



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN
BIOTECNOLOGÍA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA**

TESIS

**“Los lípidos de semilla de aguacate regulan la respuesta inmune innata de las células de
epitelio mamario bovino infectadas con *Staphylococcus aureus*”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

QUE PRESENTA:

M.C. MARISOL BÁEZ MAGAÑA

ASESOR:

DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

COASESOR:

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE DE 2019



El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la coasesoría del Dr. Rafael Salgado Garciglia. Para su realización se contó con el apoyo de la beca no. 276925 de CONACyT y de los proyectos CIC14.5 y CIC2.1 de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, y CONACyT (CB-2013-221363 y INFR-2014-230603).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por todos los recursos aportados durante toda mi formación académica, ya que ha sido mi casa desde la preparatoria, gracias a la presencia de esta Universidad he podido llegar a culminar esta etapa de mi vida académica.

Agradezco a CONACyT por las becas y apoyos otorgados durante la maestría y el doctorado.

También agradezco todo el apoyo otorgado por mis asesores, que, aunque en el papel solo aparecen dos en la vida real fueron tres, el doctor Joel, el doctor Rafa y la doctora Alejandra. Muchas gracias a los tres por apoyarme y ayudarme a crecer. También agradezco a mi comité de sinodales Doctora Soledad y el Doctor Ramón, por todas sus aportaciones e ideas para que este trabajo saliera lo mejor posible, así como a la Doctora Leluo Guan y el Doctor Eduardo Cobo, por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindarme una experiencia fuera de mi país.

Durante este trabajo realicé varias estancias en diferentes laboratorios, en los cuales siempre fui bien recibida por lo que quiero reconocer y agradecer el apoyo técnico que me fue otorgado por la M.C. Alejandra Hernández, D.C. Lourdes Macías, M.C. Perla García, M.C. Yolanda García, M.C. Yanhong Chen y M.C. Paloma Araujo, gracias a todas ustedes por facilitarme y ayudarme a sacar adelante este trabajo, aprendí mucho de cada una.

Un agradecimiento especial a todos mis compañeros y excompañeros de laboratorio que son muchos, gracias por brindarme su apoyo, amistad y por aguantarme, de cada uno me llevo un aprendizaje, se quedan en mi memoria como mi familia de laboratorio que en realidad eso fuimos.

Sobre todo, y el más importante de los agradecimientos a mi familia, mi mayor tesoro, mil gracias por siempre ser mi apoyo y mi pilar, gracias mami por tu amor y apoyo incondicional por transmitirme la fuerza necesaria para continuar y no rendirme, gracias papá por todo tu apoyo y tus palabras de aliento y a mis hermanos por aguantarme y por apoyarme, los amo.

ÍNDICE

	Página
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
I.1.1. Infecciones crónicas causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	1
I.2. Respuesta inmune innata	2
I.3. Mastitis bovina	3
I.3.1. Interacción entre las células de epitelio mamario bovino- <i>S. aureus</i>	5
I.4. Epigenética	6
I.4.1. Modificaciones epigenéticas por patógenos intracelulares	7
I.4.2. Modificaciones epigenéticas inducidas por <i>S. aureus</i> durante la mastitis	9
I.5. Tratamientos inmunomoduladores y epigenéticos como alternativas de control de la mastitis bovina	10
I.6. Propiedades inmunomoduladoras del aguacate	12
II. ANTECEDENTES	15
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVO GENERAL	17
IV.1. Objetivos específicos	17
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
VI. RESULTADOS	19
VI.1. Capítulo 1 - “Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) reduces <i>Staphylococcus aureus</i> internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells”	20
Abstract	20
1. Introduction	20
2. Materials and Methods	21
3. Results	23
4. Discussion	25

5. Conclusions.....	27
References	28
VI.2. Capítulo 2 - Análisis de las rutas de señalización involucradas en la internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas reguladas por los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate	30
Resumen	30
Abstract	31
1. Introducción	32
2. Materiales y métodos	34
3. Resultados y discusión.....	36
4. Conclusión	38
Referencias	38
VI.3. Capítulo 3 - Lipid-rich extract from Mexican avocado seed induces epigenetics changes in bovine mammary epithelial cells during <i>Staphylococcus aureus</i> internalization	46
Abstract	46
1. Introduction.....	47
2. Materials and methods	49
3. Results.....	54
4. Discussion	56
5. Conclusion	59
References	60
VI.4. Capítulo 4 - Extracción y caracterización de la Kupandina de aguacate nativo mexicano (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>)	76
Resumen	77
Abstract	78
1. Introducción	79
2. Materiales y métodos	80
3. Resultados y discusión.....	82
4. Conclusión	83
Referencias	83
VI.5. Capítulo 5 – The Kupandin from Mexican avocado seed (<i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>) regulates the innate immune response in bovine mammary epithelial cells: Implications during <i>Staphylococcus aureus</i> internalization	89
Abstract	89

1. Introduction.....	90
2. Materials and Methods.....	92
3. Results	98
4. Discussion	100
References	103
VI.6. Capítulo 6 – Recordando al enemigo para eliminarlo: Inmunidad innata entrenada	118
VII. Discusión general	122
VIII. CONCLUSIÓN GENERAL.....	127
IX. REFERENCIAS	128

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Tratamientos dirigidos al control de la internalización de <i>S. aureus</i> y la inmunomodulación de la célula hospedera en la mastitis bovina.....	10
Tabla 2. Comparación de los efectos de los DLCL y la kupandina en la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB.....	125

Índice de Figuras

Figura 1. Interacción célula de epitelio mamario bovino- <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Figura 2. Las señales ambientales o el estrés por patógenos inducen modificaciones en la maquinaria epigenética y la transcripción de los genes	8
Figura 3. Derivados de ácidos grasos de cadena larga presentes en plantas.	14
Figura 4. Representación esquemática de la estrategia metodológica.....	18

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria que provoca infecciones crónicas en humanos y animales. Es el principal agente causal de la mastitis bovina crónica y que tiene la capacidad de internalizarse en las células del epitelio mamario bovino (CEMB), proceso que le permite evadir la respuesta inmune innata (RII) del hospedero. Además, esta bacteria inhibe la activación de factores transcripcionales y provoca cambios químicos sobre las histonas y microRNAs, ambos considerados como cambios epigenéticos que se han relacionado con una inhibición de la expresión de genes de la RII. Otra característica de *S. aureus* es su alta resistencia a los antimicrobianos, que en el caso de la mastitis bovina resultan poco exitosos, por lo que se requiere la búsqueda de tratamientos más eficientes. Los extractos derivados de plantas son una alternativa ya que tienen compuestos con actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, la semilla del aguacate es una fuente de fitoquímicos con este tipo de propiedades. Previamente, el grupo de trabajo reportó que un extracto lipídico de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) rico en derivados lipídicos de cadena larga (DLCL) disminuyó la internalización de *S. aureus* en las CEMB (~80%), además indujo la expresión de IL-10 y disminuyó la expresión de TNF- α , lo que sugiere que los DLCL presentan efectos antiinflamatorios. Sin embargo, los mecanismos involucrados durante estos efectos, así como la molécula responsable de ellos no se conoce. En esta investigación se demostró que los DLCL inhiben la adhesión de *S. aureus* en las CEMB (~40%), además el pre-tratamiento durante 24 h indujo la producción de moléculas antimicrobianas como las especies reactivas de nitrógeno (ej. óxido nítrico) que se relacionan con la eliminación de la bacteria en el medio extracelular. Adicionalmente, disminuyó la activación de la MAPK p38 y Akt las cuales están relacionadas con la internalización de *S. aureus* y la expresión de genes inflamatorios. Asimismo, los DLCL incrementaron la dimetilación y trimetilación de la histona H3K9, sin que se observaran cambios sobre los niveles de acetilación sobre la histona H3K9 y sobre la actividad de las HDACs. Se purificó el compuesto mayoritario de los DLCL, el cual fue denominado kupandina, esta presentó efectos similares a los mostrados por los DLCL, lo que sugiere que esta es la molécula responsable de inhibir la internalización de *S. aureus*, así como de los efectos inmunomodulares, además de ser un modulador epigenético.

Palabras clave: *S. aureus*, internalización, epigenética, inmunomodulación, semilla de aguacate, células de epitelio mamario bovino.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a bacterium that causes chronic infections in humans and animals. *S. aureus* is the main pathogen associated with chronic bovine mastitis, which has been related with bacterial internalization capacity into bovine mammary epithelial cells (bMECs) that allow it to evade the host's innate immune response (IIR). In addition, *S. aureus* inhibits the activation of transcriptional factors and favors epigenetic changes (chemical modifications on histones and microRNAs), both are related with gene expression modulation of the IIR. Another characteristic of *S. aureus* is its high rate of antimicrobial resistance, especially in the case of bovine mastitis, because the classic treatments are unsuccessful, therefore it is necessary to searching for alternative treatments. Avocado seed is a source of phytochemicals with anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Previously, our group of work reported that a lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) (LEAS) decreased the internalization of *S. aureus* into bMECs by ~80%. In addition, LEAS increased IL -10 expression and decreased the expression of TNF- α , which suggest that LEAS has anti-inflammatory effects; however, the mechanisms involved in these effects, as well as the molecule responsible, has not been analyzed. In this work it was shown that LEAS inhibit the adhesion of *S. aureus* to bMECs (~40%); also, pre-treatment during 24 h favored the production of antimicrobial molecules such as reactive nitrogen species (ca. nitric oxide) which was related with elimination of extracellular bacteria. In addition, LEAS decreased MAPK p38, and Akt activation which has been related with *S. aureus* internalization and the inflammatory genes expression. Moreover, LEAS increased the di and tri-methylation of histone H3K9; however, no changes were observed on H3K9 acetylation and HDACs activity. Finally, the most abundant compound in LEAS was purified and was named kupandin. Interestingly, kupandin showed similar effects to those shown by LEAS. These results suggest that kupandin is responsible for decreasing *S. aureus* internalization into bMECs, as well as has immunomodulatory and epigenetic effects.

Keywords: *S. aureus*, internalization, epigenetics, immunomodulation, avocado seed, bovine mammary epithelial cells.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, perteneciente a la familia Micrococcaceae que se caracteriza por presentar una morfología en forma de cocos agrupados en racimos y colonias doradas, es un patógeno oportunista responsable de infecciones en humanos y animales (Lowy, 1998). En humanos se ha relacionado con enfermedades como neumonía, endocarditis, osteomielitis, septicemia y bacteriemia; además, se considera que una cuarta parte de la población son acarreadores asintomáticos (Fraunholz and Sinha, 2012). En animales es el principal agente causal de la mastitis subclínica provocando grandes pérdidas económicas a la ganadería lechera de todo el mundo. (Barkema et al., 2006; Nickerson, 2011; Hiitiö et al., 2017). El genoma de *S. aureus* consiste de un cromosoma circular de 2.8 mpb aproximadamente, además de plásmidos, transposones y profagos. Una característica importante en la patogenicidad de la bacteria es que los genes de virulencia son expresados dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre, lo que provoca diferentes niveles de daño que van desde infecciones superficiales en la piel, infecciones en el tracto respiratorio, síndrome de choque tóxico causado por toxinas, septicemia e infecciones crónicas y recurrentes (Lowy, 1998, 2003; McCarthy and Lindsay, 2013).

Parte del éxito de esta bacteria se debe a que logra especializarse dependiendo del hospedero, a nivel genético es posible diferenciar entre clonas de *S. aureus* exitosas asociadas a humanos de las clonas asociadas a bovinos, aunque presenten mecanismos de infección similares (Herron-Olson et al., 2007). Además, *S. aureus* logra adherirse, internalizarse, sobrevivir y evadir los mecanismos de defensa de las células fagocíticas profesionales y no profesionales, debido en parte a la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales en las que se encuentra durante la colonización (Alva-Murillo et al., 2014a; Foster et al., 2014; Mäder et al., 2016).

I.1.1. Infecciones crónicas causadas por *Staphylococcus aureus*

Las infecciones crónicas en general son de gran importancia médica y económica, tanto en humanos como en animales. Las infecciones crónicas causadas por patógenos bacterianos se

caracterizan por cursar con largos periodos de incubación y generalmente son infecciones recalcitrantes que requieren de tratamientos terapéuticos por mucho tiempo, que resultan costosos y en algunos casos poco efectivos; asimismo, las bacterias patógenas relacionadas con estas infecciones presentan un arsenal de genes relacionados al metabolismo bacteriano, lo que les permite ajustarse a la disponibilidad de nutrientes en el ambiente y sobrevivir durante largos periodos generando la persistencia (infecciones que se mantienen constantes durante largos periodos), además evaden el sistema inmune innato a través de distintos mecanismos, como la internalización en las células del hospedero, la modulación de la respuesta inflamatoria a través de la producción de citocinas y la regulación de la expresión de genes clave relacionados con la defensa del hospedero (Casadevall and Pirofski, 2009; Garzoni and Kelley, 2009; Byndloss and Tsolis, 2016).

En el caso de las infecciones ocasionadas por *S. aureus* el proceso de adhesión e internalización en células fagocíticas no profesionales, como son los epitelios, osteoblastos, fibroblastos, endotelios, etc., es clave en infecciones crónicas como la osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, infecciones en el tracto respiratorio en humanos, y en animales como la mastitis subclínica bovina (Kerro Deogo et al., 2002; Aitken et al., 2011; Hoffmann et al., 2011).

Otro punto importante que contribuye en las infecciones crónicas causadas por *S. aureus* es la supervivencia intracelular ya que *S. aureus* presenta diferentes estrategias como el escape del compartimento endosomal, la persistencia dentro de la vacuola, la supervivencia dentro del compartimento lisosomal, así como el cambio de fenotipo a variantes de colonia pequeñas (VCP). Este fenotipo es reversible y se caracteriza por la disminución de la actividad metabólica y la tasa de crecimiento, lo que contribuye a la persistencia bacteriana (Garzoni and Kelley, 2009; Atalla et al., 2010), y la citotoxicidad induciendo apoptosis o necrosis (Garzoni and Kelley, 2009). Estas estrategias le permiten a *S. aureus* evadir la respuesta inmune innata del hospedero asegurando el éxito de la infección.

I.2. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata (RII) es la primera línea de defensa del organismo, es una respuesta compleja en la que participan diferentes tipos celulares (Schleimer et al., 2007; Striz et al., 2014). La principal tarea de la RII es la eliminación de los patógenos o elementos causantes de

daño, y recuperar inmediatamente la homeostasis del organismo (Flanagan et al., 2012). Un punto clave en la RII, es el proceso de fagocitosis donde participan una variedad de tipos celulares que llevan a cabo esta función, que se clasifican como células fagocíticas profesionales [macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK), células dendríticas, monocitos, células linfoides innatas, entre otras] y células fagocíticas no profesionales como los epitelios, fibroblastos, endotelio y células mesenquimales. Además, en la defensa también participan otros elementos como las mucosas, las lágrimas, el ácido gástrico, el sistema del complemento, citocinas y péptidos antimicrobianos, etc. (Ganz, 2003; Heine, 2008; Striz et al., 2014).

Las células de la RII cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR) que reconocen a los patógenos a través del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Newton and Dixit, 2012; Oliveira-Nascimento et al., 2012). Este reconocimiento permite la fagocitosis del microorganismo para su eliminación y en algunos casos la presentación de antígeno, además, la interacción desencadena cascadas de señalización a través de las cinasas que a su vez activan a los factores transcripcionales relacionados con la producción de las citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas de oxígeno (ERO), entre otros elementos relacionados con la respuesta inmune (de Lima et al., 2006; Cheroutre and Huang, 2007; Park et al., 2017).

Las citocinas y las quimiocinas (subfamilia de las citocinas) son proteínas o glicoproteínas pequeñas (~4-20 kDa) producidas por las células inmunes y son mediadores inflamatorios que juegan un papel importante en la homeostasis de los tejidos, la comunicación celular, quimiotaxis, apoptosis y la preparación de la respuesta inmune adaptativa (Quintin et al., 2014; Striz et al., 2014; Cavaillon, 2015; Gordon, 2016). Mientras que los péptidos antimicrobianos son moléculas de entre 10 y 50 aminoácidos que pueden ser de naturaleza catiónica y aniónica, se clasifican con base en su estructura secundaria y su importancia radica en su actividad antimicrobiana, aunque también actúan como mediadores en la comunicación de la respuesta inmune (Schauber and Gallo, 2008; Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

I.3. Mastitis bovina

La mastitis bovina es una enfermedad que afecta principalmente al ganado lechero y se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, provoca una disminución significativa de la producción de la leche, afectando la inocuidad, la calidad y el valor nutricional de ésta (Hogeveen et al., 2011; Hiitiö et al., 2017). Según la agencia norteamericana California Dairy Research Foundation, en el 2016 estimó que las pérdidas ocasionadas por la mastitis bovina, fueron desde los 100 hasta los 600 dólares por vaca al año, en nuestro país no hay estadísticas confiables que permitan estimar las pérdidas económicas que esta enfermedad ocasiona, aunque, se asume que los efectos son similares a los reportados en Estados Unidos, Canadá o la Unión Europea.

Las causas de la enfermedad pueden ser diversas, como golpes, traumatismos e infecciones, siendo estas últimas la de mayor importancia desde el punto de vista médico y económico (Barkema et al., 2006). Dependiendo del agente infeccioso es el tipo de respuesta que se presenta, la mastitis se clasifica como mastitis clínica cuando se observan signos agudos de inflamación, como tumefacción, calor, dolor, rubor y pérdida de la función, mientras que en la mastitis subclínica, los signos físicos de inflamación no son evidentes, cursa con infecciones recurrentes, una baja en la producción y calidad de la leche, así como el aumento en el conteo de células somáticas mayor a 200,000 células/mL de leche. Cuando este conteo se mantiene constante en el animal durante un año, se considera a la enfermedad como una mastitis crónica (Barkema et al., 2006; Aitken et al., 2011; Oikonomou et al., 2012; Hiitiö et al., 2017). Los microorganismos causantes de la mastitis pueden ser agrupados en 4 categorías: 1) contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae* y *Mycoplasma bovis*); 2) medioambientales (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus ssp* y *Streptococcus uberis*); 3) oportunistas (*Staphylococcus coagulasa negativos*), y 4) hongos y levaduras (*Candida sp*, *Trichosporon sp*, *Saccharomyces sp* y *Aspergillus sp*) (Barkema et al., 2006; Nickerson, 2011; Zadoks et al., 2011).

De todos estos microorganismos, destaca *S. aureus*, ya que está relacionado con un 70% de los casos de mastitis subclínica. Para que *S. aureus* establezca la infección, primero deberá atravesar las barreras físicas del canal del pezón y llegar a la cisterna de la glándula mamaria, una vez que se encuentra dentro de ésta logra establecerse, evadiendo los mecanismos de la respuesta inmune como el sistema del complemento, lactoferrina, lisozima, citocinas, inmunoglobulinas y otros

elementos con actividad bactericida (Aitken et al., 2011; Wellnitz and Bruckmaier, 2012). Otro paso importante en el éxito de la infección de esta bacteria es la internalización en las células epiteliales de la glándula mamaria, en las que se multiplica y sobrevive (Kerro Deogo et al., 2002).

I.3.1. Interacción entre las células de epitelio mamario bovino-*S. aureus*

Las células epiteliales forman parte de la respuesta inmune innata, generalmente son la primera barrera física que entra en contacto con los patógenos (Schleimer et al., 2007). La principal función que cumplen las células de epitelio mamario bovino (CEMB) en la glándula mamaria es la producción de la leche; sin embargo, también participan en la defensa contra patógenos, aunque ésta es una tarea secundaria, por lo que se les consideran células fagocíticas no profesionales (German and Barash, 2002; Kerro Deogo et al., 2002).

El primer paso en la interacción entre las CEMB y *S. aureus* es el reconocimiento de componentes de la pared celular bacteriana, como los diacilglicéridos, por el receptor TLR2 de la membrana de las CEMB. Esta interacción desencadena cascadas de señalización en las CEMB en las que participan diferentes cinasas como las MAPK (JNK, p38 y ERK1/2) (Fig. 1) (Alva-Murillo et al., 2015). La activación de estas cinasas durante la infección de *S. aureus* se relaciona con la activación de factores transcripcionales; sin embargo, *S. aureus* inhibe la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), clave en la respuesta inflamatoria y de esta manera secuestra la respuesta inmune de la célula (Yang et al., 2008; Lara-Zárate et al., 2011). No obstante, la interacción de *S. aureus*-TLR2 induce la fosforilación de la MAPK p38, y ésta a su vez activa al factor transcripcional AP-1, el cual se relaciona con la expresión de péptidos antimicrobianos del grupo de las defensinas, por lo que se ha sugerido como una ruta alternativa de defensa de las CEMB frente al ataque de *S. aureus* (Alva-Murillo et al., 2015).

Como se ha señalado, *S. aureus* puede ser endocitado por las CEMB. Un receptor crucial para que se lleve a cabo este proceso son los receptores de integrinas α 5 β 1. Las integrinas están relacionadas al mecanismo de internalización llamado tipo “Zipper” (Fig. 1). La unión de las integrinas con el complejo proteína de unión a fibronectina-fibronectina provoca la activación de un foco de adhesión en el que se encuentra la cinasa de adhesión focal (FAK), relacionada con el rearrreglo del citoesqueleto de actina para llevar a cabo la endocitosis bacteriana (Sinha y

Herrman, 2005; Alva-Murillo et al., 2014). Además, en las CEMB la GTPasa Rac₁ es necesaria para la internalización de *S. aureus* (Sánchez-Ceja, 2019). Sin embargo, existen otros niveles de interacción que siguen siendo exploradas, como es la modulación epigenética la cual en diferentes modelos de infecciones crónicas se ha observado que juega un papel crucial (Bierne et al., 2012).

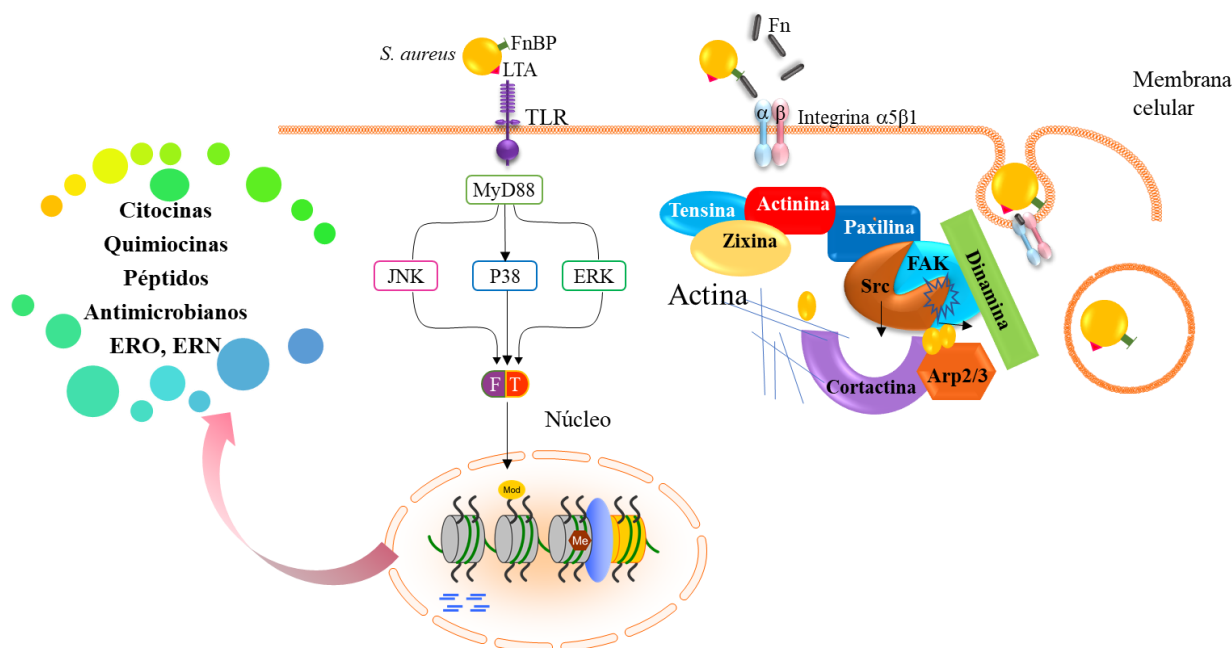


Figura 1. Interacción célula de epitelio mamario bovino-*Staphylococcus aureus*.

El receptor TLR2 de las CEMB reconocen el ácido lipoteicoico (LTA) de *S. aureus* desencadenando la ruta de señalización dependiente de la proteína adaptadora de la respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), cascada abajo induce la activación de las MAPK ERK, JNK y p38, que subsecuentemente inducen la activación de factores transcripcionales como AP-1, que modula la expresión de genes de citocinas, péptidos antimicrobianos y otros elementos importantes en la RII. En el mecanismo tipo “Zipper” las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) presentes en *S. aureus*, se unen a la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular formando el complejo FnBP-Fn, éste es reconocido por las integrinas $\alpha5\beta1$, que conlleva a la formación de focos de adhesión en la subunidad $\beta1$, donde se reclutan proteínas estructurales, que participan en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, la formación del endosoma para llevar a cabo la internalización bacteriana (Oliveira-Nascimento et al., 2012; Alva-Murillo et al., 2014).

I.4. Epigenética

El termino epigenética es utilizado para describir cambios en el fenotipo (que pueden ser heredados) que son provocados por diferentes mecanismos que inducen cambios sobre la cromatina y regulan procesos moleculares del ADN como la transcripción, replicación y reparación, pero que no involucran la mutación de éste (Jaenisch and Bird, 2003; Allis et al., 2007; Goldberg et al., 2007). Sin embargo, aún se discute sobre una definición más precisa que

englobe todos los mecanismos relacionados, en algunos casos, estos cambios pueden ser heredados, por lo que la definición de epigenética se vuelve cada vez más compleja, en este sentido el Consorcio de Mapeo del Epigenoma del NIH (National Institutes of Health, USA) definió epigenética como “Cambios heredables en la actividad y expresión de los genes (en células progenitoras o individuos) y también alteraciones estables a largo plazo en el potencial transcripcional de una célula que no son necesariamente heredables” (Gayon, 2016).

Hasta el momento se han descrito cinco niveles de regulación epigenética, los cuales incluyen: 1) La arquitectura de la cromatina, 2) modificaciones químicas sobre las histonas, 3) ARN no codificantes, 4) metilaciones en las islas CpG del ADN, y 5) enzimas modificadoras epigenéticas, las cuales están relacionados con diferentes procesos celulares, y con enfermedades crónicas como el cáncer y de tipo infeccioso (Allis et al., 2007; Zhou et al., 2011; Allis and Jenuwein, 2016).

I.4.1. Modificaciones epigenéticas por patógenos intracelulares

Las modificaciones epigenéticas son parte fundamental de la activación y respuesta de las células fagocíticas profesionales y no profesionales, en el caso de los monocitos las modificaciones postraduccionales en las histonas están relacionadas en el destino de estas células, es decir, si se convertirá en una célula dendrítica o macrófago y la polarización de éste (Cole et al., 2016). Se ha reportado que las marcas de acetilación sobre las histonas H3 y H4, la metilación en las lisinas de histona H3 (H3K9me y H3K27me) y la fosforilación sobre la serina de la histona 3 (H3S10), afectan la expresión de los genes de citocinas relacionadas con la respuesta inflamatoria, como TNF- α , IL-6 o INF- β (Sullivan et al., 2007; Hamon and Cossart, 2008; Duval et al., 2016). Este marcaje de las histonas es consecuencia de la interacción con elementos microbianos como el LPS, LTA o β -Glucano y generalmente desaparecen una vez que el patógeno o el estímulo es eliminado (Fig. 2) (Netea et al., 2011; Bierne et al., 2012). Sin embargo, se ha reportado que en ocasiones estos estímulos logran inducir un marcaje epigenético que perdura durante semanas o meses en sitios específicos de la cromatina, sobre todo en las regiones promotoras de los genes de la respuesta inflamatoria, como consecuencia, los macrófagos se mantienen en un estado de “alerta” y cuando se presenta un segundo evento de infección la respuesta logra ser más intensa e inmediata, confiriéndole a las células de la

respuesta inmune innata una especie de memoria a través de las modificaciones epigenéticas, a este fenómeno se le ha denominado “respuesta inmune innata entrenada” (Netea, 2013; Quintin et al., 2014). Por otra parte, se ha observado que el estímulo prolongado con LPS sobre los macrófagos induce un fenómeno de tolerancia, y como consecuencia una disminución en la respuesta requerida, este fenotipo se ha relacionado con enfermedades como la sepsis (Cole et al., 2016). Posiblemente estos mecanismos no sean exclusivos de los monocitos/macrófagos; sin embargo, una de las hipótesis es que también los epitelios podrían presentar memoria a través del marcaje epigenético, pero aún falta evidencia que lo respalde (Farber et al., 2016; Cassone, 2018).

