



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GPR41 Y GPR43 EN LA
INTERNALIZACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN CÉLULAS DE EPITELIO
MAMARIO BOVINO TRATADAS CON ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA**

Tesis que Presenta:

MVZ. SUSANA TENA HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Área temática: Biotecnología Pecuaria

Asesor: Dr. Joel Edmundo López Meza

Co-asesora: Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa



Morelia, Michoacán. Marzo 2012



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.5), FOMIX (MICH-2009-C05-115910) y CONACyT (CB-2008-101451 y beca 239204).



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Mastitis bovina	13
2.1.1 Etiología de la mastitis bovina	13
2.1.2 Mecanismo de invasión de <i>Staphylococcus aureus</i> en las CEMB	16
2.2 Ácidos grasos (AG)	20
2.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	20
2.3.1 Propiedades de los AGCC	22
2.4 Características de los receptores acoplados a proteínas G (GPR's)	23
2.4.1 Regulación de los GPR's	26
2.5 Receptores de ácidos grasos de cadena corta	28



3. ANTECEDENTES	33
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos particulares	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
	38
6.1 Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)	
6.2 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
6.3 Extracción de ARN total y análisis de la expresión de genes de los receptores GPR41 y GPR43	38
6.4 Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> en el crecimiento de <i>S. aureus</i>	39
6.5 Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> en la viabilidad de las CEMB	40
6.6 Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> en la invasión de <i>S. aureus</i> sobre las CEMB	40
6.7 Análisis estadístico	41



7. RESULTADOS	42
7.1 Análisis de la expresión de genes de los receptores GPR41 y GPR43	42
7.2 Análisis de la participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la endocitosis de <i>S. aureus</i>	47
7.2.1 Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> en la viabilidad de las CEMB	47
7.2.2 Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> en el crecimiento de <i>S. aureus</i>	49
7.2.3 Participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la invasión de <i>S. aureus</i>	49
7.2.4 Análisis de la expresión del receptor GPR43 en presencia de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i>	51
	52
8. DISCUSIÓN	
9. CONCLUSIÓN	58
10. BIBLIOGRAFÍA	59



ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática del establecimiento de la mastitis bovina por <i>S. aureus</i>	15
Figura 2. Mecanismo propuesto para la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB	19
Figura 3. Estructura de un receptor acoplado a proteínas G	25
Figura 4. Esquema representativo de la activación de las proteínas G	29
Figura 5. Efecto del acetato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB	43
Figura 6. Efecto del propionato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB	44
Figura 7. Efecto del butirato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB	44
Figura 8. Efecto del hexanoato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB	46
Figura 9. Efecto del octanoato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB	46
Figura 10. Efecto de la toxina PTX de <i>Bordetella pertussis</i> sobre la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino	48



Figura 11. Efecto de la toxina PTX de <i>B. pertussis</i> sobre la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino.	48
Figura 12. Efecto de la toxina PTX de <i>B. pertussis</i> sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i>	49
Figura 13. Evaluación de la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB en presencia de la toxina PTX de <i>B. pertussis</i> .	50
Figura 14. Evaluación de la invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB en presencia de la toxina PTX de <i>B. pertussis</i> .	51
Figura 15. Efecto de toxina PTX de <i>B. pertussis</i> en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB.	51



ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Moléculas involucradas en la adherencia y fagocitosis de <i>S. aureus</i>	18
Tabla 2. Características de los receptores de AG en humanos	30
Tabla 3. Internalización de <i>S. aureus</i> en CEMB tratadas con AGCC	34
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	39



RESUMEN

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades más costosas dentro de la ganadería lechera. Uno de los principales agentes patógenos causantes de esta enfermedad es *Staphylococcus aureus*. Algunas de las cepas tienen la capacidad de internalizarse y sobrevivir en diversos tipos celulares, entre ellos las células de epitelio mamario bovino (CEMB). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) cuentan con diversas propiedades entre las que destacan sus efectos inmunorreguladores y antiinflamatorios. Recientemente se demostró que los AGCC reconocen receptores en la membrana de las CEMB, los cuales fueron denominados GPR41 y GPR43 (receptores acoplados a proteínas G). Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo demostraron que diversas sales de AGCC (propionato, butirato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Partiendo de ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino tratadas con sales de AGCC (acético, propiónico, butírico, hexanoico y octanoico) e infectadas con *S. aureus*. En ninguna de las condiciones y bajo ningún tratamiento se logró identificar algún producto de amplificación para el receptor GPR41. Sin embargo, se observó que la infección fue capaz de inducir la expresión del receptor GPR43. Además, los cinco AGCC evaluados (a diferentes concentraciones) inducen la expresión del receptor GPR43. En la mayoría de los tratamientos, a excepción del hexanoato, los AGCC revierten el efecto inductor de la infección, esto de una manera dependiente de la concentración. Por otro lado, la toxina PTX de *Bordetella pertussis* (200 ng/ml) no afectó el crecimiento bacteriano ni la viabilidad de las CEMB (4 h). Los ensayos de invasión de *S. aureus* en las CEMB mostraron que el tratamiento con 200 ng/ml de la toxina PTX inhibe la endocitosis de la bacteria hasta en un 84%. También se determinó el efecto de la toxina PTX en la modulación de la expresión del gen del receptor GPR43 en presencia de *S. aureus*. Se observó que la toxina PTX induce la expresión del receptor GPR43. Sin embargo, la infección en conjunto con la toxina disminuye la expresión de este receptor, con respecto a las células infectadas. Los resultados obtenidos



demonstraron que los AGCC regulan la expresión del receptor GPR43 en las CEMB, no así la del receptor GPR41. La infección induce la expresión del ARNm del receptor GPR43; sin embargo, los AGCC revierten el efecto inductor. En conclusión, el receptor GPR43 tiene una participación directa en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB.



1. INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad que afecta al ganado bovino lechero, provocando una disminución en la calidad y la cantidad de la leche producida, por ello es considerada una de las enfermedades más costosas, generando pérdidas económicas de hasta un 11% del valor total de la producción, en especial en las regiones con una producción láctea intensiva (Wolter *et al.*, 2004; Zhao y Lacasse, 2007).

Esta patología se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, la cual es una respuesta ante el ataque de microorganismos patógenos (Dos Santos *et al.*, 2002; Field, 2003). Diversos estudios han demostrado que *S. aureus* es el patógeno contagioso más importante asociado con la mastitis; además, se sabe que hay cepas de esta bacteria que tienen la capacidad de invadir y sobrevivir en el interior de la célula epitelial de la glándula mamaria (Kerro-Dego *et al.*, 2002).

Existen factores que favorecen la incidencia de esta enfermedad, uno de ellos es el periodo de lactancia, en donde las células epiteliales de la glándula mamaria y los patógenos causantes de la infección están en contacto directo con los componentes de la leche, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Burton *et al.*, 2003). En los bovinos los AGCC son producidos por la fermentación anaeróbica bacteriana de la fibra dietética en el rumen y algunos de ellos, forman parte de los componentes de la leche (butirato, hexanoato y octanoato) (Bergman, 1990; Cummings *et al.*, 1997). Los AGCC básicamente se han estudiado como fuente de nutrientes. Sin embargo, ahora se conoce que cuentan con propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas y anti-inflamatorias (Miller *et al.*, 2005). En cuanto a las propiedades anti-inflamatorias, se sabe que algunos AGCC (butirato) inhiben la activación de factores transcripcionales, como el NF- κ B (factor nuclear kappa B), el cual regula diversos genes involucrados en la respuesta inflamatoria (Inan *et al.*, 2000).

Con respecto a la participación de los AGCC en procesos de interacción patógeno-hospedero, se tienen diversos reportes de su efecto antimicrobiano



contra una gran variedad de microorganismos patógenos como: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, entre otras (Van Immerseel *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2005; Solis de los Santos *et al.*, 2008). Nuestro equipo de trabajo demostró que diversas concentraciones de AGCC (butirato, propionato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* en cultivos primarios de células de epitelio mamario bovino (CEMB) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012).

A medida que comenzaron a evaluarse propiedades más allá de las nutricionales, se identificaron en humanos dos receptores para los AGCC, los cuales fueron denominados GPR41 y GPR43 (receptores acoplados a proteínas G) (Sawzdargo *et al.*, 1997; Brown *et al.* 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2003). El receptor GPR41, fue relacionado principalmente con el tejido adiposo, ya que es expresado en los adipocitos y tiene una participación en la adipogénesis (Brown *et al.*, 2003). Por su parte, el receptor GPR43 fue detectado en diversas células del sistema inmune lo que sugiere un papel en la activación de las células de la respuesta inmune y en la diferenciación celular (Kebede *et al.*, 2010).

Recientemente se demostró que el genoma de los bovinos contiene genes similares a los receptores GPR41 y GPR43 reportados en humanos (>75% de identidad). Estos receptores fueron detectados en una variedad de tejidos de bovino y se demostró que responden al tratamiento con AGCC (Wang *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009). Estudios posteriores en bovinos revelaron que la activación de estos receptores por sus respectivos ligandos está acoplada a la generación de IP₃, seguida de un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular, a través de la activación de la fosfolipasa C, además de la inhibición de la acumulación de AMPc. De esta manera se activan las vías de p38 (MAPK) y HSP27 (proteína de choque térmico) (Yonezawa *et al.*, 2009).

Tomando en cuenta los datos anteriores la mastitis bovina es una patología de la glándula mamaria que involucra un proceso inflamatorio y que ésta se presenta con mayor incidencia durante el período de lactancia, en el cual las



CMEB se encuentran en contacto con los componentes de la leche, entre ellos los AGCC, los cuales poseen propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas y antiinflamatorias. Además, se tienen antecedentes de que estos AGCC reconocen y activan a los receptores GPR41 y GPR43 en la membrana plasmática de la célula, los cuales fueron identificados en bovinos. Adicionalmente, se ha demostrado que los AGCC inhiben la internalización de bacterias causantes de mastitis bovina en las CMEB. Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino tratadas con sales de AGCC (acético, propiónico, butírico, hexanoico y octanoico) e infectadas con *S. aureus*. Y se analizó su participación en la endocitosis de *S. aureus*.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades más costosas del ganado lechero en la mayor parte del mundo. Esta patología se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria y viene acompañada de alteraciones del tejido glandular, por lo que ocasiona un bajo rendimiento en la producción de leche, así como un cambio en las características organolépticas (Horter *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 2005). Las pérdidas económicas son atribuidas a la disminución en la calidad y cantidad de la leche, al tratamiento con antibióticos, al incremento del tiempo y trabajo de ordeño, al secado prematuro, a la pérdida de la condición corporal, al alargamiento del intervalo parto-parto y a la muerte de los animales (Molk, 2000). Se considera que esta enfermedad representa el 70% de los gastos totales para los ganaderos lecheros, resultando en una pérdida estimada de 35 mil millones de dólares cada año (Dos Santos *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002).

De acuerdo a su duración se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. La mastitis clínica se caracteriza por la inflamación de uno o varios cuartos de la ubre, se puede presentar enrojecimiento, hinchazón, dolor, endurecimiento y reducción en la producción de leche. Por su parte, en la mastitis subclínica la ubre no muestra signos de inflamación, comúnmente es de larga duración, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche y afecta la calidad de la misma; además, puede servir como un reservorio para infectar a otros animales (Heringstad *et al.*, 2000; Valera *et al.*, 2005). Sin embargo, en este tipo de mastitis la infección puede ser detectada por el aumento en el conteo de las células somáticas (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

2.1.1 Etiología de la mastitis bovina

La mastitis bovina puede ser causada por: lesiones físicas, irritaciones químicas o la presencia de agentes infecciosos. Dentro de estos últimos puede ser



originada por bacterias, hongos, entre otros (Zhao y Lacasse, 2007). Los microorganismos ambientales comúnmente aislados incluyen a: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Escherichia coli*; mientras que los contagiosos incluyen a: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma spp* (Kerro-Dego *et al.*, 2002). El 75% de los casos es originado por bacterias Gram positivas, principalmente especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Scaramelli *et al.*, 2005). Durante la infección, el tejido de la glándula mamaria es dañado por las bacterias y sus productos, algunos de ellos, como las toxinas destruyen las membranas celulares. Adicionalmente, se sabe que hay cepas que pueden invadir y multiplicarse dentro de las células epiteliales de la glándula mamaria (Zhao y Lacasse, 2007).

La ubre bovina está constituida por cuatro glándulas mamarias. Es una glándula exocrina, en donde la leche es sintetizada por células especializadas agrupadas en alvéolos y luego excretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos (Angulo *et al.*, 2008). Al ser un órgano susceptible al ataque constante de patógenos cuenta con diversos mecanismos de defensa, entre los que se encuentran: los mecanismos anatómicos, inmunológicos y los celulares. Estos a su vez, pueden ser clasificados en: inmunidad innata e inmunidad específica. La primera de ellas, es una respuesta no específica que se activa rápidamente en el sitio de la infección (Rainard y Riollet, 2006). Cuando la infección persiste, aumenta la cantidad de células somáticas (macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células dendríticas) en la leche (Sordillo y Streicher, 2002). En caso de que el patógeno sea capaz de evadir estas defensas, se pone en marcha el sistema inmune específico, en donde ocurre la presentación de antígenos. El reconocimiento de factores patogénicos para su eliminación posterior está mediado por macrófagos, ciertas poblaciones linfocíticas e inmunoglobulinas. La infección se establece luego de que la bacteria entra a la glándula mamaria vía el canal del pezón (Fig. 1). Una vez que la bacteria supera las defensas anatómicas, esta debe evadir los mecanismos de defensa celular y humoral para que la infección se establezca (Sordillo y Streicher, 2002).

Una vez que la bacteria supera las defensas anatómicas, esta debe evadir los mecanismos de defensa celular y humoral para que la infección se establezca. Cuando la infección persiste, aumenta la cantidad de células somáticas (macrófagos, neutrófilos, linfocitos y células dendríticas) en la leche (Sordillo y Streicher, 2002).

Si la infección no es eliminada, los niveles bacterianos en la glándula mamaria aumentan hasta un punto donde sus toxinas o reacción inducida en el huésped comienzan a dañar el epitelio mamario (Sordillo y Streicher, 2002).

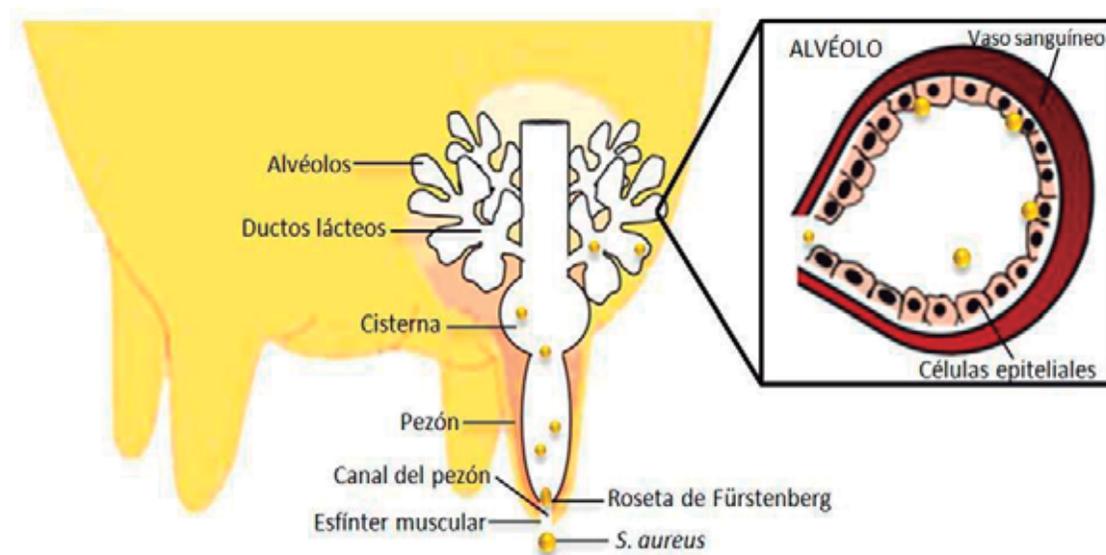


Figura 1. Representación esquemática del establecimiento de la mastitis bovina por *S. aureus*. Una vez que la bacteria logra evadir los mecanismos de defensa anatómicos, comienza a multiplicarse a lo largo del canal del pezón. *S. aureus* es capaz de evadir los mecanismos de defensa celular y humoral, lo que le permite llegar a los alvéolos, donde entra en contacto con las CEMB (Modificada de Sordillo y Streicher, 2002; Frandson, 2009).

