remueven grupos metilo de las histonas) en CEMB.

IV. Justificación

La mastitis bovina subclínica es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria, causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, que afecta de manera dramática la economía de la ganadería lechera alrededor del mundo. A pesar de que las hormonas prolactina y 17β -estradiol desempeñan un papel relevante en el tejido mamario *in vivo*, hoy en día existen escasos reportes relacionados con la regulación epigenética que ejercen sobre los genes de la respuesta inmune innata. En este sentido, se requiere realizar un estudio detallado que permita no solamente determinar el perfil de las modificaciones epigenéticas que las hormonas ejercen sobre las células epiteliales mamarias, sino también sobre otros componentes de la respuesta inmune innata, como los macrófagos. Este estudio permite entender los mecanismos epigenéticos inducidos por las hormonas prolactina y 17β -estradiol durante una infección crónica como la mastitis bovina, lo cual aporta elementos que permitan implementar medidas de control y prevención.

V. Hipótesis

- Las hormonas prolactina y 17β -estradiol inducen modificaciones epigenéticas que regulan diferencialmente la expresión de genes de la respuesta inmune innata en células epiteliales y macrófagos bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

- Caracterizar las modificaciones epigenéticas en genes de la respuesta inmune innata en células de epitelio mamario y macrófagos bovino inducidas por las hormonas prolactina y 17β -estradiol durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar las modificaciones epigenéticas específicas de la histona H3 en la región promotora de los genes de la respuesta inmune innata reguladas por las hormonas prolactina y 17β -estradiol en células de epitelio mamario bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.
- Analizar la expresión de los miRNAs (mi-451, miR-30b, miR-144, miR-146a, miR-155, miR-7863, miR-23a, miR-21 y Let-7a5p) regulada por las hormonas prolactina y 17β -estradiol en células de epitelio mamario y macrófagos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.
- Analizar la expresión de los elementos de la respuesta inmune innata (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico) regulados por las hormonas prolactina y 17β -estradiol en macrófagos bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.
- Determinar las modificaciones epigenéticas globales de la histona H3 reguladas por las hormonas prolactina y 17β -estradiol en macrófagos bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.
- Analizar la actividad de las desacetilasas de histona (HDACs) reguladas por las hormonas prolactina y 17β -estradiol en macrófagos bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.

VII. Estrategia experimental

- Evaluación de las modificaciones específicas de la histona H3 y de la expresión de miRNAs inducidos por la prolactina y el 17 β -estradiol en células de epitelio mamario bovino desafiadas con *Staphylococcus aureus*.

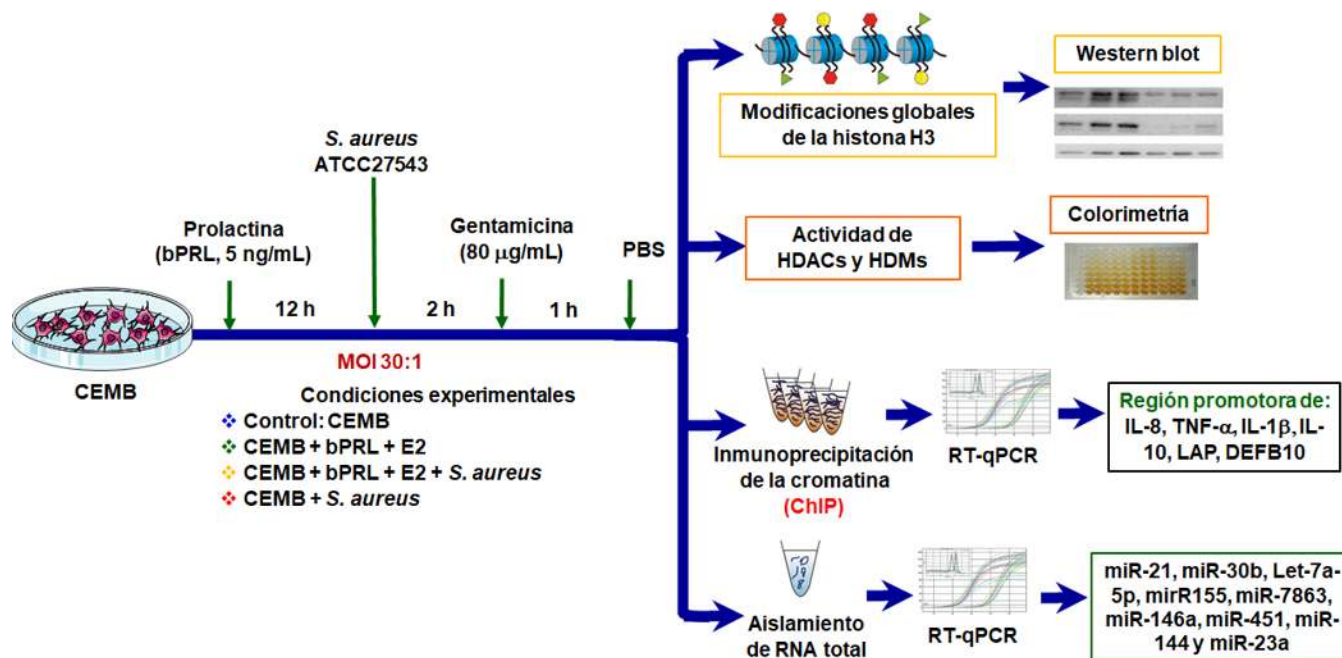


Figura 12. Esquema representativo de la estrategia establecida para la evaluación de la regulación epigenética inducida por bPRL y E2 en CEMB durante el desafío con *S. aureus*. Ensayos de invasión con protección con gentamicina fueron realizados y las CEMB se emplearon para evaluar: 1) Las modificaciones globales de la histona H3 mediante ensayos de Western blot, 2) la actividad de las HDACs y HATs a través de fluorimetría y colorimetría, 3) el enriquecimiento de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2 en la región promotora de los genes mediante ChIP-RTq-PCR, y finalmente 4) la expresión de miRNAs involucrados en la regulación de elementos de la RII a través de RT-qPCR.

- Evaluación de la expresión de los elementos de la respuesta inmune innata, de las modificaciones globales de la histona H3, de la actividad de las HDACs y la expresión de miRNAs inducidos por la prolactina y el 17 β -estradiol en macrófagos bovinos desafiados con *Staphylococcus aureus*.

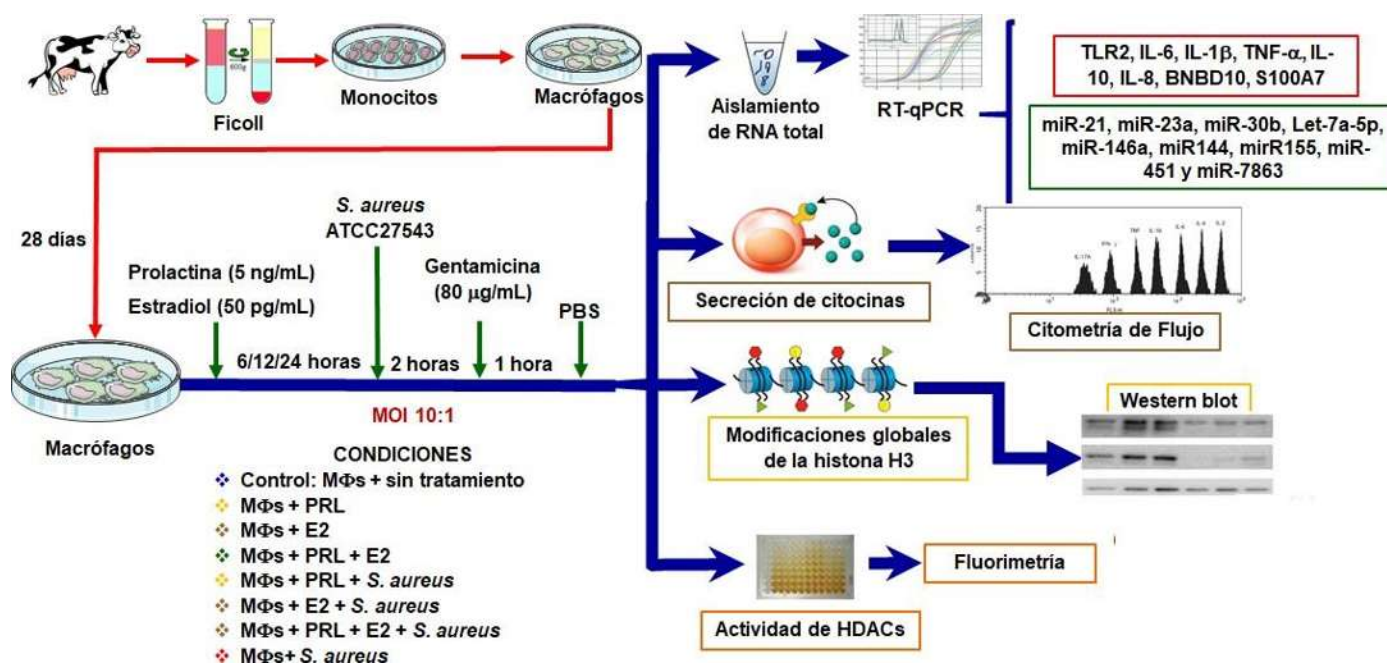


Figura 13. Esquema representativo de la estrategia establecida para la evaluación de la regulación de los elementos de la RII y de los mecanismos epigenéticos inducida por bPRL y E2 en macrófagos bovinos durante el desafío con *S. aureus*. Los macrófagos bovinos fueron diferenciados durante 28 días en medio RPMI (suplementado con piruvato de sodio 1 mM y 20% Suero fetal bovino) de monocitos aislados de sangre periféricas de vacas lactantes (60-90 días) sanas. Ensayos de invasión con protección con gentamicina fueron realizados y los macrófagos bovinos se emplearon para evaluar: 1) la expresión de elementos de la RII (citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos) y miRNAs involucrados en la regulación de elementos de la RII a través de RT-qPCR, 2) la secreción de citocinas mediante citometría de flujo, 3) Las modificaciones globales de la histona H3 mediante ensayos de Western blot, y 4) la actividad de las HDACs a través de fluorimetría.

VIII. Resultados

Los resultados generados en la realización del presente trabajo se presentan en 3 capítulos y un anexo:

1) El capítulo I corresponde al artículo de investigación: "Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*". *Frontiers in Microbiology*, 23 September 2022 Sec. Infectious Agents and Disease. Volume 13 - 2022 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.990478>. ISSN: 1664-302X. Factor de impacto 6.064 (2021 JCR Science Edition).

1) Anexo 1: Prolactina y 17 β -estradiol regulan la expresión de genes de la respuesta inmune innata a través de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, y la expresión de miARNs en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.

2) El capítulo II se presenta el manuscrito: Prolactin and 17 β -estradiol modulates the innate immune response through epigenetics mechanisms in bovine macrophages challenged with *Staphylococcus aureus*.

3) El capítulo III comprende el artículo de divulgación: "Enfermedades autoinmunes bajo la influencia de la epigenética". *Milenaria Ciencia y arte* año 11, no. 18. julio-diciembre de 2021. ISSN: 2954-9436.

8.1 Capítulo I

Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Svetlana Khaiboullina,
University of Nevada, Reno,
United States

REVIEWED BY

Eveline M. Ibeagha-Awemu,
Agriculture and Agri-Food Canada
(AAFC), Canada
Muhammad Zahoor Khan,
University of Agriculture, Dera Ismail
Khan, Pakistan

*CORRESPONDENCE

Alejandra Ochoa-Zarzosa
ochoaz@umich.mx;
alejandra.ochoa@umich.mx

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 10 July 2022

ACCEPTED 30 August 2022

PUBLISHED 23 September 2022

CITATION

Barajas-Mendiola MA,
Salgado-Lora MG, López-Meza JE and
Ochoa-Zarzosa A (2022) Prolactin
regulates H3K9ac and H3K9me2
epigenetic marks and miRNAs
expression in bovine mammary
epithelial cells challenged with
Staphylococcus aureus.
Front. Microbiol. 13:990478.
doi: 10.3389/fmicb.2022.990478

COPYRIGHT

© 2022 Barajas-Mendiola,
Salgado-Lora, López-Meza and
Ochoa-Zarzosa. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](#). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*

Marco Antonio Barajas-Mendiola,
María Guadalupe Salgado-Lora, Joel Edmundo López-Meza
and Alejandra Ochoa-Zarzosa*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

Epigenetic mechanisms are essential in the regulation of immune response during infections. Changes in the levels of reproductive hormones, such as prolactin, compromise the mammary gland's innate immune response (IIR); however, its effect on epigenetic marks is poorly known. This work explored the epigenetic regulation induced by bovine prolactin (bPRL) on bovine mammary epithelial cells (bMECs) challenged with *Staphylococcus aureus*. In this work, bMECs were treated as follows: (1) control cells without any treatment, (2) bMECs treated with bPRL (5 ng/ml) at different times (12 or 24 h), (3) bMECs challenged with *S. aureus* for 2 h, and (4) bMECs treated with bPRL at different times (12 or 24 h), and then challenged with *S. aureus* 2 h. By western blot analyses of histones, we determined that the H3K9ac mark decreased (20%) in bMECs treated with bPRL (12 h) and challenged with *S. aureus*, while the H3K9me2 mark was increased (50%) in the same conditions. Also, this result coincided with an increase (2.3-fold) in HDAC activity analyzed using the cellular histone deacetylase fluorescent kit FLUOR DE LYS®. ChIP-qPCRs were performed to determine if the epigenetic marks detected in the histones correlate with enriched marks in the promoter regions of inflammatory genes associated with the *S. aureus* challenge. The H3K9ac mark was enriched in the promoter region of *IL-1β*, *IL-10*, and *BNBD10* genes (1.5, 2.5, 7.5-fold, respectively) in bMECs treated with bPRL, but in bMECs challenged with *S. aureus* it was reduced. Besides, the H3K9me2 mark was enriched in the promoter region of *IL-1β* and *IL-10* genes (3.5 and 2.5-fold, respectively) in bMECs challenged with *S. aureus* but was inhibited by bPRL. Additionally, the expression of several miRNAs was analyzed by qPCR. Let-7a-5p, miR-21a, miR-30b, miR-155, and

miR-7863 miRNAs were up-regulated (2, 1.5, 10, 1.5, 3.9-fold, respectively) in bMECs challenged with *S. aureus*; however, bPRL induced a down-regulation in the expression of these miRNAs. In conclusion, bPRL induces epigenetic regulation on specific IIR elements, allowing *S. aureus* to persist and evade the host immune response.

KEYWORDS

prolactin, innate immunity, epigenetic, mastitis, *Staphylococcus aureus*

Introduction

Bovine mastitis is an inflammatory disease of the mammary gland that generates significant economic loss to dairy farming worldwide due to reduced milk quality, high treatment costs due to the infection, decrease in milk production, fertility problems, or the cull of animals with chronic mastitis (Huijps et al., 2008; Reshi et al., 2015; Ruegg, 2017; Dego, 2020). This disease usually results from microbial infections, and *Staphylococcus aureus* is the most prevalent causal pathogen in many regions (9–17% from milk samples) (Wilson et al., 1997; Pitkälä et al., 2004). In addition, *S. aureus* is isolated more frequently from subclinical mastitis than clinical mastitis (up to 75% of the cases in US herds) (Dego, 2020). This pathogen can internalize into the mammary gland's epithelial cells, evading the immune system, favoring chronic infections, and failure in antibiotic therapy (Barkema et al., 2006; Atalla et al., 2008; Barlow, 2011; Conlon, 2014; Josse et al., 2017; Lee et al., 2018; Zaatout et al., 2020).

Epigenetic mechanisms (for example, chemical modifications on the DNA and histones) have a relevant role in the regulation of differentiation, function, and health of the mammary gland (Devinoy and Rijnkels, 2010; Ivanova et al., 2021; Wang and Ibeagha-Awemu, 2021). For example, in bovines, the hypomethylation of α -casein gene favors its expression, while methylation represses its expression (Singh et al., 2010). Also, there is an increase in the DNA methylation in peripheral blood lymphocytes isolated from cows with mastitis naturally infected with *S. aureus* (Song et al., 2016). Besides, the histone H3K27me3 mark was up-regulated in isolated peripheral blood lymphocytes from cows with mastitis caused by *S. aureus*. It was related to a down-regulation in the expression of the inflammatory response genes (He et al., 2016). Recently, our research group reported that combined bovine prolactin (bPRL) and 17 β -estradiol modulate the IIR during *S. aureus* infection using an *in vitro* model of bovine mastitis, and these effects were related to the regulation of H3 histone modifications, such as H3K9ac and H3K9me2 (Salgado-Lora et al., 2020).

The epigenetic regulation also may be achieved through micro RNAs (miRNAs), and several reports evidence its role

in bovine bacterial infections (Do et al., 2021). For example, a miRNA transcriptional analysis of MAC-T cell line challenged with *S. aureus* and *Escherichia coli* revealed a single and differential pattern of miRNAs expression, where bta-miR-184, miR-24-3p, miR-148, miR-486, and Let-7a-5p were unique miRNAs expressed during *E. coli* infection, while bta-miR-2339, miR-499, miR-99a, and miR-23a only were expressed during *S. aureus* infection (Jin et al., 2014). In addition, the miRNA expression analysis of monocytes-derived macrophages infected with *Streptococcus agalactiae* showed that miRNAs promote an inflammatory phenotype in these cells regulating the expression of genes coding for *IL-6*, *IL-1 β* , and *TNF- α* (Lewandowska-Sabat et al., 2018).

Mammary gland function is regulated by hormones (for example, prolactin, 17 β -estradiol, progesterone, glucocorticoids). Abrupt hormone levels change during the peripartum and lactation has been associated with the risk of mastitis development due to an impaired IIR (Lamote et al., 2006; Briskin and O'Malley, 2010; Lacasse et al., 2019; Alhussien and Dang, 2020). Prolactin is a hormone of 23 kDa (199 amino acids) synthesized mainly by the lactotrophic cells of the anterior pituitary gland with a relevant role in lactation regulation; however, this hormone also is involved in the regulation of the immune response (Binart, 2017; Savino, 2017; Berczi and Nagy, 2019).

Previously, we reported that bPRL at physiological concentrations (5 ng/ml) induces the internalization of *S. aureus* into bovine mammary epithelial cells (bMECs) and modulates the IIR of these cells. Particularly, bPRL up-regulated the expression of *TNF- α* , *IL-1 β* , and *IL-6* genes; however, cells pre-treated with this hormone inhibited the bacterial induction of these genes. Similarly, the expression of the anti-inflammatory cytokine *IL-10* gene was induced by bPRL (Medina-Estrada et al., 2015). Despite the epigenetic role of bPRL on the mammary gland and IIR, their effects on specific epigenetic modifications in the promoter region of IIR genes and miRNAs expression in intramammary infections caused by *S. aureus* are scarce. Thus, this work aimed to characterize if the effects of bPRL on IIR genes in bMECs occur through epigenetic modifications of the promoter region of inflammatory response

genes. Besides we evaluate if other elements, such as miRNA expression, were modulated by bPRL in cells challenged with *S. aureus*. This information is relevant to knowing the epigenetic mechanisms underlying bovine mastitis, considering that bPRL receptor signal pathways have been associated with this disease (Khan et al., 2020).

Materials and methods

Bovine prolactin

Purified bovine prolactin (bPRL) (AFP7170E) was provided by A. F. Parlow from National Hormone & Peptide Program (NHPP)-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) (Torrance, CA, USA) (Parlow, 2002). The hormone was dissolved in sterile water. We used 5 ng/ml in all experiments, as reported (Gutiérrez-Barroso et al., 2008).

Antibodies

For western blot assays, mouse monoclonal antibody anti-H3K9Ac (1:2,000) (Sc36616, Santa Cruz, CA, USA) and mouse monoclonal antibody anti-H3K9me2 ChIP grade (1:1,000) (ab1220, Abcam, Cambridge, UK) were used as primary antibodies. The rabbit polyclonal antibody anti-H3-ChIP grade (1:5,000) (ab1791, Abcam, Cambridge, UK) was used as load control. Secondary antibodies (1:3,000) raised against mouse and rabbit antibodies coupled to radish peroxidase were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

For the chromatin immunoprecipitation assay (ChIP), 3 µg of the mouse monoclonal antibody anti-H3K9me2-ChIP grade (ab1220, Abcam, Cambridge, UK) and rabbit polyclonal antibody anti-H3K9ac-grade ChIP (ab10812, Abcam, Cambridge, UK) were used in each assay. In addition, rabbit polyclonal antibody anti-H3-grade ChIP (Abcam, ab1791) and the mouse polyclonal antibody anti-IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as reference control and negative isotype control, respectively.

Staphylococcus aureus strain

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 27543) strain was used in this work. This strain was isolated from a case of clinic mastitis and can invade bovine mammary epithelial cells (Medina-Estrada et al., 2015). Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani (LB) broth (BIOXON, Becton Dickinson-México, México) at 37°C. Colony-forming units (CFU) were adjusted by measuring the optical density at 600 nm ($OD\ 0.2 = 9.2 \times 10^7$ CFU/ml).

Primary bovine mammary epithelial cell culture

Bovine mammary epithelial cell (bMECs) were isolated from alveolar tissue of the udder of healthy lactating cows (slaughtered for meat), according to Anaya-López et al. (2006). Cells from passages 2–8 were used in all the experiments. Cells were grown on 90 × 15 mm culture Petri dishes (NEST Biotechnology Co. Wuxi, Jiangsu, China) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12-Ham) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Equitech Bio, Kerrville, TX, USA), insulin 10 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), hydrocortisone 5 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), penicillin 100 U/ml (Gibco, Waltham, MA, USA) streptomycin 100 µg/ml (Gibco) and amphotericin B 1 µg/ml (Sigma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain the complete medium. Prior to the challenge, cells were maintained in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. All the experiments were performed using cells synchronized in DMEM/F12-Ham medium without FBS and antibiotics (incomplete medium) for 24 h. bMECs were treated as follows: (1) control cells without any treatment, (2) bMECs treated with bPRL (5 ng/ml) at different times (12 or 24 h), (3) bMECs challenged with *S. aureus* for 2 h, and (4) bMECs treated with bPRL at different times (12 or 24 h), and then challenged with *S. aureus* 2 h. The interaction of *S. aureus* with bMECs for 2 h is based on previous studies from our research group (Anaya-López et al., 2006; Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Medina-Estrada et al., 2015), which analyzed the IIR to *S. aureus* challenge after this time.

Invasion assays

For ChIP assays, monolayers of 10×10^6 bMECs were grown in complete medium on 60 × 15 mm cell culture Petri dishes (NEST Biotechnology Co. Wuxi, Jiangsu, China) previously coated with 500 µl of type 1 rat collagen (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Cells were incubated until reaching 90% of confluence in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 4 days. For the miRNAs expression assays, monolayers of 2.5×10^5 bMECs were grown in complete medium on 24-well plates (NEST Biotechnology Co., Wuxi, Jiangsu, China) previously coated with 200 µl of type 1 rat collagen. Cells were incubated until reaching 90% of confluence in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. Previous to the challenge, cells were synchronized with the incomplete medium in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. Then, cells were treated with bPRL (5 ng/ml) and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 12 h or 24 h. The invasion assay was performed using the gentamicin protection assay previously described (Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Alva-Murillo et al., 2014). Briefly, bMECs

treated with bPRL were challenged with *S. aureus* (OD = 0.2) at a multiplicity of infection (MOI) of 30:1 (bacteria: cell) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 2 h. Later, cells were washed three times with PBS (pH 7.4), and an incomplete medium supplemented with gentamicin 80 µg/ml was added to eliminate extracellular bacteria for 1 h. Finally, cells were washed three times with PBS (pH 7.4) and were employed for ChIP and miRNAs expression assays as indicated below.

Chromatin immunoprecipitation-qPCR assays

Enrichment of the epigenetic marks on the promoter region of the IIR genes was assessed by ChIP, as described by Carey et al. (2009), with some modifications. DNA-protein complexes of the bMECs (10 × 10⁶ cells) were fixed by cross-linking with 1% of formaldehyde (Baker Analyzed, J. T. Baker) in agitation for 10 min, and the reaction was stopped with glycine 1.35 M (Sigma) for 5 min. Then, cells were washed three times with cold PBS (pH 7.4), detached with a sterile cell scraper (Corning, Manassas, VA, USA), and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 10 ml of cold lysis buffer for ChIP (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) and incubated 10 min on ice. The nuclei were pelleted at 1,500 rpm for 10 min at 4°C, then resuspended in cold lysis buffer with 10 µl of a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). The chromatin was sheared by sonication (6 × 15 s pulses followed by 60 s rest). 300 µl chromatin (100 µg/ml) diluted in cold dilution buffer for ChIP (1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) were supplemented with 3 µl of a cocktail of protease inhibitors and 50 µl of a mixture of protein A agarose/protein G agarose beads (Invitrogen, Waltham, MA, USA) were added to pre-clear the chromatin in agitation at 4°C for 2 h. Next, the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min at 4°C, the supernatants were transferred to new microtubes, and 3 µg of the specific antibody was added and maintained in agitation overnight at 4°C. Again, 50 µl of a mixture of protein A agarose/protein G agarose beads were added to each sample and kept in agitation at 4°C for 2 h. Then, the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 3 min at 4°C, and the supernatants were removed carefully. Further, 1 ml of cold wash buffer for ChIP (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) was added to samples, maintained in agitation for 10 min at room temperature, and centrifuged at 3,000 rpm for 3 min at 4°C, three times. Then, 1 ml of cold final wash buffer for ChIP (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl) was added, maintained in agitation for 10 min at room temperature, and centrifuged at 3,000 rpm for 3 min at 4°C. The beads were resuspended in

300 µl of elution buffer for ChIP (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) supplemented with 0.5 µl of proteinase K (20 µg/µl, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and incubated at 55°C for 2 h. An additional incubation at 65°C for 4 h was performed to reverse the cross-linking. Finally, the samples were incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatants were transferred to new microtubes, and the DNA was isolated by phenol/chloroform extraction and frozen at -80°C until use. The enrichment of epigenetic marks was analyzed by quantitative PCR using the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out with qPCRBIO SyGreen Blue Mix Hi-ROX master mix (Biosystems, Wayne, PA, USA) with specific primers (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for the promoter region of the IIR genes. The primer sequences and the PCR conditions used to amplify the promoter region of the bovine IIR genes are described in Table 1. GAPDH was used as a positive control for the analysis of H3K9ac enrichment and negative control for studying enrichment in H3K9me2.

RNA isolation and miRNAs expression

To analyze the effect of bPRL and *S. aureus* on the miRNAs expression, monolayers of 2.5 × 10⁵ cells were cultured in 24-well plates (NEST, Biotechnology Co., Wuxi, Jiangsu, China) and incubated with bPRL (5 ng/ml) for 12 h and challenged or not with *S. aureus* (MOI 30:1). The total RNA was extracted using the Trizol™ Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The integrity of total RNA was verified by agarose gel electrophoresis, and the genomic DNA contamination was removed with DNase I (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, the cDNA was synthesized according to Varkonyi-Gasic and Hellens (2011), with some modifications. Briefly, 1 µg of total RNA was reversed transcribed to cDNA using the M-MLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) in a reaction of 20 µl containing 1 µM stem-loop RT primer and 10 µM dNTPs mix (Invitrogen, Waltham, MA, USA). The reaction was incubated at 65°C for 5 min and then transferred to ice. Further, 1X First-Strand Buffer, 10 mM dithiothreitol, and 2 U/µl of RNaseOUT™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA) were added to the reaction mixture incubated at 37°C for 2 min. Finally, 5 U/µl of M-MLV reverse transcriptase was added, and the reaction mixture was incubated at 37°C for 50 min, followed by 70°C for 15 min. The RT-qPCR assay was performed by quantitative PCR using the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out with qPCRBIO SyGreen Blue Mix

TABLE 1 Primers used for the analysis of the promoter region of innate immune response genes.

Bovine (genes) ¹	Sequence (5'→3')	T _m (°C)	Fragment (bp)	Reference
TNF- α	F-GCTCATGGGTTTCTCCACCCA R-GGAGGTTATCTCCAGGGGT	60	197	This work
IL-1 β	F-TTGCCTGCCAGGTACAAGAT R-ACCATTGCCATGCCAGTCC	60	154	This work
IL-8	F-CAAAGCTTGGGTCACACAG R-AGGGAACAAGTGCACCATC	60	183	This work
IL-10	F-GCGAAGGTTACAGCAAGAAG R-TAATGAGGCTGGGAAAAACC	60	129	This work
LAP	F-GCTGAACTGACTGCCAGGAA R-GGAGTGGCCTTCATAGCACA	58.5	125	This work
BNBD10	F-CAGGGGAAACAGGCAAGTCT R-GGGGCAGTCACCTTGATGCT	55.5	147	This work
GAPDH	F-CTCTAATGTTACCTTCCTC R-CGACCACCTATTTCAGTTTC	58	191	This work

¹TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IL-1 β , interleukin 1-beta; IL-8, chemokine interleukin 8; IL-10, interleukin 10; LAP, lingual antimicrobial peptide; BNBD10, bovine neutrophil beta-defensin 10; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

TABLE 2 Primers used for the analysis of bovine miRNA expression.

Bovine miRNA	Sequence 5' to 3'	T _m (°C)	Reference
Let-7a-5p	^a Stem-Loop GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC ^b Universal Reverse Primer GTGCAGGGTCCGAGGT ^c miRNA specific sequence AACTAT ^d Forward Primer GGGTGAGGTAGTAGTTGT	54	This study
miR-21a	^c miRNA specific sequence AGTCAA ^d Forward Primer GTTGTAGCTTATCAGACTGATG	56	This study
miR-30b	^c miRNA specific sequence AGCTGA ^d Forward Primer GTTTGGTGTAACATCCTACAC	60	This study
miR-155	^c miRNA specific sequence ACCCCT ^d Forward Primer GTGGGTTAATGCTAATCGTGAT	56	This study
miR-23a	^c miRNA specific sequence TGGA ^d Forward Primer GTGATCACATTGCCAGGGA	58	This study
miR-7863	^c miRNA specific sequence TGGA ^d Forward Primer GTTGATGGACTGTACCTG	50	This study
miR-146a	^c miRNA specific sequence ACAACC ^d Forward Primer GTGGTGAGAACTGAATTCATA	52	This study
miR-144	^c miRNA specific sequence ACAACC ^d Forward Primer GTTGGGTACAGTATAGATGATG	58	This study
miR-451	^c miRNA specific sequence AAACTC ^d Forward Primer GTTGGAACCGTTACCATTACT	52	This study
U6	Stem-Loop CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT Reverse Primer GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT Forward Primer CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	50 to 60	(Han et al., 2020)

^aThe Stem-Loop and the ^bUniversal Reverse Primer sequences are the same for all miRNAs evaluated except for the ^cmiRNA specific and ^dforward primer sequences. Primers were designed using the miRNA Primer Design Tool date base [miRNA Primer Design Tool | Login (dote.hu)].

Hi-ROX master mix (Biosystems, Wayne, PA, USA) with the specific primers (Elim Biopharm, Hayward, CA, USA) for the miRNAs. The stem-loop primer and the sequences of the primers used to amplify bovine miRNAs were designed using the miRNA Primer Design Tool¹. The sequences and the PCR conditions used to amplify the bovine miRNAs are described in Table 2. U6 miRNA was used as an internal control of amplification.

Extraction and purification of histones

To analyze the effects of bPRL on the global epigenetics marks H3K9ac and H3K9me2 of bMECs, the histones were extracted according to the acidic extraction for histones protocol described by Shechter et al. (2007) and modified by Salgado-Lora et al. (2020). Briefly, 3×10^6 cells were cultured in Petri dishes at 90% of confluence, then bPRL (5 ng/ml) was added for 12 or 24 h, and then the cells were challenged with *S. aureus* for 2 h. Next, the cells were washed three times with PBS (pH 7.4), detached with trypsin (0.05%)-EDTA (0.02%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and centrifuged at 3,200 rpm at 4°C for 10 min. Next, the pellet was washed with PBS (pH 7.4) and resuspended in 1 ml of hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), and cells were maintained in agitation at 4°C for 30 min. After, the intact nuclei were pelleted at 10,000 rpm for 10 min at 4°C, resuspended in 400 µl of 0.4 N H₂SO₄, and maintained in agitation overnight at 4°C. Next, the samples were centrifuged at 13,200 rpm for 10 min at 4°C; then, histones were precipitated with TCA (33%) and maintained in agitation at 4°C overnight. Next, histones were pelleted at 13,200 rpm for 10 min at 4°C, washed with cold acetone, and centrifuged at 13,200 for 10 min at 4°C; this last step was performed three times. Finally, histones were air-dried for 20 min at room temperature, and the pellet was dissolved in sterile distilled water and stored at -80°C until use. Finally, the histones were resolved on a 15% SDS-PAGE gel to verify the integrity before performing the western blot analysis.

Western blot assays

Histone proteins were transferred to PVDF membranes using a semi-dry transfer system (Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS (pH 7.4) at 4°C for 4 h and then incubated with primary antibodies: anti-H3ac (1:1,000), anti-H3K9ac (1:200), anti-H3K9me2 (1:1,000), anti-H3 (1:5,000), at 4°C overnight. After this, the primary antibodies were removed, and the membranes were incubated with the mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase coupled secondary antibodies

(1:3,000) at 4°C for 2 h. Finally, the secondary antibody was removed and ECL western blotting substrate WesternsureT (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was added and developed using the iBright CL1500 Imaging System (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Signal intensity was quantified by densitometry using the iBright Analysis software (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The data of the target histone mark were normalized to H3 expression.

Histone deacetylases activity assay

Histone deacetylases (HDACs) activity was evaluated using the cellular histone deacetylase fluorescent kit FLUOR DE LYS® (Enzo, Enzo Biochem, New York, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. The kit measures the activity of the HDACs class I (HDAC 1, 2, 3, and 8), class IIa (HDAC 4, 5, 7, and 9), and class IIb (HDAC6 and 10). Briefly, 1×10^4 bMECs were grown on 96-well plates in a complete medium in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. Then, the cells were synchronized for 16 h with the incomplete medium. Cells were treated with bPRL (5 ng/ml) and then were challenged with *S. aureus* (MOI 30:1) for 2 h, as control bMECs without any treatment were used. Next, the supernatant was removed, and 50 µl of acetylated FLUOR DE LYS® substrate was added and incubated at 37°C for 4 h. Later, the substrate was removed, the cells were washed with PBS (pH 7.4) three times, and 25 µl of the developer was added and incubated at 37°C for 5 min. A standard curve was generated using serial dilutions (1:10) of the deacetylated FLUOR DE LYS® standard and the developer supplied with the kit. Finally, the relative fluorescence units (RFU) of both cells and the standard curve counts were acquired with a Varioskan (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) plate reader (360 nm emission and 460 nm excitation). Trichostatin A (TSA, 1 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an inhibitor of HDACs activity. The data of HDACs activity was calculated and normalized (to 1-fold) regarding the control condition.

Histone demethylases activity

Histone demethylases (HDMs) activity was evaluated using the Jumonji family demethylases activity kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). bMECs were grown on 96-well plates and treated as described for the HDACs assay, and cell lysates were obtained according to the manufacturer's instructions. The product of the enzymatic demethylation reactions is formaldehyde, which was quantitated directly by a fluorescent product with a Varioskan (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) plate reader (450 nm excitation, 510 nm emission). HDM activity was calculated and normalized (to 1-fold) regarding the

¹ <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadestool/>

control condition. According to the manufacturer's instructions, the assays were run in duplicate from two different experiments.

Statistics analysis

For western blot and ChIP-qPCR analysis, the data were obtained from at least three and four independent experiments, respectively, in triplicate and were compared with a *t*-student, and one-way analysis of variance (ANOVA) using the *post hoc* Tukey test, respectively. The results are reported as the mean $\pm$ standard error (SE) with a significance level of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$. For HDACs and HDMs activity, the data were obtained from at least three and two independent experiments for duplicated, respectively, and were compared using *t*-student. The results are reported as the mean $\pm$ standard error (SE) with a significance level of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$. Finally, for miRNAs analysis, the data were obtained from at least four experiments in triplicate and were compared with the *t*-student and Wilcoxon test. The results are reported as the mean $\pm$ SE with a significance level of $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, or $p \leq 0.001$.

Results

Histone epigenetic marks are regulated by bovine prolactin in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* challenge

Previously we reported the bPRL effects on IIR of bMECs. In this work, we analyzed the levels of several histone marks to determine if these effects could be related to epigenetic modulation. The results showed that the global acetylation of histone H3 of bMECs was not modified by bPRL at 12 h (Figure 1A). However, in bMECs treated with the hormone for 24 h and challenged with *S. aureus*, the global H3 acetylation decreased by 50% regarding control bMECs (Figure 1B). To determine if the hormone regulates specific H3 residues in bMECs, the H3K9ac and H3K9me2 marks were analyzed. The results showed that cells treated 12 h with bPRL and challenged with *S. aureus* significantly decreased the H3K9ac mark (20%) regarding control (Figure 1C). Interestingly, there were no significant changes in H3K9ac at 24 h (data not shown). Concerning the H3K9me2 mark, bMECs challenged with *S. aureus* increased significantly this mark (50%), as well as cells treated with bPRL (12 h) alone or together with the challenge (30%) (Figure 1D). Finally, bPRL at 24 h of treatment did not modify this mark (data not shown).

To explore if bPRL could be involved in the modulation of H3K9ac through regulating HDACs, the activity of two classes of HDACs (class I and II) was evaluated. The evaluations were

performed at 6 and 12 h, considering that the effects of bPRL on the H3K9ac mark were detected at 12 h. Results showed that do not exist significant changes in the HDACs activity in both bMECs treated or not treated with bPRL, but when the bMECs were challenged with *S. aureus*, the HDACs activity was increased (2.3-fold) (Figures 2A,B). Also, we evaluated the HDMs activity (enzymes involved in the methyl group remotion), and the results showed a tendency to reduction in activity (10%) in bMECs treated with bPRL 12 h and challenged with *S. aureus* (Figure 2C); however, there were no significative differences.

Bovine prolactin regulates the expression of innate immune response elements through H3K9ac and H3K9me2 marks in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*

As indicated above, the epigenetic marks H3K9ac and H3K9me2 were modified in bMECs treated with bPRL and challenged with *S. aureus*. To determine the role of these marks in the expression of IIR elements regulated by bPRL, ChIP and quantitative qPCR assays were carried out. The results showed that the H3K9ac mark was enriched significantly in the promoter region of *IL-1 β* , *IL-10*, and *BNBD10* genes (1.5, 2.5, and 7.5-fold, respectively) in bMECs treated 12 h with bPRL (Figure 3A). Still, this epigenetic mark was reduced significantly in both bMECs treated with bPRL and challenged and in cells only challenged (Figure 3A). Also, the promoter region of *TNF- α* gene showed an increase of the H3K9ac mark (5-fold) in bMECs challenged; however, in cells challenged and treated with bPRL this epigenetic mark decreased significantly (3-fold) (Figure 3A). Moreover, this mark was not modified in the promoter region of *IL-8* and *LAP* genes under the same conditions (Figure 3A). Additionally, we observed an inverse relationship between the H3K9me2 and H3K9ac marks for the *IL-1 β* and *IL-10* genes. H3K9me2 mark was significantly enriched in the promoter region of *IL-1 β* and *IL-10* (3.5, 2.5-fold, respectively) in bMECs only challenged. Still, it was reduced in bMECs treated with bPRL and challenged or not challenged (Figure 3B). A similar effect was observed for the *LAP* gene under the same conditions (Figure 3B). Interestingly, the H3K9me2 mark was enriched significantly in the promoter region of *TNF- α* and *IL-8* genes (1.3 and 3-fold, respectively) of bMECs treated with bPRL and challenged (Figure 3B). Altogether, these results indicate that bPRL, through epigenetic modifications mediated by H3K9ac and H3K9me2, allows the regulation of gene expression of IIR elements in bMECs. Moreover, this regulation is modified during *S. aureus* challenge. These marks correlate with the level

of the expression of these genes, as reported (Medina-Estrada et al., 2015).

miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells is regulated by bovine prolactin during *Staphylococcus aureus* challenge

The expression of diverse miRNAs involved in the regulation of immune response of bMECs was evaluated by qPCR in cells treated with bPRL and challenged with *S. aureus*. The results showed an up-regulation in the expression of miRNAs Let-7a-5p, miR-21a, miR-30b, miR-155, and miR-7863 (2, 1.5, 10, 1.5, and 3.9-fold, respectively) in bMECs challenged with *S. aureus* (Figure 4). Also, bPRL (12 h) induced a down-regulation of these miRNAs in bMECs challenged or not challenged (Figure 4). Further, a significant increase in the miR-23a expression (3-fold) was observed in bMECs treated only with bPRL (12 h); however, *S. aureus* induced a significant decrease of this miRNA in bMECs treated or not treated with the hormone (Figure 4F). On the other hand, the expression of miR-451, miR-144, and miR146a miRNAs was not modified (Figures 4G–I). These findings show that bPRL, through the miRNAs expression, could participate in regulating immune response mounted in bMECs challenged with *S. aureus*.