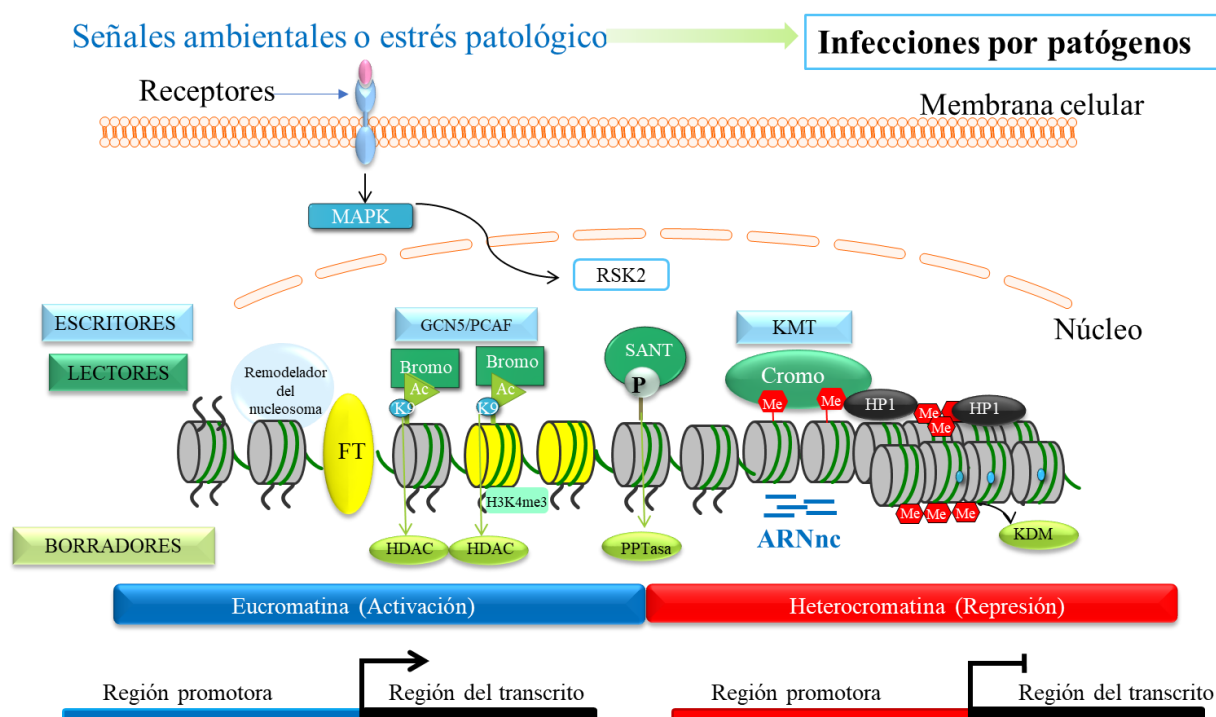


Figura 2. Las señales ambientales o el estrés por patógenos inducen modificaciones en la maquinaria epigenética y la transcripción de los genes.

Las señales ambientales u otros tipos de estrés, como el generado por patógenos, desencadenan cascadas de señalización que ocasionan cambios en la estructura de la cromatina, pasando de un estado de euromatina a heterocromatina o viceversa, sobre regiones específicas del ADN, donde se encuentran los genes relacionados con la respuesta de defensa ante estos eventos. Generalmente los cambios epigenéticos que permiten o suprimen la expresión de los genes, ocurren en la región promotora, aunque también las modificaciones se presentan sobre la región del marco de lectura influyendo en el éxito de la transcripción. Estos cambios sobre la cromatina influyen en el acceso de la maquinaria transcripcional, factores transcripcionales y otros elementos clave relacionados con la transcripción. Los cambios químicos covalentes relacionados con el estado de euromatina son la acetilación sobre la histona 3 en los residuos de lisina 9, 18 y 27 (H3K9ac, H3K18ac y H3K27ac), la fosforilación de la serina 10 (H3S10) y la trimetilación de la lisina 4 (H3K4me3); por otra parte, la heterocromatina está relacionada con la metilación en el ADN sobre las islas CpG y la histona 3 en los residuos de lisina 9, 18 y 27 (H3K9me3, H3K18me3 y H3K27me3). La coordinación de las modificaciones epigenéticas es llevada a cabo por las enzimas epigenéticas “borradoras”, “escritoras” y “lectoras”, las cuales son las encargadas de poner, eliminar o interpretar las modificaciones químicas covalentes sobre las histonas, respectivamente. Además, los ARN no codificantes forman

parte de otro nivel de regulación epigenética relacionado con la transcripción de los genes. Cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK), proteína ribosomal S6 cinasa 3 (RSK2), proteína de control general de la síntesis de aminoácidos 5 tipo 2 (GNC5), lisina metiltransferasa (KMT), acetilación (Ac), metilación (Me), lisina (K), fosforilación (P), proteína heterocromatina 1 (HP1), histona desacetilasa (HDAC), lisina desmetilasa (KDM), fosfopanteteinil transferasas (PPTasa), ARN no codificantes (ARN nc). Modificado de Bierne et al., 2012; Allis, Epigenetics, Second Edition. 2015.

I.4.2. Modificaciones epigenéticas inducidas por *S. aureus* durante la mastitis

Debido a la importancia médica y económica de la mastitis bovina causada por *S. aureus*, se ha tratado de entender la compleja interacción hospedero-patógeno con la finalidad de encontrar tratamientos que ayuden a combatir este problema, hasta el momento solo se tienen algunas pistas del papel de las modificaciones epigenéticas en la mastitis bovina subclínica causada por *S. aureus* (Vanselow et al., 2006; Jin et al., 2014; Modak et al., 2014; Sun et al., 2015; He et al., 2016; Song et al., 2016a). En este sentido, He et al. (2016) demostraron que linfocitos provenientes de sangre periférica de vacas con mastitis subclínica, presentan altos niveles de trimetilación en la histona H3K27 y sugieren que este cambio está relacionado con la disminución en la expresión de 36 genes de diferentes rutas metabólicas, así como la inducción de 25 genes relacionados con la ruta Jak-STAT.

Usando un modelo de mastitis en ratón se observó que el marcaje epigenético también es dependiente de la cepa de *S. aureus*, es decir, las cepas que provocan respuestas inflamatorias exacerbadas están relacionadas con la hiperacetilación de las histonas H3K9 y H3K14, mientras que en cepas de *S. aureus* que no están relacionadas con una inflamación exacerbada, los cambios no fueron detectados; sin embargo, se relacionó una disminución de la expresión de genes relacionados con la respuesta proinflamatoria (Modak et al., 2014). Posiblemente estos resultados pueden estar ligados a marcas de metilación, aunque faltan evidencias que corroboren esta hipótesis. También las cepas de *S. aureus* inactivadas con calor regulan la expresión de los microARN relacionados con genes de la respuesta inmune y rutas de señalización, además de inducir la expresión de cuatro miARN únicos (bta-miR-2339, miR-499, miR-23a and miR-99b) en la línea celular de epitelio mamario bovino MAC-T (Jin et al., 2014). Otro punto importante es que estos miRNA pueden viajar a través de los exosomas de la leche, por lo que pueden servir como biomarcadores para la detección de la infección (Sun et al., 2015).

I.5. Tratamientos inmunomoduladores y epigenéticos como alternativas de control de la mastitis bovina

En general, se considera que los tratamientos para las infecciones causadas por patógenos intracelulares se basan en el uso de terapias combinadas de antibióticos durante largos periodos de tiempo; sin embargo, en la mayoría de las ocasiones la tasa de éxito es muy baja (Barkema et al., 2006). En el 2015, la OMS lanzó un plan global para combatir la resistencia a los antibióticos, cuyo objetivo es enfatizar el problema de la aparición de un amplio rango de microorganismos resistentes a antibióticos y el impacto que estos ocasionan en la salud humana y animal, la industria alimentaria y el sector agrícola, así como la transferencia de resistencia a antimicrobianos entre diferentes especies, las pérdidas económicas ocasionadas por costos de los tratamientos y la producción. Además, la OMS hace un llamado a evitar el uso excesivo e innecesario de los antibióticos, creando conciencia en las sociedades y solicitando que se realice investigación en la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos al uso de los antimicrobianos (World Health Organization, 2015). En este sentido, se buscan estrategias de tratamientos alternativos para controlar la mastitis bovina subclínica, una de éstas es la búsqueda de sustancias con capacidad inmunomoduladora como las citocinas (proteínas), vitaminas E, D (liposolubles), ácidos grasos, péptidos antimicrobianos, glucósidos, terpenos y flavonoides obtenidos de las plantas (Lebish and Moraski, 1987; Sordillo et al., 2010; Téllez-Pérez et al., 2012a; Alva-Murillo et al., 2015) (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos dirigidos al control de la internalización de *S. aureus* y la inmunomodulación de la célula hospedera en la mastitis bovina

Naturaleza	Sustancia	Vía de administración y efectos	Modelo	Referencia
Citocinas	IL-2 (10-100 µg)/cuarto de la ubre	Administración intramamaria en concentraciones de 10 µg no afectaron la composición de la leche, mientras que la concentración de 100 µg incrementó el conteo de células somáticas (CCS) y presentó efectos citotóxicos	Vacas lactantes	Sordillo et al., 2010
	IL-2 (1 mg) + Cefapirina (300 mg)/cuarto de la ubre	Infusión intramamaria durante el periodo seco disminuyó la cantidad de UFC de <i>S. aureus</i> en la leche hasta un 50%; sin embargo, puede estar relacionada con un aumento en el número de abortos	Vacas en periodo seco que habían presentado infecciones intramamarias	Erskine et al., 2010

Tabla 1. Continuación

	IL-1 β 0.2 mg/cuarto de la ubre	La infusión intramamaria disminuyó en un 30% la cantidad de <i>S. aureus</i> en la leche, aumentó la cantidad de superóxido y el número de CCS en la leche	Vacas lactantes	Daley et al., 2010
	INF-gamma 10 ⁵ U/cuarto de la ubre	Esta concentración no afectó la calidad de la leche ni el CCS	Vacas lactantes	Sordillo et al., 1992
Vitaminas	Vitamina E (1 g) + Selenio (5 mg)	La inyección intramuscular redujo un 70% las infecciones intramamarias posparto	Vacas en periodo tardío de gestación con historial de mastitis subclínica y clínica	Hoque et al., 2016
	Vitamina E (3000 UI)	Inyección subcutánea incrementó la capacidad de fagocitosis y la muerte de las bacterias internalizadas en los neutrófilos obtenidos de muestras de sangre	Vacas en periodo seco	Hogan et al., 2010
	Vitamina D (50 nM) <i>In vitro</i> / 100 μ g	En cultivos <i>in vitro</i> disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> e induce la expresión de genes de péptidos antimicrobianos.	Cultivo de células de epitelio mamario bovino	Lippolis et al., 2011; Téllez-Pérez et al., 2012a; Alva-Murillo et al., 2014b
Ácidos grasos	Propionato (1 mM)	En cultivos <i>in vitro</i> disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> e induce la expresión de genes de péptidos antimicrobianos. <i>In vivo</i> modula la expresión de genes de citocinas proinflamatorias	Cultivo de células de epitelio mamario bovino/mastitis en ratón y epitelio mamario de ratón	Alva-Murillo et al., 2012; Wang et al., 2017
	Butirato (0.5 mM)	En cultivos <i>in vitro</i> disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> e induce la expresión de genes de péptidos antimicrobianos y modula la expresión de genes de citocinas proinflamatorias a través de la ruta TLR2/p38 e induce la activación de factores transcripcionales	Cultivo de células de epitelio mamario bovino	Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2015
	Hexanoato (1 mM)	En cultivos <i>in vitro</i> disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> e induce la expresión de genes de péptidos antimicrobianos	Cultivo de células de epitelio mamario bovino	Alva-Murillo et al., 2012

Tabla 1. Continuación

	Octanoato (1 y 0.25 mM)	En cultivos <i>in vitro</i> disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> (1 mM), mientras que la concentración de 0.25 mM incrementa la internalización, e induce la expresión de genes de péptidos antimicrobianos y modula la expresión de genes de citocinas proinflamatorias a través de la ruta TLR2/MAPK cinasas y promueve la activación de factores transcripcionales	Cultivo de células epitelio mamario bovino	Alva-Murillo et al., 2013, 2017
Péptidos antimicrobianos	Gamma-tionina (0.1 µg/mL)	Disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> , induce la expresión de TNF- α , IL-10 y péptidos antimicrobianos	Cultivo de células epitelio mamario bovino	Díaz-Murillo et al., 2016
	Thi 2.1 (5 y 10 µg/mL)	Disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> , induce la expresión de TNF- α , e IL-6, y disminuye IL-10 través de TLR2	Cultivo de células epitelio mamario bovino	Báez-Magaña et al., 2018
	PaDef (0.1 µg/mL)	Disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> y regula la expresión de genes de la RII	Cultivo de células epitelio mamario bovino	Morales-Pérez et al., 2018
Biomoléculas de plantas	<i>Panax ginseng</i> Ginsenoide Rgl (3 mg/mL)	En células MAC-T disminuyó la internalización de <i>S. aureus</i> , y la infusión intramamaria reguló la expresión de citocinas de la respuesta inflamatoria	Línea celular de epitelio mamario bovino (MAC-T)/ Vacas lactantes	Baravalle et al., 2010; Beccaria et al., 2018
	<i>Rhododendron dauricum</i> Farrerol (16 µg/mL)	Disminuye la internalización de <i>S. aureus</i> y regula la expresión de genes de la RII e inhibe la activación de NF- κ B	Cultivo de células epitelio mamario bovino y mastitis en ratón	Yang et al., 2013; Li et al., 2018

I.6. Propiedades inmunomoduladoras del aguacate

El aguacate (*Persea americana* Miller) es una planta que pertenece a la familia Lauraceae, forma parte de las angiospermas primitivas y se considera un fósil viviente. Se han descrito tres razas principales de aguacate: *P. americana* var. *drymifolia* raza mexicana, *P. americana* var. *guatemalensis* raza guatemala, y *P. americana* var. *americana* raza antillana, de las cuales se

han obtenido un gran número de cultivares e híbridos. Sin embargo, la variedad mexicana es la más utilizada en todo el mundo como portainjerto por su tolerancia al frío, el tamaño de los árboles, la calidad del fruto, además de que en esta raza se producen una gran cantidad de aceites con un alto contenido de ácidos grasos esenciales (Ibarra-Laclette et al., 2015).

El aguacate es un fruto de forma oval compuesto por una cubierta externa o epicarpio, un mesocarpio oleaginoso carnosos y comestible de color verde a amarillo, que recubre a la semilla. La semilla de aguacate es una fuente rica de fitoquímicos a los cuales se les han atribuido propiedades antimicrobianas, antifúngicas, anticancerosas y antiinflamatorias, la mayoría de estos efectos están relacionados con la presencia de un grupo de moléculas llamadas acetogeninas (Rodríguez-Sánchez et al., 2013; Rodríguez-López et al., 2015). Las acetogeninas provienen de la ruta de síntesis de los ácidos grasos de cadena larga, la estructura base es el ácido linolénico, aunque las acetogeninas se caracterizan por presentar cadenas alifáticas con número impar de carbonos (17, 19 y 21), con insaturaciones y un grupo acetoxi en lugar del carboxilo terminal, otra característica distintiva es la presencia de grupos hidroxilo (OH) o furanos a lo largo de la cadena (Fig. 3) (Rodríguez-Saona et al., 1998; Wang et al., 2004; Rodríguez-López et al., 2017). Se considera que la función de las acetogeninas en la planta es de protección contra patógenos, además de ser un reservorio de energía, y se encuentran en mayor proporción en la semilla del aguacate, aunque también se encuentran en el mesocarpo almacenadas en los oleosomas y la presencia de estas disminuye de forma proporcional a la madurez del fruto, también se han encontrado en las hojas de aguacate aunque en proporciones menores (Rodríguez-Saona et al., 1998; Rodríguez-López et al., 2017).

Por la naturaleza química de las acetogeninas se han considerado como fitoquímicos atractivos para tratar diversas enfermedades. Interesantemente se demostró que un grupo de acetogeninas llamadas alcoholes grasos polihidroxilados (PFA) (Fig. 3c) presentan actividad antiinflamatoria en células de queratinocitos humanos dañados por luz UV (Rosenblat et al., 2011). Hasta el momento no existe ningún reporte de efectos epigenéticos relacionados con las acetogeninas de aguacate.

Sin embargo, dentro de la familia de las anonáceas, la acetogenina escuamocina modula la fosforilación de la histona H3S10 y la apoptosis en diferentes líneas celulares cancerosas (cerebro, hígado y colon) (Lee et al., 2011). No obstante, la estructura química de las acetogeninas de las anonáceas presenta más de 30 carbonos en la cadena y varios anillos lactonas

y furanos a lo largo de la cadena (Fig. 3d). Asimismo, otro fitoquímico con una naturaleza similar a las acetogeninas de aguacate, es el ácido anacárdico que proviene de la nuez de la india (*Anacardium occidentale*), que actúa como inhibidor de la enzima histona acetil transferasa (HAT), además de que presenta propiedades antiinflamatorias a través de la inhibición del factor transcripcional NF-κB (Fig. 3e) (Sung et al., 2015). Estos resultados llevan a proponer la hipótesis de que las acetogeninas de aguacate pueden actuar como moduladores epigenéticos.

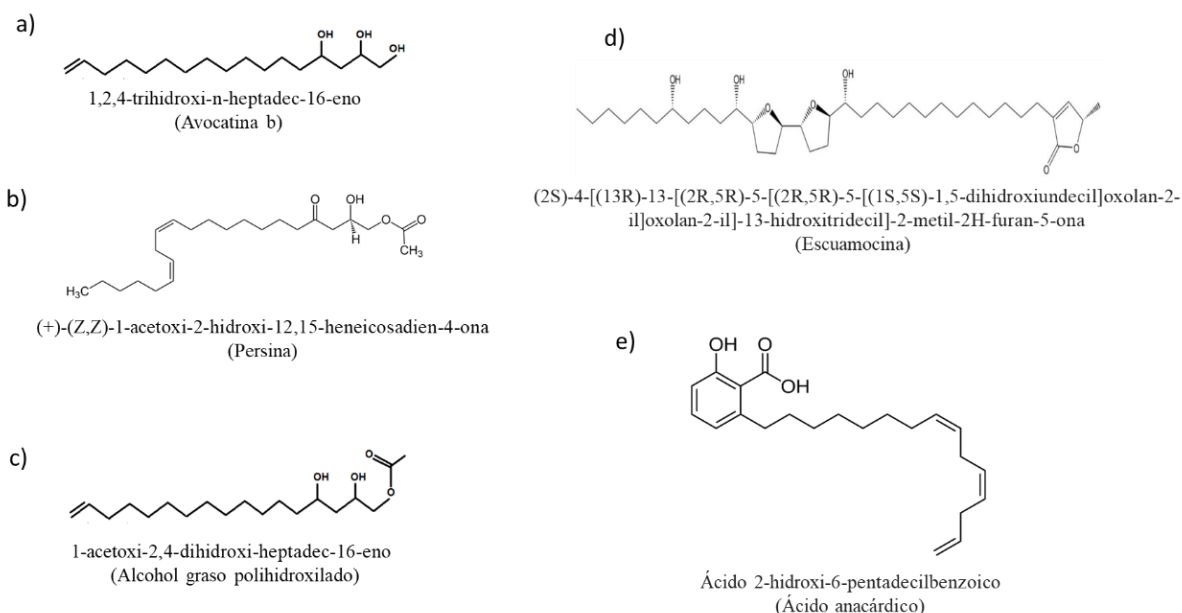


Figura 3. Derivados de ácidos grasos de cadena larga presentes en plantas.

Las acetogeninas se encuentran presentes en angiospermas primitivas principalmente en anonáceas y lauráceas, como el aguacate. Proviene de la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga (ácido linoléico) y entre otros efectos presentan actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas. La avocatina b (a) y el alcohol graso polihidroxiado (c) se encuentran presentes mayoritariamente en la semilla del aguacate, mientras que la persina (b) se encuentra en mayor proporción en la pulpa del aguacate. La escuamocina (d) es una acetogenina proveniente de las anonáceas y se caracteriza por su potente actividad citotóxica e inducción de cambios epigenéticos. El ácido anacárdico (e) es un derivado de ácidos grasos que proviene de la nuez de la india, es un inhibidor de las histonas acetiltransferasas HATs.

II. ANTECEDENTES

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se obtuvo un extracto lipídico de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) rico en derivados lipídicos de cadena larga (DLCL), del cual se evaluaron algunas de sus propiedades inmunomoduladoras en un modelo de interacción patógeno-hospedero, utilizando para ello células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *S. aureus*. A través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se logró establecer la composición de este extracto. Dentro de las moléculas presentes en el extracto se identificaron ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados; aunque las moléculas más abundantes fueron las acetogeninas de 17 carbonos, siendo la kupandina la presente en mayor proporción (15.4 µg/g de extracto). Los resultados mostraron que los DLCL (1-100 ng/mL) favorecen una disminución en la internalización de *S. aureus* en las CEMB (~80%), lo cual se relacionó con la inducción de la expresión de los genes de IL-10 (citocina antiinflamatoria) y la de los péptidos antimicrobianos TAP y BNBD5, además de disminuir la expresión de TNF- α (citocina proinflamatoria). Esto llevó a proponer que el extracto lipídico de semilla de aguacate nativo mexicano ejerce propiedades antiinflamatorias en un proceso infeccioso (Báez-Magaña, 2014). Por lo anterior, este trabajo se enfocó en identificar las vías de señalización involucradas en la modulación de la respuesta inmune innata de las CEMB reguladas por los DLCL y su relación con la inhibición de la internalización de *S. aureus*. Asimismo, se evaluó si la actividad de la molécula mayoritaria del extracto es la responsable de tales efectos.

III. HIPÓTESIS

Los derivados lipídicos de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) actúan como inmunomoduladores regulando las rutas de señalización y la respuesta epigenética en las células de epitelio mamario bovino, inhibiendo la internalización de *Staphylococcus aureus*.

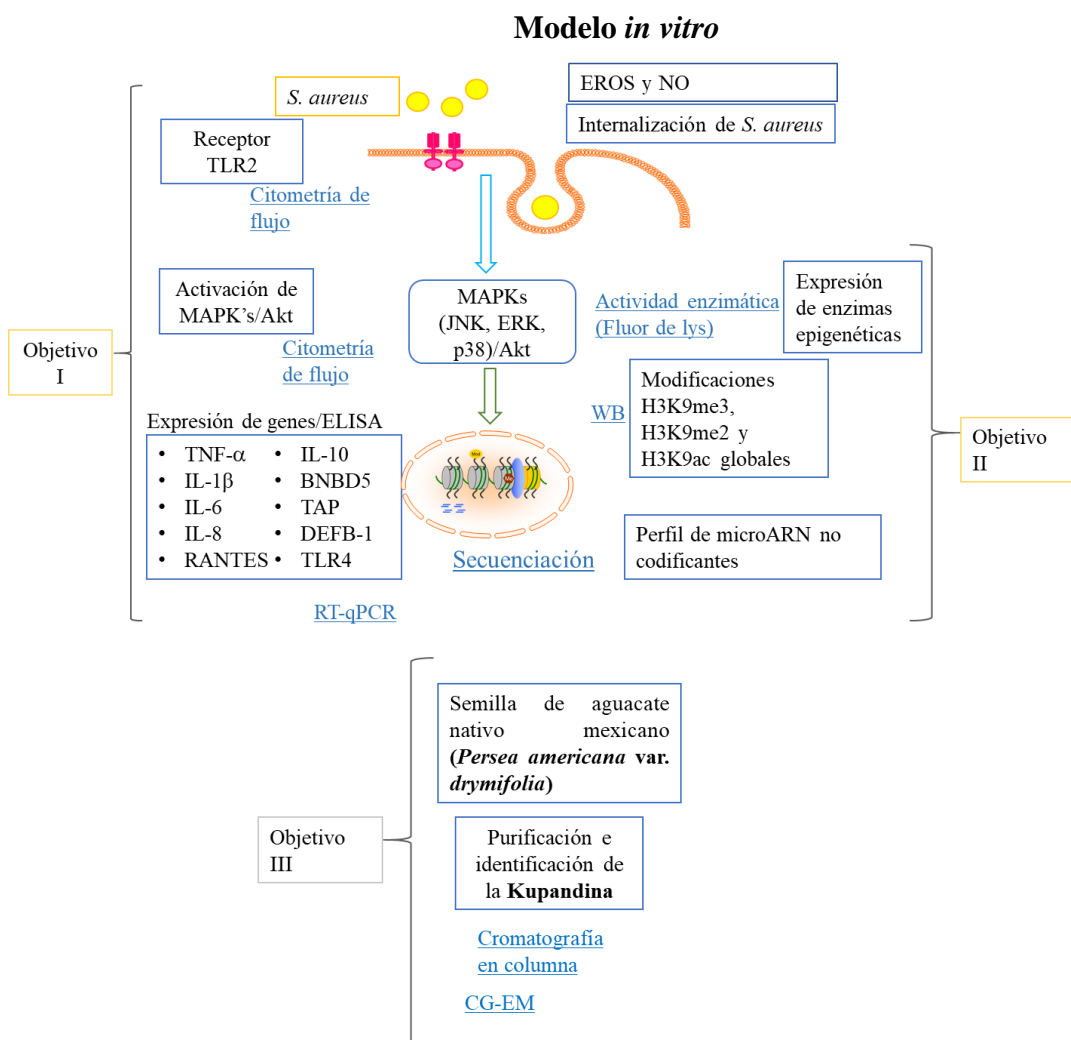
IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los derivados lipídicos de cadena larga de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre las modificaciones epigenéticas globales y las rutas de señalización relacionadas con la respuesta inmune innata y la internalización de *Staphylococcus aureus* en las células de epitelio mamario bovino.

IV.1. Objetivos específicos

- I. Determinar los efectos inmunomoduladores de los derivados lipídicos de cadena larga (DLCL) de la semilla de aguacate en las CEMB infectadas con *S. aureus*.
- II. Evaluar las modificaciones epigenéticas globales (histonas y perfil de microRNAs) en las CEMB tratadas con los derivados lipídicos de cadena larga DLCL de la semilla de aguacate y su relación con la internalización de *S. aureus*.
- III. Purificar e identificar químicamente el compuesto mayoritario del extracto rico en derivados lipídicos (DLCL) de la semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).
- IV. Determinar los efectos inmunomoduladores y epigenéticos de la kupandina en las CEMB y su efecto sobre la internalización de *S. aureus*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Objetivo IV: Comparar los efectos de DLCL y kupandina

DLCL de semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) (100 ng/ml); Kupandina (66 nM); Vehículo DMSO 0.1%

Figura 4. Representación esquemática de la estrategia metodológica.

VI. RESULTADOS

Los resultados generados durante la realización del presente trabajo se presentan en seis capítulos.

Capítulo 1. Corresponde al artículo de investigación titulado:

“Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells”. Publicado en la revista JCR Journal of Immunology Research (Factor de impacto 2018, 3.404).

Capítulo 2. Corresponde al manuscrito titulado:

“Análisis de las rutas de señalización involucradas en la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas reguladas por los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate”.

Capítulo 3. Corresponde al manuscrito titulado:

“Lipid-rich extract from Mexican avocado seed induces epigenetics changes in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization”.

Capítulo 4. Purificación e identificación de la Kupandina de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Capítulo 5. Corresponde al manuscrito titulado:

“The Kupandin from avocado seed regulates the innate immune response in bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization”.

Capítulo 6. Corresponde al artículo de divulgación titulado:

“Recordando al enemigo para eliminarlo: Inmunidad innata entrenada”. Publicado en la revista de divulgación Milenaria, ciencia y arte. ISSN: 2395-9436.