En conjunto a la activación de la respuesta inmune durante la mastitis se presenta una reacción inflamatoria, donde los macrófagos producen citocinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1 beta (IL-1 β). La interacción de TNF- α e IL-1 β con las células endoteliales promueve el

reclutamiento de células mononucleares al sitio de infección debido a que inducen la expresión de adhesinas como: selectinas (E y P), ICAM-1 (moléculas de adhesión intercelular 1) y ECAM-1 (moléculas de adhesión leucocitaria endotelial 1) (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

2.1.2 Mecanismo de invasión de *Staphylococcus aureus* en las CEMB

Uno de los principales agentes microbianos frecuentemente aislados en la mastitis bovina es *Staphylococcus aureus*, un patógeno oportunista que causa una amplia variedad de infecciones en humanos (síndrome de choque tóxico, osteomielitis, neumonía, artritis séptica y endocarditis) (Barkema *et al.*, 2006) y en animales (Brouillete *et al.*, 2003; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Pertenece a la familia Micrococcaceae, es una bacteria Gram-positiva de 0.8 - 1 μm de diámetro y es un organismo facultativo intracelular. A diferencia de otras especies de *Staphylococcus* es positivo a la prueba de coagulasa y sus colonias presentan un pigmento amarillo-dorado (Lowy, 1998).

El principal reservorio de *S. aureus* causante de mastitis bovina son los cuartos de la glándula mamaria. Esta bacteria produce toxinas que destruyen membranas celulares, las cuales causan un daño directo en el tejido productor de leche (Trinidad *et al.*, 1990). Esta bacteria se transmite entre el ganado, con mayor frecuencia durante el proceso de ordeño (López-Meza *et al.*, 2006).

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que algunas de las cepas de *S. aureus* son capaces de adherirse y ser internalizadas por una gran variedad de tipos celulares como: células endoteliales, epiteliales, queratinocitos, fibroblastos y osteoblastos (Bayles *et al.*, 1998; Menzies *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2001). Esto les permite sobrevivir por largos periodos de tiempo, permitiéndole evadir la respuesta inmune y el tratamiento con antibióticos (Bayles *et al.*, 1998). Dentro de los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentran productos de secreción, componentes estructurales y mecanismos que atribuyen habilidades a la bacteria para sobrevivir y causar mastitis (Kerro-Dego *et*



al., 2002). La acción combinada de diversos factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección, se han dividido clásicamente en dos grandes grupos: componentes superficiales y toxinas y enzimas extracelulares (tabla 1) (Mandell *et al.*, 2000). Las proteínas de superficie, como: la proteína A, la proteína de unión a fibronectina, el fibrinógeno, la elastina y la colágena promueven la adherencia del tejido dañado y ayudan a mantener la infección. Además, cuenta con proteínas que ayudan a evitar la respuesta inmune y enzimas como coagulasa, catalasas, proteasas, nucleasas, lipasas, entre otras. La síntesis de estas proteínas depende de la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria (Lowy, 1998; Kerro-Dego *et al.*, 2002).

La invasión de las CEMB por *S. aureus* se realiza a través de un proceso denominado “zipper”, el cual involucra la participación de elementos del citoesqueleto de la célula epitelial, receptores específicos y sus ligandos correspondientes (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Por ejemplo, la proteína de unión a fibronectina de *S. aureus* se une a la fibronectina (Fn), este complejo (FnBP-Fn) es reconocido por la integrina $\alpha 5\text{-}\beta 1$ (receptor localizado en la célula hospedera). Una vez que la bacteria se une a la célula hospedera induce el reclutamiento de proteínas estructurales como la zyxina, tensina y vinculina; además, de enzimas de señalización como: la tirosina cinasa (Scr) y la cinasa de adhesión focal (FAK), al sitio de adhesión de la bacteria (Fig. 2) (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Sinha y Herrman, 2005). Después de la internalización, se ha observado que la expresión del gen regulador accesorio (*agr*) activa la producción de hemolisinas entre otras toxinas, para que se produzca la ruptura del endosoma y *S. aureus* pueda ser liberada hacia el citoplasma y multiplicarse (Qazi *et al.*, 2001; Shompole *et al.*, 2003).



Tabla 1. Moléculas involucradas en la adherencia y fagocitosis de *S. aureus*

Factores asociados con la virulencia de <i>S. aureus</i>
Componentes superficiales
- Polisacárido capsular
- Polisacárido extracelular
- Proteínas superficiales <ul style="list-style-type: none">• Proteínas de unión a colágeno (Cna)• Proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB)• Proteínas de unión a fibrinógeno (ClfA y ClfB)• Proteína A (Spa)
Toxinas y enzimas extracelulares
- Toxinas con actividad sobre membranas <ul style="list-style-type: none">• Toxinas o hemolisinas α, β, γ, δ• Leucocidina
- Toxinas con actividad de superantígenos <ul style="list-style-type: none">• Enterotoxinas (A-E y G-J)• Toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1)• Toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B)
- Enzimas extracelulares <ul style="list-style-type: none">• Estafiloquinasa• Coagulasa• Hialuronidasa• Lipasas• Proteasas• ADNasa termoestable o termonucleasa• Catalasa

(Modificada de Mandell *et al.*, 2000; Kerro-Dego *et al.*, 2002)

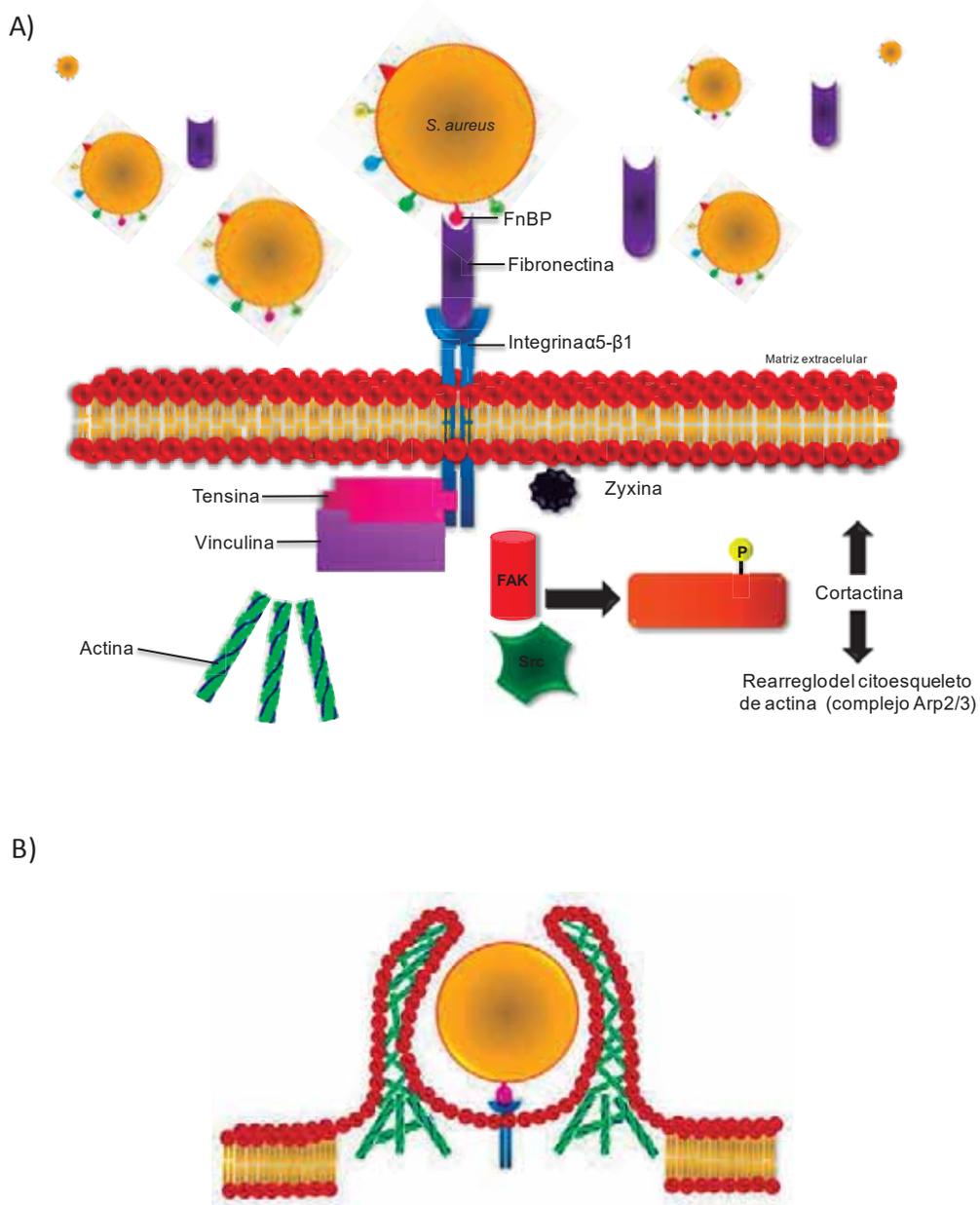


Figura 2. Mecanismo propuesto para la invasión de *S. aureus* en las CEMB. A) La bacteria se une a la fibronectina (Fn) por medio de las proteínas de unión a fibronectina (FnBP), una vez formado el complejo Fn-FnBP se une a un receptor de la célula hospedera denominado receptor integrina $\alpha 5$ - $\beta 1$. B) La unión del ligando al receptor estimula la polimerización de actina y la endocitosis, mediante la formación de una vacuola que es transportada al interior de la célula (Modificada de Sinha y Herrman, 2005).

2.2 Ácidos grasos (AG)

Los AG son ácidos carboxílicos orgánicos de cadena alifática, los cuales desempeñan actividades fisiológicas muy importantes ya que forman parte de los componentes de las membranas biológicas, también se encuentran dentro de la estructura de los triacilgliceroles (principales formas de almacenamiento energético), además de que algunos derivados de AG funcionan como hormonas y mensajeros intracelulares (Nelson *et al.*, 2005).

Los AG están estructurados por una cadena hidrocarbonada (de 2 a 36 carbonos) y un grupo carboxilo terminal (-COOH). Son moléculas anfipáticas, debido a que su cadena hidrocarbonada es hidrófoba y el grupo carboxilo hidrófilo. Los AG más abundantes tienen números pares de átomos de carbono en una cadena sin ramificar entre 12 y 24 carbonos, esto se debe a la forma de síntesis de estos compuestos, que utilizan la condensación de unidades de acetato (2 carbonos) (Nelson *et al.*, 2005). De acuerdo a la longitud de su cadena pueden dividirse en ácidos grasos de cadena corta (2-4 carbonos), cadena media (6-10 carbonos) y cadena larga a partir de 16 carbonos (Cuvelier *et al.*, 2004).

Los AG que no contienen dobles enlaces en su molécula se denominan saturados, y los que contienen dobles enlaces se les conoce como insaturados. Los ácidos grasos insaturados (AGI) pueden clasificarse atendiendo a la posición del primer doble enlace contando desde el grupo metilo terminal. Para una misma fórmula química, los AGI pueden tener múltiples isómeros de naturaleza estructural de acuerdo a la localización de los dobles enlaces en la cadena; y espacial, de acuerdo al número de hidrógenos unidos a los átomos de carbono del doble enlace (Nelson *et al.*, 2005).

2.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

En humanos, los AGCC son producidos principalmente por la fermentación anaerobia de la fibra en el intestino grueso por diversos microorganismos, mientras que en los bovinos se producen en el rumen (Bergman, 1990).



En los bovinos los carbohidratos constituyen la mayor parte de la ración alimenticia, una vez que estos llegan al rumen son sometidos a diversos procesos digestivos, en donde se obtiene como producto final los AGCC, también conocidos como AGVs (ácidos grasos volátiles) (Zavaleta, 2003). Generalmente son considerados como AGVs: el ácido fórmico, el acético, el propiónico, el butírico, el isobutírico, el 2-metilbutírico, el valérico, el isovalérico, el caproico y el caprílico. Los ácidos acético, propiónico y butírico son los que se producen en mayor cantidad durante la fermentación en el rumen (Zavaleta, 2003), de los cuales el propiónico es el principal precursor para la producción de glucosa en rumiantes (Sa'ad *et al*, 2010). Estos AGCC se absorben a través de la pared del rumen. La mayor parte del acetato y el propionato son transportados al hígado; sin embargo, la mayoría del butirato se convierte en la pared del rumen a una cetona denominada β -hidroxibutirato (Angulo *et al.*, 2008).

Durante la etapa de lactancia la glándula mamaria es capaz de sintetizar AG. Estos pueden ser tomados del torrente sanguíneo o ser sintetizados *de novo* en las células epiteliales mamarias (Parodi, 2004). Los AGCC (2-6 carbonos) y cadena media (10-14 carbonos) se obtienen principalmente de la síntesis *de novo* a partir de acetato y 3-hidroxibutirato, los cuales viajan en la sangre provenientes de la fermentación en el rumen. Las reacciones son catalizadas por las enzimas acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintetasa (FAS) (Angulo, 2008). En la glándula mamaria bovina es posible la desaturación, pero no la elongación de cadenas de más de 16 carbonos, esto se debe a que no existen las enzimas necesarias, por lo tanto los AG de 18 o más carbonos (excepto los que se originan como producto de la desaturación tales como el oleico y el ruménico) proceden de lípidos circulantes en sangre (Chilliard, 2000). Los AG de la leche pueden ser obtenidos por medio de dos vías: la actividad antimicrobial en el rumen o a través de la ingesta de alimentos (Parodi, 2004).

La grasa de la leche bovina está conformada aproximadamente por 98% de triacilglicéridos, menos del 2% de fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol, además de pequeñas cantidades de ácidos grasos libres (Jensen *et al.*, 2002).



Aproximadamente 25% de los ácidos grasos de la leche son monoinsaturados, 2.3% son poliinsaturados y 2.7% son ácidos grasos trans (Lindmark, 2008).

2.3.1 Propiedades de los AGCC

Los AGCC participan en diversas actividades como: nutrientes para el epitelio del colon, moduladores del pH colónico y otras funciones asociadas con el transporte de iones; además, de regular la proliferación, diferenciación y expresión de genes (Miller *et al.*, 2005). También se ha reportado que el butirato y el propionato inhiben a la histona desacetilasa (HDCA), por lo que se sugiere que esta inhibición podría estar bloqueando el proceso inflamatorio en modelos de enfermedades severas como: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y endotoxemia (Huang, 2006).

