



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

Tesis:

**Análisis de la regulación epigenética inducida por las hormonas
17 β - estradiol y prolactina sobre el epitelio mamario bovino durante la
infección con *Staphylococcus aureus***

Que presenta:

Q.F.B. María Guadalupe Salgado Lora

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Área temática:

Biotecnología Pecuaria

Asesora:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Coasesor:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Junio 2020 Morelia Mich.

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 de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la co-dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto: CIC 14.1) y del CONACyT (proyecto CB-287210 y beca 701067)

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a CONACyT por la beca (701067) otorgada durante mis estudios de maestría, sin la cual no me hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

También agradezco a mis asesores, la Dra. Alejandra y el Dr. Joel, por haberme dejado formar parte de su grupo de trabajo, así como por todo su apoyo y conocimientos que compartieron conmigo durante esta importante etapa de mi formación académica.

Agradezco a mi comité sinodal Dra. Esperanza, Dra. Zoraya y a la Dra. Nayely, por su apoyo y sus aportaciones para este trabajo.

Gracias al Dr. Manel por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme hacer una estancia y a todo su grupo de trabajo por todas sus enseñanzas.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, especialmente a Pao y Robert, gracias por escucharme, apoyarme y en algunas ocasiones esperarme hasta tarde en el laboratorio.

A mis amigos por su paciencia, sus consejos y palabras de aliento que me ayudaron infinitamente y que me alientan a seguir adelante.

Un agradecimiento especial a mi familia por siempre confiar en mí y apoyarme incondicionalmente, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

Tabla de contenido

	Página
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. Introducción	3
I.1. Mastitis bovina.....	3
I.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.3. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria	9
I.4. Prolactina	11
I.5. Estrógenos.....	14
I.6. Estradiol.....	14
I.7. Efecto inmunomodulador de la PRL y del 17 β -estradiol	17
I.8. Epigenética	19
I.9. Modificaciones covalentes en la cola de las histonas.....	22
I.9.1. Marcas de acetilación	22
I.9.2. Marcas de metilación	23
I.10. Procesos epigenéticos relacionados con PRL y 17 β -estradiol	24
I.11. Procesos epigenéticos relacionados con las enfermedades infecciosas.....	25
II. Antecedentes	27
III. Justificación	30
IV. Hipótesis.....	31
V. Objetivos	31
V.1. Objetivo general	31
V.2. Objetivos específicos	31
VI. Materiales y métodos	32
VI.1. Estrategia experimental	32
VI.2. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)	33

VI.3. Reactivos y cepas.....	33
VI. 4. Extracción de RNA total y análisis de la expresión de genes relacionados con enzimas epigenéticas y con la RII.....	34
VI. 5. Extracción de histonas de CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2.....	36
VI. 6. Análisis de Western blot.....	37
VI. 7. Actividad de HDACs	38
VI. 8. Medición de la abundancia membranar del receptor TLR2 mediante citometría de flujo	38
VI. 9. Análisis de datos	39
VII. Resultados.....	40
VII. 1. Las hormonas E2 y bPRL inducen la expresión de genes de la RII	40
VII. 2. La mezcla hormonal en combinación con <i>S. aureus</i> no modifica la expresión del gen de TLR2, pero si incrementa la abundancia membranar del receptor	42
VII. 3. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac)	44
VII. 3.1. La bPRL disminuye la acetilación global de la histona H3	45
VII. 3.2. El E2 y la mezcla hormonal en conjunto con <i>S. aureus</i> modulan la acetilación global de la histona H3	45
VII. 4. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac).....	48
VII. 4. 1. La bPRL disminuye la acetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9ac)	48
VII. 4.2. El E2 y la mezcla hormonal incrementan la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 ...	49
VII. 5. La mezcla hormonal de bPRL y E2 disminuyen la actividad de las HDACs	50
VII. 6. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la expresión de genes de enzimas epigenéticas.....	51
VII. 7. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2, sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2)	53
VII. 7. 1. La bPRL incrementa la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2).....	53
VII. 7.2. El E2 y la mezcla hormonal incrementan la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2).....	53
VII. 8. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la actividad de las histonas lisinas desmetilasas (KDMs).....	56
VII. 9. Efecto de las hormonas PRL y E2 sobre la expresión de los genes de desmetilasas KDM4A y KDM4C.....	57
VII. 10. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la expresión de los genes <i>DNMT1</i> y <i>DNMT3A</i>	58
VIII. Discusión	60

IX. Conclusión	70
X. Referencias	71
XI. Anexos	79

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Factores de virulencia y patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i> .	6
Figura 2. Mecanismo de internalización tipo "zipper" de <i>Staphylococcus aureus</i> en células fagocíticas no profesionales (CFNP).	8
Figura 3. Representación tridimensional de la hormona prolactina (PRL) y de su receptor (PRLR).	12
Figura 4. Síntesis de estradiol.	15
Figura 5. Niveles de regulación epigenética.	21
Figura 6. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en células de epitelio mamario bovino.	28
Figura 7. Efecto de la mezcla hormonal de bPRL y E2 sobre la internalización de <i>S. aureus</i> .	29
Figura 8. Estrategia experimental general.	32
Figura 9. Análisis de la expresión del receptor TLR2 en CEMB por efecto de la mezcla hormonal de bPRL y E2 y la infección con <i>S. aureus</i> .	43
Figura 10. Efecto de la mezcla hormonal bPRL y E2 sobre la abundancia en membrana del receptor TLR2.	44
Figura 11. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac).	46
Figura 12. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac).	47
Figura 13. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la acetilación de la K9 en la Histona 3 (H3K9ac).	49
Figura 14. Evaluación del efecto de las hormonas PRL y E2 sobre la acetilación de la lisina 9 de la Histona 3 (H3K9ac).	50
Figura 15. Actividad de HDACs en CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2.	51
Figura 16. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2).	54
Figura 17. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2).	55
Figura 18. Actividad de las KDMs en CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2.	56
Figura 19. Efecto de las hormonas bPRL y/o E2 sobre modificaciones epigenéticas globales en la histona H3 y su efecto sobre la internalización de <i>S. aureus</i> .	69

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación de las HDACs.	23
Tabla 2. Clasificación de las KDMs.	23
Tabla 3. Efecto de las hormonas lactogénicas bPRL y E2 sobre la expresión de genes de la RII en CEMB durante la infección con <i>S. aureus</i>	29
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para realizar los ensayos de expresión de genes relacionados con la RII.	35
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar los ensayos de expresión de los genes que codifican para enzimas relacionadas con modificaciones epigenéticas.	36
Tabla 6. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión de genes citocinas de proinflamatorias.....	41
Tabla 7. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión de genes de citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos.....	42
Tabla 8. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión del gen HDAC1.	52
Tabla 9. Expresión relativa de genes de enzimas epigenéticas KDMs.	57
Tabla 10. Expresión relativa de enzimas epigenéticas en tratamientos de 12 y 24 h.	58

Abreviaturas

CEMB:	Células de Epitelio Mamario Bovino
GAPDH:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
RIL:	Respuesta Inmune Innata
bPRL:	Prolactina bovina
E2:	17 β -Estradiol
RE:	Receptor de Estrógenos
TLR2:	Receptor Tipo Toll 2
IL-10:	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LAP	Péptido Antimicrobiano Lingual
TAP:	Péptido Antimicrobiano Traqueal
FAK:	Cinasa de Adhesión Focal
BNBD4:	Beta defensina de Neutrófilos Bovinos 4
DEFB1:	Defensina Beta 1
BNBD5:	Beta defensina de Neutrófilos Bovinos 5
BNBD10:	Beta defensina de Neutrófilos Bovinos 10
TNF-α:	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
S100A7:	Proteína S100A7 de Unión a Calcio (Psoriasina)
KMD:	Histona Lisina Desmetilasa
JHDM:	Proteína de Desmetilación de Histonas que Contiene el Dominio JmjC
FAD:	Flavín Adenín Dinucleótido
HDAC:	Histona Desacetilasa
KMT:	Lisina Metil Transferasa
DNMT:	DNA Metiltransferasa
HATs:	Histona Acetil Transferasa

RESUMEN

La mastitis bovina (MB) es la inflamación de la glándula mamaria de la vaca, genera pérdidas económicas importantes a nivel mundial, y se clasifica en MB clínica y subclínica. La MB subclínica presenta una mayor complejidad ya que los microorganismos causantes evaden la respuesta inmune innata (RII) del hospedero y dificulta su diagnóstico. *Staphylococcus aureus* se aísla en hasta en un 70% de los casos de MB subclínica, puede internalizarse en las células del epitelio mamario bovino (CEMB) mediante el mecanismo “tipo zipper”. La MB subclínica presenta un aumento en su incidencia durante el parto debido a cambios drásticos en los niveles circulantes de hormonas sexuales, como la prolactina (PRL) y el 17 β -Estradiol (E2), lo cual modifica la RII del hospedero. Las CEMB son blanco de estas hormonas, y se ha demostrado que a concentraciones fisiológicas la PRL bovina (bPRL 5 ng/ml) estimula la internalización de *S. aureus* en las CEMB e induce la expresión de citocinas proinflamatorias e incrementa la abundancia membranar del receptor TLR2, pieza clave en el reconocimiento de *S. aureus*; por otra parte, el E2 (50 pg/ml) disminuye la internalización de la bacteria ya que favorece un efecto antiinflamatorio favoreciendo la expresión de citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos en las CEMB. Además, estas hormonas pueden modular procesos epigenéticos favoreciendo la expresión de genes relacionados con la producción de leche. Sin embargo, se desconocen si los efectos de estas hormonas sobre la internalización de *S. aureus* implican modificaciones epigenéticas en las CEMB, o modifican aquellas inducidas por *S. aureus*, así como el efecto que la mezcla hormonal tiene sobre la RII. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las modificaciones epigenéticas globales de las histonas inducidas por las hormonas bPRL y/o E2 en CEMB infectadas con *S. aureus*. Se analizó la expresión de genes de la RII, y genes de enzimas epigenéticas: histona acetil transferasa (HATs), histona desacetilasa (HDACs) y metil transferasas (KMTs) mediante RT-qPCR. Se evaluó la abundancia membranar del receptor TLR2 mediante citometría de flujo. Se determinaron las modificaciones epigenéticas globales en las histonas (acetilación y metilación) mediante Western blot. Se analizó la actividad enzimática de las HDACs y de las KMTs en CEMB tratadas con bPRL y/o E2 e infectadas con *S. aureus*. Los resultados mostraron que la infección induce la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y que la mezcla hormonal redujo significativamente la expresión de la IL-1 β durante la infección. La mezcla hormonal indujo la expresión de péptidos antimicrobianos como BNBD10, LAP y DEF1, este efecto se mantuvo durante la infección. Por otra parte, se observó que la infección incrementa la abundancia membranar del receptor TLR2 y ésta es aún mayor durante la infección. Al evaluar los efectos a nivel epigenético de estas hormonas solas y en combinación con *S. aureus* se observó que la bPRL disminuye la H3ac; y que el E2 en combinación con *S. aureus* incrementa los niveles de H3ac, sin embargo, los tratamientos con la mezcla hormonal la disminuyen. También se observó que el E2 con y sin infección incrementa la H3K9ac. Por otra parte, se observó una disminución de la actividad de las HDACs en el tratamiento de la mezcla hormonal. Los resultados sugieren que la bPRL genera una compactación en la cromatina y que los tratamientos con E2 y la mezcla hormonal pueden generar una relajación de la misma, ambos efectos pueden estar relacionados con la expresión de genes de la RII. Por otra parte, se encontró que la bPRL incrementa la H3K9me2 y que el E2 incrementa la H3K9me2 con y sin la infección, siendo similar al tratamiento de la mezcla hormonal. También se observó que la bPRL y la mezcla hormonal en combinación con *S. aureus* disminuyen la actividad de las KMTs. En conclusión, las hormonas bPRL y E2 regulan elementos de la RII en las CEMB, mientras modulan marcas epigenéticas de acetilación y dimetilación en la histona H3, lo cual se relaciona con la internalización de *S. aureus*.

Palabras clave: Mastitis bovina, cromatina, modulación epigenética, inmunomodulación, hormonas lactogénicas.

ABSTRACT

Bovine mastitis (MB) is the mammary gland inflammation of cows, which cause significant economic worldwide losses. This disease is classified according to the clinical signs as clinical or subclinical MB, being subclinical mastitis more difficult to control due to the evasion of the innate immune response (IIR) of the host, also difficulting its diagnosis. *Staphylococcus aureus* is the main microorganism isolated from subclinical MB (70% of cases), this bacterium is able to internalize into the cells of bovine mammary epithelium (bMEC) by the zipper-like mechanism. Subclinical MB shows an increase during the peripartum due to drastic changes in the circulating levels of sex hormones, such as prolactin (PRL) and 17 β -Estradiol (E2), which modify the IIR of the host. bMEC are considered target of these hormones, and they effects on IIR and internalization of *S. aureus* have been described. Physiological concentrations of bPLR (5 ng/ ml) stimulate the internalization of *S. aureus* into bMEC and induce the expression of proinflammatory cytokines. In addition, bPRL increases the membrane abundance of TLR2 receptor, which is key in the recognition of *S. aureus*. On the other hand, E2 (50 pg/ml) has anti-inflammatory effects on bMECs, due to its capability to reverse the inflammatory response caused by *S. aureus*, promoting the expression of genes related with anti-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides, which allow a better cell defense, decreasing therefore the internalization of *S. aureus* into bMECs. In addition, these hormones can modulate epigenetic processes favoring the expression of genes related to milk production. However, the effects of these hormones on epigenetic modifications during *S. aureus* internalization into bMECs, as well as the effect of the hormonal mixture on the IIR are unknown. The objective of this work was to characterize the global epigenetic modifications of histones induced by bPRL and/or E2 hormones in bMEC infected with *S. aureus*. The expression of IIR genes and epigenetic enzyme genes: histone acetyl transferase (HATs), histone deacetylase (HDACs) and methyl transferases (KMTs) was analyzed by RT-qPCR. Membrane abundance of the TLR2 receptor was evaluated by flow cytometry. Global epigenetic modifications of histones (acetylation and methylation) were determined by Western blot. The enzymatic activity of HDACs and KDMs were also analyzed. All of these approaches were investigated in bMECs treated with bPRL and/or E2 and infected with *S. aureus*. The results showed that infection induces the expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 but the hormonal mixture significantly reduces the expression of IL-1 β in the presence of infection. Also, the hormonal mixture induced the expression of antimicrobial peptides as BNBD10, LAP and DEFB1, this effect was maintained even with the infection. On the other hand, the infection increased the membrane abundance of the TLR2 receptor, which was enhanced by infection. The epigenetic analysis revealed that bPRL decreases H3ac and that E2 in combination with *S. aureus* increases this level; however, treatments with the hormonal mixture showed a decrease of this mark. E2 with and without infection increases H3K9ac. On the other hand, a decrease in the activity of HDACs was observed in the treatment of the hormonal mixture; however, this decrease was reversed by the infection. This result suggests that bPRL generates a chromatin compactation and that treatments with E2 and the hormonal mixture could generate a relaxation of it, both effects could be related to the expression of IIR genes. Furthermore, it was found that bPRL and E2 (alone) increase H3K9me2 with and without infection, and a similar effect was observed in the treatment with the hormonal mixture. This epigenetic mark has been related to the compaction of chromatin. It was also observed that PRL and the hormonal mixture in combination with *S. aureus* decrease the activity of the KDMs. In conclusion, the hormones bPRL and E2 regulate elements of the IIR in bMECs, modulating epigenetic marks of acetylation and dimethylation in histone H3, which could be related to the internalization of *S. aureus*.

I. Introducción

I.1. Mastitis bovina

La mastitis bovina (MB) es generalmente definida como a inflamación de la glándula mamaria de la vaca generada en respuesta a una agresión que puede ser atribuible a distintos factores, por ejemplo: lesiones químicas, térmicas o mecánicas, o en mayor medida ser causada por una infección microbiana (Thompson-Crispi y col., 2014). Es considerada como una enfermedad compleja por su etiología, patogénesis, y tratamiento. Esta enfermedad genera pérdidas económicas considerables en la ganadería a nivel mundial, debido a la reducción en la producción de leche y a la baja calidad de la misma, lo que ocasiona que sea eliminada, y también a la reducción del valor animal por los altos costos de servicios veterinarios y de los tratamientos terapéuticos, generando un sacrificio temprano de animales y en ocasiones su muerte a causa de la enfermedad (Gomes y Henriques 2015; Gussmann y col., 2019).

Las pérdidas económicas ocasionadas por la MB en Estados Unidos y Europa se estiman en un promedio de 2 billones de dólares anuales (Sharma & Jeong, 2013). México se ubica en el octavo lugar en producción láctea a nivel mundial con aproximadamente 2.5 millones cabezas de ganado bovino (SIAP, 2018). Se estima que la MB impacta gravemente a la economía de los productores mexicanos generando una pérdida económica de aproximadamente \$2,500 pesos por vaca al año (Bedolla y Ponce de León, 2008).

Los microorganismos patógenos causantes de la MB se clasifican como ambientales o contagiosos. Los patógenos ambientales incluyen microorganismos coliformes como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y Estreptococos (*Streptococcus uberis* y *Streptococcus spp.*) y son la principal causa de la mastitis clínica. Por otro lado, los clasificados como patógenos contagiosos son aquellos que pueden propagarse rápidamente contagiando a otras vacas e incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma bovis* (De Vliegher y col., 2012; Schukken y col., 2011; Zadoks y col., 2011).

Los diversos patógenos que pueden causar MB inducen diferentes respuestas inmunitarias en la glándula mamaria; por lo tanto, el hospedero requiere de respuestas altamente específicas dependientes del patógeno para su protección. La MB se clasifica en dos tipos: MB clínica (aguda) y MB subclínica (crónica) (Thompson-Crispi y col., 2014). La mastitis clínica se detecta por los cambios en la apariencia física de la leche, ya que se presentan grumos y sangre, por lo cual puede cambiar el color de la leche; así como por los signos presentes en la ubre tales como hinchazón, enrojecimiento, aumento de la temperatura y presencia de secreciones purulentas. Este tipo de infección es causado principalmente por bacterias coliformes como *Escherichia coli*. En diversos estudios se observó que la MB clínica puede estar relacionada con condiciones ambientales, presentando un incremento en periodos de abundante humedad (Kurjogi & Kaliwal, 2014; Kerro-Dego y col., 2002).

Por otro lado, la MB subclínica es una infección que se desarrolla sin inflamación local, lo cual resulta en la ausencia de signos visuales, por lo tanto, su diagnóstico es más complicado, y se determina por un conteo elevado de células somáticas en la leche mayor a 200,000 células/ml, o bien con métodos basados en cultivos microbianos (Halasa y col., 2009; Hoque y col., 2018). Además, se presenta una disminución en el volumen de la leche producida y una baja calidad en la misma y puede involucrar casos transitorios de inflamación. Si estos signos persisten por más de 2 meses se denomina MB crónica, y se ha observado que tiene asociación con factores como la edad de la vaca (siendo más afectadas las vacas de mayor edad), períodos de lactancia avanzados y los factores ambientales. También se podría correlacionar a la MB subclínica con una disminución de la respuesta inmune innata (RII) y la resistencia de los microorganismos a los tratamientos antimicrobianos por el uso indiscriminado de los mismos para controlar la MB en infecciones anteriores (Lamote y col., 2006; Kurjogi & Kaliwal, 2014; Thompson-Crispi y col., 2014).

Diversos estudios han demostrado que *Staphylococcus aureus* es el patógeno predominante aislado hasta en un 70% de los casos de MB subclínica (Kerro-Dego y col., 2002). Este tipo de mastitis está asociado con desequilibrios en la RII del animal, los cuales pueden deberse, entre otros factores, a cambios drásticos en los niveles hormonales

durante el parto como es el caso de la hormona lactogénica prolactina (PRL) y del estradiol E2 (Akers, 2006; Lamote y col., 2006).

1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia *Staphylococcaceae* de aproximadamente 1 µm de diámetro, no presenta movilidad, es aerobio facultativo y fermentador de glucosa. Su genoma está constituido por un cromosoma circular de aproximadamente 2.8 mpb, además presenta plásmidos y transposones; esta bacteria se encuentra formando parte de la microbiota normal, localizándose principalmente en piel y mucosas (Lowy, 1998; Lakhundi & Zhang, 2018). Sin embargo, cuando las barreras físicas del hospedero se ven comprometidas por lesiones o ante una RII disminuida, *S. aureus* puede colonizar rápidamente los tejidos y ocasionar diversas infecciones graves como: infecciones cutáneas, bacteremias, endocarditis infecciosa, así como infecciones osteoarticulares y en el peor de los casos generar la muerte por choque tóxico (Alva-Murillo y col., 2014; Velázquez, 2005; Lim y col., 2012; Liu y col., 2020). Por otra parte, en mamíferos, este patógeno se ha asociado frecuentemente con infecciones intramamarias en hembras en periodo de lactancia (Bergonier y col., 2014; Liu y col., 2020).

El éxito de *S. aureus* para sobrevivir en condiciones extremas y así poder colonizar y propagarse por diversos tejidos, se debe a que expresa diversos factores de virulencia que le permiten adherirse y colonizar los tejidos para obtener nutrientes, y evadir de manera eficaz la RII del hospedero, generando así infecciones crónicas y recurrentes (Lim y col., 2012; Kong y col., 2016; Lee y col., 2018).

Se ha descrito que las cepas de *S. aureus* pueden ser diversas y heterogéneas genéticamente; dependientes del sitio de su aislamiento, siendo distintos los genes expresados por cepas clínicas de cepas ambientales (Velázquez, 2005; Lim y col., 2012). Los factores de virulencia tales como adhesinas, invasinas, toxinas y modulinas (Figura 1) se expresan de manera diferencial dependiendo de su fase de crecimiento y del entorno inmediato en el que se encuentre la bacteria. La mayoría de estas enzimas funcionan

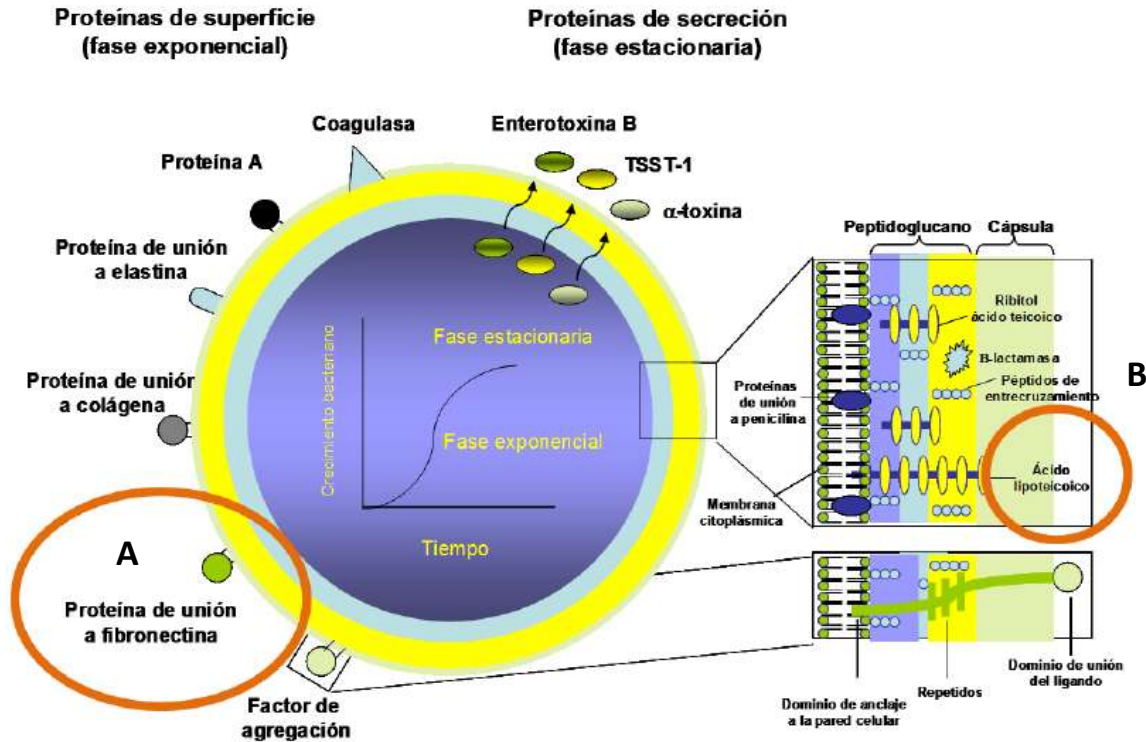


Figura 1. Factores de virulencia y patogenicidad de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* presenta una amplia gama de elementos que le permiten persistir y colonizar diversos tipos de tejidos, causando enfermedades crónicas y recurrentes tanto en la medicina veterinaria, como en la humana, entre las que se encuentran adhesinas, invasinas, toxinas y modulinas. **(A)** Para internalizarse en las células de epitelio mamario bovino (CEMB), la bacteria utiliza principalmente las proteínas de unión a fibronectina, las cuales se expresan mayoritariamente durante la fase de crecimiento exponencial, lo cual incrementa la probabilidad de invasión. **(B)** Mientras que, el ácido lipoteicoico es el que interactúa con los receptores tipo Toll, mediante los cuales la célula hospedera puede reconocer y activar una respuesta inmunológica (Modificado de Lowy, 1998)

mediante la degradación de las moléculas del hospedero o interfiriendo con las cascadas de señalización y las vías metabólicas. Las proteínas de adhesión principalmente se expresan durante la etapa de crecimiento exponencial, para garantizar el establecimiento y permanencia de la bacteria en el tejido, tales como la proteína A, proteína de unión a colágena y las proteínas de unión a fibronectina (FnBPs), las cuales son importantes para la fijación y colonización de la matriz extracelular del hospedero y constituyen un factor importante para la formación de biopelículas (Lowy 1998; Kong y col., 2016; Liu y col., 2020).