Research Article

Lipid-Rich Extract from Mexican Avocado Seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) Reduces *Staphylococcus aureus* Internalization and Regulates Innate Immune Response in Bovine Mammary Epithelial Cells

Marisol Báez-Magaña,¹ Alejandra Ochoa-Zarzosa ,¹ Nayeli Alva-Murillo ,²
Rafael Salgado-Garciglia ,³ and Joel Edmundo López-Meza ¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P., 58893 Morelia, Michoacán, Mexico

²Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico

³Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, Mexico

Correspondence should be addressed to Joel Edmundo López-Meza; elmeza@umich.mx

Received 20 May 2019; Accepted 23 August 2019; Published 12 September 2019

Guest Editor: Yanyan Qu

Copyright © 2019 Marisol Báez-Magaña et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bovine mammary epithelial cells (bMECs) are capable of initiating an innate immune response (IIR) to invading bacteria. *Staphylococcus aureus* is not classically an intracellular pathogen, although it has been shown to be internalized into bMECs. *S. aureus* internalizes into nonprofessional phagocytes, which allows the evasion of the IIR and turns antimicrobial therapy unsuccessful. An alternative treatment to control this pathogen is the modulation of the innate immune response of the host. The Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is a source of molecules with anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Hence, we analyze the effect of a lipid-rich extract from avocado seed (LEAS) on *S. aureus* internalization into bMECs and their innate immunity response. The effects of LEAS (1-500 ng/ml) on the *S. aureus* growth and bMEC viability were assessed by turbidimetry and MTT assays, respectively. LEAS did not show neither antimicrobial nor cytotoxic effects. *S. aureus* internalization into bMECs was analyzed by gentamicin protection assays. Interestingly, LEAS (1-200 ng/ml) decreased bacterial internalization (60-80%) into bMECs. This effect correlated with NO production and the induction of the gene expression of IL-10, while the expression of the proinflammatory cytokine TNF- α was reduced. These effects could be related to the inhibition of MAPK p38 (~60%) activation by LEAS. In conclusion, our results showed that LEAS inhibits the *S. aureus* internalization into bMECs and modulates the IIR, which indicates that avocado is a source of metabolites for control of mastitis pathogens.

1. Introduction

The innate immune response (IIR) is the first line of defense of organisms, which has a relevant role in the protection against pathogens. The participation of professional phagocytic cells (c.a. macrophages, dendritic cells, and circulating leukocytes) in the IIR is fundamental; however, nonprofessional phagocytic cells (c.a. epithelium, endothelium, osteo-

blast, and fibroblast cells) also have a relevant role [1]. In this sense, bovine mammary epithelial cells (bMECs) play an important role in the IIR of the mammary gland acting as a physical barrier and as initial sensors of danger with the capacity to mount a defense response [2]. The IIR regulation by immunomodulatory molecules such as fatty acids and vitamins has been widely demonstrated and involves epigenetics changes that can be stably maintained or adapted to

changing environments [3, 4]. For the above, the search for modulators that improve the bMEC IIR increases the opportunity to identify novel therapeutics.

S. aureus is the main pathogen responsible for subclinical bovine mastitis, a chronic and recurrent disease that affect dairy cattle worldwide [5, 6]. This bacterium has the ability to be internalized into the cells, which allows it to evade the IIR of the host; this characteristic has been associated with the recurrence of mastitis [7, 8]. In previous reports, we showed that immunomodulatory molecules (short and medium chain fatty acids, and cholecalciferol) inhibit *S. aureus* internalization into bMECs regulating the IIR, suggesting an immunomodulatory role in host-pathogen interaction [3, 8, 9].

For a long time, plants have been a rich source of antibacterial, antiviral, and immunomodulatory metabolites. In this sense, avocado (*Persea americana*) is a very nutritious fruit (rich in saturated and unsaturated fatty acids) that possesses different compounds with antioxidant, anticancer, antimicrobial, and anti-inflammatory properties [10]. Diverse reports have shown that avocado metabolites have immunomodulatory properties. For example, an avocado/soybean unsaponifiable (ASU) mixture decreased the expression of TNF- α , IL-1 β , COX-2, and iNOS in bovine chondrocytes and human monocyte/macrophages [11, 12]. Likewise, seven-carbon sugars typical of avocado (mannoheptulose and perseitol) inhibited *Malassezia furfur* internalization into human keratinocytes and induced expression of the antimicrobial peptide HBD-2 [13]. Also, avocado aliphatic acetogenins (lipid derivative molecules present in mesocarp and endocarp) favored the apoptosis induction and cell cycle arrest in different human cancer cell lines [14, 15]. Furthermore, the anti-inflammatory and photoprotective effects of polyhydroxylated fatty alcohols (synonymous of acetogenins) extracted from *Persea gratissima* on human keratinocytes damaged by UV have been demonstrated [16]. However, it is unknown if lipid derivative molecules from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) display immunomodulatory properties in host-pathogen interaction. Thus, in this work, we analyzed the effects of a lipid-rich extract from Mexican avocado seed (LEAS) on *S. aureus* internalization into bMECs. In addition, the effects of LEAS on the IIR of bMECs were analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Lipid-Rich Extract from Avocado Seed (LEAS). Mexican avocado fruits (*Persea americana* var. *drymifolia*) used in this study were collected when physiological maturity was achieved. The LEAS was obtained according to Rosenblat et al. [16]. Briefly, avocado seeds were separated from the fruit and frozen in liquid nitrogen, followed by trituration. The powder obtained was extracted with hexane (C₆H₁₄, J.T. Baker) for 14 h in a Soxhlet apparatus. This lipid-rich fraction was filtered and then cooled to -18°C overnight for a cold crystallization. Precipitated crystals were recovered discarding the supernatant and then drying with nitrogen gas. This extract contains abundant molecules of 16-24 carbon aliphatic chains with hydroxyl groups such as aliphatic

acetogenins and long-chain fatty acids as determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Table 1). For biological assays, crystals were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO 5%). In all of the experiments, the final concentration of DMSO was 0.1%.

2.2. Staphylococcus aureus Strain. The *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC27543) strain was used in this study. The strain was isolated from a case of bovine mastitis that has the capability to internalize into bMECs [3]. Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani (LB) broth (Bioxon, México). For the different assays, the colony-forming units (CFU) were adjusted by measuring their optical density at 590 nm (OD 0.2 = 9.2×10^7 CFU/ml).

2.3. Primary Culture Bovine Mammary Epithelial Cells (bMECs). bMECs were isolated of alveolar tissue from the udder of a healthy lactating cow as described [17]. Cells from passages 2-8 were used in all of the experiments. The bMECs were cultured in growth medium (GM) that was composed of DMEM medium/nutrient mixture F12 Ham (DMEM/F12, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest), 10 μ g/ml insulin (Sigma), 5 mg/ml hydrocortisone (Sigma), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 1 μ g/ml amphotericin B (Sigma). The cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

2.4. Effect of Lipid-Rich Extract from Avocado Seed on S. aureus 27543 Growth and bMEC Viability. The effect of LEAS on *S. aureus* growth was determined by turbidimetry assay. For this, 9.2×10^7 CFU/ml was cultured at 37°C in LB broth supplemented with different concentrations of LEAS (1-500 ng/ml) and growth was monitored turbidimetrically (590 nm) at 2, 6, 12, and 24 h.

To analyze the effect of LEAS on bMEC viability, 1×10^4 cells were incubated with the extract (1-500 ng/ml) during 24-48 h at 37°C in 96-well flat-bottom plates in GM without supplements. Further, cells were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and resuspended in a 1:1 dilution with 0.4% Trypan blue solution (Sigma) and incubated for 3 minutes. Finally, nonviable and viable cells were counted in a hemocytometer.

2.5. Effect of Lipid-Rich Extract from Avocado Seed on S. aureus 27543 Adhesion and Internalization into bMECs. Gentamicin protection assay was carried out using bMECs monolayers ($\sim 2 \times 10^5$ cells) cultured in 24-well dishes treated with 6-10 μ g/cm² rat tail type I collagen (Sigma) as described [3]. bMECs were incubated with different concentrations of LEAS (1-200 ng/ml) in DMEM/F12 media (Sigma) without supplements for 24 h followed by *S. aureus* infection (MOI 30:1 bacteria per cell). For this, the bMECs were inoculated with bacterial suspensions (9.2×10^7 CFU/ml) and incubated for 2 h in 5% CO₂ at 37°C. Afterward, bMECs were washed three times with PBS (pH 7.4) and incubated with DMEM medium supplemented with 80 μ g/ml gentamicin for 1 h at 37°C to eliminate extracellular bacteria. Finally, bMEC monolayers were detached with trypsin EDTA (Sigma) and lysed with 250 μ l of sterile distilled water. bMEC lysates were diluted 100-fold and plated on LB agar, and Petri dishes were

TABLE 1: Composition of lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Group	Compound	Content ($\mu\text{g/g}$)
Fatty acid derivatives (aliphatic acetogenins)	Avocatins	32.28
	Persins	10.12
	Pahuatins	4.26
	Polyhydroxy fatty acids	24.26
Long-chain fatty acids	Myristic acid	2.49
	Palmitic acid	7.1
	Linoleic acid	4.06
	Oleic acid	5.32
	Stearic acid	5.06
	Arachidic acid	2.39
	Erucic acid	2.44
	Behenic acid	3.63
	Nervonic acid	2.88
	Tetracosanoic acid	4.29

incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to control (bMECs treated with vehicle).

To determine the adhesion of *S. aureus* on bMECs, cells were cultured and treated as described above but the gentamicin treatment was omitted. Data are presented as the percentage of adhesion in relation to control (bMECs treated with vehicle).

2.6. *Staphylococcus aureus* Viability in bMEC-Conditioned Media. To evaluate *S. aureus* survival in conditioned media, bMECs were cultured ($\sim 2 \times 10^5$ cells) in 24-well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat tail type I collagen (Sigma). Then, bMECs were treated with LEAS (100 ng/ml) for 24 h and the culture medium was recovered. Next, conditioned media were inoculated with *S. aureus* suspension (9.2×10^7 CFU/ml) and incubated for 2 h at 37°C and 180 rpm. Finally, a dilution of this suspension (1:1000) was plated on LB agar and incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique.

2.7. Effects of Lipid-Rich Extract from Avocado Seed on MAP Kinase Activation in bMECs. The evaluation of the MAP kinase activation (p38, JNK, or ERK1/2) was carried out as reported [18]. Briefly, bMEC monolayers were cultivated on 96-well flat-bottom plates that were coated (Corning-Costar) with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat tail type I collagen (Sigma). MAP kinase activation levels were assessed by flow cytometry in bMECs pretreated with LEAS (100 ng/ml, 24 h). pp38 (T180/Y182), pJNK1/2 (T183/185), and pERK1/2 (T202/Y204) were quantitatively determined using a Flex Set Cytometric Bead Array (Becton Dickinson) according to the manufacturer's protocol using a BD Accuri™ C6 flow cytometer. Data were analyzed with FCAP software (Becton Dickinson). A total of 3000 events were acquired following the supplied protocol. The minimum detection levels for each phosphoprotein were

0.38 U/ml for pJNK and 0.64 U/ml for pp38 and pERK. The corroboration of MAPK activation was performed using different inhibitors (data not shown).

2.8. RNA Isolation and Innate Immune Response Gene Expression Analysis. To analyze the effects of LEAS and/or *S. aureus* on the expression of IIR genes of bMECs, monolayers of cells cultured in 6-well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat tail type I collagen (Sigma) were incubated with LEAS 100 ng/ml (24 h) and/or *S. aureus* for 2 h (MOI 30:1). bMEC total RNA (5 μg) was extracted with the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was removed from RNA samples with DNase I treatment (Invitrogen). Then, cDNA was synthesized as described [19]. The relative quantification of gene expression (qPCR) was performed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out with VeriQuest SYBR Green qPCR Master Mix (Affymetrix). Specific primer pairs were acquired from Invitrogen and Elim Biopharm (Table 2), and their specificity was determined by endpoint PCR. The GAPDH gene was used as an internal control.

For the measurement of the TNF- α and IL-1 β concentrations in the conditioned medium, bMECs were treated with LEAS (100 ng/ml) and/or *S. aureus*. The concentrations of TNF- α were measured using the DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions, and the concentrations of IL-1 β were assessed using the bovine IL-1 β screening kit (Thermo Scientific).

2.9. Determination of Nitric Oxide (NO) and Reactive Oxygen Species (ROS). Nitric oxide was estimated by Griess reaction. For this, bMECs were cultured ($\sim 2 \times 10^5$ cells) in 24-well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat tail type I collagen (Sigma). Then, bMECs were treated with LEAS (100 ng/ml) for 24 h. After treatment, the cells were infected with *S. aureus* (2 h) and

TABLE 2: Bovine oligonucleotides used in this study.

Specificity	Primer	Sequence (5' -3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)	References
IL-1 β	Forward	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG	198	52	[19]
	Reverse	CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA			
IL-6	Forward	AACCACTCCAGCCACAAACT	179	57	[19]
	Reverse	GAATGCCAGGAACCTACCACAA			
TNF- α	Forward	CCCCTGGAGATAACCTCCCA	101	56	[19]
	Reverse	CAGACGGGAGACAGGAGAGC			
IL-10	Forward	GATGCGAGCACCTGTCTGA	129	59	[19]
	Reverse	GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT			
BNBD5	Forward	GCCAGCTGAGGCTCCATC	143	55	[9]
	Reverse	TTGCCAGGGCAGGATCG			
DEFB1	Forward	CCATCACCTGCTCCTCACA	185	54	[9]
	Reverse	ACCTCCACCTGCAGCATT			
TAP	Forward	GCGCTCCTCTCCTGGTCCTG	216	57	[9]
	Reverse	GCACGTTCTGACTGGGCATTGA			
GAPDH	Forward	TCAACGGAAGCTCACTGG	237	56.9	[9]
	Reverse	CCCCAGCATCGAAGGTAGA			

the conditioned medium was recovered. The NO secreted by bMECs into culture medium was evaluated by measuring the nitrite concentration (NO²⁻) in cell-free media using the Griess reaction as described [3].

To analyze the production of ROS, the method of Tarpey and Fridovich [20] was used. For this, bMECs (1×10^5 cells) were grown in 24-well plates (Corning Costar) until 80% of confluence. Afterward, the LEAS (100 ng/ml) was added for 24 h; then, bMECs were infected with *S. aureus* (2 h). Subsequently, bMECs were detached with trypsin, recovered, and washed with PBS by centrifugation and the supernatant was removed. bMECs were incubated for 30 minutes with dihydrorhodamine-123 (DHR) 5 mM (Molecular Probes). ROS were determined by flow cytometry (BD Accuri™ C6 flow cytometer). In both evaluations, LPS was used as a positive control.

2.10. Data Analysis. The data were obtained from three independent experiments; each one was performed in triplicate and compared with one-way analysis of mean comparisons using Student's *t*-test, except for ELISA; in this case, a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) using the Tukey-Kramer test was used. The results are reported as the means \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $P \leq 0.05$, except for RT-qPCR analysis where fold change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs [18]. The data were normalized to vehicle (DMSO 0.1%).

3. Results

3.1. The Lipid-Rich Extract from Avocado Seed Does Not Affect *S. aureus* Growth and bMEC Viability. To evaluate the effect of LEAS on *S. aureus* growth, bacteria were cultivated in LB broth supplemented with different concentra-

tions (1-500 ng/ml). The turbidimetric results showed that the *S. aureus* growth was not affected by LEAS at the times evaluated (Figure 1(a)). In the same way, the effect of LEAS on the viability of bMECs was evaluated at 24 and 48 h using the Trypan blue exclusion assay. Data showed that LEAS did not affect bMEC viability at any concentration tested (Figure 1(b)).

3.2. The Lipid-Rich Extract from Avocado Seed Inhibits the *S. aureus* Internalization into bMECs. The effect of LEAS on *S. aureus* internalization into bMECs was evaluated by gentamicin protection assay. bMECs were treated with LEAS (1-200 ng/ml) 24 h before bacterial challenge. According to the CFUs recovered, the LEAS (1-200 ng/ml) significantly decreased *S. aureus* internalization into bMECs (60-80%) in all of the concentrations tested in relation to vehicle (Figure 2(a)). The more pronounced inhibitory effect was observed at 100 ng/ml (80%). Interestingly, this concentration also decreased the *S. aureus* adhesion to bMECs (~30%) (Figure 2(b)). According to these results, we used this concentration in the rest of the experiments.

3.3. The Lipid-Rich Extract from Avocado Seed Improves the Defense of bMECs. In order to evaluate if the inhibitory effect of LEAS on *S. aureus* internalization into bMECs was related to the secretion of antimicrobial products by bMECs, we evaluated bacterial viability in the presence of conditioned media (culture media of bMECs treated 24 h with LEAS). Interestingly, bacterial viability diminished by ~30% in the presence of conditioned media, which suggests that LEAS induced the production and secretion of antimicrobial molecules in bMECs (Figure 3(a)).

Then, we evaluate if reactive oxygen and nitrogen species could contribute to the antimicrobial effect showed by the conditioned media. The results showed that bMECs treated

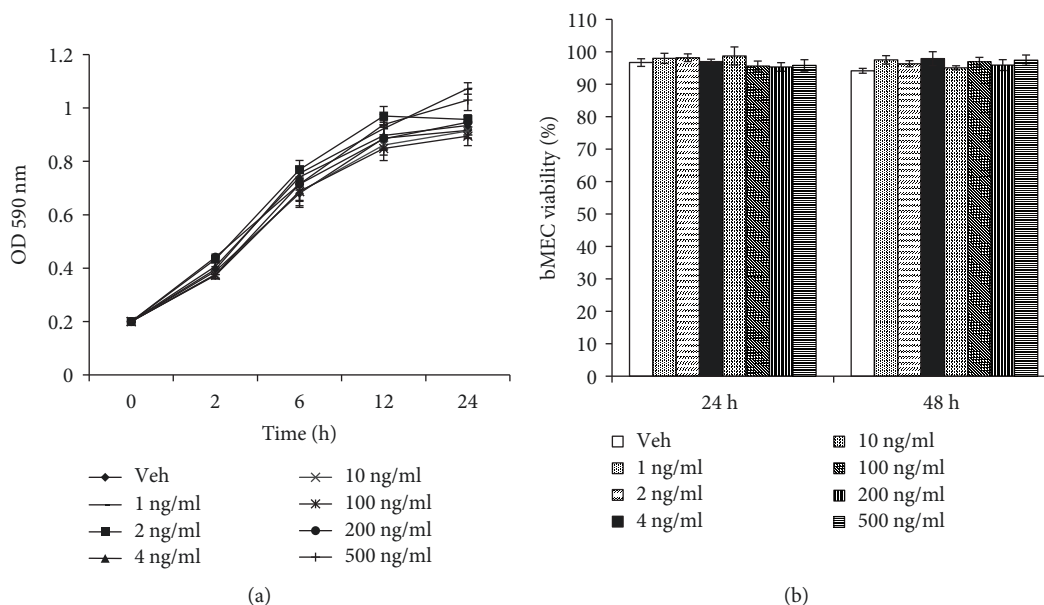


FIGURE 1: The lipid-rich avocado seed extract did not affect *S. aureus* growth and bMECs viability. (a) *S. aureus* was grown in LB at 37°C (18 h). The OD₅₉₀ was adjusted at 0.2 (9.2×10^7 CFU) and the treatments were added. The growth was monitored measuring the OD at the indicated time. (b) bMECs were grown in 96-well dishes (80% confluence) and the treatments were added. The viability was determined by Trypan blue exclusion assay at 24 and 48 h. The results correspond to three independent experiments performed by triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%) ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test).

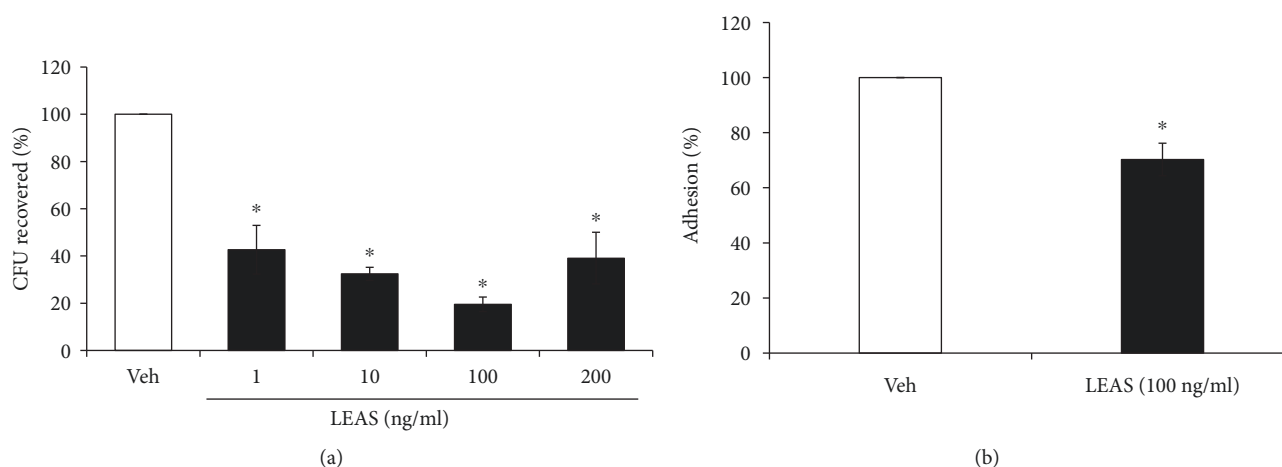


FIGURE 2: The lipid-rich avocado seed extract inhibits *S. aureus* internalization into bMECs and the adhesion. (a) The effect of LEAS on the internalization of *S. aureus* into bMECs is presented as the percentage of CFU recovered after the lysis of bMECs. The values were determined considering the vehicle (DMSO 0.1%) as 100% of internalization. The results are the average of three independent experiments performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). * indicates significant changes ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test). (b) To determine the adhesion of *S. aureus* on bMECs, cells were cultured and treated as described in Materials and Methods but the gentamicin treatment was omitted. Data are presented as the percentage of adhesion in relation to control (bMECs treated with vehicle). * indicates significant changes ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test).

with LEAS (100 ng/ml) for 24 h increased the NO levels; this effect was maintained even in bMECs challenged with *S. aureus* (Figure 3(b)). However, the ROS production was not affected by LEAS treatment (Figure 3(c)). These results suggest that NO production could be involved in the antimicrobial effect detected in the conditioned media.

3.4. *The Lipid-Rich Extract from Avocado Seed Inhibits p38 but Not JNK1/2 or ERK1/2 in bMECs.* MAPK activation has been involved in *S. aureus* internalization into bMECs [18]. Thus, we evaluated whether LEAS regulates MAPK activation (p38, JNK, or ERK1/2) in bMECs. Interestingly, in LEAS-pretreated bMECs the basal activation of JNK and

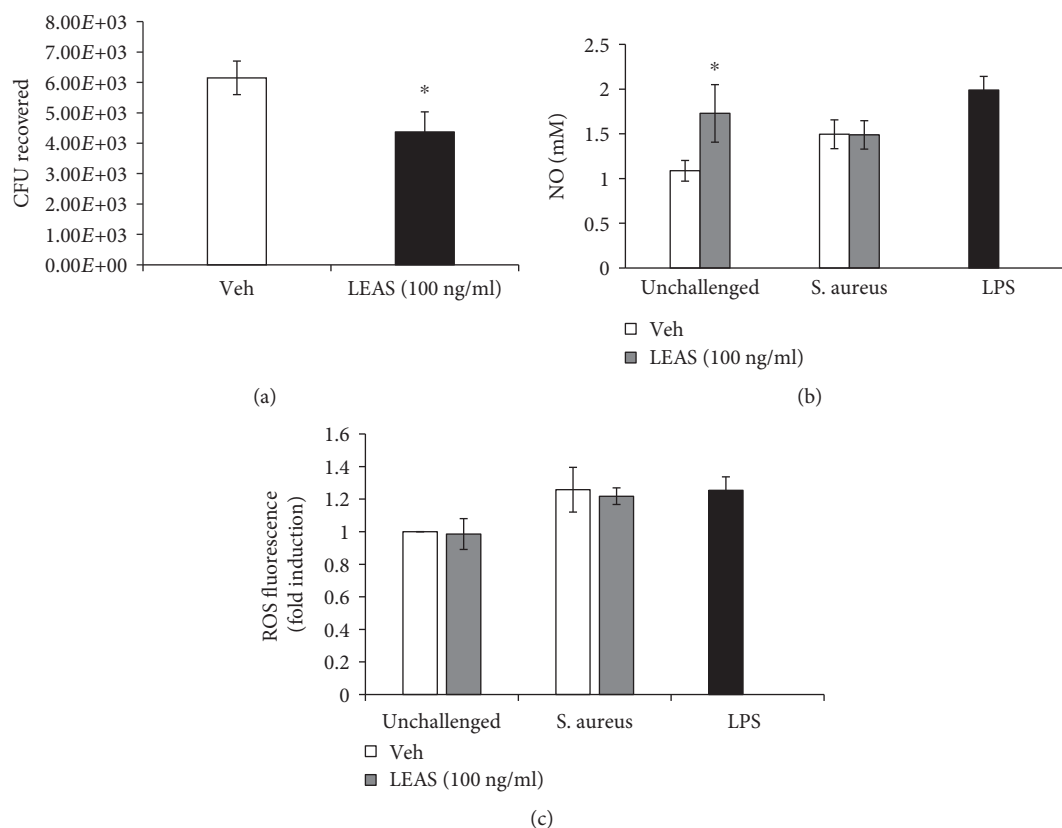


FIGURE 3: The conditioned media of LEAS-pretreated bMECs showed antimicrobial activity against *S. aureus*. (a) Effect of conditioned medium from bMECs treated with vehicle (DMSO 0.1%) or LEAS (100 ng/ml) for 24 h on *S. aureus* viability. Bacteria were incubated 2 h with conditioned media. The number of CFU recovered is shown. The results are the average of three independent experiments performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). * indicates significant changes ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test). (b) Nitric oxide and (c) ROS production in bMECs treated with 100 ng/ml of LEAS for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. NO production was measured as NO^{2-} concentration in culture medium. ROS production was evaluated by flow cytometry. In (b, c), cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 h) were used as a positive control. Each bar shows the mean of triplicate \pm SE of three independent experiments. * indicates significant changes ($P \leq 0.05$, Student's *t*-test) within the treatment. Vehicle (DMSO 0.1%).

ERK1/2 was not modified; however, phosphorylated p38 was diminished by $\sim 60\%$ (Figure 4).

3.5. The Lipid-Rich Extract from Avocado Seed Regulates the Expression of Innate Immune Elements in bMECs. bMECs are key elements of IIR and play a significant role in the defense against pathogens. Consequently, we analyzed the mRNA levels of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and the anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as the antimicrobial peptides TAP, DEF1, and BNBD5 in LEAS-pretreated bMECs before and after infection. LEAS favors an anti-inflammatory response in bMECs due to the decrease in the mRNA levels of the proinflammatory cytokine TNF- α (~ 0.5 -fold) and the increase of IL-10 mRNA levels significantly (~ 11 -fold). Notably, the effect on IL-10 was more pronounced in bMECs challenged with *S. aureus* (~ 22 -fold) (Table 3). Furthermore, LEAS kept the reduction of the TNF- α secretion in the infected bMECs. Only the secretion of IL-1 β was increased (~ 1.5 -fold) when the LEAS-treated cells were infected with *S. aureus* (Table 4). Also, the mRNA levels for IL-1 β and IL-6 were not modified for any of the conditions evaluated. In addition, we evaluated

the mRNA levels of the antimicrobial peptides BNBD5, DEF1, and TAP. The treatment of bMECs with LEAS did not affect the mRNA expression of the antimicrobial peptides tested; however, the challenge with the bacteria increased the BNBD5 expression (~ 4 -fold).

4. Discussion

IIR modulation is an alternative for therapeutic or prophylactic treatment to control and prevent diseases. Previously, we showed that short- and medium-chain fatty acids reduced *S. aureus* internalization into bMECs and improved IIR [3, 8]. In this sense, avocado (a fruit rich in fatty acids) is attractive in the search of plant compounds with immunomodulatory properties. This work demonstrates that a lipid-rich extract from Mexican avocado seed reduced *S. aureus* internalization into bMECs and regulated the IIR.