En células epiteliales colónicas humanas se demostró que el butirato tiene un papel antiinflamatorio, ya que inhibe la activación de NF- κ B, el cual regula diversos genes involucrados en la respuesta inflamatoria como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, ICAM-1, entre otros (Inan *et al.*, 2000). Estudios realizados en neutrófilos, mostraron que la concentración de butirato es esencial, ya que ésta puede retrasar (1 mM) o inducir la apoptosis (5 mM) por medio de la expresión de la caspasa-3 (Stehle *et al.*, 2001).

Diversos estudios han demostrado que los AGCC presentes en la leche (ej. butírico, hexanoico y octanoico) poseen propiedades antimicrobianas hacia diferentes tipos de bacterias (Sun *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002). Un ejemplo de ello, es el octanoato, cuando éste se utiliza a concentraciones de 50 y 100 mM, tiene un efecto bactericida contra los principales agentes patógenos causantes de mastitis como: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* y *E. coli* (Nair *et al.*, 2005).

Por otro lado, el propionato inhibe la colonización de *Salmonella typhimurium* en el tracto gastrointestinal de ratones, a través de la inhibición de la expresión de genes de invasión (Lawhon *et al.*, 2002). Por su parte, el octanoato



posee la misma actividad, pero en contra de *Campylobacter jejuni* en pollos (Solís de los Santos *et al.*, 2008).

Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que distintas concentraciones de AGCC (propionato, butirato y hexanoato) reducen la internalización de *S. aureus* (principal agente patógeno causante de mastitis) hasta en un 65% en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas; Asimismo, estos AGCC son capaces de modular la expresión de diversos genes relacionados con la inmunidad innata (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012).

2.4 Características de los receptores acoplados a proteínas G (GPR's)

En una gran variedad de organismos, incluyendo a los rumiantes, existe un sistema de comunicación celular, en donde son liberados mediadores químicos que regulan las actividades de otras células. Estos a su vez, reconocen receptores nucleares o en la membrana plasmática de las células blanco (Chang, 2010). Una vez que el mediador interactúa con el receptor, este transduce la señal a través de un gran número de efectores, hasta que se emite una respuesta celular (Gether, 2000; Marinissen *et al.*, 2001).

Dentro de los receptores de membrana se encuentran los receptores acoplados a proteínas G o GPR's, los cuales constituyen una de las familias más grandes de proteínas en el genoma humano; estos receptores cuentan con motivos estructurales que les permiten interactuar con una gran diversidad de ligandos extracelulares, proteínas intracelulares, proteínas G, arrestinas y otros receptores (Eglen *et al.*, 2007). Esta diversidad permite que controlen muchos procesos fisiológicos como: el metabolismo celular, la diferenciación y crecimiento celular, las respuestas inflamatorias e inmune, así como la neurotransmisión. Se estima que más del 40% de los fármacos modernos están dirigidos contra estos receptores. Muchos de los agentes terapéuticos actúan activando (agonistas) o



bloqueando (antagonistas) a los GPR's (Eglen *et al.*, 2005).

Los GPR's están formados por una sola cadena polipeptídica, que consta de aproximadamente 300 aminoácidos (Eglen *et al.*, 2007). Esta proteína está constituida por 7 dominios transmembranales, con el extremo amino terminal en el exterior y el carboxilo en el interior de la célula (Le Poul *et al.*, 2003; Stoddart *et al.*, 2008). Presenta una estructura con siete secuencias de 25-35 residuos aminoacídicos, con alto grado de hidrofobicidad, dispuestos en una estructura de hélices α que atraviesan la membrana celular. Estas hélices están conectadas por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares. Los receptores acoplados a proteína G están parcialmente inmersos en la bicapa lipídica, en un ambiente no polar (Fig. 3) (Scarselli *et al.*, 2000). De acuerdo a la secuencia de los segmentos transmembrana estos receptores se pueden clasificar en 5 familias, las cuales son: clase A (receptores semejantes a rodopsina), clase B (receptores de la familia de la secretina), clase C (Receptor metabotrópico del glutamato y de las feromonas), clase D (receptores fúngicos de las feromonas), clase E (receptores del AMPc) y clase F (receptores de la familia Frizzled/Smoothened) (Fredriksson, 2003).

Una de las características distintivas de los GPR's es la capacidad de interactuar con una proteína G heterotrimérica, formada por las subunidades α , β y γ . En la subunidad $G\alpha$ reside la actividad de GTPasa. La proteína G, se une al receptor entre los dominios 5 y 6 (Herroeder *et al.*, 2009). Cuando el receptor es activado por un ligando se inducen cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G, provocando que la subunidad α libere GDP y una GTP, lo cual provee la energía necesaria para la disociación de la subunidad α , de las subunidades $\beta\gamma$ (Eglen *et al.*, 2007). Existen diversas familias de la subunidad $G\alpha$ en mamíferos que se caracterizan por su estructura primaria y por la cascada de señalización que activan. Dentro de ellas se encuentran: la familia $G\alpha_s$ (estimula la adenilato ciclasa), la $G\alpha_i/o$ (inhibe la adenilato ciclasa), la $G\alpha_q/11$ (activa la fosfolipasa C) y la $G\alpha_{12/13}$ (regula las proteínas Rho). La subunidad α



de la proteína G que interacciona con el receptor y el efector (Milligan *et al.*, 2006).

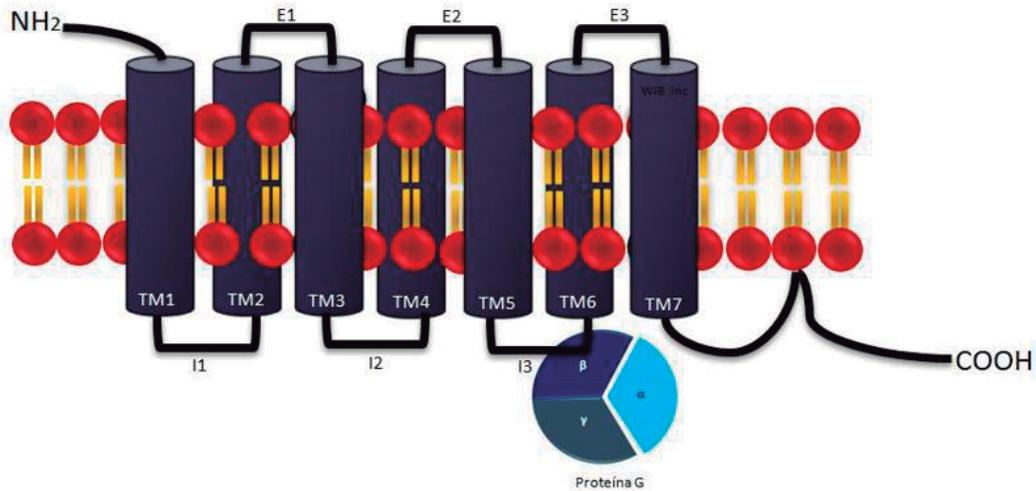


Figura 3. Estructura de un receptor acoplado a proteínas G. El receptor está formado por 7 dominios transmembranales (TM), con un extremo amino terminal localizado en el exterior de la célula y uno carboxilo terminal en el interior. Los dominios se encuentran conectados a través de 3 bucles extracelulares (E) y 3 bucles intracelulares (I) (Modificada de Milligan *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes tipos de subunidades α que regulan la actividad de uno o más efectores. Así, la subunidad $G_{\alpha s}$ es capaz de activar la adenilato ciclasa (AC), canales de calcio y canales de sodio. La $G_{\alpha o}$ inhibe a la fosfolipasa C (PLC). La $G_{\alpha i}$ activa canales de potasio, canales de calcio, inhibe a la AC y PLC; la $G_{\alpha q}$, activa principalmente la PLC, y la $G_{\alpha 12}$ está implicada en la activación de pequeñas GTPasas (Radhika *et al.*, 2001).

La vía de la AC es una de las principales cascadas de señalización que se activan a través de los GPR's. Una vez que el ligando se une al receptor se desencadena la interacción del receptor con la proteína $G_{\alpha s}$ capaz de activar a la AC. La AC se localiza en la cara interna de la membrana plasmática y cataliza la conversión del ATP en AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y PPi (pirofosfato inorgánico). El AMPc funciona como segundo mensajero estimulando la actividad de determinadas PKA (proteínas cinasas dependientes de AMPc) y PKC (proteína

cinasa dependiente de calcio), que son capaces fosforilar residuos específicos de serina/treonina, regulando así la actividad de diferentes proteínas celulares (receptores, canales iónicos, enzimas o factores de transcripción) (Wettschureck y Offermanns, 2005). Por su parte, la subunidad G α i (Fig. 4) provoca un efecto contrario acoplándose a otra región de la AC, inhibiendo así la formación de AMPc. Además de desencadenar una cascada de señalización, también se puede dar la integración de diferentes redes de señalización, entre las que se incluyen la vía de las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos) y las JNKs (c-Jun N-terminal cinasa) (Koch *et al.*, 1994).

Otra de las rutas de activación de los GPR's, es la que implica a la PLC. Los receptores que activan esta vía interactúan con proteínas G que poseen la subunidad G α q. Cuando un ligando se une al receptor, la disociación de la subunidad α activa a la PLC. La PLC es una enzima que hidroliza fosfoinosítoles de la membrana plasmática, generando IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato) y DAG (diacilglicerol) como segundos mensajeros. El IP₃ reconoce receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico provocando la liberación de Ca²⁺, el cual puede activar a la PKC (proteína cinasa dependiente de calcio) y a diferentes CamK's (calcio calmodulina/cinasa) (Fig. 4), promoviendo la fosforilación y regulación de la actividad de múltiples proteínas celulares en los diferentes tejidos que generaran una respuesta celular específica (Wettschureck y Offermanns, 2005).

2.4.1 Regulación de los GPR's

Existen diversos mecanismos que modulan la funcionalidad de los GPR's, estos pueden actuar en la síntesis del receptor, en el tráfico intracelular de los receptores o en la maduración de la proteína. Entre los mecanismos reversibles que determinan el estado de activación de los receptores, se encuentra el proceso de desensibilización (atenuación de la señalización de receptores tras la exposición prolongada a su ligando) (Marchese *et al.*, 2003).

Dentro de estos procesos se conocen: la desensibilización heteróloga y la



homóloga. La primera generalmente se lleva a cabo por una modificación covalente del receptor, como consecuencia de su fosforilación en residuos del 2º y 3er bucle intracelulares y del extremo C-terminal por la acción de cinasas intracelulares dependientes de segundos mensajeros, como la PKA o PKC. Ambas son fosfotransferasas, capaces de fosforilar a los receptores de manera independiente de su activación por el agonista, provocando el desacoplamiento de la proteína G (Louis *et al.*, 2002).

Por su parte, en la desensibilización homóloga los GPR's se acoplan a cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK's) y a β -arrestinas. Este proceso involucra la desensibilización y el reciclaje de los receptores (Louis *et al.*, 2002; Clian *et al.*, 2002). Las GRK's fosforilan el extremo carboxilo terminal de los GPR's, promoviendo la asociación de las β -arrestinas, las cuales además de participar en el desacoplamiento de las proteínas G, permiten iniciar nuevas cascadas de señalización, regulando así la actividad y estabilidad de otras proteínas, incluyendo a las GRK's (Louis *et al.*, 2002). Las β -arrestinas funcionan como moléculas adaptadoras, que se unen a la clatrina, AP-2 (β 2-adaptatina) y a la NSF (proteína de fusión sensible a la N-etilmaleimida) (Shenoy *et al.*, 2003).

Con base en la distinta afinidad en la asociación de los receptores con β -arrestinas y a su patrón de internalización y resensibilización, se han descrito dos tipos de GPR's (Shenoy *et al.*, 2003). Los receptores de tipo A (receptor β 2-adrenérgico), que muestran baja afinidad por las β -arrestinas, éstos se disocian rápidamente de ellas en el proceso de internalización; posteriormente estos receptores son llevados a un compartimento endosomal, en donde el ligando se disocia y el receptor es desfosforilado por una isoforma de PPA2 (proteína fosfatasa A2), para ser reciclado en la membrana plasmática (Pierce *et al.*, 2001). Por el contrario, los receptores de tipo B (receptor de angiotensina), poseen mayor afinidad por las arrestinas, permaneciendo asociados a estas moléculas durante la internalización, estos receptores se acumulan en vesículas endocíticas y posteriormente son marcados para su degradación. Sin embargo, también pueden



ser reciclados a la membrana plasmática (Louis *et al.*, 2002; Shenoy *et al.*, 2003).

2.5 Receptores de los ácidos grasos de cadena corta

Los AG, además de ser nutrientes esenciales, contribuyen en diversas funciones celulares. Existen diversas proteínas implicadas en la absorción, síntesis, transporte, almacenamiento, degradación y eliminación de lípidos. Un ejemplo de ello son los receptores proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales actúan como sensores de los AG; son receptores nucleares y su función es mantener la homeostasis bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas (Chawla *et al.*, 2001).

No obstante, recientemente se descubrió que algunos de los efectos biológicos de los AG podían ser mediados por mecanismos alternativos a los PPARs. Es así, como se identificaron múltiples receptores en la superficie celular, los cuales poseen la estructura característica de un receptor acoplado a proteínas G (Sauer *et al.*, 2000; Louet *et al.*, 2001; Civelli, 2005).

Dentro de los receptores de AG se encuentran: los receptores para ácidos grasos de cadena corta GPR41 y GPR43, también conocidos como receptores de ácidos grasos libres (FFAR), el receptor de ácidos grasos de cadena media GPR40 (FFAR1) y el GPR120, cuyo ligando son los ácidos grasos de cadena larga (Tabla 1) (Chawla *et al.*, 2001). Los genes que codifican para los receptores GPR41 y GPR43 fueron identificados por primera vez en humanos por Sawzdargo *et al.* (1997). Años más tarde, Brown *et al.* (2003), Le Poul *et al.* (2003) y Nilsson *et al.* (2003), demostraron que estos receptores son activados por AGCC.