Discussion

Bovine mastitis susceptibility has been associated with abrupt changes in the levels of reproductive hormones that induce an impaired immune response (Lamote et al., 2006; Lacasse et al., 2019; Alhussien and Dang, 2020). Previously we showed that bPRL induces a pro-inflammatory response in bMECs, which is down-regulated in cells challenged with *S. aureus* (Ochoa-Zarzosa et al., 2007; Gutiérrez-Barroso et al., 2008; Lara-Zárate et al., 2011; Medina-Estrada et al., 2015). In this work, we show evidence that this response is regulated by global and specific histone marks on the promoter region of IIR genes and the expression of regulatory miRNAs.

Several reports have shown the role of epigenetic regulation in mammary gland function. For example, the levels of DNA methylation are important for α -casein gene expression (Singh et al., 2010), and an increase in this mark has been reported in peripheral blood lymphocytes from cows with mastitis (Song et al., 2016), as well as in the histone H3K27me3 mark (He et al., 2016). Besides, combined hormones bPRL and 17 β -estradiol regulate H3 histone marks during *S. aureus* infection (Salgado-Lora et al., 2020). In this work, bPRL (24 h) and *S. aureus* reduced H3 global acetylation of bMECs (Figure 1B), which is related to chromatin compaction that make difficult the access of the transcriptional machinery. This result agrees with the down-regulation of pro-inflammatory genes *TNF- α* , *IL-1 β* , and

IL-8 in *S. aureus*-challenged bMECs and treated with bPRL previously reported (Medina-Estrada et al., 2015). Also, the H3K9ac mark was increased by *S. aureus* in bMECs, but it was reduced in the presence of bPRL (Figure 1C). These results agree with the up-regulation of this mark by *S. aureus* reported in a murine mastitis model (Modak et al., 2014). Noteworthy, the H3K9me2 mark was increased by *S. aureus* and bPRL in bMECs (Figure 1D), and it inversely correlated with the H3K9ac mark, which also agrees with light lysine demethylases (KDMs) activity reduction (Figure 2C). Interestingly, the H3K9ac mark reduction and H3K9me2 induction in bMECs treated with bPRL and challenged coincides with the increase in the HDACs activity (Figures 2A,B), which suggests differential regulation of these enzymes. A similar effect was reported by Báez-Magaña et al. (2020), who showed that *S. aureus* induced the HDACs activity in bMECs, which was enhanced by the antimicrobial peptide γ -thionin. However, an opposite effect was reported in bMECs challenged with *S. aureus* and treated with the combined hormones bPRL and 17 β -estradiol, in this case, the histone acetylation was increased, but HDACs activity was down-regulated or inhibited (Salgado-Lora et al., 2020). Possibly, 17 β -estradiol could be inhibiting the effect of bPRL; however, the cross-linking between both hormone signaling pathways needs further research (Rasmussen et al., 2010).

From those mentioned above, we hypothesized that prolactin could regulate the gene expression of elements of IIR in bMECs through the induction of specific epigenetic marks such as H3K9ac and H3K9me2. ChIP assays showed that bPRL favors the enrichment of the H3K9ac mark in the promoter region of *IL-1 β* and *IL-10* genes (Figure 3A), which suggests chromatin decompaction that allows the transcriptional machinery access; however, *S. aureus* reduced this mark (Figure 3A), suggesting that the chromatin has been condensed. These results agree with a previous report of our group where it was shown that bPRL increased both gene expression and secretion of IL-1 β and induced the expression of IL-10, while *S. aureus* downregulated the expression of both genes (Medina-Estrada et al., 2015). Similar findings were reported by Modak et al. (2014) in a murine mastitis model. Also, we observed an inverse relationship between the enrichment of the H3K9ac mark and the H3K9me2 mark in the promoter region of *IL-1 β* and *IL-10* genes (Figures 3A,B) under the conditions mentioned above. Similar behavior was observed for the *BNBD10* gene concerning the H3K9ac mark (Figure 3A), which was consistent with this gene's expression level (personal communication). However, for this gene, even though there was a significant attenuation of the enrichment of the H3K9me2 mark (Figure 3B) in all of the conditions evaluated, suggesting the participation of other repressor marks in the negative regulation for the expression of *BNBD10* gene. In this sense, an opposite effect was observed on the *LAP* gene. bMECs only challenged with *S. aureus* showed significant enrichment of the H3K9me2 mark in the promoter region of

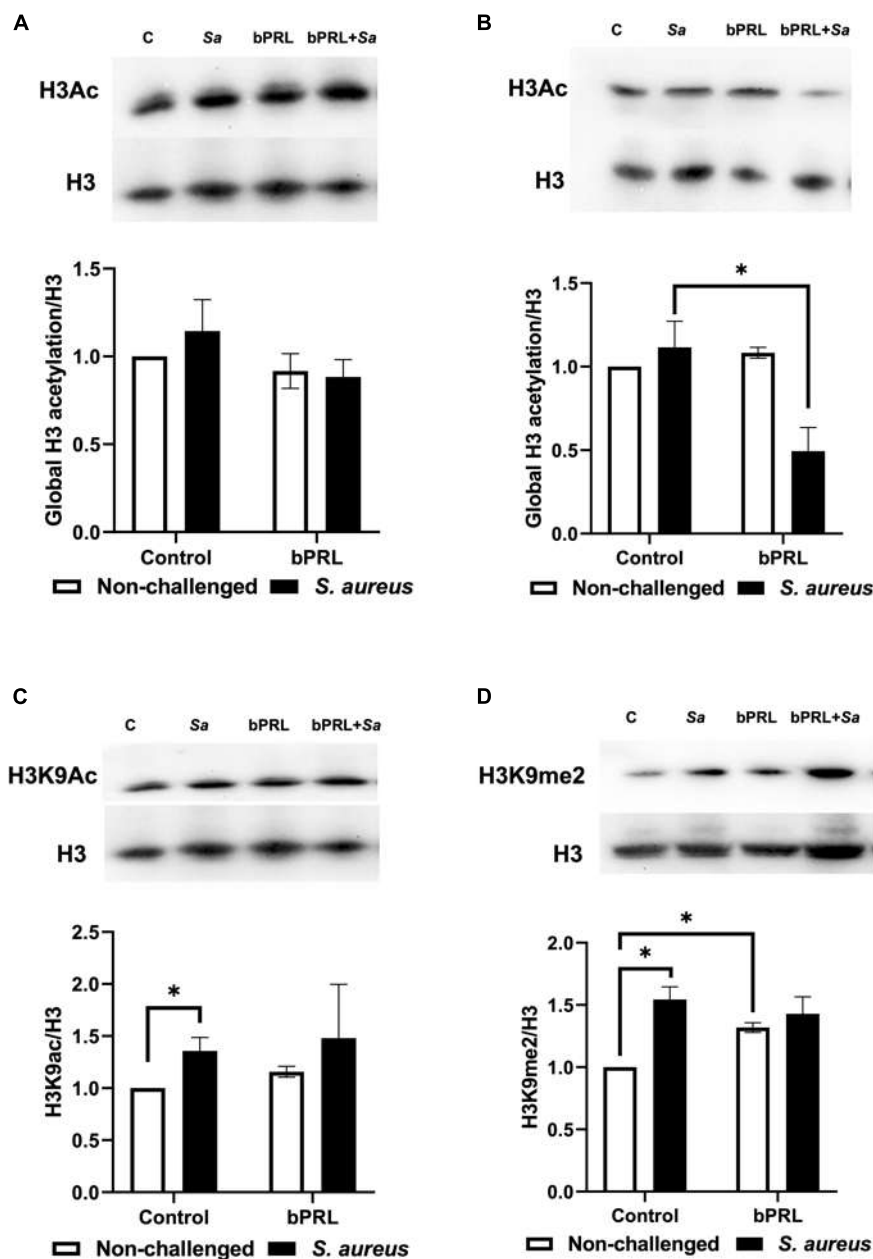


FIGURE 1

Regulation of histone H3 marks by bPRL in bMECs during *S. aureus* challenge. bMECs were treated with bPRL (5 ng/ml), and cells were or not challenged for 2 h with *S. aureus* (MOI 30:1). Densitometrical analysis of the immunoblots that shows the relative expression of global H3ac regarding the total H3 in bMECs treated 12 h (A) and 24 h (B) with bPRL and challenged or not challenged. Densitometrical analysis of immunoblots that shows the relative expression of H3K9ac mark (C) and H3K9me2 mark (D) regarding the total H3 in bMECs treated 12 h with bPRL and challenged or not challenged. C, bMECs without any treatment; bPRL, bMECs treated 12 h or 24 h with bPRL (5 ng/ml); bPRL + *Sa*, bMECs treated 12 or 24 h with bPRL (5 ng/ml) and challenged with *S. aureus* for 2 h (MOI = 30:1); *Sa*, bMECs only challenged with *S. aureus* (MOI = 30:1). Representative western blots are shown above each graph. Bars show the mean $\pm$ SE of optical density (arbitrary units, AU), considering the expression of control cells (bMECs without treatment) as 1 (data normalized) obtained from four independent experiments ($n = 4$). The symbol “*” indicates a significant change ($p \leq 0.05$).

this gene, which was attenuated in the presence of the hormone (Figure 3B), while there was no significant enrichment of the H3K9ac mark or inverse correlation concerning the H3K9me2 (Figure 3A); thus, probably the expression of this gene may

be regulated for another epigenetic mark such as H3K14ac, H3K27ac, or H3K4me3, which are involved in the relaxing of chromatin and positive expression of genes (Modak et al., 2014). Further research is necessary to respond to these issues.

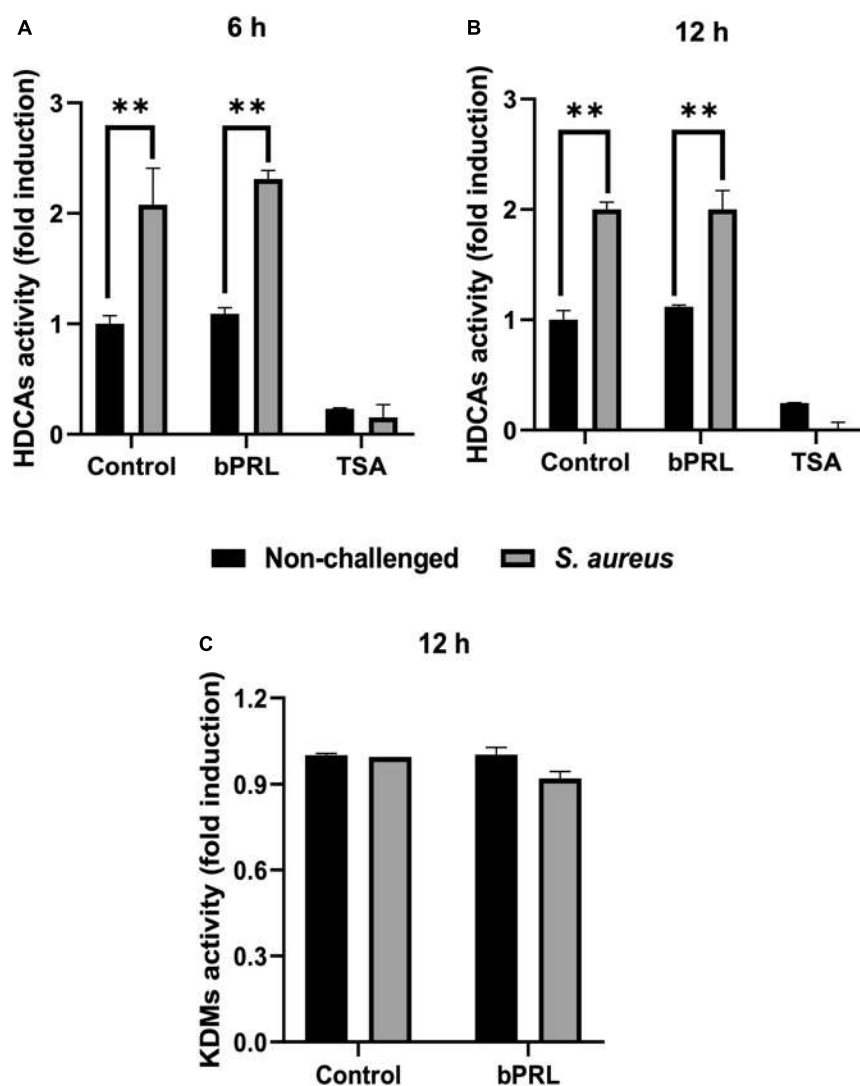


FIGURE 2

Activity of HDACs and HDMs in bMECs treated with bPRL and challenged with *S. aureus*. bMECs were treated (A) 6 and (B) 12 h with bPRL (5 ng/ml) and then were challenged or not 2 h with *S. aureus* (MOI 30:1). HDACs substrate was added and incubated according to the manufacturer's instructions. Total HDACs activity was determined using the HDAC fluorometric cellular activity assay FLUOR DE LYS®. Each bar shows the mean $\pm$ SE of HDAC activity of cells from three independent experiments for duplicates, considering the expression of control cells (bMECs without treatment) as 1 (data normalized). The symbol *** ($p \leq 0.05$) indicates a significant change. Trichostatin (TSA, 1 μ M) was used as an inhibitor of HDACs. (C) bMECs were treated 12 h with bPRL (5 ng/ml) and then were challenged or not 2 h with *S. aureus* (MOI 30:1), and were incubated with the substrates for Jumonji demethylases (HDMs). Each bar shows the mean of the HDM activity of cell lysates from two different experiments $\pm$ SE, which were run in duplicate ($n = 4$), considering the expression of control cells as 1 (data normalized).

Previously, our group reported that *S. aureus* induced both the gene expression and the secretion of TNF- α in bMECs, and this expression was downregulated by bPRL (Medina-Estrada et al., 2015). This is consistent with our results because the H3K9ac mark was increased on the promoter region of the TNF- α gene in bMECs only challenged and was reduced by bPRL (Figure 3A). Also, an inverse relationship was observed between the enrichment of the H3K9ac mark and the repressor H3K9me2 mark on the promoter region of the TNF- α gene (Figure 3B). A similar effect was observed in the promoter

region of the IL-8 gene concerning H3K9me2 (Figure 3B), except that an inverse correlation concerning the H3K9me2 mark only was observed in cells treated or not treated with the hormone and challenged with *S. aureus* (Figure 3B). To our knowledge, this is the first report that correlates epigenetics marks in the regulation of IIR by the lactogenic hormone bPRL in bMECs challenged with *S. aureus*.

On the other hand, small non-coding RNA molecules such as miRNAs are involved in regulating many physiologic processes; their role has been reported particularly in regulating

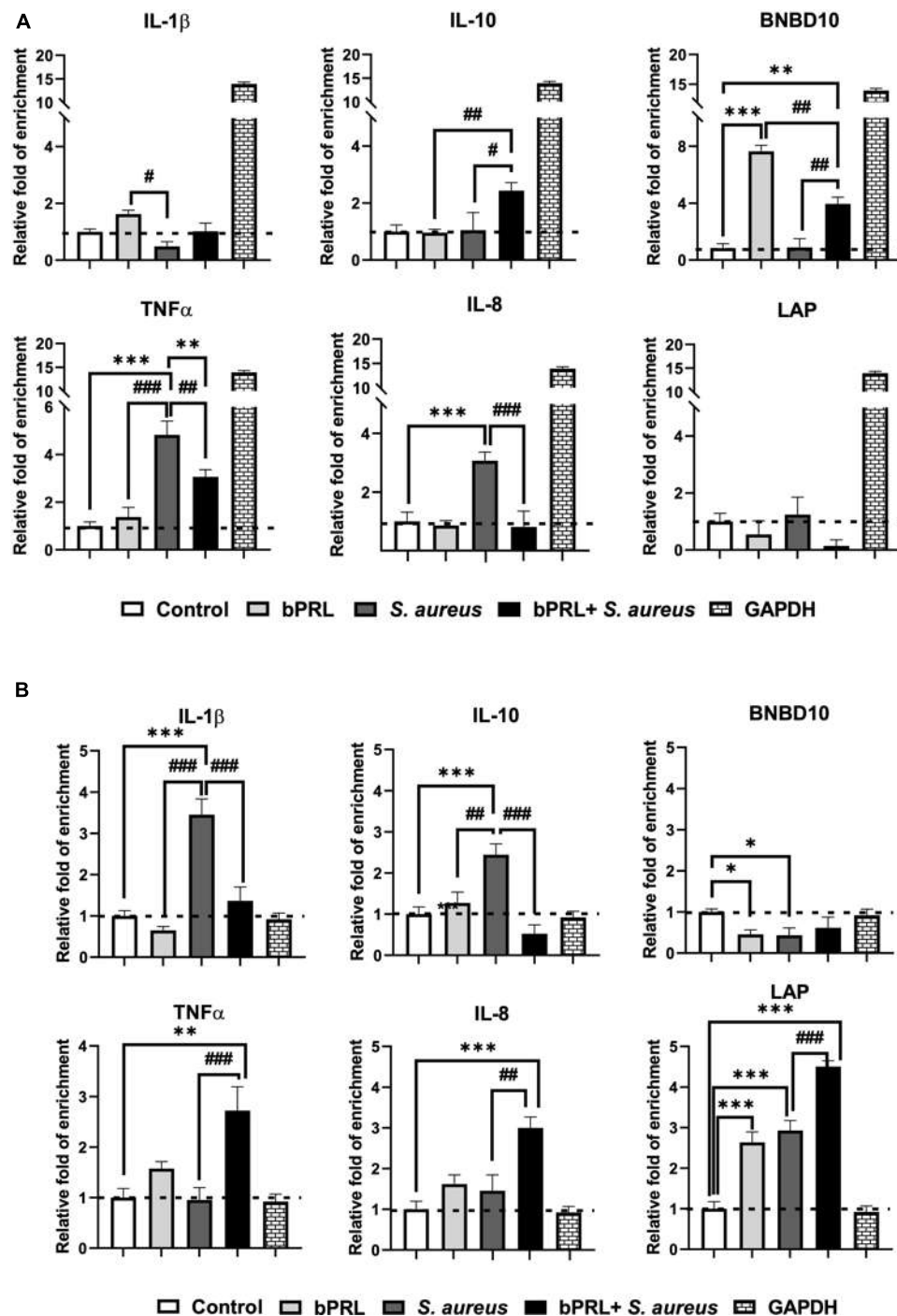


FIGURE 3

Analysis of epigenetic modulation of H3K9ac and H3K9me2 marks in the promoter region of IIR elements in bMECs treated with bPRL and challenged with *S. aureus*. bMECs were treated 12 h with bPRL (5 ng/ml), and cells were or not challenged for 2 h with *S. aureus* (MOI = 30:1). **(A)** The ChIP-qPCR assay was performed to evaluate the relative enrichment of the H3K9ac mark on the promoter region of *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10*, *TNF- α* , *IL-8*, and *LAP*. **(B)** Relative enrichment of the H3K9me2 mark on the promoter region of *IL-1 β* , *IL-10*, *BNBD10*, *TNF- α* , *IL-8*, and *LAP*. Control, bMECs without any treatment; bPRL, bMECs treated 12 h with bPRL (5 ng/ml); bPRL + *S. aureus*: bMECs treated 12 h with bPRL (5 ng/ml) and challenged with *S. aureus* (MOI = 30:1); *S. aureus*, bMECs only challenged with *S. aureus* (MOI = 30:1). The data were normalized regarding IgG-Ab isotype control, and the expression of control cells (cells without treatment) was considered as one. The data correspond to the mean $\pm$ SE from four independent experiments ($n = 4$). “*” ($p \leq 0.05$), “**” ($p \leq 0.01$), and “***” ($p \leq 0.001$) indicate a significant change regarding control (bMECs without any treatment). “#” ($p \leq 0.05$), “##” ($p \leq 0.01$), and “###” ($p \leq 0.001$) indicate a significant change regarding bMECs+*S. aureus* condition. GAPDH was used as a positive control of enrichment (for H3K9ac) and not enrichment (for H3K9me2).

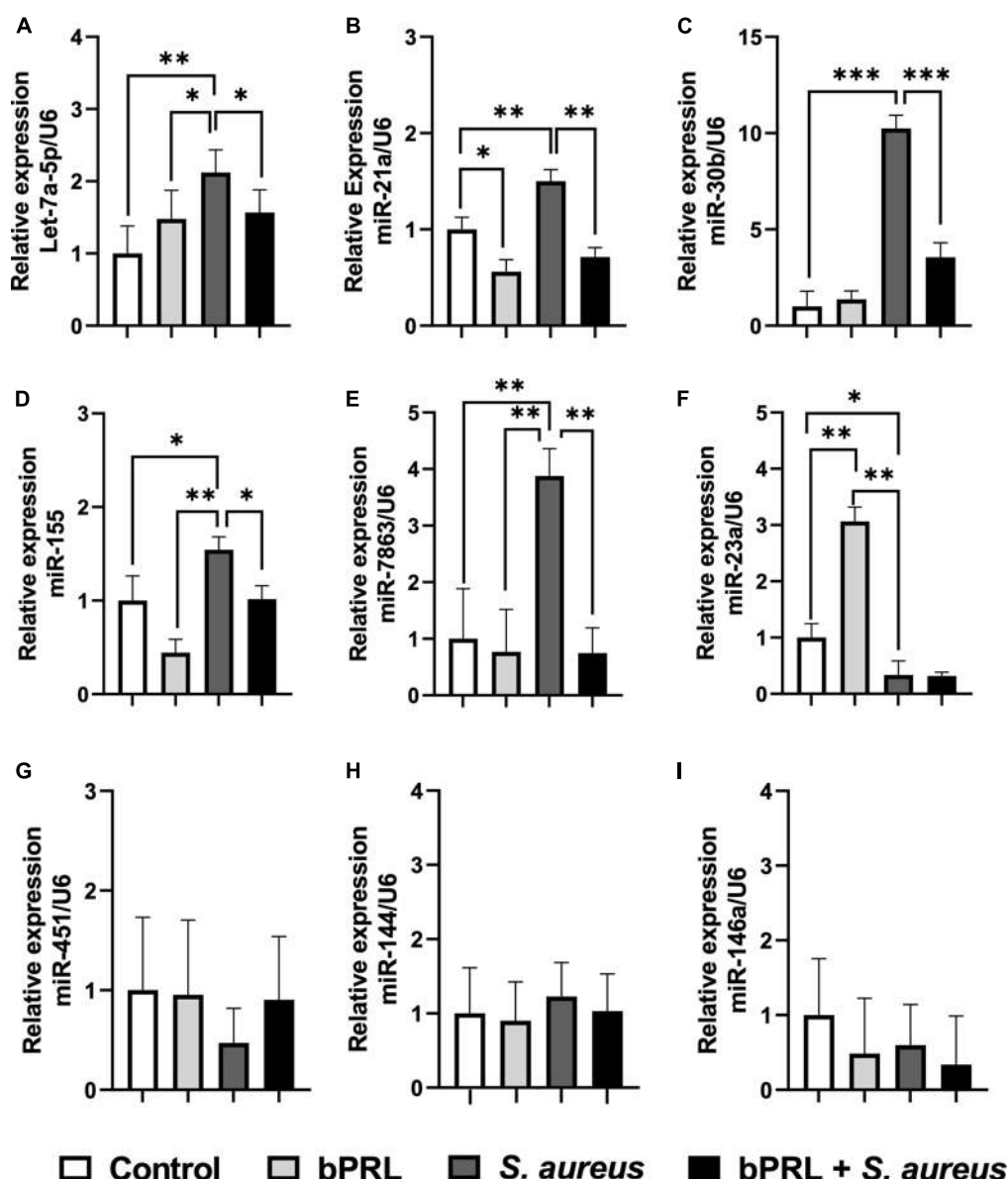


FIGURE 4

Bovine prolactin regulates the miRNAs expression in bMECs during *S. aureus* challenge. bMECs were treated 12 h with bPRL (5 ng/ml) and then were or not challenged for 2 h with *S. aureus* (MOI = 30:1). The RT-qPCR assay using the $\Delta\Delta C_t$ comparative method was performed to evaluate the expression of miRNAs Let-7a-5p (A), miR-21a (B), miR-30b (C), miR-155 (D), miR-7863 (E), miR-23a (F), miR-451 (G), miR-144 (H), miR-146a (I). Control, bMECs without any treatment; bPRL, bMECs treated 12 h with bPRL (5 ng/ml); bPRL + *S. aureus*, bMECs treated 12 h with bPRL (5 ng/ml) and challenged with *S. aureus* for 2 h (MOI = 30:1); *S. aureus*, bMECs only challenged with *S. aureus* (MOI = 30:1). Data were normalized regarding internal control U6. Each bar shows the mean $\pm$ SE and was analyzed using *t*-student and Wilcoxon tests from four independent experiments ($n = 4$). ** ($p \leq 0.05$), *** ($p \leq 0.01$), and **** ($p \leq 0.001$) indicate significant differences.

the immune response during infectious diseases (Hirschberger et al., 2018; Nejad et al., 2018). To evaluate other epigenetics mechanisms modulated by bPRL, the expression of miRNAs involved in the regulation of IIR genes by *S. aureus* such as miR-21a, miR-30b, Let-7a-5p, miR-155, miR-23a, miR-7863, miR-144, miR-146a, and mi-451 was analyzed (Jin et al., 2014). Let-7a-5p, miR-21a, and miR-30b have a key role in the regulation of expression of IIR genes such as IL-6, IL-1 β ,

and TNF- α through the direct interaction with elements downstream of the signaling pathway of Toll-like receptors (TLRs) and it has been reported that their overexpression promotes the internalization and persistence of intracellular bacteria in the cells host (Zhou et al., 2018). We showed that Let-7a-5p, miR-21a, and miR-30b were up-regulated in bMECs challenged with *S. aureus* and down-regulated significantly in the presence of bPRL (Figures 4A–C). This is in agreement with

Xu et al. (2021), who demonstrated that the pro-inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) is alleviated when miR-30b is silenced (Xu et al., 2021). In addition, Corsetti et al. (2018) reported that inhibition of expression of miR-21a induced the downregulation of TNF- α and promoted bacterial control in the host cell (Corsetti et al., 2018). In contrast to our results, Magryś and Bogut (2021) reported that a small variant colony (SVC) of *Staphylococcus epidermidis* down-regulated the expression of Let-7a-5p changing the pro-inflammatory profile to an anti-inflammatory environment that favors its intracellular persistence in macrophages THP-1. In this sense, Let-7a-5p could be key in the immune response of bMECs during *S. aureus* infection because the upregulation of this miRNA coincides with the downregulation of expression of IL-6 (Medina-Estrada et al., 2015; Zaatout et al., 2020). Further investigation is necessary to identify the molecular targets of miR-21a, and mir-30b and the key role in the immune response in bMECs challenged with *S. aureus* and treated or not with bPRL. On the other hand, miR-155 is the master regulator of pro-inflammatory genes, which are up-regulated through the signaling pathway of TLRs; this miRNA targets the IKK β kinase, which is involved in the modulation of translocation of the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) to nuclei and promotes the expression of pro-inflammatory mediators (Zhou et al., 2018). In this sense, the interaction IKK β k-miR-155 promotes in bacterial infections the escape to immune response mounted for the host through the downregulation of the expression of pro-inflammatory genes (Zhou et al., 2018). In this study, we showed that *S. aureus* promotes a significant upregulation of miR-155 in bMECs. This expression was attenuated in the presence of bPRL (Figure 4D). This supports the fact that miR-155 plays a key role in the success of the establishment and persistence of bacterial infection. Moreover, it has been reported that overexpression of miR-155 induces the expression and production of TNF- α in mycobacterial infection (Behrouzi et al., 2019). This is consistent with our results, where we showed an H3K9ac mark increased in the promotor gene of TNF- α (Figure 3A), which promotes the transcription of this gene and protein secretion (Medina-Estrada et al., 2015). Interestingly, the presence of bPRL attenuated the expression of miR-155 and coincides with the reduction of the H3K9ac mark in the promoter region of TNF- α and the reduction of gene expression and protein secretion (Medina-Estrada et al., 2015). A similar effect was reported by Rajaram et al. (2011), who demonstrated that lipomannan, a component of the cellular wall of *Mycobacterium tuberculosis*, blocks TNF- α synthesis mediated by mir-155 (Rajaram et al., 2011). In this sense, bPRL could be key for the downregulation of TNF- α through H3K9ac and miR-155. miR-23a is also a miRNA that regulates the inflammatory response by inhibiting the translocation of NF- κ B to nuclei and targeting PI3K kinase (Zhou et al., 2018). Recently, Cai et al. (2021) reported that short exposition of lipoteichoic acid (LTA), a component of

the cellular wall of *S. aureus*, induced the overexpression of miR-23a, which targeted the PI3K kinase-TLR2-MyD88 axis and downregulated the pro-inflammatory response in the cell line MAC-T (bovine mammary epithelial cells), while the inhibition of expression of miR-23a or long exposition of LTA reversed this effect (Cai et al., 2021). Our results showed a similar effect in bMECs treated only with bPRL; we observed a significant increment of expression of miR-23a, but this expression was downregulated in the presence of the bacteria (Figure 4F). Possibly, short periods of the exposition of bMECs with *S. aureus* are sufficient to decrease the protective effect of bPRL through miR-23a-TLR2-MyD88-IP3K kinase. However, the regulatory mechanism of miR-23 related to the immune response is still poorly understood. We detected a significative level of expression of miR-7863 in bMECs challenged with *S. aureus*, which was down-regulated in the presence of bPRL (Figure 4E). This agrees with Luoreng et al. (2018). They reported through transcriptional analysis the expression of miR-7863 only in mastitis caused by *S. aureus* or *E. coli*. In this sense, miR-7863 could be a biomarker of bovine mastitis. Moreover, given that bPRL down-regulated the expression of miR-7863, it could be interesting to investigate the target of this miRNA and the molecular mechanism involved in the immune response during bacterial infection. Finally, even though miR-451, miR-144, and miR-146a are important regulators of the pro-inflammatory during bacterial infections (Zhou et al., 2018), we did not observe any changes in the expression level of these miRNAs in our model of study (Figures 4G–I). This suggests that miR-451, miR-144, and miR-146a are not key in regulating the immune response of bMECs during *S. aureus* challenge.

Conclusion

Bovine prolactin regulates the IIR of bMECs through modifications of H3K9ac and H3K9me2 marks and the expression of miRNAs. In general, we observed that bPRL induced an anti-inflammatory profile in bMECs through the regulation of epigenetic marks in promotor genes of key cytokines and in the induction of miRNAs that block the pro-inflammatory cytokine production, reverting the inflammatory response induced by *S. aureus*. To our knowledge, this is the first report that correlates epigenetic mechanisms in regulating elements of IIR modulated by lactogenic hormone bPRL in bMECs challenged with *S. aureus*.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

MB-M, MS-L, JL-M, and AO-Z conceptualized and designed the experiments and analyzed the data. MB-M and MS-L performed the experiments. MB-M, JL-M, and AO-Z wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by grants from CONACyT (CB 2016-287210) and CIC 14.1 from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to AO-Z. MB-M obtained a Ph.D. Scholarship from CONACyT (743402).

References

- Alhussien, M. N., and Dang, A. K. (2020). Interaction between stress hormones and phagocytic cells and its effect on the health status of dairy cows: a review. *Vet. World* 13:1837. doi: 10.14202/vetworld.2020.1837-1848
- Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2014). Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Res. Int.* 2014:538546. doi: 10.1155/2014/538546
- Anaya-López, J. L., Contreras-Guzmán, O. E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V. M., Lopez-Meza, J. E., Valdez-Alarcon, J. J., et al. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81, 358–361. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.02.002
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C. L., Moisan, H., Malouin, F., and Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 785–799. doi: 10.1089/fpd.2008.0110
- Báez-Magaña, M., Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Arceo-Martínez, M. T., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2020). Plant defensin γ -thionin induces MAPKs and activates histone deacetylases in bovine mammary epithelial cells infected with *Staphylococcus aureus*. *Front. Vet. Sci.* 7:390. doi: 10.3389/fvets.2020.00390
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., and Zadoks, R. N. (2006). Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877–1895. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1
- Barlow, J. (2011). Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 16, 383–407. doi: 10.1007/s10911-011-9235-z
- Behrouzi, A., Alimohammadi, M., Nafari, A. H., Yousefi, M. H., Riaz Rad, F., Vaziri, F., et al. (2019). The role of host miRNAs on *Mycobacterium tuberculosis*. *ExRNA* 1:40. doi: 10.1186/s41544-019-0040-y
- Berczi, I., and Nagy, E. (2019). “Prolactin and other lactogenic hormones,” in *Pituitary Function and Immunity*. eds B. Istvan and N. Eva (Boca Raton, FL: CRC Press), 161–184. doi: 10.1201/9780429279737-6
- Binart, N. (2017). “Prolactin,” in *The Pituitary*. ed. B. Nadine (London: Academic Press), 129–161. doi: 10.1016/B978-0-12-804169-7.00005-2
- Briskien, C., and O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 2:a003178. doi: 10.1101/cshperspect.a003178
- Cai, M., Fan, W., Li, X., Sun, H., Dai, L., Lei, D., et al. (2021). The regulation of *Staphylococcus aureus*-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *Front. Vet. Sci.* 8:683886. doi: 10.3389/fvets.2021.683886
- Carey, M. F., Peterson, C. L., and Smale, S. T. (2009). Chromatin immunoprecipitation (chip). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009:db-rot5279. doi: 10.1101/pdb.prot5279
- Conlon, B. P. (2014). *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for persister cells: an investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *Bioessays* 36, 991–996. doi: 10.1002/bies.201400080
- Corsetti, P. P., de Almeida, L. A., Gonçalves, A. N. A., Gomes, M. T. R., Guimarães, E. S., Marques, J. T., et al. (2018). miR-181a-5p regulates TNF- α and miR-21a-5p influences gualynate-binding protein 5 and IL-10 expression in macrophages affecting host control of *Brucella abortus* infection. *Front. Immunol.* 9:1331. doi: 10.3389/fimmu.2018.01331
- Dego, O. K. (2020). “Bovine Mastitis,” in *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*, Part I, eds F. Aral, R. Payan-Carreira, and M. Quaresma (London: IntechOpen), doi: 10.5772/intechopen.93483
- Devinoy, E., and Rijnkels, M. (2010). Epigenetics in mammary gland biology and cancer. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 15, 1–4. doi: 10.1007/s10911-010-9171-3
- Do, D. N., Dudemaine, P. L., Mathur, M., Suravajhala, P., Zhao, X., and Ibeagha-Awemu, E. M. (2021). miRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 22:3080. doi: 10.3390/ijms22063080
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zarate, L., Loeza-Lara, P. D., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 113–122. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.09.007
- Han, S., Li, X., Liu, J., Zou, Z., Luo, L., Wu, R., et al. (2020). Bta-miR-223 Targeting CBLB contributes to resistance to *Staphylococcus aureus* mastitis through the PI3K/AKT/NF- κ B pathway. *Front. Vet. Sci.* 7:529. doi: 10.3389/fvets.2020.00529
- He, Y., Song, M., Zhang, Y., Li, X., Song, J., Zhang, Y., et al. (2016). Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 17:565. doi: 10.1186/s12864-016-2947-0
- Hirschberger, S., Hinske, L. C., and Kreth, S. (2018). MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 431, 11–21. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.020
- Huijs, K., Lam, T. J., and Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.* 75:113. doi: 10.1017/S0022029907002932
- Ivanova, E., Le Guillou, S., Hue-Beauvais, C., and Le Provost, F. (2021). Epigenetics: new insights into mammary gland biology. *Genes* 12:231. doi: 10.3390/genes12020231
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E. M., Liang, G., Beaudoin, F., and Zhao, X. (2014). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics* 15:181. doi: 10.1186/1471-2164-15-181

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- Josse, J., Laurent, F., and Diot, A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Front. Microbiol.* 8:2433. doi: 10.3389/fmicb.2017.02433
- Khan, M. Z., Khan, A., Xiao, J., Ma, Y., Ma, J., Gao, J., et al. (2020). Role of the JAK-STAT pathway in bovine mastitis and milk production. *Animals* 1:2107. doi: 10.3390/ani10112107
- Lacasse, P., Zhao, X., and Ollier, S. (2019). Effect of stage of lactation and gestation on milking-induced hormone release in lactating dairy cows. *Domestic Anim. Endocrinol.* 66, 72–85. doi: 10.1016/j.domaniend.2018.10.003
- Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., and Burvenich, C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 65, 1082–1098. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.017
- Lara-Zárate, L., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 51, 313–318. doi: 10.1016/j.micpath.2011.07.010
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., et al. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 1–23. doi: 10.1038/nrdp.2018.33
- Lewandowska-Sabat, A. M., Hansen, S. F., Solberg, T. R., Østerås, O., Heringstad, B., Boysen, P., et al. (2018). MicroRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected in vitro with two strains of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 19:241. doi: 10.1186/s12864-018-4591-3
- Luoreng, Z. M., Wang, X. P., Mei, C. G., and Zan, L. S. (2018). Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 87–99. doi: 10.7150/ijbs.22498
- Magryś, A., and Bogut, A. (2021). MicroRNA hsa-let-7a facilitates staphylococcal small colony variants survival in the THP-1 macrophages by reshaping inflammatory responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 311:151542. doi: 10.1016/j.ijmm.2021.151542
- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2015). Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb. Pathog.* 89, 43–53. doi: 10.1016/j.micpath.2015.08.018
- Modak, R., Mitra, S. D., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar, M., Bhat, A. V., et al. (2014). Epigenetic response in mice mastitis: role of histone H3 acetylation and microRNA (s) in the regulation of host inflammatory gene expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin. Epigenet.* 6:12. doi: 10.1186/1868-7083-6-12
- Nejad, C., Stunden, H. J., and Gantier, M. P. (2018). A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* 285, 3695–3716. doi: 10.1111/febs.14482
- Ochoa-Zarzosa, A., Gutiérrez-Barroso, A., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., Anaya-López, J. L., and López-Meza, J. E. (2007). Prolactin stimulates endocytosis of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *Vet. México* 38, 455–465.
- Parlow, A. F. (2002). National hormone & peptide program-NIDDK. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3514–3516. doi: 10.1210/jcem.87.7.0134
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., and Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87, 2433–2441. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4
- Rajaram, M. V., Ni, B., Morris, J. D., Brooks, M. N., Carlson, T. K., Bakthavachalu, B., et al. (2011). *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17408–17413. doi: 10.1073/pnas.1112660108
- Rasmussen, L. M., Frederiksen, K. S., Din, N., Galsgaard, E., Christensen, L., Berchtold, M. W., et al. (2010). Prolactin and oestrogen synergistically regulate gene expression and proliferation of breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 809–822. doi: 10.1677/ERC-09-0326
- Reshi, A. A., Husain, I., Bhat, S. A., Rehman, M. U., Razak, R., Bilal, S., et al. (2015). Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 7:48.
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100, 10381–10397. doi: 10.3168/jds.2017-13023
- Salgado-Lora, M. G., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2020). Prolactin and estradiol are epigenetic modulators in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* infection. *Pathogens* 9:520. doi: 10.3390/pathogens9070520
- Savino, W. (2017). Prolactin: an immunomodulator in health and disease. *Endocr. Immunol.* 48, 69–75. doi: 10.1159/000452906
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., and Hake, S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.* 2, 1445–1457. doi: 10.1038/nprot.2007.202
- Singh, K., Erdman, R. A., Swanson, K. M., Molenaar, A. J., Maqbool, N. J., Wheeler, T. T., et al. (2010). Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. *J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia* 15, 101–112. doi: 10.1007/s10911-010-9164-2
- Song, M., He, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Li, X., and Yu, Y. (2016). Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Sci. Rep.* 6:29390. doi: 10.1038/srep29390
- Varkonyi-Gasic, E., and Hellens, R. P. (2011). Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol. Biol.* 744, 145–157. doi: 10.1007/978-1-61779-123-9_10
- Wang, M., and Ibeagha-Awemu, E. M. (2021). Impacts of epigenetic processes on the health and productivity of livestock. *Front. Genet.* 11:613636. doi: 10.3389/fgenet.2020.613636
- Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., and Das, H. H. (1997). Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592–2598. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76215-5
- Xu, J., Li, H., Lv, Y., Zhang, C., Chen, Y., and Yu, D. (2021). Silencing XIST mitigated lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury in human lung fibroblast WI-38 cells through modulating miR-30b-5p/CCL16 axis and TLR4/NF-κB signaling pathway. *Open Life Sci.* 16, 108–127. doi: 10.1515/biol-2021-0005
- Zaatout, N., Ayachi, A., and Kecha, M. (2020). *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *J. Appl. Microbiol.* 129, 1102–1119. doi: 10.1111/jam.14706
- Zhou, X., Li, X., and Wu, M. (2018). miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection. *Signal Transduct. Target. Ther.* 3:14. doi: 10.1038/s41392-018-0006-9

Capítulo 8.2

Anexo 1: Prolactina y 17β -estradiol regulan la expresión de genes de la respuesta inmune innata a través de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, y la expresión de miARNs en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con *Staphylococcus aureus*.