Long-chain fatty acids have antimicrobial activity against *S. aureus* [21]. Oleic acid and lauric acid ($>70 \mu\text{g}/\text{ml}$) have showed antimicrobial effects against methicillin-resistant *S. aureus* [22]. Also, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid (128-256 mg/ml) have antimicrobial effects against

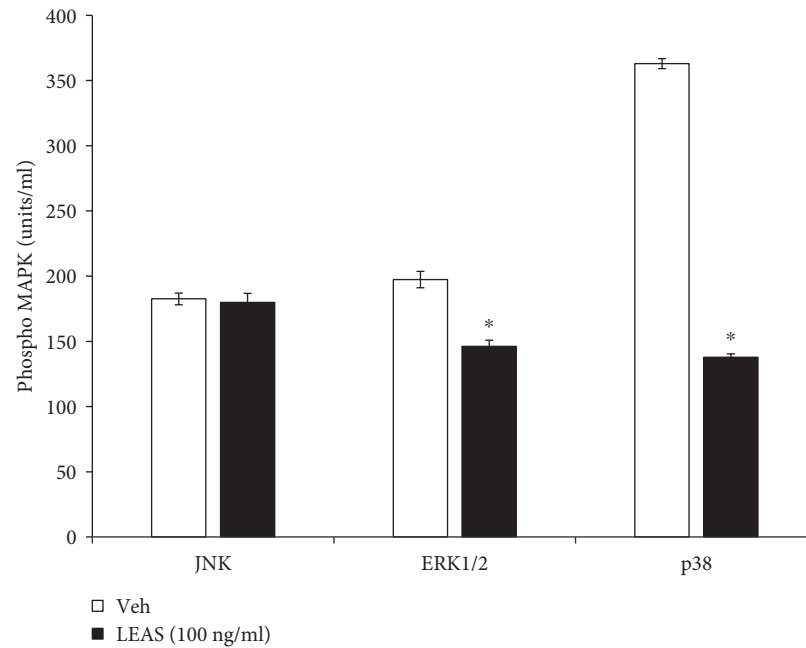


FIGURE 4: p38, JNK, and ERK1/2 activation regulated by LEAS in bMECs. MAPK phosphorylation was measured in bMECs that were treated with LEAS (100 ng/ml) by flow cytometry. Each bar shows the result of one experiment and a total of 3000 events were acquired. * indicates significant changes ($P \leq 0.05$, Student's t -test) within the treatment. Vehicle (DMSO 0.1%).

TABLE 3: Effect of lipid-rich extract from avocado seed on expression of innate immune elements of bMECs.

Activity	Gene	Vehicle	LEAS (100 ng/ml)	Vehicle+S. aureus	LEAS (100 ng/ml)+S. aureus
Pro-inflammatory	TNF- α	1 \pm 0	0.48 \pm 0.07*	1.03 \pm 0.25	0.40 \pm 0.09*
	IL-1 β	1 \pm 0	1.03 \pm 0.15	0.86 \pm 0.29	1.43 \pm 0.55
	IL-6	1 \pm 0	0.74 \pm 0.33	0.78 \pm 0.18	0.59 \pm 0.13
Anti-inflammatory	IL-10	1 \pm 0	11.39 \pm 3.57*	2.73 \pm 1.46*	21.39 \pm 5.9*
Antimicrobial peptide	BNBD5	1 \pm 0	0.94 \pm 0.16	0.98 \pm 0.22	4.02 \pm 0.32*
	DEFB1	1 \pm 0	0.98 \pm 0.29	0.51 \pm 0.23*	0.35 \pm 0.14*
	TAP	1 \pm 0	1.38 \pm 0.29	0.44 \pm 0.17*	1.60 \pm 0.34

Relative expression of genes was determined by RT-qPCR using GAPDH as endogenous control. The results correspond to three independent experiments and show the mean of triplicate \pm SE. *Fold change values greater than 2 or less than 0.5 were considered significant differentially expressed mRNAs with respect to vehicle.

TABLE 4: Effect of lipid-rich extract from avocado seed on secretion of cytokines in bMECs.

Cytokine (pg/ml)	Vehicle	LEAS (100 ng/ml)	Vehicle+S. aureus	LEAS (100 ng/ml)+S. aureus
TNF- α	2459.83 \pm 85.16 ^a	2736.5 \pm 72.85 ^a	1614.83 \pm 28.33 ^b	1576.5 \pm 123.92 ^b
IL-1 β	ND	ND	257.9 \pm 24.76 ^b	431.56 \pm 38.02 ^a

Proteins were determined by ELISA (pg/ml). The results correspond to three independent experiments and show the mean of triplicate \pm SE. Different letters indicate significant differences within the row. ND: not detected.

S. aureus isolates from diverse origins, including isolates methicillin and vancomycin resistant [23]. Likewise, docosahexaenoic acid (30 μ M) induces apoptosis in breast cancer cell lines MCF-7 and SK-BR-3 [24]. Avocado seed extract is rich in fatty acids (mainly palmitic, oleic, and linoleic), and derivatives such as acetogenins, avocatin, persins, pahuatins,

or fatty acid alcohols have antimicrobial and cytotoxic activities [14, 25]. Noteworthy, LEAS (1-500 ng/ml) did not affect the *S. aureus* growth and bMEC viability (Figure 1). It is important to notice that the concentrations used in this work are lower than those reported with antibacterial and cytotoxicity properties. However, preliminary results of our group

indicate that LEAS are cytotoxic to cancer cells (Caco-2) at concentrations above of 10 $\mu\text{g/ml}$ (data unpublished).

Bacterial adhesion and internalization are important for the establishment of chronic bovine mastitis and thus are an attractive target in the implementation of strategies for its control. In a previous work, we demonstrated that pretreated bMECs with short- and medium-chain fatty acids showed a reduced *S. aureus* internalization. Sodium propionate (1-5 mM) decreased bacterial invasion by ~65%, whereas sodium butyrate (0.25 mM) inhibited it by ~50% [3]. Likewise, sodium hexanoate (0.25-5 mM) reduced *S. aureus* internalization by ~60% [26]. Similarly, LEAS inhibited *S. aureus* internalization into bMECs but its effect was more pronounced than those reported for short- and medium-chain fatty acids, reaching inhibition of 80% (Figure 2). Also, the inhibitory LEAS concentrations were lower suggesting a better effect of lipids from avocado seed. Additionally, LEAS diminished the *S. aureus* adhesion to bMECs (~30%), which partially explains the inhibited internalization by LEAS. Interestingly, in LEAS-pretreated bMECs, the levels of NO in conditioned media were increased and bacteria viability was reduced by ~30% when incubated with it (Figure 3(a)). This data suggests a participation of antimicrobial molecules in the reduction of bacterial internalization. This result agrees with a previous report, in which the inhibitory effect of estradiol on *S. aureus* internalization into bMECs was associated to the secretion of elements with antimicrobial activity in the conditioned media [27]. In the same way, de Lima et al. [28] reported that the NO production of macrophages was stimulated by fatty acids in a concentration-dependent manner; low concentrations (1-10 μM) stimulated NO production in J774 cells (murine macrophages), whereas high concentrations (50-200 μM) inhibited NO production. This data supports the fact that IIR of bMECs can be improved by immunomodulatory molecules which leads to the secretion of antimicrobial molecules that could contribute to the reduction in bacterial internalization.

On the other hand, for *S. aureus* internalization into bMECs, the MAPK pathway has a relevant role. When MAPK activity was blocked with pharmacological inhibitors of p38 (2.5–10 μM SB203580), JNK (5–20 μM , SP600125), or ERK1/2 (0.62–10 μM , U0126), a considerable reduction in *S. aureus* internalization was observed, indicating that these kinases are involved in this process [18]. Interestingly, LEAS inhibited the activation of MAPK p38 ~60% (Figure 4), suggesting that this kinase could have a relevant participation in the observed reduction of internalization. However, other approaches are necessary to determine the precise participation of p38 in this process.

Mastitis is an inflammation of the mammary gland caused principally by bacteria, which leads to the activation of the innate immune system [29]. TNF- α is a rapid-response proinflammatory cytokine expressed in bMECs and plays an important role in mastitis. Bacterial stimulation of bMECs induces the expression of TNF- α but is depending of the strain [30, 31]. bMECs challenged with *S. aureus* induced the expression of TNF- α up to 11-fold (data not shown), which coincides with the reported by our group

[26]. However, bMECs treated with vehicle (DMSO 0.1%) and challenged 2 h with bacteria maintained the basal expression of the TNF- α mRNA (Table 3), which was attributable to the anti-inflammatory effects of DMSO, as reported in Caco-2 cells [32]. Noteworthy, LEAS (100 ng/ml) treatment decreased the expression of this cytokine 0.5-fold in bMECs, which was maintained even when cells were infected. This result is in accordance with a downregulation of TNF- α in pretreated bMECs with cholecalciferol (a lipid molecule) [19]. Also, we detected similar levels of TNF- α secretion in bMECs infected or pretreated with LEAS before the *S. aureus* challenge. However, the IL-1 β secretion was induced in the infected LEAS-treated cells (Table 4) but not the mRNA expression of this gene. This effect can be the consequence of the activation of other mechanisms, such as inflammasome activation, which requires further research [33]. Interestingly, pretreated bMECs with LEAS showed an upregulation in IL-10 expression, which was more pronounced in bMECs challenged with bacteria (~20-fold). These results are attractive due to the fact that this cytokine is not significantly induced by *S. aureus* in the udder [34]. Interestingly, these anti-inflammatory effects of LEAS on bMECs (TNF- α downregulation and IL-10 upregulation) correlated with the decrease in the internalization of *S. aureus* into bMECs.

With regard to antimicrobial peptides, these molecules actively contribute to IIR by direct action against microbial infection and as a component of the inflammatory response [35]. It has been reported that bMECs express diverse antimicrobial peptides: among them are the β -defensins. During IIR of the bovine mammary gland against bacterial infections, it has been reported that the expression of β -defensin and bovine neutrophil defensin 5 (BNBD5) increases significantly [3, 26]. Similarly, BNBD5 is expressed in the bovine mammary gland, especially in bMECs, and its expression levels depend on the bacterial stimulus [36]. However, in pretreated bMECs with LEAS, the expression of BNBD5 was not modified; only when these cells were challenged with *S. aureus* an increase was observed (Table 3). Nevertheless, it is necessary to evaluate other antimicrobial peptides in future experiments in order to determine their contribution in the *S. aureus* internalization reduction induced by LEAS.

According to the results of this work, we propose that LEAS could be applied as a prophylactic treatment to avoid bovine intramammary infections, because they improve bMEC innate immune response.

5. Conclusions

The results of this work shown that lipid-rich extract from avocado (LEAS) is a modulator of innate immune response in bovine mammary epithelial cells during *S. aureus* infection. Also, LEAS (100 ng/ml) inhibits bacterial internalization into bMECs. These data suggest that LEAS could be useful for mastitis control.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

MBM was supported by a scholarship from CONACyT. This work was supported by grants from CONACyT (CB-2013-221363 and INFR-2014-230603) and CIC14.5 to JELM.

References

- [1] N. Alva-Murillo, J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa, "Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 538546, 9 pages, 2014.
- [2] J. Oviedo-Boyso, J. J. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez et al., "Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis," *The Journal of Infection*, vol. 54, no. 4, pp. 399–409, 2007.
- [3] A. Ochoa-Zarzosa, E. Villarreal-Fernández, H. Cano-Camacho, and J. E. López-Meza, "Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes," *Microbial Pathogenesis*, vol. 47, no. 1, pp. 1–7, 2009.
- [4] I. K. Sundar and I. Rahman, "Vitamin D and susceptibility of chronic lung diseases: role of epigenetics," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 2, p. 50, 2011.
- [5] O. K. Dego, J. E. van Dijk, and H. Nederbragt, "Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review," *The Veterinary Quarterly*, vol. 24, no. 4, pp. 181–198, 2002.
- [6] S. L. Aitken, C. M. Corl, and L. M. Sordillo, "Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 16, no. 4, pp. 291–304, 2011.
- [7] M. Fraunholz and B. Sinha, "Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 2, p. 43, 2012.
- [8] N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza, "Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 927643, 8 pages, 2013.
- [9] A. D. Téllez-Pérez, N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza, "Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization," *Veterinary Microbiology*, vol. 160, no. 1–2, pp. 91–98, 2012.
- [10] D. Dabas, R. Shegog, G. Ziegler, and J. Lambert, "Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 19, no. 34, pp. 6133–6140, 2013.
- [11] R. Y. Au, T. K. Al-Talib, A. Y. Au, P. V. Phan, and C. G. Frondoza, "Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E₂ and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15, no. 11, pp. 1249–1255, 2007.
- [12] L. F. Heinecke, M. W. Grzanna, A. Y. Au, C. A. Mochal, A. Rashmir-Raven, and C. G. Frondoza, "Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 18, no. 2, pp. 220–227, 2010.
- [13] G. Donnarumma, E. Buommino, A. Baroni et al., "Effects of AV119, a natural sugar from avocado, on *Malassezia furfur* invasiveness and on the expression of HBD-2 and cytokines in human keratinocytes," *Experimental Dermatology*, vol. 16, no. 11, pp. 912–919, 2007.
- [14] S. M. D'Ambrosio, C. Han, L. Pan, A. Douglas Kinghorn, and H. Ding, "Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 409, no. 3, pp. 465–469, 2011.
- [15] E. A. Lee, L. Angka, S. G. Rota et al., "Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death," *Cancer Research*, vol. 75, no. 12, pp. 2478–2488, 2015.
- [16] G. Rosenblat, S. Meretski, J. Segal et al., "Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells," *Archives of Dermatological Research*, vol. 303, no. 4, pp. 239–246, 2011.
- [17] J. L. Anaya-López, O. E. Contreras-Guzmán, A. Cárabaz-Trejo et al., "Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis," *Research in Veterinary Science*, vol. 81, no. 3, pp. 358–361, 2006.
- [18] N. Alva-Murillo, I. Medina-Estrada, M. Báez-Magaña, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza, "The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization," *Molecular Immunology*, vol. 68, no. 2, pp. 445–455, 2015.
- [19] N. Alva-Murillo, A. D. Téllez-Pérez, I. Medina-Estrada, C. Álvarez-Aguilar, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza, "Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization," *Microbial Pathogenesis*, vol. 77, pp. 24–30, 2014.
- [20] M. M. Tarpey and I. Fridovich, "Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite," *Circulation Research*, vol. 89, no. 3, pp. 224–236, 2001.
- [21] J. G. Kenny, D. Ward, E. Josefsson et al., "The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, article e4344, 2009.
- [22] C. H. Chen, Y. Wang, T. Nakatsuji et al., "An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a therapy concordant with evolutionary medicine," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, no. 4, pp. 391–399, 2011.
- [23] A. P. Desbois and K. C. Lawlor, "Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*," *Marine Drugs*, vol. 11, no. 11, pp. 4544–4557, 2013.
- [24] H. Sun, Y. Hu, Z. Gu, R. T. Owens, Y. Q. Chen, and I. J. Edwards, "Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through

- syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 10, pp. 1518–1524, 2011.
- [25] C. E. Rodriguez-Lopez, C. Hernandez-Brenes, and R. I. Diaz de la Garza, “A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.),” *RSC Advances*, vol. 5, no. 128, pp. 106019–106029, 2015.
- [26] N. Alva-Murillo, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza, “Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression,” *Veterinary Microbiology*, vol. 155, no. 2-4, pp. 324–331, 2012.
- [27] I. Medina-Estrada, J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa, “Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 6120509, 16 pages, 2016.
- [28] T. M. de Lima, L. de Sa Lima, C. Scavone, and R. Curi, “Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages,” *FEBS Letters*, vol. 580, no. 13, pp. 3287–3295, 2006.
- [29] Y. H. Schukken, J. Günther, J. Fitzpatrick et al., “Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 144, no. 3-4, pp. 270–289, 2011.
- [30] Y. Strandberg, C. Gray, T. Vuocolo, L. Donaldson, M. Broadway, and R. Tellam, “Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells,” *Cytokine*, vol. 31, no. 1, pp. 72–86, 2005.
- [31] C. Zbinden, R. Stephan, S. Johler et al., “The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, article e87374, 2014.
- [32] S. Hollebebeck, T. Raas, N. Piront et al., “Dimethyl sulfoxide (DMSO) attenuates the inflammatory response in the *in vitro* intestinal Caco-2 cell model,” *Toxicology Letters*, vol. 206, no. 3, pp. 268–275, 2011.
- [33] K. Breyne, S. K. Cool, D. Demon et al., “Non-classical proIL-1 β activation during mammary gland infection is pathogen-dependent but caspase-1 independent,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, article e105680, 2014.
- [34] D. D. Bannerman, M. J. Paape, J.-W. Lee, X. Zhao, J. C. Hope, and P. Rainard, “*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection,” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 11, no. 3, pp. 463–472, 2004.
- [35] P. Cormican, K. G. Meade, S. Cahalane et al., “Evolution, expression and effectiveness in a cluster of novel bovine β -defensins,” *Immunogenetics*, vol. 60, no. 3-4, pp. 147–156, 2008.
- [36] T. Goldammer, H. Zerbe, A. Molenaar et al., “Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle,” *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 11, no. 1, pp. 174–185, 2004.

VI.2. Capítulo 2 - Análisis de las rutas de señalización involucradas en la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas reguladas por los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate

Marisol Báez-Magaña¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa¹, Rafael Salgado-Garciglia², Joel Edmundo López-Meza¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

***Corresponding author. Tel/Fax: (52)-443-295-8029.**

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr, Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México. E-mail address: elmeza@umich.mx

Resumen

Staphylococcus aureus es el principal causante de la mastitis bovina subclínica, una enfermedad que afecta al ganado lechero en todo el mundo. El éxito de la infección se debe a que *S. aureus* se internaliza en las células de epitelio mamario bovino (CEMB) evadiendo la respuesta inmune innata. La interacción entre *S. aureus* y las CEMB es compleja, aunque, se ha reportado que el receptor TLR2 tiene una función importante en la internalización de la bacteria, así como en montar una respuesta inmune adecuada, en la que la cinasa Akt también juega un papel importante en la internalización de *S. aureus*. Otro receptor importante en el reconocimiento de patógenos y la respuesta inflamatoria es TLR4 del cual los ácidos grasos de cadena larga son agonistas. Previamente se reportó que los derivados lipídicos de cadena larga (DLCL) de semilla

de aguacate inhiben la internalización de *S. aureus* e inducen una respuesta antiinflamatoria. En la presente investigación se evaluó la función de los receptores TLR2, TLR4 y Akt, en CEMB tratadas con los DLCL e infectadas con *S. aureus*. Los resultados mostraron que la abundancia en membrana del receptor TLR2 disminuye antes de la infección, pero no se observaron cambios después de la infección. Asimismo al analizar la expresión de TLR4 se observaron resultados similares, lo mismo ocurrió con Akt, el tratamiento antes de la infección disminuyó la fosforilación, pero después de la infección no se observaron cambios. Estos datos sugieren que los efectos inmunomoduladores reportados por los DLCL en las CEMB en presencia de *S. aureus* son independientes de los receptores TLR2, TLR4 y Akt.

Abstract

Staphylococcus aureus is the main cause of subclinical bovine mastitis, this is a disease that affects dairy cattle worldwide. The success of *S. aureus* is due to the fact that is internalized into bovine mammary epithelial cells (bMEC), avoiding the innate immune response. The interaction between *S. aureus* and the bMEC is complex, however, it has been reported that TLR2 plays an relevant role during bacteria internalization, as well as it is important for mount an adequate immune response. Likewise, the Akt kinase also has a role during *S. aureus* internalization. Another important receptor for pathogen recognition and the inflammatory response is TLR4, and has been reports that long-chain fatty acids are agonists of this receptor. Previously, it was reported that a lipid-rich extract from avocado seed (LEAS) inhibits the internalization of *S. aureus* and induces an anti-inflammatory response in bMECs. In this work we evaluated the TLR2, TLR4 receptors and Akt in bMECs treated with LEAS and infected with *S. aureus*. The results showed that the membrane abundance of TLR2 receptor decreased before the infection, but no changes were observed after infection, similar results were showed with TLR4 expression. Regarding to Akt, its phosphorylation decreased with LEAS treatment before the infection, but after infection no changes were observed. These data suggests that the immunomodulatory effects reported for LEAS on bMECs in the presence of *S. aureus* are independent of the TLR2, TLR4 and Akt receptors.

1. Introducción

La mastitis bovina subclínica es una patología de la glándula mamaria que provoca la reducción de la producción de leche y pérdidas económicas. Una de las características de la enfermedad es que no presenta signos perceptibles y generalmente se trata de infecciones persistentes que pueden convertirse en infecciones crónicas. El principal agente causal de la mastitis bovina subclínica es *Staphylococcus aureus*, esta es una bacteria Gram positiva de gran importancia médica, que causa infecciones en humanos y en animales, facultativa intracelular y que evade los tratamientos con antibióticos (Kerro Deigo et al. 2002; Barkema et al. 2006).

Durante la mastitis bovina, el reconocimiento de *S. aureus* por el sistema inmune innato es un paso clave para la eliminación del patógeno. Tanto las células fagocíticas profesionales (macrófagos, neutrófilos, entre otras.) como las no profesionales (epitelios, endotelios, fibroblastos, entre otras) logran reconocer una amplia variedad de elementos microbianos conocidos como PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), reconocimiento que ocurre a través de los PRR (Receptores de Reconocimiento de Patrones) como son los receptores TLR (receptores tipo Toll) (Takeda y Akira, 2004; Kawasaki y Kawai, 2014). Dentro de las principales actividades que se han descrito para los TLR, están el reconocimiento de microorganismos, la respuesta inflamatoria y la respuesta inmunológica (Takeda y Akira, 2004; Kawasaki y Kawai, 2014). Este reconocimiento desencadena cascadas de señalización, en el caso de los TLR de superficie celular, pueden desencadenar dos rutas distintas: 1) a través del complejo IKK- NF- κ B, que induce a la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, entre otras; 2) otra ruta es a través de la fosforilación de las MAPK cinasas JNK, p38 y ERK, que conducen a la activación del factor transcripcional AP-1 (Oliveira-Nascimento et al., 2012; Alva-Murillo et al., 2015).

Una vez que *S. aureus* invade la glándula mamaria entra en contacto con las células del epitelio mamario bovino (CEMB), en las que se internaliza y sobrevive durante largos periodos de tiempo (Atalla et al., 2010; Garzoni and Kelley, 2011). El principal receptor relacionado con el reconocimiento de *S. aureus* por las CEMB es el receptor TLR2, aunque la vía canónica que es mediada por el factor transcripcional NF- κ B es bloqueada por *S. aureus*; sin embargo, se activa una vía alterna a través de la MAPK cinasa p38 que lleva a la activación del factor

transcripcional AP-1, el cual está involucrado en la modulación de la expresión de genes de péptidos antimicrobianos (defensinas bovinas) (Alva-Murillo et al., 2015).

Por otra parte, el receptor TLR4 está asociado con la síntesis de elementos de la respuesta inflamatoria, aunque el principal ligando del receptor TLR4 es el LPS, se ha reportado que los ácidos grasos saturados pueden activarlo y modular rutas de señalización proinflamatorias (Huang et al. 2012). El ácido láurico (ácido graso saturado) induce efectos proinflamatorios a través de la dimerización entre el receptor TLR2 y el TLR4, y la activación del factor transcripcional NF- κ B, en cambio los ácidos grasos insaturados como los omegas 3 y 6 presentan efectos antiinflamatorios. También se ha reportado que el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) presentan diferentes mecanismos de acción, uno de ellos es la unión a receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), modulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y la respuesta inflamatoria, además disminuyen el reclutamiento, dimerización y traslocación de TLR4 a través de la formación de las balsas lipídicas (Rogerio and Calder, 2018).

La ruta alternativa PI3K/Akt se activa cuando los receptores TLR2 y TLR4 se unen con sus agonistas y participa en la activación del factor transcripcional NF- κ B promoviendo una respuesta proinflamatoria (Arbibe et al., 2000). Esta ruta participa en diferentes procesos celulares como la proliferación celular, supervivencia y respuesta inmunológica; en los macrófagos se ha reportado que su participación es importante durante el proceso de fagocitosis (Manning and Toker, 2017). Además, en los macrófagos RAW264.7 esta ruta regula la fagocitosis de *S. aureus* a través de la actividad de la GTPasa Rac1 (Lv et al., 2019). Asimismo, la vía PI3K/Akt participa en el reconocimiento e internalización de *S. aureus* en las células endoteliales, en las cuales el tiempo de interacción con la bacteria es importante para que se desarrolle una respuesta adecuada (Oviedo-Boyso et al., 2011).

Por otra parte, en nuestro grupo de investigación se demostró que un extracto de semilla de aguacate nativo mexicano, rico en derivados lipídicos de cadena larga (DLCL), inhibió la internalización de *S. aureus* en las CEMB desde un 60-80% e indujo la producción de la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 y del péptido antimicrobiano BNBD5, así como inhibió la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α . Los resultados sugieren un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de los compuestos de los DLCL, además de inducir la producción de óxido nítrico (NO), que pudiera estar relacionado con la inhibición de la

internalización bacteriana (Báez-Magaña et al., 2019). Sin embargo, se desconocen las rutas de señalización que pudieran estar involucradas en la producción de citocinas y elementos de la respuesta inmune, así como la internalización de *S. aureus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar los principales receptores involucrados durante la interacción de los DLCL-CEMB-*S. aureus*.

2. Materiales y métodos

2.1. Extracción de los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate (DLCL)

Para este estudio se utilizaron los frutos de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en estado de madurez fisiológica. Los derivados lipídicos de cadena larga (DLCL) fueron obtenidos de acuerdo a lo reportado por Báez-Magaña et al (2019). Las semillas del aguacate fueron separadas del fruto y congeladas con nitrógeno líquido y después se trituraron. El polvo de la semilla se utilizó para realizar la extracción con hexano (C₆H₁₄, J.T. Baker) por 14 h en un equipo Soxhlet. El extracto fue filtrado y para llevar a cabo cristalización se enfrió toda la noche a -18°C. Después se recuperaron los cristales precipitados y fueron secados con nitrógeno gaseoso, el sobrenadante fue descartado. Para los ensayos biológicos, los cristales fueron disueltos en DMSO 5%. En este trabajo se utilizó la concentración de 100 ng/mL de DLCL ya que es la concentración que reduce el 80% de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

2.2. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

El cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB) se obtuvo del tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes (Anaya-López et al., 2006). Para el estudio se utilizaron solo células de pasajes 4 al 7. Las CEMB se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/mL, GIBCO), 10 µg/mL hidrocortisona (Sigma), 250 ng/mL de anfotericina B (Invitrogen) y pH 7.4. Las células se incubaron en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

2.3. Cultivo de Staphylococcus aureus ATCC 27543

Para la realización de este trabajo se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) aislada de un caso de mastitis bovina clínica, con la capacidad de invadir endotelio y epitelio mamario bovino (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). Para obtener el inóculo, la bacteria se creció en caldo Luria Bertani (LB, 5 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura, por cada litro de agua, BIOXON), incubándose a 37°C durante 16-18 h. Las unidades formadoras de colonia (UFC) se ajustaron midiendo (en el cultivo bacteriano) la densidad óptica (DO) a 600 nm ($DO\ 0.2 = 9.2 \times 10^7$ UFC/mL).

2.4. Abundancia en membrana del receptor TLR2 y activación de Akt en las CEMB

Se adicionó colágena tipo I de cola de rata a cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), donde se cultivaron las monocapas confluentes de las CEMB ($\sim 2 \times 10^5$ células/pozo). Se agregó medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos 24 h antes de poner el tratamiento con DLCL (24 h) (Báez-Magaña et al., 2019). A continuación, se realizó la infección con *S. aureus* por 2 h con una multiplicidad de infección de 30 bacterias por cada célula. Se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se despegaron con 0.05% tripsina-EDTA (Sigma). Se recuperaron las células por centrifugación (10 min/600 x g) a 4°C, y se lavó la pastilla 2 veces con PBS frío para luego recuperar las células por centrifugación (600 x g /2 min) a 4°C, sin resuspender. Posteriormente se adicionó suero de cabra al 5% en PBS (para bloquear las uniones inespecíficas) y se resuspendió y se incubó 30 min en hielo. Se recuperó la pastilla centrifugando y se incubó con el anticuerpo anti-TLR2 (TLR2.1) 10 µg/mL (Abcam) o anti-Akt acoplado a PE 5 µL (pS473BD Bioscience) por 2 h a 4°C en agitación y en obscuridad. Después se lavaron las células 3 veces con PBS frío. Se volvieron a centrifugar y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína o FITC (1:50 en PBS) por 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se recuperó la pastilla. Se resuspendió en 100 µl de PBS frío. Finalmente, se llevó a cabo la medición de la abundancia de la proteína en el citómetro de flujo Accuri BD C6, midiendo 10,000 eventos por condición. Vehículo (DMSO 0.1%).