Estas proteínas de adhesión le permiten a *S. aureus* interactuar con la integrina $\alpha 5 \beta 1$ de la célula hospedera, a través de su ligando natural, la fibronectina (Fn). Este complejo molecular induce una cascada de señalización formando un andamiaje proteico que genera el rearrreglo del citoesqueleto de actina, formando así un endosoma, en el cual *S. aureus* es internalizado, este proceso le permite evadir la RII y persista dentro de las células sin ser detectada. Este mecanismo se conoce como “tipo-zipper” y es el mejor descrito para la internalización de *S. aureus* (Figura 2) en células fagocíticas no-profesionales, como es el caso de los epitelios, un claro ejemplo de esto son las células de epitelio mamario bovino (CEMB). Debido a lo anterior y a la selección de cepas de *S. aureus* resistentes a los tratamientos antimicrobianos que cada día va en aumento, la tasa de curación de las enfermedades causadas por este microorganismo, entre las que se destaca la mastitis es inferior al 15% (Alva-Murillo y col., 2014; Sharma & Jeong, 2013).

Otros factores de virulencia de *S. aureus* están relacionados con la capacidad de evadir la RII de múltiples formas, incluyendo el bloqueo de la quimiotaxis de leucocitos, la retención de anticuerpos del hospedero, la evasión de la detección a través de la cápsula de polisacárido, la resistencia a la destrucción después de la fagocitosis y la formación de biopelículas. Esto último protege aún más a la bacteria del efecto de los antibióticos, así como de los mecanismos de la RII del hospedero (Tong y col., 2015; Velázquez, 2005; Kong y col., 2016). Recientemente, se ha descrito la aparición de cepas resistentes a meticilina (MSRA), tanto en aislados de la medicina clínica humana, como en aislados procedentes de MB (Lakhundi, S., & Zhang, K. 2018; Hoque y col., 2018).

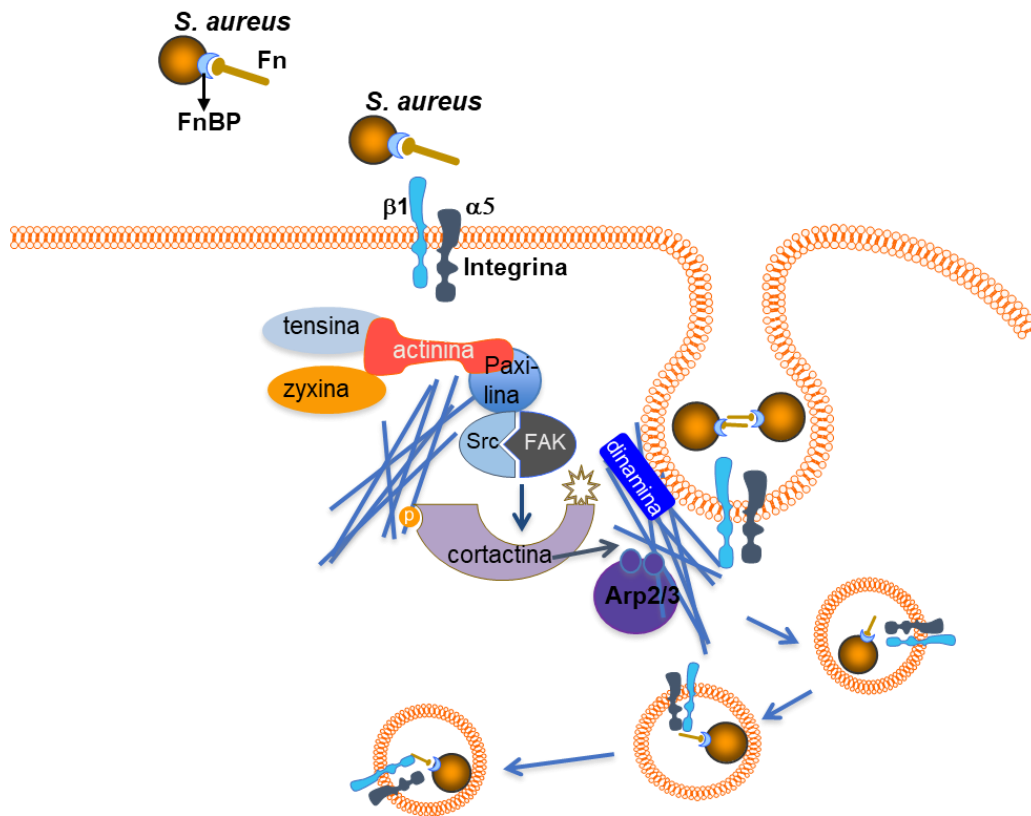


Figura 2. Mecanismo de internalización tipo "zipper" de *Staphylococcus aureus* en células fagocíticas no profesionales (CFNP). Las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) presentes en la superficie bacteriana se unen a la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular, formando un complejo (Fn-FnBP) que es reconocido por los receptores integrinas $\alpha_5\beta_1$, de esta forma *S. aureus* se adhiere a la célula hospedera e induce la formación de focos de adhesión en la subunidad β de las integrinas, donde se reclutan proteínas estructurales, que participan en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la endocitosis de la bacteria, como la cinasa FAK, mismas que favorecen la fosforilación de proteínas efectoras para promover la polimerización de actina y la regulación de la endocitosis (Modificado de Alva-Murillo y col., 2014).

I.3. Respuesta inmune innata de la glándula mamaria

La glándula mamaria está protegida por el sistema inmune innato y adaptativo, que se coordinan y operan juntos para proporcionar una defensa óptima contra los patógenos. El sistema inmune adaptativo, responde de manera más robusta a las amenazas a las que ha estado expuesto anteriormente; sin embargo, es lento para responder a nuevas amenazas. Por el contrario, la RII es la primera línea de defensa contra los patógenos. En el caso de la glándula mamaria incluye barreras físicas, como el esfínter del pezón; barreras químicas, como la queratina que se forma en el orificio del pezón; factores solubles como la lactoferrina (Lf), lisozima, péptidos antimicrobianos, proteínas del complemento; citocinas y quimiocinas. Además, existen elementos celulares como macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células fagocíticas no profesionales como los epitelios y células asesinas naturales. Los procesos de la RII están mediados por receptores que activan cascadas de transducción de señales y, dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos, los patógenos pueden ser eliminados en cuestión de minutos u horas después de la invasión (Alnakip y col., 2014; Oviedo-Boyso y col., 2008; Pereyra y col., 2014).

La glándula mamaria consiste en una unidad productora de leche (alvéolo), un sistema de conductos, una cisterna de glándulas y un pezón. El alvéolo, está formado por células epiteliales secretoras y rodeado por células mioepiteliales. El epitelio mamario al igual que los demás, sirve como primera línea de defensa (barrera física) ante patógenos potenciales que podrían ser causantes de infecciones intramamarias, dado que a través de sus receptores membranales reconoce al patógeno e induce diversas respuestas celulares importantes que conllevan a la eliminación del mismo, capacidad por la cual se les conoce como células fagocíticas no profesionales (Sharma & Jeong, 2013; Tomasinsig y col., 2010; Günther y Seyfert.,2018).

Por lo tanto, las CEMB juegan un papel importante en la RII de la glándula mamaria y aisladas pueden servir como un modelo *in vitro* de mastitis, ya que se ha demostrado que son capaces de responder diferencialmente a estímulos bacterianos, ya sea de microorganismos vivos o muertos, cuando son estimuladas con componentes de la pared

celular bacteriana expresan genes de mediadores de la inflamación para promover la atracción de células especializadas circulantes como son los macrófagos (Hughes & Watson, 2018).

Las CEMB son capaces de discriminar entre componentes propios y extraños, esto se logra al reconocer la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores tipo Toll (TLRs) que se encuentran en su cara apical. La estimulación de diferentes TLRs induce patrones distintos de expresión génica desencadenando una respuesta inmunológica e inflamatoria en el tejido afectado (O'Neill y col., 2009; Vaz y col., 2013; Alva-Murillo y col., 2014).

En bovinos se han descrito 10 tipos de TLRs y se sabe que el principal TLR que reconoce a *S. aureus*, agente causal de la MB subclínica, es el TLR2. Una vez que este receptor reconoce a la bacteria forma homo o heterodímeros con otros TLRs como TLR1, TLR6 o TLR10, generando así la expresión de componentes relacionados con la RII. Para lo cual se activan rutas de señalización que inducen la fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa B (IKKb), ocasionando su disociación del factor nuclear kappa B (NF-kB), lo cual promueve la translocación al núcleo de NF-kB para inducir así la expresión de quimiocinas como IL-8 y citocinas proinflamatorias como *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6* e *IL-12*. Además, está involucrada otra ruta que comprende la fosforilación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK cinasas) p38, JNK y ERK, que activan factores transcripcionales como SP1 y AP-1, que también lleva a la expresión de moléculas relacionadas con la RII (Akira & Takeda, 2004; Vaz y col., 2013; Alva-Murillo y col., 2014; Rainard, 2017; Medina-Estrada y col., 2018).

Las CEMB responden diferencialmente a los patógenos causantes de MB. Por ejemplo, en la MB clínica ocasionada por *E. coli* se induce un aumento significativo en la producción de citocinas proinflamatorias como *TNF- α* , *IL-1*, *IL-6* e *IL-1 β* , lo que contribuye a los signos clínicos de inflamación (aguda) asociados típicamente con la infección de esta bacteria (Rainard y col., 2016; Wellnitz & Bruckmaier, 2012). Mientras que, en los casos de MB subclínica causados por *S. aureus* se ha descrito que la bacteria tiene la capacidad de

bloquear la activación del factor transcripcional NF- κ B, el cual es pieza clave de la respuesta inflamatoria, lo que favorece que la bacteria se internalice en las células y por lo tanto no sea detectada por el sistema inmune del hospedero. A pesar de una respuesta inmune reducida y lenta, hay rutas de señalización que se activan para favorecer la eliminación de la bacteria mediante la expresión de genes relacionados con la producción de péptidos antimicrobianos (*DEFB1*, *LAP*, *TAP*, *BNBD4*, *BNBD5* y *BNBD10*), citocinas (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*), quimiocinas (*IL-8*) y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Se ha reportado que este tipo de mastitis se ve influenciado por la variación de hormonas como la prolactina y el 17 β -estradiol ya que participan en la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Lara-Zarate y col., 2011; Medina-Estrada y col., 2016; Günther & Seyfert, 2018; Thompson-Crispi y col., 2014).

I.4. Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica con un peso de 23 kDa que es sintetizada y secretada principalmente por células especializadas que se encuentran en la hipófisis anterior denominadas lactotropos (Borba y col., 2018). Sin embargo, cuando la PRL se produce en sitios extrahipofisarios como en los ovarios, la próstata, la glándula mamaria, el tejido adiposo, el cerebro y las células inmunitarias puede presentar diversas isoformas y distintos efectos. Se han descrito distintas variantes de esta hormona las cuales derivan de modificaciones postraduccionales, las principales isoformas de la PRL son: la PRL pequeña de ~23 kDa, la PRL grande de ~50 kDa y la macroprolactina (big big) de ~150-170 kDa, las dos últimas presentan una actividad biológica menor (Bole-Feysot y col., 1998; Strachan y col., 2003).

La PRL pequeña está conformada por un total de 227 aminoácidos que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos, una vez que la PRL pierde su péptido señal queda la hormona madura de 199 aminoácidos y es la isoforma con mayor actividad biológica, presenta seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares entre las Cys 4–11, 58–174 y 191–199, lo que le da una conformación de hélice α (Figura 3A). La PRL participa en al menos 200 procesos biológicos distintos, y dentro de su diversidad funcional se le han atribuido

efectos de citocina del tipo TH1 (Bole-Feysot y col., 1998; Lara-Zarate y col., 2011; Borba y col., 2018; Borba y col., 2019; Wang y col., 2016).

Sus diversas funciones biológicas son mediadas a través de un receptor específico, el receptor de PRL (PRLR) (Figura 3B). Este es miembro de la superfamilia de receptores de

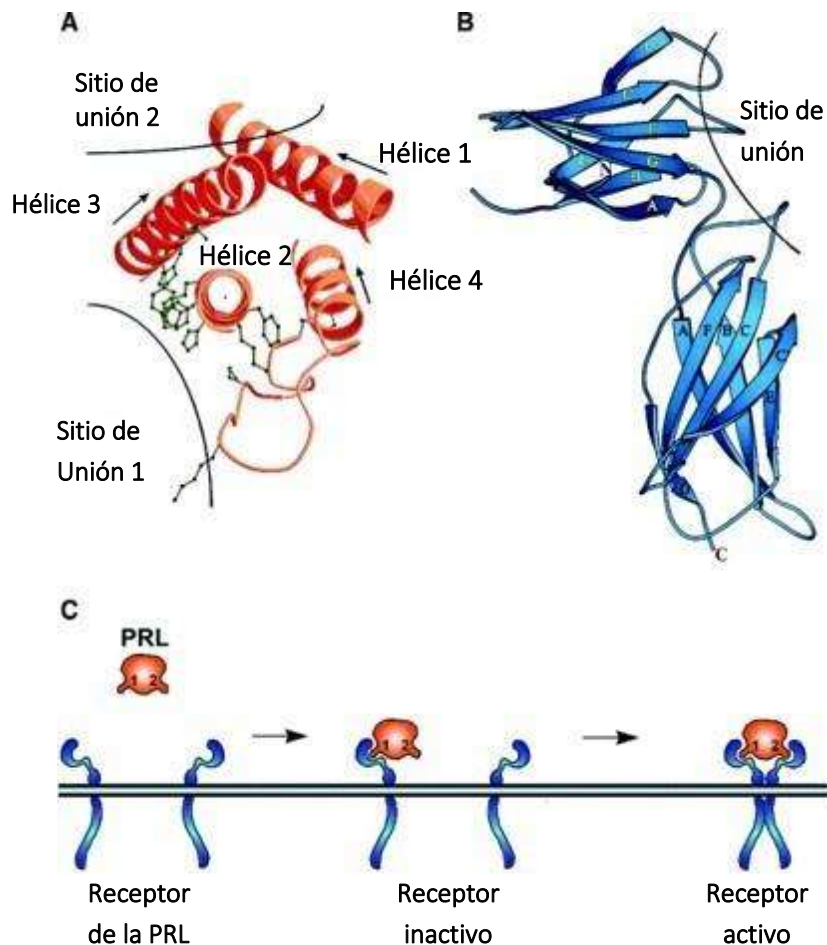


Figura 3. Representación tridimensional de la hormona prolactina (PRL) y de su receptor (PRLR). (A) La prolactina presenta una estructura terciaria con cuatro dominios hélice α , se indica la ubicación de los dos sitios de unión al receptor. (B) Modelo del receptor de PRL (PRLR), el receptor se encuentra formado por láminas β dividido en dos subdominios, se muestra su sitio de unión a la PRL y se ejemplifican los extremos amino y C-terminal indicados por N y C, respectivamente. Las escalas entre A y B son distintas. (C) Activación del receptor de la PRL por dimerización inducida por PRL. La unión de la hormona al PRLR es secuencial. Primero, la hormona interactúa con el receptor a través de su sitio de unión 1, formando un complejo inactivo. Luego, la hormona se une a un segundo receptor a través de su sitio 2, lo que conduce a la homodimerización del receptor y a la formación de un complejo activo (Tomado de Bole-Feysot y col., 1998).

citocinas, es un receptor transmembrana no enzimático de un solo paso que requiere cinasas asociadas para propagar y traducir la señal hormonal en la activación transcripcional de genes diana (Bole-Feyssot y col., 1998; Borba y col., 2018).

Este receptor se encuentra en una amplia variedad de células, las cuales se encuentran relacionadas con el sistema inmune innato, entre las que se encuentran: monocitos, linfocitos, macrófagos, células asesinas naturales, granulocitos y células epiteliales (Jara y col., 2009; Sackmann-Sala y col., 2015; Borba y col., 2018).

La edición alternativa de los genes del PRLR genera diversas isoformas de este, incluyendo una isoforma larga, una isoforma intermedia y una isoforma corta. En bovinos se encuentran las isoformas corta y larga. Estos receptores constan de un dominio extracelular (donde se presenta la unión con su ligando) y se encuentra conservado en todas las variantes de los PRLR, además de una región transmembranal y un dominio intracelular de longitud variable (Figura 3C) (Akers 2006; Qazi y col., 2006; Oakes y col., 2008; Lollivier y col., 2015).

En mujeres la concentración de PRL en suero pueden variar entre 5 y 25 ng/ml en condiciones basales, se pueden encontrar algunas variaciones fisiológicas que se pueden asociar con el ciclo circadiano. Sin embargo, durante el embarazo los niveles de PRL sérica incrementan progresivamente hasta alcanzar niveles de 200-500 ng/ml (Majumdar & Mangal, 2013)

Los estudios funcionales realizados desde el descubrimiento de la PRL han establecido claramente que el papel principal de esta hormona en los mamíferos es inducir la diferenciación de las glándulas mamarias durante el embarazo, permitiendo la proliferación de las células del epitelio mamario y asegurar la producción de leche después del parto. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la señalización del PRLR conduce a la regulación de muchas funciones que se extienden más allá de la mamopoyesis y lactopoyesis, entre las que se incluyen: la reproducción femenina, el recambio óseo, homeostasis hipofisaria, tolerancia a la glucosa, el comportamiento materno, etc. Una de las principales respuestas del epitelio mamario bovino (EMB) tras la activación del PRLR es

la síntesis de caseína de la leche (Raven y col., 2014; Sackmann-Sala y col., 2015; Lollivier y col., 2015).

I.5. Estrógenos

Los estrógenos regulan muchos aspectos del desarrollo y funciones reproductivas, tanto en hembras como en machos de distintas especies. En hembras son producidos principalmente en los órganos sexuales como el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y la placenta. También se producen en menor cantidad en los tejidos no reproductivos, como mama, hígado, glándula suprarrenal o tejido adiposo. Por otra parte, en los machos se produce ~20% de los estrógenos en los testículos y el resto es producido en el tejido adiposo, cerebro, piel y huesos (Cooke y col., 2017; Yang y col., 2017).

La estructura química de los estrógenos se caracteriza por la presencia de cuatro anillos: un grupo fenólico (anillo A), 2 ciclohexanos y un anillo ciclopentano (anillo D). Hay tres tipos de estrógenos fisiológicos: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y estriol (E3), los cuales presentan una configuración química distinta. La estrona (E1) tiene su grupo carbonilo en la posición C17, el estradiol (E2) presenta su grupo hidroxilo en el C17 y el estriol (E3) posee 2 grupos alcohol en los C16 y C17, respectivamente (Medina-Estrada y col., 2018).

Los estrógenos son sintetizados a partir de la ruta del colesterol usando las vías delta 5/4, de donde se derivan los andrógenos como la testosterona, esta última es convertida por la aromatasa (P450aro=CYP19), la cual elimina un carbono y se aromatiza el anillo A, para originar el estradiol (Figura 5). Otra vía de síntesis se presenta mediante la conversión por la aromatasa, una enzima citocromo P450 localizada en el retículo endoplásmico de las células productoras de estrógenos, que cataliza la conversión de androstenediona a estrona y ésta puede convertirse enzimáticamente en 17 β -estradiol y a su vez en estriol (Monteiro y col., 2014; Yang y col., 2017; Medina-Estrada y col., 2018).

I.6. Estradiol

El 17 β -estradiol también conocido como E2 (por sus dos grupos hidroxilo), es una molécula de 18 carbonos y de naturaleza hidrofóbica. Es una hormona esteroide derivada del

colesterol, y es la hormona sexual predominante y el más potente de los estrógenos. Se encuentra presente de manera abundante en el suero sanguíneo durante la etapa reproductiva en las hembras de mamífero. El rango de concentración del estradiol en suero varía según la especie, pero oscila entre los 50 pg/ml en niveles basales, y durante la fase preovulatoria puede alcanzar hasta 1500 pg/ml (Lamote y col., 2006; Medina-Estrada y col., 2018).

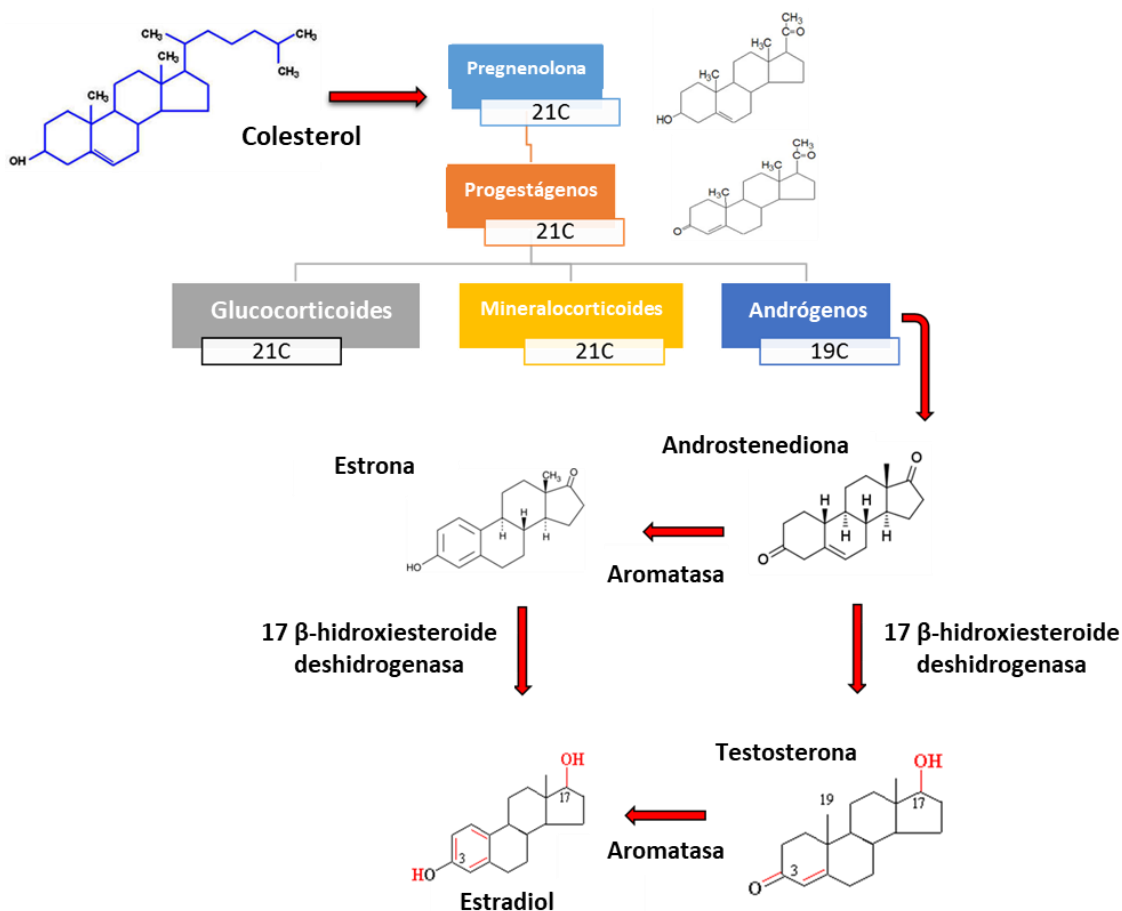


Figura 4. Síntesis de estradiol. La producción de estradiol puede ocurrir en diferentes tipos de células. El estrógeno es un producto derivado del colesterol mediante una serie de reacciones a lo largo de la biosíntesis de estrógenos. La enzima aromatasa participa en el último paso en la síntesis de 17 β-estradiol. La aromatasa es un miembro de la superfamilia del citocromo P450 y se expresa ampliamente en muchos tipos de células. Como resultado de estas reacciones, se produce una molécula de 18 carbonos con dos grupos hidroxilo en su estructura molecular. La molécula resultante también contiene un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un grupo β- hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la característica estructural principal en la cual ocurre la unión selectiva y de alta afinidad a los receptores de estrógenos (Tomado de Medina-Estrada y col., 2018).