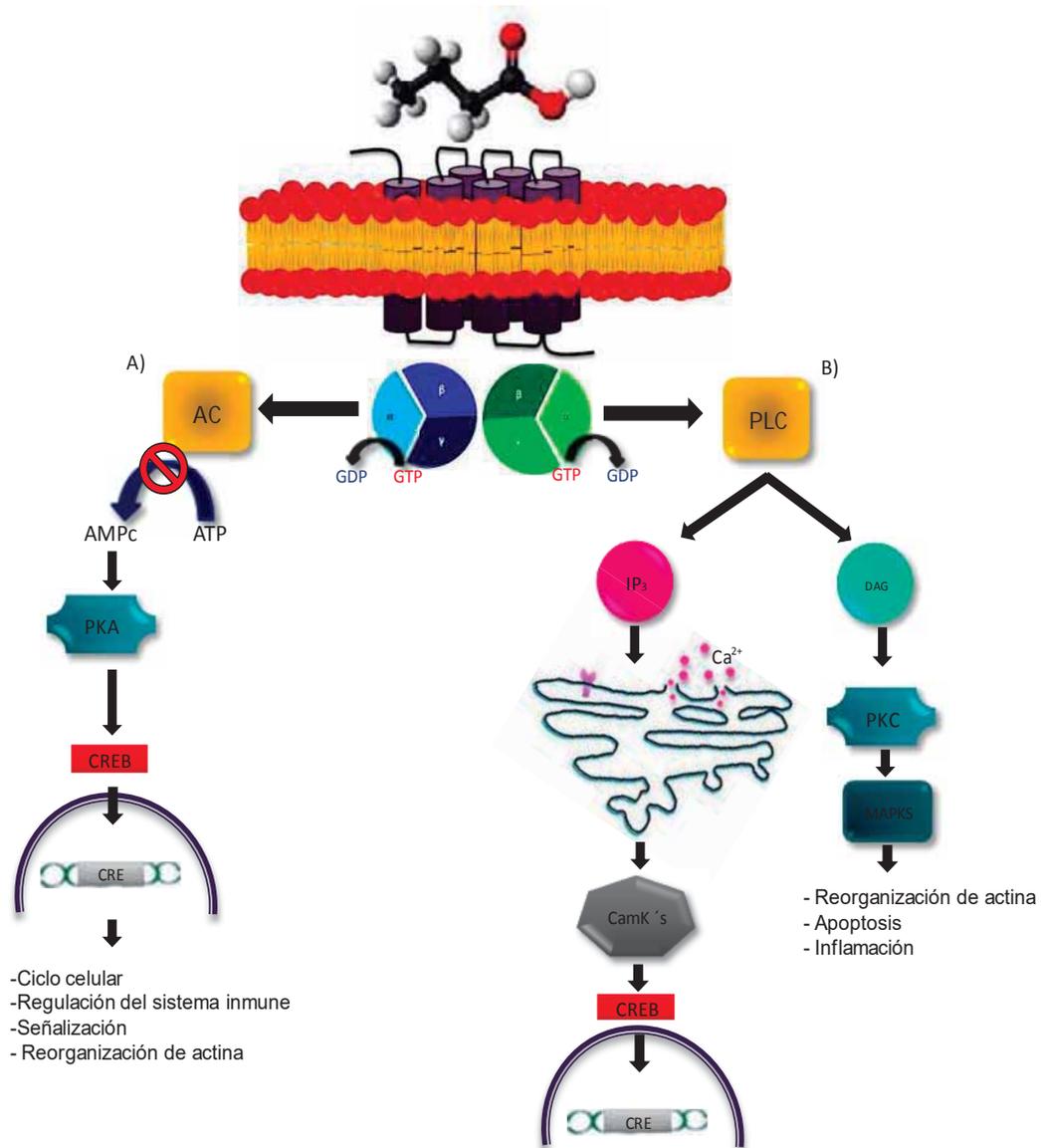


Figura 4. Esquema representativo de la activación de las proteínas G α i y G α q. A) La subunidad G α i actúa sobre la adenilato ciclasa (AC) acoplándose de tal manera que inhibe la formación de AMPc. B) La subunidad G α q activa a la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4-5 bisfosfato (PIP₂) localizado en la membrana, para dar lugar a diacilglicerol (DAG) y a inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ se une a su receptor en el retículo endoplásmico y provoca la apertura de canales de calcio; el incremento en la concentración de calcio induce la activación de la calcio-calmodulina cinasa (Camk's), la cual puede activar a proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), y éste a su vez a elemento de respuesta a AMPc (CRE), el cual activa la transcripción de distintos genes. Por su parte el DAG activa a proteína cinasas C (PKC) y ésta a su vez puede activar diversas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's), las cuales se sabe están involucradas en la activación de diversos factores de transcripción (modificada de Wettschureck *et al.*, 2005).

Diversos estudios han mostrado que el receptor GPR41 está relacionado principalmente con el tejido adiposo, ya que se determinó que es expresado principalmente en los adipocitos y que participa en la adipogénesis (Brown *et al.*, 2003). También se reportó la expresión de los genes de este receptor en: páncreas, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea (Kebede *et al.*, 2010; Leigh *et al.*, 2008). Ambos receptores (GPR41 y GPR43) tienen características en común con los GPR's pertenecientes a la familia A (tipo rodopsina) (Surgand *et al.*, 2006).

Por su parte, el receptor GPR43 fue detectado en células del sistema inmune como: monocitos, linfocitos B, células PMN, entre otras. Por lo anterior, su distribución sugiere un papel en la activación y diferenciación de las células de la respuesta inmune. Sin embargo, este receptor también es expresado en adipocitos, sugiriendo una participación en la regulación del metabolismo de los lípidos (Kebede *et al.*, 2010).

Tabla 2. Características de los receptores de AG en humanos

Nomenclatura	GPR40	GPR41	GPR43	GPR120	GPR84
Antagonista	-----	-----	-----	-----	-----
Agonista (AG)	Cadena media	Cadena corta	Cadena corta	Cadena media y larga	Cadena media
Agonista (otro)	Tiazolidinediona	-----	-----	-----	-----
Proteína G a la que están acoplados	Gq/11	Gi/o	Gq/11 y Gi/o	Gq/11	Gi/o
Rango de concentración efectiva	1 μ M -100 μ M	30 nM-10 mM	30 nM-10 mM	-----	-----
Localización en el cromosoma	19q13.1	19q13.1	19q13.1	10q23.33	12q13.13
Proteína	300 aa	346 aa	330 aa	377 aa	396 aa
Expresión	Células β pancreáticas	Adipocitos, páncreas, bazo, médula ósea	PMNC, neutrófilos, monocitos	Colon	Bazo

(Tabla modificada de Atsuhiko *et al.*, 2009)



Los receptores GPR41 y GPR43 exhiben entre ellos un 43% de identidad (Stoddart *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que estos receptores tienen como ligandos a los AGCC, se ha determinado que tienen distintas afinidades por este tipo de moléculas. Con respecto al receptor GPR43 los AGCC exhiben el siguiente orden de afinidad: acetato (C2) = propionato (C3) = butirato (C4) > pentanoato (C5) > hexanoato (C6). Mientras que el GPR41 es activado por los mismos ácidos grasos, pero en diferente orden: pentanoato = butirato > acetato > formiato (Le Poul *et al.*, 2003). Este efecto podría estar relacionado con una serie de aminoácidos cargados positivamente en la parte superior de los dominios V, VI y VII del receptor, los cuales interactúan con el grupo carboxilo de los ácidos grasos (Leigh *et al.*, 2008).

A pesar de que responden al mismo grupo de agonistas endógenos, los receptores para AGCC tienen distintas afinidades por las proteínas G. El receptor GPR41 está acoplado a una proteína G α_i , la cual es sensible a la toxina PTX de *Bordetella pertussis*. Esta toxina bloquea la activación del receptor por medio de una ADP ribosilación a un residuo de cisteína localizado cuatro aminoácidos antes del C-terminal de la subunidad G α (Milligan, 1998).

Respecto al receptor GPR43, éste puede estar acoplado a las proteínas G α_i y G α_q (insensible a la toxina PTX de *B. pertussis*) (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2003; Stoddart *et al.*, 2008). Ambos receptores activan la liberación de Ca²⁺, estimulando la vía ERK (cinasa regulada extracelularmente) e inhibiendo la acumulación de AMPc (Le Poul *et al.*, 2003).

Recientemente se demostró que el genoma de los bovinos contiene genes similares a los receptores GPR41 y GPR43 reportados en humanos (>75% de identidad). Estos receptores fueron detectados en una variedad de tejidos de bovino como: hígado, corazón, bazo, riñón, intestino delgado, epitelio mamario, entre otros (Wang *et al.*, 2009).

Posteriormente, se demostró que responden al tratamiento con AGCC. Se realizaron estudios, donde se reveló que la activación de ambos receptores por



propionato, acetato y butirato en CEMB se encuentra acoplada a la generación de IP_3 , seguida de una liberación elevada de Ca^{2+} intracelular, a través de la activación de la fosfolipasa C y la inhibición de la acumulación de AMPc, activando de esta manera las vías de p38 (MAPK) y HSP27 (Yonezawa *et al.*, 2009).

3. ANTECEDENTES

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes dentro de la ganadería lechera, debido a que causa pérdidas económicas y disminuye la salud del animal. Uno de los principales agentes causales es *S. aureus*, el cual tiene la capacidad de internalizarse en células epiteliales y endoteliales (Almeida *et al.*, 1996, 2007; Hensen *et al.*, 2000; Kerro-Dego *et al.*, 2002).

Los AGCC son producidos por la fermentación anaeróbica bacteriana en el rumen. Se sabe que los AGCC son la mayor fuente de energía en rumiantes, además forman parte de los componentes de la leche (Bergman, 1990; Parodi, 2004). Los AG no solo son nutrientes esenciales, también contribuyen en diversas funciones celulares como la diferenciación celular, la proliferación, motilidad, apoptosis y regulación inmune (Li y Elsasser, 2005; Al-Lahham *et al.*, 2010; Meijer *et al.*, 2010).

En rumiantes además de proveer energía los AGCC juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos, diversos estudios han demostrado que promueven el crecimiento ruminal, aumentan las concentraciones de insulina y glucagón en suero, estimulan la motilidad del tracto gastrointestinal e inhiben la síntesis de colesterol en el hígado (Lane y Jesse, 1997; DiCostanzo *et al.*, 1999; Cherbut, 2003; Bergman, 1990). Actualmente se sabe que los AGCC cuentan con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antimicrobianas (Miller *et al.*, 2005). Se tienen antecedentes acerca de las propiedades antimicrobianas de los AG presentes en la leche (ej. butírico, hexanoico y octanoico), un ejemplo de ello es el octanoato, el cual posee un efecto bactericida contra los principales agentes patógenos que causan mastitis como: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus*, y *E. coli* (Nair *et al.*, 2005). Sin embargo, existen pocos estudios que muestran el papel de los AGCC en la internalización de patógenos en células epiteliales. Es por ello que dentro de nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto de los AG en el proceso de internalización de *S. aureus* en CEMB. Dentro de los resultados se observó que los AGCC modulan la expresión de genes de la

inmunidad innata como: el péptido antimicrobiano traqueal (TAP), la β -defensina y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Asimismo se demostró que los AGCC disminuyen hasta un 65% la internalización de esta bacteria en CEMB (Tabla 3) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si los receptores de AGCC (GPR41 y GPR43) se encuentran involucrados en el proceso de endocitosis.

Tabla 3. Internalización de *S. aureus* en CEMB tratadas con AGCC

Concentración (mM)	Internalización (%)		
	Propionato	Butirato	Hexanoato
Control	100	100	100
0.25	**	53	55
0.5	27	50	57
1	55	44	65
2	29	**	43
5	**	**	39

Modificada de Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012

**Indica que no hubo un cambio significativo respecto al control

Los receptores GPR41 y GPR43 han sido identificados en CEMB y se ha demostrado que responden al tratamiento con AGCC (Wang *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009), donde se observó que la activación de los receptores a través de los AG provocan un aumento del Ca^{2+} intracelular, una disminución de la concentración de AMPc, lo cual se relaciona con la activación de p38 y HSP27 (Yonezawa *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si la expresión de los genes que codifican para los receptores GPR41 y GPR43 está relacionada con el proceso de infección de *S. aureus* en las CEMB en presencia de AGCC, o si tienen alguna participación en la endocitosis de la bacteria.

4. HIPÓTESIS

Staphylococcus aureus induce la expresión de los genes de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino, éste efecto es revertido por los ácidos grasos de cadena corta, lo cual está relacionado con la internalización de la bacteria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

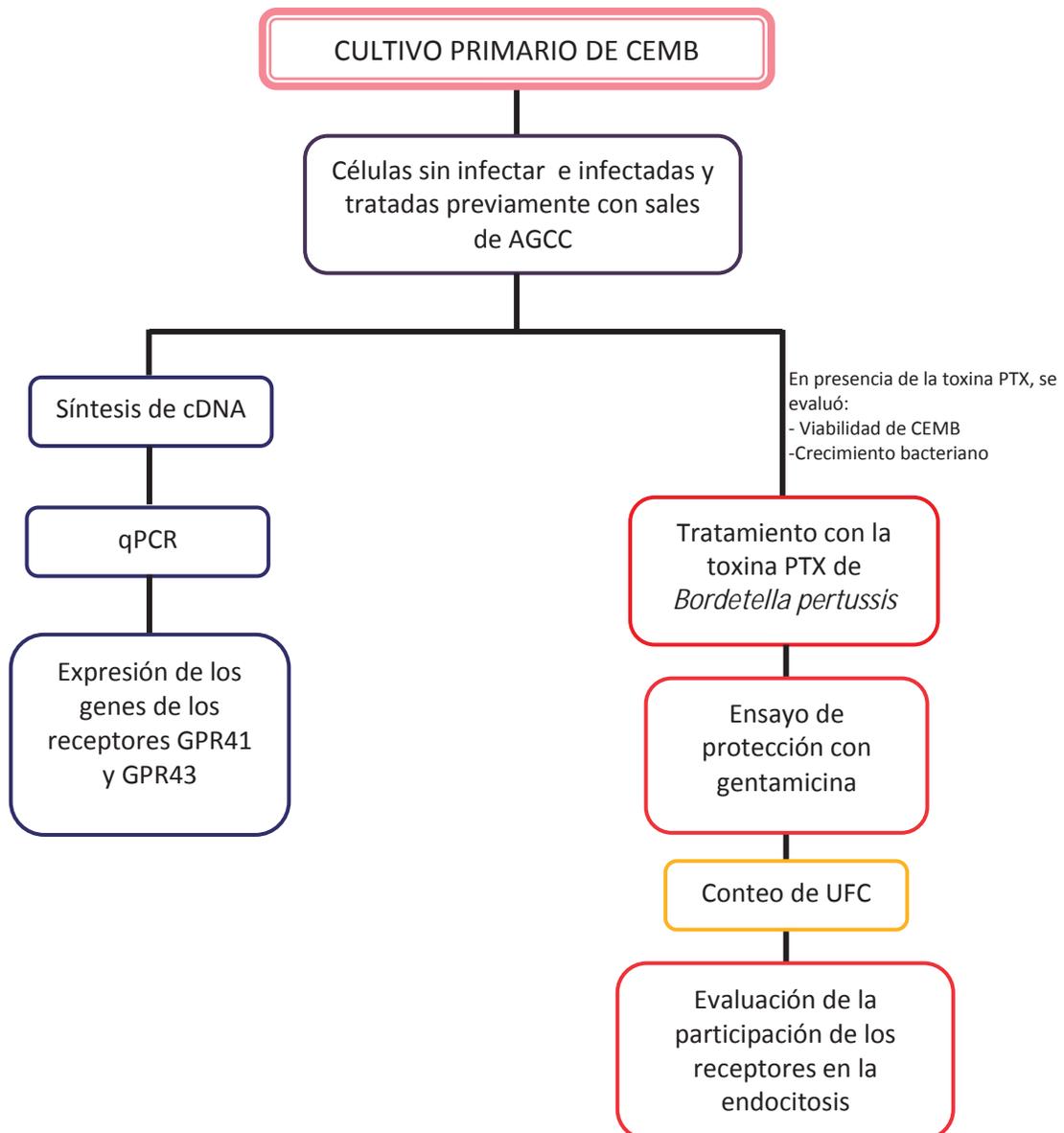
Establecer la participación de los receptores GPR41 y GPR43 en el proceso de internalización de *Staphylococcus aureus* en células de epitelio mamario bovino tratadas con ácidos grasos de cadena corta.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino tratadas con ácidos grasos de cadena corta.
2. Evaluar la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino infectadas con *Staphylococcus aureus*.
3. Analizar la expresión de los receptores GPR41 y GPR43 en células de epitelio mamario bovino tratadas con ácidos grasos de cadena corta e infectadas con *Staphylococcus aureus*.
4. Determinar la participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la endocitosis de *Staphylococcus aureus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo de estudio utilizado en este trabajo fueron los cultivos de las células de epitelio mamario bovino (CEMB). Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 27543) que tiene la capacidad de invadir CEMB. Se evaluaron las sales de cinco AGCC: acético, propiónico, butírico, hexanoico y octanoico. Los ensayos se realizaron utilizando las siguientes concentraciones: 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM, las cuales se han reportado que tienen participación en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012).