2.5. Análisis de la expresión relativa del receptor TLR4 en las CEMB

El ARN total (5 µg) de las CEMB se extrajo de las condiciones evaluadas usando Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del proveedor y el cual se utilizó para sintetizar el ADNc. La muestra obtenida se trató con DNAsa I (Invitrogen) para remover cualquier

contaminación con ADN. La síntesis de ADNc se realizó por la reacción de transcripción reversa (RT) en un volumen final de 20 μL conteniendo: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 se guardó 5 min en hielo. Se centrifugó y se añadieron 4 μL de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 10 mM de ditioneitol (Invitrogen) y 2 U/ μL de inhibidor de RNAsa (RNAsa Out, 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 se incubó a 37°C por 50 min. La reacción se inactivó a 70°C por 15 min. La integridad del ADNc sintetizado se confirmó por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para el gen constitutivo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$) en el sistema StepOne Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (Radiant), con 0.9 pmol/ μL de cada oligonucleótido, 250 ng de ADNc y agua grado biología molecular. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica el receptor de TLR4. Como control interno (gen endógeno) se utilizó el gen de la GAPDH (Yonezawa et al., 2009).

2.6. Análisis de datos

Los datos se obtuvieron de dos experimentos independientes por triplicado y se compararon con análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se reportan como el promedio \pm el error estándar (EE) con nivel de significancia de $P < 0.05$. Para el análisis de qPCR los niveles de expresión relativa de genes mayores a 2 o menores a 0.5 se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados y discusión

Reportes previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la participación del receptor membranal TLR2 es importante para que se lleve a cabo la internalización de *S. aureus* en las CEMB, así como la activación de la respuesta inmune de la célula (Alva-Murillo et al., 2015; Medina-Estrada et al., 2016; Báez-Magaña et al., 2018). Previamente se reportó que los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate (DLCL) inhiben la adhesión y la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Báez-Magaña et al., 2019).

En este trabajo se evaluó la abundancia membranar del receptor TLR2 en presencia de los DLCL (100 ng/ml) con y sin infección. Los resultados mostraron que los DLCL disminuyen la abundancia de TLR2 en membrana hasta un 30% antes de la infección, mientras que después de la infección no se presentaron cambios (Fig. 1), estos datos sugieren que la inhibición de la internalización de *S. aureus* en presencia de estos compuestos puede estar relacionada con la reducción de este receptor, posiblemente por una disminución en la interacción entre la célula hospedera y la bacteria, sin embargo no se descarta que pudieran estar actuando otras rutas relacionadas con los procesos de internalización bacteriana. Debido a la naturaleza lipídica de estos compuestos es posible que la presencia en membrana de este receptor pudiera estar siendo afectada por cambios en las balsas lipídicas como ocurre con los ácidos grasos insaturados DHA y EPA (Roger and Calder, 2018); sin embargo, falta realizar experimentos que corroboren esta hipótesis.

Los receptores TLR se agrupan en dímeros formando diferentes combinaciones, entre ellas está la conformación TLR2/TLR4. El receptor TLR4 es uno de los principales receptores involucrados en la inducción de la respuesta inflamatoria, aunque su principal ligando es el LPS, se ha reportado que los ácidos grasos de cadena larga pueden modular la activación de éste, la cual es determinada por la naturaleza del ácido graso mostrando efectos pro o antiinflamatorios (Roger and Calder, 2018). Como se mencionó anteriormente, debido a la composición lipídica de los DLCL se evaluaron sus efectos sobre la expresión del receptor TLR4, los resultados mostraron que la expresión de TLR4 disminuyó hasta un 80% antes de la infección y después de la infección la expresión se mantiene disminuida (Fig. 2). Interesantemente este resultado se correlaciona con la inhibición de la abundancia en membrana de TLR2, lo que sugiere que los TLR a nivel de expresión del mensajero y de proteína son afectados por los DLCL.

También se evaluó la fosforilación de la cinasa Akt, la cual participa en la internalización de *S. aureus* y es uno de los elementos río abajo en la ruta de los receptores TLR2 y TLR4 (Manning and Toker, 2017). Los resultados no mostraron cambios significativos al comparar la fosforilación de esta cinasa en las células tratadas con los DLCL; sin embargo, después de la infección se observó una disminución en la fosforilación, aunque esta disminución es atribuida a *S. aureus* y no al tratamiento con los DLCL (Fig. 3), resultado que puede estar correlacionado con la inhibición de la expresión del receptor TLR4.

En este trabajo se analizaron elementos clave que participan en la modulación de la respuesta inflamatoria como son los receptores TLR2, TLR4 y Akt, además TLR2 y Akt son elementos que también participan en la internalización de *S. aureus* (Arbibe et al., 2000; Oviedo-Boyso et al., 2008). Sin embargo, en este trabajo se reportó que los DLCL inhiben tanto la abundancia en membrana de TLR2, así como la activación de la cinasa AKT, lo que sugiere que los DLCL pueden estar interviniendo con la interacción de la bacteria con las CEMB y de esta manera el proceso de internalización de *S. aureus* se ve afectado, además los resultados mostraron que los efectos antiinflamatorios y sobre la inhibición de la internalización de *S. aureus* en las CEMB que presentan los DLCL pueden estar ligados con la inhibición de rutas de señalización activadas por los TLR, cinasas y factores transcripcionales como NF- κ B, ligados con la respuesta proinflamatoria (Kawasaki and Kawai, 2014). Sin embargo, por la naturaleza lipídica de los DLCL resulta atractivo evaluar rutas alternativas relacionadas con los ácidos grasos de cadena larga y procesos pro y antiinflamatorios como son los receptores GPR (Liou et al., 2011) y los receptores de lípidos PPAR, los cuales están relacionados con la expresión de citocinas y elementos inflamatorios, a través de la represión del factor NF- κ B (Wahli and Michalik, 2012).

4. Conclusión

Los derivados lipídicos de cadena larga de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhiben la internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino y presentan efectos antiinflamatorios a través de las vías TLR2, TLR4 y Akt.

Referencias

- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.025
- Arbibe, L., Mira, J.-P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch, R.J., Knaus, U.G., 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1, 533–540. doi:10.1038/82797

- Atalla, H., Gyles, C., Mallard, B., 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143, 319–328. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.030
- Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2018. Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 57, 47-54. doi:10.1016/j.intimp.2018.02.001
- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., López-Meza, J.E., 2019. Lipid-Rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–10. doi:10.1155/2019/7083491
- 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. doi:10.1016/j.peptides.2016.02.008
- Garzoni, C., Kelley, W.L., 2011. Return of the Trojan horse: Intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *EMBO Mol. Med.* 3, 115–117. doi:10.1002/emmm.201100123
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J.L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 113–122. doi:10.1016/j.vetimm.2007.09.007
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Lv, Y., Fang, L., Ding, P., Liu, R., 2019. PI3K/Akt-Beclin1 signaling pathway positively regulates phagocytosis and negatively mediates NF- κ B-dependent inflammation in *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510, 284–289. doi:10.1016/j.bbrc.2019.01.091

- Liou, A.P., Lu, X., Sei, Y., Zhao, X., Pechhold, S., Carrero, R.J., Raybould, H.E., Wank, S., 2011. The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates Long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology* 140, 903-912.e4. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.012
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001
- Medina-Estrada, I., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Ochoa-Zarzosa, A., 2016. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Mediators Inflamm.* 2016, 1–16. doi:10.1155/2016/6120509
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L.M., 2012. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol* 3, 1-17. doi:10.3389/fimmu.2012.00079
- Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J.G., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Cárabez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M., Baizabal-Aguirre, V.M., 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand. J. Immunol.* 67, 169–176. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02056.x
- Oviedo-Boyso, J., Cortés-Vieyra, R., Huante-Mendoza, A., Yu, H.B., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Finlay, B.B., Baizabal-Aguirre, V.M., 2011. The phosphoinositide-3-kinase-akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect. Immun.* 79, 4569–4577. doi:10.1128/IAI.05303-11
- Rogero, M.M., Calder, P.C., 2018. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients* 10, 1–19. doi:10.3390/nu10040432
- Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., Hochberg, M., 2011. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 239–246. doi:10.1007/s00403-010-1088-6

Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003

Wahli, W., Michalik, L., 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 351–363. doi:10.1016/j.tem.2012.05.001

Leyendas de figuras

Fig. 1 Abundancia en membrana del receptor TLR2 en CEMB infectadas con *S. aureus* y tratadas con los DLCL. Las CEMB se trataron con DLCL (100 ng/mL) 24 h y/o se infectaron con *S. aureus* por 2 h (MDI 30:1), y se evaluó la abundancia del receptor en la membrana celular por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia se estimó de 10,000 eventos. Vehículo (DMSO 0.1%). Cada barra muestra el resultado de dos experimentos independientes por triplicado \pm SE. Las letras sobre las barras indican cambios significativos ($P \leq 0.05$, Tukey-Kramer).

Fig. 2 Expresión relativa del mRNA del receptor TLR4 en CEMB infectadas con *S. aureus* y tratadas con los DLCL. Las células se trataron con los DLCL (100 ng/mL) por 24 h, posteriormente se infectaron por 2 h (MDI 30:1). Se muestra la expresión relativa del gen TLR4 bovino, utilizando como control de referencia a GAPDH. Vehículo (DMSO 0.1%). Cada barra muestra el promedio \pm EE de tres experimentos independientes por triplicado. Valores mayores a 2 y menores a 0.5 veces se consideran como cambios significativos.

Fig. 3 Fosforilación de la cinasa Akt en CEMB infectadas con *S. aureus* y tratadas con los DLCL. Las CEMB se trataron con DLCL (100 ng/mL) 24 h y/o se infectaron con *S. aureus* por 2 h (MDI 30:1), y se evaluó fosforilación de la cinasa Akt por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia se estimó de 10,000 eventos. Vehículo (DMSO 0.1%). Cada barra muestra el resultado de dos experimentos independientes por triplicado \pm SE. Las letras sobre las barras indican cambios significativos ($P \leq 0.05$, Tukey-Kramer).

Figura 1.

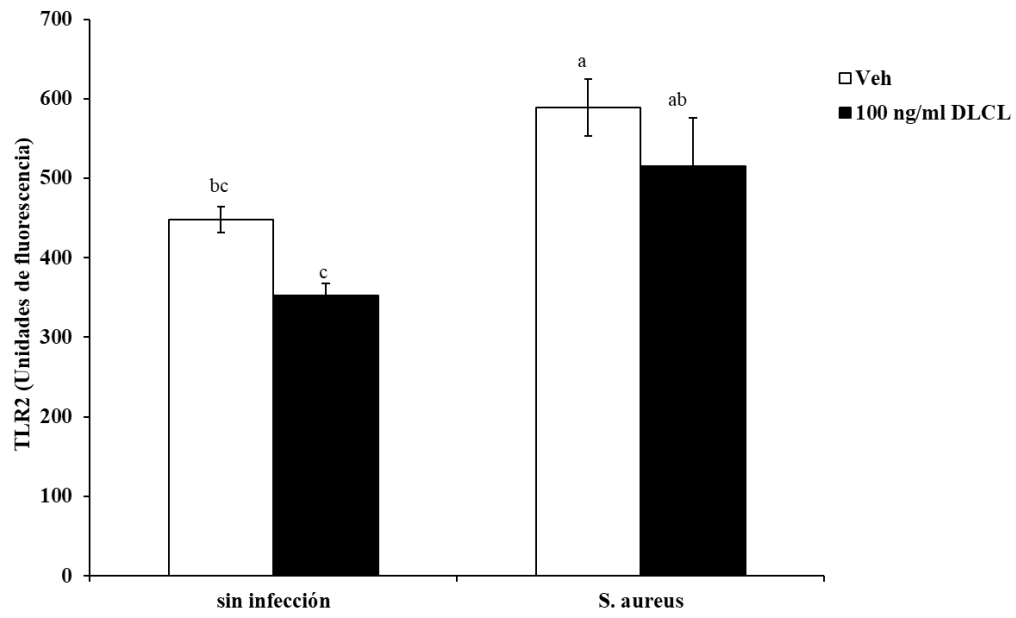


Figura 2.

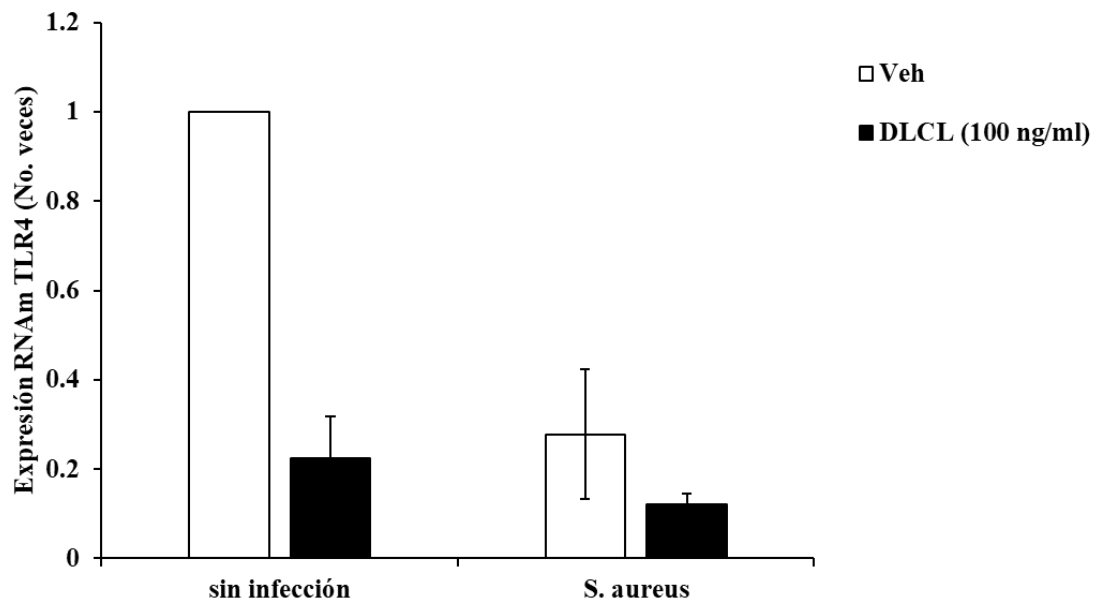
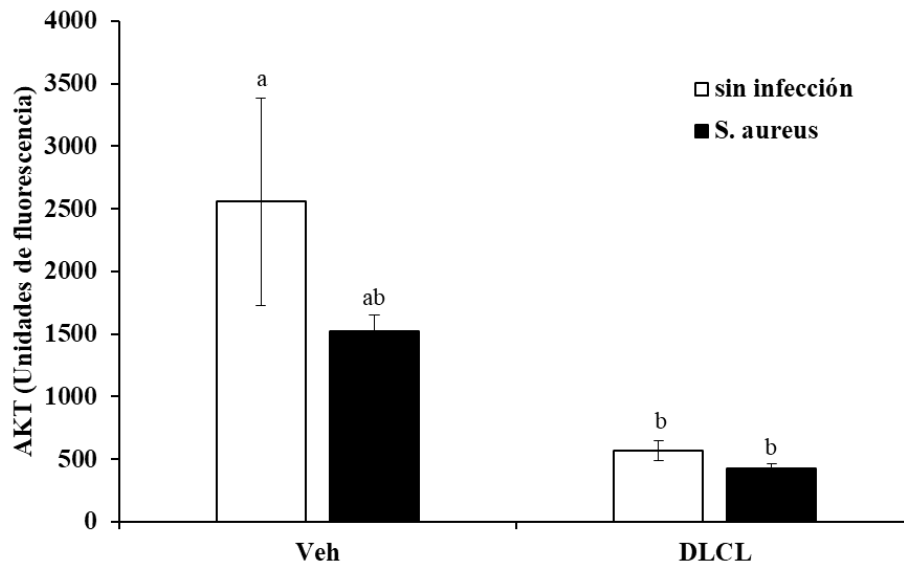


Figura 3.



VI.3. Capítulo 3 - Lipid-rich extract from Mexican avocado seed induces epigenetics changes in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization

Marisol Báez-Magaña¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa¹, Le Lou Guan², Yanhong Chen², Rafael Salgado-Garciglia³, Joel Edmundo López-Meza¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

² Department of Agricultural, Food and Nutritional Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB T6G2P5, Canada.

³Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

***Corresponding author. Tel/Fax: (52)-443-295-8029.**

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr, Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México. E-mail address: elmeza@umich.mx

Abstract

Immune innate response (IIR) is the first defense barrier of organisms against pathogens. It is a complex response activated for several signalling pathways that involves different receptors, kinases and other enzymes that lead to activate transcriptional factors involved in gene expression related with defense. Also, it has been reported that in IIR the epigenetic mechanisms have an important role. Bovine chronic mastitis is a disease caused mainly by *S. aureus* and frequently the bacteria is internalized by bovine mammary epithelial cells which allows it to evade the mechanisms of defense and survive for long periods. Besides, during bovine mastitis

S. aureus induces epigenetic changes in the host such as hyperacetylation on histone H3 and modify the miRNAs profile of the host cell. In a previous work, we reported that a lipid-rich extract from avocado seed (LEAS) decreased *S. aureus* internalization into bMECs, which was attributed to a LEAS-induced secretion of antimicrobial substances. Also, LEAS increased IL-10 gene expression and decreased TNF- α , which suggest that LEAS have anti-inflammatory effects. LEAS contains a mix of long-chain fatty acids and derivatives such as acetogenins, which could be attractive molecules with epigenetic modulation properties. In this work we showed that LEAS increased the di and tri-methylation of histone H3 in bMECs infected with *S. aureus*. Also, in bMECs treated with LEAS and then challenged with bacteria the number of miRNAs was increased, mainly miRNAs related with IIR; in particular the miRNA-671, which has been associated with the expression of the antimicrobial peptides beta-defensin 106A and beta-defensin 106B. Also, other 19 different miRNAs involved in metabolic processes and immune response were detected. To our knowledge, this is the first report of an avocado seed extract that induced epigenetic changes in host-pathogen interactions.

Key words: Epigenetic, Mastitis, *S. aureus*, Avocado

1. Introduction

The epigenetics is the study of the heritable changes and no-heritable that regulate the activity and gene expression in different cellular process (Li, 2002; Allis et al., 2007). Epigenetic modifications are directly involved with the access to transcriptional machinery for enable the expression of the genes. The epigenetic modifications include chemical changes or “tags” (methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, citrullination, ADP-ribosylation, *O*-GlcNAcilation) on histone tails, mainly in residues of lysine, serine and arginine, which can be removed once that the stimulus is eliminated (Allis et al., 2007; Zhou et al., 2011; Marmorstein and Zhou, 2015; Allis and Jenuwein, 2016). These modifications can be induced by environmental signals, stress and pathogens (Hamon and Cossart, 2008; Feil and Fraga, 2012). The epigenetic marks are add directly by epigenetic enzymes or indirectly by kinases like MAPK (Jones and Baylin, 2007; Hamon and Cossart, 2008; Silmon De Monerri and Kim, 2014; Allis et al., 2015). In addition, these marks could be eliminated by different

enzymes, such as HDACs (histones deacetylases) and KMDs (histone demethylases), known as erasers enzymes, whose function is remove the acetylation or methylation marks, respectively (Seto and Yoshida, 2015; Allis and Jenuwein, 2016; He et al., 2016). Also, other epigenetic level include the production of non-coding RNAs, which have a relevant role in the regulation of the gene expression at post-transcriptional level (Sonkoly et al., 2008; Iorio et al., 2010; O'Brien et al., 2018).

Innate immune response (IIR) is the organisms first line of defense and is conserved in all of the species (Schleimer et al., 2007; Buchmann, 2014; Striz et al., 2014). In recent years different research groups have described that epigenetic modifications have a relevant role in IIR (Hamon and Cossart, 2008; Netea, 2013; Silmon De Monerri and Kim, 2014). The canonical via of IIR activation occurs through the TLR-MAPK-transcriptional factors pathway, which leads to the production of cytokines, chemokines, antimicrobial peptides, and other elements of IIR (Oliveira-Nascimento et al., 2012; Kawasaki and Kawai, 2014). Also, chromatin signatures trigger changes in the chromatin architecture related with the control of transcription programs of inflammatory genes (cytokines and chemokines), as well as the recovery of tissue homeostasis (Lee et al., 2003; Hamon and Cossart, 2008; Quintin et al., 2014). However, some pathogens avoid this defense barrier and regulate the epigenetic mechanisms of host causing chronic and recurrent infections (Grant and Hung, 2014; Silmon De Monerri and Kim, 2014; Byndloss and Tsolis, 2016).

S. aureus is a bacterium of great importance in human and animal health. In veterinary, this bacteria causes serious problems in the dairy sector, since is the main causal agent for subclinical bovine mastitis (Kerro Deogo et al., 2002; Herron-Olson et al., 2007). *S. aureus* is a facultative intracellular pathogen that can be internalized by bovine mammary epithelial cells, thereby evading the defense response of the cell through of an arsenal of elements, which include the regulation of the IIR at epigenetic level favoring an inhibition of the inflammatory response (Garzoni and Kelley, 2009; Atalla et al., 2010; Timothy J. Foster et al., 2014; Modak et al., 2014; He et al., 2016; Song et al., 2016b). In this sense, a *S. aureus* strain isolated from bovine mastitis increased the marks of histone-acetylation H3K14ac and H3K9ac in a mice mastitis model, as well as the expression of miRNA mmu-miR-301, mmu-Let7, mmu-miR-20 and mmu-miR-106, which was related to the inhibition of the activation of transcriptional factor NF- κ B and cytokine expression (Modak et al., 2014). Furthermore, peripheral blood samples from cows

with subclinical mastitis caused by *S. aureus* showed an epigenetic labeling pattern, which could serve as a guide for the search of affected genes during this disease (He et al., 2016). In addition, in bovine mammary epithelium cells MAC-T, heat-inactivated *S. aureus* modulated the expression of microRNAs involved in different signaling pathways (Jin et al., 2014). Also, more recently Sun et al (2015) reported that microRNA could be transported through milk exosomes, and they have been proposed as possible biomarkers. However, there are still many gaps to understand the complexity of this disease, and to find appropriate therapies that help in its treatment.

Previously, our work group reported the effects of a lipid-rich extract from Mexican native avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) (LEAS), which reduced up to ~80% the internalization of *S. aureus* into bMECs; also, LEAS favors the secretion of antimicrobial compounds due that the conditioned medium eliminate ~30% of bacteria (Báez-Magaña et al., 2019). Also, chemical analysis of this extract showed that acetogenins and long-chain fatty acids are the mainly constituents, which are known as epigenetic modulators (Lee et al., 2011; Lau et al., 2019). Therefore, the aim of this work was to determine the global epigenetic modifications induced by LEAS and its implications during the internalization of *S. aureus* in bovine mammary epithelium cells.

2. Materials and methods

2.1. Lipid-rich extract from avocado seed (LEAS)

Mexican avocado fruits (*Persea americana* var. *drymifolia*) used in this study were collected at physiological maturity. LEAS was obtained according to reported by Báez-Magaña et al (2019). Briefly, avocado seeds were separated from the fruit and then frozen in liquid nitrogen and crushed. The powder was extracted with hexane (C₆H₁₄, J.T. Baker) for 14 h in a Soxhlet apparatus. This lipid-rich fraction was filtered and then cooled to -18°C overnight for a cold crystallization. Precipitated crystals were recovered discarding the supernatant and then were dryness with gas nitrogen. For biological assays crystals were resuspended in DMSO 5%. In this work, we used 100 ng/mL of LEAS in all of the experiments because it reduced ~80% the internalization of *S. aureus* into bMECs.

2.2. *Staphylococcus aureus* strain

S. aureus subsp. *aureus* (ATCC27543) strain was used in this study. This strain was isolated from a case of bovine mastitis and has the capability of internalize into bMECs (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani broth (LB, Bioxon, Mexico). For the different assays the colony forming units (CFU) were adjusted by measuring their optical density at 590 nm ($OD\ 0.2=9.2 \times 10^7$ CFU/mL).

2.3. Primary culture bovine mammary epithelial cells (bMEC)

bMECs were isolated of alveolar tissue from udders of healthy lactating cows as described (Anaya-López et al., 2006). Cells from passages 2-8 were used in all of the experiments. The bMECs were cultured in growth medium (GM) that was composed of a DMEM medium/nutrient mixture F12 Ham (DMEM/F12, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest), 10 µg/mL insulin (Sigma), 5 mg/mL hydrocortisone (Sigma), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 1 µg/mL amphotericin B (Sigma). The cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

2.4. Acid extraction of histones

To analyze the effects of LEAS and/or *S. aureus* on histone modifications of bMECs, monolayers of cells that were cultured in plates (2×10^6 cells/mL) with 6-10 µg/cm² rat-tail type I collagen (Sigma) were incubated with 100 ng/mL (24 h) of LEAS and/or *S. aureus* for 2 h (MOI 30:1). The histones were obtained according to the protocol reported by Shechter et al. 2007. For this, cells were washed with PBS twice and detached with trypsin-EDTA (Sigma), then the cells were collected in a new tube and washed with PBS and then centrifugated (10 min, 300 g). Cell pellet was resuspended in hypotonic lysis buffer and incubated for 30 min in a rotator at 4°C to promote hypotonic swelling and lysis, after which the solution was centrifugated (10,000 g, 10 min, 4°C). Pellet of nucleus was resuspended in 400 µL 0.4 N H₂SO₄ and incubated overnight in a rotator at 4°C. Samples were centrifugated (16000 g, 10 min) and the supernatant containing the histones was transferred to new tube for precipitation. Histones were precipitated using TCA 33% added drop by drop and then were incubated on ice for 30 min. Histones were washed with ice-cold acetone twice (16000 g, 10 min at 4°C). Air-dried histone pellet was dissolved in 100 µL of ddH₂O. To analyze the histone extraction, samples

were run on a 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with Coomassie Blue dye.

2.5. Western blot

10 mg of histones was separated by SDS-PAGE 15% and then was transferred on PVDF 0.45 mm membrane (BioTrace) using a semi-dry blotting unit (Fisher Biotech) following manufacturer's protocols (El Mansouri et al., 2014). Transference was made using three buffer system for Semidry electroblotting: Anode 1 Buffer: 0.3 M Tris Base, 20% MeOH, pH 10.4; Anode 2 Buffer: 0.025 M Tris Base, 20% MeOH pH 10.4; Cathode Buffer 0.025M Tris Base, 0.04M Caproic acid, 20% MeOH pH 9.4. The following antibodies were purchased from Abcam and used in 1:1000 dilution: anti-histone H3 antibody-nuclear loading control and ChIP grade (ab1791), anti-histone H3 (di methyl K9) antibody-ChIP grade (ab1220), anti-histone H3 (acetyl K9) antibody ChIP grade (ab10812), anti-histone H3 (tri methyl K9) antibody-ChIP grade, and secondary antibody anti-rabbit IgG, HRP-inked Antibody #7074 (Cell signaling technology). Detection of proteins were analyzed using chemiluminescent substrate highly sensitive for detection of horseradish peroxidase (HRP) WesternSure (LI-COR) according to the manufacturer's instructions and exposed to KODAK X-ray Film (KODAK). The WB were analyzed using the Image Studio Lite 5.2 Software LI-COR-Biosciences.

2.6. HDAC total deacetylase activity assay in bMECs

bMECs were grown in 96-well plate (1×10^4 cells) to confluence ~80% in DMEM F-12 Ham (Sigma) without phenol red, with L-glutamine, 15 mM HEPES and NaHCO_3 1.2 g, without FBS and antibiotics. bMECs were treated for 2, 6, 12 and 24 h with LEAS (100 ng/mL) and infected with *S. aureus* 2 h. The total deacetylase activity was assessed using HDAC Fluorometric cellular activity assay kit (Fluor de lys, Promega) according to the manufacturer's instructions. After incubation with LEAS and/or *S. aureus*, the media were replaced with new media supplemented with 200 μM flour de lys substrate and 1 μM trichostatin (TSA) and incubated 4 h at 37°C. Finally, for determinate HDACs activity 1X development plus 2 μM TSA was added and mixed, then it was incubated by 15 min at 37°C. Samples were read at 360 and 460 nm in a Varioskan flash multimode reader (Thermo Scientific).