Sus principales funciones están asociadas a la reproducción en el desarrollo de los órganos reproductores femeninos y las características sexuales secundarias, aunque también está involucrada con diferentes patologías, por ejemplo el cáncer, inflamación, enfermedades autoinmunes y procesos infecciosos, como lo revela el aumento de las respuestas inflamatorias, infección, sepsis y la mayor tasa de enfermedades autoinmunes en las mujeres en comparación con los hombres en donde la respuesta inmune innata desempeña una función clave (Lamote y col., 2006; Medina-Estrada y col., 2018; Monteiro y col., 2014; Prossnitz & Barton, 2011).

Los principales órganos secretores de esta hormona son los ovarios, la corteza adrenal, testículos, placenta y el tejido adiposo. Los blancos biológicos del E2 son los órganos reproductivos femeninos (ovario, útero y glándula mamaria). Se sabe que el E2 actúa en una gran variedad de poblaciones celulares; sin embargo, sus blancos principales son las células epiteliales (Medina-Estrada y col., 2018). Esta hormona regula la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células epiteliales, procesos íntimamente relacionados con el ciclo reproductivo femenino, como la lactancia o la ovulación. Se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* que el E2 es esencial para el desarrollo del parénquima mamario y de la proliferación de las CEMB. La concentración de E2 varían según la especie y la etapa reproductiva; en hembras de mamíferos oscila entre 50 pg/ml (estándar para la condición basal) y 1500 pg/ml (estándar para la fase preovulatoria) (Lamote y col., 2006; Yart y col., 2012).

La señalización celular del E2 está mediada por los receptores de estrógenos (RE), la distribución del RE varía en función de los tejidos, lo que produce distintos efectos de la hormona en distintos órganos. Los RE contienen dominios estructural y funcionalmente conservados evolutivamente (Paterni y col., 2014); el E2 se une al RE α (565 aa), identificado en útero de rata en 1960, y al RE β (530 aa), que se identificó en la próstata de rata en 1996. Estos receptores pertenecen a la familia de factores de transcripción del receptor nuclear (RN) los cuales funcionan como factores de transcripción o se asocian con otros factores transcripcionales. Los RE están ubicados como monómeros en el citoplasma en complejos proteicos que involucran proteínas de choque térmico como Hsp70 y Hsp90 (Monteiro y

col., 2014). La unión al estrógeno promueve su disociación de este complejo y la dimerización de los mismos (homodímeros de RE α o RE β o heterodímeros de RE α -RE β), ocasionando su activación mediante fosforilación y su consecuente traslocación al núcleo, para regular así la expresión de genes relacionados con las funciones del E2, activando por ejemplo rutas de señalización relacionadas con genes de la RII como las citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias, péptidos antimicrobianos y quimiocinas (Pfaff y col., 2011; Monteiro y col., 2014; Medina-Estrada y col., 2018).

También se sabe que el E2 tiene efectos no genómicos relacionados con la señalización celular, mediados por su unión al receptor acoplado a proteína G (GPR), anteriormente conocido como GPR30 (Prossnitz & Barton y col., 2011). Este receptor presenta 7 dominios transmembrana, y su activación mediada por 17 β -estradiol estimula la producción de cAMP y la movilización de calcio intracelular, la activación de receptores de tirosina quinasa (como EGFR e IGF-IR) y la activación de diferentes vías de transducción (PI3K, Art, MAPK, Scr y PKA/PKC). Por lo tanto, las vías de señalización del GPR también están relacionadas con la regulación de la RII (Medina-Estrada y col., 2018).

I.7. Efecto inmunomodulador de la PRL y del 17 β -estradiol

Se sabe que la homeostasis hormonal ejerce una influencia crucial para lograr un sistema inmunológico competente y saludable. La PRL tiene una función dual ya que actúa como una hormona y una citocina, dependiendo de las concentraciones a las que se encuentre, por lo cual interfiere con la modulación del sistema inmune, inhibiendo principalmente la selección negativa de linfocitos B autorreactivos (Borba y col., 2019).

En el epitelio mamario murino se ha descrito también un efecto inmunomodulador de la PRL en células tratadas con la hormona, se promovió la síntesis de citocinas que podrían estar implicadas en la quimiotaxis de linfocitos T y B hacia la glándula mamaria (Dill y col., 2017). La unión de la PRL a su receptor desencadena diferentes rutas de señalización como: PI3K/Akt, MAPK y JAK/STAT, lo cual influye en la RII, la secreción celular y en la

diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Bole-Feysot y col., 1998; Burton y Erskine, 2003; Borba y col., 2019).

Se sabe que la MB tiene una incidencia mayor durante el periodo seco y de lactancia, periodos que se caracterizan por cambios fisiológicos importantes en las concentraciones de hormonas lactogénicas como la PRL y el E2, la secreción de PRL es estimulada durante la lactancia y sus niveles disminuyen conforme avanza la misma, generando desregulaciones en la RII (Gutiérrez-Barroso y col., 2007; Lacasse y col., 2018; Lamote y col., 2006). Diversos estudios han señalado una relación directa entre los niveles de PRL y enfermedades relacionadas con la RII, el uso de agonistas de la dopamina como la bromocriptina, cabergolina o la quinagolida ha demostrado ofrecer beneficios clínicos y podría ser una terapia prometedora para distintas afecciones, entre ellas la MB, ya que su uso en vacas en el periodo de lactancia tardía y proceso de secado disminuye significativamente las concentraciones de PRL, facilitando así el proceso del secado de la glándula mamaria con lo cual se reduce significativamente el riesgo de infecciones como la MB (Borba y col., 2019; Lacasse y col., 2018; Lacasse y col., 2019)

Otra importante hormona lactogénica de la que se ha demostrado un potente efecto inmunomodulador es el E2, que a concentraciones basales en células mononucleares de recién nacidos (los niveles sanguíneos de estradiol son particularmente elevados al nacer y disminuyen de 10 a 100 veces en 48 h), inhibe la activación de la vía NF- κ B y bloquea la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, por lo cual se considera que el E2 puede participar en la limitación de la RII de los recién nacidos para reaccionar a las infecciones microbianas (Giannoni y col., 2011).

Altos niveles de E2 reducen la abundancia de los TLRs en epitelio endometrial humano. Dicha reducción afecta directamente la interacción patógeno-hospedero (Kovats, 2015). En este contexto se investigó el papel que puede tener el estradiol sobre la secreción de compuestos antimicrobianos por las células epiteliales uterinas humanas, encontrando que el estradiol actúa estimulando la síntesis de las citocinas y quimiocinas CXCL10 y CXCL11 (también conocidas como IL-10 e IL-11, respectivamente), las cuales podrían estar

involucradas en el reclutamiento de células natural killer (NK) necesarias para la respuesta inmune contra patógenos (Wira y col., 2010). Por otra parte, en células del epitelio uterino humano se reportó la actividad antimicrobiana indirecta del 17 β -estradiol contra distintos patógenos, mediante la inducción de la producción de péptidos antimicrobianos (Fahey y col., 2008).

I.8. Epigenética

El término epigenética fue acuñado en la década de 1940 por Conrad Waddington y aplicado a los posibles mecanismos causales que actúan sobre los genes que gobiernan el resultado fenotípico (Zhang y Pradhan., 2014). Posteriormente, Huxley en 1956, redefinió el término cuando se dio cuenta de que la variación en la especificación del fenotipo celular no necesariamente estaba relacionada con la secuencia del gen. Desde entonces, el concepto y la definición de epigenética han evolucionado gradualmente (Triantaphyllopoulos y col., 2016). Actualmente, la epigenética puede ser definida como una serie de cambios en el fenotipo, los cuales pueden ser heredados (en células somáticas) y son provocados por distintos mecanismos que generan cambios en la cromatina y, por lo tanto, regulan procesos moleculares del DNA como la transcripción, replicación y reparación, pero que no involucran cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA y que pueden ser reversibles, además de estar mediados por el ambiente en el que se encuentre la célula (Allis & Jenuwein, 2016; Banta & Richards, 2018).

Las células eucariotas pueden contener grandes cantidades de DNA en el núcleo, lo cual es posible gracias a dos clases de proteínas: las histonas y las proteínas remodeladoras de la cromatina, las cuales compactan el DNA en una estructura altamente organizada llamada cromatina, conformada por nucleosomas, que a su vez se encuentran formados por octámeros de cuatro pares de histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4 en donde se envuelven aproximadamente 147 pares de bases de nucleótidos y un conector adicional, la histona H1 que "sella" el octámero (Portela & Esteller 2010; Bierne y col., 2012; Stephens y col., 2013).

Las modificaciones epigenéticas están altamente reguladas en distintos niveles (Figura 5). En primer lugar, se tiene a la metilación del DNA, la cual consiste en la adición de un grupo metil (CH₃) en la posición 5 del anillo pirimídico de las citocinas. La metilación de citocinas del DNA se asocia con la presencia de islas de dinucleótidos CpG. Dicha metilación está muy extendida en mamíferos y funciona directa o indirectamente en múltiples niveles que generalmente suprimen la transcripción génica, ya que provoca una fuerte compactación de la cromatina. Este también es un mecanismo fundamental que subyace durante el silenciamiento del cromosoma X en células de hembras de mamífero. Existen enzimas encargadas de colocar y mantener las marcas de metilación en el DNA, las cuales se conocen como DNA metiltransferasas (DNMT). Se ha descrito que estas enzimas se encargan de distintas funciones, es así como la enzima *DNMT1* presenta una afinidad mayor hacia el DNA hemimetilado, mientras que la enzima DNMT3a presenta una afinidad mayor hacia el DNA no metilado, solo por mencionar algunas de las enzimas DNMT (Zhang & Pradhan, 2014; Kanherkar y col., 2014; Triantaphyllopoulos y col., 2016).

En segundo lugar, se tiene a las modificaciones postraduccionales de las histonas, dichas modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, que son colocadas o eliminadas de las histonas mediante enzimas específicas. Estas modificaciones están implicadas en diversos procesos del DNA, incluida la reparación, replicación y recombinación, este apartado será descrito con mayor detalle posteriormente (Bannister & Kouzarides, 2011; Triantaphyllopoulos y col., 2016).

El tercer nivel de regulación epigenética comprende a los complejos remodeladores de la cromatina en donde ocurre un reposicionamiento o reestructuración de los nucleosomas dentro de la cromatina para facilitar o inhibir el acceso al DNA cercano, mediado por complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP que mueven, expulsan o reestructuran nucleosomas, estos procesos parece que han evolucionado para adaptarse a los cambios de la cromatina (Ho & Crabtree, 2010).

El cuarto nivel de regulación epigenética se le atribuye a los RNAs lineales no codificantes (lncRNAs), existen varios tipos: como los microRNA (miRNA) y los RNA largos no codificantes

(RNAnc), así como los RNA circulares (RNAc) que consisten en un bucle continuo cerrado. Tienen como característica común que no poseen la capacidad de traducirse a proteínas. Se ha reportado que algunos lncRNAs son capaces de regular diferentes funciones como bloquear la expresión de los genes al unirse a las regiones 3' no traducidas de RNA mensajeros, ocasionando la degradación o inhibición de este. Por otra parte, pueden activar la transcripción celular mediante la formación de una triple estructura de DNA/RNA en su región promotora. Esta estructura sirve para reclutar modificadores de histonas para remodelar la arquitectura local de la cromatina. Dado el gran número de lncRNAs dentro de una célula, estos en general regulan todos los procesos del DNA; por ejemplo, algunos RNA largos son capaces de unirse a complejos modificadores de la cromatina y dirigirlos a diferentes regiones genómicas (Beermann y col., 2016; Triantaphyllopoulos y col., 2016).

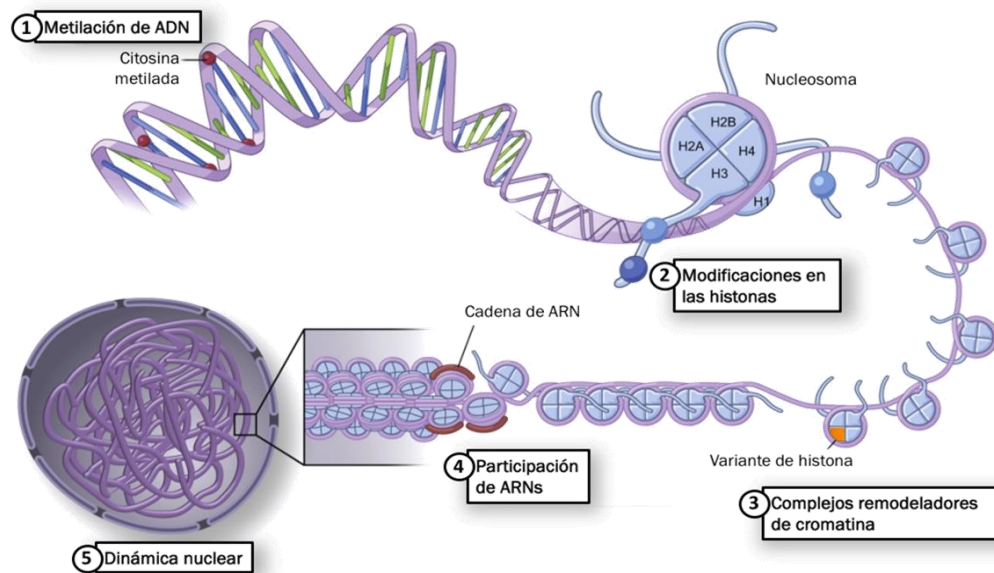


Figura 5. Niveles de regulación epigenética. Las modificaciones epigenéticas están altamente reguladas en distintos niveles, estos incluyen la metilación del DNA, modificaciones covalentes en las colas de las histonas, complejos remodeladores de la cromatina, participación de RNAs no codificantes y la dinámica nuclear (Modificado de Shu-Ching Yan y col., 2010).

En el quinto nivel de regulación epigenética se encuentra la dinámica nuclear de la cromatina. Las regiones más cercanas a la lámina nuclear tienen poca densidad de genes y por lo tanto baja actividad de transcripción, en comparación con las zonas centrales del núcleo en donde se ha encontrado mayor actividad de la expresión génica, así como mayor participación de factores de transcripción; por lo que aquí se llevan a cabo procesos clave como la replicación del DNA y reparación (Shu-Ching Yan y col., 2010).

I.9. Modificaciones covalentes en la cola de las histonas

Investigaciones recientes sobre la epigenética se han enfocado en las modificaciones químicas sobre el grupo amino terminal de algunos residuos de aminoácidos presentes en las histonas, como pueden ser lisinas y argininas. Dichas modificaciones ocurren de manera covalente en las colas de las histonas y principalmente se presentan en las histonas H3 y H4. Estos cambios pueden silenciar o activar la expresión de genes, entre estas modificaciones se tiene las siguientes marcas: metilación, acetilación y fosforilación principalmente; sin embargo, se han descrito algunas otras modificaciones como la ubiquitinación y sumoilación (Yasmin y col., 2015; Triantaphyllopoulos y col., 2016; Fellows & Weisz, 2019).

I.9.1. Marcas de acetilación

La acetilación de histonas neutraliza la carga positiva de las lisinas, lo que altera las interacciones electrostáticas y modifica la capacidad de regular la estructura y la estabilidad de la cromatina, relajándola para adoptar un estado menos compacto, permitiendo así la expresión de los genes (Yasmin y col., 2015). Las enzimas encargadas de catalizar los marcajes de acetilación son las histonas acetiltransferasas (HATs) que funcionan como coactivadores transcripcionales, al adicionar grupos acetilo en numerosas posiciones de las histonas utilizando como cofactor al acetil CoA. Por otra parte, las desacetilasas fungen como represores, al eliminar los grupos acetilo, estas últimas según la homología de sus secuencias se agrupan en cuatro clases (Tabla 1). Las principales marcas de acetilación estudiadas son la acetilación global (H3Kac), la acetilación de la lisina 9 de la histona H3

(H3K9ac) y En la histona H3 se pueden presentar marcas de acetilación o metilación, como la acetilación de la lisina 9 (H3K9ac) y la lisina 14 (H3K14ac) (Bannister & Kouzarides, 2011; Fellows & Weis, 2019).

Tabla 1. Clasificación de las HDACs.

Clases	Elementos	Localización	Cofactor
I	HDAC 1, 2, 3 Y 8	Principalmente en el núcleo	Zn ²⁺
Ila	HDAC 4, 5, 7 y 9	Núcleo y citoplasma	
Ilb	HDAC 6 y 10	Citoplasma	
III	SIRT 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7	Núcleo y citoplasma	NAD ⁺ y/o ADP
IV	HDAC 11	No determinado	

Se muestran los elementos de cada una de las clases de las Histona desacetilasas (HDACs), así como su localización en la célula y su cofactor. Tabla realizada a partir de Fellows & Weisz, 2019 y Alenghat 2015.

I.9.2. Marcas de metilación

Las marcas de metilación son más complejas en comparación con las marcas de acetilación, ya que dependiendo sobre cual residuo de lisina sea colocado el grupo metilo, esta marca será de activación o bien de represión dando lugar a una relajación o una compactación de la cromatina, respectivamente. Por ejemplo, la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3) está fuertemente vinculada con la expresión de genes, mientras que la trimetilación de la histona H3 en las lisinas 9 (H3K9me3) o 27 (H3K27me3) genera marcas represivas de genes (Fellows & Weisz, 2019), reduciendo así la actividad transcripcional del gen metilado. Como se mencionó anteriormente existen enzimas encargadas de colocar y mantener las marcas de metilación en el DNA, las cuales se representan en la tabla 2 (Zhang & Pradhan, 2014).

Tabla 2. Clasificación de las KDMs.

Clasificación	Elementos	Nivel de regulación	Cofactores
KMD1/LSD	LSD1, LSD2	Mono y dimetilación	FAD
Jumonji-C	KDM2/JHDM1	KDM2A, KDM2B	Fe ²⁺ y α-cetoglutarato
	KDM3/JMJD1	KDM3A, KDM3B	
	KDM4/JMJD2	KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM4D	

	KDM5/JARID1	KDM5A, KDM5B, KDM5C, KDM5D	Dimetilación y trimetilación	
--	-------------	-------------------------------	---------------------------------	--

Se muestran los elementos de cada grupo, así como el nivel de regulación sobre el que actúan y el cofactor que utilizan. KDM: Histona lisina desmetilasa. Tabla realizada a partir de Fellows & Weisz, 2019 y Zhang & Pradhan, 2014.

I.10. Procesos epigenéticos relacionados con PRL y 17 β -estradiol

De manera general, se ha descrito que la glándula mamaria (de varias especies de mamíferos) sufre cambios epigenéticos durante los diferentes eventos de proliferación y diferenciación que presenta este tejido a lo largo de la vida de un organismo (Holliday y col., 2018). En particular, en los bovinos se ha reportado que la PRL genera modificaciones epigenéticas asociadas con la expresión de genes de proteínas de la leche como k-caseína, β -lactoglobulina o proteína ácida del suero (WAP), asociadas con la extensiva producción lechera en el ganado bovino y que presenta una influencia de factores como: nutrición, frecuencia de ordeño, fotoperíodo, salud de la ubre, MB y la concentración de las hormonas lactogénicas (Bulger & Groudine, 2010; Singh y col., 2010).

Un ejemplo de lo anterior es la correlación inversa entre la expresión de genes de proteínas de la leche y la metilación del DNA, ya que el promotor de estos genes se encuentra hipometilado, permitiendo así la expresión de dichos genes (Vanselow y col., 2006; Rijnkels y col., 2013; Singh y col., 2010). Además, el efecto de la hormona lactogénica sobre la expresión del gen de la caseína en cultivo celular está relacionada con cambios en las modificaciones de las histonas y el reclutamiento de factores de transducción de señales (Kabotyanski y col., 2006).

Estudios en ratones en donde se monitoreó la metilación del gen α caseína, encontraron que cuando se hipometila el gen se activa su expresión, por el contrario, cuando ocurre la hipermetilación su expresión se ve reprimida, dichos eventos están involucrados con la involución de la glándula mamaria durante el cese de la lactancia (Platenburg y col., 1996; Nguyen y col., 2014).

Por otra parte, se han descrito los efectos de las hormonas lactogénicas PRL y E2 sobre la expresión de genes relacionados con la producción de la leche en células de epitelio

mamario murino y bovino, en donde se encontró que existen incrementos considerables en la acetilación global (H3ac) y en las marcas de metilación relacionadas con una cromatina relajada (H3K4me2); ambas modificaciones se observaron sobre las regiones promotoras de los genes, permitiendo así la transcripción activa de estos, tal es el caso del gen de la caseína, la lactosa y de WAP. Estas modificaciones epigenéticas también fueron evaluadas sobre hepatocitos y fibroblastos, encontrando bajos niveles de H3ac y H3K4me2, además de un incremento sobre los niveles de H3K27me3, lo cual se relaciona con una nula expresión de estos genes en el hígado, donde la región promotora de los genes relacionados con la lactancia se encuentra fuertemente compactada. Lo anterior demuestra que la regulación epigenética específica de estos genes en las CEMB está regulada por las hormonas lactogénicas (Montazer-Torbat y col., 2008; Singh y col., 2010; Rijnkels y col., 2010; Rijnkels y col., 2013).

I.11. Procesos epigenéticos relacionados con las enfermedades infecciosas

Investigaciones recientes han demostrado que la interacción entre patógenos bacterianos y las células hospederas ha proporcionado a las bacterias herramientas potenciales que les permiten remodelar el epigenoma del hospedero, por lo cual se les puede considerar como epimutágenos, ya que afectan la estructura de la cromatina y el programa transcripcional del hospedero epigenéticamente. Esto genera huellas específicas sobre la célula hospedera, que pueden influir sobre la RII que presenta contra los agentes patógenos, la cual puede ser aprovechada por estos para su supervivencia y replicación intracelular y extracelular (Bierne y col., 2012; Hamon & Cossart, 2008).

En las MB clínica y subclínica existe regulación a nivel epigenético que afecta directamente la expresión de genes involucrados en la producción láctea, ya que las bacterias hipermetilan las regiones promotoras de estos genes y ocasionan así una disminución considerable en la producción de la leche (Singh y col., 2010).