ANEXO 1

Prolactina y 17 β -estradiol regulan la expresión de genes de la respuesta inmune innata a través de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, y la expresión de miRNAs en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con *Staphylococcus aureus*

Marco Antonio Barajas-Mendiola¹, Joel Edmundo López-Meza¹ and Alejandra Ochoa Zarzosa^{1*}

¹Centro 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, Morelia, C.P. 58893, 1919466e@umich.mx (M.A. B-M); elmeza@umich.mx (J.E. L-M)

*Autor correspondiente: ochoaz@umich.mx

Resumen

La mastitis subclínica es una inflamación de la glándula mamaria (GM) causada principalmente por la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Durante la mastitis, existen cambios abruptos en los niveles de hormonas reproductivas, como la prolactina (PRL) y el 17 β -estradiol (E2), que comprometen la respuesta inmune innata (RII) de la GM. Los mecanismos epigenéticos son una clave importante en la regulación de la respuesta inmune durante un proceso infeccioso. Sin embargo, los efectos de PRL y E2 sobre la regulación epigenética aún son poco conocidos. En el presente estudio se exploró la regulación epigenética inducida por la prolactina bovina (bPRL, 5 ng/mL) y E2 (50 pg/mL) en células de epitelio mamario bovino (CEMB) desafiadas con *S. aureus*. Se determinó que la marca epigenética H3K9ac se enriqueció significativamente en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-8*, *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* (1.61, 2.38, 3.15, 9.30 y 7.56 veces, respectivamente) en CEMB tratadas con bPRL y E2 y desafiadas con *S. aureus*, no obstante, en ausencia de las hormonas el nivel de enriquecimiento de esta marca disminuyó. Así mismo, la marca H3K9me2 se enriqueció significativamente en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-8*, *BNBD10* y *LAP* (3.17, 2.0, 7.09 y 5.62

veces, respectivamente) en CEMB solo desafiadas con *S. aureus*, mientras que esta disminuyó en presencia de las hormonas. Un efecto contrario se observó para ambas marcas en el gen de *TNF α* , bajo las mismas condiciones. Adicionalmente, se observó un incremento en la expresión de los miRNAs: miR-155, miR-146a, miR-21a, miR-451, miR-23a, miR-30b, miR-7863, miR-144, Let-7a-5p (8.2, 8.6, 16.56, 13.72, 7.59, 23.0, 11.97, 6.74 y 4.14 veces, respectivamente) en CEMB desafiadas con *S. aureus*, mientras que en presencia de las hormonas el nivel de expresión de estos miRNAs disminuyó. En conclusión, estos resultados sugieren que bPRL y E2 inducen una regulación sobre los elementos de la RII a través de mecanismos epigenéticos que le permiten a *S. aureus* tener éxito, tanto en la persistencia y la evasión del sistema inmune del hospedero.

Palabras clave: mastitis, hormonas, inmunidad innata, regulación epigenética, *Staphylococcus aureus*

Introducción

La mastitis subclínica bovina es una de las principales causas de las pérdidas económicas en la ganadería lechera debido a la reducción de la calidad de la leche, pérdida del valor del animal, costos de tratamientos, riesgo de sacrificio y en ocasiones la muerte de los animales (Ruegg, 2017; Gussmann *et al*, 2019). Como tal, la mastitis subclínica bovina es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria (GM) ocasionada principalmente por la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), que se caracteriza por no manifestar una inflamación local, resultando una carencia de signos visuales, de tal modo que esta infección se diagnostica por un alto contenido de células somáticas en la leche, la cual si persiste por más de dos meses, se le denomina mastitis crónica (Petzl *et al*, 2008; Thompson-Crispi *et al*, 2014; Günther *et al*, 2017). Durante la mastitis, se induce un desequilibrio de la respuesta inmune innata (RII) del animal que está asociada a los cambios fisiológicos de la GM regulados por hormonas como la prolactina (PRL) y el 17 β -estradiol (E2), las cuales presentan cambios abruptos durante el periodo del parto y lactancia del animal (Lamote *et al*, 2006; Newman *et al*, 2010; Need *et al*, 2014; Enger *et al*, 2018; Lacasse *et al*, 2019). El epitelio de la GM es una barrera física que actúa como primera línea de defensa contra

patógenos, y participa de manera muy importante en la RII, ya que se ha demostrado que cuando las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) son enfrentadas con componentes bacterianos, desencadenan vías complejas de señalización que culminan con la producción de componentes de la RII como quimiocinas y citocinas inflamatorias que ayudan a controlar y erradicar al patógeno invasor (Rainard *et al*, 2022). En vista de que las hormonas PRL y E2 inducen cambios en la RII, se ha demostrado que la PRL (5 ng/mL) induce la internalización de *S. aureus* en CEMB, y en conjunto con la infección, promueve una respuesta inflamatoria (Oviedo-Boyso *et al*, 2007; Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008; Lara-Zárate *et al*, 2011; Medina- Estrada *et al*, 2015). Por su parte, el E2 (50 pg/mL) reduce la internalización de *S. aureus* y la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria en las CEMB, promoviendo una respuesta anti-inflamatoria y antimicrobiana (Medina-Estrada *et al*, 2016). Por otra parte, y de manera muy general, se ha descrito que la GM (de varias especies) sufre cambios epigenéticos durante los diferentes eventos de proliferación y diferenciación que presenta este tejido a lo largo de la vida de un organismo (Holliday, H., *et al*, 2018; Ivanova, E., *et al*, 2021). En particular, en bovinos se han descrito modificaciones epigenéticas de genes asociados a la expresión de proteínas de la leche como las caseínas. Por ejemplo, se ha observado que cuando el gen de la α -caseína es hipometilado se induce su expresión, mientras que cuando este mismo gen es metilado, se reprime su expresión (Singh, K., *et al*, 2010). Así mismo, se han reportado cambios epigenéticos en linfocitos de sangre periférica aislados de vacas con mastitis ocasionada por la infección de *S. aureus* de manera natural, mostrando un aumento del patrón de hipermetilación en el ADN en vacas infectadas (Song, M., *et al*, 2016). Además, se ha reportado que la trimetilación del residuo Lys27 de la Histona H3 (H3K27me3) se encuentra aumentada en linfocitos de sangre periférica de aislados de vacas con mastitis por *S. aureus*, observándose que este tipo de modificación inhibe la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria (He, Y., *et al*, 2016).

Recientemente, en un modelo *in vitro* de mastitis bovina se reportó que la bPRL y el E2 modulan la RII en CEMB durante la infección con *S. aureus*, y estos efectos se relacionaron a la regulación de las modificaciones de la histona H3, tales como la acetilación y la di-metilación de la lisina 9 (H3K9ac y H3K9ame2) (Salgado Lora *et*

al, 2020). Además, se demostró que bPRL modula la expresión de genes de la RII a través de las modificaciones epigenéticas H3K9ac y H3K9me2 en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (Barajas-Mendiola *et al*, 2022). Esto demuestra de manera muy importante que varios genes involucrados en la respuesta inflamatoria durante la mastitis inducida por *S. aureus* están altamente metilados y no se expresan, promoviendo el estado crónico de la enfermedad.

Otro tipo de regulación epigenética es a través de los miRNAs, los cuales son moléculas pequeñas de ARN (19-24 nucleótidos) que participan de manera muy importante en la regulación de la expresión de genes involucrados en la RII y adaptativa, tanto de humanos como de animales (Das *et al*, 2016; Do, D. N., *et al*, 2021). En lo particular, un análisis del transcriptoma de miRNAs de CEMB (línea celular MAC-T) desafiadas con *S. aureus* y *E. coli* reveló un patrón único y diferencial de la expresión de miARNs, en donde bta-miR-184, miR-24-3p, miR-148, miR-486 y let-7a-5p son miARNs únicos expresados durante la infección con *E. coli* y bta-miR-2339, miR-499, miR-23a y mir-99a se expresaron de manera única durante la infección con *S. aureus* (Jin *et al*, 2014). Por otra parte, el análisis de expresión de miRNAs de macrófagos derivados de monocitos bovinos infectados con *Streptococcus agalactiae*, reveló la participación de miRNAs que favorecen un fenotipo inflamatorio de estas células inmunes a través de la expresión de genes como IL-6, IL-1 β y TNF- α . Recientemente se demostró que E2 y PRL regula la expresión de miRNAs involucrados en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria en CEMB desafiadas con *S. aureus* (Lewandowska-Sabat *et al*, 2018). A pesar de que las hormonas PRL y E2 desempeñan un papel relevante para el tejido mamario bovino *in vivo*, hoy en día existen escasos reportes relacionados con la regulación epigenética que ejercen estas hormonas sobre genes de la RII. En este sentido, es necesario realizar un estudio que permita determinar el perfil de modificaciones epigenéticas que ejercen las hormonas sobre las CEMB, lo cual proporcionaría elementos necesarios que permitan desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para mejorar la salud y la productividad del ganado lechero. En el presente trabajo se caracterizaron las modificaciones epigenéticas de las histonas en genes de la RII de células de epitelio mamario bovino y la expresión de miARNs inducidas por las hormonas prolactina y 17 β -estradiol durante la infección con *S. aureus*.

Materiales y métodos

Reactivos

Prolactina bovina (bPRL) purificada (AFP7170E). La cual fue proporcionada por A. F. Parlow (NHPP, NDDK, Torrance, CA, USA), y se disolvió en agua estéril. 17 β -estradiol E2, fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), y se disolvió en etanol al 1% (vehículo). En este trabajo, todos los experimentos se realizaron usando una concentración de 5 ng/mL de bPRL y 50 pg/mL de E2 (concentraciones fisiológicas).

Anticuerpos

Para los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se usaron 3 μ g por inmunoprecipitado (IP) de los anticuerpos: anti-H3K9ac grado ChIP policlonal de conejo (abcam, ab10812), anti-H3K9me2-grado ChIP monoclonal de ratón (abcam, ab1220), como control de referencia se usó el anticuerpo anti-H3-grado ChIP policlonal de conejo (abcam, ab1791), y como control negativo de isotipo se usó el anticuerpo anti-IgG policlonal de ratón (Sigma-Aldrich).

Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

Las CEMB se aislaron del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes sanas de acuerdo al protocolo previamente descrito (Anaya-López *et al*, 2006). Se usaron células de los pasajes 2 al 8 para todos los experimentos. Las CEMB se cultivaron en cajas de cultivo Petri de 90x15 mm (NEST, 753001) en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12-Ham) (Sigma-Aldrich, D8900) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Equinotech), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, I9278), 5 μ g/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, H6909), 100 U/mL de penicilina (Gibco, 15140-122) 100 μ g/mL de estreptomycin (Gibco, 15140-122) y 1 μ g/mL de anfotericina B (Sigma, A2942), de aquí en adelante este será referido como medio completo. Las células se mantuvieron a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂. Todos los experimentos se realizaron con el medio DMEM/F-2-Ham sin rojo de fenol libre de SFB y antibióticos (medio incompleto).

Cepa de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

En este trabajo se usó la cepa de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC27543). Esta cepa fue aislada de un caso de mastitis clínica con capacidad de invadir células de epitelio mamario bovino (Anaya-López, J. L. et al, 2006). La bacteria se creció en caldo Luria-Bertani (LB) (BIOXON) a 37°C, las unidades formadoras de colonia (UFCs) se ajustaron mediante densidad óptica a 600 nm ($DO_{0.2} = 9.2 \times 10^7$ UFC/mL).

Ensayos de invasión

Para los ensayos de ChIP, se crecieron monocapas de 5×10^6 CEMB en medio completo en placas de cultivo Petri de 60x15 mm previamente tratadas con 500 μ L de colágena de rata (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron hasta alcanzar un 90% de confluencia a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ por 4 días. Para los ensayos de la expresión de miRNAs, se cultivaron monocapas de 2.5×10^5 CEMB en placas de cultivo de 24 pozos (NEST) previamente tratadas con 200 μ L de colágena de rata (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron hasta alcanzar un 90% de confluencia a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Para ambos ensayos, previo a la infección las células se sincronizaron en medio incompleto a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. Después las células fueron tratadas con bPRL (5 ng/mL) y E2 (50 pg/mL) e incubadas a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ durante 12 h. los ensayos de invasión se realizaron usando el ensayo de protección con gentamicina previamente descrito (Alva-Murillo, N., et al, 2015). Brevemente, las CEMB se infectaron con *S. aureus* ($DO = 0.2$) a una multiplicidad de infección (MOI) de 30:1 (bacteria: célula) en atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 2 h. Después, las células se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.4) y se adicionó medio incompleto suplementado con 80 μ g/mL de gentamicina (para eliminar las bacterias extracelulares) y se incubó en atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 1 h. Finalmente las CEMB se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.4) y fueron empleadas para llevar a cabo los ensayos de ChIP y análisis de la expresión de miRNAs.

Ensayos de ChIP-qPCR

Para analizar el enriquecimiento de las marcas epigenéticas en la región promotora

de los genes de la respuesta inmune innata, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina acoplados a PCR tiempo real (ChIP-qPCR). Primeramente, se obtuvieron los inmunoprecipitados (IP) de acuerdo al protocolo previamente descrito (Barajas-Mendiola, M. A., et al, 2022) y después el enriquecimiento de las marcas epigenéticas fue evaluado mediante PCR tiempo real usando el método comparativo Ct (Δ Ct) en el termociclador StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo usando el estuche qPCRBIO SyGreen Blue Mix Hi-ROX master mix (Biosystems, PB20.16-20). Se usaron oligonucleótidos específicos (Invitrogen) que reconocen la región promotora de los genes de bovino de la respuesta inmune innata. Las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones de la PCR empleadas fueron previamente descritas por (Barajas-Mendiola et al, 2022). GAPDH fue usado como control positivo de enriquecimiento para el análisis de la marca H3K9ac, mientras que el mismo gene fue usado como control negativo de enriquecimiento para el análisis de la marca H3K9me2.

Aislamiento de ARN total y análisis de la expresión de miRNAs

Para analizar el efecto de las hormonas sobre la expresión de miARNs involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria en las CEMB desafiadas con *S. aureus*, se realizaron ensayos de RT-qPCR. El ARN total de las CEMB fue extraído usando el sistema Trizol™ Reagent (Invitrogen, 15596-018) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total fue visualizado en un gel de agarosa al 1% para corroborar su integridad. Después, se removi6 la contaminación de ADN gen6mico usando DNase I (Invitrogen, 18068-015) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis del cDNA se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito (Barajas-Mendiola et al, 2022). El análisis de la expresión de los miRNAs fue evaluado mediante PCR tiempo real usando el método comparativo Ct ($\Delta\Delta$ Ct) en el termociclador StepOnePlus Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo usando la enzima qPCRBIO SyGreen Blue Mix Hi-ROX master mix (Biosystems, PB20.16-20) con oligonucleótidos específicos (ELIM Biopharm)

para los miRNAs bovinos. Las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones de la PCR fueron previamente descritas (Barajas-Mendiola *et al*, 2022). El miRNA U6 fue usado como control interno de amplificación.

Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos de al menos 3 experimentos independientes (n=3) y fueron analizados en el software PRISM 8.0 mediante un análisis de la variancia de una sola vía (one-way ANOVA), usando el post hoc Tukey. Los resultados se reportaron como la media $\pm$ error estándar (ES) con un nivel de significancia de $p < 0.5$.

Resultados

La prolactina bovina y el 17 β -estradiol regulan la expresión de los elementos de la respuesta inmune innata a través de las marcas H3K9ac y H3K9me2 en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con *S. aureus*

Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó la expresión diferencial de genes de la RII y la regulación epigenética de las marcas H3K9ac y H3K9me2 (40 y 20%, respectivamente) en CEMB tratadas con la bPRL (5 ng/mL) y el E2 (50 pg/mL) y desafiadas con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Dichas marcas epigenéticas pueden estar relacionadas con los efectos inmunomoduladores de las hormonas. En este trabajo se analizó el papel de las marcas H3K9ac (una marca asociada con la expresión de genes) y H3K9me2 (una marca asociada con la represión de genes) en la modulación de la expresión de los genes de la RII inducida por las hormonas mediante ensayos de CHIP y PCR tiempo real. Los resultados mostraron que la marca epigenética H3K9ac se enriqueció de manera significativa en la región promotora de los genes *IL-8*, *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* (2.38, 3.15, 9.30 y 7.56 veces, respectivamente) en las CEMB previamente tratadas con la mezcla hormonal y desafiadas 2 h con *S. aureus* (MOI 30:1) (Figura 1C, D, E y F). No obstante, en las CMEB desafiadas con la bacteria los niveles de enriquecimiento en la región promotora de estos genes disminuyó de manera significativa (1.52, 1.58, 2.17 y 3.15 veces, respectivamente) (Figura 1C, D, E y F). Así mismo, también se observó un aumento significativo en la región promotora solo en los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP*

(1.86, 3.84 y 2.61 veces, respectivamente) en las CEMB tratadas con la mezcla hormonal (Figura 1 D, E y F). En línea con lo anterior, se observó un efecto similar para la marca epigenética H3K9ac en la región promotora del gen de *IL-1 β* (2.30 veces) (Figura 1B), en CEMB bajo las mismas condiciones. Mientras que en las CMEB tratadas y no con la mezcla hormonal y desafiadas con *S. aureus* el nivel de enriquecimiento de H3K9ac en la región promotora del gen de *IL-1 β* se redujo (Figura 1B). De manera interesante, un efecto contrario se observó para el gen de *TNF α* , ya que se encontró un enriquecimiento significativo de H3K9ac en la región promotora de este gen en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (4.14 veces) (Figura 1A). Mientras que en presencia de la mezcla hormonal disminuyó dramáticamente en las CEMB desafiadas o no (Figura 1A). En vista de que los cambios de acetilación de las histonas se ven acompañados por cambios en los niveles de metilación de las mismas, también se evaluó el enriquecimiento de la marca represora H3K9me2 en la región promotora de estos genes. Los resultados mostraron que hubo un enriquecimiento significativo de esta marca epigenética en la región promotora de los genes *IL-8*, *BNBD10* y *LAP* (2.0, 7.09 y 5.62 veces, respectivamente) en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (Figura 2C, E, F). Un efecto similar se observó en el enriquecimiento de esta marca en la región promotora del gen de *IL-1 β* (3.17 veces) (Figura 2B). Notablemente, en las CEMB tratadas (12 h) con la mezcla hormonal y posteriormente desafiadas con *S. aureus*, la marca H3K9me2 disminuyó de manera significativa en la región promotora de los genes *IL-8*, *BNBD10* y *LAP* (1.12, 3.56 y 3.61 veces, respectivamente) (Figura 2C, E y F). Además, en las CMEB únicamente tratadas con la mezcla hormonal, H3K9me2 solo se enriqueció en la región promotora de los genes *BNBD10* y *LAP* (2.0 y 2.76 veces, respectivamente) (Figura 2E y F). Interesantemente, un se observó efecto contrario en el enriquecimiento de H3K9me2 en la región promotora del gene de *TNF α* . Un enriquecimiento significativo (2.67 veces) de esta marca epigenética se observó en la región promotora de este gene en las CEMB tratadas (12 h) con la mezcla hormonal y posteriormente desafiadas con *S. aureus* (Figura 2A), mientras que en las CEMB tratadas o no con la mezcla hormonal y desafiadas o no con la bacteria, esta marca disminuyó sustancialmente (Figura 2A). Además, no se observó un cambio en el enriquecimiento de la marca H3K9me2 para el gene de *IL-10* (Figura

2D) bajo todas las condiciones evaluadas. Estos resultados indican que la bPRL y E2 modulan elementos de la RII en CEMB desafiadas con *S. aureus* a través de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2.

La expresión de miRNAs bovinos es regulada por la prolactina bovina y el 17 β -estradiol en células de epitelio mamario bovino desafiadas con *S. aureus*

Por otra parte, con el fin de determinar otros mecanismos epigenéticos modulados por bPRL y E2 en la regulación de la expresión de genes de la RII en las CEMB desafiadas con *S. aureus*, se evaluaron miRNAs como: miR-21a, Let-7a-5p, miR-30b, miR-155, miR23a, miR-7863, miR-451, miR-144 y miR-146a, los cuales participan de manera importante en la regulación de la expresión de genes de la RII. Mediante ensayos de RT-qPCR, los resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de miR-155, miR-146a, miR-21a, miR-451, miR-23a, miR-30b, miR-7863, miR-144, Let-7a-5p (8.2, 8.6, 16.56, 13.72, 7.59, 23.0, 11.97, 6.74 y 4.14 veces, respectivamente) en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (Figura 3A- I), mientras que en presencia de las hormonas el nivel de expresión de miR-155, miR-146a, miR-21a disminuyó de manera significativa (4.88, 5.89, 4.79). Un efecto similar fue observado en la expresión de miR-23a, miR-30b, miR-7863, miR-144, Let-7a-5p (5.56, 15.20, 3.77, 4.70, 1.86 veces, respectivamente) bajo estas mismas condiciones (Figura 3E, F, G, H e I). Sin embargo, bajo estas condiciones no hubo cambios en la expresión de miR-451 (Figura 3D). Importantly, bPRL y E2 indujeron la expresión de miR-155, miR-146a, miR-21a, miR-451 (2.66, 2.88, 3.24 y 3.37 veces, respectivamente) en las CEMB (Figura 3A, B, C y D). Estos resultados indican que la bPRL y el E2 regulan la expresión de miARNs que están involucrados en la regulación de los genes de la respuesta inmune innata, particularmente de la respuesta inflamatoria.

Discusión

Cambios abruptos en las concentraciones de las hormonas reproductivas, como prolactina y 17 β -estradiol, inducen un desequilibrio de la respuesta inmune innata de la glándula mamaria, lo cual está asociado a la susceptibilidad de desarrollar infecciones intramamarias como la mastitis (Lamote *et al* 2006; Newman *et al*, 2010; Need *et al*, 2014; Enger *et al*, 2018; Lacasse *et al*, 2019). Previamente se demostró

que bPRL induce una respuesta pro-inflamatoria en las CEMB, la cual es inhibida por *S. aureus* (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008; Lara-Zárate *et al*, 2011; Medina-Estrada *et al*, 2015), mientras que E2 induce una respuesta anti-inflamatoria y antimicrobiana (Medina-Estrada *et al*, 2016). Además, la mezcla hormonal favoreció la respuesta antimicrobiana en las CEMB y esta respuesta fue mantenida después de la infección con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Importantly, Salgado-Lora y colaboradores (2020) demostraron que las hormonas regularon la acetilación global de la histona H3 y marcas específicas, tales como la H3K9ac y H3K9me2 en CEMB desafiadas con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). En este trabajo se muestra evidencia de que la RII montada por las CEMB durante el desafío con *S. aureus* es regulada por las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2. Los resultados mostraron E2 y bPRL favorecen el enriquecimiento de la marca epigenética H3K9ac, una marca asociada a la expresión de genes, en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* (Figura 1D, E y F), lo cual sugiere que la cromatina esta descondensanda y esto permite que la maquinaria transcripcional se posicione para iniciar la transcripción. Estos resultados están en acuerdo con lo reportado por Salgado-Lora y colaboradores (2020), en el que se mostró que la mezcla hormonal regula de manera positiva la expresión de estos genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Previamente se demostró que *S. aureus* inhibe la expresión de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* (Medina-Estrada *et al*, 2015; Salgado-Lora *et al*, 2020), posiblemente para disminuir la defensa antimicrobiana por parte de la célula hospedera. Aquí se muestra que esta regulación negativa de los genes antimicrobianos y anti-inflamatorio coincide con la reducción del enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de estos genes (Figura 1D, E y F). Interesantemente, el enriquecimiento de la marca H3K9ac inducido por la mezcla hormonal fue más evidente en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* cuando las CEMB fueron infectadas con *S. aureus* (Figura 1D, E y F), y esto también coincide con la expresión de estos genes bajo las mismas condiciones (Salgado-Lora *et al*, 2020). Sin embargo, estos resultados no coinciden con el estudio realizado solo usando E2 (Medina-Estrada *et al*, 2015). Posiblemente esto se deba al hecho de que bPRL este potenciando el efecto del E2; sin embargo, la comunicación entre las vías de señalización de ambas hormonas requiere una fuerte

investigación (Rasmussen *et al*, 2010). Notablemente, se observó una relación inversa entre la marca H3K9ac y la marca H3K9me2 en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP*, en donde la mezcla hormonal reduce el enriquecimiento de la marca H3K9me2 (Figura 2D, E, F), lo cual coincide con el enriquecimiento de la marca H3K9ac y la expresión de los genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Además, *S. aureus* induce el incremento de H3K9me2 en la región promotora de estos genes (Figura 2D, E, F), lo cual coincide con la regulación negativa de estos genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Estos resultados no coinciden con lo reportado por Barajas-Mendiola y colaboradores (2022), esto debido a que probablemente el E2 está opacando el efecto de la bPRL, y en este estudio los ensayos se realizaron solo usando bPRL (Barajas-Mendiola *et al*, 2022). Similarmente, la mezcla hormonal favorece el enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-8* e *IL-1 β* (Figura 1B y C) coincidiendo con la reducción de la marca H3K9me2 (Figura 2B y C) y la regulación positiva de estos genes previamente reportada por Salgado-Lora y colaboradores (2020). Además, se observó que *S. aureus* induce una reducción del enriquecimiento de la marca H3K9ac en estos genes (Figura 1B y C), coincidiendo con el aumento de la marca H3K9me2 en la región promotora de estos genes (Figura 2B, C). Sin embargo, la expresión de los genes *IL-8* e *IL-1 β* (Salgado-Lora *et al*, 2020) bajo estas condiciones, no coincide con lo reportado aquí, posiblemente otras marcas epigenéticas como H3K14ac, H3K27ac o H3K4me3, marcas asociadas a la expresión de genes, estén participando en la regulación de la expresión de *IL-8* e *IL-1 β* bajo las condiciones ya mencionadas (Modak *et al*, 2014). Investigaciones futuras serán necesarias para responder esta pregunta. De manera importante la regulación de las marcas H3K9ac y H3K9me2 sobre los genes *IL-8* e *IL-1 β* fueron reproducibles cuando las CEMB fueron tratadas solo con bPRL en las mismas condiciones (Barajas-Mendiola *et al*, 2022), esto probablemente se deba a los efectos pro-inflamatorios de la bPRL (Medina-Estrada *et al*, 2015). Previamente en el grupo se reportó que *S. aureus* induce la expresión y secreción de TNF α en las CEMB y que esta expresión es regulada de forma negativa por bPRL (Medina-Estrada *et al*, 2015) y por la mezcla hormonal (Salgado-Lora, M. G., *et al*, 2020). Esto es consistente con nuestros resultados debido a que la marca H3K9ac se incrementó

en la región promotora de este gene en las CEMB desafiadas con *S. aureus* y se redujo en presencia de la mezcla hormonal (Figura 1A). Además, también se observó una relación inversa entre las marcas H3K9ac y H3K9me2 en la región promotora de este gene (Figura 2A). Este efecto fue similar en ensayos donde solo se usó bPRL (Barajas-Mendiola *et al*, 2022). Estos resultados indican que la mezcla hormonal induce una regulación epigenética específica mediada por las marcas H3K9ac y H3K9me2, favoreciendo una respuesta antimicrobiana y disminuyendo la respuesta pro-inflamatoria.

Por otra parte, pequeños ARNs no codificantes, como los miRNAs, participan de forma importante en la regulación de diversos procesos fisiológicos, y particularmente se ha descrito su participación en la regulación de la respuesta inmune durante infecciones bacterianas (Zhou *et al*, 2018; Chandan *et al*, 2020). Aquí se evaluó la expresión de miRNAs que están involucrados en la regulación de la RII tales como: miR-21a, Let-7a-5p, miR-30b, miR-155, miR23a, miR-7863, mir-451, miR-144 y mir-146a (Jin *et al*, 2014). miR-155, miR146a y miR-21a son miARNs que están involucrados en la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-6, IL-1 β y TNF α , a través de interaccionar directamente con elementos de la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) y se ha observado que en infecciones de bacterias intracelulares su expresión se ve incrementada (Zhou *et al*, 2018). Aquí se muestra que *S. aureus* indujo la expresión de miR-155, miR146a y miR-21a en las CEMB y significativamente el nivel de expresión disminuyó en presencia de la mezcla hormonal (Figura 3A, B, C). miR-155 es un regulador maestro de la respuesta inflamatoria, principalmente a través de la regulación de la translocación de NF- κ B hacia el núcleo para regular de manera positiva la expresión de genes pro-inflamatorios (Zhou *et al*, 2018). Además, se ha reportado que la sobre expresión de miR-155 induce la expresión y secreción de TNF α en infecciones por *Mycobacterium* promoviendo el establecimiento y la persistencia bacteriana (Behrouzi *et al*, 2019). Esto coincide con nuestros resultados, en donde se observó que *S. aureus* induce la expresión de miR-155 (Figura 3A), además esto también es consistente con los resultados de la regulación a través de las modificaciones de la histona H3, en donde se detectó una relación del enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de TNF α (Figura 1A) con la regulación positiva de la

expresión de este gene (Medina-Estrada *et al*, 2015; Salgado-Lora *et al*, 2020). Al igual que miR-155, miR-146a también es un regulador de la respuesta pro-inflamatoria en infecciones bacterianas (Zhou *et al*, 2018). Los resultados muestran que la sobreexpresión de miR-146a (Figura 3B) coincide con la regulación de la expresión y secreción de TNF α (Medina-Estrada *et al*, 2015; Salgado-Lora *et al*, 2020); y esto está relacionado al enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de este gene (Figura 1A). Sin embargo, los resultados de este trabajo no coinciden con lo reportado por Wang y colaboradores (2017), en el que mostraron una regulación negativa de miR-146a en las CEMB, esto debido a que en este estudio se usó LPS para infectar a las células (Wang *et al*, 2017). Además, las respuestas inducidas por *S. aureus* son diferentes a las inducidas por *Escherichia coli* (Thompson-Crispi *et al*, 2014). A pesar de que miR-21a regula la respuesta pro-inflamatoria durante infecciones microbianas y participa de forma importante en enfermedades de las vías respiratorias (Zhou *et al*, 2019), en infecciones intramamarias como la mastitis es escasamente conocido su papel. Aquí se muestra que *S. aureus* induce la expresión de miR-21a (Figura 1C) y esto correlaciona con la presencia de este miARN en la leche de vacas infectadas con *S. aureus* (Do *et al*, 2021). Sin embargo, se requiere de más investigación sobre la participación de este miRNA.

Además, en este trabajo se muestra que *S. aureus* induce la expresión de miR-23a, miR-30b y miR-144 en las CEMB, pero esta disminuyó significativamente en presencia de la mezcla hormonal (Figura 3E, F, H). miR-23a es también un miRNA que está dirigido a inhibir la respuesta pro-inflamatoria a través de suprimir la translocación del factor de transcripción NF- κ B hacia el núcleo y específicamente se orienta a la cinasa PI3K (Cai *et al*, 2021). Los resultados muestran que miR-23a se sobre expresa en las CEMB desafiados con *S. aureus* (Figura 3E), y esto no coincide con lo reportado por Cai y colaboradores (2021) en donde demuestran que miR-23a inhibe la respuesta inflamatoria mediada por PI3K (Cai *et al*, 2021). Esto puede deberse a que en este estudio emplearon una línea de epitelio mamario inmortalizada (MAC-T) y el LTA para infectar estas células. Sin embargo, probablemente la sobreexpresión de miR-23a tenga efecto sobre otras citocinas inflamatorias como IL-1 β , debido a que en este estudio la sobreexpresión de miR-

23a coincide con la disminución de la marca H3K9ac en la región promotora de este gene (Figura 1B), pero no con la regulación de la expresión del gen (Salgado-Lora *et al*, 2020), lo cual probablemente obedezca a que otra marca epigenética está modulando la expresión de gene (Modak *et al*, 2014). miR-30b posee un papel protector en el daño ocasionado por la inflamación y está involucrado en la inhibición de la formación del autofagosoma y persistencia de bacterias intracelulares (Xu *et al*, 2021). Aquí se demostró que miR-30b es regulado de manera positiva en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (Figura 3F), y esto correlaciona con la presencia de este miARN en la leche de vacas infectadas con *S. aureus* (Do *et al*, 2021). Probablemente miR-21a este disminuyendo la respuesta inflamatoria y promoviendo que *S. aureus* se establezca de manera exitosa en el nicho intracelular; sin embargo, para responder esto es necesaria una posterior investigación. miR-144 está involucrado en la regulación negativa de la expresión de TNF α e INF γ a través de la vía de señalización TLR2/JAK/MAPK (Zhou *et al*, 2018), aquí se muestra evidencia que *S. aureus* induce la expresión de este miARN en las CEMB (Figura 3H). El papel de este miRNA no ha sido explorado en infecciones por *S. aureus*, mientras que, en otras enfermedades, como la tuberculosis, tiene una relevancia importante en la protección inmune al contribuir con la regulación negativa de TNF α e INF γ (Behrouzi A. *et al*, 2019). Es necesaria mayor investigación para entender el papel de miR-144 en infecciones intramamarias como la mastitis. Adicionalmente, se muestra que *S. aureus* induce la expresión de miR-7863 en las CEMB y significativamente su nivel de expresión disminuyó en presencia de la mezcla hormonal (Figura 3G), esto coincide con lo reportado por Loureng y colaboradores (2018). Ellos reportaron mediante un análisis transcripcional que miR-7863 solo se expresa en mastitis causadas por *E. coli* y *S. aureus*, en este sentido miR-7863 podría ser usado como un biomarcador de la mastitis bovina (Luoreng *et al*, 2018). Sin embargo, al observar que la mezcla hormonal reduce su expresión (Figura 3G) podría ser interesante buscar el blanco y el mecanismo molecular implicado en la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Let-7a-5p está involucrado en la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-6, IL-1 β y TNF α (Zhou *et al*, 2018). Nuestro estudio muestra que Let-7a-5p se expresó de manera importante en las CEMB desafiadas

con *S. aureus*. En contraste con nuestros resultados, Magryś & Bogut (2021) reportaron que la variante de colonia pequeña (SCV) de *Staphylococcus epidermidis* reguló de manera negativa la expresión de Let-7a-5p cambiando el perfil pro-inflamatorio a un entorno antiinflamatorio, lo cual favorece la persistencia intracelular en los macrófagos THP-1 (Magryś & Bogut, 2021). En este sentido, Let-7a-5p podría ser clave en la respuesta inmune de las CEMB durante la infección por *S. aureus*, porque la regulación positiva de este miARN coincide con la regulación negativa de la expresión de IL-6 (Medina-Estrada *et al*, 2015). Finalmente, En este trabajo se observó que *S. aureus* induce la expresión de miR-451: sin embargo, la presencia de la mezcla hormonal no produjo cambios (Figura 3D). Esto coincide con lo reportado por Murata y colaboradores (2014). En ese trabajo se demostró que miR-451 se sobre expresa en neutrófilos murinos estimulados con LPS y que regula de manera importante la respuesta inflamatoria a través de la vía p38MAPK, además esto se relacionó con la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos hacia el sitio de infección durante una infección (Murata *et al*, 2014). En este sentido, un efecto similar puede estar sucediendo en nuestro modelo de estudio, debido a *S. aureus* induce la expresión de miR-144 en las CEMB (Figura 3H) y esto coincide con la reducción del enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora (Figura 1C) y con la inhibición de la expresión de este gen (Salgado-Lora *et al*, 2020). Estos resultados sugieren que bPRL y E2, a través de la expresión de miARNs y de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, participan de manera importante en la regulación de la respuesta inmune montada por las CEMB. Sin embargo, bacterias como *S. aureus* pueden desregular la respuesta inmunológica montada por las CEMB a través de la modulación de estos mecanismos epigenéticos, lo cual puede explicar, en parte, la evasión del sistema inmune montado por las células hospederas, así como su persistencia en ellas.

Conclusión

Los resultados sugieren que la prolactina bovina y el 17 β -estradiol regulan la expresión de los elementos de la respuesta inmune innata de las CEMB a través de la regulación de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2. Además, las hormonas regulan diferencialmente la expresión de miARNs involucrados en la

respuesta inflamatoria de las CMEB durante el desafío con *S. aureus*. Esto indica que las hormonas favorecen la respuesta antimicrobiana, disminuyendo la respuesta pro-inflamatoria.