2.7. Role of HDACs during *S. aureus* internalization into bMECs

Gentamicin protection assay was carried out using bMECs monolayers ($\sim 2 \times 10^5$ cells) cultured in 24 well dishes treated with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma) (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). bMECs were incubated with LEAS (100 ng/mL) in DMEM/F12 media (Sigma) without antibiotics and serum for 24 h and then were incubated with trichostatin A (0.5 μM , Enzo), a HDAC inhibitor, for 30 min. Then, bMECs were infected with *S. aureus* (MOI 30:1 bacteria per cell). For this, bMECs were inoculated with bacterial suspensions (9.2×10^7 CFU/mL) and incubated for 2 h in 5% CO_2 at 37°C. Afterward, bMECs were washed three times with PBS (pH 7.4) and incubated with incomplete medium supplemented with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin for 1 h at 37°C to eliminate extracellular bacteria. Finally, bMECs monolayers were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and lysed with 250 μL of sterile distilled water. bMECs lysates were diluted 100-fold, plated on LB agar and Petri dishes were incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to control (bMECs treated with vehicle).

2.8. RNA total isolation and library construction of microRNA

To analyze the effects of LEAS and/or *S. aureus* on the miRNA profile of bMECs, monolayers of cells (2×10^5 cell/well) that were cultured in 6 well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma) were incubated with LEAS 100 ng/mL (24 h) and/or *S. aureus* for 2 h (MOI 30:1). bMEC total RNA (5 μg) was extracted with the Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Equal amounts (330 ng) of total RNA from each sample was pooled to elaborate a small RNA library using the TruSeq Small RNA Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed for 13 cycles. In total, 13 small RNA libraries were constructed and pooled in equal amounts for gel purification and sequencing. Sequencing was carried out on the HiScan SQ system (Illumina) using the TruSeq™ SBS kit v3 (50 cycles, Illumina). Real-time analysis and base calling were done using the HiSeq Control Software Version 1.4.8 (Illumina) (Zhao et al., 2016).

2.9. *Small RNA sequence analysis*

Low-quality reads were removed from the raw reads using CASAVA 1.8 based on chastity. After trimming the 3' adaptor sequence by a perl script ("clip_adapters.pl") provided by miRDeep2 software (version 2.0.0.5), the reads with 18–30 nt in length of small RNA from all libraries were extracted and pooled to identify known and novel miRNAs using miRDeep2 with the default parameters. All reads were aligned to the bovine genome (2009, UMD3.1) with Bowtie (allowing 1 mismatch) and reads that mapped to bovine rRNAs, tRNAs, and snoRNAs in the Rfam RNA family database were discarded. The remaining reads were scored by miRDeep2 as known or potential novel bovine miRNAs. Small RNAs that mapped only to genomic repeat loci were removed. The lowest score cut-off of 5 that yielded a signal-to-noise ratio of 16.2 was used for novel miRNA prediction and small RNAs with higher scores than threshold were regarded as potential novel miRNAs. Furthermore, small RNAs that had lower scores than cut-off but more than 10 reads in total were further analyzed as miRNA candidates. Small RNAs <20 nt were ignored because of higher false-positive discovery rates and the remaining novel miRNAs and miRNAs candidates were further annotated using Blastn (word size = 6). Conserved novel miRNAs were classified as homologous known miRNAs or orthologous known bovine miRNAs and named according to the following guidelines: (1) it matches > 90% identity and > 90% of the length of a known animal miRNA (miRBase Release 19), or (2) it precursor aligns to any precursor of a known miRNA with > 70% identity and > 75% sequence coverage. In addition, a huge bovine specific miRNA family (bta-miR-2284, miRBase Release 19) containing more than 80 members, shows very high similarity in their precursor sequences. Therefore, novel miRNAs were regarded as new members of bta-miR-2284 family if their precursors were clustered by CLUSTAL W with bta-miR-2284 precursors. Non-conserved novel miRNAs were also named and inputted into miRBase, while the remaining miRNA candidates that didn't follow any of the categories above were not further analyzed. The expression of miRNAs (known and novel miRNAs) for each library was calculated by miRDeep2 using the Quantifier module. Reads that mapped equally well to the positions of two or more mature miRNAs were divided equally to the read counts of those mature miRNAs. DEseq allows a P-value to be determined in the absence of any available biological replicates by treating the two conditions as replicates, under the assumption that only a small proportion of transcripts are differentially expressed (Jin et al., 2014).

2.10. Target gene prediction and pathway analysis

The putative target genes of differentially expressed miRNAs were predicted using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems Inc., Redwood City, CA, USA). IPA uses a miRNA target filter that depends of experimentally validated gene-miRNA interactions from TarBase database (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase>) and miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>), and the presence of conserved 8mer and 7mer sites on 3 prime untranslated regions (3'UTR) of genes that match the seed region of each miRNA from TargetScan (<http://www.targetscan.org>). Additionally, manually curated findings within the IPA knowledge base are also used. Predictions returned by IPA are either experimentally validated interactions, high or moderate interactions between the 8mer/7mer seed regions of miRNA that match sites on 3'UTR of genes. In this study, only genes showing high predictions and experimentally validated interactions were further analyzed. Predicted gene targets were imputed into the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID version 6.7, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) for gene ontology (GO) functional annotation and pathway analysis.

2.11. Statistical analysis

For Western blot the data were obtained from three independent experiments, and compared with one-way analysis of means comparisons using Student's t. The results are reported as the means \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $P \leq 0.05$. The data of HDACs activity were obtained from 1 experiment carried out in duplicated and compared with one-way analysis of means comparisons using Tukey-Kramer test. The results are reported as the means \pm the standard errors (SE), and the significance level was set at $P \leq 0.05$. The data were normalized to vehicle (DMSO 0.1%).

3. Results

3.1. LEAS regulates the histone modifications in bMECs infected with *S. aureus*

The chemical modifications of amino acids on histone tails (mainly lysine residues) are directly related with chromatin architecture and gene expression. Also, intracellular bacteria are able to

regulates the chromatin architecture and modulate the gene expression of IIR. Thus, we evaluate the global profile of acetylation and methylation in bMECs treated with LEAS and/or infected with *S. aureus*. LEAS (100 ng/mL, 24 h) induced a slight up-regulation (~0.2-fold) of H3K9me2 and H3K9me3 marks; whereas, H3K9ac mark was not modified. Similar behavior was observed in LEAS-bMECs treated and infected due that H3K9me3 and H3K9me3 marks were up-regulated (~0.3 and 0.4-fold), respectively, but the H3K9ac mark was not affected. As well as, *S. aureus* increased H3K9ac and H3K9me2 marks (~0.3 and 0.4-folds, respectively); however, H3K9me3 changes were not observed (Fig. 1).

3.2. LEAS does not affect the HDACs activity in bMECs infected with *S. aureus* but HDACs are associated with the *S. aureus* internalization

Acetylation marks on histone tails are eliminated by HDACs. To analyze the effect of LEAS on HDACs activity, we treated bMECs with LEAS 100 ng/mL during 6, 12 and 24 h with and without infection. The results showed that bMECs infected increased the HDACs activity in a time-manner dependent. However, LEAS not affected the HDACs activity even when bMECs were challenged with *S. aureus* (Fig. 2).

Previously we showed that LEAS inhibits *S. aureus* internalization into bMECs. To evaluate a possible relation between internalization and HDACs activity, bMECs were treated with LEAS (100 ng/mL, 24 h) and then trichostatin (TCA) 0.5 μ M was added for 30 min. Interestingly, when HDAC activity was blocked with TCA we observed an increase in the *S. aureus* internalization (2-fold) compared to control without TCA (Fig. 3). However, the effects of LEAS on *S. aureus* internalization with HDAC activity blocked did not change the CFU recovered compared with vehicle. These results suggest that LEAS effects on internalization are independent of HDACs activity according with the results showed in the figure 3.

3.3. miRNA profile in bMECs treated with LEAS and infected with *S. aureus*

After RNA sequencing the raw reads for each condition were obtained, these results are reported in Table 1. After quality and length filters, the following reads of each conditions were used to further analysis: 1) Control (vehicle), 245897 reads (46.33%); 2) LEAS, 265330 reads (51.76%), 3) *S. aureus*, 101500 reads (34.17%); 4) LEAS and *S. aureus*, 841244 reads (43.38%). After trimming, the number of miRNA 20-24 nt were 80.5% control, 80.5% LEAS, *S. aureus* 65.5%

and LEAS and *S. aureus* 80%; the rest of reads were snoRNA, rRNA, mRNA, snRNA, tRNA and unassigned RNA (Fig. 4). According to results, the numbers of miRNA detected were different for each condition. LEAS and *S. aureus* was the condition that had a higher number of miRNA (174), followed by LEAS (163 miRNA), control (160 miRNA) and *S. aureus* (96 miRNA) (Fig. 5a). Using principal component analysis (PCA) it was showed that LEAS and control had similar profile of miRNAs, whereas *S. aureus* and LEAS and *S. aureus* had different profile between them. Also, conditions without infection and infected showed different profiles (Fig. 5b). The analysis of miRNA distribution and those commonly expressed showed that 95 miRNAs are present in all conditions. Interestingly, control (vehicle) and LEAS conditions only shared four miRNAs, but *S. aureus* and LEAS not showed miRNA similar between them. Also, LEAS and LEAS and *S. aureus* shared 11 miRNAs (Fig. 5c).

3.4. Identification of novel miRNA and enriched KEGG pathways

A total of 15 miRNA uniquely expressed were identified for LEAS and 22 for LEAS with *S. aureus*. Based on predicted targets of miRNAs using Targetscan and mirRanda as well as functional analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), the functional categories of miRNAomes in LEAS and LEAS with *S. aureus* were identified. LEAS showed miRNAs associated to pathways and elements related with immune response. Similar results showed LEAS with *S. aureus*, in this condition miRNA related with histones and chromatin modifiers were detected. Besides, miR-671 is related with antimicrobial peptides beta defensin 106A and beta defensin 1006B (Table 2). However, is necessary evaluate the expression of miR-671 and other miRNA related with cytokines and epigenetics pathways detected in this analysis to clarify their role in the interaction *S. aureus*-bMECs.

4. Discussion

Staphylococcus aureus is a persistent bacterium related to chronic infections in humans and animals (Fraunholz and Sinha, 2012; Löffler et al., 2014). *S. aureus* presents different strategies that allow it manipulate elements of the host to thereby hijack the defense mechanisms of the cells (Herron-Olson et al., 2007; Lara-Zárate et al., 2011; Foster et al., 2014). One strategy is the regulation of the epigenetic machinery of host, which are closely related to gene expression.

Also, there is a direct relationship between changes in epigenetic marks and the immune response of the host (Hamon and Cossart, 2008; Silmon De Monerri and Kim, 2014).

During bovine mastitis caused by *S. aureus* in both *in vitro* and *in vivo* models, a relationship has been observed between the epigenetic changes and the IIR (Modak et al., 2012, 2014; Grabiec and Potempa, 2018). In this work, we reported that bMECs infected with *S. aureus* showed an hyperacetylation of histone H3K9, which coincides with the reported by Modak et al (2014) in a mouse mastitis model, in that study *S. aureus* induces hyperacetylation of H3K9 and H3K14. In addition, it is also reported that *S. aureus* increased the H3K18ac in bMECs (Ochoa-Zarzosa et al. 2009).

Previously, we showed that LEAS has interesting immunomodulatory properties in a host-pathogen interaction model. LEAS inhibited the internalization of *S. aureus* into bMECs ~60-80% and regulates its IIR (TNF- α , IL-10 and BNBD5) suggesting an anti-inflammatory profile (Báez-Magaña et al., 2019). In the search of mechanisms that may be associated with these effects, in this work the histone global modifications was analyzed. LEAS increased the di and tri methylation of histone H3K9 in bMECs (Fig. 1), which could be related with the inhibition of the expression of proinflammatory genes (Bayarsaihan, 2011; Báez-Magaña et al., 2019). In general, there are few reports of epigenetic modulation for lipid compounds in host-pathogen interactions. The fatty acids most studied in these interactions are short-chain fatty acids (SCFAs) such as butyrate and propionate (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Sunkara et al., 2012; Silva et al., 2018). Both SCFAs (1 mM, 2 h) increased in MAC-T cells the acetylation of histone H3 in the lysine residues K9/14, K18 and K27, through the regulation of the activity of the HDACs (Silva et al., 2018). In addition, both SCFAs in bMECs infected with *S. aureus* inhibit the bacteria internalization and showed immunomodulatory properties, although their effects were lesser than showed by LEAS (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2012). In the same way, squamocin (bis-tetrahydrofuran acetogenin), a lipid-derivatives from annonaceous, modulate the histone H3 phosphorylation in different cancer cell lines (human glioblastoma GBM8401 cells, human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells and human colorectal carcinoma SW620 cells) (Lee et al., 2011). Likewise, anacardic acid from cashew nuts, a potent inhibitor of histone acetyltransferases (HAT), showed anti-inflammatory and anticancer activities through inhibition of NF- κ B activation in cancer cell lines (human myeloid KBM-5 cells, human T-cell lymphoma Jurkat cells, human lung adenocarcinoma H1299 cells,

human embryonic kidney A293 cells, human prostate cancer Du145 cells, and human squamous cell carcinoma SCC4 cells) (Sung et al., 2008).

During *S. aureus* infections HDACs have been related with the regulation of MAPKs phosphorylation and the production of cytokine TNF- α , which in turn regulates the activation of JNK and ERK1 / 2, these MAPK are regulated by HDACs activity forming a loop (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2015; Romanick et al., 2019), this is a mechanism interesting between HDAC, inflammatory response and *S. aureus*, however, in this work we present the first report of the participation of HDACs during internalization of *S. aureus* into bMECs (Fig. 3), although it would be interesting to try to relate the HDAC-mediated internalization process with the inflammatory response. Furthermore, LEAS effects on internalization of *S. aureus* as well as immunomodulatory effects reported by Báez-Magaña et al. (2019) are independent of HDACs activity and H3K9ac (Fig. 1-3).

In the other hand, lymphocytes from cows with subclinical bovine mastitis shown an increase in the expression of IL-10, which was associated with the decreased histone methylation (H3K27) in the IL-10 promoter region (He et al., 2016), in this work we reported that LEAS (100 ng/mL) increased di and tri- methylation of H3K9, besides previously LEAS at same concentration suppressed the expression of several genes related with proinflammatory response (Báez-Magaña et al., 2019), so it would be interesting to try to establish the relation between the increased of methylation with promoter region of proinflammatory genes in bMECs treated with LEAS.

Another level of epigenetic regulation is through miRNAs. In bovine mammary epithelium cells (MAC-T) infected with *S. aureus* a total of 231 miRNAs were detected, of which only four were unique to *S. aureus* (bta-miR-2339, miR-499, miR-23a and miR-99b) involved in processes such as transduction pathways, immune system and cell death (Jin et al., 2014). In this work we detected only 96 miRNAs expressed by bMECs in the presence of *S. aureus* (data no shown), which are different from those mentioned above, this can be attributed to the nature of the cells although these are preliminary results and it is necessary at least one other biological replica to confirm this data. In addition, infection increased the appearance of new miRNAs, highlighting the presence of miR-671, according with data base TargetScan Release 6.0 (<http://www.targetscan.org/>) which seems to have a relationship with the production of β -defensins, a group of antimicrobial peptides important in defense against pathogens. Also, the

miR-2285, miR-378, miR-2399-5p and miR-151-5p, related to cytokine expression, were detected in LEAS condition, although these data are preliminary and further analysis are required to confirm the expression levels of these miRNAs.

In addition to immunomodulation, another important point was to demonstrate the relationship between the internalization of *S. aureus* with the HDAC activity. LEAS do not affect the HDACs activity neither internalization (Fig. 2). However, due to the nature of the compounds of this extract it is necessary to evaluate the interactions with HAT, HTM and KDM and the possible relationship with the decrease in *S. aureus* internalization. This result suggests that LEAS induce global epigenetic changes in bMECs with or without challenged; however, is necessary demonstrate the relation with IIR gene such as defensins, cytokines and chemokines, and the bacteria internalization.

5. Conclusion

LEAS induces global changes of di and tri methylation on histone H3K9, which have been related with compaction of chromatin and could be associated with the anti-inflammatory effect. Also, LEAS induces the presence of miRNAs related with antimicrobial effects and epigenetic enzymes. However, is necessary more assays that reinforce this data. On the other hand, the effect of LEAS on inhibition of *S. aureus* internalization into bMECs is not related with HDACs activity, but nevertheless other epigenetic pathways should be evaluated. Take together the results of this work, we showed evidence that LEAS induces epigenetics modification to level of histones and induce modifications on miRNAs profile in bMECs.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

MBM was supported by a scholarship from CONACyT. This work was supported by grants from CONACyT (CB-2013-221363 and INFR-2014-230603) and CIC14.5 to JELM.

References

- Allis, C.D., Jenuwein, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500. doi:10.1038/nrg.2016.59
- Allis, D.C., Caparros, M.L., Jenuwein, T., Lachner, M., Reinberg, D., 2015. Overview and concepts. *Epigenetics*, Second edition Chapter 3. 47-105. ISBN:978-1-936113-59-0
- Allis, D.C., Jenuwein, T., Reinberg, D., 2007. Chapter 3: Overview and Concepts. *Epigenetics* 23–40. ISBN: 978-087969875-1
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.025
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 155, 324–331. doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.025
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdez-Alarcón, J.J., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81, 358–361. doi:10.1016/j.rvsc.2006.02.002
- Atalla, H., Gyles, C., Mallard, B., 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143, 319–328. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.030
- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., López-Meza, J.E., 2019. Lipid-Rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–10. doi:10.1155/2019/7083491
- Bayarsaihan, D., 2011. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J. Dent. Res.* 90, 9–17. doi:10.1177/0022034510378683

- Buchmann, K., 2014. Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. *Front. Immunol.* 5, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00459
- Byndloss, M.X., Tsohis, R.M., 2016. Chronic bacterial pathogens: Mechanisms of persistence, in: virulence mechanisms of bacterial pathogens. *Microbiol Spectr.* 4(2), 1-17.. doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0020-2015
- El Mansouri, F.E., Nebbaki, S.S., Kapoor, M., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Benderdour, M., Fahmi, H., 2014. Lysine-specific demethylase 1-mediated demethylation of histone H3 lysine 9 contributes to interleukin 1 β -induced microsomal prostaglandin E synthase 1 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 16, 1–15. doi:10.1186/ar4564
- Feil, R., Fraga, M.F., 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 97–109. doi:10.1038/nrg3142
- Foster, Timothy J, Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49-62. doi:10.1038/nrmicro3161
- Fraunholz, M., Sinha, B., 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1-10. doi:10.3389/fcimb.2012.00043
- Garzoni, C., Kelley, W.L., 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17, 59–65. doi:10.1016/j.tim.2008.11.005
- Grabiec, A.M., Potempa, J., 2018. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit. Rev. Microbiol.* 44(3), 336-350. doi:10.1080/1040841X.2017.1373063
- Grant, S.S., Hung, D.T., 2014. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence* 4, 273–283. doi:10.4161/viru.23987
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J.L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 113–122. doi:10.1016/j.vetimm.2007.09.007
- Hamon, M.A., Cossart, P., 2008. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe* 4, 100–109. doi:10.1016/j.chom.2008.07.009

- He, Y., Song, M., Zhang, Yi, Li, X., Song, J., Zhang, Yuan, Yu, Y., 2016. Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. BMC Genomics 17, 1–12. doi:10.1186/s12864-016-2947-00
- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Kapur, V., 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. PLoS One 2(10), e1120. doi:10.1371/journal.pone.0001120
- Iorio, M. V., Piovan, C., Croce, C.M., 2010. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: An intricate network. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 1799, 694–701. doi:10.1016/j.bbagr.2010.05.005
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E.M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., Guan, L.L., 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. BMC Genomics. 15(181), 1-16. doi:10.1186/1471-2164-15-181
- Jones, P. a, Baylin, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. Cell. doi:10.1016/j.cell.2007.01.029
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. Front. Immunol. 5, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Kerro Dego, O., van Dijk, J.E., Nederbragt, H., 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. Vet. Q. 24, 181–198. doi:10.1080/01652176.2002.9695135
- Lara-Zárate, L., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2011. *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. 51, 313–318. doi:10.1016/j.micpath.2011.07.010
- Lau, A.T.Y., Yu, F.-Y., Xu, Y.-M., 2019. Epigenetic effects of essential fatty acids. Curr. Pharmacol. Reports 5, 68–78. doi:10.1007/s40495-019-00166-9
- Lee, C.-C., Lin, Y.-H., Chang, W.-H., Lin, P.-C., Wu, Y.-C., Chang, J.-G., 2011. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. BMC Cancer. 1(58), 1-9. doi:10.1186/1471-2407-11-58
- Lee, J.Y., Ye, J., Gao, Z., Youn, H.S., Lee, W.H., Zhao, L., Sizemore, N., Hwang, D.H., 2003. Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. J. Biol. Chem. 278, 37041–37051. doi:10.1074/jbc.M305213200

- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673. doi:10.1038/nrg887
- Löffler, B., Tuscherr, L., Niemann, S., Peters, G., 2014. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 170–176. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.011
- Marmorstein, R., Zhou, M.M., 2015. Writers and Readers of histone acetylation: Structure, mechanism, and inhibition, *Epigenetics*. Second edition. Chapter 4. ISBN:978-1-936113-59-0
- Modak, R., Das Mitra, S., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar, M., Bhat, A. V, Bhuvana, M., Ghosh, S.K., Shome, B.R., 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, 1-15, . doi:10.1186/1868-7083-6-12
- Modak, R., Mitra, S. Das, Krishnamoorthy, P., Bhat, A., Banerjee, A., Gowsica, B.R., Bhuvana, M., Dhanikachalam, V., Natesan, K., Shome, R., Shome, B.R., Kundu, T.K., 2012. Histone H3K14 and H4K8 hyperacetylation is associated with *Escherichia coli* induced mastitis in mice. *Epigenetics* 7, 492–501. doi:10.4161/epi.19742
- Netea, M.G., 2013. Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 881–884. doi:10.1111/eci.12132
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–12. doi:10.3389/fendo.2018.00402
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog.* 47, 1–7. doi:10.1016/j.micpath.2009.04.006
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L.M., 2012. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.* 3, 1-17. doi:10.3389/fimmu.2012.00079
- Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J.W., Netea, M.G., 2014. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 29C, 1–7. doi:10.1016/j.coi.2014.02.006

- Romanick, S.S., Morrill, K., Hostler, A., Evans, L.W., Shen, Y., Matsumura, A., Piotrowski, H., Silva, L.G., Faciola, A.P., Ferguson, B.S., 2019. HDAC1/2-mediated regulation of JNK and ERK phosphorylation in bovine mammary epithelial cells in response to TNF- α . *J. Cell. Physiol.* 234, 1088–1098. doi:10.1002/jcp.27265
- Schauber, J., Oda, Y., Büchau, A.S., Yun, Q.C., Steinmeyer, A., Zügel, U., Bikle, D.D., Gallo, R.L., 2008. Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Invest. Dermatol.* 128, 816–824. doi:10.1038/sj.jid.5701102
- Schleimer, R.P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., Avila, P.C., 2007. Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1279–1284. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.046
- Seto, E., Yoshida, M., 2015. Epigenetic Erasers of histone acetylation. *Epigenetics*. Second edition. Chapter 5. ISBN:978-1-936113-59-0
- Silmon De Monerri, N.C., Kim, K., 2014. Pathogens hijack the epigenome: A new twist on host-pathogen interactions. *Am. J. Pathol.* 184, 897–911. doi:10.1016/j.ajpath.2013.12.022
- Silva, L.G., Ferguson, B.S., Avila, A.S., Faciola, A.P., 2018. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *J. Anim. Sci.* 96, 5244–5252. doi:10.1093/jas/sky373
- Song, M., He, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Li, X., Yu, Y., 2016. Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Sci. Rep.* 6, 1–15. doi:10.1038/srep29390
- Sonkoly, E., Ståhle, M., Pivarcsi, A., 2008. MicroRNAs: Novel regulators in skin inflammation. *Clin. Exp. Dermatol.* 33, 312–315. doi:10.1111/j.1365-2230.2008.02804.x
- Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., Sekerkova, A., 2014. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin. Sci.* 126, 593–612. doi:10.1042/CS20130497
- Sun, J., Aswath, K., Schroeder, S.G., Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sonstegard, T.S., 2015. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Genomics* 16, 1–10. doi:10.1186/s12864-015-2044-9
- Sundar, I.K., Rahman, I., 2011. Vitamin D and susceptibility of chronic lung diseases: Role of epigenetics. *Front. Pharmacol.* 2, 1–10. doi:10.3389/fphar.2011.00050

- Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T., Chaturvedi, M.M., Liu, M., Aggarwal, B.B., 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B α kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood*. 111, 4880 – 4891. doi:10.1182/blood-2007-10-117994
- Sunkara, L.T., Jiang, W., Zhang, G., 2012. Modulation of antimicrobial host defense peptide gene expression by free fatty acids. *PLoS One*. 7, e49558. doi:10.1371/journal.pone.0049558
- Zhao, K., Liang, G., Sun, X., Guan, L.L., 2016. Comparative miRNAome analysis revealed different miRNA expression profiles in bovine sera and exosomes. *BMC Genomics*. 17, 1–12. doi:10.1186/s12864-016-2962-1
- Zhou, V.W., Goren, A., Bernstein, B.E., 2011. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18. doi:10.1038/nrg2905

Figure captions

Figure 1. Lipid-rich extract from avocado seed induces modifications on H3K9 in bMECs challenged with *S. aureus*. The bMECs were treated for 24 h with LEAS (100 ng/mL) and then infected with *S. aureus* ATCC27543 for 2 h (MDI 30:1). **A)** The epigenetic modifications were analyzed by Western blot using specific antibodies against H3K9ac, H3K9me2 and H3K9me3 (Abcam). Histone 3 (H3) was used as control. The graphs represent the WB densitometric analysis of **B)** H3K9ac, **C)** H3K9me2 and **D)** H3K9me3. The WB were analyzed using the Image Studio Lite 5.2 Software LI-COR-Biosciences. Each band was normalized with the H3 load control with respect to vehicle (DMSO 0.1%). The results are the average of three independent experiments. The letters above the bars indicates a significant change ($P \leq 0.05$, *t*-student).

Figure 2. Epigenetic effects of LEAS are independent of HDACs activity in bMECs challenged with *S. aureus*. Arbitrary fluorescence units (AFU) of HDACs activity was determined by HDAC fluorometric cellular activity assay kit (fluor de lys). bMECs were treated by 2, 6, 12 and 24 h with LEAS (100 ng/mL), then cells were challenged with *S. aureus* for 2 h (MDI 30:1). The HDAC activity was measured by levels of substrate deacetylation after 4 h of incubation and then stimulation with development and lysis reagents by 15 min. The fluorescence was detected at Ex. 360 nm, Em 460 nm. Different letters above the bars indicate significant changes among the treatments evaluated ($P \leq 0.05$, Tukey-Kramer). Control of inhibition HDAC activity (TCA), vehicle (DMSO 0.1%).

Figure 3. LEAS inhibits *S. aureus* internalization into bMECs independently of HDACs. bMECs were treated for 24 h with LEAS (100 ng/mL), 30 min before infection trichostatin A (0.5 μ M) was added. Cells were infected with *S. aureus* for 2 h (MDI 30:1). Participation of HDACs during LEAS inhibition of internalization of *S. aureus* into bMECs is presented as the percentage of CFU recovered after the lysis of bMECs. The values were determined considering the vehicle (DMSO 0.1%) as 100% of internalization. The results are the average of one independent experiment performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). The «*» indicates significant changes ($P \leq 0.05$, *t*-student).

Figure 4. Profiling of small RNAs in bMECs pre-treated with LEAS and challenged with *S. aureus*. **A)** The relative abundance of different classes of small RNAs. **B)** Size and frequency distribution of detected miRbase (Sense) (19-40 nt).

Figure 5. Complexity of miRNAs detected in bMECs pre-treated with LEAS before and after challenged with *S. aureus*. **A)** Composition of miRNAs presents in each condition (vehicle, LEAS, vehicle + infection, and LEAS + infection). **B)** Principal component analysis of the total detected miRNAs in bMECs with or without infection. **C)** Venn diagram showing the profile of miRNAs expressed in each condition. Vehicle DMSO 0.1%.

Figure 1.