La regulación epigenética ocasionada por *S. aureus* en un modelo murino de mastitis indujo la hiperacetilación de H3K9 y H3K14, así como la modulación de la expresión de miRNAs del

hospedero que están relacionados directamente con la expresión diferencial de genes pro y antiinflamatorios (Modak y col., 2014). Por otra parte, en linfocitos bovinos provenientes de vacas con MB subclínica, se observaron altos niveles de H3K27me3, una marca de metilación que está estrechamente relacionada con la compactación de la cromatina y el silenciamiento de genes relacionados con la RII y distintas rutas metabólicas (Le y col., 2016). Además de los procesos epigenéticos que ocurren sobre la modificación en las colas de las histonas, *S. aureus* puede modular epigenéticamente a nivel de microRNAs, los cuales pueden usarse como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la MB subclínica. En las CEMB se ha detectado la presencia de 341 miRNAs que están directamente relacionados con la infección bacteriana y que pueden estar modulando procesos energéticos, distintas rutas de señalización y también estar implicados en procesos relacionados con la RII del hospedero (Li y col., 2015). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes en los cuales se destaque el efecto de las hormonas lactogénicas sobre modificaciones epigenéticas en un modelo de MB subclínica.

II. Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado el papel que juegan las hormonas lactogénicas PRL y E2 durante el establecimiento de la infección de las CEMB por *S. aureus* intracelular, así como su efecto sobre la RII de estas células. Los resultados obtenidos demuestran que concentraciones fisiológicas de PRL bovina (bPRL 5 ng/ml) (Figura 6A) estimulan la internalización de *S. aureus* en las CEMB y en conjunto con la bacteria regula elementos de la RII (Tabla 3), favoreciendo la expresión de citocinas proinflamatorias y disminuyendo la expresión de péptidos antimicrobianos (Gutiérrez-Barroso y col., 2008; Lara-Zarate y col., 2011; Medina-Estrada y col., 2015). Además del efecto que tiene la bPRL sobre la expresión de genes de la RII, se ha descrito que esta hormona regula rutas de señalización en donde participan MAPK y factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B, lo cual está relacionado con la estimulación de la internalización de la bacteria en las CEMB (Lara-Zarate y col., 2011; Medina-Estrada y col., 2015). Además, la bPRL induce un incremento en la expresión del gen del receptor TLR2 y también incrementa la abundancia membranal del mismo, resultando de gran importancia para el reconocimiento de la bacteria, favoreciendo así la internalización de la misma (Medina-Estrada y col., 2015).

Por otra parte, se ha establecido que el E2 a una concentración de 50 pg/ml (Figura 6B) reduce significativamente la internalización de *S. aureus* en las CEMB hasta en un 50% (Medina-Estrada y col., 2016). Aunado a esta disminución de la internalización de la bacteria, el E2 también reduce la producción de mediadores inflamatorios (citocinas proinflamatorias), ya sea basalmente o los inducidos por la infección de *S. aureus* en las CEMB (Tabla 3), mostrando particularmente un efecto antiinflamatorio en este tejido y favoreciendo una respuesta antimicrobiana al inducir la expresión de péptidos antimicrobianos. Estos péptidos pueden tener un efecto directo sobre la viabilidad de la bacteria por lo cual se reduce la internalización, además el E2 modula rutas de señalización y factores transcripcionales que también contribuyen a que se presente una disminución de la internalización de *S. aureus*. Sin embargo, esta hormona no presentó un efecto sobre la abundancia membranal del receptor TLR2 el cual se encuentra directamente relacionado

con el reconocimiento de la bacteria (Medina-Estrada y col., 2016; Medina-Estrada y col., 2018). Además de lo descrito anteriormente, datos no publicados del grupo de trabajo demostraron que la mezcla hormonal de bPRL y E2 tienen un efecto similar al reducir hasta en un 45% la internalización bacteriana (Figura 7), por lo cual se concluye que en el proceso de internalización de la bacteria prevalece el efecto del E2.

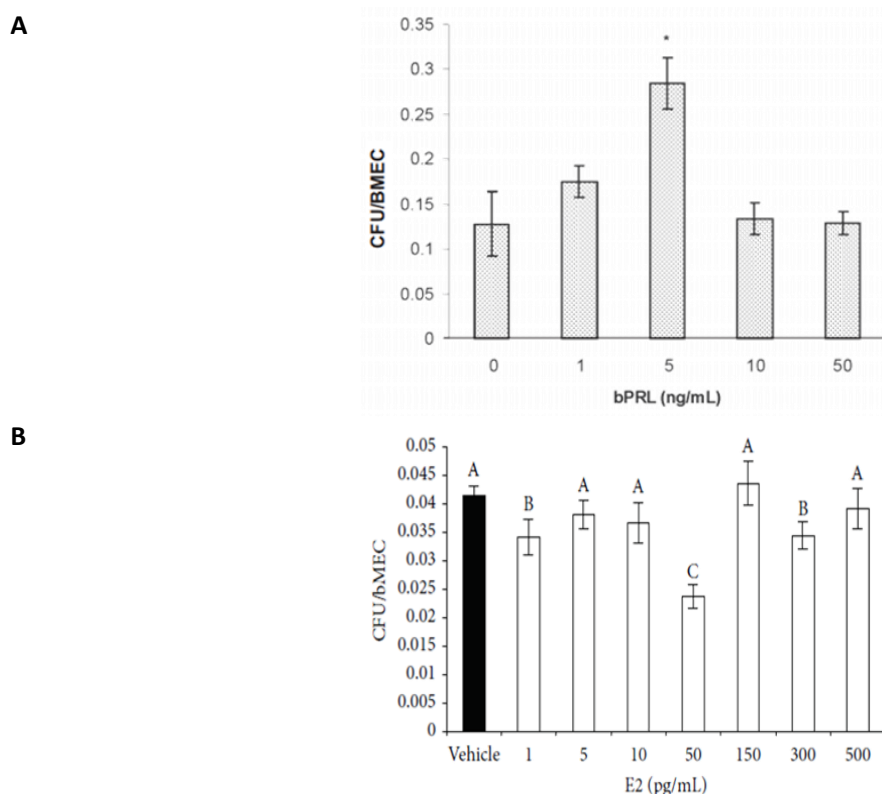


Figura 6. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la internalización de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino. (A) Efecto de la bPRL sobre la internalización de *S. aureus*, se observó que a una concentración de 5 ng/ml aumenta la internalización de *S. aureus*, en comparación de las otras concentraciones analizadas. **(B)** El 17 β -Estradiol a una concentración de 50 pg/ml disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB, en comparación con las otras concentraciones analizadas. Las células fueron tratadas durante 24 h con las hormonas e infectadas con *S. aureus* durante 2 h. Se utilizó como vehículo de la bPRL medio incompleto y para el E2 EtOH al 1%. Se muestran los resultados de la relación de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas por CEMB. Tomado de Ochoa-Zarzosa y col. (2007) y Medina-Estrada y col. (2016).

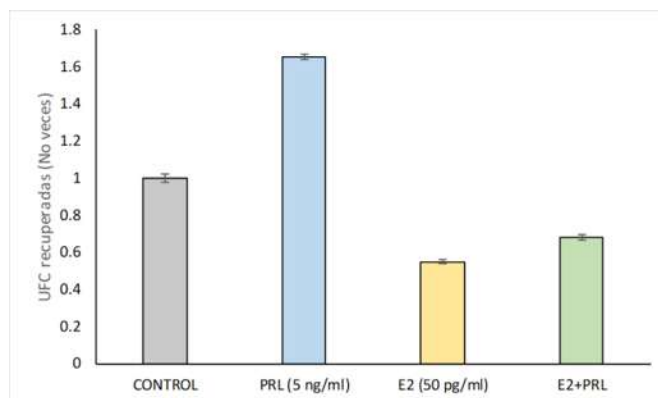


Figura 7. Efecto de la mezcla hormonal de bPRL y E2 sobre la internalización de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino. Se observó que el tratamiento con la mezcla de las hormonas bPRL y E2 a una concentración de 5 ng/ml y 50 pg/ml, respectivamente, disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Las células fueron tratadas durante 24 h con las hormonas e infectadas con *S. aureus* durante 2 h, utilizando como vehículo EtOH al 1%. Se muestran los resultados de UFC recuperadas después de la lisis de las CEMB. (Medina-Estrada 2016; datos no publicados).

Tabla 3. Efecto de las hormonas lactogénicas bPRL y E2 sobre la expresión de genes de la RII en CEMB durante la infección con *S. aureus*.

Hormona	Concentración	Efecto	Referencia
Prolactina bovina (bPRL)	5 ng/ml	▲ TLR-2, TNF- α , IL-8, IL-6 ▼ IL-10, DEFB1	Lara-Zarate y col. 2011 Medina-Estrada y col. 2015
Estradiol (E2)	50 pg/ml	▲ S100A7, IL-10, DEFB1 ▼ IL-1 β , IL-6, TNF- α	Medina Estrada y col. 2016

III. Justificación

Las modificaciones epigenéticas de la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus* se ha estudiado en modelos murinos, resaltando la inducción en la acetilación de histonas de ciertos genes claves de la respuesta inflamatoria (Modak y col., 2014). Por otra parte, se ha demostrado que la bPRL puede ejercer modulación epigenética en el epitelio mamario favoreciendo la expresión de genes de proteínas de la leche (Vanselow y col., 2006; Rijnkels y col., 2013; Singh y col., 2010). Evidencias del grupo de trabajo indican que la bPRL y el 17 β -estradiol regulan la RII de las CEMB, estimulando o inhibiendo respectivamente, la internalización de *S. aureus*. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si los efectos que ejercen estas hormonas pueden implicar modificaciones epigenéticas en las CEMB, o modificar aquellas inducidas por *S. aureus*. De igual forma, se desconoce el efecto que puede ejercer el tratamiento conjunto de estas hormonas sobre la RII de las CEMB. Con base en las modificaciones de las histonas que ya se han detectado en epitelio mamario murino infectado con *S. aureus*, en este trabajo se analizaron este tipo de modificaciones epigenéticas en las CEMB.

IV. Hipótesis

Las hormonas bPRL y el 17 β -estradiol inducen diferencialmente modificaciones epigenéticas en las histonas en células de epitelio mamario bovino durante la infección con *Staphylococcus aureus*, las cuales están relacionadas con su efecto sobre la respuesta inmune innata.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Determinar el efecto de las hormonas prolactina bovina y 17 β -estradiol sobre la RII, así como caracterizar las modificaciones epigenéticas globales de las histonas inducidas por las hormonas en células de epitelio mamario bovino infectadas con *Staphylococcus aureus*.

V.2. Objetivos específicos

1. Analizar la expresión de genes de la RII en CEMB regulados por las hormonas bPRL y 17 β -estradiol durante la internalización de *S. aureus*.
2. Determinar las modificaciones epigenéticas globales en la histona H3 (acetilación y metilación) en CEMB tratadas con bPRL y/o 17 β -estradiol e infectadas con *S. aureus*.
3. Analizar la expresión de las enzimas epigenéticas responsables de las modificaciones en las histonas [histona acetil transferasa (HATs), histona desacetilasa (HDACs) y metil transferasas (KMTs)], en CEMB tratadas con bPRL y/o 17 β -estradiol e infectadas con *S. aureus*.
4. Analizar la actividad enzimática de las histonas desacetilasas (HDACs) y de las lisinas desmetilasas KDMs en CEMB tratadas con bPRL y/o 17 β -estradiol e infectadas con *S. aureus*.

VI. Materiales y métodos

VI.1. Estrategia experimental

Se crecieron células de epitelio mamario bovino (CEMB) a un 80% de confluencia. Se colocaron tratamientos de bPRL a 5 ng/ml, E2 a 50 pg/ml y butirato de sodio (NaB) 3.5 mM, este último se utilizó como control. Se infectaron las CEMB durante 2 h con la cepa ATCC 27543 de *S. aureus*, teniendo una multiplicidad de infección de 30 bacterias por cada célula (Figura 8).

En el cultivo de CEMB sometidos a todos los tratamientos:

- 1.- Se aisló el RNA para evaluar genes de la RII y genes de enzimas epigenéticas modificadoras de la cromatina mediante RT-qPCR.
- 2.- Se realizó la extracción de histonas para evaluar las modificaciones epigenéticas de manera global, mediante Western blot.
- 3.- Se analizó la abundancia de TLR2 en la membrana mediante citometría de flujo.
- 4.- Se evaluó la actividad enzimática de las histonas deacetilasas y de las lisinas desmetilasas utilizando kits.

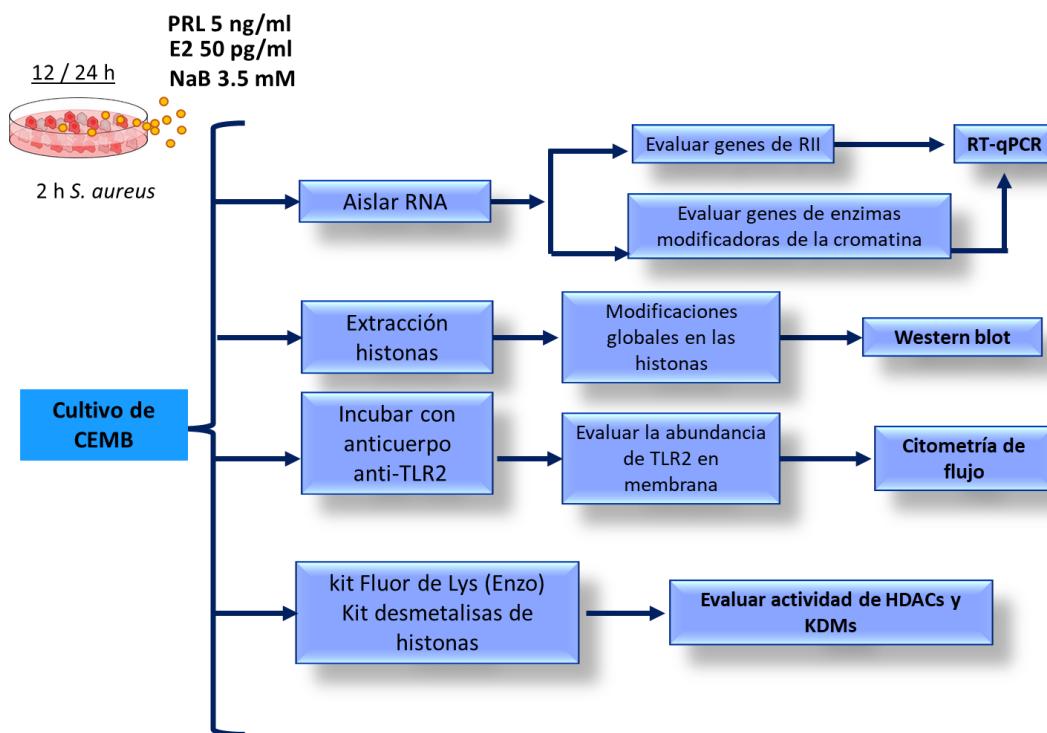


Figura 8. Estrategia experimental general. Desarrollada en el presente trabajo.

VI.2. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

Se utilizaron células de epitelio mamario bovino (CEMB) obtenidas de tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes sanas, las cuales se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente (Anaya y col., 2006). Para su cultivo se empleó la mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma), suplementado con 250 ng/ml de anfotericina B (Invitrogen), penicilina-estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), 5% de suero fetal bovino, 5% de suero de ternera, insulina e hidrocortisona (10 µg/ml de cada una) ajustado a un pH de 7.4. Las células se incubaron a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Las CEMB se crecieron hasta alcanzar un 80% de confluencia para ser utilizadas en las pruebas experimentales posteriores, se utilizaron solo células de los pasajes 4 al 7.

VI.3. Reactivos y cepas

Se empleó la cepa patógena de *S. aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso clínico de mastitis bovina clínica, con capacidad de invadir endotelio y epitelio (Oviedo-Boyso y col., 2008; Ochoa-Zarzosa y col., 2009). La bacteria fue crecida en caldo Luria Bertani (LB) (5 g de NaCl, 10 g de peptona de caseína y 5 g de extracto de levadura, por cada litro de agua, BIOXON), a 37°C durante 18 h. Para los experimentos, el cultivo se ajustó a una D.O. de 0.1 (560 nm), equivalente a 4×10^7 UFC/ml.

Se utilizó el estándar de prolactina bovina (bPRL) producida por A.F. Parlow, del NHPP USA empleando una concentración de 5 ng/ml, en tratamientos de 12 y 24 h.

El 17 β-estradiol fue adquirido de Sigma y disuelto en 1% de etanol. El E2 se empleó a una concentración de 50 pg/ml, en tratamientos de 12 y 24 h. Ambas concentraciones se tomaron con base en los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo (Gutiérrez-Barroso y col., 2008; Lara-Zárate y col., 2011; Medina-Estrada y col., 2016).

VI. 4. Extracción de RNA total y análisis de la expresión de genes relacionados con enzimas epigenéticas y con la RII

Las células se crecieron en placa de cultivo de 6 pozos y se trataron con bPRL (5 ng/ml) y/o E2 (50 pg/ml) durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y se extrajo el RNA total de las CEMB usando Trizol™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las muestras obtenidas se trataron con DNAsa I (Invitrogen) para remover cualquier contaminación con DNA. El RNA se utilizó para sintetizar cDNA, lo cual se realizó por la reacción de transcripción reversa (RT) y se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 25 µg/ml de oligo d(T)15-18 (Invitrogen), 500 nM de dNTP's Mix (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min y después 5 min en hielo. Se centrifugó y se añadieron 4 µl de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditiotreitól (Invitrogen) y 2 U/µl de inhibidor de RNAsa (Invitrogen), luego se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente, se adicionaron 10 U/µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y posteriormente se incubaron a 37°C por 50 min, la reacción se inactivó mediante el calentamiento a 70°C por 15 min. Se confirmó la integridad del cDNA sintetizado por medio de una PCR con oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 0.9 pmol/µl de cada oligonucleótido, 250 ng de cDNA y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes relacionados con la RII (Tabla 4), así como oligonucleótidos específicos para enzimas epigenéticas (Tabla 5); como control interno (gen endógeno) se amplificó el gen de GAPDH.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para realizar los ensayos de expresión de genes relacionados con la RII.

Gen (bovino)	Actividad	Primer	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>DEFB1</i>	Péptido antimicrobiano	D R	CCATCACCTGCTCCTCACA ACCTCCACCTGCAGCATT	185	54	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>BNDB4</i>	Péptido antimicrobiano	D R	GCCAGCATGAGGCTCCATC CGTTTAAATTTAGACGGTGT	278	54	Medina-Estrada y col. 2016
<i>BNBD5</i>	Péptido antimicrobiano	D R	GCCAGCTGAGGCTCCATC TTGCCAGGGCACGAGATCG	143	55	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>BNBD10</i>	Péptido antimicrobiano	D R	GCTCCATCACCTGCTCCTC AGGTGCCAATCTGTCTCATGA	152	54	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>LAP</i>	Péptido antimicrobiano	D R	GCCAGCATGAGGCTCCATC CTCCTGCAGCATTTTACTTGGG CT	194	54	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>TAP</i>	Péptido antimicrobiano	D R	GCGCTCCTCTTCTGGTCCTG GCACGTTCTGACTGGGCATTGA	216	57	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>S100A7</i>	Proteína de unión a calcio	D R	GCAGCTCTCAGCTTGAGCAG CCAGCAAGGACAGGAACCTCAG	221	54	Téllez-Pérez y col. 2012
<i>TLR2</i>	Receptor tipo Toll 2	D R	CGACTGGCCCGATGACTACC TGAGCAGGAGCAACAGGAAGA G	146	58.5	Alva-Murillo y col. 2014
<i>TNF-α</i>	Citocina proinflamatoria	D R	CCCCTGGAGATAACCTCCCA CAGACGGGAGACAGGAGAGC	101	56	Alva-Murillo y col. 2014
<i>IL-1β</i>	Citocina proinflamatoria	D R	GCAGAAGGGAAGGGAAGAAT GTAG CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTA GAA	198	52	Alva-Murillo y col. 2014
<i>IL-6</i>	Citocina proinflamatoria	D R	AACCACTCCAGCCACAAACACT GAATGCCAGGAACCTACCACA A	179	57	Alva-Murillo y col. 2014
<i>IL-8</i>	Citocina proinflamatoria	D R	TTCCACACCTTTCCACCCCAA GCACAACCTTCTGCACCCACTT	149	53.5	Alva-Murillo y col. 2014
<i>IL-10</i>	Citocina antiinflamatoria	D R	GATGCGAGCACCTGTCTGA GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT	129	59	Alva-Murillo y col. 2014
<i>GAPDH</i>	Gen constitutivo	D R	TCAACGGGAAGCTCACTGG CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	57	Téllez-Pérez y col. 2012

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar los ensayos de expresión de los genes que codifican para enzimas relacionadas con modificaciones epigenéticas.

Gen (bovino)	Función	Primer	Secuencia (5' → 3')	Fragmento (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>HDAC1</i>	Histona desacetilasa	D R	TTACGACGGGGATGTTGGAA GGCTTTGTGAGGACCGTTGG	136	62	Este estudio
<i>KMT5C</i>	Lisina metiltransferasa	D R	GGACTGTGTGAGAATGACGA TGGGTCTTGAGGGCAGCTT	248	58	Este estudio
<i>KDM6B</i>	Lisina desmetilasa	D R	CTTTGCCCTTGGGGGCTTG GCATAATACGGTTTGTCGGG	183	56	Este estudio
<i>KDM4A</i>	Lisina desmetilasa	D R	CAGAAATGTGCTTCACCTCG CACCGAGAACACATCCAGTC	178	58	Este estudio
<i>KDM4C</i>	Lisina desmetilasa	D R	GGAACACCCGGTACTACAG CACTTGACTTGCACGACTTC	154	62	Este estudio
<i>DNMT1</i>	DNA metiltransferasa	D R	GATCAAGCGCTGCATCTTGG CCACAAACACCGCATACGAC	197	62	Este estudio
<i>DNMT3A</i>	DNA metiltransferasa	D R	GAGAAAGAGGACATCTTATGG GCAAAATATTCTTCTCAGCG GAG	170	62	Este estudio
<i>GAPDH</i>	Gen constitutivo	D R	TCAACGGGAAGCTCACTGG CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	57	Este estudio

VI. 5. Extracción de histonas de CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2

Para analizar los efectos de las hormonas bPRL y/o E2, así como de *S. aureus* en las modificaciones de histonas de CEMB, se crecieron 4×10^6 células en placas de cultivo y se trataron con bPRL (5 ng/ml) y/o E2 (50 pg/ml) durante 12 o 24 h para realizar la extracción de histonas mediante el protocolo de extracción ácida. Para lo cual las células se lavaron dos veces con PBS frío y se rasparon con una pala de plástico estéril. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 1 ml de buffer hipotónico de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, e inhibidor de proteasas) y se la solución se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml a 4°C. Después se colocó en agitación sobre un rotador durante 30 min a 4°C para promover la lisis de las células en agitación mecánica. Posteriormente la pastilla con núcleos intactos se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 400 µl de H₂SO₄ [0.4 N], y se incubó

durante toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13,200 rpm durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf, para precipitar las histonas se empleó TCA (ácido tricloroacético) al 33%, la muestra se incubó en hielo durante 30 min, y posteriormente se centrifugó la muestra a 13,200 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con 200 µl de acetona fría, entre cada lavado se centrifugó la muestra a 13,200 rpm durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar al aire durante 1 h. La pastilla se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril y se almacenó la muestra a -80°C para su posterior uso.