6.1 Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

El cultivo primario de CEMB se obtuvo del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente (Anaya-López *et al.*, 2006). Las CEMB fueron cultivadas del pasaje 2 al 8 en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12K de Ham (DMEM/F12K, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (100 µg/ml), 10 µg/ml insulina (Sigma), 10 µg/ml hidrocortisona (Sigma) y 1 µg/ml de anfotericina B (Invitrogen). Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

6.2 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Para este estudio se utilizó la cepa comercial de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 27543 aislada de un caso de mastitis bovina clínica y con reconocida capacidad de invadir las CEMB. Para obtener el inóculo de la bacteria, ésta se creció en caldo Luria Bertani (5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura), incubándose a 37°C durante 16-18 horas.

6.3 Extracción de ARN total y análisis de la expresión de genes de los receptores GPR41 y GPR43

Se hizo la extracción del ARN total de las CEMB sometidas a los distintos tratamientos con las sales de AGCC, infectadas con *S. aureus* o ambos. Se utilizó Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La muestra obtenida fue tratada con DNAsa I (Invitrogen) para eliminar cualquier contaminación con DNA. La síntesis del ADNc se realizó por medio de la reacción de transcripción reversa (RT) a partir del ARN total. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, conteniendo 25 µg/ml de Oligo d(T) (Invitrogen) y 500 nM de dNTP's (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min. Después se añadió First strand buffer 1X (Invitrogen), ditiotreitól 10 nM e inhibidor de RNAsa 2 U/µL (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/µL, Invitrogen) y posteriormente se



incubó a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min. El cDNA se utilizó para establecer los niveles de expresión de los genes de los receptores.

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación relativa de la expresión de los genes por el método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 0.9 pmol/ μ l de cada oligonucleótido, 250 ng de cDNA y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos que codifican para los receptores GPR41 y GPR43. Como control interno se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Especificidad	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento	Referencia
GPR41	Sentido	5'-CCAACCCAGACCACTCCTTC-3'	159 pb	Yonezawa <i>et al.</i> , 2009
	Reverso	5'-TTAGCAAGAGCACGTCCACA-3'		
GPR43	Sentido	5'-CATGGTGGTCACCACCTTCT-3'	230 pb	
	Reverso	5'-GACTGGCATTGAGGCTACCA-3'		
GAPDH	Sentido	5'-TCAACGGGAAGCTCACTGG-3'	237 pb	
	Reverso	5'-CCCCAGCATCGAAGGTAGA -3'		

6.4 Efecto de la toxina PTX de *Bordetella pertussis* en el crecimiento de *S. aureus*

Se cultivó *S. aureus* (ATCC 27543) en caldo LB a 37°C durante 18 h en agitación constante. Se ajustó la D.O.₆₀₀ del cultivo bacteriano a 0.2 (equivalente a 9.7×10^7 UFC/ml). Después se adicionó el tratamiento de la toxina PTX de *Bordetella pertussis* (200 ng/ml) (Sigma). Se incubó a 37°C por 2, 4, 8, 16 y 24 h.



Posteriormente se determinó la absorbancia a D.O.₆₀₀ en un lector de placas (espectrofotómetro DAS) de los cultivos en las distintas condiciones y tiempos. Como control se utilizó el cultivo de *S. aureus* sin tratamiento.

6.5 Efecto de la toxina PTX de *Bordetella pertussis* en la viabilidad de CEMB

Para determinar el efecto de la toxina se realizó un ensayo a través de MTT, una técnica colorimétrica en donde se emplea la sal bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma). Se incubaron 5×10^3 células por pozo, en cajas de 96 pozos con medio sin suero y sin antibióticos. Se evaluaron diversas concentraciones de la toxina (12.5 a 200 ng/ml). Las CEMB se incubaron 4 h a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂. Después se adicionaron 10 µl de MTT (5 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 4 h, una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 100 µl de lauril sulfato de sodio (SDS, Sigma) al 10%, se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Por último, se determinó la absorbancia del lisado a 595 nm en un lector de placas (DAS) para ELISA. También se evaluó la viabilidad por medio de la técnica de exclusión de azul tripano. Las CEMB fueron cultivadas en presencia de 200 ng/ml de la toxina PTX, durante distintos periodos de tiempo (0, 2, 4, 8, 16 y 24 h). Posteriormente las células fueron despegadas con 0.25% tripsina-EDTA (Gibco), se centrifugaron a 200 rpm por 10 min. Para hacer el recuento de células, a 20 µl de suspensión celular se le adicionaron 20 µl de colorante azul tripano (Sigma); esta mezcla se llevó a la cámara de Neubauer y se contaron todas las células, marcando como células muertas las que incorporan el azul tripano y como células vivas las no teñidas.

6.6 Efecto de la toxina PTX de *Bordetella pertussis* en la invasión de *S. aureus* sobre las CEMB

Para evaluar si los receptores GPR's se encuentran relacionados con la endocitosis de *S. aureus*, se realizaron ensayos de protección con gentamicina. Se utilizaron CEMB cultivadas en cajas de 24 pozos, tratadas con las diferentes concentraciones de las sales de AGCC y se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente se adicionaron 200 ng/ml de la toxina



PTX de *B. pertussis* y se incubaron durante 4 h. Después las células se lavaron 3 veces con PBS estéril y se infectaron con la cepa de *S. aureus* (ATCC 27543), empleando una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula, durante 2 h a 37°C, para lo cual se adicionó un cultivo bacteriano previamente ajustado a una D.O.₆₀₀ de 0.2. Se agregó gentamicina a una concentración de 80 µg/ml para eliminar a las bacterias no endocitadas, incubándose 1 h a 37°C. Posteriormente, Las células se lavaron 3 veces con PBS estéril, se despegaron con 0.25% tripsina-EDTA (Gibco) y el contenido de cada uno de los pozos se transfirió a tubos Eppendorf y se recuperaron las células centrifugando a 2,500 rpm/15 min, la tripsina se decantó y se adicionó 250 µl de agua destilada estéril, en la cual se resuspendió la pastilla hasta lisar a las células. Luego se hizo una dilución 1:100 del volumen total de células lisadas y se distribuyeron en agar LB y se incubaron por 18 h, para después llevar a cabo el conteo manual de UFC. Como control se utilizaron las CEMB sin tratamiento y sin infectar.

6.7 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron con tres experimentos independientes por triplicado de cada una de las condiciones, posteriormente se realizó un análisis mediante la prueba *t* de Student para establecer las diferencias significativas.



7. RESULTADOS

7.1 Análisis de la expresión de genes de los receptores GPR41 y GPR43

Para determinar si los AGCC modulan la expresión de los genes de los receptores en las CEMB tratadas con AGCC e infectadas con *S. aureus*, se llevó a cabo el análisis de la expresión relativa de los genes de los receptores GPR41 y GPR43 por PCR en tiempo real. Primero se determinó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos, a través de una curva de validación, en la cual se evaluó el comportamiento de amplificación de los GPR's con respecto al gen endógeno, el cual corresponde a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los resultados obtenidos de esta evaluación demostraron que los oligonucleótidos cumplen con los valores requeridos para la pendiente de la gráfica ($-3.3 \pm 10\%$) y el coeficiente de correlación ($R^2= 0.99$).

Una vez que se establecieron las condiciones de amplificación se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los genes antes mencionados, con cada uno de los tratamientos. En ninguna de las condiciones y bajo ningún tratamiento se logró identificar algún producto de amplificación para el receptor GPR41. Sin embargo, se logró evaluar la expresión relativa del receptor GPR43. Cabe resaltar que la infección con *S. aureus* indujo la expresión del receptor GPR43 en las CEMB, éstas mostraron una inducción de ~ 6 veces. Para fines de simplificar la descripción de los resultados, en todos los análisis se incluyó como control la inducción generada por la bacteria, pero la información relacionada con ello ya no se describe. A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron con cada uno de los AGCC y la expresión del receptor GPR43.

Para establecer si el acetato modulaba la expresión del receptor GPR43, se evaluó la expresión relativa de este receptor en CEMB sin infectar e infectadas (Fig. 5). Las CEMB sin tratamiento y sin la infección (células control) mostraron una expresión basal del ARNm de GPR43. Cuando las CEMB fueron tratadas con el AGCC, solo la condición de 10 mM provocó una inducción significativa del mensajero del receptor GPR43, esta inducción fue de 8 veces. Sin embargo, este



efecto inductor de la infección fue revertido cuando las CEMB fueron previamente tratadas con el AGCC. Este efecto fue evidente a partir de la concentración de 0.5 mM ya que a la concentración de 0.25 mM se observó una inducción de la expresión de GPR43 de ~8 veces, con respecto a las células que únicamente fueron estimuladas con el AGCC.

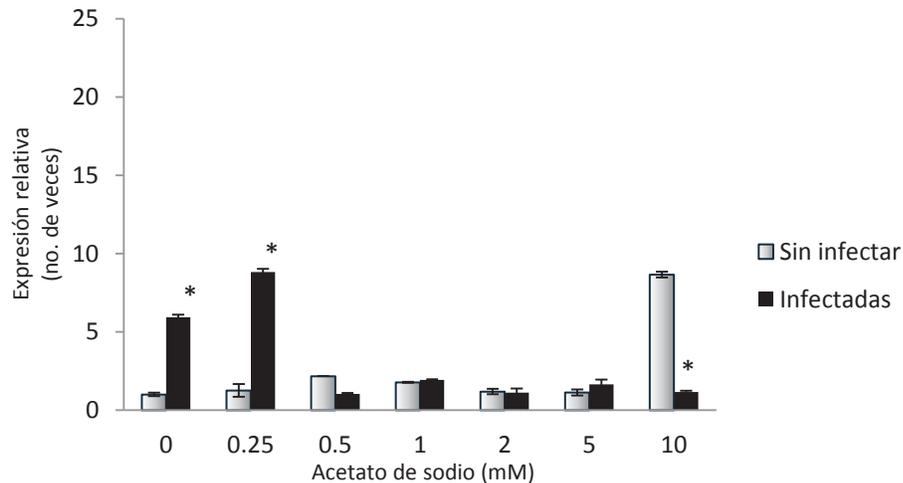


Figura 5. Efecto del acetato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con el AGCC 24 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB sin infectar.

En las CEMB tratadas con propionato (Fig. 6) se observó que todas las concentraciones de este AGCC son capaces de inducir en mayor o menor proporción la expresión de GPR43. Las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 mM inducen la expresión del receptor ~3 veces con respecto a las células sin tratamiento. En las concentraciones de 2 y 10 mM se observó un aumento de ~6 y ~7 veces, respectivamente. En el caso de las CEMB tratadas con el AGCC e infectadas, se observó que en las concentraciones de 0.25 a 5 mM no hubo un cambio significativo en la expresión del receptor, con respecto a las CEMB únicamente tratadas con el AGCC. Sin embargo, a 10 mM la expresión disminuyó ~3 veces, a diferencia de las células solamente tratadas con propionato.



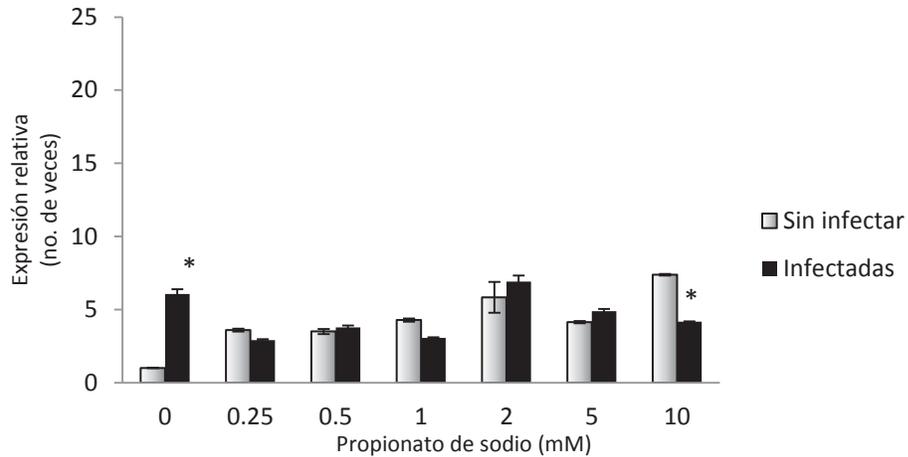


Figura 6. Efecto del propionato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con el AGCC 24 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB sin infectar.

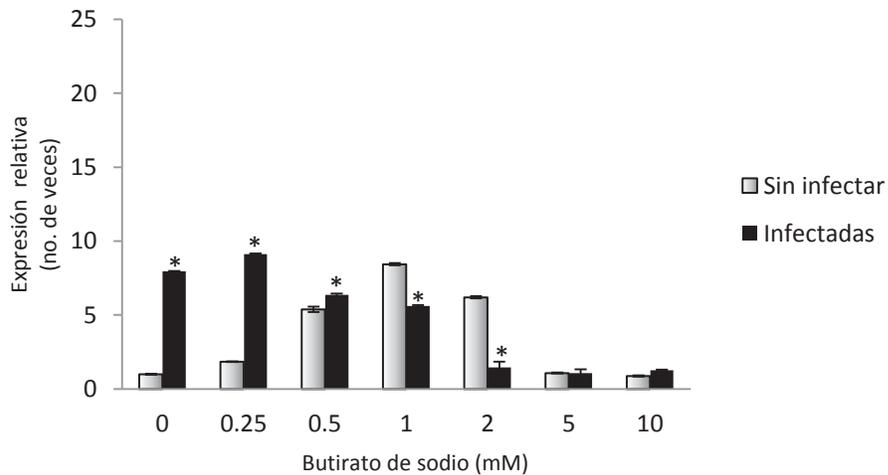


Figura 7. Efecto del butirato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con el AGCC 24 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB sin infectar.

En relación al butirato, éste indujo la expresión relativa del receptor GPR43, excepto a las concentraciones de 5-10 mM (Fig. 7), el incremento fue de ~8 veces en las CEMB tratadas con las concentraciones de 0.25 a 2 mM del AGCC. El tratamiento con butirato revirtió el efecto inductor de la infección, con excepción del tratamiento de 0.25 mM, regresando incluso a los niveles basales a partir de la condición de 2 mM.

En la figura 8 se muestran los resultados de la expresión del ARNm del receptor GPR43 en las CEMB tratadas con hexanoato e infectadas. Todos los tratamientos con el AGCC provocaron una inducción de la expresión del mensajero de GPR43. Los tratamientos de 0.25, 0.5 y 10 mM de hexanoato fueron los que tuvieron una mayor inducción, siendo hasta ~ 21 veces en la condición de 10 mM, respecto a las células sin tratamiento. En cuanto a las CEMB estimuladas con el AGCC e infectadas, los resultados mostraron que este AGCC en las condiciones de 0.25, 2 y 5 mM contrarrestó el efecto inductor de la infección, aunque no tan manifiesto como los otros AGCC. Sin embargo, en las concentraciones de 0.5, 1 y 10 mM se observó una inducción superior a la mostrada por la infección, llegando incluso a ser hasta 4 veces con respecto a las células infectadas.

Por otra parte, en el caso del tratamiento con octanoato de sodio no se consideraron las concentraciones de 2, 5 y 10 mM, ya que en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que a estas concentraciones el ácido graso presenta un efecto inhibitorio, tanto en el crecimiento de la bacteria como en la viabilidad de las células. En la figura 9 se puede observar una inducción en la expresión del ARNm del receptor únicamente en las CEMB tratadas con 0.25 mM de octanoato de sodio, el cual es considerado por algunos autores como un ácido graso de cadena media (Guo *et al.*, 2006). con los otros AGCC, el efecto inductor de la infección fue inhibido por el AGCC, siendo esta más evidente en la concentración de 0.25 mM.