Figuras

Figura 1

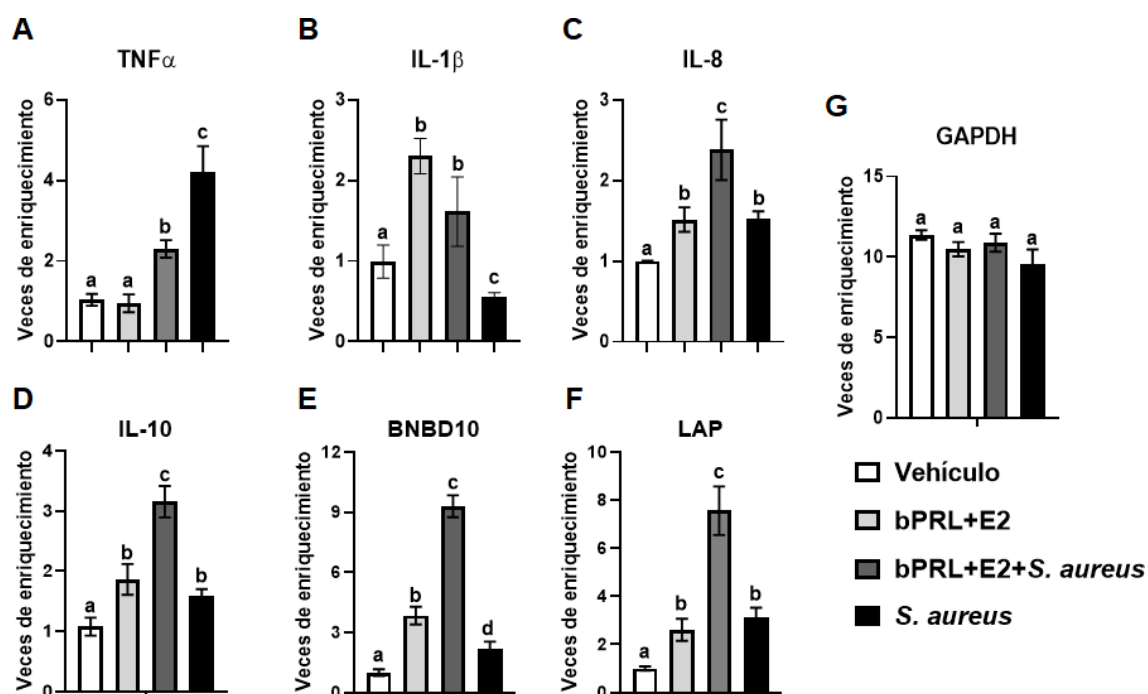


Figura 2

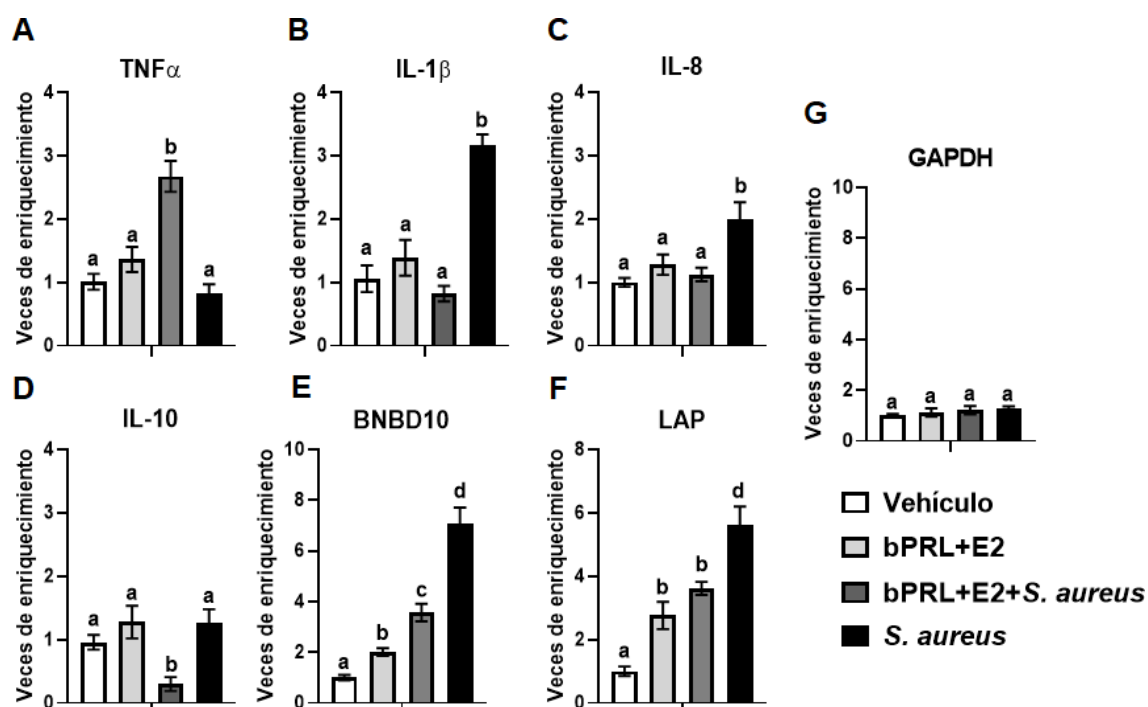
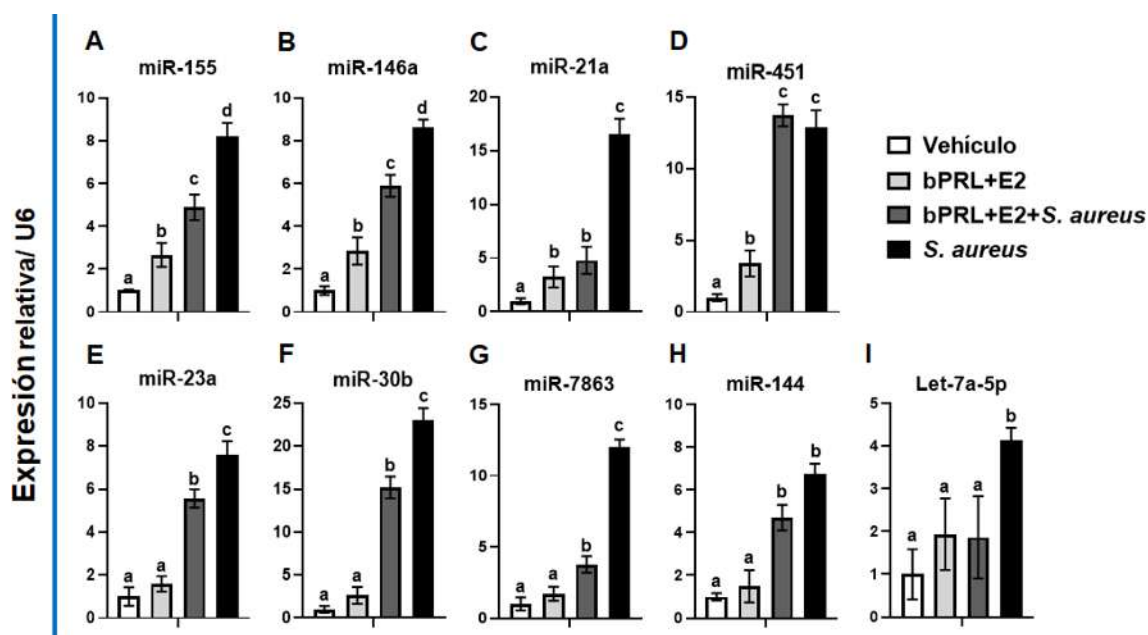


Figura 3



Leyendas de figura

Figura 1. Análisis del enriquecimiento de la marca H3K9ac inducido por prolactina y 17 β -estradiol en la región promotora de los genes de los elementos de la respuesta inmune innata en CEMB desafiadas con *S. aureus*. Monocapas (1×10^6 células) de CEMB tratadas (12 h) con prolactina bovina (bPRL, 5 ng/mL) y 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) y desafiadas (2) con *S. aureus* (MOI 30:1), fueron usadas para analizar el enriquecimiento de la marca H3K9ac (marca asociada a la expresión de los genes) en la región promotora de los genes TNF α **A**), IL-1 β **B**), IL-8 **C**), IL-10 **D**), BNBD10 **E**) y LAP **F**) mediante ensayos de ChIP-qPCR. Los datos se normalizaron con respecto al control de isotipo IgG; y la expresión del vehículo (células + 1% de etanol) se consideró como 1. Las barras corresponden a la media $\pm$ error estándar de 4 experimentos independientes (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de una sola vía, post hoc Tukey, $p < 0.05$). GAPDH **G**) se usó como control positivo del enriquecimiento de la marca H3K9ac. **Vehículo:** CEMB tratadas con etanol al 1%; **bPRL + E2:** CEMB tratadas con prolactina (5 ng/mL) y 17 β -estradiol (50 pg/mL); **bPRL + E2 + *S. aureus*:** CEMB tratadas con la mezcla hormonal y desafiadas con *S. aureus*; ***S. aureus*:** CEMB desafiadas con *S. aureus*.

Figura 2. Análisis del enriquecimiento de la marca H3K9me2 inducido por prolactina y 17 β -estradiol en la región promotora de los genes de los elementos de la respuesta inmune innata en CEMB desafiadas con *S. aureus*. Monocapas (1×10^6 células) de CEMB tratadas (12 h) con prolactina bovina (bPRL, 5 ng/mL) y 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) y desafiadas (2) con *S. aureus* (MOI 30:1), fueron usadas para analizar el enriquecimiento de la marca H3K9me2 (marca asociada a la represión de los genes) en la región promotora de los genes TNF α **A**), IL-1 β **B**), IL-8 **C**), IL-10 **D**), BNBD10 **E**) y LAP **F**) mediante ensayos de ChIP-qPCR. Los datos se normalizaron con respecto al control de isotipo IgG; y la expresión del vehículo (células + 1% de etanol) se consideró como 1. Las barras corresponden a la media $\pm$ error estándar de 4 experimentos independientes (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de una sola vía, post hoc Tukey, $p < 0.05$).

GAPDH **G)** se usó como control negativo del enriquecimiento de la marca H3K9me2. **Vehículo**: CEMB tratadas con etanol al 1%; **bPRL + E2**: CEMB tratadas con prolactina (5 ng/mL) y 17 β -estradiol (50 pg/mL); **bPRL + E2 + S. aureus**: CEMB tratadas con la mezcla hormonal y desafiadas con *S. aureus*; **S. aureus**: CEMB desafiadas con *S. aureus*.

Figura 3. Expresión de miRNAs inducidos por prolactina y 17 β -estradiol en CEMB durante el desafío con *S. aureus*. Ensayos de RT-qPCR para evaluar la expresión de miARNs en macrófagos bovinos tratados con PRL y E2 y desafiadas con *S. aureus*. Monocapas (2.5×10^5 células) de CEMB tratadas (12 h) con prolactina bovina (bPRL, 5 ng/mL) y 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) y desafiadas con *S. aureus* (2 h) (MOI 30:1), fueron usadas para analizar la expresión relativa de miR-155 **A)**, miR-146a **B)**, miR-21a **C)**, miR-451 **D)**, miR-23a **E)**, miR-30b **F)**, miR- 7863 **G)**, miR-144 **H)**, y Let-7a-5p **I)**. El miARN U6 fue usado como gen endógeno para todas las condiciones. Los valores se normalizaron con respecto al vehículo. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de 4 experimentos independientes (n=4). Letras diferentes indican cambios significativos (ANOVA de dos vías y el post hoc Tukey $p < 0.05$). **Vehículo**: CEMB tratadas con etanol al 1%; **bPRL + E2**: CEMB tratadas con prolactina (5 ng/mL) y 17 β -estradiol (50 pg/mL); **bPRL + E2 + S. aureus**: CEMB tratadas con la mezcla hormonal y desafiadas con *S. aureus*; **S. aureus**: CEMB desafiadas con *S. aureus*.

Referencias

- Gussmann, M., Denwood, M., Kirkeby, C., Farre, M., & Halasa, T. (2019). Associations between udder health and culling in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 171, 104751. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104751>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>.
- Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F., & Mallard, B. A. (2014). Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Frontiers in Immunology*, 5, 493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00493>.

Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H. J., ... & Seyfert, H. M. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports*, 7(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>.

Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H. M., Nürnberg, G., & Schuberth, H. J. (2008). *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary research*, 39(2), 1-23. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007057>.

Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2006). Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. *Veterinary research*, 37(1), 61-74. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005038>.

Newman, K. A., Rajala-Schultz, P. J., DeGraves, F. J., & Lakritz, J. (2010). Association of milk yield and infection status at dry-off with intramammary infections at subsequent calving. *Journal of dairy research*, 77(1), 99-106. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990380>.

Enger, B. D., Crutchfield, C. E., Yohe, T. T., Enger, K. M., Nickerson, S. C., Parsons, C. L., & Akers, R. M. (2018). *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in non-lactating mammary glands stimulated to rapidly grow and develop with estradiol and progesterone. *Veterinary research*, 49(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0542-x>.

Lacasse, P., Zhao, X., & Ollier, S. (2019). Effect of stage of lactation and gestation on milking-induced hormone release in lactating dairy cows. *Domestic animal endocrinology*, 66, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.10.003>.

Need, E. F., Atashgaran, V., Ingman, W. V., & Dasari, P. (2014). Hormonal regulation of the immune microenvironment in the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 19, 229-239. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9324-x>.

Rainard, P., Gilbert, F., & Germon, P. (2022). Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in Immunology*, 13, 1031785. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031785>.

- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López- Meza, J. E., Bravo-Patino, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of infection*, 54(4), 399-409. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>.
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López- Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 121(1-2), 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.007>.
- Lara-Zárate, L., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 51(5), 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.07.010>.
- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2015). Non- classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis*, 89, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.018>.
- Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6120509>.
- Holliday, H., Baker, L. A., Junankar, S. R., Clark, S. J., & Swarbrick, A. (2018). Epigenomics of mammary gland development. *Breast cancer research*, 20, 1-11.
- Ivanova, E., Le Guillou, S., Hue-Beauvais, C., & Le Provost, F. (2021). Epigenetics: new insights into mammary gland biology. *Genes*, 12(2), 231. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1031-x>.
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487-500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Zhang, Q., & Cao, X. (2019). Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. *Nature Reviews Immunology*, 19(7), 417-432.

<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0151-6>.

Singh, K., Erdman, R. A., Swanson, K. M., Molenaar, A. J., Maqbool, N. J., Wheeler, T. T.,... & Stelwagen, K. (2010). Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15, 101-112.

<https://doi.org/10.1007/s10911-010-9164-2>.

He, Y., Song, M., Zhang, Y., Li, X., Song, J., Zhang, Y., & Yu, Y. (2016). Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*, 17, 1-12.

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2947-0>.

Song, M., He, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Li, X., & Yu, Y. (2016). Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Scientific reports*, 6(1), 29390.

<https://doi.org/10.1007/s10911-010-9164-2>.

Salgado-Lora, M. G., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2020). Prolactin and estradiol are epigenetic modulators in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* infection. *Pathogens*, 9(7), 520.

<https://doi.org/10.3390/pathogens9070520>.

Barajas-Mendiola, M. A., Salgado-Lora, M. G., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2022). Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 990478.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.990478>.

Das, K., Garnica, O., & Dhandayuthapani, S. (2016). Modulation of host miRNAs by intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 79. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00079>.

Do, D. N., Dudemaine, P. L., Mathur, M., Suravajhala, P., Zhao, X., & Ibeagha-Awemu, E. M. (2021). MiRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3080. <https://doi.org/10.3390/ijms22063080>.

Jin, W., Ibeagha-Awemu, E. M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., & Guan, L. L. (2014). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals

- pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC genomics*, 15(1), 1-16.
- Lewandowska-Sabat, A. M., Hansen, S. F., Solberg, T. R., Østerås, O., Heringstad, B., Boysen, P., & Olsaker, I. (2018). MicroRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected in vitro with two strains of *Streptococcus agalactiae*. *BMC genomics*, 19, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-181>.
- Anaya-López, J. L., Contreras-Guzmán, O. E., Cáramez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V. M., Lopez-Meza, J. E., Valdez-Alarcon, J. J., & Ochoa-Zarzosa, A. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 81(3), 358-361. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.02.002>.
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2015). The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Molecular Immunology*, 68(2), 445-455. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.025>.
- Rasmussen, L. M., Frederiksen, K. S., Din, N., Galsgaard, E., Christensen, L., Berchtold, M. W., & Panina, S. (2010). Prolactin and oestrogen synergistically regulate gene expression and proliferation of breast cancer cells. *Endocrine-related cancer*, 17(3), 809-822. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0326>.
- Modak, R., Das Mitra, S., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar, M., Bhat, A. V., ... & Kundu, T. K. (2014). Epigenetic response in mice mastitis: role of histone H3 acetylation and microRNA (s) in the regulation of host inflammatory gene expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical epigenetics*, 6(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-6-12>.
- Zhou, X., Li, X., & Wu, M. (2018). miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 14.
- Chandan, K., Gupta, M., & Sarwat, M. (2020). Role of host and pathogen-derived microRNAs in immune regulation during infectious and inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 3081. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0006-9>.
- Behrouzi, A., Alimohammadi, M., Nafari, A. H., Yousefi, M. H., Riazi Rad, F., Vaziri, F., & Siadat, S. D. (2019). The role of host miRNAs on *Mycobacterium tuberculosis*. *ExRNA*, 1(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0040-y>.

Wang, X. P., Luoreng, Z. M., Zan, L. S., Li, F., & Li, N. (2017). Bovine miR-146a regulates inflammatory cytokines of bovine mammary epithelial cells via targeting the TRAF6 gene. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7648-7658. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12630>.

Cai, M., Fan, W., Li, X., Sun, H., Dai, L., Lei, D., ... & Liao, Y. (2021). The regulation of *Staphylococcus aureus*-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 683886. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.683886>.

Zhou, Y., Yang, Y., Liang, T., Hu, Y., Tang, H., Song, D., & Fang, H. (2019). The regulatory effect of microRNA-21a-3p on the promotion of telocyte angiogenesis mediated by PI3K (p110 α)/AKT/mTOR in LPS induced mice ARDS. *Journal of translational medicine*, 17(1), 1-27. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02168-z>.

Xu, J., Li, H., Lv, Y., Zhang, C., Chen, Y., & Yu, D. (2021). Silencing XIST mitigated lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury in human lung fibroblast WI-38 cells through modulating miR-30b-5p/CCL16 axis and TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Open Life Sciences*, 16(1), 108-127. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0005>.

Luoreng, Z. M., Wang, X. P., Mei, C. G., & Zan, L. S. (2018). Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 14(1), 87. <https://doi.org/doi:10.7150/ijbs.22498>.

Magryś, A., & Bogut, A. (2021). MicroRNA hsa-let-7a facilitates staphylococcal small colony variants survival in the THP-1 macrophages by reshaping inflammatory responses. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(8), 151542. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151542>.

Murata, K., Yoshitomi, H., Furu, M., Ishikawa, M., Shibuya, H., Ito, H., & Matsuda, S. (2014). MicroRNA-451 down-regulates neutrophil chemotaxis via p38 MAPK. *Arthritis & rheumatology*, 66(3), 549-559. <https://doi.org/10.1002/art.38269>.

8.3 Capítulo II

Se presenta el manuscrito: Prolactin and 17β -estradiol modulates the innate immune response through epigenetics mechanisms in bovine macrophages challenged with *Staphylococcus aureus*.

Prolactin and 17 β -estradiol modulates the innate immune response of bovine macrophages challenged with *Staphylococcus aureus* through epigenetic mechanisms

Marco Antonio Barajas-Mendiola¹, Joel Edmundo López-Meza¹ and Alejandra Ochoa Zarzosa^{1*}

¹Centro 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, Morelia, C.P. 58893, 1919466e@umich.mx (M.A. B-M); elmeza@umich.mx (J.E. L-M)

*Correspondence: ochoaz@umich.mx

Abstract

Staphylococcus aureus is the most prevalent pathogen associated with subclinical mastitis, an inflammatory disease of the mammary gland of dairy cattle that significantly affects the economy of dairy farming worldwide. The neuroendocrine system regulates critical immune system components, such as macrophages, through bidirectional communication by neurotransmitters, cytokines, and hormones involving epigenetic regulation. Therefore, changes in the levels of reproductive hormones, such as bovine prolactin (bPRL) and 17 β -estradiol (E2), compromise the innate immune response (IIR) of the mammary gland. In this work, we evaluated the effect of bPRL and E2 on the IIR of bovine macrophages challenged with *S. aureus*. We showed by RT-qPCR and flow cytometry that physiologic concentrations of the hormones (bPRL 5 ng/mL; E2 50 pg/mL) induced significant changes in the expression of pro and anti-inflammatory cytokines, chemokines, and antimicrobial peptides in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Notably, these effects were non-dependent on the TLR2 receptor. Additionally, miRNA expression was analyzed by qPCR. Results showed that miR-451, miR-155, and miR-7863 expression increased significantly in macrophages challenged with *S. aureus* but decreased substantially in the presence of the hormones. Interestingly, the miR-146a and miR-21a expression was increased in

infected macrophages in the presence of the hormonal mix. Further, the hormones, but not *S. aureus*, increased the Let-7a-5p expression; similar results were observed for miR-30b and miR-23a expression. Moreover, we showed that bPRL and E2 favor the global acetylation of histone H3 and the epigenetic H3K9ac mark, but no H3K9me2 mark in macrophages challenged or not with *S. aureus*. Finally, we determined that bPRL and E2 induced HDAC activity in macrophages, which was increased by the bacterium. All these findings suggest that bPRL and E2 regulate IIR elements and epigenetic mechanisms in macrophages challenged with *S. aureus*.

Keywords: hormones, macrophages, epigenetic regulation, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis.

Introduction

Subclinical mastitis is an inflammatory disease of the mammary gland (MG) of dairy cattle mainly caused by the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* that produces important economic losses for dairy farming around the world (Huijps, K., et al, 2008; Thompson-Crispi, K, et al., 2014; Günther, J. et al, 2017; Ruegg, P. L., 2017; Dego, O. K., 2020). In this sense, MG is the primary target tissue for establishing *S. aureus* infection (Aitken, S. L., et al, 2011; Sordillo L. M. et al, 2018). This infection could become a chronic infection impairing the innate immune response (IIR) and compromising the integrity of tissue, leading to functional loss of the tissue, which in turn leads to the culling of the animal (Gussmann, M., et al, 2019). Moreover, MG is a complex tissue composed of different types of cells (endothelial, epithelial, leucocyte cells, etc). It is the target of reproductive hormones such as prolactin (PRL) and 17 β -estradiol (E2), which play an essential role during the differentiation, development, and function of this tissue (Inman, J. L. et al, 2015). Further, abrupt changes in these reproductive hormones are associated with the IIR imbalance of the MG; this establishes a relationship between intramammary infections (IMIs) and the physiologic and reproductive status of animals (Newman, K. A., et al, 2010; Lamote, I., et al, 2006; Enger, B. D., et al, 2018; Lacasse, P., et al, 2019).

During peripartum, lactation, and dry period, cows are more susceptible to IMIs, such as mastitis, and this is associated, in part, with the reproductive hormones (Lamote, I., et al, 2006; Lacasse, P., et al, 2019; Alhussien, M. N., & Dang, A. K., 2020). As a part of the immune response of MG against pathogens, epithelial cells play an important role in triggering a relevant defense against infection because they are in close contact with the pathogen (Rainard, P., Gilbert, F., & Germon, P., 2022). Moreover, the role of PRL and E2 on the regulation of IIR elements in epithelial cells of MG during the challenge with *S. aureus* has been explored in our workgroup. We demonstrated that bovine PRL (bPRL) at a physiological concentration (5 ng/mL) induces a pro-inflammatory response and promotes the internalization of *S. aureus* into bovine mammary epithelial cells (bMECs) (Gutiérrez-Barroso, A., et al, 2008; Lara- Zarate L., et al, 2011; Medina-Estrada I., et al, 2015). Also, E2 at a physiological concentration (50 pg/mL) induces anti-inflammatory and antimicrobial response and reduces the internalization of the bacteria (Medina-Estrada I., et al, 2016). In addition, the hormonal mix causes similar effects showed by E2 in bMECs challenged with *S. aureus* (Salgado-Lora M. G., et al, 2022). However, in bacterial persistent studies, we observed that this response is insufficient to eliminate the infection (personal communication). In this sense, another component of the IIR, such as macrophages, becomes critical for stopping infection (Renna, M. S., et al, 2019).

Macrophages are professional phagocytes that engulf invading microorganisms like *S. aureus* and trigger several killing mechanisms to efficiently eliminate the bacteria (Pidwill G. R., et al, 2021). Despite this, *S. aureus* can survive in macrophages and persist intracellularly, eventually enabling bacterial dissemination (Hommes, J. W., & Surewaard, B. G, 2022). Notably, Alhusien et al, (2015) reported that the number and the phagocytic activity of macrophages decreased in animals with subclinical mastitis (Alhusien, M., et al, 2015). This shows that macrophages in cattle dairy are critical components associated with the health status of animals. On the other hand, epigenetic mechanisms (e.g., chemical modifications on DNA and histones, miRNAs) have a relevant role in the regulation of the development, function, and health of the MG (Holliday, H., et al, 2018;

Ivanova, E., et al, 2021). Research in bovines found that the hypomethylation of the α -casein gene favors its expression, while methylation represses it (Singh, K. et al 2010). Further, an increase in DNA methylation was observed in peripheral blood lymphocytes from cows with mastitis naturally infected with *S. aureus* (Song, M., et al, 2016). In addition, the histone H3K9me3 was up-regulated in lymphocytes from cows with subclinical mastitis caused by *S. aureus*, and this was related to the down-regulation of the expression of the inflammatory response genes (He, Y., et al, 2016). Moreover, previously we reported that bPRL and E2 modulate the IIR through H3K9ac and H3K9me2 regulation in bMECs challenged with *S. aureus* (Salgado-Lora, M. G., et al 2020; Barajas-Mendiola, M. A., et al 2022). miRNAs are another epigenetic mechanism regulating MG functions (Do, D. N. et al, 2021). For example, the miRNA expression analysis of monocytes-derived macrophages infected with *Streptococcus agalactiae* showed that miRNAs promote an inflammatory phenotype in these cells regulating the expression of IL-6, IL-1 β , and TNF α genes (Lewandowska-Sabat, A. M., 2018). Notably, the miRNA regulatory function has been broadly reported in the bovine mammary epithelium and is a key regulator of the immune response during bacterial infection (Miretti S, et al, 2020; Do, D. N., et al, 2021), but in macrophages, is scarce. Although reproductive hormones such as PRL and E2 are relevant for mammary tissue function, there are no reports related to the effect of both hormones on IIR and epigenetic regulation in bovine macrophages during *S. aureus* infection, which was the aim of this work. This will allow a better understanding of the interactions between the stress hormones and the phagocytic cells, opening up new therapeutic approaches and improving the well-being and sustainability of dairy herds.

2. Materials and Methods

2.1 Hormones

Purified bovine prolactin (bPRL) (AFP7170E) was provided by A. F. Parlow from National Hormone & Peptide Program (NHPP)-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDKD) (Torrance, CA, USA) (Parlow, 2002). 17 β -estradiol (E2) was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The

working solutions were dissolved in water and 1% ethanol sterile, respectively. We used bPRL 5 ng/mL and E2 50 pg/mL in all experiments, as reported (Medina-Estrada et al, 2015; Medina-Estrada et al, 2016).

2.2 Antibodies

For western blot assays, rabbit polyclonal antibody anti-H3ac (H3K9ac, K14ac, K18ac, K23, and K27ac) (1:1,000) (abcam, ab47915, Cambridge, UK); rabbit monoclonal antibody H3K9ac (1:1,000) (abcam, ab10812, Cambridge, UK); mouse monoclonal antibody anti-H3K9me2 (1:1,000) (abcam, ab1220, Cambridge, UK), all were used as primary antibodies; and rabbit polyclonal antibody anti-H3 (1:3000) (abcam, ab1791, Cambridge UK) was used as load control. Secondary antibodies (1:3,000) raised against mouse and rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, Ma, USA).

2.3 *Staphylococcus aureus* strain

Staphylococcus aureus subsp. aureus (ATCC27543) strain was used in this work. This strain was isolated from clinic mastitis and can invade mammary epithelial tissue. Bacteria grew overnight in Luria-Bertani (LB) broth (BIOXON, Becton Dickinson, México) at 37°C. Colony-forming units (CFU) were adjusted by measuring the optical density at 600 nm ($OD = 9.2 \times 10^7$ CFU/mL).

2.4 Primary culture of the bovine macrophages

Blood mononuclear cells were isolated from healthy lactating cows (90-120 lactating days) using the Ficoll-Paque™Plus system according to the manufacturer's specifications. Briefly, 4 mL of bovine peripheral blood was mixed with 4 mL of PBS pH 7.4 sterile. The mix was deposited in a 15 mL tube that contained 3 mL of Ficoll-Paque™Plus and centrifuged to $400 \times g$ at 20°C for 4 minutes. The mononuclear cell layer was removed and washed with 4 mL PBS pH 7.4 sterile. The cells were centrifuged to $400 \times g$ at 20°C for 15 minutes. The pellet was washed with 4 mL PBS pH 7.4 sterile and centrifuged to $100 \times g$ at 20°C for 10 minutes. Mononuclear cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 20% of fetal bovine serum (FBS) (Equitech Bio, Kerrville, TX, USA), sodium pyruvate 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

USA), penicillin 100 u/mL (GIBCO, Waltham, MA, USA), streptomycin 100 µg/mL (GIBCO, Waltham, MA, USA); and amphotericin B 1 µg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (complete RPMI-1640 medium). 2×10^6 mononuclear cells were incubated in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 2 h. Then, the floating cells (lymphocytes) were removed, and the adherent cells (monocytes) were washed with PBS pH 7.4 sterile. Finally, the monocytes were maintained in complete RPMI-1640 medium in 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 28 days (renewing the medium each 4-5 days) until differentiation to macrophages (Supplementary Figure S1).

2.5 Multiplicity of infection assay

Bovine macrophages were challenged with *S. aureus* at different multiplicities of infection (MOI, 1:1, 10:1, bacteria: cell) and several interaction times (0.5, 1, and 2 h). Phagocytized CFUs were recovered on agar LB plates after macrophage lysis and maintained at 37°C for 16 h. CFUs were counted using the Scan 500-Interscience system.

2.6 Invasion assays

Bovine macrophages were cultured in a 6-well plate (NEST Biotechnology Co., Wuxi, Jiangsu, China) previously treated with 200 µL of type 1 rat collagen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). As described above, cells were incubated in a complete medium in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Then, cells were treated with bPRL (5 ng/mL) and E2 (50 pg/mL) and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 24 h. The invasion assay was performed using the gentamicin protection assay as described (Gutiérrez-Barroso et al, 2008). Briefly, bovine macrophages treated with bPRL and E2 was challenged with *S. aureus* (OD= 0.2) with an MOI of 10:1 in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 2 h. Later, cells were washed two times with PBS (pH 7.4), and gentamicin 80 µg/mL was added to eliminate extracellular bacteria for 1 h. Finally, cells were washed two times with PBS (pH 7.4) and were employed to perform the different assays described in the following sections.

2.7 RNA Isolation, gene and miRNAs expression analysis

To analyze the effect of the hormones on the expression of IIR genes in bovine macrophages challenged or not with *S. aureus*, bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$

cells) cultured in 6-well plates were incubated with the hormones (24 h) and then challenged or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Total RNA (1 µg) was extracted with the Trizol™ Reagent (Invitrogen Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The integrity of RNA was verified by agarose gel electrophoresis, and the genomic DNA contamination was removed with DNase I (Invitrogen, Waltham MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, cDNA was synthesized using the GeneScript Reverse™ Transcriptase system (GeneCraft) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 µg of total RNA was reversed transcribed to cDNA in a 20 µL reaction containing 5X GeneScript Buffer, 0.5 µg/µL Oligo d(T) (Invitrogen), 10 mM dNTPs mix (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 10 mM DTT (Invitrogen, Waltham, MA, USA). The mix was incubated at 80°C for 3 minutes and immediately transferred to ice. Finally, 2 U/µL RNaseOUT™ (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 25 mM MgCl₂, and 10 U/µL GeneScript reverse transcriptase were added, and the reaction was incubated at 42°C for 30 minutes, followed by 80°C for 10 minutes. The RT-qPCR assay was performed by quantitative PCR using the comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The reactions were carried out with qPCRBIO SyGreen Blue Mix Hi-ROX master mix (Biosystem, Wayne, PA, USA) using specific primers (Elim Biopharm, Hayward, CA, USA). The sequences and the PCR conditions are described in **Table 1**. The GAPDH gene was used as an internal control of amplification. To analyze the effect of the hormones on miRNA expression in bovine macrophages challenged or not with *S. aureus*, the sequences and the PCR conditions used to amplify the bovine miRNAs are described in **Table 2**. U6 miRNA was used as an internal control of amplification.

2.8 Nitric oxide production assay

The nitric oxide (NO) production was assessed in culture supernatants. It was indirectly measured by a modified Griess assay (Arias-Negrete S., et al, 2014), evaluating the nitrite concentration released by bovine macrophages. Briefly, bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) were cultured in 24-well plates and then incubated with the hormones (24 h), and then challenged or not with *S. aureus*

(MOI 10:1). 100 μ L of supernatants were placed in 96-well plates, and 50 μ L of sulfanilamide solution (Griess reactive A) was added, followed by the addition of 50 μ L of N-1-naphthyl-ethylenediamine (Griess reactive B). The reaction was performed at room temperature in darkness for 30 minutes. Nitrite accumulation was determined by spectrophotometry at 540 nm using a standard curve of calibration of nitrite.

2.9 Analysis of cytokine secretion

To analyze the effect of the hormones on cytokine secretion, bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) cultured in 24-well plates were treated with the hormones (24 h) and then challenged or not with *S. aureus* (MOI 10:1). The supernatants were collected and used to determinate the secretion of cytokines using the BD™CBA Human Inflammatory Cytokine kit (Fisher Scientific, BD 551811, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions and analyzed in a BD Accury™C6 cytometer (BD Biosciences).

2.10 Histone extraction and western blot assays

To analyze the effects of the hormones on the epigenetics marks, bovine macrophages ($\sim 1 \times 10^6$ cells) cultured in 6-well plates were treated with the hormones (12 and 24 h) and then challenged or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Then, histone extraction was carried out by acid extraction as reported (Salgado-Lora M. G., et al, 2020). Briefly, cells were washed two times with PBS (pH 7.4) and detached with PBS-TE (PBS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) on ice. Cells were resuspended in an H-Lysis solution (0.25 M sucrose, 3 mM CaCl_2 , 1 mM Tris pH 8.0, and 0.5% NP-40), shooked, and centrifuged at 3,900 rpm at 4°C for 5 minutes. Then, the pellet was recovered and washed with an H-wash solution (300 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, and 0.5% NP-40), shooked, and centrifuged at 3900 rpm at 4°C for 5 minutes. Histone extraction was accomplished with an H-extraction solution (0.5 M HCl, 10% glycerol, and 0.1 M 2-mercaptoethylamine-HCl). Then the supernatant was recovered by centrifugation at 13,000 rpm at 4°C for 10 minutes, and cold acetone was added (1:5 ratio). Finally, the histones were precipitated for 5 days at -20°C. The precipitate was recovered by centrifugation at 13,000 rpm at 4°C for 10 minutes, dissolved in 25 μ L

of the sterile deionized water, and stored at -80°C until use.

For western blot analysis, the histones were separated in a 15% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane by semi-dry transfer, as reported (Salgado-Lora M. G., et al, 2020). The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in cold PBS at 4°C overnight. Subsequently, the membranes were washed three times with cold TBS and then incubated with the primary antibodies: anti- H3ac (1:1,000), anti-H3K9ac (1:1,000), anti-H3K9me2 (1:1,000), and anti-H3 (1:3,000), at 4°C overnight. Then, primary antibodies were removed and stored at 4°C. The membranes were washed three times with cold TBS, and incubated 2 h at 4°C with the horseradish peroxidase-coupled anti-IgG secondary antibody (1:3,000). Then, the secondary antibody was removed and stored at -20°C, and the membranes were washed three times with cold TBS. Finally, 200 µL of ECL substrate was added to membranes and exposed to an X-ray plate. The plate was manually developed in the dark. The intensity of the signals was quantified by densitometry with the ImageJ software. 3.5 mM sodium butyrate was used as a positive control for H3K9ac induction and negative control for H3K9me2 induction (supplementary figure S4). Data were normalized based on the H3 signal and presented as the relative expression level concerning untreated cells.

2.11 HDACs activity

Bovine macrophages ($\sim 1 \times 10^6$ cells) cultured in 6-well plates were treated with the hormones (6 and 12 h) and then challenged or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Then, cells were washed two times with PBS (pH 7.4) and detached with PBS-TE (PBS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) on ice. Immediately, preparation of the samples for the fluorometric assay was performed according to the manufacturer's instructions of the Histone Deacetylase (HDAC Activity Assay Kit Fluorometric Kit (abcam, ab15604, Cambridge, UK). The changes in fluorescence intensity were monitored for 1 h in a Varioskan spectrophotometer (Thermo Scientific).

2.12 Statistics analysis

The data were obtained from at least three independent experiments (n=3), except for secretion cytokine assay, miRNAs expression, and HDACs activity assays,

where data were obtained from two independent experiments (n=2). Data were analyzed in PRISM 8.0 software by performing a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) using the post hoc Tukey test. The results are reported as the mean $\pm$ the standard error (SE) with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Multiplicity of infection (MOI) determination

The multiplicity of infection (MOI) is a concept frequently used in infectious disease research and is defined as the ratio of infectious agents (e.g., phages, viruses, bacteria, protozoans) to infect a target (e.g., a cell) (Scheiner K. A., et al, 2022). Thus, the optimum MOI and the interaction time for evaluating any molecule's immunomodulatory properties should be determined. The results showed that the most suitable MOI was 10:1 (bacteria: cell) and 2 h of interaction because the CFUs recovered were higher (~ 4 CFUs/macrophage), and cell viability was $\sim 83\%$ (Figure 1 and S2). We selected the MOI of 10:1 and 2 h of interaction for evaluating the immunomodulatory effects of bPRL and E2 on bovine macrophages challenged with *S. aureus*.

3.2 Pro-inflammatory genes expression and nitric oxide production are differently regulated by prolactin and 17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*

To analyze if the hormones modulate the expression of elements of the IIR in bovine macrophages, we evaluate the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and antimicrobial peptide genes by RT-qPCR. Data showed that bPRL, but not E2, significantly induced the of *TNF α* and *IL-6* (3.8, and 6.5-fold, respectively) (Figure 2A, B). A similar effect was observed in cells infected with *S. aureus*; however, this effect was reverted by bPRL (Figure 2A, B). Notably, E2 attenuated the pro-inflammatory effect of bPRL in bovine macrophages because the expression of *TNF α* and *IL-6* was significantly reduced (2.2, and 3.1-fold, respectively) when both hormones were present (Figura 2A, B). Also, in macrophages treated with bPRL or hormonal mix and then challenged with *S. aureus*, these cytokines' expression levels were reduced dramatically (Figure 2A,

B). A contrary effect was observed for the *IL-1 β* expression, E2, but no bPRL significantly induced the expression of *IL-1 β* (5.1-fold) (Figure 2C); a similar effect was observed in cells treated with E2 and then challenged with the bacteria (4.6-fold). Also, changes in the level expression were not observed in bovine macrophages treated or not with bPRL or hormonal mix and then challenged with *S. aureus* (Figure 2C). Importantly, the secretion of cytokines coincides with the gene expression of these cytokines when the cytokine secretion was evaluated (Figure 2D-F). Additionally, bPRL and *S. aureus*, but no E2, induced nitrite production significantly (4.1 and 6.2 μ M, respectively) in bovine macrophages (Figure 3A). Also, E2 attenuated the effect of bPRL in macrophages treated with both hormones reducing the level of nitrite production (2.3 μ M), but not when it was previously treated with the hormones or hormonal mix and challenged with *S. aureus* (Figure 3A). Finally, we showed that bPRL and E2 significantly induced the expression of *IL-8* (3.0 and 3.7-fold, respectively) (Figure 3B). The hormonal combination strongly induced the *IL-8* expression (6.1-fold). Moreover, in macrophages treated or not with the hormones and then challenged with *S. aureus*, the level expression of *IL-8* was strongly induced (Figure 3B). A similar result for this cytokine was observed when the secretion was evaluated (Figure 3C).

3.3 Anti-inflammatory and antimicrobial genes are differently regulated by prolactin and 17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*

Recently it was reported the immunoprotective role of E2 in murine macrophages against *S. aureus* (Souza, C. L. S. E. et al, 2021). In this sense, we evaluated the anti-inflammatory and antimicrobial gene expression in macrophages challenged with *S. aureus*. We showed that E2 and *S. aureus*, but not bPRL, significantly induced the expression of *IL-10* (3.9 and 5.8-fold, respectively) (Figure 4A). Notably, when the cells were previously treated with E2 and then challenged with the bacteria, the expression level was dramatically reduced (0.6-fold) (Figure 4A). Further, when macrophages were treated with the hormonal mix, the expression level of *IL-10* was maintained at similar levels (4.4-fold) observed in cells only treated with E2, but in the presence of bacteria, the level expression of this

cytokine was dramatically reduced (0.8-fold) (Figure 4A). Similar data were observed when IL-10 secretion was evaluated (Figure 4B). Also, E2 and *S. aureus* significantly induced the expression of the antimicrobial peptide *BNBD10* (5.5 and 2.7-fold, respectively) (Figure 4C). Further, cells previously treated with E2 and then challenged with *S. aureus* showed a more accentuated expression of *BNBD10* (8.1-fold) (Figure 4C). Notably, the effects observed with E2 were downregulated by bPRL due to macrophages pre-treated with the hormonal mix, and then challenged or not with *S. aureus* showed a level expression of *BND10* reduced (2.6, and 3.7-fold respectively), which was similar to macrophages challenged with *S. aureus* (Figure 4C). Moreover, E2 significantly induced the *S100A7* expression in macrophages (2.3-fold) (Figure 4D). Besides, we observed a similar tendency for the *BNBD10* gene for all conditions evaluated; there were any significant changes (Figure 4D). Notably, the effects exerted by the hormones on elements of IIR expression in bovine macrophages were not TLR2-dependent (Figure S3). All findings suggest that E2 and bPRL regulate elements of the IIR of macrophages through a via independent of TLR2.