VI. 6. Análisis de Western blot

Para evaluar las modificaciones de las histonas se realizó un análisis global mediante Western blot. Las muestras de histonas se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 15%, y posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a través de una unidad de transferencia semiseca (Fisher Scientific). Para ello, se equilibró el gel durante 15 min en la solución de transferencia III (0.3 M Tris pH 10.4) y la membrana (previamente hidratada en metanol) en la solución II (0.25 M Tris pH10.4). Se armó el sándwich de transferencia y se dejó correr a 15 V durante 1 h. A continuación, la membrana se bloqueó con leche descremada en polvo al 5% disuelta en PBS frío y se dejó a 4°C toda la noche. La membrana se lavó tres veces con PBS frío, y luego se adicionó el anticuerpo primario (1:1,000) incubando a 4°C toda la noche. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios contra modificaciones específicas: H3ac (Abcam, ab47915) para acetilación global que reconoce modificaciones en K9 + K14 + K18 + K23 + K27 de la histona H3, anticuerpo policlonal de conejo de grado Chip, utilizado a una dilución de 1:1,000. H3K9ac (Santa Cruz, Sc56616) que reconoce las modificaciones de acetilación en la lisina 9 de la histona H3, anticuerpo monoclonal de ratón, utilizado a una dilución de (1:200). H3K9me2 (Abcam, Ab1220) reconoce marcas de dimetilación en la lisina 9 de la histona H3, anticuerpo monoclonal de ratón grado Chip, utilizado a una dilución de (1:1,000). Como control de carga se utilizó el anticuerpo para la histona H3 (Abcam, ab1791), anticuerpo policlonal de conejo utilizado a una dilución de (1:5000). Posteriormente, la membrana se lavó tres veces

con PBS frío, y luego se adicionó el anticuerpo secundario, la membrana se incubó durante 2 h a 4°C con el anticuerpo secundario anti-IgG acoplado a la peroxidasa de rábano (1:3,000) (Cell Signalling Technology). La membrana se lavó tres veces y se agregaron 100 µl de sustrato WesternSure™ ECL. Finalmente, la membrana se colocó entre dos hojas plásticas y se expuso en el equipo iBright CL1500 Imaging System Invitrogen. La intensidad de las señales se cuantificó por densitometría con el software iBright Analysis Software.

VI. 7. Actividad de HDACs

Se evaluó el efecto de las hormonas bPRL y E2, así como la mezcla de estas sobre la actividad de las HDACs mediante el uso del kit Fluor de Lys (Enzo). Este estuche evalúa HDACs de clase I (HDAC1, 2, 3 y 8), IIa (HDAC4, 5, 7 y 9), y IIb (HDAC6 y 10). Para realizar este procedimiento se sembraron 10,000 células/pozo en placas blancas de 96 pozos por duplicado y se sincronizaron durante 16 h con medio incompleto libre de rojo de fenol. Las células fueron tratadas con las hormonas a una concentración de 5 ng/ml de bPRL, E2 50 pg/ml durante 6 y 12 h y como control se utilizó el vehículo de EtOH al 1%. Posteriormente, el medio se reemplazó con 50 µl de sustrato Fluor de Lys y se incubó por 4 h a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se adicionó 25 µl de revelador. Se incubaron por 5 min a 37°C, y posteriormente se agregó 25 µl de buffer de ensayo con 1% del detergente NP-40 y 1 µM de trichostatina A. Se incubaron 10 minutos más y se leyó la fluorescencia a 360 y 460 nm en un lector multimodo flash Varioskan (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como la actividad de las HDACs (Sunkara et al., 2012).

VI. 8. Medición de la abundancia membranal del receptor TLR2 mediante citometría de flujo

Se realizó citometría de flujo (CF), para evaluar la abundancia membranal del receptor TLR2 para lo cual se crecieron 40,000 células en placa de cultivo de 24 pozos que fueron tratadas con la mezcla hormonal de prolactina bPRL (5 ng/ml) y E2 (50 pg/ml) durante 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío y se les añadió 1 ml de tripsina-EDTA (0.25%-0.5 nM respectivamente, Sigma) para despegarlas de los pozos. Se inactivó la tripsina con el mismo volumen de medio DMEM/F12 más suero fetal bovino y se colocó

todo el contenido del pozo en tubos de eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugaron por 10 min a 2,500 rpm a 4°C. Se recuperó la pastilla (células) y se realizaron 3 lavados por centrifugación a 2,500 rpm con 100 µl de PBS frío a 4° C, durante 10 min. Posteriormente, se bloqueó con BSA al 5% en PBS por 30 min en hielo y después se incubó con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti TLR2 [TLR2.1] (Abcam, ab9100) a una dilución de 1:150, diluido en PBS con BSA al 0.1%, durante 2 h a 4°C en agitación. Después de 2 h de incubación, se realizaron 3 lavados por centrifugación y se incubó con el anticuerpo secundario de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína o (FITC) de Cell Signaling Technology a una dilución de 1:100, diluido en PBS con BSA al 0.1% por 1 h en agitación a 4°C y cubierto de la luz. Terminado el tiempo, se hicieron 2 lavados más para quitar el excedente de anticuerpo secundario. Finalmente, se llevó a cabo la medición de la abundancia en membrana de la proteína en un citómetro de flujo BD accuri™ C6, midiendo 10,000 eventos por condición. Los datos se analizaron mediante el software BD accuri™ Software Analysis.

VI. 9. Análisis de datos

Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes por triplicado, y se compararon con análisis de varianza (ANOVA) y una prueba *t* de student. Los resultados se reportaron como el promedio $\pm$ el error estándar (EE) con un nivel de significancia de $P < 0.05$, Para los análisis de qPCR se consideraron que los valores mayores a 2 o menores de 0.5 son estadísticamente significativos en la cantidad de expresión de RNAm.

VII. Resultados

VII. 1. Las hormonas E2 y bPRL inducen la expresión de genes de la RII

Se ha descrito que durante la MB se expresan distintos tipos de genes involucrados en la RII, los cuales suelen ser dependientes del patógeno causante de la infección, ya que representan un mecanismo de defensa por parte de la célula hospedera para tratar de contrarrestar los procesos infecciosos (Schukken y col., 2011).

Para cumplir con el primer objetivo se analizó el efecto de la mezcla hormonal de bPRL y E2 sobre la expresión de genes de la RII en las CEMB durante la internalización de *S. aureus*, se evaluaron distintos genes relacionados con la RII observando un incremento o disminución en sus niveles de expresión, cabe mencionar que el efecto individual de las hormonas fue evaluado con anterioridad por Medina-Estrada (2015 y 2017).

En la tabla 6 se muestra la expresión de genes con actividad proinflamatoria *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-8*. En todos los casos se observó que *S. aureus* induce la expresión de estas citocinas proinflamatorias. En el caso del gen de *TNF- α* se observó un incremento en su expresión por efecto de la infección con *S. aureus* de 2.18 veces, así como por la mezcla hormonal con la infección 3.02 veces. En el mismo sentido, la infección con *S. aureus* indujo la expresión del gen *IL-1 β* 18.3 veces, la mezcla hormonal incrementó la expresión 3.1 veces y la mezcla hormonal con la infección presentó una disminución de casi 10 veces con respecto a las CEMB con infección; lo cual sugiere que la mezcla hormonal en presencia de *S. aureus* tiene un efecto antiinflamatorio.

La expresión de *IL-6* también presentó un incremento en su expresión de 3.5 veces por efecto de la bacteria, el cual se mantuvo con el tratamiento de la mezcla hormonal en combinación con la infección. La expresión de *IL-8* presentó un incremento de 4.9 veces, mientras que durante la infección por *S. aureus*, la mezcla hormonal en combinación con la bacteria también presentó un incremento en la expresión de este gen de 5.83 veces, en el caso de la *IL-6* e *IL-8* los tratamientos con la mezcla hormonal no presentaron un efecto antiinflamatorio, ya que prevaleció el efecto de la infección.

Tabla 6. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión de genes citocinas de proinflamatorias

Actividad	Gen	Tratamientos			
		EtOH	EtOH + S. a.	E2 + bPRL	E2 + bPRL + S. a.
Proinflamatoria	<i>TNF-α</i>	1 ± 0.06 ^a	2.18 ± 0.06^b	2.99 ± 0.07^{ab}	3.21 ± 0.09^{ab}
	<i>IL-1β</i>	1 ± 0.04 ^a	18.33 ± 0.77^d	3.18 ± 0.05^b	8.4 ± 0.26^c
	<i>IL-6</i>	1 ± 0.05 ^a	3.5 ± 0.19^b	1.56 ± 0.05 ^a	3.18 ± 0.11^b
	<i>IL-8</i>	1 ± 0.08 ^a	4.9 ± 0.15^b	0.88 ± 0.05 ^a	5.83 ± 0.04^b

Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 24 h y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR, se muestra la expresión relativa de los genes evaluados utilizando como control de referencia a GAPDH, normalizados con el vehículo etanol sin infección (EtOH). Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA), que se encuentra representado dentro de la columna. Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas, marcadas en negritas. Los resultados se reportan como el promedio ± el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P < 0.05$ n=12.

Por otro lado, se analizó el efecto de la mezcla hormonal de E2 y bPRL sobre la expresión de genes relacionados con citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos. Los resultados se muestran en la tabla 7, se observó que los tratamientos con la mezcla hormonal incrementan la expresión del gen de IL-10 2.23 veces y este incremento se mantiene durante la infección con *S. aureus*. También se observó que el tratamiento con la mezcla hormonal ejerce modificaciones sobre la expresión de los genes relacionados con péptidos antimicrobianos: en el caso del gen BNBD10, éste incrementó su expresión 7.6 veces con la mezcla hormonal y en el tratamiento de la mezcla hormonal en combinación con la bacteria incrementó aún más su expresión ~15 veces.

La expresión de los genes *LAP* y *DEFB1* también presentó un incremento de ~2 veces durante el tratamiento con la mezcla hormonal, efecto que se mantuvo durante la infección. Por otra parte, los genes *BNBD5*, *S100A7* y *TAP* no presentaron diferencias significativas en sus niveles de expresión en ninguno de los tratamientos evaluados.

Tabla 7. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión de genes de citocinas antiinflamatorias y péptidos antimicrobianos

Actividad	Gen	Tratamientos			
		EtOH	EtOH + S. a.	E2 + bPRL	E2 + bPRL + S. a.
Antiinflamatoria y antimicrobiana	<i>IL-10</i>	1 ± 0.02 ^a	1.72 ± 0.09 ^a	2.23 ± 0.05^b	2.03 ± 0.01^b
	<i>BNBD5</i>	1 ± 0.07 ^a	0.59 ± 0.03 ^{ab}	0.64 ± 0.02 ^{ab}	0.60 ± 0.03 ^{ab}
	<i>BNBD10</i>	1 ± 0.04 ^a	1.26 ± 0.06 ^a	7.63 ± 0.02^a	14.90 ± 0.03^a
	<i>S100A7</i>	1 ± 0.04 ^a	1.12 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.01 ^{ab}	0.74 ± 0.007 ^a
	<i>TAP</i>	1 ± 0.05 ^a	0.58 ± 0.02 ^{ab}	0.68 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.02 ^a
	<i>LAP</i>	1 ± 0.04 ^a	0.92 ± 0.06 ^a	2.08 ± 0.11^b	2.33 ± 0.04^b
	<i>DEFB1</i>	1 ± 0.09 ^a	1.76 ± 0.08 ^{ab}	2.22 ± 0.01^b	2.06 ± 0.04^b

Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 24 h y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR, se muestra la expresión relativa de los genes evaluados utilizando como control de referencia a GAPDH, normalizados con el vehículo etanol sin infección (EtOH). Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA), que se encuentra representado dentro de la columna. Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas, marcadas en negritas. Los resultados se reportan como el promedio ± el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P < 0.05$ n=12.

VII. 2. La mezcla hormonal en combinación con *S. aureus* no modifica la expresión del gen de TLR2, pero si incrementa la abundancia membranal del receptor

Los receptores tipo Toll se encargan de sensor el ambiente que rodea a las células que los expresan en su membrana, permitiendo el reconocimiento de componentes específicos de los microorganismos patógenos (Akira y col., 2004). Antecedentes del grupo de trabajo han demostrado que el receptor TLR2 se encuentra implicado en la internalización de *S. aureus*

y que la expresión del gen, así como la abundancia membranal del receptor TLR2 se ve modificada por los tratamientos con las hormonas E2 o bPRL y por la interacción con *S. aureus* (Medina-Estrada y col., 2015; Medina-Estrada y col., 2016). Sin embargo, se desconoce el efecto que puede tener la mezcla hormonal de E2 y bPRL sobre la expresión del gen de TLR2, así como el efecto sobre la abundancia membranal del receptor TLR2. Los resultados obtenidos mostraron que la infección con *S. aureus* sobre las CEMB incrementó la expresión del gen de TLR2 ~2 veces; aunque no se observaron diferencias significativas en el tratamiento con la mezcla hormonal sin infección, ni en el tratamiento de la mezcla hormonal en presencia con la infección por *S. aureus* (Figura 9).

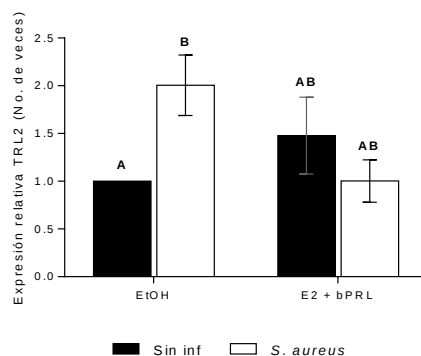


Figura 9. Análisis de la expresión del receptor TLR2 en CEMB por efecto de la mezcla hormonal de E2 y bPRL y la infección con *S. aureus*. Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 24 h, posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus*. El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR, se muestra la expresión relativa del gen del receptor TLR2, utilizando como control de referencia a GAPDH. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA), letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se reportan como el promedio $\pm$ el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. $n=12$.

Por otra parte, se evaluó la abundancia membranal del receptor TLR2 en CEMB tratadas con la mezcla hormonal. Se observó que la abundancia membranal de este receptor aumenta significativamente en ~1.35 veces durante la infección bacteriana, pero el tratamiento con la mezcla hormonal más la infección por *S. aureus* aumentó aún más la abundancia de este receptor, hasta ~2 veces (Figura 10), demostrando que la mezcla hormonal en conjunto con la bacteria modula la presencia de TLR2 en la membrana de las CEMB.

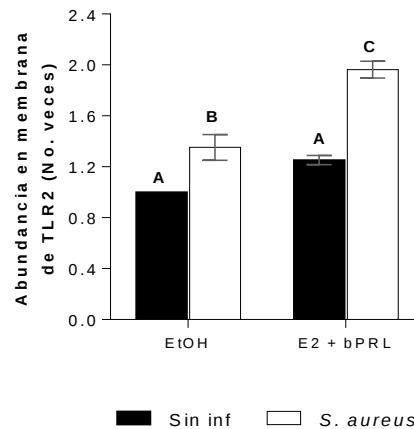


Figura 10. Efecto de la mezcla hormonal bPRL y E2 sobre la abundancia en membrana del receptor TLR2. Se muestra la abundancia en membrana del receptor TLR2, el cual se midió mediante citometría de flujo. Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 24 h, posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus*. La intensidad de fluorescencia se estimó a partir de 10,000 eventos por condición. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA). Las barras representadas con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas, los resultados se reportan como el promedio $\pm$ el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P \leq 0.05$ $n=3$.

VII. 3. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac)

La acetilación de las histonas, especialmente de la histona H3, es un proceso crítico en la activación de la expresión génica, ya que neutraliza las cargas que permiten la unión entre la histona y el DNA, por lo cual se facilita el acceso de la maquinaria de transcripción, favoreciendo así la expresión de ciertos genes. Para cumplir con el objetivo número dos que fue determinar las modificaciones epigenéticas globales en las histonas (acetilación y metilación) en CEMB tratadas con bPRL y/o E2 e infectadas con *S. aureus*, se realizaron análisis de Western blot empleando un anticuerpo que reconoce de manera global las marcas de acetilación en la histona H3. Este anticuerpo reconoce las marcas que se colocan sobre todas o alguna de las lisinas que se enlistan a continuación: K9, K14, K18, K23 y K27, lo cual permite determinar de manera general el efecto que las hormonas solas o la mezcla de ellas, así como de la infección con *S. aureus* sobre la acetilación global de la histona H3.

Para evaluar esta modificación, las CEMB se trataron con las hormonas bPRL y/oE2 durante 12 o 24 h a las concentraciones descritas. Posteriormente, se realizó la infección con *S. aureus* durante 2 h a una multiplicidad de infección de 30:1, se utilizó como vehículo del E2 etanol (EtOH) al 1% y butirato de sodio (NaB 3.5 mM), control positivo de la acetilación, el NaB es un inhibidor de las HDACs al bloquear el sitio activo de la enzima. Posteriormente, se obtuvieron las histonas mediante extracción ácida, se separaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron las histonas a una membrana de PVDF para realizar el Western blot. Los tratamientos fueron normalizados con respecto al vehículo de cada hormona, en el caso de la bPRL fue medio incompleto (MI) y para el E2 se utilizó EtOH al 1% como vehículo.

VII. 3.1. La bPRL disminuye la acetilación global de la histona H3

Los resultados mostraron que cuando las células se trataron con bPRL durante 12 h no se presentaron cambios significativos en los niveles de acetilación global con respecto al vehículo (MI) (Figura 11A). El NaB, usado como control positivo de acetilación indujo un incremento del 50% con respecto al MI en la acetilación global, cuando las células fueron desafiadas con *S. aureus*.

Por otra parte, cuando las células se trataron con bPRL durante 24 h y se infectaron con la bacteria se observó una disminución del 50% en la acetilación global de H3 con respecto al MI sin infección (Figura 11B), también se observó un incremento en los niveles de acetilación global en el control con NaB de hasta ~60% y ~30% con y sin infección por *S. aureus*, respectivamente.

VII. 3.2. El E2 y la mezcla hormonal en conjunto con *S. aureus* modulan la acetilación global de la histona H3

También se evaluó el efecto que ejerce el E2 y la mezcla hormonal sobre la acetilación global, encontrando que en células tratadas durante 12 h con E2 infectadas con *S. aureus* se incrementaron los niveles de acetilación global hasta un ~35%, resultado similar al que presentó la mezcla hormonal en conjunto con la bacteriana, ya que incrementó ~30% (Figura 12A), con respecto al vehículo (EtOH) sin infección.

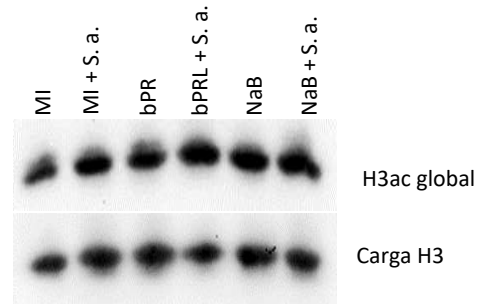
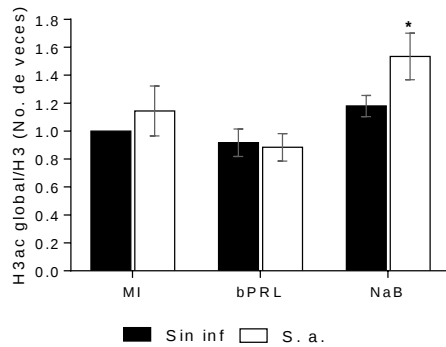
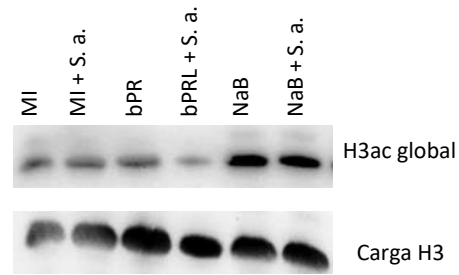
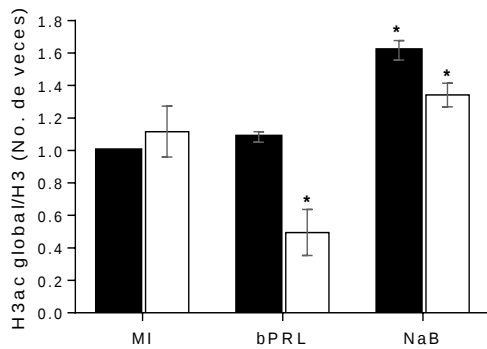
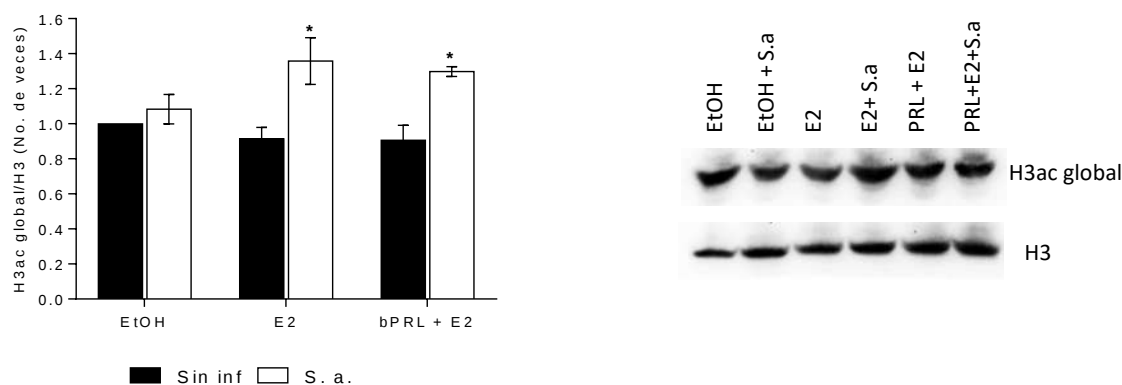
A**B**

Figura 11. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL o butirato de sodio 3.5 mM y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (*S. a.*). Después, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3. Derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Se utilizó NaB como control positivo de acetilación. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo que fue medio incompleto (MI). Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

Por otra parte, cuando las células fueron tratadas bajo las condiciones anteriores, pero durante 24 h se observó un incremento de ~20% en la acetilación global en el tratamiento con la infección; en el caso del E2 en combinación con la infección se mantuvo el incremento de esta marca, pero a niveles más bajos ~15%. Mientras que en el caso de la mezcla hormonal en presencia de la infección se observó una disminución de la acetilación de ~15%

(Figura 12B). Por lo tanto, se sugiere que el incremento en la acetilación global en el tratamiento de E2 es debido a la infección por *S. aureus*; sin embargo, también se observó que la mezcla hormonal en combinación con *S. aureus* tiende a disminuir los niveles de acetilación global. Lo que sugiere una modulación sobre la H3ac por parte de *S. aureus* dependiente del tratamiento con E2 y con la mezcla hormonal.