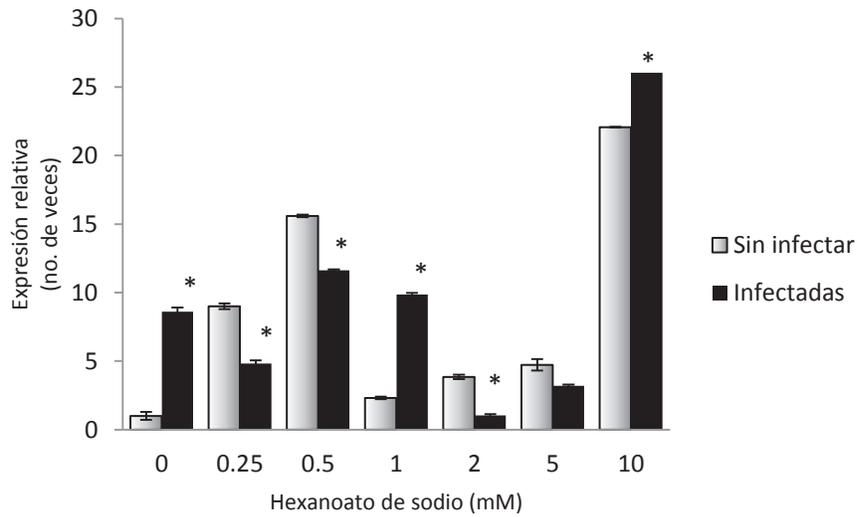


Figura 8. Efecto del hexanoato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con el AGCC 24 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB sin infectar.

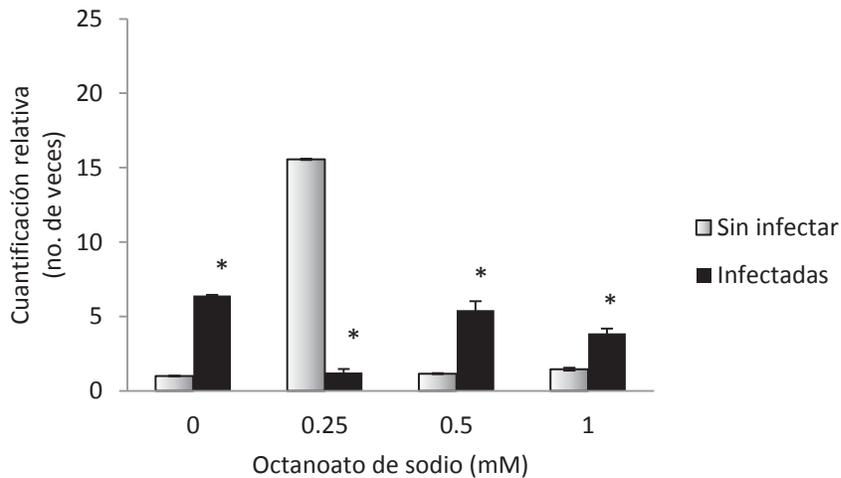


Figura 9. Efecto del octanoato de sodio en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con el AGCC 24 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$) con respecto a las CEMB sin infectar.

7.2 Análisis de la participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la endocitosis de *Staphylococcus aureus*

Los receptores GPR's interactúan con proteínas G heterotriméricas, constituidas por 3 subunidades (α , β y γ). Cuando el receptor es activado la subunidad α libera GDP y une GTP, permitiendo la separación de las subunidades $\beta\gamma$, lo cual favorece el acercamiento a la enzima blanco efectora para la activación de la ruta de señalización. Existen diversas familias de la subunidad $G\alpha$ que se caracterizan por su estructura primaria y por la ruta de señalización que activan. Se sabe que el receptor GPR41 está acoplado a la subunidad G_{ai} , mientras que el receptor GPR43 puede estar acoplado a las subunidades G_{ai} y G_{aq} . Las proteínas G_{ai} pueden ser inactivadas por medio de la toxina PTX de *B. pertussis*, inhibiendo así su ruta de señalización. Es por ello que en el presente trabajo se utilizó el tratamiento con PTX con el fin de evaluar la participación de estos receptores en la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

7.2.1 Efecto de la toxina PTX de *B. pertussis* en la viabilidad de las CEMB

De manera inicial se determinó el efecto de la toxina PTX sobre la viabilidad de las CEMB, por medio de diversos ensayos con diferentes concentraciones de PTX a diferentes tiempos. La viabilidad de las CEMB fue determinada a través de 2 métodos (MTT y exclusión por azul tripano).

Inicialmente se realizaron ensayos donde se evaluaron diversas concentraciones de toxina PTX (12.5 a 200 ng/ml). Las CEMB fueron tratadas con las diferentes concentraciones y se incubaron durante 4 h. La viabilidad fue determinada por medio del ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las concentraciones de la toxina afecta la viabilidad de las células (Fig. 10).

Posteriormente las CEMB fueron cultivadas en presencia de 200 ng/ml de PTX, durante distintos periodos de tiempo (2, 4, 8, 16 y 24 h) y la viabilidad de las células fue determinada por el método de exclusión con azul tripano. Los



resultados de la figura 11 muestran que a partir de las 16 h comienza a disminuir la viabilidad de las células hasta alcanzar un 28 % de inhibición a las 24 h.

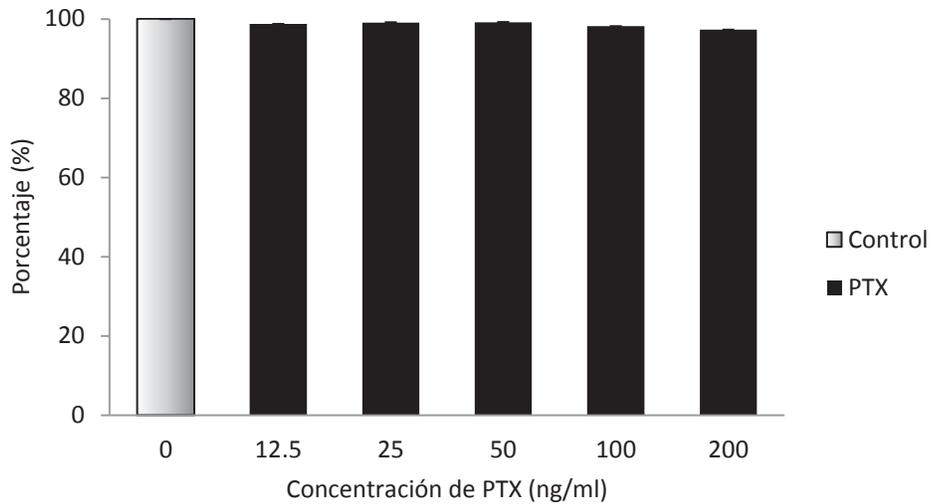


Figura 10. Efecto de la toxina de *B. pertussis* (PTX) sobre la viabilidad de las células de epitelio mamario bovino. Las CEMB fueron cultivadas e incubadas durante 4h en presencia de diferentes concentraciones de la toxina PTX (12.5 a 200 ng/ml). La viabilidad de las células se determinó por medio del ensayo colorimétrico de MTT. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

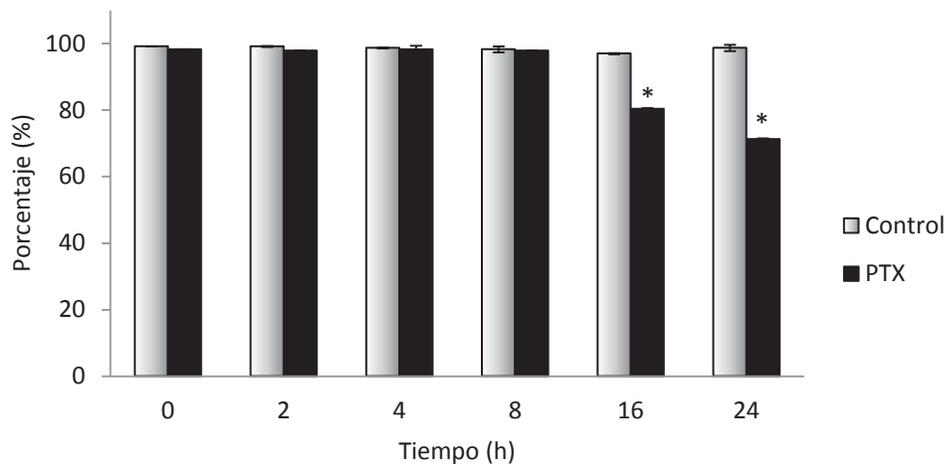


Figura 11. Efecto de la toxina PTX de *B. pertussis* (200 ng/ml) sobre la viabilidad de las CEMB. Las CEMB fueron cultivadas en presencia de 200 ng/ml de PTX, durante distintos períodos de tiempo (0-24h), posteriormente la viabilidad de las CEMB fue determinada por el método de exclusión con azul tripano. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$).

7.2.2 Efecto de la toxina PTX de *B. pertussis* en el crecimiento de *S. aureus*

Para descartar el efecto de PTX en el crecimiento bacteriano, se evaluaron diversos periodos de tiempo con la concentración previamente establecida. Los resultados obtenidos (Fig. 12) muestran que el tratamiento con 200 ng/ml de PTX promueve el crecimiento de la bacteria, este comportamiento se mantuvo hasta las 8 h; sin embargo, a partir de ahí el cultivo entra en una fase estacionaria de crecimiento.

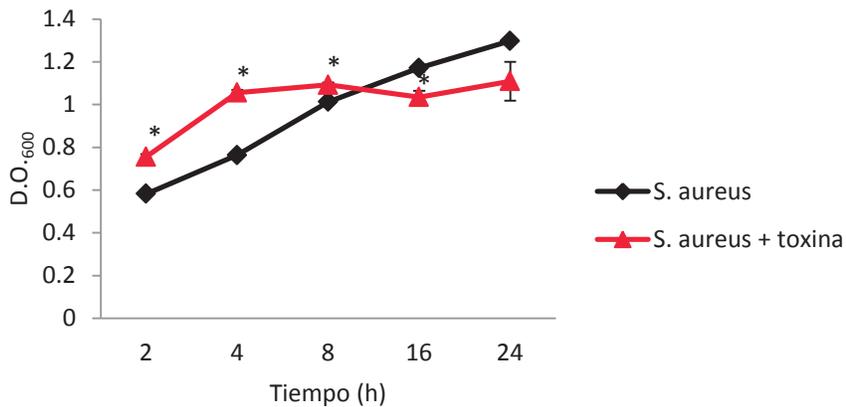


Figura 12. Efecto de la toxina PTX de *B. pertussis* sobre el crecimiento de *S. aureus*. Se cultivó y ajustó la bacteria a una D.O.₆₀₀ a 0.2 (9×10^7 UFC). Posteriormente se adicionaron 200 ng/ml de PTX y se midió la D.O.₆₀₀ a los tiempos establecidos. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. “*” indica un cambio significativo ($P < 0.05$).

7.2.3 Participación de los receptores GPR41 y GPR43 en la invasión de *S. aureus* en las CEMB

Una vez evaluados los efectos de la toxina PTX sobre la viabilidad de las CEMB y *S. aureus*, se analizó su efecto en la internalización de la bacteria en las células. Las CEMB fueron tratadas con 200 ng/ml de la toxina PTX de *B. pertussis* durante 4 h previas a la infección. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de protección con gentamicina. Una vez realizado el ensayo de invasión se contaron las UFC, donde se demostró que el tratamiento con la toxina inhibe la endocitosis hasta un 84% (Fig. 14).

A continuación, se evaluaron diferentes concentraciones de la toxina (12.5 a 200 ng/ml), para ello las CEMB fueron tratadas durante 4 h con dichas concentraciones y posteriormente se realizaron los ensayos de invasión. Una vez que se contaron las UFC se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, siendo la concentración de 200 ng/ml donde se observó el mayor efecto en la inhibición de la endocitosis de *S. aureus*.

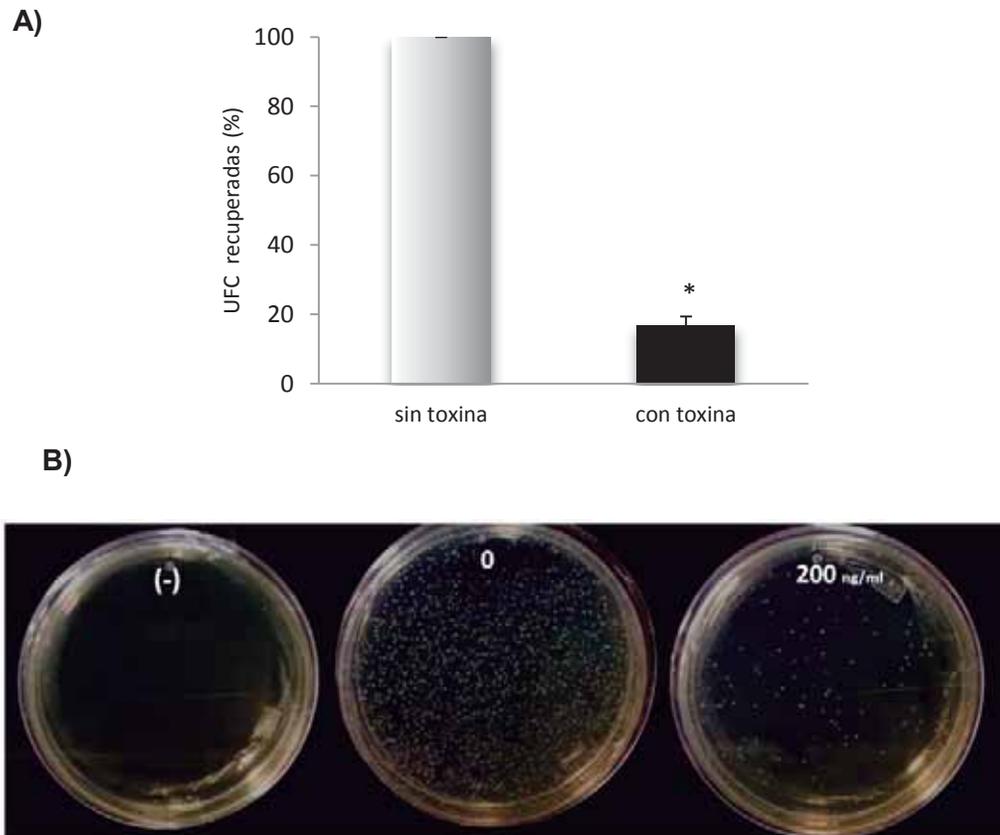


Figura 13. Evaluación de la invasión de *S. aureus* en las CEMB en presencia de la toxina PTX de *B. pertussis*. Las CEMB fueron tratadas con 200 ng/ml de PTX durante 4 h previas a la infección. **A)** La gráfica presenta el porcentaje de UFC recuperadas. **B)** Fotografía representativa del crecimiento de UFC en placas de medio sólido LB de *S. aureus*. Los valores fueron determinados considerando a las células sin PTX como el 100% de la invasión. “**” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$).