3.4 miRNAs expression in bovine macrophages is regulated by prolactin and 17 β -estradiol during the *S. aureus* challenge

miRNAs are small non-codificant RNAs involved in regulating several cellular functions; their role in regulating immune response is critical during bacterial infection (Das K., et al, 2016). In this study, we evaluated miRNAs involved in the regulation of the IIR by qPCR in bovine macrophages treated with bPRL and E2 and challenged with *S. aureus*. The results showed that miR-155 expression, a master regulator of the inflammatory response, was up-regulated for bPRL and *S. aureus* (7.2, and 5.8-fold, respectively) (Figure 5A). However, when bPRL was previously added to the cells and then challenged with the bacteria, there was a significant decrease in the expression level of miR-155 (3-fold) (Figure 5A). Moreover, E2 seems to be not significantly regulating miR-155 expression, but when was added together with and then challenged or not with *S. aureus*, a decreased expression of miR-155 (2.8, and 1.3-fold, respectively) was observed (Figure 5A). Besides, the results showed that E2 up-regulated the expression of

miR-451, miR-146a, and miR-21 (3.6, 4.4, and 7.2-fold, respectively) in bovine macrophages (Figure 5B, C, D). Notably, when the cells were only challenged with *S. aureus*, an up-regulation was observed for these miRNAs (2.3, 2.9, and 2.7-fold, respectively) (Figure 5B, C, D). bPRL seems to negatively regulate the effects of E2; when macrophages were pre-treated with the hormonal mix, the level of expression of miR-451, miR-146a, and miR-21a significantly decreased (2.9, 2.1, and 1.8-fold, respectively) (Figure 5B, C, D). A similar effect was observed for miR-451 in cells pre-treated with the hormonal mix and then challenged with bacteria (Figure 5B). Notably, contrary effects for miR-146a and miR-21a were observed under the same conditions. The hormonal mix favored the up-regulation of miR-146a and miR-21a after the challenge with the bacteria (4.9, and 4.8-fold, respectively) (Figure 5C, D). Moreover, we evaluated the miR-23a and miR-30b expression. The results showed that E2, but not bPRL, increased the expression of miR-23a (3.6-fold), but when challenged with *S. aureus* (post-hormonal treatment), the level of expression was dramatically increased (7.9-fold) (Figure 5E). The expression level of miR-23a was dramatically decreased when the macrophages were treated with the hormonal mix and challenged or not with *S. aureus* (Figure 5E). On the other hand, E2 and bPRL up-regulated the expression of miR-30b (2.3, and 3-fold, respectively), a similar effect was observed in cells previously treated with bPRL and then challenged with *S. aureus* (3-fold) (Figure 5F). Further, the hormonal mix in macrophages challenged or not with *S. aureus* dramatically reduced the level of expression of miR-30b (Figure 5F). Interestingly, E2, bPRL, and hormonal mix up-regulated the expression of Let-7a-5p (6.0, 9.1, and 4.3-fold, respectively), but the expression level of this miRNA was decreased when cells were challenged with *S. aureus* (Figure 5G). Finally, miR-7863 was up-regulated in macrophages challenged with *S. aureus* (2.1-fold) (Figure 5H). Interestingly, the hormones discouraged the expression of this miRNA in cells challenged or not with *S. aureus* (Figure 5H). All findings suggest that E2 and bPRL differentially regulate the miRNAs expression in bovine macrophages, and probably *S. aureus* takes advantage to manipulate the host immune response.

3.5 Global acetylation on the Histone H3 is regulated by bovine prolactin and

17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*

Previously our workgroup demonstrated an important role of bPRL and E2 in the regulation of elements IIR expression through epigenetics mechanisms in an *in vitro* model of subclinical bovine mastitis (Salgado-Lora M. G., et al, 2020; Barajas-Mendiola M.A., et al, 2022). In this sense, macrophages are an important niche of *S. aureus* too (Pidwill G. R., et al, 2021), and stress hormones such as E2 and bPRL importantly regulated the functions of these cells (Alhussien, M. N., & Dang, A. K., 2020; Renna M. S., et al, 2019), but if epigenetic mechanisms are related to the regulation of the IIR in bovine macrophages challenged with *S. aureus* remains not elucidated. The results showed that acetylation global of histone H3 was significantly up-regulated in bovine macrophages treated (12 h) with E2, bPRL, and hormonal mix (1.20, 1.26, and 1.38-fold, respectively) (Figure 6A). A similar result was observed in cells challenged with *S. aureus* (1.14-fold) (Figure 6A). Notably, in cells pre-treated with hormones (E2 or bPRL) separately or with hormonal mix and challenged with *S. aureus*, the level of acetylation global of histone H3 significantly increased concerning cells not challenged (1.26, 1.35, and 1.38-fold, respectively) (Figure 6A). However, in macrophages treated for 24 h with hormones, the level of acetylation global of histone H3 was not modified, even when the pre-treated cells were challenged with *S. aureus*, although a significant decrease was observed only in cells previously treated with the hormonal mix and then challenged with the bacteria (0.8-fold) (Figure 7A).

To determine if hormones regulate specific residues on H3, the H3K9ac and H3K9me2 marks were analyzed. The results showed that the treatment (12 h) of E2, bPRL, and hormonal mix significantly up-regulated the H3K9ac mark in macrophages (1.17, 1.51, and 1.27-fold, respectively) (Figure 6B). Similarly, in cells challenged with *S. aureus* an up-regulated expression of the H3K9ac mark (1.20-fold) was observed (Figure 6B). Interestingly, in macrophages treated (12 h) with bPRL or with the hormonal mix but not E2, and challenged with *S. aureus*, the H3K9ac was significantly decreased at basal levels (Figure 6B). Further, in macrophages treated for 24 h with hormones and challenged or not with the bacteria, there were no changes in the expression of the H3K9ac mark (Figure

7B). Notably, in cells pre-treated (24 h) with the hormonal mix and challenged with *S. aureus*, a significant decreased (0.59-fold) of the H3K9ac mark was observed (Figure 7B). Concerning to H3K9me2 mark, hormonal (separated or mixed) treatment (12 h) did not modify the expression of this epigenetic mark, but in cells challenged with *S. aureus*, an increase of the H3K9me2 mark was observed (1.18-fold) (Figure 6C). Notably, there were no changes in H3K9me2 at 24 h of evaluation (Figure 7C). These findings suggest that E2 and bPRL regulate the H3K9ac and H3K9me2 marks in bovine macrophages are probably involved in regulating IIR elements during the *S. aureus* challenge.

3.6 Activity HDACs are regulated in bovine macrophages treated with bovine prolactin and 17 β -estradiol and challenged with *S. aureus*

To explore if bPRL and E2 could be involved in the modulation of H3K9ac through regulating HDACs, the activity of HDACs (class I) was evaluated. The HDACs activity was assessed at 6 and 12 h, considering the effects of these hormones on the H3K9ac mark (Figure 6B). Results showed that the treatment (6 h) of E2, bPRL, and hormonal mix in bovine macrophages induced a moderate and significant activity of HDACs (1.17, 2.02, and 2.04-fold, respectively) (Figure 7A). A similar effect was observed in macrophages challenged with *S. aureus* (4.28-fold) (Figure 8A). Notably, in cells previously treated (12 h) with the hormones (bPRL, E2, and hormonal mix) and then challenged with *S. aureus*, the activity of HDACs was increased (2.86, 3.44, and 3.65-fold, respectively) (Figure 8A). Similar results were observed when macrophages were treated for 24 h with the hormones and challenged or not with *S. aureus* (Figure 8B).

4. Discussion

Subclinical mastitis is an inflammatory disease of the mammary gland in dairy cattle and is caused mainly by the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (Thompson-Crispi, K, et al, 2014; Ruegg, P. L., 2017; Günther, J. et al, 2017; Dego, O. K., 2020). Abrupt changes in the concentration of reproductive hormones such as PRL and E2 induce an imbalance of the innate immune response of the mammary gland (Lamote, I., et al, 2006; Lacasse, P., et al, 2019; Alhussien,

M. N., & Dang, A. K., 2020). Among the components of the innate immune response of the mammary gland, macrophages are key in eliminating invading pathogens (Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S., 2011). Further, the presence of macrophages in the mammary gland secretions is related to the health of this tissue (Alhussien, M., et al, 2015; Renna, M. S., et al, 2019). Alhussien et al (2015) reported that the amount and the phagocytic activity of macrophages are decreased in cows cursing with mastitis, showing a more dramatic effect in subclinical mastitis cases. (Alhussien, M., et al, 2015). Moreover, activating these cells require the timely regulation of gene expression through the interaction of the transcription factors and epigenetic modifications to regulate the different functions of macrophages (Amit, I., et al, 2016; Chen, S., et al, 2020). This highlights the relevance of epigenetics mechanisms as regulators of the activity of the macrophages during bacterial infection (Zhang, Q., & Cao, X., 2019). This work aimed to characterize the innate immune response induced by bPRL and E2 and identified the epigenetic mechanisms involved in this response in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Firstly, we determined the multiplicity of infection (MOI) in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Our results showed optimal MOI of 10:1 (bacteria: cell) and an interaction time of 2 h (Figure 1A). Further, the ratio CFU/macrophage was ~4 bacteria per cell (Figure 1B), and these conditions do not have consequences on the viability of cells (Figure 1C and S2). This agrees with Bettencourt et al (2017), who reported the same MOI in the macrophage's cellular lines J774 (mice), THP-1 (human), and human monocyte-derivate macrophages during the *Mycobacterium tuberculosis* infection. All these indicate that an MOI 10:1 and an interaction time of 2 h is appropriate to analyze the immune response induced by the hormones. In this sense, we explored the innate immune response induced by E2 and bPRL in bovine macrophages during the *S. aureus* challenge. We showed that bPRL and *S. aureus* induces the expression (Figure 2A, B) and secretion (Figure 2E, F) of the pro-inflammatory cytokines $\text{TNF}\alpha$ and IL-6; this is consistent with the reports that showed an up-regulation of the pro-inflammatory response in alveolar macrophages challenged with *S. aureus* (Brann, K. R., et al, 2019), and the up-

regulation of the pro-inflammatory cytokines induced by PRL (Sodhi, A., & Tripathi, A., 2008; Suarez, A. L. P., et al, 2015). Notably, E2 substantially decreased the expression (Figure 2A, B) and secretion (Figure 2E, F) of the $\text{TNF}\alpha$ and IL-6, and the same effect was reproduced in macrophages treated with the hormonal mix, even in the presence of *S. aureus* (Figure 2A, B, E, F). This, suggest that E2 down-regulated the pro-inflammatory response induced by bPRL. Similar results were observed in macrophages from ovariectomized mice challenged with *S. aureus*, where the pro-inflammatory response was inhibited when E2 was added (Souza, C. L. S. E., et al, 2021). Interestingly, we showed that E2 and the hormonal mix, but no bPRL, induce the expression and production of IL-1 β (Figure 1C, G). This agrees with Martínez-Neri, et al (2015), who observed in THP-1 macrophages that PRL does not induce the expression and secretion of this cytokine (Martínez-Neri, P. A., et al, 2015). Importantly, *S. aureus* does not induce the expression and secretion of IL- β (Figure 1C, G), a similar result was observed in alveolar macrophages infected with *S. aureus* (Brann, K. R., et al 2019). A possible explication for this effect could be that the Staphylococcal Panton-Valentine Leucocidin (PVL), an important trigger of the expression of IL-1 β (Younis, A., et al, 2005), was down-regulated with the treatment here used. Further research is necessary to abording this issue for the implications of inflammasome activation on bacterial clearance (Broz, P., 2019). Although IL-1 β is produced by macrophages infected with *S. aureus* pretreated with E2, the presence of the bPRL down-regulated this response, suggesting that E2 down-regulated the pro-inflammatory response induced by bPRL. Furthermore, nitric oxide (NO) is produced by iNOS in macrophages and is critical for bacterial elimination (Lee, M., et, al, 2019). Here, we reported that pro-inflammatory stimuli such as bPRL and *S. aureus* induce NO production in macrophages (Figure 3A). This is in agreement with the previous reports, which demonstrated that PRL-induced NO production in peritoneal macrophages (Tripathi, A., & Sodhi, A. 2007); and components of the cell wall of *S. aureus* increase the NO production in the murine line cell RAW264.7 (Kim, N. J., et al, 2015). Interestingly, the hormonal mix reduced the NO production in macrophages but favored this production when *S. aureus* was present (Figure 3A).

This is consistent with the ability of *S. aureus* to resist nitrosative stress through the activity of lactate dehydrogenase (LDH), which is induced by NO and correlates with the intracellular replication of the bacteria (Richardson, A. R., Libby, S. J., & Fang, F. C., 2008). Further, it has been described that NO inhibits the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , INF γ , and TNF α in leucocytes (Hagman, S., et al, 2019), an effect mediated by nitrosylation of the transcription factors JAK/STAT and NF- κ B (Sha, Y., & Marshall, H. E., 2012). This probably could explain how *S. aureus* takes advantage of the immune machinery of macrophages to down-regulate the pro-inflammatory response and how the hormones contribute to this effect. However, intensive research is necessary to respond to this issue. Besides, we showed that both hormones and *S. aureus* up-regulated the expression and secretion of IL-8 (Figure 3B, C). This is consistent with the fact that IL-8 is an important chemokine involved in the migration of leucocytes during bacterial infection (Meniailo, M. E., et al, 2018). Additionally, *S. aureus* induces the expression and secretion of IL-10 (Figure 4A, B). Similar results were observed in human and mice monocytes-derivate macrophages infected with *S. aureus* (Heim, C. E., et al, 2020). Interestingly, in the same study the up-regulation of IL-10 was associated with bacterial LDH activity (Heim, C. E., et al, 2020), which is associated with the nitrosative stress resistance of *S. aureus* (Richardson, A. R., Libby, S. J., & Fang, F. C., 2008), which correlates with the increase of the NO production in our work (Figure 3A). Future investigation is necessary to elucidate this issue. However, E2 and the hormonal mix reduced the expression of IL-10 in macrophages-challenged *S. aureus* (Figure 3A); which disagrees with the studies by Heim et al (2020). A possible explanation could be that E2 interferes with the activity of bacterial LDH, diminishing the expression of the IL-10; however, further research is necessary to answer this issue. Importantly, all effects of the bPRL and E2 on the regulation of the expression of the elements IIR are not dependent on the signaling of TLR2 (Figure S3), probably these effects are closely related to JAK/STAT and MAPKs signaling pathway (Medina- Estrada I., et al, 2018; Khan, M. Z., et al, 2020). Antimicrobial peptides, such as cathelicidins and β -defensins, are part of the arsenal of antimicrobial of the

leucocytes, and an increased gene expression of β -defensins in infected udder confirms their crucial role in defense of the mammary gland of cows during mastitis (Kościuczuk, E. M., et al, 2014). In this work, we showed that E2 induced the expression of BNBD10 in macrophages challenged or not with *S. aureus*; however, bPRL reduced the expression of this peptide (Figure 4C). Similarly, the up-regulation expression of this defensin was observed in bovine monocytes and neutrophils stimulated with vitamin D. In contrast, in the presence of LPS, the expression of BNBD10 was down-regulated (Merriman, K. E., et al, 2015). The expression of S100A7 in the alveolus is considered a critical component of the innate immune system and plays an important role in the host mammary gland defense system (Kumar, R., et al, 2020). In this work, S100A7 was only expressed in macrophages stimulated with E2, while *S. aureus* did not induce the expression of this peptide (Figure 4D). This indicates that S100A7 does not play an essential role in defense of the mammary gland during mastitis caused by *S. aureus*, and this agrees with the report that describes an up-regulated expression of S100A7 in mammary gland infected with *E. coli* (Regenhard, P., et al, 2009).

Epigenetics mechanisms are important regulators of the activity of the macrophages during bacterial infection (Zhang, Q., & Cao, X., 2019). miRNAs are small non-codificant RNAs (18-24 nt) involved in almost all known cellular processes, including the innate immune system through modulation of gene expression (Xiao, C., & Rajewsky, K., 2009; Bayraktar, R., et al, 2019). In this work, we showed that miR-155, miR-451, miR-146a, and miR-21a (Figure 5A-D) are up-regulated in macrophages challenged with *S. aureus*, this is consistent with the fact that these miRNAs are involved in the up-regulation of the pro-inflammatory genes such as IL-6, TNF α e IL-1 β , interacting with elements downstream of TLR signaling; moreover, overexpression of miR-155, miR-451, miR-146a, and miR-21a has been observed in intracellular bacterial infections (Das, K., Garnica, O., & Dhandayuthapani, S., 2016B; Bayraktar, R., et al, 2019). Interestingly, in our study the overexpression of miR-155, miR-451, miR-146a, and miR-21a coincided with the up-regulation or the expression (Figure 2A, B) and secretion (Figure D, E) of IL-6 and TNF α suggest that these miRNAs regulate the

expression of pro-inflammatory cytokines in bovine macrophages during the *S. aureus* challenge. Notably, the hormones induce the expression of miRNAs in macrophages differentially, while bPRL induces the expression of miR-155 (Figure 5A), E2 induces the expression of miR-451, 146a, and miR-21a (Figure 5B, C, D). However, the hormonal mix down-regulates this miRNA's expression, which is consistent with the anti-inflammatory effects of E2 (Medina-Estrada, I., et al, 2018). Interestingly, we report that in macrophages stimulated with the hormonal mix and challenged with *S. aureus*, miR-155 was down-regulated (Figure 5A), while miR-146a was up-regulated. Similar result was observed by Schulte et al, (2013) in murine macrophages infected with LPS; both miR-155 and miR-146a were co-expressed, and this induced the downregulation of the pro-inflammatory response of miR-155 (Schulte, L. N., et al 2013). This correlates with our results, where the pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF α , and IL-1 β were down-regulated (Figure 2A). In addition, it has been reported a differential role of miR-155 and miR-146a in the modulation of NO production during bacterial infection. In this sense, miR-155 down-regulate the NO production in macrophages infected with *Mycobacterium* (Qin, Y., et al, 2016), while miR-146 up-regulate the NO production in murine macrophages with BCG (Li, M., et al, 2016). The up-regulation of NO production in this work (Figure 3A) is consistent with the down and up-regulation expression of miR-155 and miR-146a, respectively (Figure 5A and C). Also, we reported that miR-451 is down-regulated in macrophages stimulated with the hormonal mix and challenged with *S. aureus*. A contrary effect was reported by Murata et al (2014); they reported that overexpression of miR-146a inhibits the chemotaxis via p38 MAPK in an in vitro and in vivo mice model of rheumatoid arthritis (Murata, K., et al 2014). But this suggests that the down-regulated miR-146a expression correlates with the expression and secretion of IL-8 (Figure 3B, C). This could be important for the expression of chemokines involved in the chemotaxis, considering that subclinical mastitis is a chronic inflammatory disease characterized by an increment in somatic cells count, particularly neutrophils (Alhussien, M., et al, 2015). Overexpression of miR-21a is involved in the inhibition of the pro-inflammatory response (Tao, L., et al, 2019), which this is not agree with our

results. The down-regulation of pro-inflammatory cytokines (Figure 2) does not coincide with the expression of miR-21a (Figure 5D). However, in monocytes infected with *Mycobacterium leprae*, miR-21a inhibits the expression of vitamin D-dependent antimicrobial peptides, suggesting that these bacteria evade the antimicrobial response (Liu, P. T., et al, 2012). This agrees with our findings; the down-regulation of miR-21a (Figure 5D) coincides with the down-regulation of the expression of the antimicrobial peptides BNBD10 and S100A7 (Figure 4C, D). Moreover, bPRL inhibits the effect of E2 and contributes to this effect (Figure 4C, D). This suggested that miR-21a down-regulated the E2-dependent antimicrobial peptide expression. Additionally, we showed that E2 induces the expression of miR-23a preferentially, while bPRL induces the expression of miR-30b in bovine macrophages, even during the *S. aureus* challenge (Figure E, F). We do not found reports of these miRNAs involved in the inflammatory response. However, it has been reported that miR-23a and miR-30b are involved in the phagolysosomal maturation during *Mycobacterium tuberculosis* and *Burkholderia pseudomalle* infection, respectively (Vegh, P., et al, 2015; Hu, Z. Q., et al, 2019). These reports highlights that the down-regulation of these miRNAs induces the inhibition of the phagolysosome maturation in macrophages, which is related to bacterial persistence (Vegh, P., et al, 2015; Hu, Z. Q., et al, 2019). Despite that the hormone separately up-regulated the expression of miR-23a and miR-30b, even in the presence of *S. aureus*; interestingly, the hormonal mix down-regulate the expression of these miRNAs, similarly to macrophages infected with *S. aureus* (Figure E, F). This suggests that hormonal mix contributes to the inhibition of phagolysosome maturation during bacterial infection in bovine macrophages. Further research is necessary to answer this issue. Moreover, Let-7a-5p is involved in down-regulating pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF α , and IL-1 β via TLR signaling (Zhou, X., et al, 2018). Although the hormones promote the up-regulation of Let-7a-5p, does not coincide with the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines reported here (Figure 2A-C). Possibly because the bPRL and E2 effects are not throughout TLR signaling (Figure S3). Notably, *S. aureus*, even in the presence of the hormones, down-regulated the expression of

Let-7a-5p. This agrees with the report by Magryś (2020) who demonstrated that Let-7a was down-regulated in THP-1 macrophages infected with a small colony variant (SCV) of *Staphylococcus epidermidis* balancing the pro-inflammatory response to anti-inflammatory response (Magryś, A., & Bogut, A., 2021). However, SCV of *S. aureus* was not confirmed in our study, hence future research to corroborate this must be done. Interestingly, the expression of miR-7863 was up-regulated only by *S. aureus* in bovine macrophages (Figure 5H), consistent with the report by Luoreng et al (2018), proposing this miRNA as a biomarker of both clinical and subclinical mastitis (Luoreng, Z. M. et al, 2018). Moreover, the hormones supreme the effects of the bacteria (Figure 5H), so it could be interesting to investigate the target of this miRNA and the molecular mechanism involved in the immune response during bacterial infection.

Finally, we attempt to correlate the effects of the hormones on elements of the IIR with the modifications on the histone H3 in bovine macrophages during the *S. aureus* challenge. We carry out the epigenetic analysis for different interaction times (6, 12, and 24 h) of stimulation of the hormones because the epigenetic effects on the chromatin can be achieved in short periods (Modak, R., et al, 2014). We showed that after 12 h of treatment, bPRL and E2 expression induce global acetylation of histone H3 in bovine macrophages (Figure 6A). Furthermore, this mark was maintained in the presence of *S. aureus* (Figure 6A). Notably, at 24 h of hormonal treatment, the global H3 acetylation decreased by ~30% in macrophages challenged with *S. aureus* (Figure 7A). Similar effects were observed in human macrophages derived from peripheral blood monocytes infected with *M. tuberculosis* (Chandran, A., et al, 2015), and in mouse macrophages infected with *Leishmania amazonensis* (Lecoeur, H., et al, 2020). Additionally, we analyzed post-translational modifications on histone H3K9, such as acetylation and dimethylation. Our results indicate that at 12 h of hormonal treatment, the H3K9ac mark (involved in the expression of genes) was induced, and maintained in the presence of *S. aureus* (Figure 6B). However, the H3K9ac mark decreased ~15% in macrophages pretreated with the hormonal mix and challenged with *S. aureus* (Figure 6B). Notably, at 24 h of hormonal treatment the H3K9ac mark decreased

by ~50% (Figure 7B) in the same conditions. A similar effect was reported in CEMB treated with bPRL and E2 and challenged with *S. aureus* (Salgado-Lora, M. G., et al, 2020). This indicates that the changes observed depend on the time of the interaction between cells and hormones. Importantly, these results coincide with the increase in the activity of HDACs, enzymes involved with removing acetyl groups from histones, in macrophages treated (6 h) with the hormonal mix and challenged with *S. aureus* (Figure 8A). Moreover, this effect was maintained at 12 h of the hormonal treatment in the same conditions (Figure 8B). Concerning the H3K9me2 mark (involved in the repression of genes), only macrophages challenged with *S. aureus* showed an increment (Figure 6C), while no change was observed with hormonal treatment in the different testing times (Figure 6C and 7C). Probably, this could be associated with the moderate pro-inflammatory response induced by the hormones via attenuating the activity of G9, a histone methyl transferase that catalyzes the methylation of histone 3 lysine 9 (H3K9a), which was reported to play an important role in alveolar macrophages infected with *Streptococcus pneumonia* (Li, y., et al, 2022). However, if this is occurring in our study model requires further research. This indicates that the epigenetic H3K9ac and H3K9e2 marks participate importantly in the regulation of the RII elements; however, this should be corroborated by evaluating the enrichment of this mark in the promoter region of these genes by chromatin immunoprecipitation assay. Importantly, the epigenetic mechanisms, in addition to regulating the IIR gene expression in macrophages during bacterial infections (Chen *et al*, 2020), they are also involved in the essential functions of these cells such as phagocytosis (Mombelli et al, 2011; Gierlikowski & Gierlokowska, 2022). For example, the miR-155 overexpression induced by *Pseudomonas aeruginosa*, suppress phagocytosis in bone marrow-human-derived macrophages, and murine macrophages RAW264.7 (Yang *et al*, 2014). Moreover, Mombelli *et al* (2011) reported that HDACs inhibitors (HDACi) reduced the phagocytic capacity of murine macrophages during *E. coli* and *S. aureus* infection, through downregulation of the phagocytic receptor Msr1, suggesting that the effect is due to a hyperacetylation of histone H3 (Mombelli *et al*, 2011). Future research is necessary to correlate the

epigenetic mechanism induced by PRL and E2 in bovine macrophages during *S. aureus* challenge and the phagocytic capacity, because during intramammary infections such as subclinical mastitis caused by *S. aureus*, the phagocytic capacity of the bovine macrophages is reduced (Alhusien *et al*, 2015).

All these findings indicate that the neuroendocrine system critically regulates the activity and response of macrophages through the cross-talk between neurotransmitters, cytokines, and hormones involving epigenetic mechanisms, and could explain how *S. aureus* survive in macrophages and how the hormones contribute to this. Moreover, this work describes, for the first time, that bPRL and E2 could be modulators in bovine macrophages during the *S. aureus* challenge.

5. Conclusion

These results indicate that bPRL and E2 modulate the innate immune response in bovine macrophages challenged with *S. aureus*, decreasing the pro-inflammatory response. All these effects could be related to regulating the modifications of H3 histone, such as H3K9ac and H3K9me2, and by regulating miRNA expression. To our knowledge, this is the first report that describes the effect of the bPRL and E2 on IIR and epigenetic regulation in bovine macrophages during *S. aureus* infection.

6. References

- Aitken, S. L., Corl, C. M., & Sordillo, L. M. (2011). Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16, 291-304. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9230-4>
- Alhussien, M. N., & Dang, A. K. (2020). Interaction between stress hormones and phagocytic cells and its effect on the health status of dairy cows: A review. *Veterinary world*, 13(9), 1837. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1837-1848>
- Alhussien, M., Kaur, M., Manjari, P., Kimothi, S. P., Mohanty, A. K., & Dang, A. K. (2015). A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical, and clinical mastitis Karan Fries cows. *Veterinary world*, 8(5), 685. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.685-689>
- Barajas-Mendiola, M. A., Salgado-Lora, M. G., López-Meza, J. E., & Ochoa-

- Zarzosa, A. (2022). Prolactin regulates H3K9ac and H3K9me2 epigenetic marks and miRNAs expression in bovine mammary epithelial cells challenged with *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 990478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.990478>
- Do, D. N., Dudemaine, P. L., Mathur, M., Suravajhala, P., Zhao, X., & Ibeagha-Awemu, E. M. (2021). MiRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3080. <https://doi.org/10.3390/ijms22063080>
- Enger, B. D., Crutchfield, C. E., Yohe, T. T., Enger, K. M., Nickerson, S. C., Parsons, C. L., & Akers, R. M. (2018). *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in non-lactating mammary glands stimulated to rapidly grow and develop with estradiol and progesterone. *Veterinary research*, 49(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0542-x>
- Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schubert, H. J., ... & Seyfert, H. M. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific Reports*, 7(1), 4811. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05107-4>
- Gussmann, M., Denwood, M., Kirkeby, C., Farre, M., & Halasa, T. (2019). Associations between udder health and culling in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 171, 104751. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104751>
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin modulates the expression of inflammatory response genes and stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 121(1-2), 113-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.007>
- He, Y., Song, M., Zhang, Y., Li, X., Song, J., Zhang, Y., & Yu, Y. (2016). Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*, 17, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2947-0>
- Holliday, H., Baker, L. A., Junankar, S. R., Clark, S. J., & Swarbrick, A. (2018).

Epigenomics of mammary gland development. *Breast cancer research*, 20, 1-11.

<https://doi.org/10.1186/s13058-018-1031-x>

Hommes, J. W., & Surewaard, B. G. (2022). Intracellular habitation of *Staphylococcus aureus*: Molecular mechanisms and prospects for antimicrobial therapy. *Biomedicines*, 10(8), 1804. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081804>

Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, 75(1), 113-120.

<https://doi.org/10.1017/S0022029907002932>

Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D., & Bissell, M. J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment.

Development, 142(6), 1028-1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>

Ivanova, E., Le Guillou, S., Hue-Beauvais, C., & Le Provost, F. (2021).

Epigenetics: new insights into mammary gland biology. *Genes*, 12(2), 231.

<https://doi.org/10.3390/genes12020231>

Lacasse, P., Zhao, X., & Ollier, S. (2019). Effect of stage of lactation and gestation on milking-induced hormone release in lactating dairy cows. *Domestic animal endocrinology*, 66, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.10.003>

Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2006).

Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. *Veterinary research*, 37(1), 61-74. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005038>

Lara-Zárate, L., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 51(5), 313-318.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.07.010>

Lewandowska-Sabat, A. M., Hansen, S. F., Solberg, T. R., Østerås, O.,

Heringstad, B., Boysen, P., & Olsaker, I. (2018). MicroRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected in vitro with two strains of *Streptococcus agalactiae*. *BMC genomics*, 19, 1-15.

<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4591-3>

Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A.

(2015). Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis*, 89, 43-53.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.018>

Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6120509>

Miretti, S., Lecchi, C., Ceciliani, F., & Baratta, M. (2020). MicroRNAs as biomarkers for animal health and welfare in livestock. *Frontiers in veterinary science*, 7, 578193. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.578193>

Newman, K. A., Rajala-Schultz, P. J., DeGraves, F. J., & Lakritz, J. (2010). Association of milk yield and infection status at dry-off with intramammary infections at subsequent calving. *Journal of dairy research*, 77(1), 99-106. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990380>

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patino, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of infection*, 54(4), 399-409.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>

Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. *Frontiers in immunology*, 11, 3506. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.620339>

Rainard, P., Gilbert, F. B., & Germon, P. (2022). Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. *Frontiers in Immunology*, 13, 1031785. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031785>

Renna, M. S., Silvestrini, P., Beccaria, C., Velázquez, N. S., Baravalle, C., Engler, C., ... & Dallard, B. E. (2019). Effects of chronic *Staphylococcus aureus* infection on immunological parameters and functionality of macrophages isolated from bovine mammary secretions. *Microbial pathogenesis*, 137, 103743.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103743>

- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of dairy science*, 100(12), 10381-10397.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Salgado-Lora, M. G., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2020). Prolactin and estradiol are epigenetic modulators in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* infection. *Pathogens*, 9(7), 520. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070520>
- Singh, K., Erdman, R. A., Swanson, K. M., Molenaar, A. J., Maqbool, N. J., Wheeler, T. T., ... & Stelwagen, K. (2010). Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15, 101-112.
<https://doi.org/10.1007/s10911-010-9164-2>
- Song, M., He, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Li, X., & Yu, Y. (2016). Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Scientific reports*, 6(1), 29390. <https://doi.org/10.1038/srep29390>
- Sordillo, L. M. (2018). Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(3), 507-523.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.005>
- Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F., & Mallard, B. A. (2014). Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Frontiers in Immunology*, 5, 493.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00493>
- Bettencourt, P., Carmo, N., Pires, D., Timóteo, P., & Anes, E. (2017). Mycobacterial infection of macrophages: the effect of the multiplicity of infection. *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs; Méndez-Vilas, A., Ed*, 651-664.
- Brann, K. R., Fullerton, M. S., Onyilagha, F. I., Prince, A. A., Kurten, R. C., Rom, J. S., ... & Voth, D. E. (2019). Infection of primary human alveolar macrophages alters *Staphylococcus aureus* toxin production and activity. *Infection and Immunity*, 87(7), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/iai.00167-19>
- Sodhi, A., & Tripathi, A. (2008). Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages in vitro:

involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF- κ B. *Cytokine*, 41(2), 162-173.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.007>

Suarez, A. L. P., López-Rincón, G., Martínez Neri, P. A., & Estrada-Chávez, C. (2015). Prolactin in inflammatory response. *Recent Advances in Prolactin Research*, 243-264. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_11

Souza, C. L. S. E., Barbosa, C. D., Coelho, H. I., Santos Júnior, M. N., Barbosa, E. N., Queiroz, É. C., ... & Marques, L. M. (2021). Effects of 17 β -estradiol on Monocyte/Macrophage response to *Staphylococcus aureus*: An in vitro study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 701391.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.701391>

Martínez-Neri, P. A., López-Rincón, G., Mancilla-Jiménez, R., del Toro-Arreola, S., Muñoz-Valle, J. F., Fafutis-Morris, M., ... & Pereira-Suárez, A. L. (2015). Prolactin modulates cytokine production induced by culture filtrate proteins of *M. bovis* through different signaling mechanisms in THP1 cells. *Cytokine*, 71(1), 38-44.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.08.006>

Younis, A., Krifucks, O., Fleminger, G., Heller, E. D., Gollop, N., Saran, A., & Leitner, G. (2005). *Staphylococcus aureus* leucocidin, a virulence factor in bovine mastitis. *Journal of dairy research*, 72(2), 188-194.

<https://doi.org/10.1017/S002202990500083X>

Broz, P. (2019). Recognition of intracellular bacteria by inflammasomes. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0003-2019>

Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., & Choy, J. (2017). Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Macrophages: Origin, Functions and Biointervention*, 181-207. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_8

Tripathi, A., & Sodhi, A. (2007). Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: Involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase signal transduction pathways. *Molecular immunology*, 44(12), 3185-3194.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.01.024>

Kim, N. J., Ahn, K. B., Jeon, J. H., Yun, C. H., Finlay, B. B., & Han, S. H. (2015).

Lipoprotein in the cell wall of *Staphylococcus aureus* is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages. *Molecular immunology*, 65(1), 17-24.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.016>

Richardson, A. R., Libby, S. J., & Fang, F. C. (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science*, 319(5870), 1672-1676. <https://doi.org/10.1126/science.1155207>

Hagman, S., Mäkinen, A., Ylä-Outinen, L., Huhtala, H., Elovaara, I., & Narkilahti, S. (2019). Effects of inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-6 on the viability and functionality of human pluripotent stem cell-derived neural cells. *Journal of neuroimmunology*, 331, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.07.010>

Sha, Y., & Marshall, H. E. (2012). S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(6), 701- 711. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.008>

Meniailo, M. E., Malashchenko, V. V., Shmarov, V. A., Gazatova, N. D., Melashchenko, O. B., Goncharov, A. G., ... & Seledtsov, V. I. (2018). Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *International immunopharmacology*, 56, 217-221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.036>

Heim, C. E., Bosch, M. E., Yamada, K. J., Aldrich, A. L., Chaudhari, S. S., Klinkebiel, D., ... & Kielian, T. (2020). Lactate production by *Staphylococcus aureus* biofilm inhibits HDAC11 to reprogramme the host immune response during persistent infection. *Nature microbiology*, 5(10), 1271-1284. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0756-3>

Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2018). Immunomodulatory effects of 17 β -estradiol on epithelial cells during bacterial infections. *Journal of Immunology Research*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/6098961>

Khan, M. Z., Khan, A., Xiao, J., Ma, Y., Ma, J., Gao, J., & Cao, Z. (2020). Role of the JAK-STAT pathway in bovine mastitis and milk production. *Animals*, 10(11), 2107. <https://doi.org/10.3390/ani10112107>

Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., & Bagnicka, E. (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, 1-14.

<https://doi.org/10.1186/s12917-014-0246-z>

Merriman, K. E., Kweh, M. F., Powell, J. L., Lippolis, J. D., & Nelson, C. D. (2015). Multiple β -defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 154, 120-129.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.08.002>

Kumar, R., Ali, S. A., Singh, S. K., Bhushan, V., Mathur, M., Jamwal, S., ... & Kumar, S. (2020). Antimicrobial peptides in farm animals: an updated review on its diversity, function, modes of action and therapeutic prospects. *Veterinary Sciences*, 7(4), 206.

<https://doi.org/10.3390/vetsci7040206>

Regenhard, P., Leippe, M., Schubert, S., Podschun, R., Kalm, E., Grötzinger, J., & Looft, C. (2009). Antimicrobial activity of bovine psoriasin. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.001>

Han, S., Li, X., Liu, J., Zou, Z., Luo, L., Wu, R., ... & Shen, B. (2020). Bta-miR-223 targeting CBLB contributes to resistance to Staphylococcus aureus mastitis through the PI3K/AKT/NF- κ B pathway. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 529.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00529>

Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunological reviews*, 240(1), 11-24.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00989.x>

Amit, I., Winter, D. R., & Jung, S. (2016). The role of the local environment and epigenetics in shaping macrophage identity and their effect on tissue homeostasis. *Nature immunology*, 17(1), 18-25. <https://doi.org/10.1038/ni.3325>

Chen, S., Yang, J., Wei, Y., & Wei, X. (2020). Epigenetic regulation of macrophages: From homeostasis maintenance to host, defense. *Cellular & molecular immunology*, 17(1), 36-49. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0315-0>

Zhang, Q., & Cao, X. (2019). Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. *Nature Reviews Immunology*, 19(7), 417-432.

<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0151-6>

Bayraktar, R., Bertilaccio, M. T. S., & Calin, G. A. (2019). The interaction between

- two worlds: microRNAs and Toll-like receptors. *Frontiers in immunology*, 10, 1053.
- Xiao, C., & Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 136(1), 26-36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01053>
- Das, K., Garnica, O., & Dhandayuthapani, S. (2016). Modulation of host miRNAs by intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 79. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00079>
- Li, M., Wang, J., Fang, Y., Gong, S., Li, M., Wu, M., ... & Huang, X. (2016). microRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. *Scientific reports*, 6(1), 23351. <https://doi.org/10.1038/srep23351>
- Qin, Y., Wang, Q., Zhou, Y., Duan, Y., & Gao, Q. (2016). Inhibition of IFN- γ -induced nitric oxide dependent antimycobacterial activity by miR-155 and C/EBP β . *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 535. <https://doi.org/10.3390/ijms17040535>
- Tao, L., Xu, X., Fang, Y., Wang, A., Zhou, F., Shen, Y., & Li, J. (2019). miR-21 targets jnk and ccr7 to modulate the inflammatory response of grass carp following bacterial infection. *Fish & shellfish immunology*, 94, 258-263. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.022>
- Hu, Z. Q., Rao, C. L., Tang, M. L., Zhang, Y., Lu, X. X., Chen, J. G., ... & Mao, X. H. (2019). Rab32 GTPase, as a direct target of miR-30b/c, controls the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* by regulating phagosome maturation. *PLoS pathogens*, 15(6), e1007879. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007879>
- Vegh, P., Magee, D. A., Nalpas, N. C., Bryan, K., McCabe, M. S., Browne, J. A., ... & Lynn, D. J. (2015). MicroRNA profiling of the bovine alveolar macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection suggests pathogen survival is enhanced by microRNA regulation of endocytosis and lysosome trafficking. *Tuberculosis*, 95(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.10.011>
- Magryś, A., & Bogut, A. (2021). MicroRNA hsa-let-7a facilitates staphylococcal small colony variants survival in the THP-1 macrophages by reshaping inflammatory responses. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(8), 151542. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151542>

- Luoreng, Z. M., Wang, X. P., Mei, C. G., & Zan, L. S. (2018). Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*, 14(1), 87. <https://doi.org/10.7150/ijbs.22498>
- Li, Y., Li, G., Zhang, L., Li, Y., & Zhao, Z. (2022). G9a promotes inflammation in *Streptococcus pneumoniae* induced pneumonia mice by stimulating M1 macrophage polarization and H3K9me2 methylation in FOXP1 promoter region. *Annals of Translational Medicine*, 10(10). <https://doi.org/10.21037/atm-22-1884>.
- Chandran, A., Antony, C., Jose, L., Mundayoor, S., Natarajan, K., & Kumar, R. A. (2015). Mycobacterium tuberculosis infection induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00090>
- Lecoeur, H., Prina, E., Rosazza, T., Kokou, K., N'Diaye, P., Aulner, N., ... & Späth, G. F. (2020). Targeting macrophage histone H3 modification as a leishmania strategy to dampen the NF-κB/NLRP3-mediated inflammatory response. *Cell Reports*, 30(6), 1870-1882. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.030>
- Mombelli, M., Lugin, J., Rubino, I., Chanson, A. L., Giddey, M., Calandra, T., & Roger, T. (2011). Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 204(9), 1367-1374.
- Gierlikowski, W., & Gierlikowska, B. (2022). MicroRNAs as Regulators of Phagocytosis. *Cells*, 11(9), 1380. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir553>
- Yang, K., Wu, M., Li, M., Li, D., Peng, A., Nie, X., ... & Huang, X. (2014). miR-155 Suppresses Bacterial Clearance in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Keratitis by Targeting Rheb. *The Journal of infectious diseases*, 210(1), 89-98. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu002>

Figure captions

Figure 1. Multiplicity of infection (MOI) determination in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) cultured in 24-well plates were challenged with *S. aureus* at different MOI (1:1, and 10:1) and different interaction times (0.5, 1, and 2 h). Gentamicin protection assay was

performed and then CFUs recovered **A**), CFUs/macrophage ratio **B**), and viability of infected macrophages **C**) were determined. Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). Different letters indicate significant changes (Two- way ANOVA and post hoc Tukey, $p<0.5$).