A



B

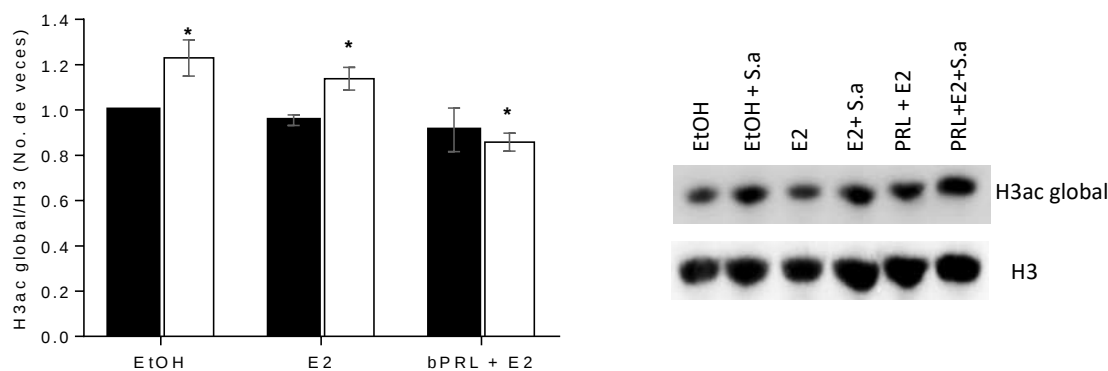


Figura 12. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación global de la histona H3 (H3ac). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL, vehículo (EtOH 1%), 50pg/ml de E2 y la combinación de ambas hormonas y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). Después, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3. Derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo EtOH sin infección. Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

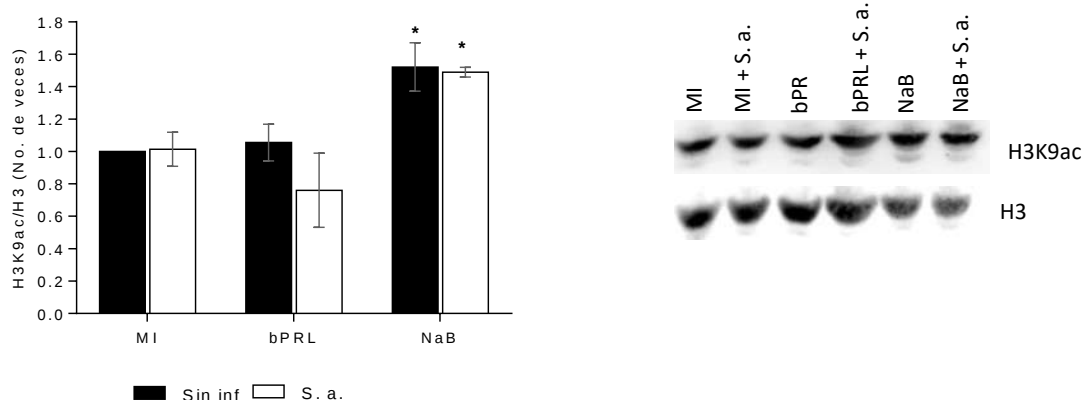
VII. 4. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac)

De acuerdo con los resultados obtenidos al evaluar la acetilación global de la histona H3, donde se observaron cambios significativos dependientes de las hormonas en combinación con la bacteria, se decidió evaluar una marca epigenética más específica como lo es la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac), la cual se relaciona con efectos de relajación de la cromatina.

VII. 4. 1. La bPRL disminuye la acetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9ac)

Los resultados mostraron que cuando las células se trataron con bPRL durante 12 h y posteriormente se infectaron con *S. aureus* se presentó una tendencia a la disminución de la H3K9ac de hasta ~20% con respecto al control (MI) (Figura 13A), aunque esta no fue significativa estadísticamente. Por otra parte, cuando las células se trataron con bPRL durante 24 h en ausencia o presencia de la infección se observó una tendencia a disminuir la H3K9ac hasta ~20% (Figura 13B); en los tratamientos con NaB se observó un incremento significativo de hasta ~50% y de ~2 veces a las 12 h y 24 h, respectivamente.

A



B

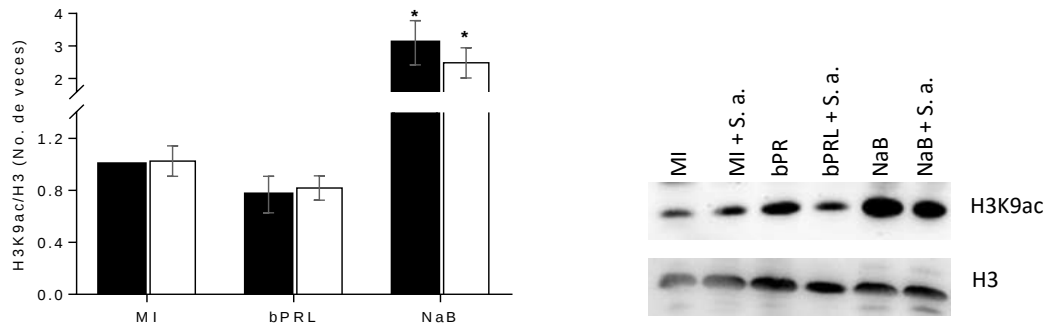
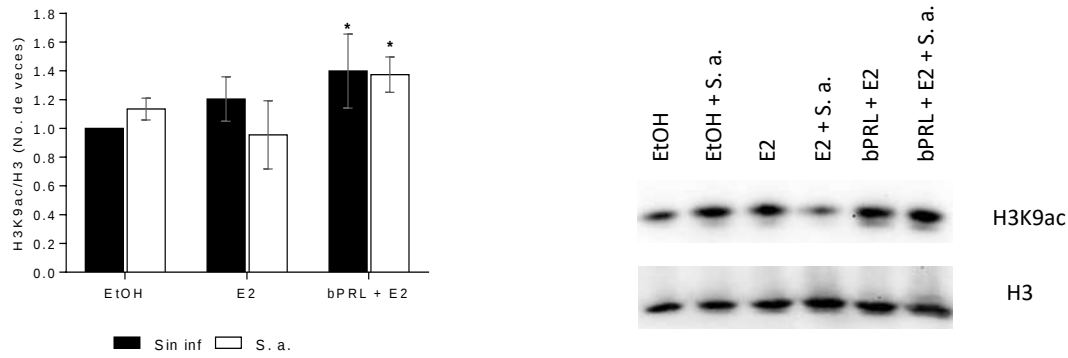


Figura 13. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la acetilación de la K9 en la Histona 3 (H3K9ac). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL o butirato de sodio 3.5 mM y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (*S. a.*). Después, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Se utilizó NaB como control positivo de acetilación. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo que fue medio incompleto (MI). Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

VII. 4.2. El E2 y la mezcla hormonal incrementan la acetilación de la lisina 9 de la histona H3

En las células que fueron tratadas con E2 durante 12 h sin y en presencia de la infección no se observaron cambios significativos de esta marca. Sin embargo, en los tratamientos con la mezcla hormonal durante 12 h se observó un incremento en la H3K9ac de ~40% en ausencia y presencia de la infección, dicho incremento es atribuible al efecto de las hormonas (Figura 14A). En los tratamientos de 24 h con E2 se observó un incremento de ~20% y ~25% en ausencia y presencia de la infección, respectivamente; no se hubo cambios significativos con el tratamiento de la mezcla hormonal (Figura 14B).

A



B

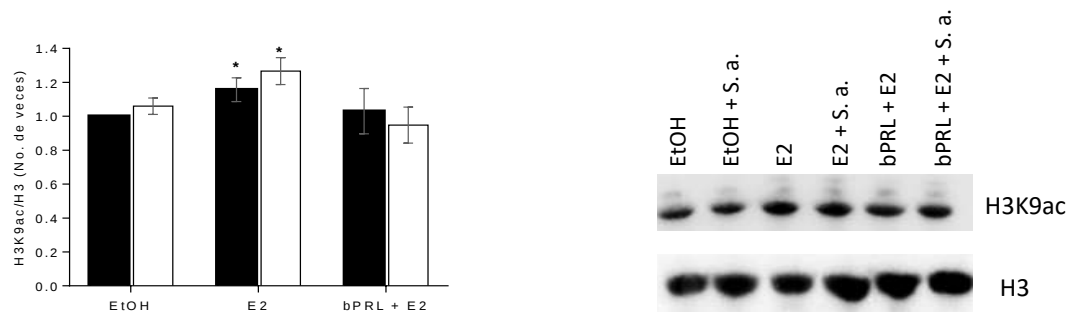


Figura 14. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la acetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL, vehículo (EtOH 1%), 50pg/ml de E2 y la combinación de ambas hormonas y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). Después, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3. Derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo EtOH sin infección. Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

VII. 5. La mezcla hormonal de bPRL y E2 disminuyen la actividad de las HDACs

Para correlacionar los resultados de acetilación obtenidos en los ensayos de Western Blot y evaluar si las hormonas o la infección por *S. aureus* están relacionados con la actividad enzimática de las HDACs, se utilizó el kit Fluor de Lys® para realizar la medición de la actividad de las HDACs en tiempos de 6 y 12 h. Para ello, se trataron las células con las hormonas bPRL y/o E2 y posteriormente se infectaron con *S. aureus* durante 2 h. No se detectaron cambios significativos en los tratamientos de bPRL y E2 de manera individual

(Figura 15A). Sin embargo, en el tratamiento de la mezcla hormonal de bPRL y E2, tanto a las 6 como a las 12 h disminuyó la actividad de las HDACs (Figura 15B) de ~23% y ~15%, respectivamente. Como control positivo de la inhibición de las HDACs se utilizó tricostatina A (TSA), debido a que es un inhibidor selectivo de las HDACs de clase I y II, donde se observó una actividad de las HDACs muy baja.

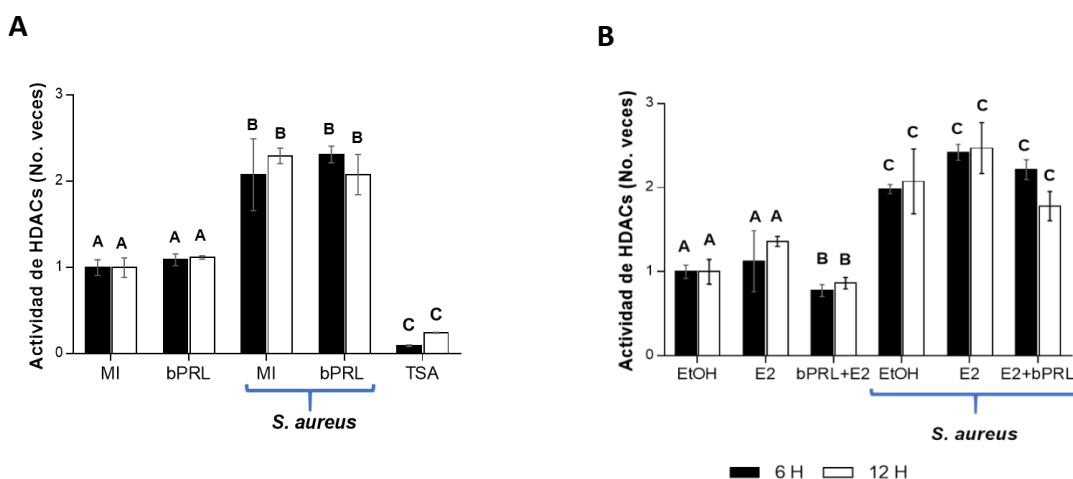


Figura 15. Actividad de HDACs en CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2. Las células fueron tratadas durante 6 y 12 h con 5 ng/ml de bPRL, Vehículo (EtOH 1%), 50 pg/ml de E2 y la combinación de ambas hormonas. Posteriormente, se infectaron por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus*. Después se evaluó la actividad de las HDACs mediante el uso del kit Fluor de Lys (Enzo). **A)** Evaluación del efecto de la bPRL sobre la actividad de las HDACs, normalizado con respecto al vehículo medio incompleto (MI) sin infección. **B)** Evaluación del efecto del E2 y de la mezcla hormonal sobre la actividad de las HDACs, valores normalizados con respecto al vehículo EtOH sin infección. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes $\pm$ EE, las letras sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, ANOVA).

VII. 6. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la expresión de genes de enzimas epigenéticas

Para dilucidar la contribución de los genes de las HDAC de las clases I-IV o de la clase de las sirtuinas y evaluar cuales participan en los cambios observados en los ensayos de actividad de HDACs y Western blot descritos anteriormente, se comenzó por evaluar la expresión del gen HDAC1. Los ensayos de expresión se realizaron por PRC en tiempo real en la (Tabla 8), se muestran los resultados del gen HDAC1 que codifica para la enzima histona deacetilasa 1.

Tabla 8. Efecto de las hormonas E2 y bPRL sobre la expresión del gen HDAC1.

Tratamientos	HDAC1	Tratamientos	HDAC1
12 h		24 h	
MI	1 ± 0.02 ^a	MI	1 ± 0.01 ^a
MI + S. a.	4.48 ± 0.2 ^b	MI + S. a.	0.57 ± 0.01 ^a
bPRL	2.3 ± 0.18 ^b	bPRL	0.66 ± 0.004
bPRL + S. a.	0.46 ± 0.12 ^c	bPRL + S. a.	0.45 ± 0.04 ^c
EtOH	1 ± 0.13 ^a	EtOH	1 ± 0.01 ^a
EtOH + S. a.	1.6 ± 0.16 ^a	EtOH + S. a.	0.86 ± 0.06 ^a
E2	1.02 ± 0.10 ^a	E2	0.58 ± 0.03 ^a
E2 + S. a.	1.44 ± 0.18 ^a	E2 + S. a.	0.75 ± 0.02 ^a
bPRL + E2	1.34 ± 0.15 ^a	bPRL + E2	1.17 ± 0.01 ^a
bPRL + E2 + S. a.	1.27 ± 0.16 ^a	bPRL + E2 + S. a.	0.68 ± 0.009 ^a

Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 12 o 24 h y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a.). El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR, se muestra la expresión relativa de los genes evaluados utilizando como control de referencia a GAPDH, normalizados a su respectivo vehículo medio incompleto (MI) sin infección y etanol sin infección (EtOH). Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA) que se encuentra representado dentro de la columna. Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas, marcadas en negritas. Los resultados se reportan como el promedio ± el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P \leq 0.05$ n=12.

En los tratamientos con las hormonas a las 12 h, la infección con *S. aureus* aumentó la expresión del gen HDAC1 4.5 veces, así como en el tratamiento con bPRL donde se incrementó la expresión del gen 2.3 veces. Por otra parte, se observó que la bPRL en combinación con la infección disminuyó la expresión del gen, ya que se observó una expresión de 0.46 veces. Por otra parte, se presentó un efecto similar en al tratamiento de 24 h con bPRL en conjunto con la bacteria ya que solo se expresó 0.45 veces este gen

VII. 7. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2, sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2)

Generalmente los cambios en los niveles de acetilación de las histonas (inducción o inhibición) suelen estar relacionados con los niveles de metilación (principalmente asociados con la represión de la cromatina), por lo que se decidió evaluar el efecto que tienen las hormonas bPRL y E2 sobre la marca de dimetilación de la lisina 9 de la histona H3, la cual se ha relacionado con la compactación de la cromatina.

VII. 7. 1. La bPRL incrementa la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2)

Los resultados mostraron que la infección aumentó ~ 70% la H3K9me2; mientras que a las 12 h de tratamiento con bPRL con o sin infección aumentó ~30% en ambos casos (Figura 16A). Por otra parte, en las células que fueron tratadas durante 24 h se observó un incremento de ~25% en el tratamiento con bPRL (Figura 16B). En los tratamientos con NaB no se observaron cambios significativos en esta marca epigenética.

VII. 7.2. El E2 y la mezcla hormonal incrementan la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2)

En el caso de las células que fueron tratadas con E2 durante 12 h se observaron cambios significativos incrementando los niveles de dimetilación en un 50%, y en combinación con la infección se presentó un aumento de ~140%. Por otra parte, en el tratamiento con la mezcla hormonal se presentaron resultados similares al del E2, ya que se incrementó ~40% la marca con la mezcla, mientras que en presencia de la bacteria el incremento fue de ~140% (Figura 17A).

Por otra lado, a las 24 h se observaron cambios significativos en el tratamiento de E2 en combinación con la infección incrementando ~40% esta marca; sin embargo, con la mezcla hormonal disminuyó ~20% y ~30% en ausencia y presencia de la infección, respectivamente (Figura 17B). Lo anterior sugiere que los efectos de las hormonas son dependientes del tiempo de tratamiento.

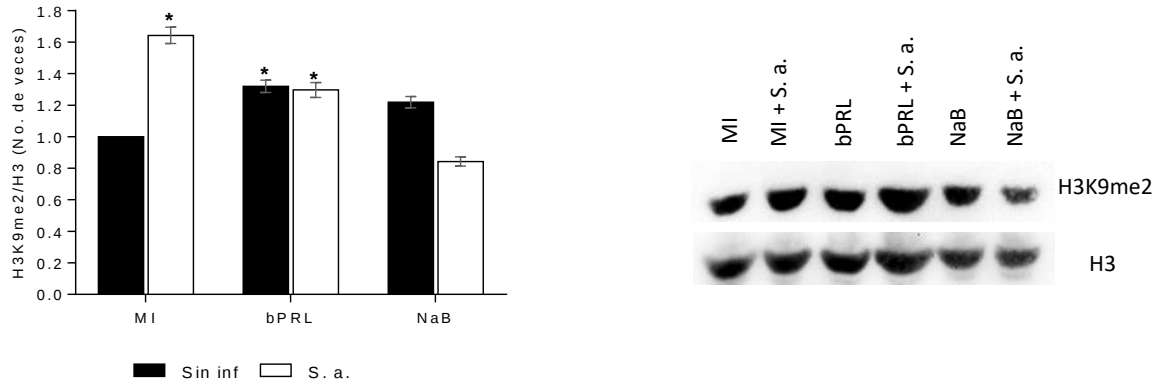
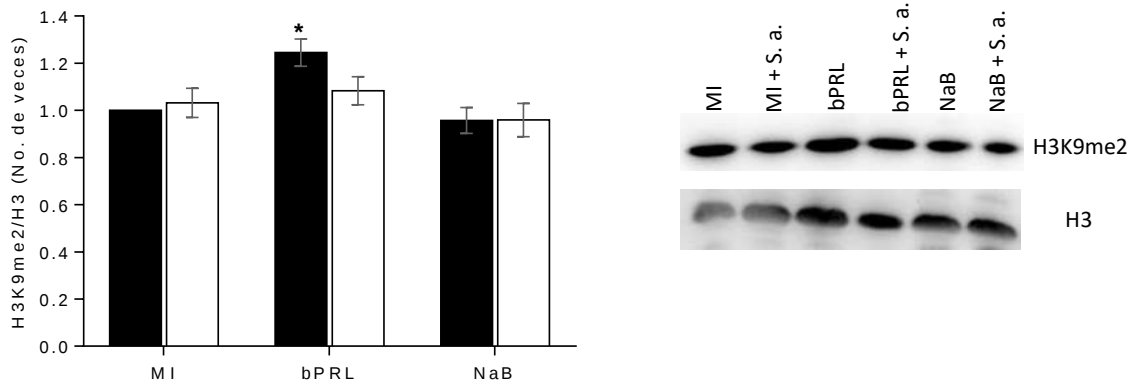
A**B**

Figura 16. Evaluación del efecto de la bPRL sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL o butirato de sodio 3.5 mM y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a.). Después, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3. Derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo que fue medio incompleto (MI). Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

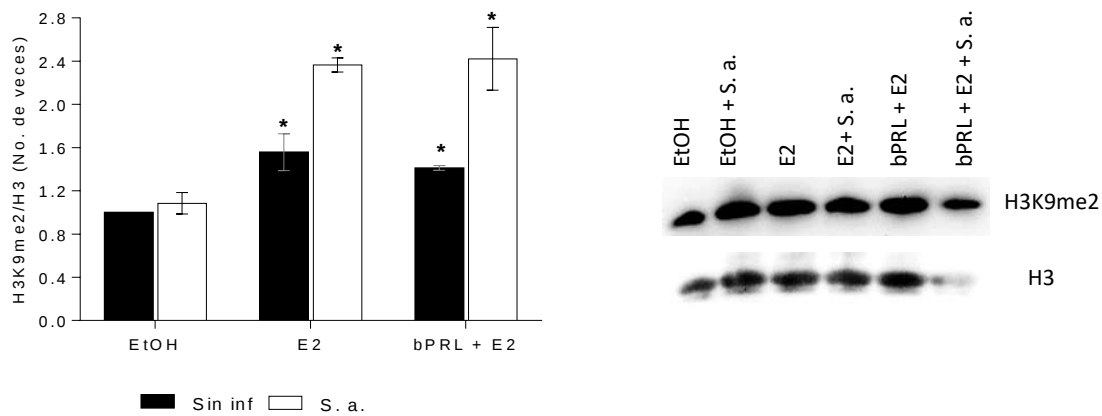
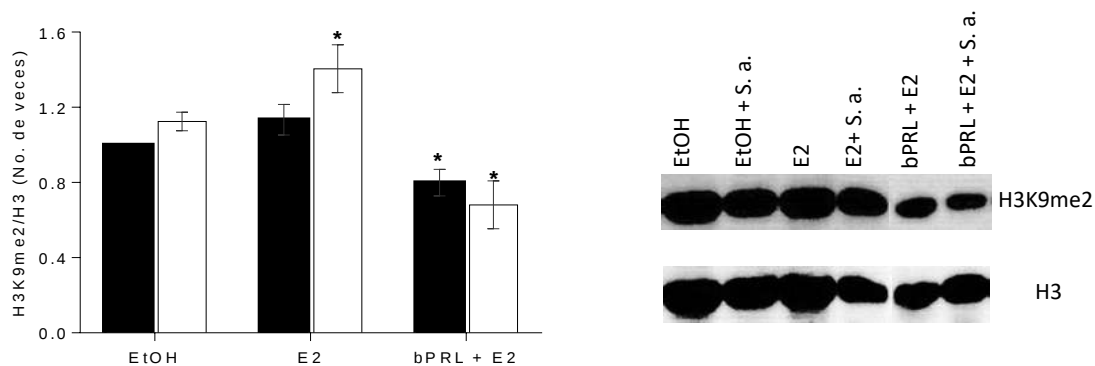
A**B**

Figura 17. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la dimetilación de la K9 de la histona H3 (H3K9me2). Se extrajeron histonas de células sin tratamiento y tratadas por 12 y 24 h con 5 ng/ml de bPRL, vehículo (EtOH 1%), 50pg/ml de E2 y la combinación de ambas hormonas y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). Posteriormente, se separaron en un gel SDS-PAGE y se realizaron los ensayos de Western blot. **A)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 12 h. **B)** Izquierda: análisis densitométrico con respecto al nivel de expresión de la H3, derecha: imagen representativa de Western blot 24 h. Los niveles de H3 fueron utilizados como control de carga. Los valores fueron normalizados respecto al vehículo EtOH sin infección. Cada barra muestra el resultado de cuatro experimentos independientes $\pm$ EE. El símbolo “*” sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, T-student).

VII. 8. Evaluación del efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la actividad de las histonas lisinas desmetilasas (KDMs)

Para correlacionar los resultados de dimetilación obtenidos en los ensayos de Western blot y evaluar si el efecto de las hormonas o la infección está relacionado con la actividad enzimática de las KDMs, se evaluó la actividad de estas enzimas responsables de quitar los grupos metilo de las histonas.

Los resultados mostraron que los tratamientos con bPRL durante 12 h en combinación con la infección disminuyen la actividad de las KDMs ~10% con respecto a las células control (MI) (Figura 18A). Por otra parte, cuando las células fueron tratadas durante 12 h con la mezcla hormonal en presencia de la infección, también se observó una disminución en la actividad de las KDMs ~20% con respecto al control del vehículo (Figura 18B).

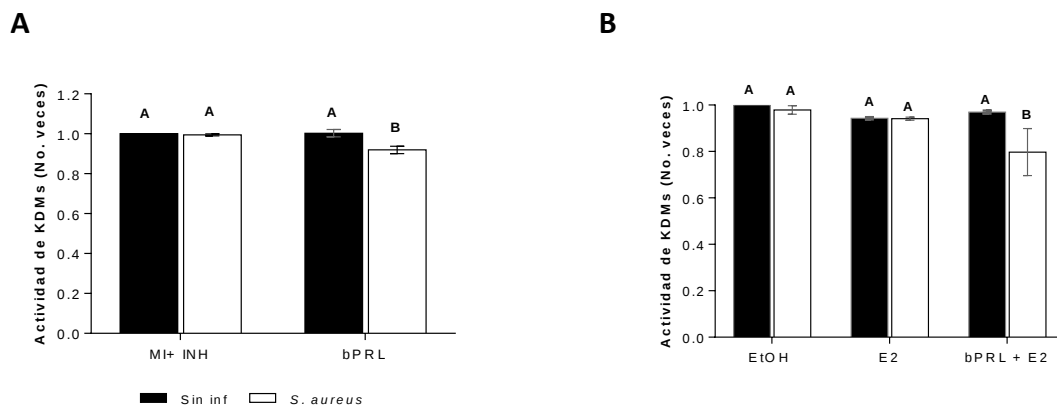


Figura 18. Actividad de las KDMs en CEMB tratadas con las hormonas bPRL y E2. Las células fueron tratadas durante 12 h con 5 ng/ml de bPRL, Vehículo (EtOH 1%), 50 pg/ml de E2 y la combinación de ambas hormonas. Posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus*. Después se evaluó la actividad de las KDMs mediante el uso de un kit invitrogen para medir la actividad de las KDMs mediante fluorescencia. **A)** Evaluación del efecto de la PRL sobre la actividad de las KDMs, normalizado con respecto al vehículo de medio incompleto (MI) sin infección. **B)** Evaluación del efecto del E2 y de la mezcla hormonal sobre la actividad de las KDMs, valores normalizado con respecto al vehículo EtOH sin infección. Cada barra muestra el resultado de tres experimentos independientes $\pm$ EE, las letras sobre las barras indican un cambio significativo ($P \leq 0.05$, ANOVA).