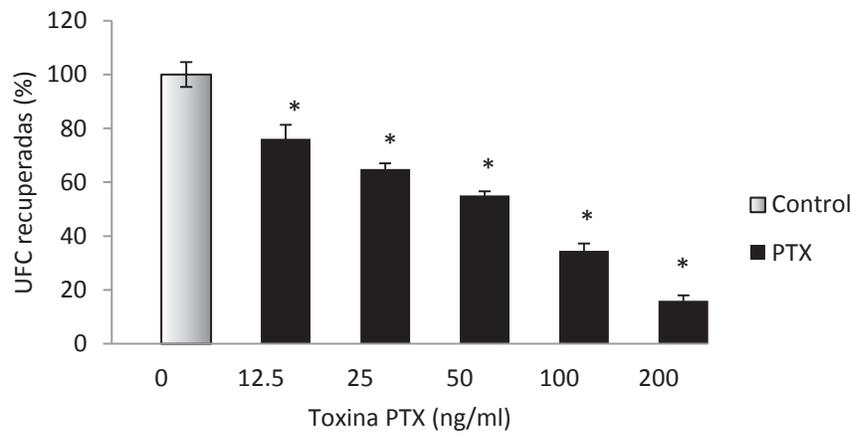


Figura 14. Evaluación de la invasión de *S. aureus* en las CEMB en presencia de la toxina PTX de *B. pertussis*. Las CEMB fueron tratadas con diferentes concentraciones de PTX (12.5-200 ng/ml) durante 4 h previas a la infección con *S. aureus*. En la gráfica se presenta el porcentaje de UFC recuperadas, los valores fueron determinados considerando a las células sin PTX como el 100% de la invasión. “*” indica un cambio significativo ($P < 0.05$).

7.2.4 Análisis de la expresión del receptor GPR43 en presencia de la toxina de PTX de *B. pertussis*

Para determinar si la toxina PTX modula la expresión del gen del receptor GPR43, se llevó a cabo un análisis de la expresión relativa por PCR en tiempo real. En la figura 15 se puede observar que la toxina indujo la expresión del receptor hasta ~3 veces. Sin embargo, revirtió el efecto inductor de la bacteria ya que esta disminuye aproximadamente a la mitad, respecto a la infección.

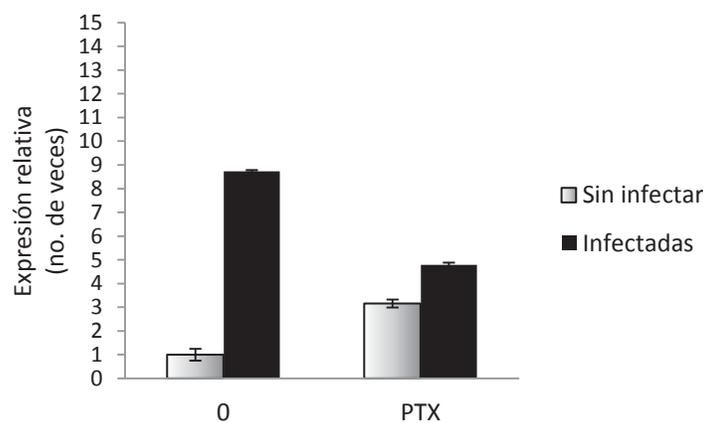


Figura 15. Efecto de toxina PTX de *B. pertussis* en la expresión del receptor GPR43 en las CEMB. Las CEMB se trataron con la toxina PTX (200 ng/ml) 4 h previas a la infección con *S. aureus*. Se realizó la extracción del ARN total, posteriormente la síntesis de ADNc de cada una de las muestras. La expresión relativa se llevó a cabo por medio de PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno GAPDH. “*” indica un cambio significativo ($P \leq 0.05$).



8. DISCUSIÓN

La mastitis es una de las principales patologías que afecta al ganado bovino lechero, es considerada una enfermedad de alto impacto económico debido a que provoca una disminución en la calidad y la cantidad de la leche (Ceron-Muñoz *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002). El principal agente infeccioso causante de la mastitis bovina es la bacteria *Staphylococcus aureus*, la cual es aislada en más del 70% de las infecciones intramamarias (Wilson *et al.*, 1997; Watts, 1998). Algunas de las cepas de esta bacteria pueden invadir y sobrevivir intracelularmente permitiéndole evadir la respuesta inmune y el tratamiento con antibióticos (Bayles *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2001).

Por otra parte, los AGCC son nutrientes esenciales para los bovinos y se obtienen principalmente de la fermentación bacteriana en el rumen. Además de su función nutrimental también cuentan con propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas y antiinflamatorias (Miller *et al.*, 2005; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Por estas propiedades, en nuestro grupo de trabajo se han realizado diversos estudios que han permitido establecer que estos AGCC (butirato, propionato, hexanoato) reducen hasta un 65% la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). Esto se ha explicado parcialmente a través de la modulación de la expresión de genes de la inmunidad innata como: el péptido antimicrobiano traqueal (TAP), la β -defensina y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si el efecto inhibitorio podría estar relacionado con la activación de los receptores para AGCC (GPR41 y GPR43), los cuales se han reportado en CEMB y se ha demostrado que responden al tratamiento con AGCC (Wang *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009). Es por ello, que en el presente trabajo se evaluó la expresión del ARNm de los receptores GPR41 y GPR43 en CEMB tratadas con sales de AGCC (acético, propiónico, butírico, hexanoico y octanoico) e infectadas con *S. aureus*; además, se evaluó la participación de los receptores en la endocitosis de la bacteria.

Las concentraciones de AGCC utilizadas en este trabajo (0.25 mM a 10 mM) corresponden a aquellas que previamente se evaluaron en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009; Alva-Murillo *et al.*, 2012). Estas concentraciones se encuentran dentro de las reportadas como efectivas para la activación de los receptores GPR's en diferentes tipos celulares, incluyendo las CEMB (30 nM-10 mM) (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009). Ninguna de las concentraciones a las 24 h disminuye la viabilidad de las CEMB, sin embargo estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo mostraron que diversas concentraciones de octanoato (2, 5 y 10 mM) disminuyen la viabilidad de las células (Alva-Murillo *et al.*, 2012).

En años recientes se reportó la identificación y se demostró la funcionalidad de los receptores GPR41 y GPR43 en las CEMB; además de su expresión en diferentes estadios de la lactancia de la glándula mamaria de bovinos (Yonezawa *et al.*, 2009). No obstante, en los experimentos realizados en este trabajo el ARNm del receptor GPR41 no fue detectado en las CEMB, aún utilizando el mismo juego de oligonucleótidos para qPCR y el mismo tipo celular que reportaron Yonezawa *et al.* (2009). Ante esto, se evaluaron otros oligonucleótidos reportados en la literatura (Wang *et al.*, 2009); sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos. Cabe señalar que también se modificaron las condiciones de temperatura, MgCl₂, entre otros, y no se logró amplificar el mensajero de este receptor. Hasta el momento, desconocemos la razón de esta discrepancia. Se tienen reportes previos de un resultado similar en tejido adiposo de ratón, en donde no se logró identificar el receptor GPR41, a pesar de utilizar un juego de oligonucleótidos previamente reportado para este receptor en el mismo tejido (Xion *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005).

En este trabajo se logró identificar la expresión del receptor GPR43 en cultivos primarios de CEMB y se demostró que los AGCC son capaces de inducir la expresión del ARNm del receptor. Estudios previos han demostrado que la afinidad de los AGCC por el receptor GPR43 disminuye a medida que aumenta el



tamaño de la cadena (C2=C3=C4>C5>C6) (Le Poul *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003). Sin embargo, a diferencia de lo anterior nosotros observamos un comportamiento en el cual la concentración del AG necesaria para inducir la expresión del receptor disminuye a medida que la longitud del ácido graso aumenta. Esta discrepancia puede estar relacionada con el método utilizado, ya que nosotros evaluamos la expresión del ARNm del receptor inducida por los AGCC y los grupos de trabajo hicieron la evaluación a nivel de membrana con ensayos de unión a GTP γ S (Le Poul *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003). La mayor inducción del receptor GPR43 se observó con hexanoato y octanoato los cuales no son ligandos naturales de este receptor, se sabe que son ligandos del receptor GPR40 (Chawla *et al.*, 2001). Por ello es importante destacar que a pesar de que el octanoato es considerado un ácido graso de cadena media (Francois *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2005; Murielle *et al.*, 2010) nosotros observamos que éste ácido graso (0.25 mM) es capaz de inducir la expresión del receptor GPR43 (~16 veces), cuyos ligandos naturales son los AGCC.

Otro aspecto importante que se evaluó en el presente trabajo, fue la interacción del proceso infeccioso con los diferentes tratamientos con los AGCC. Un dato relevante de este trabajo fue que se demostró que la infección de las CEMB con *S. aureus* induce la expresión del receptor GPR43 (~6 veces) (Fig. 6). Además se observó que el efecto inductor de la infección es revertido por los tratamientos con los AGCC de manera dependiente de la concentración; Lo que es congruente con los estudios reportados en neutrófilos humanos donde se observó que la simulación de la infección con el estímulo de LPS (lipolisacárido, presente en bacterias Gram negativas) aumenta la expresión del receptor GPR43 (~ 7 veces) y el efecto inductor del receptor GPR43, es restituido por el tratamiento con AGCC (4 mM) (Aoyama *et al.*, 2010). Sin embargo, no se tienen reportes donde se haya evaluado la expresión del ARNm de este receptor en cultivos primarios de CEMB, en un modelo de infección como en el utilizado en este trabajo. Dentro de nuestro grupo de trabajo se han realizado diversos estudios que demuestran que los AGCC reducen la internalización de *S. aureus* (Ochoa-

Zarzosa *et al.*, 2009; Murillo *et al.*, 2012). De estos estudios surgió la hipótesis de que este efecto podría estar relacionado con la activación de los receptores para AGCC (GPR41 y GPR43), los cuales se han reportado en las CEMB y se ha demostrado que responden al tratamiento con AGCC (Wang *et al.*, 2009; Yonezawa *et al.*, 2009). Los reportes acerca del efecto de los AGCC en la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB establecen que los mayores efectos inhibitorios sobre este proceso se obtienen cuando se utilizan concentraciones cercanas a 1 mM. Interesantemente los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la expresión del receptor GPR43 mostraron que en la concentración de 1 mM no hay inducción de la expresión del ARNm de este receptor. Esto permite proponer que la inducción del ARNm del receptor probablemente no está relacionada directamente con la disminución en la endocitosis de la bacteria y que la participación de los receptores podría ser a otra.

Además de evaluar la expresión del ARNm de los receptores GPR41 y GPR43, también se evaluó la participación de ambos receptores durante el proceso de endocitosis. Diversos grupos de trabajo han demostrado que el receptor GPR41 se encuentra acoplado a la proteína G α i (sensible a la toxina PTX de *Bordetella pertussis*), mientras que el GPR43 puede estar acoplado a las proteínas G α i y G α q (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2003). Posteriormente, en CEMB tratadas con AGCC se dilucidó la ruta de señalización desencadenada por la activación de estos receptores, para ello se bloqueó la subunidad G α i con la toxina PTX de *B. pertussis* (200 ng/ml durante 16 h). Con esta y otras herramientas se estableció que la ruta conducía a la activación de p38, MAPK y HSP27 (Yonezawa *et al.*, 2009). Por consiguiente, en este trabajo se utilizó la toxina PTX para bloquear la ruta de señalización desencadenada por los receptores y evaluar su participación en el proceso de endocitosis de *S. aureus*. Se evaluó el efecto de la toxina PTX en la viabilidad de las CEMB y el crecimiento de la bacteria. Los experimentos de viabilidad de las CEMB se realizaron inicialmente exponiendo las células a una concentración de 200 ng/ml durante 24 h. Sin embargo, la viabilidad de las células se afectó drásticamente. Estos datos



no coinciden con lo reportado por Yonezawa *et al.* (2009) quien reporta que un tratamiento de 24 h con la misma concentración de la toxina PTX no afecta la viabilidad de un cultivo primario de células epiteliales mamarias bovinas. Hasta el momento se desconoce cuál es la razón de esta diferencia. Ante esto, se realizó una evaluación de la viabilidad de las CEMB (ensayo de exclusión con azul tripano), donde se evaluaron diferentes periodos de tiempo. Los resultados mostraron que a partir de las 16 h el tratamiento con la toxina (200 ng/ml) reduce la viabilidad de las células (28%) (Fig. 11). Por ello, para minimizar un posible daño de la toxina PTX sobre las CEMB, los ensayos de invasión se realizaron con tratamientos de 4 h con la toxina, la cual no afectó la viabilidad de las CEMB a este tiempo aun a concentraciones de 200 ng/ml (Fig. 10). En el mismo sentido, los resultados mostraron que la toxina PTX no afectó el crecimiento de *S. aureus* (Fig. 12).

Una vez que se establecieron las condiciones adecuadas se procedió a realizar los ensayos de protección con gentamicina, donde se evaluaron diferentes concentraciones de la toxina PTX (12.5 a 200 ng/ml). Los resultados permitieron determinar que había un efecto inhibitorio de la internalización de *S. aureus* en las CEMB, la cual fue dependiente de la concentración. Revelando que la concentración de 200 ng/ml presenta el mayor efecto, disminuyendo hasta en un 84% la internalización (Fig. 14). El proceso de endocitosis de *S. aureus* propuesto para las CEMB ocurre a través de un mecanismo “zipper” e involucra la participación de elementos del citoesqueleto, receptores y ligandos (Kerro-Dego *et al.*, 2002). La cascada de señalización desencadenada por este proceso promueve la fosforilación de varios sustratos involucrados en la reorganización de actina (Schlaepfer y Mitra, 2009). Probablemente la disminución de la endocitosis de *S. aureus* esté relacionada con el hecho de que al bloquear la subunidad Gai (que interactúa con los receptores GPR41 y GPR43) se induce un aumento en la concentración de AMPc intracelular, el cual puede activar proteínas de unión a actina relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto como: filamina, aducina, paxilina, FAK (cinasa de adhesión focal) y Scr (tirosina cinasa) (Agerer *et al.*,

2005). Además, la activación de PKA por AMPc, también puede modular la actividad de las GTPasas Rho, el cual es otro mecanismo importante para la regulación de la actina (Yang *et al.*, 2006; Andersson *et al.*, 2005). Por otra parte, se sabe que el receptor GPR43, además de interactuar con la proteína Gai (sensible a la toxina PTX de *B. pertussis*), también interactúa con Gαq. Por lo que la inactivación de la proteína Gai pudiera promover de alguna forma la ruta de señalización que se encuentra ligada a la proteína Gαq; la cual implica la activación de PLC y la producción de IP₃ y DAG. El IP₃, promueve la liberación de Ca²⁺, el cual puede activar a la PKC y a diferentes CamK's. Por su parte, el DAG activa a PKC y está a su vez puede activar diversas proteínas como Raf. No obstante, esta ruta puede activar la transcripción de genes relacionados con la inflamación, la sobrevivencia celular, el rearreglo de actina del citoesqueleto, entre otras (Wettschureck y Offermanns, 2005).

Debido a que se observó que la infección causada por *S. aureus* es capaz de inducir la expresión del receptor GPR43 y que la toxina PTX de *B. pertussis* disminuye la internalización de la bacteria, se decidió evaluar si el efecto inductor del receptor se mantenía en presencia de la toxina. Para ello se determinó el efecto de la toxina PTX en la modulación de la expresión del gen del receptor GPR43 en presencia de *S. aureus*. Los resultados mostraron que la toxina PTX por sí sola es capaz de inducir la expresión del receptor, este efecto posiblemente se debe a que de alguna manera la inactivación del receptor por medio de la toxina active una ruta de señalización que promueve la transcripción del gen de este receptor. Además, se observó que la toxina PTX es capaz de revertir la inducción del receptor ocasionada por la infección (Fig. 15). Esto permite proponer que la inducción del ARNm del receptor probablemente podría estar relacionada con la endocitosis de la bacteria. No obstante, se requiere de estudios adicionales para establecer su participación en este evento.