Figure 2. Prolactin and 17 β -estradiol regulates the expression of the pro-inflammatory cytokines in bovine macrophages challenged with *S. aureus*.

Bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) cultured in a 6-well plate were incubated (24 h) or not with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) and then challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI 10:1). mRNA expression of *TNF- α* **A**), *IL-6* **B**), and *IL-1 β* **C**) was analyzed by RT-qPCR. The GAPDH gene was used as an internal control of expression for all conditions. Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM: incomplete medium). Bars represent the media standard $\pm$ error (SE) from three independent experiments (n=3). To analyze the cytokine secretion of *TNF- α* **D**), *IL-6* **E**), and *IL-1 β* **E**), supernatants were collected and analyzed by flow cytometry. Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p<0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 3. Prolactin and 17 β -estradiol regulates de nitric oxide production and the chemokine IL-8 expression in bovine macrophages challenged with *S.*

aureus. Bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) cultured in a 24-well plate were incubated (24 h) or not with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) and then challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI 10:1). **A**) Nitric oxide was analyzed by Griess assay. Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). **B**) mRNA expression of *IL-8* was analyzed by RT-qPCR. The GAPDH gene was used as an internal control of expression for all conditions. Data were normalized concerning untreated cell's

condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). **C)** The cytokine secretion of IL-8 was analyzed by flow cytometry. Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p < 0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β - estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 4. Prolactin and 17 β -estradiol regulates changes in the anti-inflammatory cytokines and antimicrobial peptide expression in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Bovine macrophages ($\sim 2.5 \times 10^5$ cells) cultured in a 6-well plate were incubated (24 h) or not with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) and then challenged or not with *S. aureus* (MOI 10:1). mRNA expression of *IL-8* **A)**, *BNBD10* **C)**, and *S100A7* **D)** was analyzed by RT-qPCR. The GAPDH gene was used as an internal control of expression for all conditions. Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM: incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). To analyze the cytokine secretion IL-8 **B)**, supernatants were collected and analyzed by flow cytometry. Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p < 0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 5. miRNAs expression is regulated by prolactin and 17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Bovine macrophages ($\sim 5 \times 10^5$ cells) cultured in a 6-well plate were incubated (24 h) or not with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) and then challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Expression of miR-155 **A)**, miR-451 **B)**, miR-146a **C)**, miR-21a **D)**, miR-23a **E)**, miR-30b **F)**, Let-7a-5p **G)**, and miR-7863 **H)** was analyzed by

RT-qPCR. U6 miRNA was used as an internal control of expression. Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Different letters indicate significant changes (two-way ANOVA, post hoc Tukey $p < 0.05$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 6. Regulation of the histone H3 marks by prolactin and 17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*.

Bovine macrophages ($\sim 1 \times 10^6$ cells) cultured in 6-well plates were incubated (12 h) with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL), and challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Densitometrical analysis of the immunoblots shows the relative expression of global acetylation of histone H3 **A**), H3K9ac **B**), and H3K9me2 **C**). Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p < 0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 7. Regulation of the histone H3 marks by prolactin and 17 β -estradiol in bovine macrophages challenged with *S. aureus*.

Bovine macrophages ($\sim 1 \times 10^6$ cells) cultured in 6-well plates were incubated (24 h) with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL), and challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI 10:1). Densitometrical analysis of the immunoblots shows the relative expression of global acetylation of histone H3 **A**), H3K9ac **B**), and H3K9me2 **C**). Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p < 0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol;

PRL+ E2= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure 8. The activity of HDACS in bovine macrophages treated with prolactin and 17 β -estradiol during *S. aureus* challenge. Bovine macrophages ($\sim 1 \times 10^6$ cells) cultured in 6-well plates were treated 6 h **A**) and 12 h **B**) with prolactin (bPRL, 5 ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL) and challenged (2 h) with *S. aureus* (MOI 10:1). Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM= incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p > 0.5$). A HeLa nuclear extract and Trichostatin A were used as positive and negative (respectively) control of HDACs activity **C**). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Supplementary figure captions

Figure S1. Bovine monocyte-derived macrophages primary culture establishment. **A)** Representative photomicrographs of bovine monocytes (day 0), **B-D)** monocyte-macrophage transition, and **E)** differentiated bovine monocyte-derived macrophages (day 28) are shown. RPMI-1649 medium plus sodium pyruvate 1 mM and 20% fetal bovine serum were employed for macrophage differentiation. Photomicrographs were taken using the magnification 20X. Scale bar= 20 μ m.

Figure S2. Viability of macrophages challenged with *S. aureus*. Bovine macrophages were cultured in a 24-well plate and then challenged (0.5, 1, and 2 h) with *S. aureus* (MOI 10:1). Cells were recovered by detaching with PBS-TE solution, and viability was analyzed by trypan blue exclusion assay. Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Significance was analyzed by One-way ANOVA and post hoc Tukey ($p < 0.5$).

Figure S3. Prolactin and 17 β -estradiol does not induce changes in the TLR2 expression in bovine macrophages challenged with *S. aureus*. Bovine macrophages cultured in a 6-well plate were incubated (24 h) or not with prolactin

(bPRL, 5ng/mL) and/or 17 β -estradiol (E2, 50 pg/mL), and the challenged (2 h) or not with *S. aureus* (MOI). mRNA expression of *TLR2* was analyzed by RT-qPCR. The GAPDH gene was used as an internal control of expression for all conditions. Data were normalized concerning untreated cell's condition (IM: incomplete medium). Bars represent the media $\pm$ standard error (SE) from three independent experiments (n=3). Different letters indicate significant changes (Two-way ANOVA, post hoc Tukey, $p < 0.5$). **IM**= incomplete medium (untreated cells); **PRL**= macrophages treated with bPRL; **E2**= macrophages treated with 17 β -estradiol; **PRL + E2**= macrophages treated with the hormonal mix.

Figure S4. Western blot controls of epigenetic modifications in bovine macrophages. Global acetylation of histone H3 **A**), H3K9ac **B**), and H3K9me2 **C**) from untreated bovine macrophages = **Control**; and treated with 3.5 mM sodium butyrate (used as a positive control for acetylation and negative control for methylation) = **ButNa**. To rule out the effect of the 17 β -estradiol vehicle, bovine macrophages were treated with 1% ethanol= **control (1% EtOH)** and then challenged with *S. aureus* (MOI 10:1) = ***S. aureus* (1% EtOH)**. Bars represent media $\pm$ standard error (SE) from two independent experiments (n=2). Values were normalized concerning control. “*”($p < 0.5$) and “***”($p < 0.01$) indicate significant changes concerning control (Student's t-test).

Tables

Table 1. Primers for analysis of the innate immune response gene expression used in this study.

Gene (Bovine)*	Primer	Sequence 5'→3'	Fragment (bp)	Tm (°C)	Reference
TLR2	Forward		146	58.5	Medina- Estrada I., et al, 2016
	Reverse	CGACTGGCCCGATGACTACC TGAGCAGGAGCAACAGGAAGAG			
TNF- α	Forward	CCCCTGGAGATAACCTCCCA	101	56	
	Reverse	CAGACGGGAGACAGGAGAGC			
IL-6	Forward	AACCACTCCAGCCACAAACACT	179	57	
	Reverse	GAATGCCCAAGGAAGTACCACAA			
IL-1 β	Forward	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTA	198	52	
	Reverse	G CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA			
IL-8	Forward	TTCCACACCTTTCCACCCCAA	149	53.5	
	Reverse	GCACAACCTTCTGCACCCACTT			
IL-10	Forward	GATGCGAGCACCTGTCTGA	129	59	
	Reverse	GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT			
BNBD10	Forward	GCTCCATCACCTGCTCCTC	152	54	
	Reverse	AGGTGCCAATCTGTCTCATGA			
S100A7 (psoriasin)	Forward	GCAGCTCTCAGCTTGAGCAG	221	54	
	Reverse	CCAGCAAGGACAGGAACTCAG			
GAPDH	Forward	TCAACGGGAAGCTCACTGG	237	56.9	
	Reverse	CCCAGCATCGAAGGTAGA			

*TLR2: Toll-like Receptor 2; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha; IL-6: Interleukine 6; IL-1 β : Interleukine-1 beta; IL-8: Interleukine-8; IL-10: Interleukine-10; BNBD10; Bovine Neutrophil Beta defensin 10; S100A7: S100 Calcium-binding Protein A7, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Table 2. Primers for analysis of bovine miRNAs expression used in this study.

Bovine miRNA	Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Reference
Let-7a -5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	54	Barajas-Mendiola M. A., Et al, 2002
Stem-Loop	CCAGAGCCAACAACACTAT		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GGGTGAGGTAGTAGGTTGT		
miR-21a	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	56	
Stem-Loop	CCAGAGCCAACAGTCAA		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTTGTAGCTTATCAGACTGATG		
miR-30b	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	60	
Stem-Loop	CCAGAGCCAACAGCTGA		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTTTGGTGTAACATCCTACAC		
miR155	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	56	
Stem-Loop	CCAGAGCCAACACCCCT		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTGGGTAAATGCTAATCGTGAT		
miR-23a	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	58	
Stem-Loop	CCAGAGCCAAC TGGAAA		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTGATCACATTGCCAGGGA		
miR-7863	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	50	
Stem-Loop	CCAGAGCCAACGCTCCT		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTTGATGGACTGTCACCTG		
miR-146a	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	52	
Stem-Loop	CCAGAGCCAACACAACC		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTGGTGAGAACTGAATTCCATA		

miR-144	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCA	58	
Stem-Loop	CCAGAGCCAAC CTAGTA		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTTGGGTACAGTATAGATGATG		
miR-451	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCA	52	
Stem-Loop	CCAGAGCCAAC AAATC		
Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT		
Forward	GTTGGAAACCGTTACCATTACT		
Reverse	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	50 to	Han, S., et,
Forward	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	60	al, 2020

Figures

Figure 1

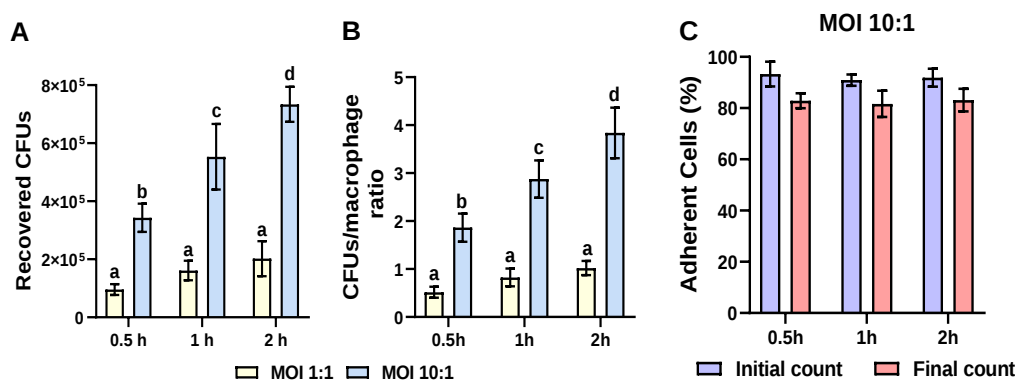


Figure 2

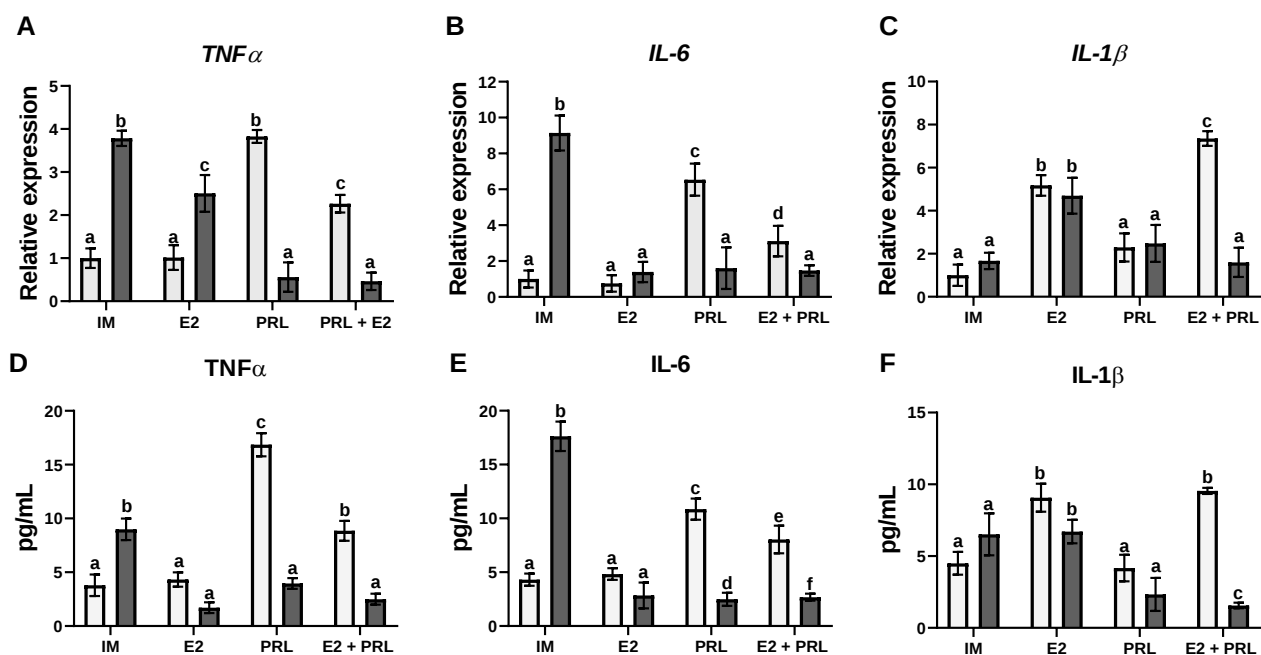


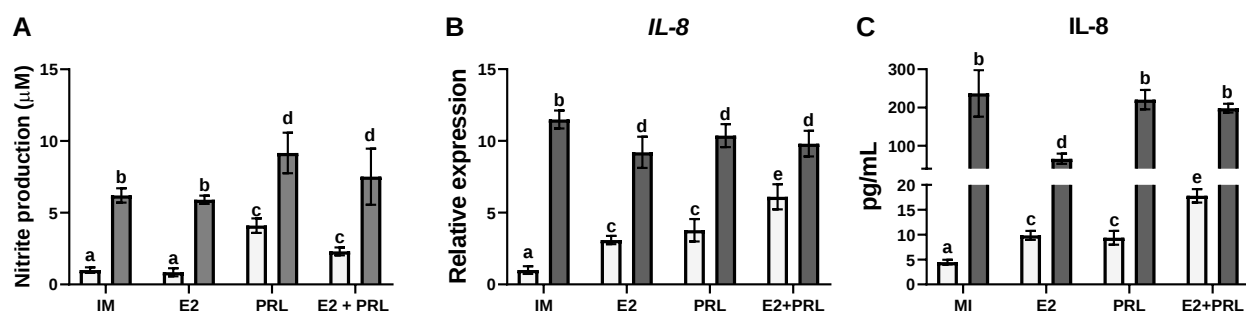
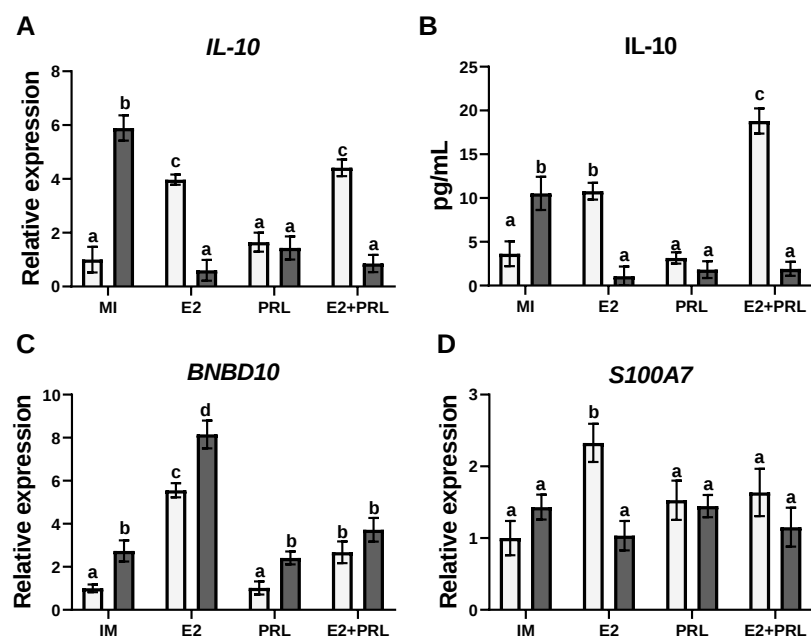
Figure 3**Figure 4**

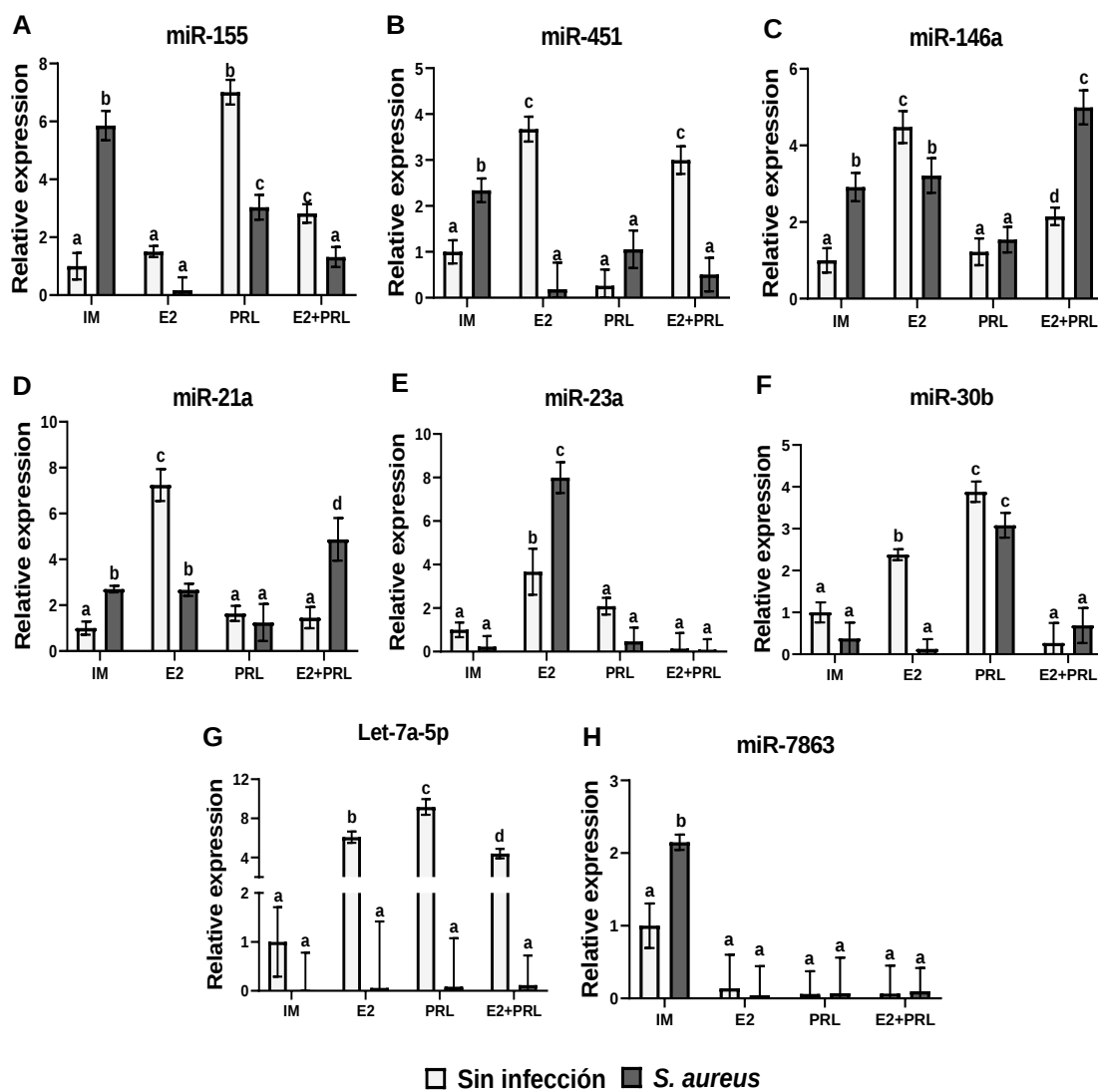
Figure 5

Figure 6

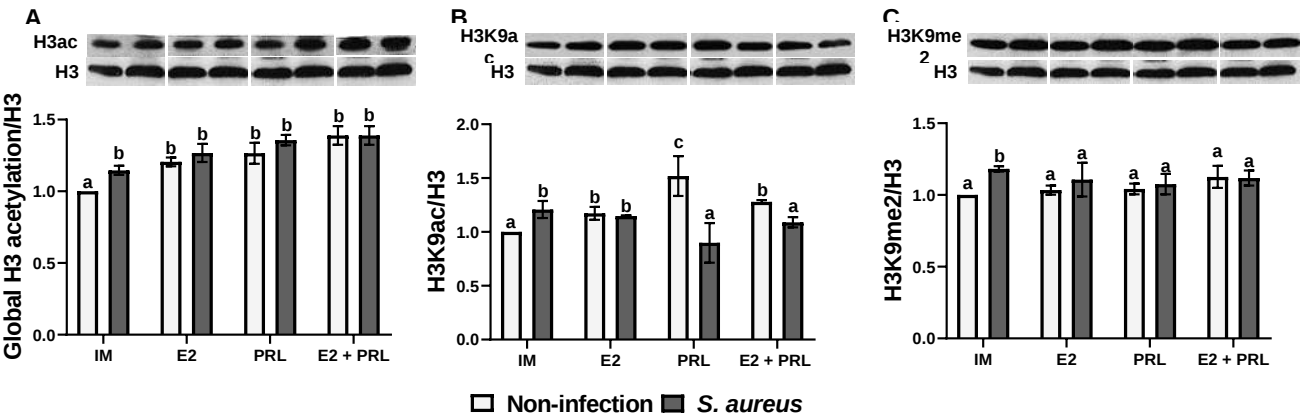


Figure 7

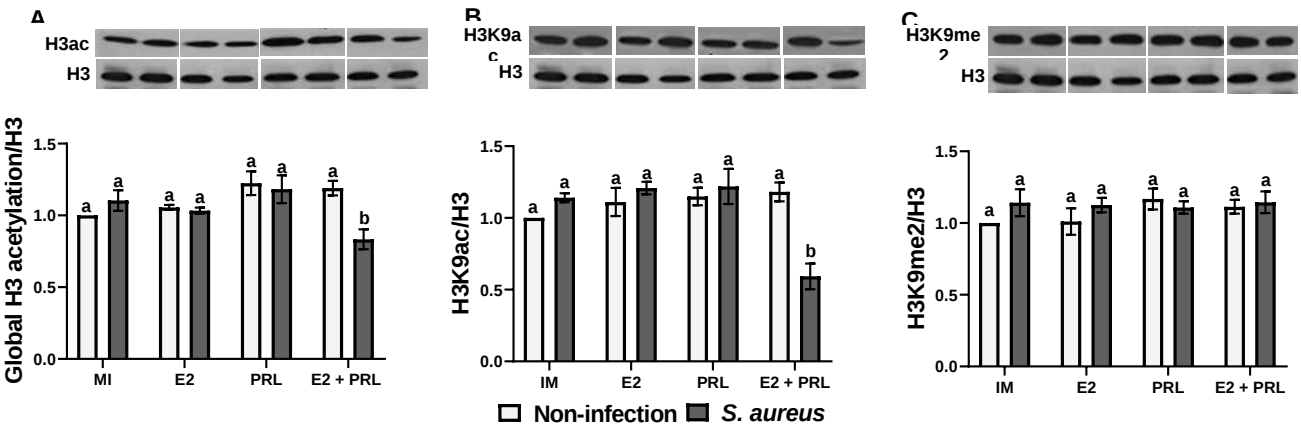
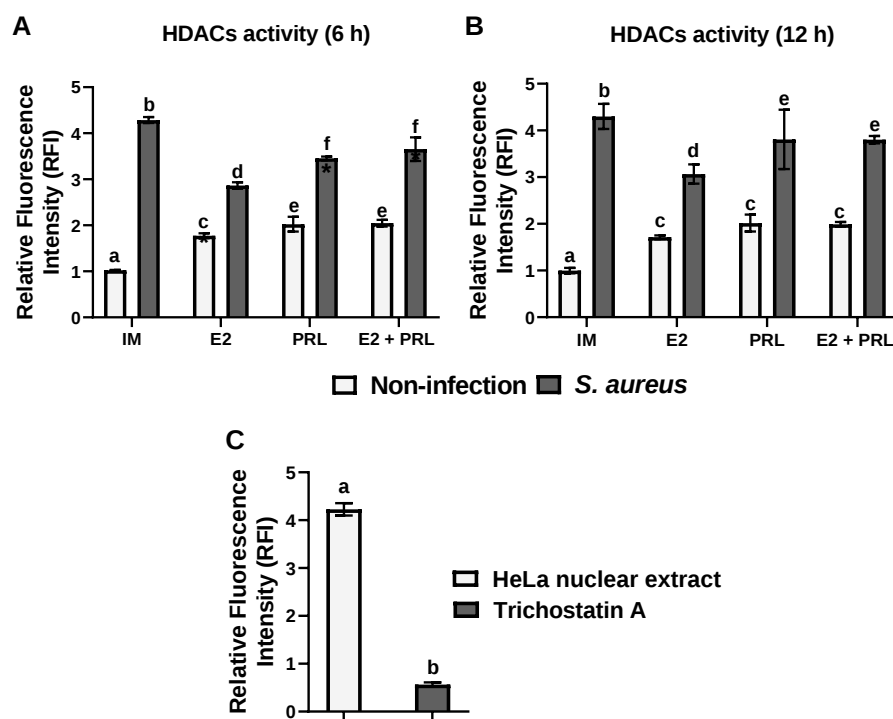


Figure 8

Supplementary figures

Figure S1

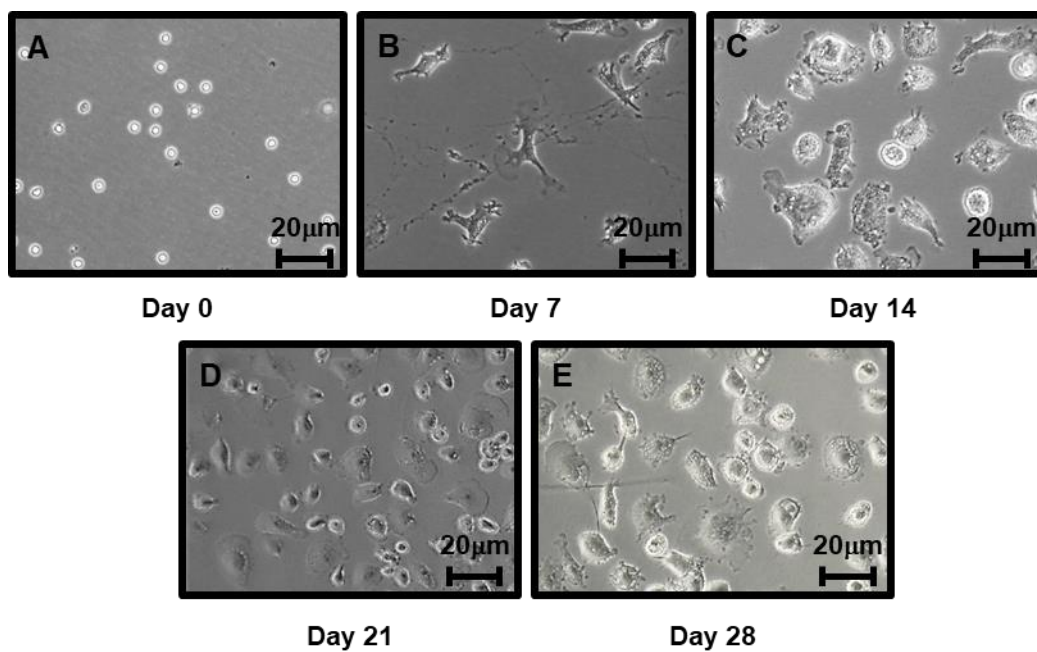


Figure S2

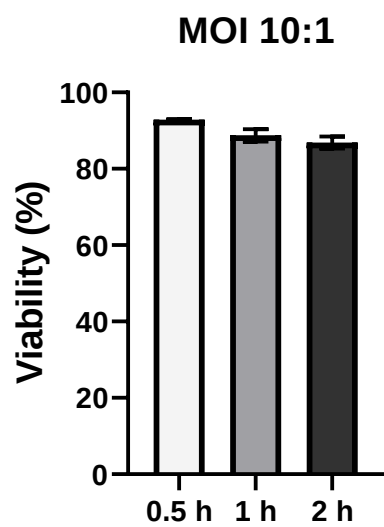


Figure S3

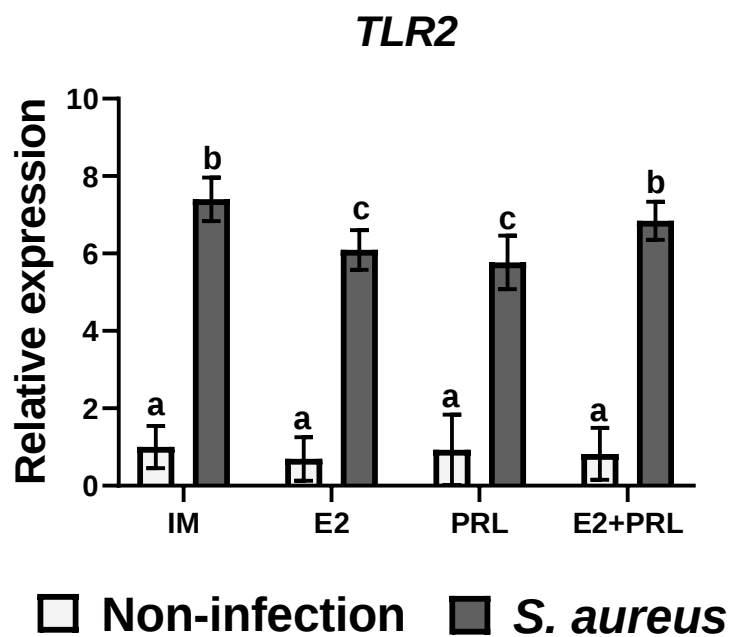
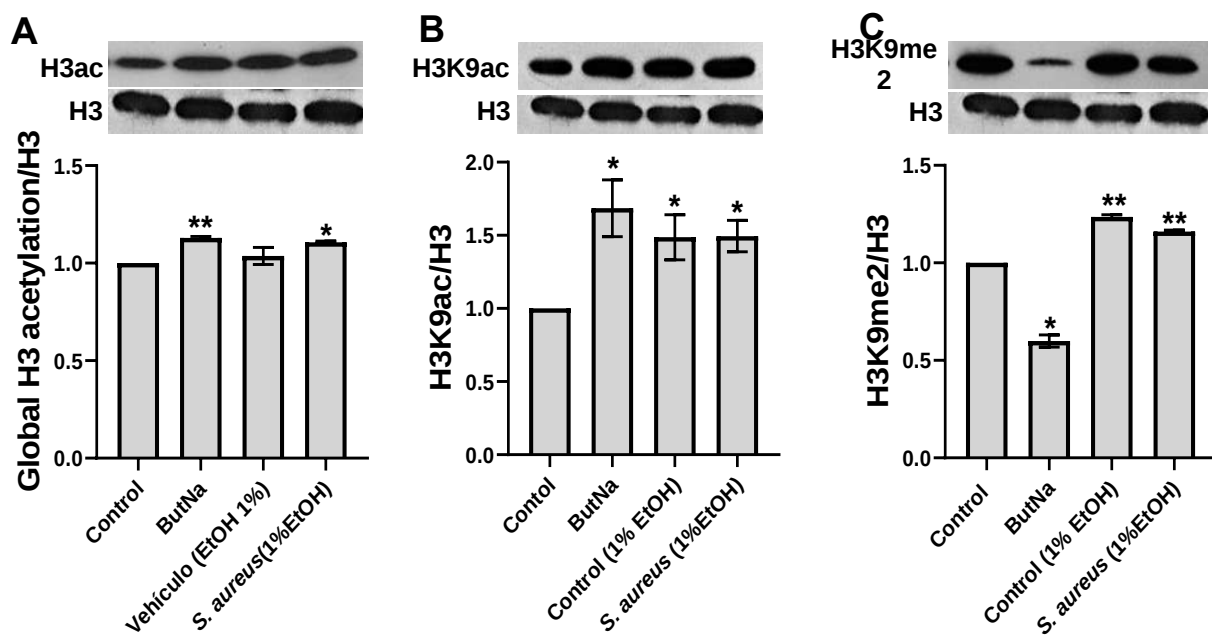


Figure S4



8.4 Capítulo III

Se presenta el artículo de divulgación: “Enfermedades autoinmunes bajo la influencia de la epigenética”. Milenaria Ciencia y arte año 11, no. 18. julio-diciembre de 2021. ISSN: 2954-9436

Revista

Milenaria, Ciencia y arte



Órgano de divulgación de la Facultad de Salud Pública y Enfermería



A manera de editorial

Saltando de gusto como una *Hyla plicata*, presentamos la décimo octava entrega de *Milenaria*, que aglutina 20 textos tan diversos como interesantes. En un intento de tomarle el pulso a la tercera ola de la pandemia, nuestros autores discurren sobre la reapertura de escuelas ante la contingencia, la adicción a dispositivos electrónicos, y el uso de herramientas didácticas como el *Webquest*. Sin dejar de revisar temas igual de urgentes como el cambio climático y sus repercusiones, especialmente las causadas por esa mezcla de *Jekyll y Mr. Hyde* llamado Antropobimores, haciendo un llamado a reconectarnos con la biodiversidad a través de la lente de la ciencia ciudadana.

En asuntos de salud nos hacen un llamado inclusivo a la prevención, favoreciendo la lectura en lengua *Náhuatl*, resaltando la importancia epigenética en las enfermedades autoinmunes, nos hablan de la leptina y su relación con la obesidad, de la importancia de una sustancia de los frutos rojos llamada ácido elágico o de los beneficios de disfrutar del zapote amarillo.

Dando otro salto de rana hacia las ciencias sociales, se reconoce la historia de muchas familias mexicanas con el texto: Mi vida después de que mi padre migró. Se observa a los alumnos de primaria mejorar su aprendizaje viviendo la realidad inmediata de la Microhistoria y se distingue a la Cultura como una necesidad universal que requiere el adecuado diseño de políticas públicas.

Ahora los que saltan son los colores para revalorar a Tamara de Lempicka, para que nuestros niños nos impacten con la forma en que visualizan nuestra ciudad a futuro, para que con palabras coloridas nos susurren: “tus sueños son del tamaño de la libertad” o que una carcajada nos recuerde que esta vida es “súper fácil”.

Hace casi una década, nadie del equipo de *Milenaria* sabía cómo se hace una revista, acudimos a la guía experta del Mtro. Jesús Morales Pérez y aunque tenía otros proyectos, con gran paciencia nos ayudó a delinear lo que hoy es nuestra publicación. Esta edición está dedicada a la memoria de este gran filósofo, educador y editor universitario; le enviamos hasta otro plano un agradecido ¡Vale!

Esperamos que este número sea de su agrado...

Nuestra Portada:

Rana de Árbol Plegada (*Hyla plicata*), una rana endémica de México, que se encuentra cerca de arroyos y charcos en bosques húmedos de gran altitud, como el caso de este ejemplar de “Los Azufres” en Michoacán. Este anfibio mide menos de 5 cm y las hembras suelen ser ligeramente más grandes que los machos. En sus patas, las puntas de los dedos tienen discos adhesivos que les permiten trepar a tallos y hojas resaltando así sus hábitos arborícolas (Reseña informativa: Brenda Gutiérrez, fotografía: Luis Fernando Ortega).

Más información en <https://www.naturalista.mx/taxa/23784-Hyla-plicata>

DIRECTOR:

DR. MARCIANO PRADO PALLARES

DIRECTORA FUNDADORA:

MA. TERESA MALDONADO GUIZA

EDITOR:

LUIS FERNANDO ORTEGA VARELA

COMITÉ EDITORIAL:

AMALIA ÁVILA SILVA,
GABRIELA BARRAGÁN CAMPOS,
ERICKA GONZÁLEZ CANCINO,
MA. TERESA MALDONADO GUIZA,
HÉCTOR AARON RÍOS MENDOZA,
ÁLVARO RODRÍGUEZ BARRÓN,
LUIS MIGUEL VÁZQUEZ RANGEL.

DIAGRAMACIÓN Y DISEÑO:

† JESÚS MORALES PÉREZ / JOSÉ ANTONIO HUERTA ESPINO

MILENARIA, CIENCIA Y ARTE, año 11, no. 18. julio-diciembre de 2021, es una revista semestral editada por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a través de la Facultad de Salud Pública y Enfermería, Gertrudis Bocanegra 330 Col. Cuauhtémoc, C.P.58020, Morelia, Michoacán, México, Tels. (443) 3122490 y 3137698. <http://www.milenaria.umich.mx/>. Editor responsable: Luis Fernando Ortega Varela. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del título: 04-2016-022913480800-203, ISSN: en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Desarrollo y mantenimiento del sitio web, M.A.T.I. Luis Miguel Vázquez Rangel, Gertrudis Bocanegra 330 Col. Cuauhtémoc, C.P.58020, Morelia, Michoacán, México, Tels. (443) 3122490 y 3137698. Fecha de última modificación, 5 de noviembre de 2021.

Todos los artículos publicados han sido sometidos a un arbitraje doble ciego por parte de al menos dos académicos.

El contenido de los trabajos es responsabilidad de sus respectivos autores, por lo que no refleja necesariamente el punto de vista de nuestra Casa de Estudios. Esta revista puede ser reproducida total o parcialmente con fines no lucrativos, siempre y cuando se cite la fuente completa.

La revista *Milenaria, Ciencia y Arte* es una aventura editorial de todos, por eso te invitamos a que nos hagas llegar tus comentarios a: milenariaumsnh@gmail.com, expresa tus opiniones e intereses para hacer más viva esta publicación.