VII. 9. Efecto de las hormonas PRL y E2 sobre la expresión de los genes de desmetilasas KDM4A y KDM4C

Para correlacionar los resultados que se obtuvieron en los ensayos de Western blot y actividad enzimática, y evaluar si estos se relacionan con los niveles de expresión de algunas de las enzimas modificadoras de las marcas epigenéticas, se realizaron ensayos de expresión en tiempo real de los genes KDM4A y KDM4C que codifican para enzimas modificadoras de las marcas epigenéticas relacionadas con la desmetilación. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Expresión relativa de genes de enzimas epigenéticas KDMs.

Tratamientos	Genes evaluados		Tratamientos	Genes evaluados	
12 h	KDM4A	KDM4C	24 h	KDM4A	KDM4C
MI	1 ± 0.02 ^a	1 ± 0.03 ^a	MI	1 ± 0.05 ^a	1 ± 0.02 ^a
MI + S. a.	0.58 ± 0.09 ^a	1.37 ± 0.03 ^a	MI + S. a.	1.64 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.01^b
bPRL	1.14 ± 0.02 ^a	1.15 ± 0.08 ^a	bPRL	0.93 ± 0.03 ^a	0.62 ± 0.01 ^a
bPRL + S. a.	0.93 ± 0.0 ^a 4	0.56 ± 0.04 ^{ab}	bPRL + S. a.	1.68 ± 0.06 ^a	0.41 ± 0.02^b
EtOH	1 ± 0.01 ^a	1 ± 0.06 ^a	EtOH	1 ± 0.015 ^a	1 ± 0.02 ^a
EtOH + S. a.	1.43 ± 0.02 ^a	1.87 ± 0.08 ^a	EtOH + S. a.	0.96 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.01 ^a
E2	1.49 ± 0.04 ^a	1.30 ± 0.01 ^a	E2	0.82 ± 0.03 ^a	0.74 ± 0.02 ^a
E2 + S. a.	1.42 ± 0.01 ^a	1.53 ± 0.07 ^a	E2 + S. a.	1.34 ± 0.17 ^a	0.38 ± 0.04^b
E2 + bPRL	1.46 ± 0.04 ^a	1.91 ± 0.11 ^a	E2 + bPRL	0.79 ± 0.01 ^a	1.32 ± 0.01 ^a
E2 + bPRL + S. a.	0.59 ± 0.01 ^a	1.06 ± 0.08 ^a	E2 + bPRL + S. a.	0.87 ± 0.03 ^a	0.76 ± 0.07 ^a

Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 12 o 24 h y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR, se muestra la expresión relativa de los genes evaluados utilizando como control de referencia a GAPDH, normalizados a su respectivo vehículo, medio incompleto (MI) sin infección y etanol (EtOH) sin infección. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA) que se encuentra representado dentro de la columna. Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas marcadas en negritas. Los resultados se reportan como el promedio ± el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P < 0.05$. n=12.

Al evaluar la expresión del gen *KDM4A* no se observaron cambios significativos. Por otra parte, el gen *KDM4C* que codifica para una proteína que funciona como una desmetilasa específica de la trimetilación, convirtiendo residuos de histonas trimetiladas específicas en la forma dimetilada, presentó una ligera disminución en su nivel de expresión en los tratamientos con bPRL en combinación con la infección.

Debido a que no se observaron más cambios significativos en la expresión de estos genes en tiempos de 12 h se decidió analizar la expresión a tiempos de tratamientos de 24 h. Sin embargo, el gen *KDM4A* no presentó cambios significativos en ningún tratamiento. En el caso del gen *KDM4C* se observó una disminución en la expresión de este en las células con infección, con PRL y la bacteria, y con E2 e infectadas, por lo que esta represión en la expresión del gen puede ser debida a la infección.

VII. 10. Efecto de las hormonas bPRL y E2 sobre la expresión de los genes *DNMT1* y *DNMT3A*

También se analizó la expresión de genes relacionados con la metilación del DNA. En el caso de la expresión del gen *DNMT1* a las 12 h, la mezcla hormonal indujo dicha expresión; mientras que la PRL y el estímulo bacteriano disminuyeron la expresión del gen *DNMT3A* (Tabla 10). Los tratamientos de 24 h no modificaron en la expresión de estos genes.

Tabla 10. Expresión relativa de enzimas epigenéticas en tratamientos de 12 y 24 h.

Tratamientos	Genes evaluados		Tratamientos	Genes evaluados	
12 h	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>	24 h	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>
MI	1 ± 0.02 ^a	1 ± 0.04 ^a	MI	1 ± 0.03 ^a	1 ± 0.02 ^a
MI + S. a.	1.47 ± 0.13 ^a	0.81 ± 0.03 ^a	MI + S. a.	0.97 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.01 ^a
bPRL	1.37 ± 0.09 ^a	1.09 ± 0.09 ^a	bPRL	1.22 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.04 ^a
bPRL + S. a.	1.00 ± 0.05 ^a	0.42 ± 0.03^b	bPRL + S. a.	1.02 ± 0.02 ^a	0.67 ± 0.01 ^a
EtOH	1 ± 0.05 ^a	1 ± 0.07 ^a	EtOH	1 ± 0.01 ^a	1 ± 0.01 ^a
EtOH + S. a.	1.49 ± 0.04 ^a	1.52 ± 0.08 ^a	EtOH + S. a.	1.04 ± 0.02 ^a	1.04 ± 0.04 ^a
E2	1.42 ± 0.08 ^a	1.31 ± 0.13 ^a	E2	0.99 ± 0.02 ^a	0.91 ± 0.01 ^a

E2 + S. a.	1.45 ± 0.04 ^a	1.14 ± 0.07 ^a	E2 + S. a.	0.91 ± 0.06 ^a	1.04 ± 0.02 ^a
E2 + bPRL	2.23 ± 0.05^b	1.41 ± 0.07 ^a	E2 + bPRL	1.05 ± 0.02 ^a	1.35 ± 0.08 ^a
E2 + bPRL + S. a.	1.05 ± 0.01 ^a	1.05 ± 0.05 ^a	E2 + bPRL + S. a.	0.72 ± 0.05 ^a	0.69 ± 0.02 ^a

Las células se trataron con 50 pg/ml de E2 y con 5 ng/ml de bPRL durante 12 o 24 h y/o posteriormente infectadas por 2 h (MDI 30:1) con *S. aureus* (S. a). El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR. Se muestra la expresión relativa de los genes evaluados utilizando como control de referencia a GAPDH, normalizados a su respectivo vehículo, medio incompleto (MI) sin infección y etanol (EtOH) sin infección. Los datos se obtuvieron de cuatro experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA) que se encuentra representado dentro de la columna. Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas, marcadas en negritas. Los resultados se reportan como el promedio ± el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. n=12.

VIII. Discusión

La MB es una enfermedad que, en la mayoría de los casos, se asocia principalmente a infecciones por microorganismos patógenos, generando grandes pérdidas económicas a nivel mundial (Sharma & Jeong, 2013). La MB se puede presentar de manera clínica o subclínica, esta última es más compleja en cuanto al diagnóstico y tratamiento, dado que las bacterias causantes pueden evadir la RII del hospedero, internalizarse y persistir en la célula hospedera. *S. aureus* es el principal microorganismo aislado en este tipo de mastitis (Thompson-Crispi y col., 2014; Alva-Murillo y col., 2014). Se ha descrito que durante el periodo del parto se presenta un incremento de la MB debido a la variación en los niveles de las hormonas lactogénicas bPRL y E2, lo cual ocasiona una desregulación en la RII del hospedero (Lamote y col., 2006).

Se ha descrito que las hormonas lactogénicas bPRL y E2 a concentraciones inmunomoduladoras de 5 ng/ml y 50 pg/ml, respectivamente, tienen efectos diferenciales sobre la internalización de *S. aureus* y la regulación de la expresión de genes relacionados con la RII. La PRL estimula la expresión de citocinas proinflamatorias, así como un incremento sobre la internalización de *S. aureus* (Lara-Zarate y col., 2011; Medina-Estrada y col., 2015).

Mientras que se ha demostrado que el E2 induce la expresión de genes de citocinas antiinflamatorias y de péptidos antimicrobianos, así como la disminución de un 50% en la internalización de *S. aureus* (Medina-Estrada y col., 2016). Cuando se evaluó el efecto de la mezcla de estas hormonas sobre la internalización de *S. aureus* se observó un resultado muy similar al del E2, ya que disminuye la internalización de la bacteria hasta en un 45% (Medina-Estrada datos no publicados).

Sin embargo, hasta el momento se desconoce el efecto que puede tener la combinación de ambas hormonas (bPRL y E2) sobre la RII de las CEMB, y si los efectos observados con el tratamiento de las hormonas por separado o en mezcla pueden deberse a modificaciones epigenéticas. Cabe mencionar que no existen reportes donde se demuestre el efecto de la combinación hormonal de bPRL y E2 sobre la RII o sobre modificaciones epigenéticas.

Se ha descrito que las hormonas PRL y E2 tienen efectos sobre la RII de distintos epitelios, así como la importancia de este tipo celular en la respuesta ante distintos patógenos en múltiples etiologías (Kelley y col., 2007; Fahey y col., 2008; Wang y col., 2013; Wang y col., 2016; Moulton, 2018). De acuerdo a los resultados reportados por el grupo de trabajo, en este estudio se evaluó el efecto de la mezcla hormonal sobre la expresión de genes de la RII. Los resultados mostraron que *S. aureus* indujo la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-8 (Tabla 6), y este incremento se mantuvo durante el tratamiento con la mezcla hormonal. TNF- α presentó un incremento de 2.18 veces cuando las células fueron infectadas, pero cuando las CEMB se trataron con la mezcla hormonal este gen se expresó 3 veces, en ausencia y presencia de *S. aureus*. Estos datos coinciden con lo reportado por Gilbert y col. (2013) así como por Díaz-Murillo y col. (2016) quienes muestran en un modelo de CEMB que *S. aureus* induce la expresión de este gen.

También se observó que la infección indujo la expresión del gen IL-1 β (18.33 veces), pero en las células tratadas con la mezcla hormonal e infectadas con *S. aureus* disminuyó la expresión del gen de IL-1 β en un 45%. El resultado observado sugiere que la mezcla hormonal tiene efectos antiinflamatorios similares a los que ejerce el E2 de manera independiente en las CEMB, tal como lo reportaron Medina-Estrada y col. (2016). También se ha descrito que el E2 en un modelo de células uterinas humanas, así como en vasos sanguíneos cerebrales de rata disminuye la expresión de este gen (Fahey y col., 2008; Ospina y col., 2004).

Los genes de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α presentaron un incremento en su expresión por efecto de la infección con *S. aureus*, efecto que se mantuvo con el tratamiento de la mezcla hormonal en combinación con la infección. Pereira-Suarez y col. (2015) y Medina-Estrada y col. (2015), reportaron que la PRL, así como la hormona en combinación con la infección bacteriana incrementan la expresión de estos genes. Además, se ha descrito que *S. aureus* también incrementa la expresión de algunas citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Bekeredjian-Ding y col., 2015), lo cual se correlaciona a lo observado en estos resultados.

Por otra parte, se observó que la mezcla hormonal incrementó 2.2 veces la expresión del gen de la IL-10, que es una citocina antiinflamatoria, y que en el tratamiento de la mezcla hormonal más la infección se mantuvo la expresión del mismo. Se ha reportado que la bacteria favorece la expresión de este gen (Lahouassa y col., 2007) y también que el E2 en combinación con *S. aureus* incrementan la expresión de este gen (Medina-Estrada y col. 2016).

Por otra parte, al evaluar la expresión de genes de péptidos antimicrobianos se observó que la bacteria induce la expresión del gen BNBD10 7.6 veces, y que la mezcla hormonal en conjunto con la bacteria incrementó aún más la expresión de este gen a 15 veces. Los genes LAP y DEFB1 también presentaron un incremento en su expresión de hasta 2.33 veces durante el tratamiento con la mezcla hormonal, efecto que se mantiene durante la infección, la mezcla hormonal presenta un efecto antiinflamatorio predominando el efecto del E2 reportado por Medina-Estrada y col. (2016). Todo lo anterior se relaciona con una mejor respuesta inmune por parte de las CEMB ante *S. aureus*, ya que se ha reportado que la bacteria puede inducir la expresión de péptidos antimicrobianos (Alva-Murillo y col., 2015; Whelehan y col., 2011), pero en presencia de la mezcla hormonal se favorece aún más la expresión de estos genes.

El receptor TLR2 es pieza clave en el reconocimiento de *S. aureus* ya que participa en la activación de diversas rutas de señalización relacionadas con la RII (Alva-Murillo y col., 2014). Se ha demostrado que la expresión y abundancia en membrana del receptor TLR2 se ve modificada por los tratamientos con las hormonas PRL y/o E2 y por la interacción con *S. aureus* (Medina-Estrada y col., 2015; Medina-Estrada y col., 2016). Sin embargo, el efecto de la mezcla hormonal sobre el receptor TLR2 se desconocía previo a este trabajo. La abundancia membranal de TLR2 en las CEMB se incrementó 1.35 veces por efecto de la infección, y cuando las células fueron tratadas con la mezcla hormonal y se expusieron a la infección, aumentó la abundancia del receptor 2 veces en comparación a las CEMB sin infección (Figura 10). Esto demuestra que la mezcla hormonal, en conjunto con la bacteria, modula la abundancia membranal de este receptor, lo cual puede estar implicado en el reconocimiento y disminución de la internalización de la bacteria, así como con la activación

de cascadas de señalización involucradas en la RII de la célula, mediadas por el receptor TLR2, que ayudan a la célula a eliminar eficazmente a la bacteria, al favorecer la expresión de péptidos antimicrobianos (Hilmi y col., 2014; Miller y col., 2020), los cuales son secretados extracelularmente, afectando la viabilidad de la bacteria y disminuyendo así la internalización de la misma Medina-Estrada (2018).

Por otra parte, se sabe que las bacterias han desarrollado estrategias sofisticadas para evadir la RII del hospedero al que colonizan, entre las que destaca la manipulación de los mecanismos epigenéticos celulares. Los factores de virulencia y los productos metabólicos de las bacterias alteran la expresión y la actividad de ciertas enzimas epigenéticas como son las HATs, las HDACs y KDMs, para suprimir la transcripción de los genes de defensa del hospedero a través de cambios epigenéticos en las marcas de acetilación y metilación de histonas principalmente (Bierne y col., 2012). Se ha descrito que *S. aureus* induce modificaciones epigenéticas sobre la H3K9ac, así como de la H3K14ac incrementando dichas marcas epigenéticas, lo que se relaciona con la expresión de genes de la RII como IL-12, IL-6, IL1 β y TNF- α (Modak y col., 2014). Sin embargo, se desconocía la participación de las hormonas bPRL y E2 de manera individual, y la mezcla de ellas, sobre los cambios epigenéticos que puede generar *S. aureus* en las CEMB.

Los resultados obtenidos mostraron que en las CEMB que fueron tratadas con PRL durante 24 h y que fueron estimuladas con *S. aureus* presentaron una disminución del 50% en la acetilación global de la histona H3 (Figura 11A), esta disminución podría estar relacionada con la compactación de la cromatina en regiones donde se lleve a cabo la expresión de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, hecho que se relaciona con la presión en la expresión de estos genes (Medina- Estrada y col., 2015). En este sentido, la disminución de la respuesta de los mediadores de la inflamación favorece una disminución así del daño al tejido en infecciones causadas por *S. aureus* (Flannagany col., 2015).

Al evaluar el efecto que presentan el E2 y la mezcla hormonal en conjunto con *S. aureus* sobre la H3ac, se observó un incremento de hasta 35% en la H3ac a las 12 h, (Figura 12A). Por otra parte, en las CEMB tratadas con E2 durante 24 h e infectadas con *S. aureus* se

observó un incremento de esta marca en un 15%. Sin embargo, la mezcla hormonal y la infección disminuyeron la H3ac un 15% (Figura 12B). Los efectos observados sobre la H3ac se pueden relacionar con la relajación de la cromatina en regiones relacionadas con la expresión de genes de la RII. Se ha demostrado que el E2 favorece la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10, y de algunos péptidos antimicrobianos como DEFB1 Y BNBD10 (Medina-Estrada y col., 2016). Además, en este trabajo se observó un incremento de la expresión de péptidos antimicrobianos por efecto de la mezcla hormonal.

Por otra parte, se ha demostrado que la bacteria puede inducir la expresión de estos genes de manera variable, así como de algunas citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL-1 β y TNF- α , dependiendo del tiempo de infección y del tipo celular, esto como un mecanismo de respuesta ante la infección (Ezzat-Alnakip y col., 2014; Pollitt y col., 2018).

Sin embargo, estas son aproximaciones muy generales y las marcas de acetilación de la histona H3 podrían estar ocurriendo de manera más específica sobre alguno de los residuos de lisina de esta histona. Al respecto, se ha descrito que *S. aureus* puede modular marcas epigenéticas sobre la H3K9ac, lo cual se describió en un modelo murino (Modak y col., 2014). Por lo anterior, en este trabajo también se evaluó la marca H3K9ac con los diferentes tratamientos.

La bPRL en conjunto con la bacteria disminuyó un 20% los niveles de H3K9ac en ambos periodos de tratamiento 12 y 24 h (Figura 13). Sin embargo, Modak y col. (2014) mostraron que *S. aureus* induce la hiperacetilación de esta lisina en un modelo de mastitis en ratón, por lo cual se puede sugerir que el tratamiento con PRL está implicado en una reducción de la acetilación de la H3K9ac generando así una compactación en la cromatina. Sin embargo, no se descarta que en nuestro modelo de estudio también se pudieran presentar cambios sobre la acetilación de la lisina 14, ya que se ha descrito que el aumento en esta marca se asocia con procesos infecciosos en distintos modelos (Modak y col., 2014; Bierne y col., 2012), aunque para ello hacen falta otras aproximaciones.

La mezcla hormonal incrementó la H3K9ac en un 40% con y sin la infección (Figura 14A) a las 12 h de tratamiento; por otra parte, el E2 en tratamientos de 24 h incrementó la H3K9ac

un 20% y en presencia de la bacteria aumentó en un 25%. Lo anterior sugiere que las modificaciones epigenéticas observadas son dependientes del tiempo de tratamiento. Por otra parte, el incremento en los niveles de acetilación en los tratamientos con la mezcla hormonal podría estar relacionados con una mayor expresión de genes de péptidos antimicrobianos o citocinas antiinflamatorias en las CEMB, y a su vez estar asociados a una menor internalización de la bacteria, predominando el efecto del E2 reportado por Medina-Estrada y col. (2016). Las células fagocíticas entre ellas los epitelios tiene la capacidad de provocar una respuesta transcripcional ante una infección para expresar genes de la RII, para lo cual se modifica la estructura de la cromatina, generando marcas de acetilación sobre los sitios promotores de genes de la RII (Smale y col., 2014).

Las marcas de acetilación pueden ser eliminadas por enzimas como las histonas desacetilasas, estas se clasifican según su localización y cofactor en HDACs de clase I a la IV y SIRT de la 1 a la 7 (Alenghat y col., 2015). En este trabajo se evaluó el efecto de las hormonas PRL y/o E2 en combinación con *S. aureus* sobre la actividad de las HDACs de clase I y II, se ha descrito que las bacterias pueden modificar la actividad de estas enzimas, para favorecer su permanencia en el tejido que se encuentran colonizando (Grabiec & Potempa., 2018). Los resultados mostraron que la mezcla hormonal, tanto a las 6 como a las 12 h de tratamiento disminuyen la actividad de las HDACs (Figura 15B) en un 23% y 15% respectivamente; sin embargo, la actividad de las HDACs se incrementó en los tratamientos con la infección. Estos resultados se pueden relacionar con el incremento observado en los niveles de H3K9ac en el tratamiento de la mezcla hormonal en tratamientos de 12 h en los ensayos de Western blot, dado que una menor actividad enzimática se asocia con un incremento en los niveles de acetilación, debido a que los grupos acetilo no son removidos (Allis y col., 2015). La importancia de las HDACs sobre la expresión de genes radica en que una disminución en la actividad de estas enzimas se ha relacionado con una menor expresión de genes de citocinas proinflamatorias como: TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sin embargo, *S. aureus* incrementa la actividad de las HDACs en las CMEB, ocasionando así la expresión de las citocinas proinflamatorias (Rösler y col., 2018).

En el caso de los tratamientos con las hormonas bPRL y E2, solas o en interacción con la bacteria donde no se observó actividad enzimática de las HDACs se puede sugerir que las enzimas de la clase SIRT pueden tener un efecto sobre la acetilación que se observó en los ensayos de Western blot, ya que se ha descrito que algunas bacterias pueden modular la actividad de las enzimas SIRT y que estos cambios en la actividad enzimática generan cambios en la expresión de genes de la RII (Eskandarian y col., 2013); sin embargo esto deberá corroborarse en estudios posteriores.

Los resultados de actividad enzimática pueden ser explicados también con base en la expresión de genes de las enzimas HDACs (Tabla 8). En este trabajo se evaluó la expresión del gen HDAC1, para empezar a dilucidar cuál de los genes de las HDACs se encuentra participando en las modificaciones observadas en los ensayos descritos anteriormente. Los resultados mostraron diferencias en el aumento de la expresión del gen HDAC1 en los tratamientos con las CEMB infectadas hasta 4.5 veces, mientras que la bPRL incrementó su expresión 2.3 veces a las 12 h de tratamiento. Por otra parte, se observó que la PRL en las CEMB infectadas este gen solo se expresó 0.45 veces a las 12 y 24 h de tratamiento; sin embargo, no se observó actividad enzimática de las HDACs por efecto del tratamiento con bPRL, posiblemente se deba a que el gen no se transcriba o bien que la proteína no tenga actividad por efecto de la bPRL. Algunos reportes demuestran que la expresión de los genes de las HDACs está relacionada con procesos infecciosos y que la expresión de estos es dependiente de la bacteria que causa la infección (Bierne y col., 2012).

Por otra parte, se evaluó la marca epigenética asociada con represión génica H3K9me2. Se ha descrito que esta marca, así como la H3K9me3 y la H3K27me3 pueden ser modificadas por procesos infecciosos, entre ellos los causados por *S. aureus* (Hamon & Cossart., 2008; He y col., 2016). Sin embargo, se desconocen los efectos que pueden presentar las hormonas en combinación con la bacteria sobre la H3K9me. Los resultados de Western blot mostraron que la bPRL sola o con la infección bacteriana incrementaron hasta un 30% la H3K9me2 (Figura 16). Se sabe que las hormonas lactogénicas como la PRL disminuyen las marcas represivas para favorecer la expresión de genes relacionados con la lactancia y el desarrollo de la glándula mamaria (Rijnkels y col., 2013), sin embargo, esto ocurre a

concentraciones más altas de la hormona (Kabotyanski y col., 2006), a las concentraciones evaluadas en este trabajo mostro efectos represivos al incrementar la H3K9me2.

Por otra parte, el E2 y la mezcla hormonal incrementaron la H3K9me2 hasta en un 55% a las 12 h, efecto que fue potenciado por la infección alcanzando un incremento de casi 140%. (Figura 17A). Y se ha reportado que un incremento en los niveles de H3K9me afecta la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β o IL-6 (Hamon & Cossart, 2008). Además, Medina-Estrada y col. (2016) reportaron que en células tratadas con E2 e infectadas con *S. aureus* la expresión de estos genes se ve reprimida, por lo que se sugiere que el E2 y la mezcla hormonal en combinación con la bacteria están generando la compactación de la cromatina en la región promotora de estos genes. Sin embargo, esta hipótesis deberá corroborarse en ensayos posteriores mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, lo cuales permiten dar una aproximación más precisa (Bierne y col., 2012).