9. CONCLUSIÓN

La infección con *S. aureus* induce la expresión del gen del receptor GPR43 en células de epitelio mamario bovino, éste efecto es revertido por el tratamiento con ácidos grasos de cadena corta. Los GPR'S inhiben la internalización de la bacteria.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen, K., Hauck, C. R. 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J Cell Sci.* 118:2189-2200.
- Ahmed, S., Meghji, S., Williams, R. J., Henderson, B., Brock, J. H., Nair, S. P. 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun.* 69:2872-2877.
- Almeida, R. A. y Oliver, S. P. 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathogen.* 31:205-212.
- Angulo, J., Mahecha, L., Giraldo, C. A., Olivera, M. 2005. Prostaglandinas y grasa de la leche. Ed. Biogénesis. Pp 112-137.
- Angulo, J., Olivera, M. 2008. Fisiología de la producción láctea en bovinos. Ed. Biogénesis. pp 4-18.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Zadoks, R. N. 2006. The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89:1877-1895.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A., Trumble, W. R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 66:336-342.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 70:567-590.
- Bhakdi, S. y Tranum-Jensen, J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev.* 55:733-51.
- Boulangier, D., Bureau, F., Mélotte, D., Mainil, J., Lekeux, P. 2003. Increased nuclear factor NF- κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci.* 86:1259-1267.
- Bourne, H., Sanders, D., McCormick, F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349:117-127.
- Brouillete, E., Grondin, G., Lefebvre, C., Talbot, B. G., Malouin, F. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 4:253-262.



- Brouillette, E., Grondin, G., Lacasse, P., Talbot, B. G. 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus*. Is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectina-binding proteins. *Microb Pathogen*. 35:159-168.
- Brown, A., Goldsworthy, S. M., Barnes, A., Tchean, L., Daniels, D., Muir, A., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, L., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, M. S., Wise, A., Dowell. 2002. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 278:11312-11319.
- Cavaglieri, C. R., Nishiyama, A., Fernandes, L. C., Curi, R., Miles. 2003. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci*. 73:1683-1690.
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., Mangelsdorf, D. J. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. 294:1866-70.
- Cherbut, C. 2003. Motor effects of short-chain fatty acids and lactate in the gastrointestinal tract. *Proc Nutr Soc*. 62:95-99.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R. M., Doreau, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann Zoot*. 49:181-205.
- Civelli, O. 2005. GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci*. 26:15-91.
- Cliang, A., Laporte, S. A., Caron, M., Lefkowitz, R. J. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*. 66:61-79.
- Coldren, C. D., Nick, J. A., Poch, K. R., Woolum, M. D., Fouty, B. W., O'Brien, J. M. 2006. Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:1267-76.
- Correa, M. P. y Marin, J. M. 2002. O-serogroups, EAE gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol*. 85:125-132.

- Covington, D. K., Briscoe, C. A., Brown, A. J., Jayawickreme, C. K. 2006. The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40–GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochem Soc Trans.* 34:770-773.
- Cox, M. A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Lavery, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Bayne, Y., Chou, C., Lundell, D., Jenh, C. 2009. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E2 and cytokines. *World J Gastroenterol.* 28:15-44.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufrasne, I., Hornick, J. L., Istasse, L. 2004. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. *Ann Med Vet.* 148:133-140.
- DiCostanzo, A., Williams, J. E., Keisler, D. H. 1999. Effects of short- or long-term infusions of acetate or propionate on luteinizing hormone, insulin, and metabolite concentrations in beef heifers. *J Anim Sci.* 77:3050-6.
- Dong, J. C. y Jung-gu, K. 2004. Discovery of new G protein-coupled receptors for lipid mediators. *J. Lipid Res.* 45:410-418.
- Dos Santos, J. N., Netto dos Santos, K. R., Gentilini, E., Sordelli, D., Freire Bastos, M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 85:133-144.
- Dower, K., Ellis, D. K., Saraf, K., Jelinsky, S. A., Lin, L. L. 2008. Innate immune response to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative crosstalk with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 180:3520-34.
- Eglen, R. M. 2005. Functional G protein-coupled receptor assays for primary and secondary screening. *Comb Chem Hig Throughput Screen.* 8:311-318.
- Eglen, R. M., Bosse, R., Reisine, T. 2007. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol.* 3:425-51.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T., Bourne, H. 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem.* 269:7851-7854.



- Field, T. R., Ward, P. N., Pedersen, L. H., James, A. y Leigh, J. A. 2003. The hyaluronic acid capsule of *Streptococcus uberis* is not required for the development of infection and clinical mastitis. *Infect Immun.* 71:132-139.
- Fischer, K., Vogt, S., Grosse, R., Hogg, N., Gunzer, M., Offermanns, S., Wettschureck, N. 2009. Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. *Immunity.* 30:708-20.
- Fowler, T., Wann, E. R., Joh, D., Johansson, S., Foster, T. J., Höök, M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 79:672-679.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., Schioth, H. B. 2003. The G protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63:1256-1272.
- Gasque. 2008. Enciclopedia bovina. UNAM. pp. 417-425.
- Ge, H., Li, X., Weiszmann, J., Ping, W., Baribault, H., Chen, J., Tian, H., Li, Y. 2008. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *J Endocr.* 149:4519-4526.
- Gether, U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21:90-113.
- Halasa, T., Huijps, K., Osteras, O. and Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 29:18-31.
- Halestrap, A.P. y Meredith. 2004. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acids transporters and beyond. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 447:619-628.
- Haug, A., Hostmark, A., Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition: a review. *Lipids Health Dis.* 6:25-27.
- Hensen, S. M., Pavicic, M. J., Lohuis, J. A., Poutrel, B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci.* 83:418-429.



- Heringstad, B., Klemetsdal, G., Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci.* 64:95-106.
- Hong, Y. H., Nishimura, Y., Hishikawa, D., Tsuzuki, H., Miyahara, H., Gotoh, C., Choi, K. C., Feng, D. D., Chen, C., Lee, H. G., Katoh, K., Roh, S. G., Sasaki, S. 2005. Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43. *Endocrinology.*14:5092-9.
- Hortet, P. y Seegers, H. 1998. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med.* 37:1-20.
- Huang, L. 2006. Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J Cell Physiol.* 209:611-6.
- Inan, M. S., Rasoulpour, R. J., Yin, L., Hubbard, A. K., Rosenberg, D. W., Giardina, C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology.* 118:724-734
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Jensen, R. G., Newburg, D. S. 1995. Bovine milk lipids of milk composition. Ed. Handbook. London, UK: Academic Press. 543-75.
- Kebede, M. A., Alquier, T., Latour, M. G., Poitout, V. 2009. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications?. *Diabetes Obes Metab.* 11:10-20.
- Kerro-Dego, O., Van Dijk, J. E., Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Q.* 24:181-198.
- Koch, T., Kroslak, T., Mayer, P., Raulf, E., Holtt, V. 1997. Site mutation in the rat muopioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization. *J Neurochem.* 69:1767-70.
- Koch, W., Hawes, B., Allen, F., Lefkowitz, R. 1994. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12706-12710.
- Kolakowski, L. F. 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 2:1-7.



- Lane, M. A., y Jesse, B. W. 1997. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J Dairy Sci.* 80:740-6.
- Lawhon, S., Maurer, D. R., Suyemoto, M., Altier, C. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 46:1451-1464.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J.Y., Lannoy, V., Decobecq, M.E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., y Detheux, M. 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem.* 278:25481-25489.
- Lefkowitz, R. J., Shenoy, S. K. 2007. Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem.* 282:29549-62.
- Leigh, A., Stoddart, N., Graeme, M. 2008. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol Rev.* 60:405-417.
- Li, C. J. y Elsasser, T. H. 2005. Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: Involvement of caspase and proteasome pathways. *J Anim Sci.* 83:89-97.
- Li, C. J., Li, R. W., Wang, Y., Elsasser, T. E. 2007. Pathway analysis identifies perturbation of genetic networks induced by butyrate in a bovine kidney epithelial cell line. *Funct Integr Genomics.* 7:193-205.
- Li, R. W. y Li, C. J. 2006. Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells. *BMC Genomics.* 7:234.
- López-Meza, J. E., Higuera-Ramos, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., Chassin-Noria, O., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V. M. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* Asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Téc Pecu Méx.* 44:91-106.
- Louet, J. F., Chatelain, F., Decaux, J. F. 2001. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)-independent pathway. *Biochem J.* 354:189-97.
- Lowy, F.,D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.*339:520-532.

- Marchese, A., Chen, C., Kim, Y. M., Benovic, J. L. 2003. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci.* 28:369-76.
- Marinissen, M. J., Gutkind, J. S. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 22:368-376.
- Maslowski, K., Vieira, A., Aylwin, N., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H., Rolph, M., Mackay, F., Artis, D., Ramnik, J., Teixeira M., Mackay, C. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 461:1282-1286.
- Matitashvili, E., Bramley, A. J., Zavizion, B. 1997. An *in vitro* approach to ruminant mammary gland biology. *Biotechnol Adv.*15:17-41.
- Meijer, K., De Vos, P., Priebe, M. G. 2010. Butyrate and other short fatty acid as modulators of immunity: what relevance for health?. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 13:715-721.
- Mendell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. Principles and practice of infectious diseases. Ed.Churchill Livingstone. Philadelphia, Pensilvania. 2000.
- Menzies, B. E., Kourteva, I. 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun.* 66:5994-5998.
- Miller, S. J., Zaloga, G. P., Hoggatt, A. M., Labarrere, C., Faulk, W. P. 2005. Short-chain fatty acids modulate gene expression for vascular endothelial cell adhesion molecules. *Nutrition.* 21:740-748.
- Milligan, G. 1988. Techniques used in the identification and analysis of function of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins. *Biochem J.* 255:1-13.
- Milligan, G., Kostenis, E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* 1:46-55.
- Milligan, G., Stoddart, L. A., Smith, N., J. 2009. Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. *Br J Pharmacol.* 158:146-153.
- Nair, M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 88:3488-3495.



- 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. *Microb Pathog.* 47:1-7.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V. M. 2007 Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54:399-409.
- Parkos, C. A. 1997. Cell adhesion and migration. I. Neutrophil adhesive interactions with intestinal epithelium. *Am J Physiol.* 273:G763–G768.
- Parodi, P. 1997. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr.* 127:1055-1060.
- Pierce, K. L. y Lefkowitz, R. J. 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 10:727-33.
- Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J. 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 10:727-33.
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., Sealfon, S. C. 1992. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 11:1-20.
- Qazi, S. N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C. E., Cockayne, A. Winzer, K., Chan, W. C., Williams, P., Hill, P. J. 2001. Agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun.* 69:7074-7082.
- Radhika, V., Dhanasekaran, N. 2001. Transforming G proteins. *Oncogene.* 20:1607-14.
- Rainard, P. y Riollot, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37:389-400.
- Rappuoli, R., Pizza, M. 2000. Bacterial toxins. Cellular Microbiology. Ed. Romero, A., T. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. pp.122-134.
- Rose, D., Brunner, J. R., Kalan, E. B., Larson, B. L., Melnychyn, P., Swaisgood, H. E. 1970. Nomenclature of the proteins of cow's milk: third revision. *J Dairy Sci.* 53:1-17.



- Sa'ad, H., Al-Lahham., Maikel, P., Peppelenbosch., Roelofsen., Vonk, R., Koen, V. 2010. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1801:1175-83.
- Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. K., Hammer, R. E., Williams, S. C., Crowley, J., Yanagisawa, M., Gordon, J. I. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16767-72.
- Sawzdargo, M., George, S. R., Nguyen, T., Xu, S., Kolakowski, L. F., O'Dowd, B. F. 1997. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun*. 239:543-547.
- Scarselli, M., Armogida, M., Chiacchio, S., DeMontis, M. G., Colzi, A., Corsini, Maggio, G. 2000. Reconstitution of functional dopamine D (2s) receptor by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *Eur J Pharmacol*. 397:291-296.
- Schlaepfer, D. D. y Mitra, S. K. 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev*. 14:92-101
- Shenoy, S. K., Lefkowitz, R. J. 2003. Trafficking patterns of β arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β arrestin deubiquitination. *J Biol Chem*. 278:14498-14506.
- Shompole, S., Henon, K. T., Liou, L. E., Dziejwanowska, K., Bohach, G. A., Bayles, K. W. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol*. 49:919-927.
- Solis de los Santos, F., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Reyes-Herrera, I., Metcalf, J. H., Dirain, M. L., Aguiar, V. F., Blore, P. J., Donoghue, D. J. 2008. Therapeutic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chicks. *Appl Environ Microbiol*. 74:4564-6.
- Sordillo, L. M., Streicher, K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7:135-146.
- Stehle, H. W., Leblebicioglu, B., Walters, J. D. 2001. Short-chain carboxylic acids produced by gram-negative anaerobic bacteria can accelerate or delay polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. *J Periodontol*. 72:1059-63.

- Stoddart, L., Smith, N., Jenkins, L., Brown, A., Milligan, G. 2008. Conserved polar residues in transmembrane domains V, VI, and VII of free fatty acid receptor 2 and free fatty acid receptor 3 are required for the binding and function of short chain fatty acids. *J Biol Chem.* 47:32913-32924.
- Sun, C. Q., O'Connor, J. O., Turner, S. J., Lewis, G. D., Stanley, R. A., Roberton, A. M. 1998. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. *Chem Biol Interact.* 113:117-131.
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., Roberton, A. M. 2002. The antimicrobial properties of milk fat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chem Biol Interact.* 140:185-198.
- Surgand, J. S., Rodrigo, J., Kellenberger, E., Rognan, D. 2006. A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins.* 62:509-538.
- Tomo, Y., Satoshi, H., Yosuke, K., Kazuo, K., Yoshiaki, O. 2009. Short-chain fatty acid signaling pathways in bovine mammary epithelial cells. *Regul Pept.* 15:30-6.
- Trinidad, P., Nickerson, C. S., Adkinson, R. W. 1990. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J Dairy Sci.* 73:639-647.
- Tucker, H. A. 2000. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J Dairy Sci.* 83:874-884.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2003. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is induced by short-chain fatty acids. *Int J Food Microbiol.* 85:237-48.
- Wang, A., Gu, Z., Heid, B., Akers, R. M., Jiang, H. 2009. Identification and characterization of the bovine G protein-coupled receptor GPR41 and GPR43 genes. *J Dairy Sci.* 92:2696-2705.
- Wellenberg, G. J., Van Der Poel, W. H., Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: *Vet Microbiol.* 88:27-45.
- Wettschureck, N. y Offermanns, S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 85:1159-1204.



- Wickström, E. 2009. New markers of bulk milk quality in relation to mastitis. Studies on polymorphonuclear leukocytes and α -lactalbumin. 25:6-33.
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschock, M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Ed. Universitaria. 62-72.
- Wong, J. M., Kendall, C. W., Eman, A., Jenkins, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 40:235-243.
- Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M., Yanagisawa, M. 2004. Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:1045-50.
- Yonezawa, T., Haga, S., Kobayashi, Y., Katoh, K., Obara, Y. 2009. Short-chain fatty acid signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Regul Peptides.*153:30-36.
- Zavaleta, E. 2003. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Ciencia veterinaria.* 1:223-236.
- Zhao, X., Lacasse, P. 2007. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86:57-65.