A manera de editorial	2
¿México estará preparado para la reapertura de escuelas ante la contingencia sanitaria por covid-19? Un desafío social para la salud pública	3
Mónica González Hernández y Mauricio Torres Abarca	
Adicción a los dispositivos electrónicos y a las redes sociales en tiempos de pandemia	6
Marcia Yvette Gauthereau Torres y Daniel Godínez Hernández	
Webquest: marcando el futuro de la educación	8
Patricia Serna González y Raquel Santillán Galván	
El cambio climático y sus repercusiones biopsicosociales ..	11
Víctor Hugo Ortiz Montalvo, Julio César Pérez Alejo	
Un Antropobimores.... y sus dos comportamientos con el Planeta	15
Salvador García Espinosa y Rosenda Aguilar Aguilar	
Biodiversidad a través del lente: fotografía y ciencia ciudadana	17
Laura Itzel Rojas González, Tania Alhelí Cruz Mejía y Ariana García Galván	
CÓMO PREVENIR LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Favoreciendo la lectura en lengua náhuatl	22
Perla Jacaranda De Dienheim Barrigueté, Katia Ruiz López y Flor Fernanda Osorio Martínez	
“Enfermedades autoinmunes bajo la influencia de la epigenética”	25
Marco Antonio Barajas Mendiola, Joel Edmundo López Meza, Alejandra Ochoa Zarzosa	
El receptor LEPRB y su relación con la resistencia a la leptina y a la obesidad	29
Jennifer Solórzano Mondragón, Karen Trujillo Canales y Martha Isabel Lara Padilla	
¡Lo que debes saber del ácido elágico!	31
Kristal Ruiz-Pompa y Juan Carlos González-Hernández	
ZAPOTE AMARILLO, UN FRUTO EXQUISITO DE SABOR INIGUALABLE NUTRIMENTALMENTE RICO	34
Erika Judith Avila Mendoza y Rosa María García Martínez	
Mi vida después de que mi padre migró: Salud mental y emocional de hijos e hijas de padres migrantes	37
Maricarmen Rodríguez Dimas, María Elena Rivera Heredia y Nydia Obregón Velasco	
Microhistoria en la Educación Primaria	40
María de Jesús Cantero García	
La práctica docente: su análisis en profesores de bachillerato mediante los dilemas	43
José Luis Tapia Huerta y Guadalupe Soto Molina	
La Cultura y su papel fundamental en la satisfacción de necesidades humanas universales como base en el diseño de políticas públicas	45
Jaime Bravo Déctor	
La vigencia de Tamara de Lempicka	48
Rosa María Bravo Valdes	
¿CÓMO QUIERO QUE SEA MI CIUDAD?	51
Ana Emilia García Aguilar y Salvador García Espinosa	
Dibujando los días	55
Aspirinas para el alma	56
In memoriam Maestro Jesús Morales Pérez	58

¿MÉXICO ESTARÁ PREPARADO PARA LA REAPERTURA DE ESCUELAS ANTE LA CONTINGENCIA SANITARIA POR COVID-19? UN DESAFÍO SOCIAL PARA LA SALUD PÚBLICA

Mónica González Hernández y Mauricio Torres Abarca

Facultad de Salud Pública y Enfermería U.M.S.N.H.
Contacto: torres_mauricio1@hotmail.com

Resumen. La pandemia por Covid-19 nos obligó a dar un giro de 180°, entrando a un mundo virtual a través de los diferentes medios de comunicación y en primera instancia el internet y la televisión, dando apertura a una nueva adaptabilidad muy diferente a la que todo estudiante y empleado estaba acostumbrado a realizar, donde se encontraba en práctica una medida preventiva para cuidar la salud de las personas a través del distanciamiento social, teniendo como mejor aliados a la tecnología para el uso de las plataformas virtuales. La reapertura de las escuelas deberá estar acorde con las medidas sanitarias que establecen los diferentes órganos de salud en coordinación con el gobierno federal, ya que el principal objetivo que debe existir para el gobierno es proteger la salud de las personas. México como país, presenta un gran desafío social para la salud pública, siendo un gran aliado la prevención, promoción y educación para la salud.

Palabras Clave: Apertura escolar, distanciamiento social, salud pública.



Figura 1. Clases virtuales. Imagen tomada de diario la jornada, disponible en: <https://www.jornada.com.mx/ultimas/2020/08/24/primer-dia-del-regreso-a-clases-virtual>

“Enfermedades autoinmunes bajo la influencia de la epigenética”

Marco Antonio Barajas Mendiola, Joel Edmundo López Meza, Alejandra Ochoa Zarzosa

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México

Contacto: barajasmma@gmail.com

Resumen. A lo largo de nuestra vida estamos expuestos a incontables microorganismos patógenos y partículas que se encuentran circulando en el medio ambiente y que son capaces de entrar en nuestro cuerpo y ocasionar, algunas veces, una enfermedad, por lo que debemos estar preparados para combatirlos. A esta capacidad que poseemos para hacer frente a agentes extraños se le conoce como inmunidad. Sin embargo, en ciertas ocasiones la respuesta inmune puede no responder de manera adecuada, dando origen a desórdenes inmunológicos como las enfermedades autoinmunes, caracterizadas por producir un grave daño ocasionado por los propios componentes de la respuesta inmunológica. Recientemente, se ha considerado que muchos de estos eventos pueden también ser regulados por eventos epigenéticos. La epigenética es el estudio de los cambios heredables de la expresión y función de los genes sin alterar la secuencia del ADN. Los mecanismos de regulación epigenética (metilación del ADN, modificación química de histonas, miARNs) están involucrados de manera muy importante en procesos celulares como: diferenciación, desarrollo, crecimiento, envejecimiento y respuesta inmune. Además, la epigenética proporciona, en parte, un mejor entendimiento de como los factores ambientales pueden alterar la expresión de genes y desregular la respuesta inmune hacia un estado no deseado promoviendo la aparición y desarrollo de desórdenes inmunológicos, como la autoinmunidad. La presente revisión se enfoca en mostrar un breve panorama de como los mecanismos epigenéticos están implicados en la aparición y desarrollo de desórdenes inmunológicos como las enfermedades autoinmunes.

Palabras clave: Respuesta inmune, autoinmunidad, epigenética.

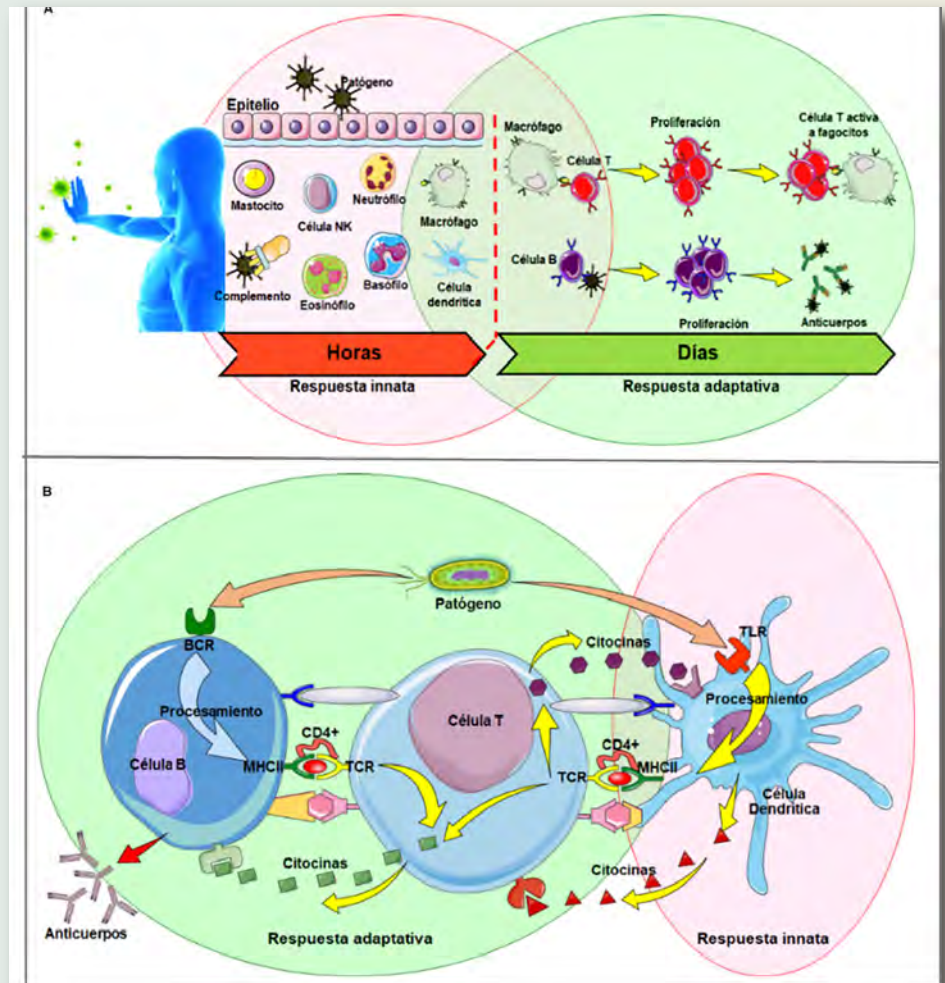


Figura 1. El sistema inmunológico es una maquinaria sofisticada en donde la respuesta innata y adaptativa cooperan de manera coordinada para destruir al patógeno invasor. **A)** La defensa en contra de patógenos invasores es iniciada por las reacciones tempranas de la respuesta innata. Días después, la respuesta adaptativa promueve una respuesta más específica para destruir a los patógenos invasores, a través de las funciones de los linfocitos T, y linfocitos B que se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. **B)** Después del reconocimiento del patógeno invasor, las células presentadoras de antígenos (APC) como las células dendríticas y los linfocitos B lo fagocitan y procesan para presentar el antígeno a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T. Esto promueve la activación de las funciones efectoras de los linfocitos T induciendo otros componentes de la respuesta inmune como macrófagos, otros linfocitos T y linfocitos B, a través de la producción de citocinas (Howell M & Shepherd M, 2018; Yamauchi & Moroishi, 2019).

Autoinmunidad, el lado oscuro de la inmunidad

Las enfermedades autoinmunes se describen como un ataque anormal del sistema inmunológico a órganos o tejidos propios mediado principalmente por anticuerpos dirigidos contra moléculas expresadas por nuestras células. La prevalencia de enfermedades

autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SS) esclerosis múltiple (EM), diabetes mellitus 1 (DM1) y enfermedad del intestino irritable en la población mundial es muy alta (~7-9%) y afecta principalmente a mujeres (Theofilopoulos y col, 2017). Notablemente, la principal función del sistema inmune es montar una respuesta

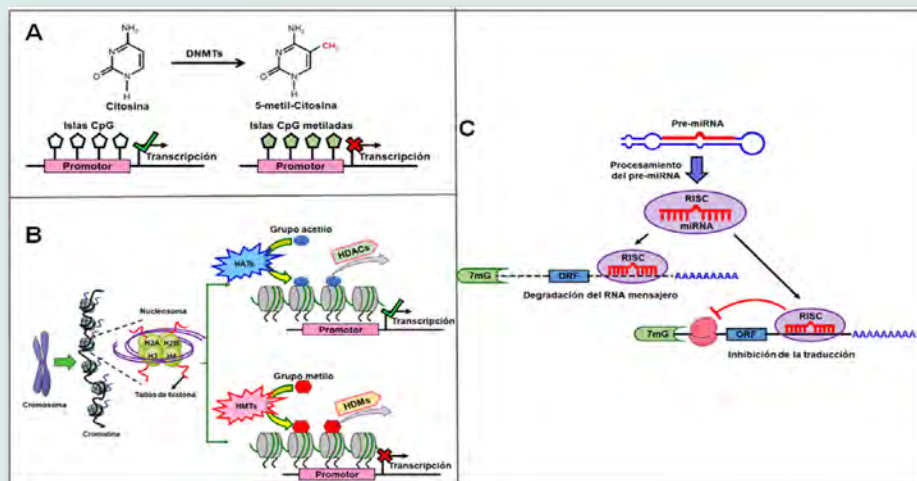


Figura 2. Mecanismos clave que contribuyen en el funcionamiento del epigenoma. **A)** Metilación del ADN. Proceso que se lleva a cabo en las islas CpG encontradas en la región promotora de los genes (DNMTs). La marca de metilación se asocia a la represión de genes. **B)** Modificación química de las histonas. Las colas de las histonas son susceptibles a modificaciones químicas como la metilación y la acetilación y se llevan a cabo principalmente en los residuos de lisina. La metilación en las histonas se presenta a través de la actividad de las enzimas HMTs y son removidos por la actividad de las HDMTs, mientras que la acetilación consiste en la adición de grupos acetilo por las HATs, que son removidos por la actividad de las HDACs. Usualmente las marcas de metilación en las histonas se asocian a la represión de genes mientras que las marcas de acetilación se asocian a la expresión de genes. **C)** Función de los miARNs. Moléculas de ARN no codificante como los miARNs participan de manera importante en la regulación de la expresión de genes. Los miARNs son producidos en el núcleo de la célula como precursores de miARNs (pre-miARNs) y en el citosol son procesados para formar el miARN maduro (miARN). El miRNA es cargado en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) y se dirige al mRNA que tiene como blanco para inducir la represión de genes a través de su degradación o por inhibición de la transcripción (Long y col, 2018; Wu y Lu, 2019; Treiber y col, 2019).

eficiente que nos permita protegernos de moléculas o microorganismos potencialmente peligrosos. Tal respuesta se lleva a cabo a través de dos diferentes estrategias, una respuesta innata que aparece de manera inmediata, no es altamente específica y recientemente se ha descrito que presenta memoria, conocida como inmunidad entrenada (Pelz y Wechsler, 2019; Netea y col, 2020), y una respuesta adaptativa que aparece más tarde, es altamente específica y presenta mecanismos de memoria más complejos (Figura 1A) (Pelz y Wechsler, 2019). Ambas estrategias, a través de los mecanismos de sus diferentes componentes (como células epiteliales, mucosas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, citocinas, quimiocinas, linfocitos T y B), actúan de manera coordinada para proporcionar una adecuada respuesta y destruir a los patógenos (Figura 1B).

No obstante, una característica clave de la respuesta inmunológica es evitar una respuesta destructiva en contra de nosotros mismos, es decir, tiene la capacidad de distinguir lo propio de lo no propio a través de la auto-tolerancia inmunológica, proceso de regulación del sistema inmune que se caracteriza por la

ausencia de una respuesta inmune frente a un antígeno propio y solo dirige tal respuesta en contra de antígenos extraños. Sin embargo, cuando la auto-tolerancia inmunológica se rompe, como consecuencia de la susceptibilidad genética, de factores ambientales, o de infecciones, pueden surgir las enfermedades autoinmunes (Yang y col, 2018; Koike y col, 2021). Está claro que la susceptibilidad genética es un fuerte componente en la aparición y desarrollo de enfermedades autoinmunes debido a que existe una fuerte asociación entre las variantes genéticas en los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y este tipo de enfermedades. Del mismo modo, variantes genéticas en genes que no pertenecen al MHC, por ejemplo los genes que codifican para los factores reguladores del interferón (IRFs, por sus siglas en inglés) también están fuertemente asociados al origen y desarrollo de estas enfermedades autoinmunes (Long y col, 2018). Sin embargo, diversos estudios en gemelos idénticos (que poseen la misma información genética) se han empleado de manera satisfactoria para entender la patología de varias enfermedades

autoinmunes. En estos estudios se encontraron bajos niveles (12-67%) de prevalencia en la aparición de estas enfermedades entre gemelos idénticos (Xiang y col, 2017); por ejemplo, en un estudio de la prevalencia de LES entre gemelos idénticos se estimó que esta fue del 24% (Gegersen, 1993). Estos hallazgos reflejan que componentes no genéticos (influencia del medio ambiente o mecanismos epigenéticos) participan de manera importante en la patología de muchas enfermedades autoinmunes (Generalí y col, 2017). Por lo anterior, el origen de las enfermedades autoinmunes no solo depende de la constitución genética del individuo, sino que los factores epigenéticos y medio-ambientales también contribuyen en el inicio y perpetuidad de las mismas, haciendo que la comprensión, diagnóstico y tratamiento adecuado de estas enfermedades se vuelva complejo (Jadeu y González, 2012).

Epigenética, una nueva perspectiva del origen y desarrollo de las enfermedades autoinmunes

La epigenética, término acuñado por Conrad Hal Waddington, se define como el estudio de los cambios estables y potencialmente heredables de la expresión y función de los genes sin alterar la secuencia del ADN estableciendo una relación entre la influencia genética y medioambiental que dan lugar a un fenotipo (Zulet y col, 2017). La epigenética, a través de sus mecanismos (metilación del ADN, modificación química de las histonas y participación de pequeñas moléculas de ARN no codificantes), juega un papel muy importante en diversos procesos biológicos como en el desarrollo, diferenciación y función de diversos tejidos y órganos. Así mismo, los mecanismos epigenéticos regulan de manera importante el desarrollo y diferenciación de las células inmunológicas, así como la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Zhao y col, 2015). Sin embargo, estos mecanismos epigenéticos también son críticos en la aparición y desarrollo de las enfermedades autoinmunes debido a que existe una fuerte asociación entre la función inmunológica desregulada y la aparición de mecanismos epigenéticos aberrantes (Zhao y col, 2015). En este

Enfermedad autoinmune	Metilación del ADN	Modificación química de las histonas	miARNs
LES	↓ CD40L ↓ CD70 ↓ Células TCD4 ⁺ ↓ Perforina	↑ Metilación de H3 y H4 ↑ Acetilación de H3 y H4	↑ miR-21 ↑ miR-148a
AR	↓ Células TCD4 ⁺ ↑ Sinoviocitos	↑ Acetilación de H3	↑ miR-146a
EM	↓ Células TCD4 ⁺ Fibroblastos	↓ Acetilación de H3 en fibroblastos	↑ miR-29a ↑ miR-196a
SS	↓ Células TCD4 ⁺	No hay análisis	↑ miR-146a

Tabla 1. Cambios en el perfil epigenético de las enfermedades autoinmunes. Lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (ES), síndrome de Sjögren (SS). Tomado y modificado de Long y col; Mazzone y col, 2019.

sentido, la epigenética proporciona bases para una mejor comprensión de como los factores del medio ambiente pueden alterar la expresión de los genes y desbalancear el equilibrio del sistema inmunológico, lo cual puede resultar en la aparición de muchos de los mecanismos patológicos implicados en desórdenes como las enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, la epigenética es crítica en la aparición y desarrollo de LES, una enfermedad autoinmune sistémica y crónica caracterizada por una disregulación de linfocitos T CD4⁺ y B que da como resultado la producción de auto-anticuerpos en contra de antígenos nucleares (ADN, histonas, proteínas no histona o asociadas a ARN) afectando sistemas, órganos y tejidos (como riñones, piel, vasos sanguíneos, sistema respiratorio, cardiovascular y nervioso) (Tsokos, 2011; Mazzone y col, 2019). Uno de los eventos epigenéticos clave en LES son los bajos niveles de metilación en regiones específicas del ADN, comúnmente en el promotor de un gen.

La metilación es un mecanismo epigenético que consiste en adicionar un grupo metilo en los residuos de citosina, usualmente sucede en dinucleótidos citosina-guanina (CpG) en el ADN de mamíferos y es mediada por un grupo de enzimas llamadas ADN metil-transferasas (DNMTs, por sus siglas en inglés) (Figura 2A). Generalmente está asociada a la supresión de genes. En el LES, los bajos niveles de metilación permiten la sobreexpresión de genes específicos asociados a la autoinmunidad como CD70 y CD40L, moléculas co-estimuladoras que se expresan en los linfocitos T CD4⁺ que contribuyen a una sobre estimulación de las células B, promoviendo una producción descontrolada de anticuerpos. Así mismo, la perforina, una proteína que promueve la lisis de la membrana celular, presenta bajos niveles de metilación en su promotor y se encuentra sobreexpresada en linfocitos T CD4⁺, lo cual promueve la lisis de monocitos propios y la producción de auto-antígenos en

pacientes con LES (Klein y col 2017; Long y col, 2018, Mazzone y col, 2019, Tsokos, 2020).

Por otra parte, el ADN de las células eucariotas está organizado en el núcleo en una estructura conocida como cromatina, la cual está formada de unidades básicas conocidas como nucleosomas. El nucleosoma es una estructura formada principalmente por un octámero de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que se encuentran enrolladas por ADN (146 pares de bases) (Figura 2B). Las histonas son susceptibles a modificaciones químicas que regulan de manera importante la expresión de los genes. Entre estas modificaciones, principalmente se encuentran la acetilación (modificación asociada a la expresión de genes) y la metilación (modificación asociada a la represión de genes), las cuales son catalizadas por las enzimas histona acetil transferasas (HATs) e histona metil-transferasas (HMTs), respectivamente (Figura 2B). Estas modificaciones químicas usualmente ocurren en los residuos del aminoácido lisina (K) encontrados en las colas de las histonas H3 y H4. Por ejemplo, la tri-metilación en el residuo 27 de lisina de H3 (H3K27me3) está asociada a la represión de genes, mientras que una acetilación en el residuo 9 de lisina de la H3 (H3K9ac) está asociada a la expresión de genes, aunque también la tri-metilación de la lisina 4 de la H3 (H3K4me3) está asociado a la expresión de genes. Además, estas modificaciones químicas en las histonas son reversibles a través de la actividad de otras enzimas como las histonas desacetilasas (HDACs) e histona desmetilasas (HDMs) las cuales remueven grupos acetilo y metilo de los residuos de lisina de las histonas, respectivamente (Figura 2B) (Wu y Lu, 2019). En el LES, los patrones de modificaciones químicas en las histonas han sido poco investigados; sin embargo, la enfermedad se ha asociado a bajos niveles de acetilación global de las histonas H3 y H4, bajos niveles de metilación global de H3 (particularmente en H3K9), debido a una actividad aberrante de las HDACs y de las HMTs, respectivamente, en células T CD4⁺. Además, altos niveles de acetilación global en H4 y altos niveles de metilación (particularmente la marca H3K4me3) se ha observado en

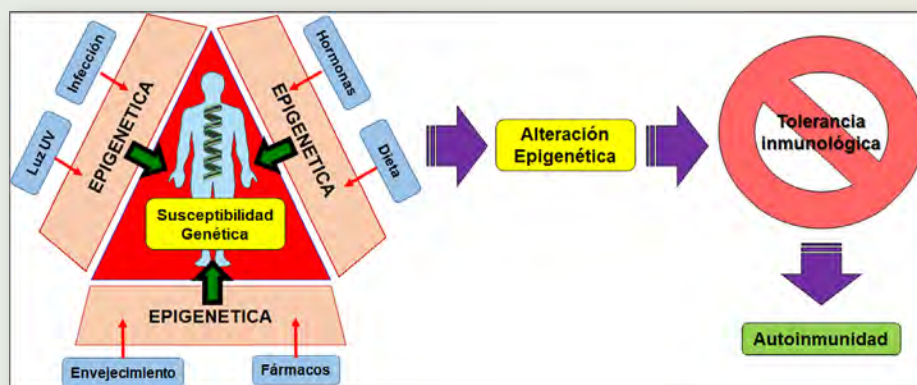


Figura 3. Los factores medioambientales influyen en la aparición de las enfermedades autoinmunes en individuos genéticamente susceptibles. Las modificaciones del epigenoma son influenciadas por los factores medioambientales como la dieta, el consumo de medicamentos, niveles hormonales, infecciones, entre otros; los cuales promueven la pérdida de la auto-tolerancia inmunológica favoreciendo la aparición de enfermedades autoinmunes (Wang y col, 2015; Klein y col 2017; Long y col, 2018)



Glosario

Antígeno: molécula capaz de montar una respuesta inmunológica y promover la formación de anticuerpos.

Autoinmunidad: estado desregulado del sistema inmunológico que causa la pérdida de la tolerancia a antígenos propios lo cual provoca daño a las células y tejidos normales.

Epigenoma: descripción completa de las modificaciones químicas en el ADN y en las proteínas histona de un organismo. Estas modificaciones son heredables y resultan en cambios en la estructura de la cromatina y en la función del genoma.

Gemelos idénticos: también llamados gemelos monocigóticos. Son el resultado de la fecundación de un único óvulo y un único espermatozoide, en donde el cigoto, en algún momento durante las primeras fases de su desarrollo, se separa en dos dando lugar a dos individuos con el mismo material genético.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad, molécula presente en células presentadoras de antígenos como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B cuya función es presentar el antígeno, proveniente de un microorganismo patógeno, a los linfocitos T y activar sus funciones efectoras para eliminar de manera más eficiente el patógeno invasor.

miARN: pequeñas moléculas de ARN no codificante que inhiben la expresión de los genes blanco directamente a través de la degradación del ARN mensajero o inhibiendo el inicio de la traducción.

Prevalencia: proporción de individuos de una población en particular que se encuentra estar afectada por una condición médica, como una enfermedad, en un tiempo específico.

Promotor: región del ADN que controla el inicio de la transcripción de ADN a ARN.

Tolerancia: estado de indiferencia o falta de respuesta hacia una sustancia que normalmente se esperaría montar una respuesta inmunológica.

Traducción: proceso en el cual una molécula de ARN mensajero es convertida a proteína.

monocitos de pacientes con LES, lo cual correlaciona con el desarrollo de la enfermedad (Klein y col 2017; Long y col, 2018, Mazzone y col, 2019).

Del mismo modo que la metilación del ADN y las modificaciones químicas de las histonas, moléculas de ARN no codificante como los micro ARN (miARNs) son importantes reguladores epigenéticos. Los miARNs consisten en pequeñas moléculas de ARN (18-25 nucleótidos) que inhiben la expresión de genes a través de la degradación del ARN mensajero (mARN) o por inhibición de la traducción (Figura 2C) y están implicados en el control de

diversos procesos biológicos (por ejemplo, la respuesta inmunológica) (Treiber y col, 2019). Del mismo modo, los miARNs son clave en la aparición y desarrollo de varias enfermedades autoinmunes a través de la regulación del desarrollo de las células inmunes, mediando la producción de citocinas pro-inflamatorias (inmunidad innata) y la producción de auto-anticuerpos (inmunidad adaptativa) (Zhang y col, 2020). Un perfil alterado de expresión de miARNs se ha identificado en células inmunes de pacientes con LES. Por ejemplo, bajos niveles de expresión de miR-125a, miR-125b, miR-146a y miR-155 y altos niveles de expresión de

miR-148a, miR-21, miR-223, miR-30a y miR-31 se asocian a la sobre-estimulación de células T y B y a la producción de auto-anticuerpos, eventos clave en el desarrollo y aparición de esta enfermedad autoinmune (Long y col, 2018; Mazzone y col, 2019; Zhang y col, 2020).

En línea con lo anterior, muchos de estos mecanismos epigenéticos aberrantes que regulan la aparición y desarrollo de LES, también aparecen de forma similar en pacientes que cursan con otro tipo de enfermedades autoinmunes (Tabla 1); por ejemplo, patrones de bajos niveles de metilación en el promotor del gen CD40L, están asociados a la sobre-expresión de este gen en células T CD4⁺ de pacientes con AR, síndrome de Sjögren, EM y DM1 (Lian y col, 2012; Liao y col, 2012; Mazzone y col, 2019). Esto refleja de manera muy importante la presencia de vías comunes de señalización que son reguladas epigenéticamente entre estas enfermedades autoinmunes.

Finalmente, los mecanismos epigenéticos proporcionan un panorama que permite entender como los factores medioambientales (hormonas, dieta, infecciones, medicamentos, radiación UV, entre otros) pueden dirigir al rompimiento de la auto-tolerancia en individuos genéticamente susceptibles promoviendo el inicio y desarrollo de desórdenes inmunológicos como las enfermedades autoinmunes (Figura 3).

Conclusión

El sistema inmune evolucionó hasta formar una compleja red de componentes que lo convierten en una eficiente máquina capaz de protegernos frente a un daño inminente. Sin embargo, una falla en su función puede producir efectos no deseados como el desarrollo de desórdenes inmunológicos que ponen en peligro la salud, como lo son las enfermedades autoinmunes. Hoy en día no solo se debe considerar la constitución genética del individuo, que aunque es determinante en la aparición de los desórdenes inmunológicos, los mecanismos epigenéticos, como metilación del ADN, modificaciones químicas de las histonas y la expresión de miARNs también contribuyen de

manera importante en la aparición y desarrollo de enfermedades. La estrecha relación entre las enfermedades autoinmunes y la epigenética está ampliamente documentada; sin embargo, en vista de que los seres humanos estamos expuestos a una gran cantidad de factores que puede contribuir de manera dramática en nuestra salud, investigaciones que involucren como estos factores pueden modificar el panorama epigenético, podrían tener un gran impacto en la generación de conocimiento que ayude a explicar el riesgo y progresión de estas enfermedades para implementar estrategias que permitan dar un tratamiento adecuado aumentando la calidad de vida de quién las padece.

Referencias

- Generali, E., Ceribelli, A., Stazi, M. A., & Selmi, C. (2017). Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Journal of autoimmunity*, 83, 51-61.
- Gregersen, P. K. (1993). Discordance for autoimmunity in monozygotic twins. Are "identical" twins really identical?. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 36(9), 1185-1192.
- Howell, M., & Shepherd, M. (2018). The immune system. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 19(10), 575-578.
- Jadue, A. N. & González, A. I. (2012). Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 464-472.
- Klein, K., Maciejewska-Rodrigues, H., Gay, S., & Jungel, A. (2017). The Role of Epigenetics in Autoimmune Disorders. In *Handbook of Epigenetics* (pp. 535-551). Academic Press.
- Koike, H., Chiba, A., & Katsuno, M. (2021). Emerging Infection, Vaccination, and Guillain-Barré Syndrome: A Review. *Neurology and Therapy*. 2021,1-15.
- Lian, X., Xiao, R., Hu, X., Kanekura, T., Jiang, H., Li, Y., ... & Lu, Q. (2012). DNA demethylation of CD40L in CD4+ T cells from women with systemic sclerosis: a possible explanation for female susceptibility. *Arthritis & Rheumatism*, 64(7), 2338-2345.
- Liao, J., Liang, G., Xie, S., Zhao, H., Zuo, X., Li, F., ... & Lu, Q. (2012). CD40L demethylation in CD4+ T cells from women with rheumatoid arthritis. *Clinical immunology*, 145(1), 13-18.
- Long, H., Yin, H., Wang, L., & Lu, Q. (2018). The Epigenetics of Autoimmunity: An Overview. In *The Epigenetics of Autoimmunity* (pp. 1-23). Academic Press.
- Martín, D. D., Cantera, M. Ú., Suárez, A. L., & de Mon Soto, M. Á. (2017). Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(24), 1388-1397.
- Mazzone, R., Zwergel, C., Artico, M., Taurone, S., Ralli, M., Greco, A., & Mai, A. (2019). The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders. *Clinical epigenetics*, 11(1), 1-15.
- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., ... & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 375-388.
- Pelz, B. J., & Wechsler, J. B. (2019). Overview of Basic Immunology. In *Allergy and Sleep* (pp. 17-30). Springer, Cham.
- Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H., & Baccala, R. (2017). The multiple pathways to autoimmunity. *Nature immunology*, 18(7), 716.
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5-20.
- Tsokos G.C. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011;365:2110-21.
- Tsokos, G. C. (2020). Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nature immunology*, 21(6), 605-614.
- Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*, 278(4), 369-395.
- Wu, H., & Lu, Q. (2019). Epigenetics. In *Mosaic of Autoimmunity* (pp. 105-114). Academic Press.
- Xiang, Z., Yang, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2017). The epigenetic mechanism for discordance of autoimmunity in monozygotic twins. *Journal of autoimmunity*, 83, 43-50.
- Yamauchi, T., & Moroishi, T. (2019). Hippo pathway in mammalian adaptive immune system. *Cells*, 8(5), 398.
- Yang, S. H., Gao, C. Y., Li, L., Chang, C., Leung, P. S., Gershwin, M. E., & Lian, Z. X. (2018). The molecular basis of immune regulation in autoimmunity. *Clinical Science*, 132(1), 43-67.
- Zhang, L., Wu, H., Zhao, M., Chang, C., & Lu, Q. (2020). Clinical significance of miRNAs in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 109, 102438.
- Zhao, M., Wang, Z., Yung, S., & Lu, Q. (2015). Epigenetic dynamics in immunity and autoimmunity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 67, 65-74.
- Zulet, M. I., Fontes, L. P., Blanco, T. A., Bescos, F. L., & Iriarte, M. M. (2017). Epigenetic changes in neurology: DNA methylation in multiple sclerosis. *Neurología (English Edition)*, 32(7), 463-468.

• Enviado: febrero 04, 2021 • Aceptado: julio 26, 2021

El receptor LEPRB y su relación con la resistencia a la leptina y a la obesidad

Jennifer Solórzano Mondragón¹, Karen Trujillo Canales¹ y Martha Isabel Lara Padilla².

Facultad de Nutrición, Universidad de Morelia. 2. Facultad de Salud Pública y Enfermería, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.

Contacto: jen_cani202@hotmail.com

Resumen. La leptina es una hormona sintetizada por el tejido adiposo, codificada por el gen LEP. La relación de esta hormona con la obesidad, se debe a su principal función del aumento de saciedad y del gasto energético. Los niveles elevados de leptina, algún defecto en el receptor (LEPRb), o transporte, pueden provocar resistencia a la leptina, disminuyendo la saciedad y dando como consecuencia la obesidad.

Palabras clave: leptina, obesidad, resistencia a la leptina, receptor LEPRB.

INTRODUCCIÓN

La obesidad se define como una "enfermedad crónica inflamatoria que resulta en aumento de la masa del tejido adiposo" (Garvey, et al., 2016). Su fisiopatología es multifactorial (genética, vida sedentaria, dieta hipercalórica).

La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo que actúa inhibiendo el apetito y, a su vez es la encargada de aumentar el gasto de energía corporal (Madeira, et al., 2017). Los valores de leptina son directamente proporcionales a la cantidad de tejido adiposo, en la obesidad se produce una hiperleptinemia (niveles elevados de leptina) ocasionando una resistencia a la leptina.

Leptina y obesidad

La leptina (del griego leptos-, delgado) es una hormona peptídica de 167

IX. Discusión general

Cambios abruptos en las concentraciones de hormonas reproductivas como la prolactina y el 17β -estradiol durante el parto, la lactancia y el periodo seco inducen un desequilibrio de la respuesta inmune innata en la glándula mamaria bovina contribuyendo a la susceptibilidad de los animales a desarrollar mastitis subclínica, la cual es una enfermedad, crónica y recurrente, ocasionada principalmente por infecciones con *S. aureus*, la cual provoca un efecto negativo en la economía en la ganadería lechera (Lamote *et al*, 2006; Enger y col., 2018; Gussmann *et al*, 2019; Lacasse *et al*, 2019; Alhusien & Dang, 2020). Esto indica que estas hormonas, además de participar de manera importante en el desarrollo, diferenciación y función de la glándula mamaria bovina, pueden modular la respuesta inmune innata en este tejido.

Previamente en nuestro grupo de trabajo se demostró el papel inmunomodulador de la prolactina y el 17β -estradiol en células de epitelio mamario bovino durante el desafío con *S. aureus*. Se demostró que las hormonas y *S. aureus* activan vías de señalización y factores de transcripción que promueven la expresión de moléculas (como citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos) que generan una respuesta contra el patógeno. Por ejemplo, la bPRL a concentraciones fisiológicas (5 ng/mL) favorece una respuesta inflamatoria en las CEMB, la cual es inhibida por *S. aureus* (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008; Lara-Zarate *et al*, 2011; Medina-Estrada *et al*, 2015); mientras que, E2 a concentraciones fisiológicas (50 pg/mL) favorece una respuesta anti-inflamatoria y antimicrobiana en las CEMB, la cual es mantenida en presencia de *S. aureus* (Medina-Estrada *et al*, 2016). Además, la mezcla hormonal mostró efectos similares a los de E2 en las CEMB desafiadas o no con la bacteria (Salgado-Lora *et al*, 2020).

Evidencia creciente sobre la respuesta inducida por las moléculas inmunomoduladoras y los microorganismos patógenos sobre componentes de la respuesta inmune innata, como las células epiteliales y los macrófagos, resaltan un importante papel de los mecanismos epigenéticos como importantes reguladores de esta respuesta (por ejemplo, modificación de histonas y miRNAs) (Mehta, & Jeffrey, 2015; Zhang & Cao, 2019; Salgado-Lora *et al*, 2020).

Sin embargo, en infecciones intramamarias como la mastitis subclínica, poco se sabe sobre la participación de los mecanismos epigenéticos inducidos por las hormonas bPRL y E2 en la modulación de la respuesta inmunológica montada por las células de la glándula mamaria como las células epiteliales y los macrófagos. En el presente trabajo se exploró la participación de las marcas epigenéticas en la regulación de la expresión de los genes de la RII inducida por bPRL y E2 en las CEMB y en macrófagos bovinos durante el desafío con *S. aureus*.

Primeramente, se analizaron los efectos de bPRL sobre la regulación de los mecanismos epigenéticos en las CEMB a diferentes tiempos de estimulación (6, 12 y 24 h) con la hormona, esto debido a que los efectos de los mecanismos epigenéticos en la cromatina se llevan a cabo en cortos periodos de tiempo (Modak, R., et al, 2014). Aquí mostramos que bPRL a las 24 h en las CEMB desafiadas con *S. aureus*, reduce la acetilación global de la histona H3 (50%), lo cual está relacionado con la compactación de la cromatina, haciendo más difícil el acceso a la maquinaria transcripcional. Además, esto coincide con la regulación negativa de la expresión de los genes *IL-6*, *IL-8* y *TNF- α* en las CEMB bajo las mismas condiciones (Medina-Estrada *et al*, 2015). De manera importante, la marca H3K9ac, una marca asociada a la expresión de genes, se incrementó en las CEMB desafiadas con *S. aureus*; sin embargo, en presencia de bPRL fue reducida. Estos resultados concuerdan con la expresión de esta marca inducida por *S. aureus* en un modelo murino de mastitis (Modak *et al*, 2014). Además, la marca H3K9me2, una marca asociada a la represión de genes, se incrementó en las CEMB desafiadas con *S. aureus*, mientras que en presencia de la hormona no se observaron cambios. Interesantemente, la reducción de la marca H3K9ac y el aumento de la marca H3K9me2 coinciden con el incremento de la actividad de las HDACs y con una reducción de las HDMs, consistente con la evidencia de que las bacterias intracelulares modulan de manera positiva la actividad de las HDACs para evadir la respuesta montada por la célula hospedera (Grabiec & Potempa, 2018). Esto indica que bPRL regula expresión de elementos de la RII a través de estos mecanismos epigenéticos. En este sentido, demostramos que bPRL favorece el enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-1 β* , *IL-10* y *BNBD10*, mientras que, en presencia de la bacteria esta marca disminuyó sustancialmente. Además, esta disminución de

la marca H3K9ac coincide con el enriquecimiento de la marca H3K9me2 en la región promotora de estos mismos genes. Importantemente, estos efectos coinciden con la regulación de la expresión de *IL-1 β* , *IL-10* y *BNBD10* bajo las mismas condiciones (Medina-Estrada *et al*, 2015). Además, estos resultados sugieren que existe una relación inversa entre las marcas H3K9ac y H3K9me2 en la regulación de la expresión de genes de la RII. Por el contrario, *S. aureus* favorece el enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *TNF α* e *IL-8* CEMB, mientras que la presencia de bPRL reduce el enriquecimiento de esta marca y favorece el incremento de la marca H3K9me2. Estos resultados coinciden con la regulación de la expresión de estos genes bajo estas condiciones (Medina-Estrada *et al*, 2015). Además, nuevamente estos resultados muestran una relación inversa entre las marcas H3K9ac y H3K9me2 en la regulación de la expresión de genes de la RII.

Con el fin de explorar la participación de otros mecanismos epigenéticos, se evaluó la participación de los miRNAs en la respuesta inducida por bPRL en las CEMB durante el desafío con *S. aureus*. La bacteria favorece la expresión de miR-155 en las CEMB desafiadas con *S. aureus* y esto coincide con el enriquecimiento de la marca epigenética H3K9ac en la región promotora del gene *TNF- α* , y con la expresión y secreción de la citocina (Medina-Estrada *et al*, 2015). Mientras que la presencia de bPRL disminuye la expresión de miR-155, lo cual coincide con la reducción de la marca H3K9ac y con el incremento de la marca H3K9me2, además coincide con la regulación negativa de este gene bajo las mismas condiciones (Medina-Estrada *et al*, 2015). Esto indica que bPRL modula la expresión de *TNF- α* a través de la regulación epigenética. Un efecto similar para otros genes de la respuesta pro-inflamatoria puede estar sucediendo, debido a que *S. aureus* incrementó la expresión de otros miRNAs involucrados en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria como: miR-21a, miR-30b y Let-7a-5p, mientras que la presencia de bPRL redujo considerablemente la expresión de estos miRNAs. Notablemente, miR-7863 es un miARN que se expresa en infecciones como la mastitis, por lo que se le consideró como un posible marcador para detectar la enfermedad (Luoreng *et al*, 2018). Aquí se demostró que este miARN es regulado de manera negativa en las CEMB tratadas con bPRL y desafiadas con *S. aureus*,

por lo que resulta interesante estudiar el blanco y el posible mecanismo molecular involucrado durante la infección.