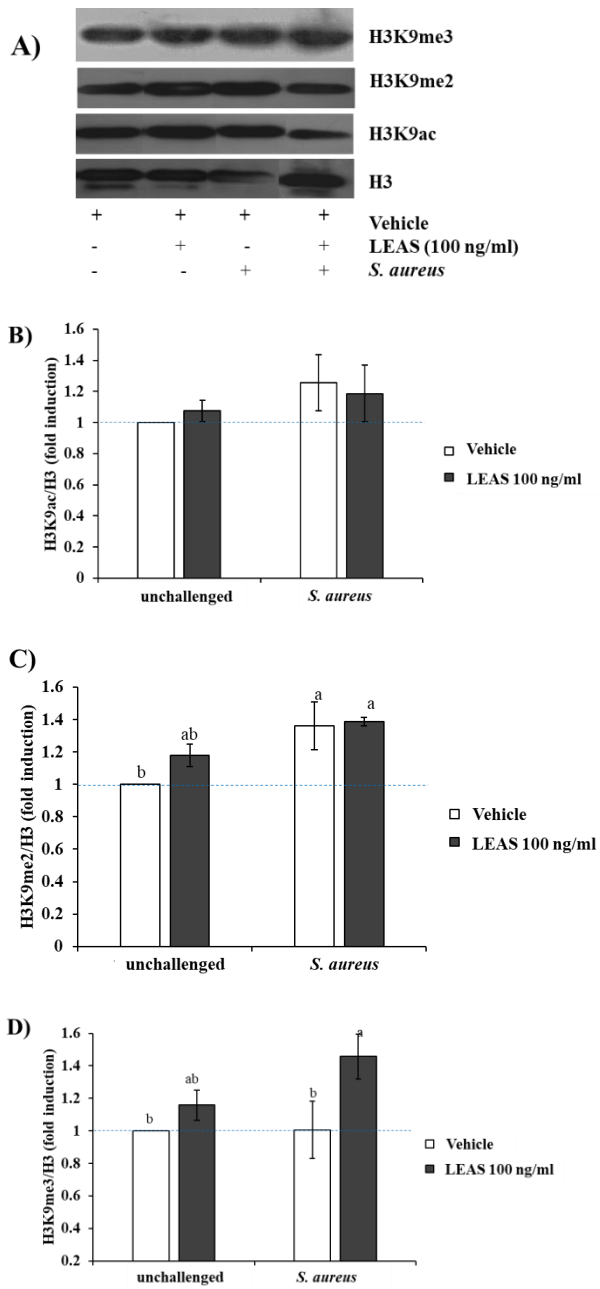


Figure 2.

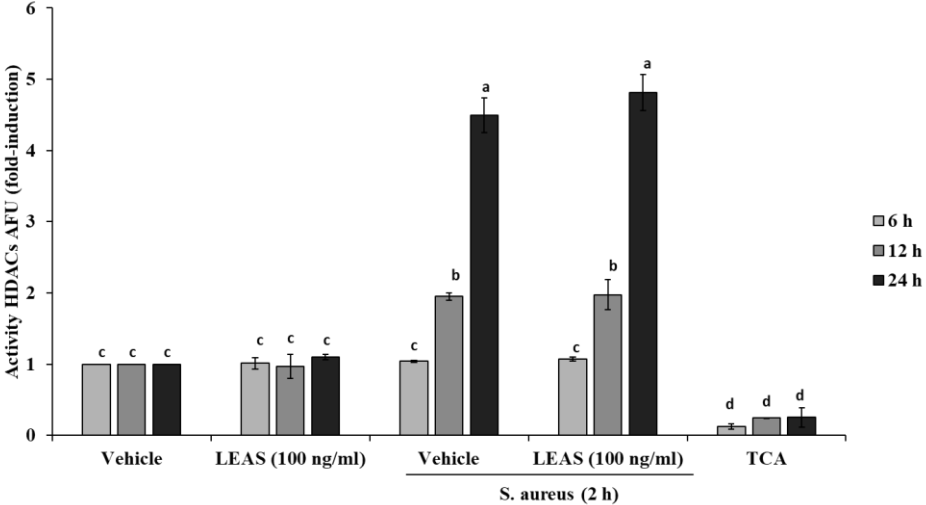


Figure 3.

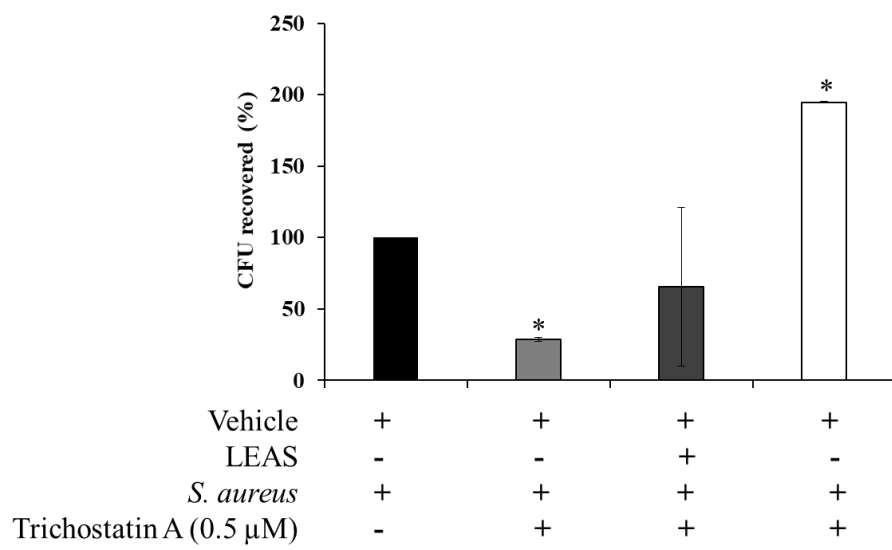
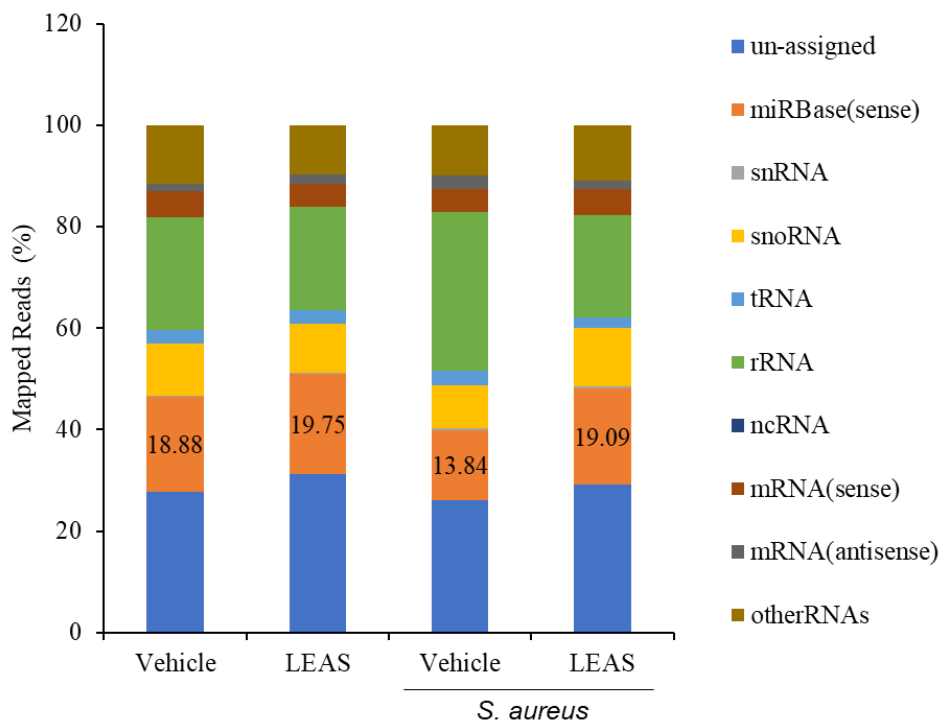


Figure 4.

A)



B)

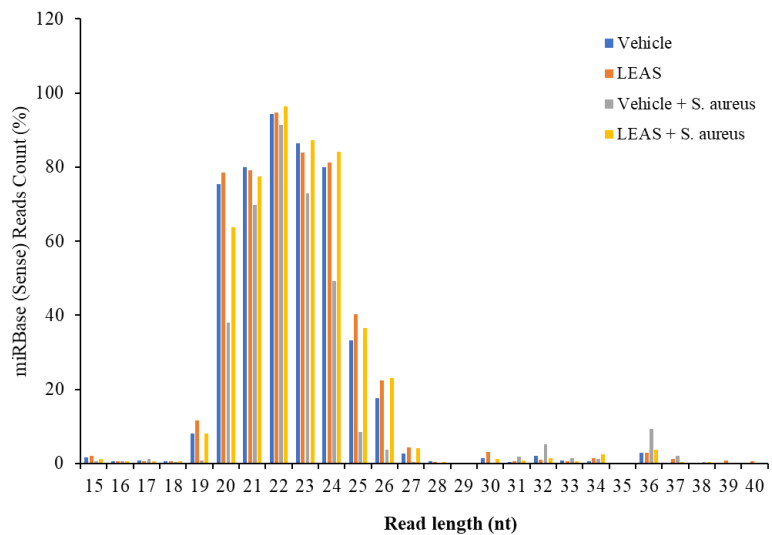


Figure 5.

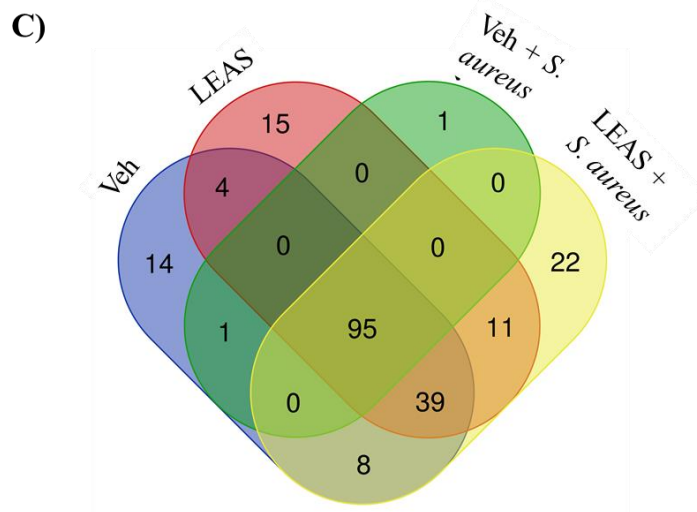
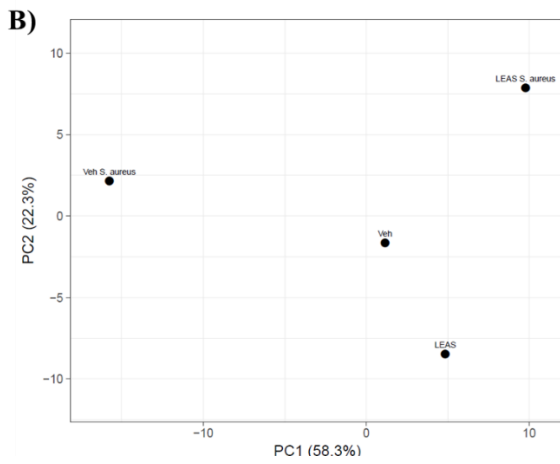
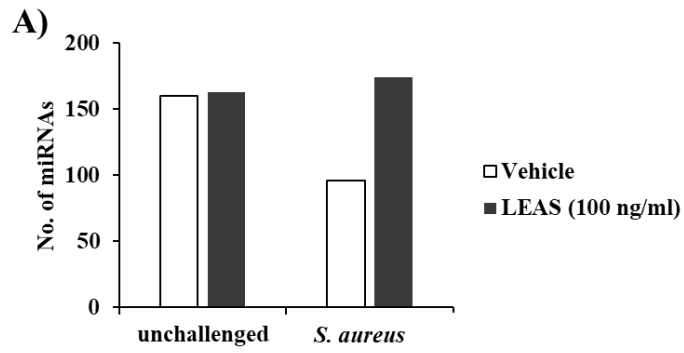


Table 1. Sequencing total reads

Sample	Reads Raw	Reads Adapter Found	Reads	% Reads
Vehicle	530677	510826	245897	46.3364721
LEAS	512594	478317	265330	51.7622134
Vehicle + <i>S. aureus</i>	296965	262525	101500	34.179112
LEAS + <i>S. aureus</i>	841244	798441	364971	43.3846779

Table 2. microRNA target prediction

MicroRNA	
name	Gene name
	Defensin, beta 106B
miR-671	Defensin, beta 106A Gamma-glutamylamine ciclotransferase
miR-2285	Phosphoserine phosphatase
	Histone cluster 2, H4b
miR-2419-5p	Phosphoseryl-tRNA kinase CD28 molecule
miR-378	Interferon, alpha-inducible protein 6 Interlukin 6 signal transducer
LEAS	Cytochrome p450
miR-2399-5p	Guanine nucleotide binding protein (G protein) Neutral cholesterol ester hydrolase 1 Chemokine (c-c motif) receptor like 2
	APH1A gamma secretase subunit
miR-151-5p	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1 (catalytic) Interlukin 1 receptor accesory protein-like 1
	Serin palmitoyltransferase, small subunit B
miR-450b	G protein-coupled receptor 37 Interlukin 23 receptor
miR-1246	Transmembrane protease, serine 11A Zinc finger protein 23
LEAS + <i>S. aureus</i>	miR-130 Interferon regulatory factor 1 Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta

Table 2. Continuation

	Nitric oxide synthase trafficking
miR-378	Suppressor of cytokine signaling 2 Interlukin 1, alpha
	G protein-coupled receptor 3
miR-193-5p	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatic, subfamily d, member 1 Protocadherins
miR-224	Histone 3, family 3B (H3.3B)
miR-874	Chemokine (c-c motif) ligand 28
	G protein-coupled receptor 6
miR-17-5p	Chemokine (c-c motif) ligand 1 Interlukin 25 interferon regulatory factor 9
	Reactive oxygen species modulator 1
miR-455-5p	Interferon regulatory factor 2
	H2A histone family, member y
miR-2285aa	Suppressor of cytokine signaling 1
	Interlukin 8
miR-2284ab	Chemokine (c-c motif) ligand 25
	CD28 molecule
miR-7863	Epithelial stromal interaction 1 (breast)
miR-2313-3p	Chemokine (c-x-c) ligand 3

VI.4. Capítulo 4 - Extracción y caracterización de la Kupandina de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*)

Marisol Báez-Magaña¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa¹, Lourdes Macías-Rodríguez², Yolanda García-Rodríguez³, Rafael Salgado-Garciglia², Joel Edmundo López-Meza¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

***Corresponding author. Tel/Fax: (52)-443-295-8029.**

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr, Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México. E-mail address: elmeza@umich.mx

Resumen

El aguacate nativo mexicano *Persea americana* var. *drymifolia* es una fuente de nutrientes y de fitomoléculas con propiedades medicinales para la salud humana, en especial la semilla del aguacate es una fuente rica de lípidos derivados de ácidos grasos llamados acetogeninas alifáticas. Las acetogeninas del aguacate se caracterizan por tener cadenas alifáticas insaturadas de 17, 19 o 21 carbonos, con grupos hidroxilos y pueden contener un grupo acetoxi en lugar del grupo carboxilo. Previamente se demostró que un extracto lipídico de semilla de aguacate (LEAS) rico en acetogeninas es capaz de inhibir la internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino, además de mostrar propiedades inmunomoduladoras y epigenéticas. Para determinar si la acetogenina mayoritaria en LEAS es la responsable de inhibir la internalización de *S. aureus* y de inducir modificaciones epigenéticas e inmunomoduladoras, se realizó la purificación y caracterización de esta molécula. En este trabajo se describen las condiciones de purificación y caracterización de la acetogenina mayoritaria presente en LEAS, la cual fue llamada kupandina (derivada de kupanda: aguacate en purépecha).

Abstract

Native Mexican Avocado *Persea americana* var. *drymifolia* is a source of nutrients and phytochemicals with medicinal properties for human health, especially the avocado seed is a source rich in molecules derived from fatty acids called aliphatic acetogenins. Acetogenins from avocado are characterized by unsaturated aliphatic chains of 17, 19 or 21 carbons, with hydroxyl groups and an acetoxy group instead of carboxyl group. Previously, it was shown that a lipid-rich avocado seed (LEAS) rich in acetogenins inhibited *S. aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. In addition, LEAS showed immunomodulatory and epigenetic properties. To determine if the most abundant acetogenin present in LEAS is responsible of regulates *S. aureus* internalization and also epigenetic and immunomodulatory modifications in bMECs, the purification and characterization of majority acetogenin was performed. This work describes conditions for purification and characterization of most abundant acetogenin present in LEAS, which was called kupandin (from kupanda: avocado in purépecha).

1. Introducción

Dentro de la familia de las Laureaceae se encuentra el género *Persea*, el cual apareció en las cadenas montañosas de la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre occidental ubicadas en el centro de México, durante el paleógeno. En el género *Persea* se encuentran dos subgéneros de gran importancia económica de donde provienen los cultivares de aguacate, *Persea schideana* Ness y *Persea americana* Mill. Dentro del subgénero *Persea americana* se encuentran las principales variedades botánicas de aguacate *P. americana* var. *drymifolia* y *P. americana* var. *guatemalensis* (Scora and Bergh, 1990). La variedad de aguacate nativo mexicano *P. americana* var. *drymifolia* es de los cultivares más antiguos en México y del cual se tienen reportes del consumo humano de sus frutos que datan de al menos 8000 años, muchas de las variantes comerciales que se consumen actualmente en todo el mundo provienen de este cultivar, debido a su resistencia a climas fríos, las características organolépticas que aporta, así como su alto contenido de acetites (Scora and Bergh, 1990; Galindo-Tovar et al., 2008).

Desde épocas prehispánicas en México el aguacate es parte importante de la cultura siendo relevante para la dieta humana por su valor alimenticio, y también para el tratamiento de diversas afecciones (Landon, 2009). Actualmente México es el primer productor de aguacate a nivel mundial, en México la producción de aguacate en el año 2018 fue de aproximadamente 6 mil millones de toneladas, siendo el estado de Michoacán el principal productor (Secretaría de Agricultura y Desarrollo rural y Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera, 2019).

La principal característica del aguacate es su alto contenido en lípidos, el ácido oleico (C18:1), representa más de la mitad de los ácidos grasos insaturados presentes en la pulpa y semilla además de otros 22 ácidos grasos más. También, es rico en derivados de ácidos grasos llamados acetogeninas (Ibarra-Laclette et al., 2015). Las acetogeninas provienen de la ruta de síntesis de los ácidos grasos de cadena larga, la estructura base es el ácido linolénico, aunque las acetogeninas se caracterizan por presentar cadenas de carbonos impares 17, 19 y 21 carbonos con algunas insaturaciones y un grupo acetoxi en lugar del carboxilo terminal, otra característica distintiva es la presencia de grupos hidroxilo (OH) o furanos a lo largo de la cadena (Rodríguez-Saona et al., 1998; Wang et al., 2004; Rodríguez-López et al., 2017). Las variedades de aguacate nativas se caracterizan por presentar un alto contenido de estas biomoléculas, aunque la proporción varía de acuerdo al estado de madurez del fruto, así como el tejido en el que se

encuentran, en la pulpa y la semilla la cantidad de acetogeninas disminuye en proporción al estado de madurez; sin embargo, en la semilla la cantidad de acetogeninas generalmente es constante, una hipótesis es que estas biomoléculas cumplen funciones de protección y de reservorios de energía (Rodríguez-López et al., 2015; Rodríguez-López et al., 2017).

En la semilla la cantidad de acetogeninas encontradas varía entre 1.09-8.3 mg/g de peso fresco, siendo las acetogeninas C17 las más abundantes (Rodríguez-López et al., 2015). La importancia de estas moléculas ha destacado en los últimos años por su valor medicinal. Las acetogeninas han demostrado presentar gran versatilidad por sus efectos antimicrobianos contra *Clostridium sporongenes* y *Listeria monocytogenes* (Salinas-Salazar et al., 2016; Pacheco et al., 2017), citotóxicas contra células de cáncer oral humano (D'Ambrosio et al., 2011), cáncer de colon (Lara-Márquez, 2015), cáncer de mama (Butt et al., 2006; Brooke et al., 2011), leucemia (Lee et al., 2015) y cardiomiocitos de ratón (Silva-Platas et al., 2012), actividad antioxidante *in vitro* (Rodríguez-Sánchez et al., 2013), antiinflamatorias en modelos de dermatitis (Otuki et al., 2011; Rosenblat et al., 2011). En nuestro grupo de trabajo se reportó la actividad inmunomoduladora y epigenética de un extracto lipídico de semilla de aguacate (DLCL) rico en acetogeninas en un modelo de interacción hospedero-patógeno. DLCL inhibió la adhesión e internalización de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino y moduló la respuesta inmune de éstas (Báez-Magaña et al., 2019).

2. Materiales y métodos

Muestra biológica

Las semillas de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) de frutos en estado de madurez fisiológica utilizadas para este estudio se colectaron en la región de Tingambato, Michoacán, México.

Obtención del extracto de semilla de aguacate nativo mexicano (Persea americana var. drymifolia)

Los frutos de aguacate se congelaron en nitrógeno líquido durante varios minutos (10 min. aproximadamente). Después se separó la semilla de la pulpa, las cuales congeladas fueron trituradas hasta convertirlas en polvo. Para la obtención del extracto, la semilla se colocó en un equipo Soxhlet, en reflujo durante 14 h a 50°C utilizando como solvente hexano (evitando la

ebullición del solvente). Después el extracto fue filtrado con papel Whatman y el extracto filtrado se colocó a -18°C toda la noche para llevar a cabo la precipitación de los cristales. Los cristales recuperados se secaron con nitrógeno gaseoso, este precipitado es llamado extracto rico en derivados lipídicos de cadena larga (DLCL) (Rosenblat et al. 2011).

Purificación de la kupandina por cromatografía en columna

Para llevar a cabo la purificación de la acetogenina mayoritaria (kupandina) se disolvieron 25 mg del extracto seco (DLCL) en 5 ml de hexano. Se preparó una columna de cristal de 1x 24 pulgadas, la cual fue empaquetada con 45 g de gel de sílice y equilibrada usando la siguiente mezcla de solventes: hexano, isopropanol, acetato de etilo, ácido acético (40:20:5:1). Las condiciones de corrida utilizadas fueron las siguientes: Velocidad de goteo: 60 gotas/min, volumen inicial: 50 ml, fracciones recuperadas: 14 fracciones de 3 ml c/u volumen final: 50 ml. Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas con cromatografía en capa fina (TLC) usando la mezcla de solventes descrita anteriormente, el revelado de la TLC se realizó usando yodo sublimado.

Derivatización de la kupandina

Las fracciones recuperadas se colocaron en un Reacti-vial que se secó con nitrógeno gaseoso, después se adicionaron 100 μL de diclorometano y 1 mL de NaOH 0.5 N en metanol, el vial se calentó a 90°C durante 10 min y se dejó enfriar hasta 30°C aproximadamente, después se adicionó 1 ml de trifluoruro de boro en metanol y se calentó hasta 90°C durante 10 min y después se dejó enfriar hasta 30°C . Con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfirió toda la muestra del Reacti-vial a un tubo de ensaye (“tubo 1”). A continuación, se adicionó 1 ml de hexano y se agitó vigorosamente en un vortex. La fase superior se transfirió a un tubo de ensaye nuevo (“tubo 2”). Después se adicionó 1 ml de hexano al tubo 2 y se agitó en vortex, nuevamente la fase superior se transfirió a un nuevo tubo de ensaye y se agregó 1 mL de agua destilada, la fase superior se pasó a través de una columna (Poly-prep, Chromatography columns) rellena con NaSO_4 , la fase orgánica fue recuperada en un tubo nuevo, el cual se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Identificación de la kupandina por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Se inyectó 1 μL de la muestra derivatizada (1 mg/mL) tipo split (1:20) en un cromatógrafo (Agilent 7890B; Agilent, Foster City, CA, USA). La corrida se realizó con las siguientes condiciones: Temperatura del inyector, 270°C; temperatura del detector, 300°C. Las condiciones de operación del horno fueron las siguientes: La temperatura inicial fue de 150°C por 3 min, con un incremento gradual de 5°C por minuto hasta 278°C mantenida por 12 minutos (tiempo total de 40.6 minutos), post-corrida a 300°C por 3 minutos. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, “Chem Station” Agilent Technologies Rev. D.04.00 (2002). Para la cuantificación se utilizó el estándar metil ester octadecanoato.

3. Resultados y discusión

Análisis de la composición química del precipitado del extracto hexánico de semilla de aguacate

La obtención del precipitado del extracto hexánico de semilla de aguacate se realizó de acuerdo al método reportado por Rosenblat et al. 2011, del cual se obtuvieron cristales ricos en ácidos grasos y acetogeninas obteniendo un rendimiento del 0.2%. La composición de este extracto se analizó por CG-EM. Se lograron identificar dos grupos de moléculas, el grupo más abundante fueron las acetogeninas y en segundo lugar se encontraron los ácidos grasos de cadena larga, la composición química y abundancia se muestran en la Tabla 1.

*Purificación de la kupandina de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) por cromatografía en columna*

A partir de un extracto hexánico precipitado de semilla de aguacate se realizó la purificación de la kupandina, la cual es la acetogenina más abundante en este extracto (Tabla 1). Por TLC se identificó una banda enriquecida en la fracción 13 con un factor de retención (FR) de 0.53 (fig.1) similar al FR de metilheptadecanoato. Esta banda fue recolectada y analizada posteriormente por CG-EM.

Identificación de la kupandina de semilla de aguacate nativo mexicano (Persea americana var. drymifolia) por CG-EM

La fracción 13 fue analizada por CG-EM, para lo cual se realizó la preparación de la muestra utilizando el método para la derivatización de ácidos grasos descrito anteriormente. La fracción 13 fue analizada por CG-EM y se demostró que la kupandina fue la molécula mayoritaria, presentando una abundancia de 75%, ya que fue el pico mayoritario con un tiempo de retención de 17.17, el resto de los componentes de esta fracción correspondieron a otras acetogeninas (Fig. 2). La kupandina es una acetogenina con una cadena alifática de 17C y un peso molecular de 326 g/mol, aunque el nombre químico, así como la estructura no se muestran en este trabajo por cuestión de protección para una futura patente.

4. Conclusión

La semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) es rica en acetogeninas. Además, se purificó e identificó la acetogenina más abundante, la cual fue llamada kupandina.

Referencias

- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., López-Meza, J.E., 2019. Lipid-Rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–10. doi:10.1155/2019/7083491
- Bayarsaihan, D., 2011. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J. Dent. Res.* 90, 9–17. doi:10.1155/2019/7083491
- Brooke, D.G., Shelley, E.J., Roberts, C.G., Denny, W.A., Sutherland, R.L., Butt, A.J., 2011. Synthesis and in vitro evaluation of analogues of avocado-produced toxin (+)-(R)-persin in human breast cancer cells. *Bioorganic Med. Chem.* 19, 7033–7043. doi:10.1016/j.bmc.2011.10.006
- Butt, A.J., Roberts, C.G., Seawright, A.A., Oelrichs, P.B., Macleod, J.K., Liaw, T.Y.E., Kavallaris, M., Somers-edgar, T.J., Lehrbach, G.M., Watts, C.K., Sutherland, R.L., 2006. A

novel plant toxin, persin, with *in vivo* activity in the mammary gland, induces Bim-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2300–2310. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0170

D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., 2011. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 465–469. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.027

Galindo-Tovar, M.E., Ogata-Aguilar, N., Arzate-Fernández, A.M., 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55, 441–450. doi:10.1007/s10722-007-9250-5

Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C.A., Albert, V.A., Mockaitis, K., Kilaru, A., López-Gómez, R., Cervantes-Luevano, J.I., Herrera-Estrella, L., 2015. Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics* 16, 1–18. doi:10.1186/s12864-015-1775-y

Landon, A.J., 2009. Domestication and significance of *Persea americana*, the avocado, in Mesoamerica. *Avocado. Nebraska Anthropol.* 24, 62–79. <http://digitalcommons.unl.edu/nebanthro/47>

Lee, E.A., Angka, L., Rota, S., Hanlon, T., Mitchell, A., Hurren, R., Wang, X.M., Gronda, M., Boyaci, E., Bojko, B., Minden, M., Sriskanthadevan, S., Datti, A., Wrana, J.L., Edginton, A., Pawliszyn, J., Joseph, J.W., Quadriatero, J., Schimmer, A.D., Spagnuolo, P.A., 2015. Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Res.* 75, 2478–2489. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2676

Lara-Márquez, M. 2015. Efectos citotóxicos de los ácidos grasos y derivados de los ácidos grasos sobre células cancerosas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 63 pp.