Hasta el momento no existen reportes donde se demuestre el efecto que pueden tener las hormonas lactogénicas o *S. aureus* sobre la actividad de las lisinas desmetilasas (KDMs). Por lo cual se analizó si las KDMs del tipo Jumonji están involucradas en las modificaciones observadas en los ensayos de Western blot, y se encontró que el tratamiento con bPRL en tiempos de 12 h combinados con la infección bacteriana, disminuyó un 10% la actividad enzimática. También se observó que la mezcla hormonal en combinación con la infección disminuye la actividad de estas enzimas hasta un 20% (Figura 18), efecto que se puede asociar con el incremento observado en los niveles de H3K9me2 en los ensayos de Western blot, para los tratamientos con bPRL y la mezcla hormonal en presencia de la infección.

La actividad de las KDMs se relaciona con la expresión de los genes KDM4A y KDM4C, ambos codifican para proteínas que funcionan como desmetilasas específicas de la trimetilación. En tratamientos de 24 h se observó una disminución en la expresión de KDM4C en los tratamientos de bPRL y E2 (por separado) con infección bacteriana, por lo que la infección mostró un efecto inhibitorio en la expresión de este gen (Tabla 9).

Posteriormente se analizó si otras marcas, como la metilación del DNA podría estar involucrada en los efectos detectados. Para ello, se analizó la expresión de genes de enzimas metilasas de DNA, que son enzimas clave responsables de catalizar la transferencia de grupos metilo a las citosinas en estructuras específicas de CpG. Los genes evaluados fueron *DNMT1* y *DNMT3A*. Se observaron cambios en los tratamientos de 12 h con la mezcla hormonal para el gen *DNMT1* incrementando su expresión 2.2 veces. Por otra parte, la mezcla hormonal disminuyó la expresión del gen *DNMT3A* en un 40%. Esta es solo una aproximación que sugiere que la metilación del DNA se puede ver modificada por efecto de las hormonas y por acción de *S. aureus* y esto podría tener un efecto sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB, ya que se ha descrito que algunos patógenos pueden modular la actividad de estas enzimas favoreciendo la persistencia bacteriana en las células por periodos de tiempo prolongados sin que el sistema inmune del hospedero las detecte (Morandini y col., 2016).

Todo lo que se ha mencionado se encuentra ejemplificado y resumido en la Figura 19 como un modelo del efecto de las hormonas bPRL y/o E2, sobre la RII y modificaciones epigenéticas en las CEMB infectadas con *S. aureus*.

IX. Conclusión

La combinación hormonal de bPRL y E2 regula elementos de la respuesta inmune innata, favoreciendo un ambiente antiinflamatorio en células de epitelio mamario bovino, al tiempo que reduce la internalización de *S. aureus*. Además, las hormonas bPRL y E2, ya sea de manera independiente o en conjunto, así como en interacción con *S. aureus* modulan diferencialmente las marcas epigenéticas de acetilación y dimetilación en la histona H3, así como la actividad enzimática de histonas desacetilasas y lisinas desmetilazas, relacionadas con las marcas epigenéticas en la histona H3.

X. Referencias

1. Akers, R. M. (2006). Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *J Dairy Sci.* 89: 1222-1234.
2. Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4, 499–511.
3. Alenghat T. (2015). Epigenomics and the microbiota. *Toxicologic pathol.* 43(1), 101–106.
4. Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* 17, 487–500.
5. Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2014). Nonprofessional Phagocytic Cell Receptors Involved in *Staphylococcus aureus* Internalization. *Biomed Res Int.* 2014, 538546.
6. Anaya, J., Contreras, O., Cáramez, A., Baizabal, V. López, J., Valdez, J., and Ochoa A. (2006). “Invasive Potential of Bacterial Isolates Associated with Subclinical Bovine Mastitis”. *Res Vet Sci.* 81:358-361.
7. Anaya-López, J. L., Contreras-Guzmán, O. E., Cáramez-Trejo, A. Baizabal-Aguirre VM, López-Meza, JE, Valdez-Alarcón JJ, and Ochoa-Zarzosa A, (2006). “Invasive potential of bacterial solates associated with subclinical bovine mastitis”. *Res Vet Sci.* 81:358-361.
8. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell res.* 21(3), 381–395.
9. Banta, J. A., and Richards, C. L. (2018). Quantitative epigenetics and evolution. *Heredity.* 121(3), 210–224.
10. Bedolla, C.C. and Ponce de León, M.E.R. (2008). Pérdidas Económicas Ocasionadas por la Mastitis Bovina en la Industria Lechera. *Rev Elect Vet.* 9:1695-7504.
11. Beermann, J., Piccoli, M.T., Viereck, J. and Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 96(4):1297-325
12. Bekeredjian-Ding, I., Stein, C., and Uebele, J. (2015). The Innate Immune Response Against *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 385–418.
13. Bergonier, D., Sobral, D., Feßler, A. T., Jacquet, E., Gilbert, F. B., Schwarz, S., and Vergnaud, G. (2014). *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Vet Res.* 45(1), 97.
14. Bierne, H., Hamon, M., and Cossart, P. (2012). Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(12), a010272.
15. Borba, V. V., Zandman-Goddard, G., and Shoenfeld, Y. (2018). Prolactin and Autoimmunity. *Front Immunol.* 9, 73.

16. Borba, V. V., Zandman-Goddard, G., and Shoenfeld, Y. (2019). Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 101324
17. Bulger, M., and Groudine, M. (2010). Enhancers: The abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Dev Biol.* 339(2), 250–257.
18. Christine Bole-Feysot, Vincent Goffin, Marc Edery, Nadine Binart, Paul A. Kelly, (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice, *Endocrine Reviews.* 19, 1998.
19. Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., and Hess, R. A. (2017). Estrogens in Male Physiology. *Physiol Rev.* 97(3), 995–1043.
20. De Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S., Barkema H.W. (2012). Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Curr Microbiol.*, 95 (3). 1025-1040.
21. Díaz-Murillo, V., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides*, 78, 109–118.
22. Dill, R., and Walker, A. M. (2017). Role of Prolactin in Promotion of Immune Cell Migration into the Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 22(1), 13–26.
23. Eskandarian, H. A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppee, J.-Y., Cossart, P., & Hamon, M. A. (2013). A Role for SIRT2-Dependent Histone H3K18 Deacetylation in Bacterial Infection. *Science*, 341(6145),
24. Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J Vet Med*, 2014, 659801.
25. Fahey, J. V., Wright, J. A., Shen, L., Smith, J. M., Ghosh, M., Rossoll, R. M., and Wira, C. R. (2008). Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol.* 1(4), 317–325.
26. Flannagan, R. S., Heit, B., & Heinrichs, D. E. (2015). Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens.*, 4(4), 826–868.
27. Giannoni, E., Guignard, L., Knaup Reymond, M., Perreau, M., Roth-Kleiner, M., Calandra, T., and Roger, T. (2011). Estradiol and Progesterone Strongly Inhibit the Innate Immune Response of Mononuclear Cells in Newborns. *Infect Immun.* 79(7), 2690–2698.
28. Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granié, C., Rupp, R., and Rainard, P. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res.* 44(1), 40.
29. Gomes, F. and Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Curr Microbiol.* 72: 377.

30. Grabiec, A. M., & Potempa, J. (2018). Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit Rev Microbiol.* 44(3), 336–350.
31. Gussmann M., Denwood M., Kirkeby C., Farre M., Halasa T. (2019). Associations between udder health and culling in dairy cows. *Prev Vet Med.* 171, 2019
32. Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López-Meza, J. E. and Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 121: 113–22.
33. Halasa, T., Nielen M., De Roos A.P.W., Van Hoorne R., de Jong G., Lam T.J.G.M., Van Werven T., Hogeveen H., (2009). Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. *J. Dairy Sci.* 92:599–606
34. Hamon MA. and Cossart P. (2008). Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe.* 14;4(2):100–9
35. Hamon, M. A., & Cossart, P. (2008). Histone Modifications and Chromatin Remodeling during Bacterial Infections. *Cell Host & Microbe*, 4(2), 100–109.
36. Hilmi, D., Parcina, M., Stollewerk, D., Ostrop, J., Josten, M., Meilaender, A., Zaehring, U., Wichelhaus, T. A., Bierbaum, G., Heeg, K., Wolz, C., and Bekerredjian-Ding, I. (2014). Heterogeneity of host TLR2 stimulation by *Staphylococcus aureus* isolates. *PloS one.* 9(5), e96416
37. Ho, L., and Crabtree, G. R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature.* 463: 474–484.
38. Holliday, H., Baker, L. A., Junankar, S. R., Clark, S. J., and Swarbrick, A. (2018). Epigenomics of mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 20(1), 100.
39. Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A., Haider, M. G., and Islam, M. A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *Int J Vet Sci Med.* 6(1), 53–60.
40. Hughes, K., and Watson, C. J. (2018). The Mammary Microenvironment in Mastitis in Humans, Dairy Ruminants, Rabbits and Rodents: A One Health Focus. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 23, 27–41.
41. J., Petzl, W., Schuberth, H.-J., Sipka, A., Smith, D.G.E., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N., Seyfert, H.-M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 270–289
42. Jara, L.J., Medina, G., Saavedra, M.A., Vera-Lastra, O. y Navarro, C. (2009). Prolactin and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 40 (1): 50–9
43. Kabotyanski, E. B., Huetter, M., Xian, W., Rijnkels, M., Rosen, J. M. (2006). Integration of Prolactin and Glucocorticoid Signaling at the β -Casein Promoter and Enhancer by Ordered Recruitment of Specific Transcription Factors and Chromatin Modifiers. *Mol Endocrinol.* 20: 2355–2368.
44. Kanherkar, R. R., Bhatia-Dey, N., and Csoka, A. B. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2:49.

45. Kelley, K. W., Weigent, D. A., & Kooijman, R. (2007). Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun.* 21(4), 384–392.
46. Kong, C., Neoh, H. M., and Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins. Toxins (Basel)* 8(3), 72.
47. Kurjogi, M. M., & Kaliwal, B. B. (2014). Epidemiology of Bovine Mastitis in Cows of Dharwad District. *Int Sch Res Notices.*, 2014, 968076.
48. Lacasse, P., Zhao, X., and Ollier, S. (2018). Effect of stage of lactation and gestation on milking-induced hormone release in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 66:72-85
49. Lacasse, P., Zhao, X., Vanacker, N., and Boutinaud, M. (2019). Review: Inhibition of prolactin as a management tool in dairy husbandry. *Animal.* 13(S1), S35-S41.
50. Lahouassa, H., Moussay, E., Rainard, P., and Riollot, C. (2007). Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*, 38(1), 12–21.
51. Lakhundi, S., and Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews.* 31(4)
52. Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L. and Burvenich, C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology.* 65: 1082-1098.
53. Lara-Zarate, L., Lopez-Meza J.E., and Ochoa-Zarzosa A. (2011) *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 2011. 51(5): p. 313-8.
54. Lee, A., Lencastre, H., Garau, j., Kluymans, J., Malhotra-kumar, S., Peschel, A., and Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 4, 18033
55. Li, R., Zhang, C. L., Liao, X. X., Chen, D., Wang, W. Q., Zhu, Y. H., Yang, Z. P. (2015). Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci.* 16(3), 4997–5013.
56. Liu, Y., Zhang, J., and Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Sci Prog.* 2020 Jan 5:36.
57. Lollivier, V., Lacasse, P., Angulo-Arizala, J., Lamberton, P., Wiart, S., Portanguen, J., Bruckmaier, R., and Boutinaud, M. (2015). In vivo inhibition followed by exogenous supplementation demonstrates galactopoietic effects of prolactin on mammary tissue and milk production in dairy cows., *J Dairy Sci.* 98:8775-87
58. Majumdar, A., & Mangal, N. S. (2013). Hyperprolactinemia. *Journal of human reproductive sciences*, 6(3), 168–175.
59. Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2018). Immunomodulatory Effects of E2on Epithelial Cells during Bacterial Infections. *J Immunol Res.* 2018, 6098961.
60. Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J.E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2015). Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb Pathog.*, 89:43-53

61. Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., and Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of Estradiol in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Mediators Inflamm.* 2016, 6120509.
62. Miller, L. S., Fowler, V. G., Shukla, S. K., Rose, W. E., and Proctor, R. A. (2020). Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.* 44(1), 123–153.
63. Modak, R., Das Mitra, S., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar M., Bhat A.V., Bhuvana, M., Ghosh, S.K., Shome, B.R. and Kundu T.K. (2014). Epigenetic response in mice mastitis: Role of histone H3 acetylation and microRNA(s) in the regulation of host inflammatory gene expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Epigenetics.* 6: 12.
64. Montazer-Torbati, M. B., Hue-Beauvais, C., Droineau, S., Ballester, M., Coant, N., Aujean, E., Devinoy, E. (2008). Epigenetic modifications and chromatin loop organization explain the different expression profiles of the Tbrg4, WAP and Ramp3 genes. *Exp Cell Res.* 314(5), 975–987.
65. Monteiro, R., Teixeira, D., and Calhau, C. (2014). Estrogen signaling in metabolic inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014, 615917.
66. Morandini, A. C., Santos, C. F., and Yilmaz, Ö. (2016). Role of epigenetics in modulation of immune response at the junction of host-pathogen interaction and danger molecule signaling. *Pathog Dis.* 74(7), ftw082.
67. Moulton V. R. (2018). Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol*, 9, 2279.
68. Nguyen, M., Boutinaud, M., Pétridou, B., Gabory, A., Pannetier, M., Chat, S., and Devinoy, E. (2014). DNA methylation and transcription in a distal region upstream from the bovine AlphaS1 casein gene after once or twice daily milking. *PloS one.* 9(11), e111556.
69. O'Neill, L. A., Bryant, C. E., and Doyle, S. L. (2009). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacological reviews*, 61(2), 177–197.
70. Oakes, S.R., Rogers, R.L., Naylor, M.J. Ormandy, C., J. (2008). Prolactin regulation of mammary gland development. *Mammary Gland Biol Neoplasia.* 13: 13.
71. Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J.J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Bravo-Patiño A. and Baizabal-Aguirre V.M. (2008). Innate Immune Response of Bovine Mammary Gland to Pathogenic Bacteria Responsible for Mastitis. *J Infect.* 54:399-409.
72. Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J. A., & Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids.*, 90, 13–29.
73. Pereira-Suarez, A. L. P., López-Rincón, G., Martínez Neri, P. A., and Estrada-Chávez, C. (2014). Prolactin in Inflammatory Response. *Adv Exp Med Biol.* 243–264.

74. Pereyra, E.A.L., Dallard, B.E. and Calvinho, L.F. (2014). Aspects of the Innate Immune Response to Intramammary *Staphylococcus aureus* Infections in Cattle. *Rev Arg Microb.* 46:363-75
75. Pfaff, D., Waters, E., Khan, Q., Zhang, X., & Numan, M. (2011). Minireview: estrogen receptor-initiated mechanisms causal to mammalian reproductive behaviors. *Endocrinology*, 152(4), 1209–1217.
76. Platenburg G. J., Vollebregt E. J., Karatzas C. N., Kootwijk E.P., De Boer H. A., Strijker R. (1996). Mammary gland-specific hypomethylation of Hpa II sites flanking the bovine alpha S1-casein gene. *Transgenic Res.* 5: 421-31
77. Pollitt, E., Szkuta, P. T., Burns, N., and Foster, S. J. (2018). *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLoS Pathog.* 14(6), e1007112.
78. Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.*, 28(10), 1057–1068.
79. Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews. Endocrinol.* 7(12), 715–726.
80. Qazi A, Tsai-Morris C y Dufau M. (2006). “Ligand-Independent Homo and Heterodimerization of Human Prolactin Receptor Variants: Inhibitory Action of the Short Forms by Heterodimerization”. *J. Mol Endocrinol.* 20: 1912-32.
81. Rainard, P. (2017). Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction? *Vet Res.* 48, 25.
82. Rainard, P., Cunha, P., and Gilbert, F. B. (2016). Innate and Adaptive Immunity Synergize to Trigger Inflammation in the Mammary Gland. *PloS one.* 11(4), e0154172.
83. Raven, L. A., Cocks, B. G., Goddard, M. E., Pryce, J. E., and Hayes, B. J. (2014). Genetic variants in mammary development, prolactin signalling and involution pathways explain considerable variation in bovine milk production and milk composition. *Genet Sel Evol.* 6(1), 29.
84. Rijkels, M., Elnitski, L., Miller, W., and Rosen, J. M. (2003). Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics.* 82(4):417-32.
85. Rijkels, M., Freeman-Zadrowski, C., Hernandez, J., Potluri, V., Wang, L., Li, W., and Lemay, D. G. (2013). Epigenetic modifications unlock the milk protein gene loci during mouse mammary gland development and differentiation. *PloS one.* 8(1), e53270.
86. Rösler, B., Wang, X., Keating, S. T., Joosten, L., Netea, M. G., and Van de Veerdonk, F. L. (2018). HDAC inhibitors modulate innate immune responses to microorganisms relevant to chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin Exp Immunol.* 194(2), 205–219.
87. Sackmann-Sala, L., Guidotti, J.-E., and Goffin, V. (2015). Minireview: Prolactin Regulation of Adult Stem Cells. *Mol Endocrinol.* 29: 667–681.
88. Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrickc, J., Fontainec, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leighf, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka. A., Smith, D.G., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N., Seyfert, H.M. (2011). Host-response

- patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 44:270-89
89. Sharma, N., and Jeong, D. K. (2013). Stem Cell Research: A Novel Boulevard towards Improved Bovine Mastitis Management. *Int J Biol Sci.* 9: 818–829.
 90. Shu-Ching Yan, M., Matouk, C.C., and Marsden, P.A. (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol.* 109: 916–926
 91. SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2018). Panorama de la leche en México. Recuperado de:
<http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Panorama%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf>
 92. Singh, K., Erdman, R. A., Swanson, K. M., Molenaar, A. J., Maqbool, N. J., Wheeler, T. T., Stelwagen, K. (2010). Epigenetic Regulation of Milk Production in Dairy Cows. *J. of Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 15(1), 101–112.
 93. Smale, S.T., Tarakhovsky, A., and Natoli, G. (2014). Chromatin contributions to the regulation of innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 32:489-511
 94. Stephens, K. E., Miaskowski, C. A., Levine, J. D., Pullinger, C. R., and Aouizerat, B. E. (2013). Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes. *Biol Res Nurs.* 15(4):373-81
 95. Strachan, M.W.J., Teoh, W.L., Don-Wauchope, A. C., Seth, J., Stoddart, M., and Beckett, G.J. (2003). Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. *Clinical Endocrinology*, 59: 339-346.
 96. Sunkara, L. T., Jiang, W., and Zhang, G. (2012). Modulation of Antimicrobial Host Defense Peptide Gene Expression by Free Fatty Acids. *PLoS ONE*, 7(11).
 97. Téllez-Pérez, A. D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. and López-Meza, J. E., (2012). “Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization,” *Vet Microbiol.* 160: 91–98.
 98. Thompson-Crispi, K., Atalla, H., Miglior, F., and Mallard, B. A. (2014). Bovine Mastitis: *Front Immunol*, 5, 493.
 99. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., and Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 28, 603–661.
 100. Triantaphyllopoulos, K. A., Ikonomopoulos, I., and Bannister, A. J. (2016). Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics and Chromatin.* 9, 31.
 101. Vanselow, J., Yang, W., Herrmann, J., Zerbe, H., Schuberth, H.-J., Petzl, W., Seyfert, H.-M. (2006). DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of S1-casein synthesis during acute mastitis. *Journal of J. Mol. Endocrinol.* 37(3), 463–477.
 102. Vaz, J., Akbarshahi, H., & Andersson, R. (2013). Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.*, 19(5), 616–630.
 103. Vaz, J., Akbarshahi, H., and Andersson, R. (2013). Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 19(5), 616–630.

104. Velázquez M. 2005. "Surgimiento y Diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente". *Salud pública Méx* v.47 n.5.
105. Vo, A. T. and Millis, R. M., (2012). Epigenetics and breast cancers. *Obstet Gynecol Int.* 2012:602720.
106. Wang, C., Symington, J. W., Ma, E., Cao, B., & Mysorekar, I. U. (2013). Estrogenic modulation of uropathogenic *Escherichia coli* infection pathogenesis in a murine menopause model. *Infect Immun*, 81(3)
107. Wang, J., Yang, Z., Fu, S., Liu, B., Wu, D., Wang, W., Sun, D., Wu, R., Liu, J. (2016). Bovine lactotroph cultures for the study of prolactin synthesis functions., *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 52:296-304
108. Wellnitz, O. y Bruckmaier, R.M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192(2):148
109. Whelehan, C. J., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Young, F. J., and O'Farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 140(3-4), 181–189.
110. Wira, C. R., Fahey, J. V., Ghosh, M., Patel, M. V., Hickey, D. K., and Ochiel, D. O. (2010). Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol.* 63:6.
111. Yang, X., Guo, Y., He, J., Zhang, F., Sun, X., Yang, S., and Dong, H. (2017). Estrogen and estrogen receptors in the modulation of gastrointestinal epithelial secretion. *Oncotarget.* 8(57), 97683–97692.
112. Yasmin, R., Siraj, S., Hassan, A., Khan, A.R., Abbasi, R. & Ahmad, N. (2015). Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators Inflamm.* 2015:201703.
113. Yasmin, R., Siraj, S., Hassan, A., Khan, A.R., Abbasi, R. and Ahmad, N. (2015). Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators Inflamm.* 2015:201703
114. Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H., (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 16(4):357-72.
115. Zhang, G. and Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life.* 66: 240-256.

XI. Anexos

Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de las HDACs

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)	Tm (°C)
HDAC2 NM_001075146.1	D	GATACACAATCCGCAACGTTGC	127	57.1 °C
	R	TGCAGTTTGAAGTCCGGTCC		57.7 °C
HDAC3 NM_001206243.1	D	GATCGATTGGGCTGCTTCAAC	96	56.6 °C
	R	CCACCTAGCACCAGTAGAGG		56.6 °C
HDAC3 NM_001206243.1	D	GATCGATTGGGCTGCTTCAAC	96	56.6 °C
	R	CCACCTAGCACCAGTAGAGG		56.6 °C
HDAC4 XM_024990285.1	D	CAGCTTCTGAACCCAACCTG	141	56 °C
	R	CCGAGTCTGTGACATCCAAG		55.2 °C
HDAC5 NM_001038025.2	D	GGAGAATGGCTTTACGGGCT	114	57.5 °C
	R	GAGGGAGACGTGTAGAGGGCTG		58.9 °C
HDAC6 NM_001098960.1	D	CTGATGTTGGTTCACAGCCTAG	117	55.6 °C
	R	GTTCCGATGCAGATAAACTGAGTC		55.6 °C
HDAC7 XM_005206369.3	D	CCGACACCATCTGGAATGAG	183	55.3 °C
	R	CCACTGAGTTGAAGAAGCAGAAG		55.7 °C
HDAC8 NM_001076231.2	D	GTATGTTAGCGTGTGCGACTC	163	55.9 °C
	R	CTGCAGATAGGCATCGGTATG		55.2 °C
HDAC9 XM_005205236.4	D	CAGAAGTGTGAGACCCAGACAC	139	57.3 °C
	R	CTGTAGGAGAGCTTGGTGGC		57.6 °C
HDAC10 NM_001075460.1	D	GTCCAAGGAGTATGATGCCGTC	191	57.5 °C
	R	CGTTGTTGAACACGCAGAATCC		57 °C
HDAC11 NM_001102056.1	D	GAGCTGGTGTTCGGATAGTC	172	57.2 °C
	R	GTGTGTCTGAGTTCTGTGCTGAG		57.6 °C