Por otra parte, la mezcla hormonal favorece la respuesta antimicrobiana en las CEMB y esta respuesta fue mantenida después de la infección con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Importantemente, Salgado-Lora y colaboradores (2020) demostraron que las hormonas regularon la acetilación global de la histona H3 y marcas específicas tales como la H3K9ac y H3K9me2 en las CEMB desafiadas con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Aquí demostramos que E2 y bPRL favorecen el enriquecimiento de la marca epigenética H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Salgado-Lora y colaboradores (2020), en el que se mostró que la mezcla hormonal regula de manera positiva la expresión de estos genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Previamente se demostró que *S. aureus* inhibe la expresión de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* (Medina-Estrada *et al*, 2015; Salgado-Lora *et al*, 2020), posiblemente para disminuir la defensa antimicrobiana por parte de la célula hospedera. Aquí mostramos que esta regulación negativa de los genes antimicrobianos y anti-inflamatorios coincide con la reducción del enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP*. Interesantemente, el enriquecimiento de la marca H3K9ac inducido por la mezcla hormonal fue más evidente en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP* cuando las CEMB fueron infectadas con *S. aureus*, lo cual coincide con la expresión de estos genes bajo las mismas condiciones (Salgado-Lora *et al*, 2020).

Notablemente, se observó una relación inversa entre la marca H3K9ac y la marca H3K9me2 en la región promotora de los genes *IL-10*, *BNBD10* y *LAP*, en donde la mezcla hormonal reduce el enriquecimiento de la marca H3K9me2, lo cual coincide con el enriquecimiento de la marca H3K9ac y la expresión de los genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Además, *S. aureus* induce el incremento de H3K9me2 en la región promotora de estos genes coincidiendo con la regulación negativa de estos genes (Salgado-Lora *et al*, 2020). Similarmente, la mezcla hormonal favorece el enriquecimiento de la marca H3K9ac en la región promotora de los genes *IL-8* e *IL-1 β* coincidiendo con la reducción de la marca H3K9me2 y la regulación positiva de estos genes previamente reportada por Salgado-Lora y colaboradores (2020).

Además, se observó que *S. aureus* induce una reducción del enriquecimiento de la marca H3K9ac en estos genes, lo cual coincide con el aumento de la marca H3K9me2 en la región promotora de estos genes. Sin embargo, la expresión de los genes *IL-8* e *IL-1 β* (Salgado-Lora *et al*, 2020) bajo estas condiciones, no coincide con lo reportado aquí, posiblemente otras marcas epigenéticas como H3K14ac, H3K27ac o H3K4me3, marcas asociadas a la expresión de genes, estén participando en la regulación de la expresión de *IL-8* e *IL-1 β* bajo las condiciones ya mencionadas (Modak *et al*, 2014). De manera importante, el efecto de la mezcla hormonal sobre la regulación epigenética de la expresión de TNF- α fue reproducido de manera similar al efecto de la bPRL sobre la regulación epigenética en este mismo gene.

Asimismo, *S. aureus* moduló la expresión de manera positiva de los miRNAs: miR-21a, Let-7a-5p, miR-30b, miR-155, miR23a, miR-7863, miR-451, miR-144 y miR-146a en las CEMB, esto coincide con lo reportado con otras bacterias intracelulares, en las que el incremento de la expresión de estos miRNAs durante las infecciones bacterias promueve una regulación negativa de la respuesta inflamatoria favoreciendo la persistencia bacteriana (Jin *et al*, 2014; Zhou *et al*, 2018; Wang *et al*, 2017; Do *et al*, 2021). Además, en presencia de la mezcla hormonal la expresión de estos miARNs disminuyó considerablemente.

Hasta aquí, estos resultados permiten proponer un modelo (Figura 14) en el que bPRL y E2, a través de la expresión de miARNs y de las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2, regulan los elementos de la RII en CEMB. Sin embargo, bacterias como *S. aureus* pueden desregular la respuesta inmunológica montada por las CEMB, a través de la modulación de estos mecanismos epigenéticos, lo cual puede explicar, en parte, la evasión del sistema inmune montado por las células hospedadoras, así como su persistencia en ellas.

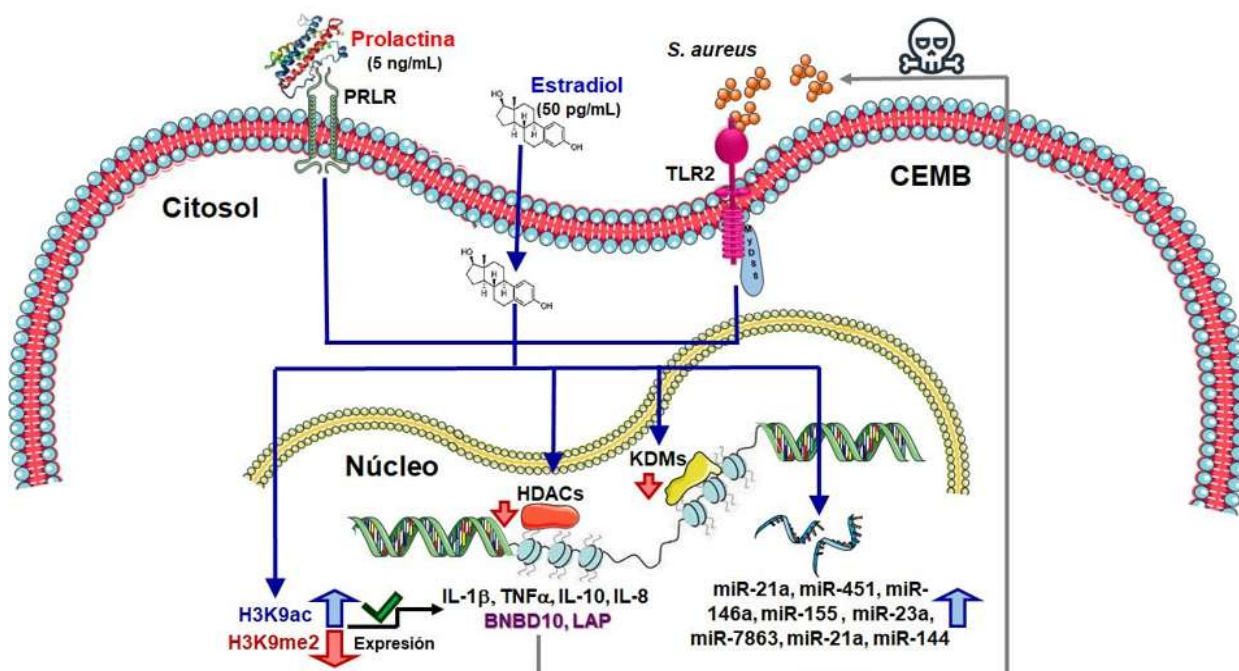


Figura 14. Regulación epigenética inducida por bPRL y E2 en las CEMB durante el desafío con *S. aureus*. Las hormonas reproductivas, como bPRL y E2 (a concentraciones fisiológicas), inducen la expresión de elementos de la RII en las CEMB que son reguladas por las marcas epigenéticas H3K9ac (una marca asociada a la expresión de genes) y H3K9me2 (una marca asociada a la represión de genes) y por la actividad de miRNAs en CEMB, favoreciendo una respuesta anti-inflamatoria y antimicrobiana. Esta respuesta es mantenida cuando *S. aureus* está presente, lo cual indica que bacterias intracelulares como *S. aureus* pueden desregular, a través de la manipulación de los mecanismos epigenéticos, la respuesta montada por las CEMB, lo cual le permite evadir la respuesta montada por la célula hospedera, sobrevivir y persistir en ella.

Además de las células epiteliales, otros componentes de la respuesta inmune innata como los macrófagos, participan de manera importante en el mantenimiento de la salud e integridad de la glándula mamaria (Alhusien *et al*, 2015). Por lo que en el presente trabajo también se exploró el efecto de las hormonas bPRL y E2 (empleándolas las concentraciones fisiológicas usadas en la investigación con las CEMB) en macrófagos bovinos durante el desafío con *S. aureus*. Primero se determinó la MOI en macrófagos y se encontró que una MOI de 10:1 (bacteria: célula) y un tiempo de interacción de 2 h fue el óptimo para llevar a cabo los ensayos de inmunomodulación. Benttencourt y colaboradores (2017) reportaron que una MOI de 10:1 y un tiempo de interacción de 2 h en la línea celular de macrófagos murinos J774, macrófagos THP-1 y en macrófagos derivados de monocitos de humano infectados con *M. tuberculosis*, es el apropiado para evaluar la respuesta inmune de estas células en contra de microorganismo patógenos (Benttencourt *et al*,

2017)). Además, en este mismo trabajo se reportó que bajo estas condiciones, los macrófagos aún se encontraban viables, este efecto fue también corroborado en este trabajo. Establecido la MOI optima, lo siguiente que se realizó fue evaluar el efecto de las hormonas sobre los elementos de la RII en macrófagos desafiados con *S. aureus*. Aquí Mostramos que la PRL y *S. aureus* inducen la expresión y la secreción de TNF- α e IL-6, un efecto similar fue observado en la regulación positiva de la respuesta por-inflamatoria en macrófagos alveolares expuestos a *S. aureus* (Brann, K. R., et al, 2019) o con PRL (Suarez, A. L. P., et al, 2015). Notablemente, esta respuesta pro-inflamatoria fue inhibida en presencia E2, incluso cuando *S. aureus* estuvo presente. Esto indica que E2 inhibe la respuesta pro-inflamatoria inducida por bPRL. Un estudio realizado en macrófagos provenientes de ratones hembra ovariectomizadas y desafiados con *S. aureus* mostró que el perfil pro-inflamatorio fue inhibido cuando se adicionó E2 (Souza *et al*, 2021). Además, estímulos pro-inflamatorios como PRL y *S. aureus* no inducen la expresión y secreción de IL- β , pero estímulos anti- inflamatorios como E2 si promueven la expresión y secreción de IL-1 β . Probablemente esto se deba a que en nuestro modelo de estudio E2 este regulando la leucocidina Panton-Valentine (PVL) de *S. aureus*, un factor de virulencia importante para la expresión de IL-1 β (Younis *et al*, 2005), siendo esta citocina importante en la eliminación bacteriana a través de la activación del inflamosoma (Broz, 2019). Interesantemente, las hormonas disminuyeron la producción de óxido nítrico (NO) en los macrófagos, pero favorecen su producción cuando *S. aureus* está presente. Esto indica que la producción de NO no es dependiente de las hormonas y consistente con que *S. aureus* resiste el estrés nitrosativo a través de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual es inducida por NO (Richardson *et al*, 2008). Además, la regulación negativa de los genes pro-inflamatorios mostrados en este trabajo se pueda deber a la producción de NO, debido a que se ha reportado que el estrés nitrosativo afecta de manera importante factores de transcripción involucrados en la respuesta pro-inflamatoria como JAK/STA y NF- κ B (Sha & Marshall, 2012; Hagman *et al*, 2019). IL-8 es una quimiocina que participa de manera importante en la quimiotaxis de leucocitos durante las infecciones bacterianas (Meniailo *et al*, 2018), aquí se mostró que tanto las hormonas como *S. aureus* promueven la expresión y secreción de IL-

8. Esto es consistente con el hecho de que, en infecciones intramamarias, como la mastitis subclínica, hay un incremento en el número de células somáticas (Alhusien *et al*, 2015). Adicionalmente, *S. aureus* indujo la expresión y secreción de IL-10, similares resultados fueron observados en macrófagos de humano y de ratón derivados de monocitos infectados con *S. aureus*, esto se asoció a la actividad de la LDH bacteriana (Heim *et al*, 2020). Sin embargo, en presencia de las hormonas este efecto no fue observado. Una posible explicación es que estos efectos fueron observados en biopelículas y no en células planctónicas (Heim *et al*, 2020). Notablemente, los efectos debidos a las hormonas no fueron debidos a la señalización del TLR2.

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos como las catelicidinas y las β -defensinas, participan de manera importante en la defensa de la glándula mamaria durante infecciones intramamarias. En este estudio se demostró que E2 induce la expresión del péptido antimicrobiano BNB10; sin embargo, bajo un estímulo pro-inflamatorio como bPRL y *S. aureus*, se reduce la expresión de este péptido en macrófagos bovinos. Este efecto fue similar a lo observado en monocitos y neutrófilos bovinos cuando fueron estimulados con la vitamina D, en donde BNB10 se expresa, mientras que con estímulos pro-inflamatorios como el LPS bacteriano, la expresión de BNB10 fue inhibida (Merriman *et al*, 2015). Probablemente, esto es debido a que la señalización del receptor $ER\alpha$ a través de su interacción con E2 promueve la respuesta antimicrobiana (Medina-Estrada *et al*, 2018). Un efecto similar fue observado para el gene del péptido S100A7.

Con el fin de evaluar los mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la respuesta inmune innata en macrófagos durante el desafío con *S. aureus*, primeramente se evaluó el efecto de las hormonas sobre la expresión de los miRNAs: miR-155, miR-451, miR-146a, miR-21a, miR-23a, miR-30b, Let-7a-5p y miR-7863. De manera importante, bPRL y E2 regulan diferencialmente la expresión de estos miRNAs. Por ejemplo, bPRL regula la expresión de miR-155, mientras que E2 regula la expresión de miR-451, miR-146a, miR-21a. Sorpresivamente, la mezcla hormonal mostró también una expresión diferencial, mientras que miR-155 y miR-451 fueron regulados de manera negativa, miR-146a y miR-21a fueron regulados de manera positiva en los macrófagos desafiados con *S. aureus*. Todos estos efectos

correlacionaron con la modulación de la expresión y secreción de genes pro-inflamatorios, anti-inflamatorios, producción de NO y péptidos antimicrobianos presentados en este trabajo. Asimismo, coinciden con los reportes que resaltan la participación de estos miRNAs en inducir una respuesta inflamatoria moderada y tolerable, que le permite a *S. aureus* tener éxito en sobrevivir dentro de fagocitos profesionales (Liu *et al*, 2012; Schulte *et al*, 2013; Qin *et al*, 2016; Murata *et al*, 2014; Li *et al*, 2016; Tao *et al*, 2019). Interesantemente, mostramos que la expresión de miR-23a fue preferentemente regulado por E2, mientras que miR-30b fue regulado por bPRL. Sin embargo, en conjunto, regularon de manera negativa la expresión de estos miARNs en macrófagos desafiados o no con *S. aureus*. Un efecto similar fue observado en estudios donde se demostró una regulación negativa de la expresión de miR-23a y miR30b durante la maduración del fagosoma en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y *Burkholderia pseudomalle* (Vegh *et al*, 2015; Hu *et al*, 2019). Probablemente, el efecto de la mezcla hormonal contribuye en la inhibición de la maduración del fagosoma a través de la regulación negativa de la expresión de estos miRNAs en este modelo de estudio. Además, en este estudio también se determinó que las hormonas, por separado o en conjunto, inducen la expresión de Let-7a-5p, un miRNA asociado a la regulación positiva de la expresión de genes pro-inflamatorios (Zhou *et al*, 2018). Sin embargo, en este estudio no se observó una correlación entre estos efectos. No obstante, las hormonas en conjunto con *S. aureus*, inhibieron la expresión de este miRNA de igual manera que lo observado en macrófagos desafiados con *S. aureus*. Un efecto similar fue observado en macrófagos THP-1 humanos infectados con variantes de colonia pequeña (SCV) de *Staphylococcus epidermidis*, donde se favoreció la respuesta anti-inflamatoria (Magryś, A., & Bogut, A., 2021). Nuestros resultados conducen a que las hormonas en macrófagos desafiados con *S. aureus* disminuyen la respuesta pro-inflamatoria, lo cual probablemente tenga efecto en el cambio de fenotipo a SCV. Un efecto similar fue encontrado al evaluar la expresión de miR-7863, el cual previamente se propuso ser usado como un marcador de la mastitis (Luoreng *et al*, 2018). Sin embargo, el blanco y los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la respuesta inmune son desconocidos.

Finalmente, en este trabajo se evaluó la participación de las modificaciones

postraduccionales de las histonas como la acetilación global de la histona H3, la marca asociada a la expresión de genes H3K9ac y la marca asociada a la represión de genes H3K9me2. Se mostró que después de 12 de tratamiento, bPRL y E2 inducen la acetilación global de la histona H3 en macrófagos bovinos. Además, esta marca fue mantenida en presencia de *S. aureus*. Notablemente, a las 24 h de tratamiento hormonal en macrófagos desafiados con *S. aureus* esta marca disminuyó ~30%. Además, bajo estas mismas condiciones, a las 12 h de tratamiento la marca epigenética H3K9ac disminuyó ~15%, mientras que las 24 h esta misma marca disminuyó ~50%. Esto indica que los cambios observados son dependientes del tiempo de la interacción entre las células y las hormonas, un efecto similar fue reportado en las CEMB tratadas con bPRL y E2 y desafiadas con *S. aureus* (Salgado-Lora *et al*, 2020). Importantemente estos resultados coinciden con el aumento de la actividad de las HDACs, enzimas encargadas de quitar grupos acetilo de las histonas. Efectos similares fueron observados en macrófagos de humano derivados de monocitos de sangre periférica infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Chandran *et al*, 2015), y en macrófagos de ratón infectados con *Leishmania amazonensis* (Lecoeur *et al*, 2020). Esto indica, que esta marca está participando de manera importante en la regulación de los elementos de la RII; sin embargo, esto debe ser corroborado evaluando el enriquecimiento de esta marca en la región promotora de estos genes mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Notablemente, ningún cambio se observó en los diferentes tiempos de evaluación en la marca represora H3K9me2. En un reciente estudio se reportó que esta marca está implicada en la progresión de la neumonía a través de la regulación de la actividad de la metil transferasa G9, la cual transfiere grupos metilo a la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), promoviendo un fenotipo anti-inflamatorio en los macrófagos alveolares (Lee *et al*, 2022). Probablemente las hormonas regulen de manera negativa la actividad de G9, lo cual podría explicar, en parte, el perfil pro-inflamatorio moderado inducido en los macrófagos bovinos durante el desafío con *S. aureus*. Sin embargo, investigaciones futuras serán necesarias para contestar esta pregunta.

Importantemente, los mecanismo epigenéticos, además de regular la expresión de genes de la respuesta inmune innata de los macrófagos durante

infecciones microbianas, también están involucrados en la regulación de funciones esenciales de estas células como lo es la fagocitosis (Mombelli *et al*, 2011; Gierlikowski & Gierlikowska, 2022). Por ejemplo, la sobreexpresión del miRNA mir-155 inducida por *Pseudomonas aeruginosa* suprime la fagocitosis en macrófagos humanos de medula ósea y en macrófagos murinos RAW264.7 (Yang *et al*, 2014). Además Mombelli y colaboradores (2011) reportaron que inhibidores de HDACs (HDACi) inhiben la capacidad fagocítica de macrófagos de ratón durante la infección con *E. coli* y *S. aureus*, a través de la regulación negativa del receptor fagocítica Msr1, sugiriendo que este efecto está asociado a una hiperacetilación de la histona H3 (Mombelli *et al*, 2011). Investigaciones futuras son necesarias para relacionar los mecanismos epigenéticos inducidos por las hormonas PRL y E2 en macrófagos desafiados con *S. aureus* y la capacidad fagocítica de estas células, debido a que durante infecciones intramamarias como la mastitis subclínica debida a *S. aureus*, la capacidad fagocítica de los macrófagos se ve reducida (Alhusien *et al*, 2015)

Estos resultados permiten proponer un modelo (Fig.15) en el que bPRL y E2 a través de la expresión de miARNs y las marcas H3K9ac y H3K9me2, regulan los elementos de la RII en macrófagos bovinos. No obstante bacterias como *S. aureus* pueden desregular la respuesta inmunológica montada por los macrófagos a través de la modulación de estos mecanismos epigenéticos, lo cual puede explicar, en parte, la evasión del sistema inmune montado por las células hospederas así como su persistencia en ellas.

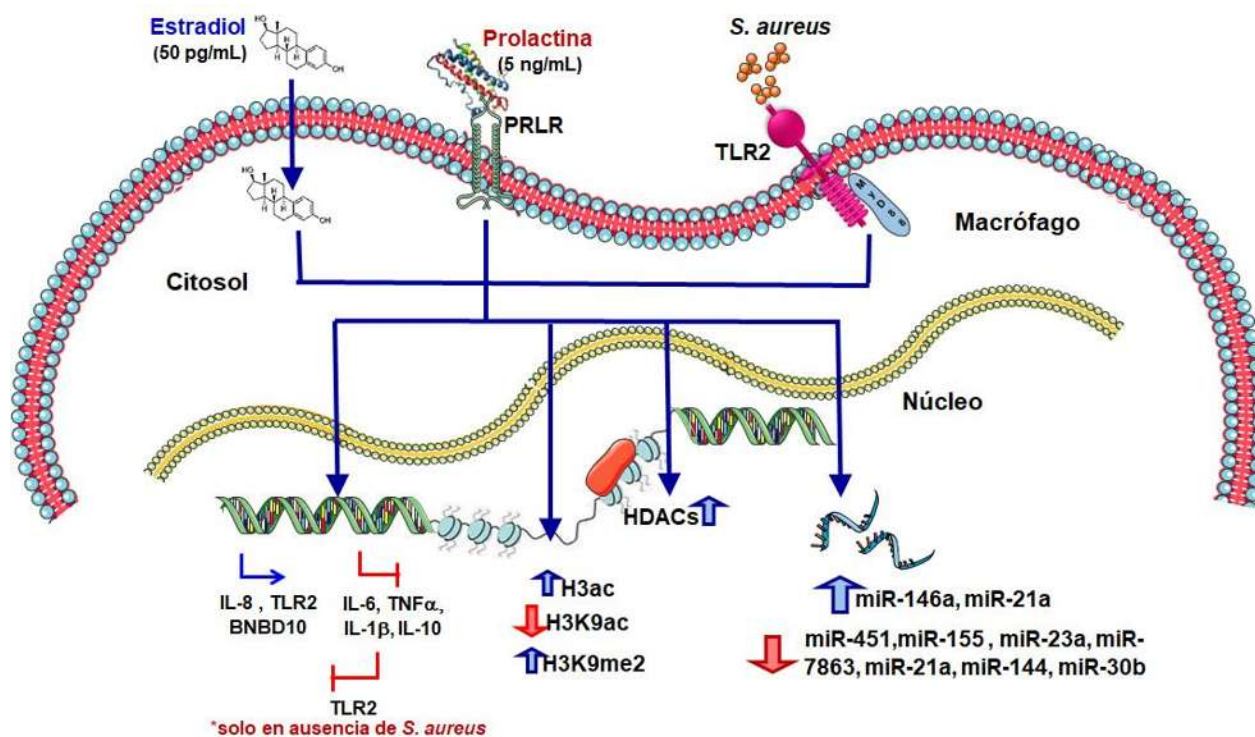


Figura 15. Regulación epigenética inducida por bPRL y E2 en macrófagos bovinos durante el desafío con *S. aureus*. Hormonas reproductivas como bPRL y E2 (a concentraciones fisiológicas) modulan la expresión de elementos de la RII a través de la regulación de mecanismos epigenéticos, como miRNAs y las marcas epigenéticas H3K9ac (una marca asociada a la expresión de genes) y H3K9me2 (una marca asociada a la represión de genes), promoviendo una respuesta pro-inflamatoria moderada y favoreciendo la respuesta antimicrobiana. Además, en presencia de *S. aureus*, estos efectos se mantienen. Notablemente, estos eventos no están relacionados con la señalización del receptor TLR2, debido a que en ausencia de la bacteria, el receptor TLR2 no se expresa. Esto indica que *S. aureus* desregula la respuesta montada por los macrófagos, a través de manipular estas mismas marcas epigenéticas. Esto le permite abatir las funciones microbicidas de los macrófagos permitiéndole sobrevivir y persistir dentro de estas células.

X. Conclusión general

bPRL y E2 regulan diferencialmente la expresión de los elementos de la respuesta inmune innata a través de los mecanismos epigenéticos H3K9ac, H3K9me2 y expresión de miRNAs en células de epitelio mamario bovino y macrófagos bovinos durante el desafío con *Staphylococcus aureus*. Esto explica como las bacterias intracelulares como *S. aureus* pueden evadir la respuesta inmune montada por la glándula mamaria y persistir de manera intracelular contribuyendo de manera importante en la cronicidad de infecciones intramamarias como la mastitis.

XI. Perspectivas

- Investigar los blancos moleculares de los miARNs (Le7-7a-5p, miR-21a, miR-155, miR-7863, miR-451 y miR-146) en las CEMB y macrófagos tratados con prolactina y 17 β -estradiol y desafiadas con *S. aureus*.
- Analizar si la comunicación cruzada entre las vías de señalización de prolactina y 17 β -estradiol tiene un impacto en la regulación de la expresión de los elementos de la RII y de los mecanismos epigenéticos, a nivel de modificaciones globales de la histona H3 y de miARNs en las CEMB y macrófagos tratados con *S. aureus*.
- Evaluar los genes de la RII que son regulados de manera directa por las marcas epigenéticas H3K9ac y H3K9me2 en macrófagos bovinos tratados con prolactina y 17 β -estradiol y desafiados con *S. aureus*, mediante el análisis del enriquecimiento de estas marcas epigenéticas en la región promotora de los genes.
- Evaluar el efecto de las hormonas prolactina y 17 β -estradiol sobre la polarización y la actividad fagocítica de los macrófagos desafiados con *S. aureus*.
- Investigar el papel de las marcas epigenéticas H3K9ac, H3K9me2 y de la expresión de miARNs inducidas por prolactina y 17 β -estradiol, sobre la polarización y la actividad fagocítica de los macrófagos bovinos.

XII. Bibliografía complementaria

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2012). Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.025>.

Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2013). Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/927643>.

Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB reports*, 49(9), 488.

Barone, I., Brusco, L., & Fuqua, S. A. (2010). Estrogen Receptor Mutations and Changes in Downstream Gene Expression and Signaling Estrogen Receptor Mutations. *Clinical Cancer Research*, 16(10), 2702-2708. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.141>.

Bedolla, C. C., & de León, M. P. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 9(4), 1-26.

Bernard, V., Young, J., Chanson, P., & Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(5), 265-275. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*, 19(3), 225-268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>.

Borba, V. V., Zandman-Goddard, G., & Shoenfeld, Y. (2018). Prolactin and autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 9, 73. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00073>.

Boutet, P., Sulon, J., Closset, R., Detilleux, J., Beckers, J. F., Bureau, F., & Lekeux,

- Buitrago, C. G., Ronda, A. C., Boland, A. R. D., & Boland, R. (2006). MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone $1\alpha, 25$ (OH) 2-vitamin D3 in the C2C12 muscle cell line. *Journal of cellular biochemistry*, 97(4), 698-708. <https://doi.org/10.1002/jcb.20639>.
- Bulger, M., & Groudine, M. (2010). Enhancers: the abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Developmental biology*, 339(2), 250-257.
- Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J. Y. J., & Chien, S. (2017). Epigenetic regulation: a new frontier for biomedical engineers. *Annual review of biomedical engineering*, 19, 195-219. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.035>.
- Cheskis, B. J., Greger, J. G., Nagpal, S., & Freedman, L. P. (2007). Signaling by estrogens. *Journal of cellular physiology*, 213(3), 610-617. <https://doi.org/10.1002/jcp.21253>.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.
- Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., & Peterson, C. L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(7), 407-422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>.
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in male physiology. *Physiological reviews*, 97(3), 995-1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>.
- De la Maza, L. M., Pezzlo, M. T., Bittencourt, C. E., & Peterson, E. M. (2020). *Color atlas of medical bacteriology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1309/LMK371AGGMWUPNGC>.
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*, 199(4), 887-896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- Farzaneh, S., & Zarghi, A. (2016). Estrogen receptor ligands: a review (2013– 2015). *Scientia pharmaceutica*, 84(3), 409-427. <https://doi.org/10.3390/scipharm84030409>.
- Feng, M., Chen, J. Y., Weissman-Tsukamoto, R., Volkmer, J. P., Ho, P. Y., McKenna, K. M., ... & Weissman, I. L. (2015). Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2145-2150.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1424907112>.

Ferreira, A. M., Bislev, S. L., Bendixen, E., & Almeida, A. M. (2013). The mammary gland in domestic ruminants: a systems biology perspective. *Journal of Proteomics*, 94, 110-123. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.012>.

Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, 180(6), 1044-1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>.

Flannagan, R. S., Heit, B., & Heinrichs, D. E. (2015). Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 4(4), 826-868. <https://doi.org/10.3390/pathogens4040826>.

Fol, M., Włodarczyk, M., & Druszczyńska, M. (2020). Host epigenetics in intracellular pathogen infections. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4573. <https://doi.org/10.3390/ijms21134573>.

Foster, T. J. (2009). Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Veterinary dermatology*, 20(5-6), 456-470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00825.x>.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 80(4), 1523-1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>.

Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392-404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.

Gordon, S., & Plüddemann, A. (2017). Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC biology*, 15(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>.

Grabiec, A. M., & Potempa, J. (2018). Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Critical reviews in microbiology*, 44(3), 336-350. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1373063>.

Grassin-Delyle, S., Abrial, C., Salvator, H., Brollo, M., Naline, E., & Devillier, P. (2020). The role of toll-like receptors in the production of cytokines by human lung macrophages. *Journal of innate immunity*, 12(1), 63-73. <https://doi.org/10.1159/000494463>.

Grosz, M., Kolter, J., Paprotka, K., Winkler, A. C., Schäfer, D., Chatterjee, S. S., ... & Fraunholz, M. (2014). Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon

phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulín α . *Cellular microbiology*, 16(4), 451-465. <https://doi.org/10.1111/cmi.12233>.

Günther, J., & Seyfert, H. M. (2018, November). The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 40, pp. 555-565). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0701-1>.

H. A., Sivaram, M., ... & Kumar, R. D. (2016). Infrared thermography: A potential noninvasive tool to monitor udder health status in dairy cows. *Veterinary world*, 9(10), 1075. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1075-1081>.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.

Hirata, T., Osuga, Y., Hamasaki, K., Hirota, Y., Nose, E., Morimoto, C., ... & Taketani, Y. (2007). Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *Journal of reproductive immunology*, 74(1-2), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.11.004>.

Horn, J., Stelzner, K., Rudel, T., & Fraunholz, M. (2018). Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(6), 607-624. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009>.

Hu, Q., Cui, X., Tao, L., Xiu, L., Wang, T., & Wang, X. (2014). *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in primary bovine mammary epithelial cells through Fas-FADD death receptor-linked caspase-8 signaling. *DNA and Cell Biology*, 33(6), 388-397.

Ippolito, G., Leone, S., Lauria, F. N., Nicastri, E., & Wenzel, R. P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *International journal of infectious diseases*, 14, S7-S11. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.05.003>.

Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018>.

Jurdziński, K. T., Potempa, J., & Grabiec, A. M. (2020). Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential. *Clinical epigenetics*, 12(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00982-7>.

Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology*, 294(2), 63-69.

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>.

Kowsar, R., Hambruch, N., Liu, J., Shimizu, T., Pfarrer, C., & Miyamoto, A. (2013). Regulation of innate immune function in bovine oviduct epithelial cells in culture: the homeostatic role of epithelial cells in balancing Th1/Th2 response. *Journal of Reproduction and Development*, 59(5), 470-478. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-036>.

Krause, B. J., Castro-Rodríguez, J. A., Uauy, R., & Casanello, P. (2016). Conceptos generales de epigenética: proyecciones en pediatría. *Revista chilena de pediatría*, 87(1), 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.12.002>.

Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 306-321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>.

Kumar, M., Sahu, S. K., Kumar, R., Subuddhi, A., Maji, R. K., Jana, K., ... & Basu, J. (2015). MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF-κB pathway. *Cell host & microbe*, 17(3), 345-356. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.007>.

Kumar, P., & Magon, N. (2012). Hormones in pregnancy. *Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association*, 53(4), 179. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.107549>.

Lahouassa, H., Moussay, E., Rainard, P., & Riollet, C. (2007). Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, 38(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.04.006>.

Lai, Y. C., Lai, Y. T., Rahman, M. M., Chen, H. W., Husna, A. A., Fujikawa, T., ... & Miura, N. (2020). Bovine milk transcriptome analysis reveals microRNAs and RNU2 involved in mastitis. *The FEBS Journal*, 287(9), 1899-1918. <https://doi.org/10.1111/febs.15114>.

Larsen, S. B., Cowley, C. J., & Fuchs, E. (2020). Epithelial cells: liaisons of immunity. *Current opinion in immunology*, 62, 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.004>.

Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>.

- Lee, K. Y. (2019). M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Med Biol Sci Eng*, 2(1), 1-5. <https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1>.
- Lemay, D. G., Pollard, K. S., Martin, W. F., Freeman Zadrowski, C., Hernandez, J., Korf, I., ... & Rijnkels, M. (2013). From genes to milk: genomic organization and epigenetic regulation of the mammary transcriptome. *PloS one*, 8(9), e75030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075030>.
- Lesmeister, M. J., Jorgenson, R. L., Young, S. L., & Misfeldt, M. L. (2005). 17Beta-estradiol suppresses TLR3-induced cytokine and chemokine production in endometrial epithelial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-74>.
- Lopez, M., & Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(8), 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.003>.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine*, 339(8), 520-532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- Majumdar, A., & Mangal, N. S. (2015). Hyperprolactinemia. *Principles and practice of controlled ovarian stimulation in ART*, 319-328. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1686-5_29.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- Mehta, S., & Jeffrey, K. L. (2015). Beyond receptors and signaling: epigenetic factors in the regulation of innate immunity. *Immunology and cell biology*, 93(3), 233-244. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.101>.
- Montazer-Torbati, M. B., Hue-Beauvais, C., Droineau, S., Ballester, M., Coant, N., Aujean, E., ... & Devinoy, E. (2008). Epigenetic modifications and chromatin loop organization explain the different expression profiles of the Tbrg4, WAP and Ramp3 genes. *Experimental cell research*, 314(5), 975-987. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.001>.
- Monteiro, R., Teixeira, D., & Calhau, C. (2014). Estrogen signaling in metabolic

inflammation. *Mediators of inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/615917>.

Moredo, F., Larsen, A. E., & Stanchi, N. O. (2018). Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. *Series: Libros de Cátedra*. <https://doi.org/10.35537/10915/74878>.

Nadkarni, S., & McArthur, S. (2013). Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Current opinion in pharmacology*, 13(4), 576-581. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.05.007>.

Nguyen, M., Boutinaud, M., Pétridou, B., Gabory, A., Pannetier, M., Chat, S., ... & Devinoy, E. (2014). DNA methylation and transcription in a distal region upstream from the bovine AlphaS1 casein gene after once or twice daily milking. *PLoS One*, 9(11), e111556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111556>.

Oakes, S. R., Rogers, R. L., Naylor, M. J., & Ormandy, C. J. (2008). Prolactin regulation of mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 13(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9069-5>.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.

Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H., & López-Meza, J. E. (2009). Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microbial pathogenesis*, 47(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.04.006>.

Boutet, P., Sulon, J., Closset, R., Detilleux, J., Beckers, J. F., Bureau, F., & Lekeux, P. (2007). Prolactin-induced activation of nuclear factor κ B in Bovine mammary epithelial cells: role in chronic mastitis. *Journal of dairy science*, 90(1), 155-164. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72617-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72617-6).

Patel, M. V., Fahey, J. V., Rossoll, R. M., & Wira, C. R. (2013). Innate Immunity in the Vagina (Part I): Estradiol Inhibits HBD 2 and Elafin Secretion by Human Vaginal Epithelial Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(5), 463-474. <https://doi.org/10.1111/aji.12078>.

Pollitt, E. J., Szkuta, P. T., Burns, N., & Foster, S. J. (2018). *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS pathogens*, 14(6), e1007112.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>.

Prajsnar, T. K., Hamilton, R., Garcia-Lara, J., McVicker, G., Williams, A., Boots, M.,... & Renshaw, S. A. (2012). A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *Staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cellular microbiology*, 14(10), 1600-1619. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>.

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., & Sklar, L. A. (2007). GPR30: AG protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology*, 265, 138-142.

Rainard, P., & Riollot, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research*, 37(3), 369-400. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.010>.

Rijnkels, M., Freeman-Zadrowski, C., Hernandez, J., Potluri, V., Wang, L., Li, W., & Lemay, D. G. (2013). Epigenetic modifications unlock the milk protein gene loci during mouse mammary gland development and differentiation. *PloS one*, 8(1), e53270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053270>.

S. A., Mardani, F., ... & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6425-6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.

Simpson, E., & Santen, R. J. (2015). Celebrating 75 years of oestradiol. *J Mol Endocrinol*, 55(3), T1-T20. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0128>.

Sathiyabarathi, M., Jeyakumar, S., Manimaran, A., Jayaprakash, G., Pushpadass, Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, Sodhi, A., & Tripathi, A. (2008). Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages in vitro: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF-κB. *Cytokine*, 41(2), 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.007>.

Strandberg, Y., Gray, C., Vuocolo, T., Donaldson, L., Broadway, M., & Tellam, R. (2005). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine*, 31(1), 72-86. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.02.010>.

Swanson, J. A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(8), 639-649. <https://doi.org/10.1038/nrm2447>.

Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A., & Kragelund, B. B. (2005).

Solution structure of human prolactin. *Journal of molecular biology*, 351(4), 810-823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042>.

Téllez-Pérez, A. D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2012). Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.007>.

Thomas, M. P., & Potter, B. V. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 137, 27-49. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.12.014>.

Thwaites, G. E., & Gant, V. (2011). Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nature reviews microbiology*, 9(3), 215-222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2508>.

Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C. F., Hüfner, M.,... & Clapp, C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(10), R1193-R1203. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00256.2015>.

Truchet, S., & Honvo-Houéto, E. (2017). Physiology of milk secretion. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 367-384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>.

Tucker, A. R., Salazar, N. A., Ayoola, A. O., Memili, E., Thomas, B. N., & Morenikeji, O. B. (2021). Regulatory network of miRNA, lncRNA, transcription factor and target immune response genes in bovine mastitis. *Scientific Reports*, 11(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01280-9>.

Vanselow, J., Yang, W., Herrmann, J., Zerbe, H., Schuberth, H. J., Petzl, W., ... & Seyfert, H. M. (2006). DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the α S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of α S1-casein synthesis during acute mastitis. *Journal of molecular endocrinology*, 37(3), 463-477. <https://doi.org/10.1677/jme.1.02131>.

Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*, 33, 643-675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>.

- Villaggio, B., Soldano, S., & Cutolo, M. (2012). 1, 25-dihydroxyvitamin D3 downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages. *Clin Exp Rheumatol*, 30(6), 934-938. PMID: 23253631.
- Vlasova, A. N., & Saif, L. J. (2021). Bovine immunology: Implications for dairy cattle. *Frontiers in Immunology*, 12, 643206. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643206>.
- Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>.
- Waddington, C. H. (1940). The genetic control of wing development in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 41, 75-113. <https://doi.org/10.1007/BF02982977>.
- Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 129(7), 2619-2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>.
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *The veterinary journal*, 192(2), 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>.
- Yan, M. S. C., Matouk, C. C., & Marsden, P. A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology*, 109(3), 916-926. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00131.2010>.
- Yang, X., Guo, Y., He, J., Zhang, F., Sun, X., Yang, S., & Dong, H. (2017). Estrogen and estrogen receptors in the modulation of gastrointestinal epithelial secretion. *Oncotarget*, 8(57), 97683. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18313>.
- Zbinden, C., Stephan, R., Johler, S., Borel, N., Bünter, J., Bruckmaier, R. M., & Wellnitz, O. (2014). The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PloS one*, 9(1), e87374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087374>.