Otuki, M.F., Schwob, O., Silveira Prudente, A., Zaltsman, I., Meretski, S., Segal, J., Yedgar, S., Rosenblat, G., 2011. Attenuation of experimental TPA-induced dermatitis by acetylenic acetogenins is associated with inhibition of PLA 2 activity. *Eur. J. Pharmacol.* 672, 175–179. doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.184

Pacheco, A., Rodríguez-Sánchez, D.G., Villarreal-Lara, R., Navarro-Silva, J.M., Senés-Guerrero, C., Hernández-Brenes, C., 2017. Stability of the antimicrobial activity of acetogenins

from avocado seed, under common food processing conditions, against *Clostridium sporogenes* vegetative cell growth and endospore germination. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 2311-2323. doi:10.1111/ijfs.13513

Rodríguez-Lopez, C.E., Hernández-Brenes, C., de la Garza, R.I.D., 2015. A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Rsc Adv.* 5, 106019–106029. doi:10.1039/C5RA22854A

Rodríguez-López, C.E., Hernández-Brenes, C., Treviño, V., Díaz de la Garza, R.I., 2017. Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed. *BMC Plant Biol.* 17, 9–12. doi:10.1186/s12870-017-1103-6

Rodríguez-Sánchez, D., Silva-Platas, C., Rojo, R.P., García, N., Cisneros-Zevallos, L., García-Rivas, G., Hernández-Brenes, C., 2013. Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*). *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 942–943, 37–45. doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.013

Rodríguez-Saona, C., Millar, J.G., Trumble, J.T., 1998. Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. *J. Nat. Prod.* 61, 1168–1170. doi:10.1021/np980127q

Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., Hochberg, M., 2011. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 239–246. doi:10.1007/s00403-010-1088-6

Salinas-Salazar, C., Hernández-Brenes, C., Rodríguez-Sánchez, D., Castillo, E., Navarro-Silva, J., Pacheco, A., 2016. Inhibitory activity of avocado seed fatty acid derivatives (acetogenins) against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol. Saf.* 82, 134-144 . doi:10.1111/1750-3841.13553

Scora, R.W., Bergh, B., 1990. The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana*) Mill. Lauraceae. *Acta Hort.* 275, 387–394. doi:10.17660/ActaHortic.1990.275.47

Secretaría de Agricultura y Desarrollo rural, (SADER), Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera, (SIAP), 2019. Boletín mensual de producción Aguacate.

Silva-Platas, C., García, N., Fernández-Sada, E., Dávila, D., Hernández-Brenes, C., Rodríguez, D., García-Rivas, G., 2012. Cardiotoxicity of acetogenins from *Persea americana* occurs

through the mitochondrial permeability transition pore and caspase-dependent apoptosis pathways. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 461–471. doi:10.1007/s10863-012-9452-1

Wang, X., Beno-Moualem, D., Kobilier, I., Leikin-Frenkel, A., Lichter, A., Prusky, D., 2004. Expression of $\Delta 12$ fatty acid desaturase during the induced accumulation of the antifungal diene in avocado fruits. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00249.X

FIGURAS

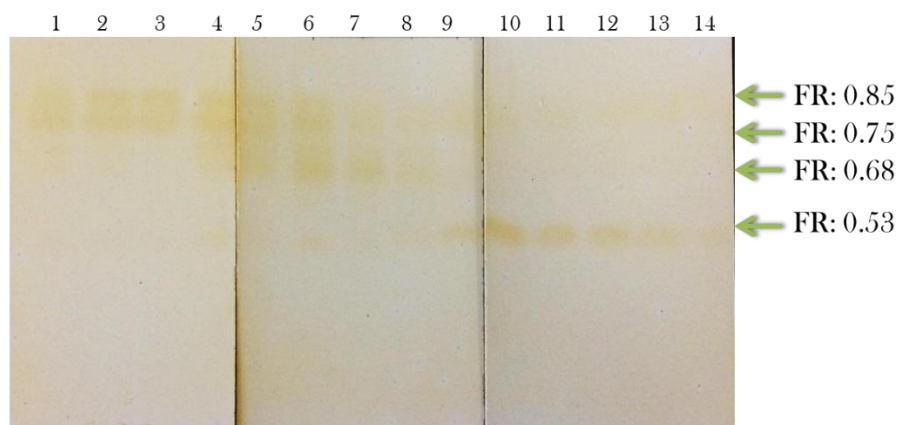


Figura 1. Cromatografía en capa fina (TLC) de la purificación de la kupandina. La purificación se realizó por cromatografía en columna como se describe en materiales y métodos, para visualizar la composición de las fracciones recuperadas se corrieron en placas de gel de sílice usando la mezcla de solventes hexano, acetato de etilo, isopropanol, ácido acético (40:20:5:1), las placas secas fueron reveladas con yodo sublimado y se reportaron los valores de FR para cada banda, el valor de RF 0.53 corresponde a la kupandina.

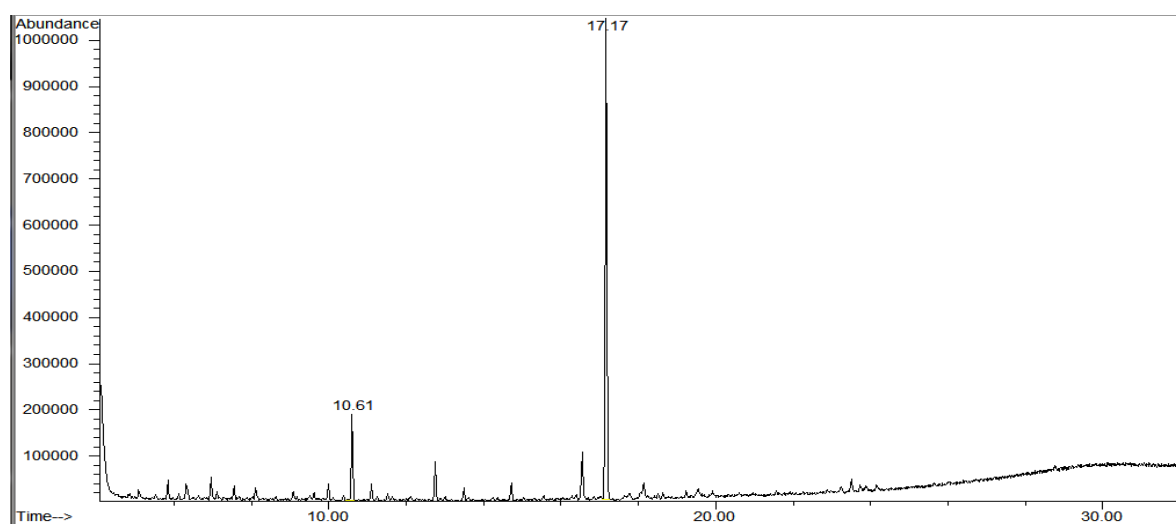


Figura 2. Cromatograma de la kupandina obtenido por CG-EM. El cromatograma corresponde a la fracción 13 obtenida por cromatografía en columna. El pico mayoritario corresponde al tiempo de retención de 17.17, con una altura de 1037758, un área de 30626612 y una abundancia de 75.38.

Tabla 1. Composición química del precipitado del extracto hexánico de semilla de aguacate *Persea americana* var. *drymifolia*

Grupo	Compuesto	Contenido ($\mu\text{g/g}$)
Derivados de ácidos grasos alifáticos (acetogeninas)	Avocatinas	32.28
	Persinas	10.12
	Pahuatinas	4.26
	Alcoholes grasos polihidroxiados	24.26
Ácidos grasos de cadena larga	Ácido mirístico	2.49
	Ácido palmítico	7.1
	Ácido linoleico	4.06
	Ácido oleico	5.32
	Ácido esteárico	5.06
	Ácido alquídico	2.39
	Ácido erúcico	2.44
	Ácido behemenico	3.63
	Ácido nervónico	2.88
Ácido tetracosanoico	4.29	

VI.5. Capítulo 5 – The Kupandin from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) regulates the innate immune response in bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization

Marisol Báez-Magaña¹, Alejandra Ochoa-Zarzosa¹, Rafael Salgado-Garciglia², Joel Edmundo López-Meza¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

²Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México.

***Corresponding author. Tel/Fax: (52)-443-295-8029.**

E-mail address: elmeza@umich.mx (J.E. López-Meza)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carr, Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México. E-mail address: elmeza@umich.mx

Abstract

Avocado seed is a rich source of phytochemicals with a wide range of effects on health. Acetogenins are molecules derivatives from long-chain fatty acids present only in Annonaceae and Lauraceae (avocado) plant families. Avocado acetogenins are conformed by aliphatic chains of 17, 19 and 21-carbons, being acetogenins 17C the most abundant in seed, which have cytotoxic, antimicrobial and anti-inflammatory properties. Previously we showed that a lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) or LEAS is rich in acetogenins C17 and has immunomodulatory effects, because improved the immune innate response (IIR) of bovine mammary epithelial cells (bMECs) and inhibited the adhesion and invasion of *Staphylococcus aureus*. This bacterium is the principal pathogen that cause

subclinical bovine mastitis, which is a persistent and chronic infection. In this work we isolated the molecule responsible of the LEAS effects, which was denominated kupandin, an acetogenin 17C. Kupandin inhibits *S. aureus* adhesion and invasion into bMECs in a similar manner to LEAS. Also, conditioned media from bMECs stimulated with kupandin inhibited the *S. aureus* growth ~40%, which correlated with an increase in the production of nitric oxide. Likewise, kupandin increased the expression of anti-inflammatory interleukin IL-10 ~1.8 and 12-fold before and after infection, respectively. Besides, kupandin induce epigenetic changes on histone H3K9 decreasing its acetylation and trimethylation (~0.2 and ~0.4-folds, respectively), also HDACs activity increased the *S. aureus* internalization into bMECs by kupandin effects. These results suggest that kupandin improve the IIR of bMECs against bacterial pathogens and shown anti-inflammatory properties in this host-pathogen model. To our knowledge, this is the first report of an avocado acetogenin with epigenetic modulation properties.

Key words: *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, immune innate response, avocado seed, acetogenin.

1. Introduction

Immune innate response (IIR) is the first defense of organisms, that involves different cell types such as professional phagocytes (macrophages, neutrophils, dendritic cells, natural killer cells, etc.) and non-professional phagocytes (epithelial, fibroblast, endothelium) (Flannagan et al., 2012; Striz et al., 2014). These cells are producers of cytokines, chemokines (chemotactic, inflammatory activity), antimicrobial peptides, reactive nitrogen species (RNS), reactive oxygen species (ROS) and others, whose principal objective is the pathogen elimination and recovering the organism homeostasis (Gallo and Hooper, 2012; Cavaillon, 2015).

Staphylococcus aureus is an intracellular facultative bacterium that avoid the action of the immune response of the host, therefore the pathogen survive for long time inside the host cell (Garzoni and Kelley, 2009, 2011). Internalization is considered a key step in the establishment of chronic and persistent infections in humans and animals. In subclinical bovine mastitis, *S. aureus* is the main infectious agent associated with this disease. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) have an important role during *S. aureus* infection (Herron-Olson et al., 2007;

Atalla et al., 2010; Rinaldi et al., 2010). *S. aureus* is recognized by bMECs through TLR2 receptor, which trigger phosphorylation of p38 (MAPKs), activation of transcriptional factors and induction of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and beta-defensins (Ochoa-Zarzosa et al., 2009; Alva-Murillo et al., 2015). Additionally, *S. aureus* modulate the host's immune response through hijacking or mimicry different elements, for example the epigenetic machinery (Vanselow et al., 2006; Modak et al., 2014; Romilly et al., 2014; Song et al., 2016b). The epigenetic modifications evaluated during bovine mastitis include methylation and acetylation on histones tail, principally in lysine residues; also modifications of miRNA profiles have been addressed (Jin et al., 2014; Modak et al., 2014; He et al., 2016; Zhao et al., 2016). In a mastitis mice model, *S. aureus* induced acetylation on H3K9ac and H3K14ac affecting the gene expression of antimicrobial peptide cathelicidin, these epigenetic modifications could be a *S. aureus* strategy to affect host's immune response and thus guarantee the success of infection (Modak et al., 2014). All these elements evidence the complexity of interaction between *S. aureus*-bMEC; however, this knowledge opens the door to search new therapies.

In this sense, our work group has focused on the search of chemical compounds that inhibit the *S. aureus* internalization into bMECs and regulate the IIR, thus promoting the cell self-defense through the expression of cytokines, antimicrobial peptides and reactive oxygen or nitrogen species (Télez-Pérez et al., 2012b; Alva-Murillo et al., 2017). We previously reported that the pre-treatment for 24 h of bMECs with a lipid-rich avocado extract (LEAS) (100 ng/mL) inhibited the *S. aureus* internalization by up to ~80%. Also, conditioned media of bMECs treated with LEAS decreased *S. aureus* adhesion in bMECs ~40%, and affected *S. aureus* viability. In addition, LEAS inhibited the gene expression of TNF- α (~0.5-fold), but increased the expression of IL-10 (~21-fold) and BNBD5 (bovine neutrophil beta defensin 5) (~4-fold) (Báez-Magaña et al., 2019). Furthermore, LEAS could be an epigenetic modulator due that increased the di- and tri- methylation of H3K9, as well as modified the microRNAs profiles related to the anti-inflammatory response.

LEAS from Mexican native avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) is a mixture of long chain fatty acids among them palmitic acid, oleic acid and linoleic acid, also presents in avocado oil (Báez-Magaña et al., 2019). However, LEAS has a higher proportion of fatty acid derivatives known as acetogenins, which are essentially found in the primitive angiosperms Annonaceae (ca. *Annona*) and Lauraceae (ca. avocado) families. Acetogenins have as precursor palmitic acid

and they have been attributed roles of energy storage and protection against fungus (Wang et al., 2004; Rodríguez-López et al., 2017). Avocado acetogenins are characterized for an aliphatic chain conformed by an impar number of carbons (17, 19 and 21), also some them have furans rings inside the chain and have as distinctive characteristic the presence of hydroxyl and acetoxy groups (Rodríguez-López et al., 2017). In avocado, acetogenins are synthesized in the mesocarp and endocarp and can be stored in oleosomes. Different reports have showed that native varieties of avocado show a major proportion of acetogenins than commercial varieties (Rodríguez-Saona et al., 1998; Rodríguez-López et al., 2015; Rodríguez-López et al., 2017). Avocado acetogenins have antimicrobial, cytotoxic properties against cancer cell lines and anti-inflammatory effects in human keratinocytes damaged by UV (D'Ambrosio et al., 2011; Rosenblat et al., 2011; Pacheco et al., 2017). In this study, we purified an acetogenin named kupandin, which is the major component in LEAS. Kupandin chemical characteristics are similar to other lipids derivates from vegetal origin like anacardic acid (potent inhibitor of histone acetyl transferase) and squamocin (induce phosphorylations on histone 3), which suggest that could be an epigenetic modulator (Lee et al., 2011; Sung et al., 2015). The aim of this work was to demonstrate that kupandin is the responsible of the *S. aureus* internalization inhibition into bMECs. Also, kupandin effects on the IIR and global epigenetic modifications were tested.

2. Materials and Methods

2.1. Purification and extraction of kupandin from avocado seed

Mexican avocado fruits (*Persea americana* var. *drymifolia*) used in this study were collected at physiological maturity. LEAS was obtained according to reported by Báez-Magaña et al (2019). Kupandin was purified by column chromatography using the following conditions: A 1 x 24-inch glass column was packed with 45 g of silica gel and was equilibrated using the following solvent mixture: hexane, isopropanol, ethyl acetate, acetic acid (40:20:5:1), with a drip speed of 60 drops per minute and an initial volume of 50 ml. Fractions of 3 ml were recovered and analyzed by Thin-layer chromatography (TLC) using the mix of solvents previously described. Kupandin was detected in the fraction 13. Kupandin structure was determined by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Kupandin is formed by an aliphatic chain of 17 carbons, with two -OH groups, one group acetoxy and two double bonds. Kupandin

is the majority LEAs compound a has a molecular weight of 326g/mol, and was dissolved in DMSO 5%, for biological assays. Concentrations of kupandin were determined according with proportion found in LEAS. Kupandin 66 nM is equivalent to 100 ng/mL of LEAS.

2.2. *Staphylococcus aureus* strain

S. aureus subsp. *aureus* (ATCC27543) strain was used in this study. This strain was isolated from a case of bovine mastitis and has the capability of internalize into bMECs (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). Bacteria were grown overnight in Luria-Bertani broth (LB, Bioxon, Mexico). For the different assays the colony forming units (CFU) were adjusted by measuring their optical density at 590 nm ($OD\ 0.2=9.2 \times 10^7$ CFU/mL).

2.3. Primary culture bovine mammary epithelial cells (bMEC)

bMECs were isolated of alveolar tissue from udders of healthy lactating cows as described (Anaya-López et al., 2006). Cells from passages 2-8 were used in all of the experiments. The bMECs were cultured in growth medium (GM) that was composed of a DMEM medium/nutrient mixture F12 Ham (DMEM/F12, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest), 10 µg/mL insulin (Sigma), 5 mg/mL hydrocortisone (Sigma), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 1 µg/mL amphotericin B (Sigma). The cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

2.4. Effect of kupandin on *S. aureus* 27546 growth and bMEC viability

The effect of kupandin on *S. aureus* growth was determined by turbidimetry assay. For this, 9×10^7 CFU/mL were cultured at 37°C in LB broth supplemented with different concentrations of kupandin (0.66-132 nM) and growth was monitored turbidimetrically (590 nm) at 2, 6, 12 and 24 h.

To analyze the effect of kupandin on bMEC viability, 1×10^4 cells were incubated with the kupandin (0.66-132 nM) during 24-48 h at 37°C in a 96-well flat-bottom plates in incomplete growth medium (without antibiotics and serum). Further, cells were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and resuspended in a 1:1 dilution with Trypan Blue solution 0.4% (Sigma) and incubated 3 minutes. Finally, nonviable and viable cells were counted in a hemocytometer.

2.5. Effect of kupandin on *S. aureus* 27543 adhesion and internalization into bMECs

Gentamicin protection assay were carried out using bMECs polarized monolayers ($\sim 2 \times 10^5$ cells) cultured in 24 well dishes with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma) as described (Ochoa-Zarzosa et al., 2009). bMECs were incubated with different concentrations of kupandin (0.66-132 nM) in DMEM/F12 media (Sigma) without antibiotics and serum for 24 h and then were infected with *S. aureus* (MOI 30:1 bacteria per cell). For this, the bMECs were inoculated with bacterial suspensions (9.2×10^7 CFU/mL) and incubated for 2 h in 5 % CO_2 at 37°C. Afterward, bMECs were washed three times with PBS (pH 7.4) and incubated with incomplete medium supplemented with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin for 1 h at 37°C to eliminate extracellular bacteria. Finally, bMECs monolayers were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and lysed with 250 μL of sterile distilled water. bMECs lysates were diluted 100-fold, plated on LB agar and Petri dishes were incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to control vehicle (DMSO 0.1%).

To determine the kupandin effect on *S. aureus* adhesion in bMECs, cells were cultured and treated as described above but the gentamicin treatment was omitted. Data are presented as the percentage of adhesion in relation to control (bMECs treated with vehicle).

2.6. *Staphylococcus aureus* viability in bMECs conditioned media

To evaluate *S. aureus* survival in conditioned media, bMECs were cultured ($\sim 2 \times 10^5$ cells) in 24 well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma). Then, bMECs were treatment with kupandin (66 nM) which is equivalent to 100 ng/mL of LEAS, for 24 h and the culture medium was recovered. Next, conditioned media were inoculated with *S. aureus* suspension (9.2×10^7 CFU/mL) and incubated for 2 h at 37°C and 180 rpm. Finally, a dilution of the conditioned medium was made (1:1000), plated on LB agar and incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determine by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to control (bMECs treated with vehicle).

2.7. RNA isolation and innate immune response gene expression analysis

To analyze the effects of kupandin (66 nM) and/or *S. aureus* on the expression of IIR genes of bMECs, monolayers of cells that were cultured in 6 well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma) were incubated with kupandin (0.66-132 nM) (24 h) and/or *S. aureus* for 2 h (MOI 30:1). bMEC total RNA (5 μg) was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was removed from RNA samples with DNase I treatment (Invitrogen). Then cDNA was synthesized as described (Alva-Murillo et al., 2012). The relative quantification of gene expression (qPCR) was performed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. The reactions were carried out with VeriQuest SYBR Green qPCR master mix (Affymetrix). Specific primer pairs were acquired from Invitrogen and Elim Biopharm (Table 1), and their specificity was determined by end point PCR. GAPDH was used as an internal control.

2.8. Determination of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS)

Nitric oxide was estimated by Griess reaction. For this, bMECs were cultured ($\sim 2 \times 10^5$ cells) in 24 well plates with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma). Then bMECs were treated with kupandin (66 nM) for 24 h. After treatment, the cells were infected with *S. aureus* (2 h) and the conditioned medium was recovered. The NO secreted by bMECs into culture medium was evaluated by measuring the nitrite concentration (NO^{2-}) in cell-free media using the Griess reaction as described (Gutiérrez-Barroso et al., 2008)

To analyze the ROS the method of Tarpey and Fridovich (2001) was used. For this, bMECs (1×10^5 cells) were grown in 24 well plates (Corning-Costar) until 80% of confluence. Afterward, kupandin (66 nM) was added for 24 h; then bMECs were infected with *S. aureus* (2 h). Subsequently, bMECs were detached with trypsin, recovered and washed with PBS buffer by centrifugation and the supernatant was removed. bMECs were incubated for 30 minutes with dihydrorhodamine-123(DHR) 5 mM (Molecular Probes). ROS were determined by flow cytometry (BD ACCURI C6 flow cytometer).

2.9. Acid extraction of histones

To analyze the effects of kupandin (66 nM) and/or *S. aureus* on histone modifications of bMECs, monolayers of cells that were cultured in plates (2×10^6 cells) with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-

tail type I collagen (Sigma) were incubated with kupandin (66 nM) (24 h) and/or *S. aureus* for 2 h (MOI 30:1). The histone purification was carried out according to the method reported by Shechter et al. 2007. Cells were washed with PBS twice and detached with trypsin-EDTA (Sigma), then were collected in a new tube and washed with PBS and centrifugated (10 min, 300 g). Cell pellet was resuspended in hypotonic lysis buffer and incubated for 30 min in agitation at 4°C to promote hypotonic swelling and lysis, after which the lysed were centrifugated (10,000 g, 10 min, 4°C). The pellet (nucleus) was resuspended in 400 µl 0.4 N H₂SO₄ and incubated overnight in agitation at 4°C. Samples were centrifugated (16000 g, 10 min) and the supernatant containing the histones were transferred to a new tube for precipitation with TCA. Each sample was precipitated using TCA 33% added drop by drop and then were incubated on ice for 30 min. The histones were washed with ice-cold acetone twice (16000 g, 10 min at 4 °C). Air-dried histone pellet was dissolved in 100 µL of ddH₂O. Samples of histones were analyzed by electrophoresis in a SDS-polyacrylamide 15% gel and stained with Coomassie Blue dye.

2.10. Western blot

10 mg of histones were separated by SDS-PAGE 15% and then were transferred on PVDF 0.45 mm membrane (BioTrace) using a semi-dry blotting unit (Fisher Biotech) following manufacturer's protocols (El Mansouri et al., 2014). Transference was made using three buffer system for Semidry electroblotting: Anode 1 Buffer: 0.3M Tris Base, 20% MeOH, pH 10.4; Anode 2 Buffer: 0.025M Tris Base, 20% MeOH pH 10.4; Cathode Buffer 0.025M Tris Base, 0.04M Caproic acid, 20% MeOH pH 9.4. The following antibodies were purchased from Abcam and used in 1:1000 dilution: anti-histone H3 antibody-nuclear loading control and ChIP grade (ab1791), anti-histone H3 (di methyl K9) antibody-ChIP grade (ab1220), anti-histone H3 (acetyl K9) antibody ChIP grade (ab10812), anti-histone H3 (tri methyl K9) antibody-ChIP grade, and secondary antibody anti-rabbit IgG, HRP-inked Antibody #7074 (Cell signaling technology). Detection of proteins were analyzed using chemiluminescent substrate highly sensitive for detection of horseradish peroxidase (HRP) WesternSure (LI-COR) according to the manufacturer's instructions and exposed to KODAK X-ray Film (KODAK). The WB were analyzed using the Image Studio Lite 5.2 Software LI-COR-Biosciences.

2.11. HDAC Total deacetylase activity assay in bMECs

bMECs were grown in 96-well plate (1×10^4 cells) to confluence ~80% in DMEM F-12 Ham (Sigma) without phenol red, with L-glutamine, 15 mM HEPES and NaHCO_3 1.2 g, without FBS and antibiotics. bMECs were treated for 2, 6, 12 and 24 h with kupandin (66 nM) and infected with *S. aureus* 2 h. The total deacetylase activity was assessed using HDAC Fluorometric cellular activity assay kit (Fluor de lys, Promega) according to the manufacturer's instructions. After incubation with kupandin and/or *S. aureus*, the media were replaced with new media supplemented with 200 μM flour de lys substrate and 1 μM trichostatin (TSA) and incubated 4 h at 37°C. Finally, to determine HDACs activity 1X development plus 2 μM TSA was added and mixed, then it was incubated by 15 min at 37°C. Samples were read at 360 and 460 nm in a Varioskan flash multimode reader (Thermo Scientific).

2.12. Role of HDACs in *S. aureus* internalizaion into bMECs regulated by kupandin

Gentamicin protection assay was carried out using bMECs monolayers ($\sim 2 \times 10^5$ cells) cultured in 24 well dishes treated with 6-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rat-tail type I collagen (Sigma) as described. bMECs were incubated with kupandin (66 nM) in DMEM/F12 media (Sigma) without antibiotics and serum for 24 h and then were incubated with trichostatin A (0.5 μM) (HDAC inhibitor) (Enzo) for 30 min, after the bMECs were infected with *S. aureus* (MOI 30:1 bacteria per cell). For this, the bMECs were inoculated with bacterial suspensions (9.2×10^7 CFU/mL) and incubated for 2 h in 5 % CO_2 at 37°C. Afterward, bMECs were washed three times with PBS (pH 7.4) and incubated with incomplete medium supplemented with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin for 1 h at 37°C to eliminate extracellular bacteria. Finally, bMECs monolayers were detached with trypsin-EDTA (Sigma) and lysed with 250 μL of sterile distilled water. bMECs lysates were diluted 100-fold, plated on LB agar and Petri dishes were incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to control (bMECs treated with vehicle).

2.13. Data analysis

The data were obtained from three independent experiments, each one was performed in triplicate, and compared with one-way analysis of means comparisons using *t*-Student. The results are reported as the means \pm the standard errors (SE), and the significance level was set

at $P \leq 0.05$, except for RT-qPCR analysis where fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. The data were normalized to the vehicle (DMSO 0.1%).

3. Results

3.1. Obtention and characterization of kupandin

With the aim to identify the molecule responsible of the LEAS effects, we hypothesized that the most abundant acetogenin has a relevant role in the inhibition of *S. aureus* internalization into bMEC and the modulation of the IIR (Báez-Magaña et al. 2019). Purification of kupandin was performed by column chromatography and confirmation of purification was performed by Thin-layer chromatography (TLC) and GC-MS, finding an abundance of 75% (data not shown). By GC-MS it was determined that majority compound in LEAS was a 17-carbon acetogenin (15.4 $\mu\text{g/g}$ seed), which contains an acetoxy group, two OH groups in carbons 2 and 4, in addition to two unsaturations in the carbons 14 and 16, this molecule was named kupandin (from kupanda, which is a Purépecha word to refer for avocado).

3.2. Kupandin from avocado seed does not affect *S. aureus* growth and bMECs viability

To evaluate the effect of kupandin on *S. aureus* growth, bacteria were cultivated in LB broth supplemented with different concentrations (0.66-132 nM). The turbidimetric results showed that *S. aureus* growth was not affected by kupandin at the times evaluated (Fig. 1A). In the same way, the effect of kupandin on viability bMECs was evaluated at 24 and 48 h using the trypan blue assay. Data showed that kupandin did not affect bMEC viability in any concentrations tested (Fig. 1B).

3.3. Kupandin from avocado seed inhibits the *S. aureus* internalization into bMECs

The effect of kupandin on internalization of *S. aureus* into bMECs was evaluated by gentamicin protection assay. bMECs were treated with kupandin (0.66-132 nM) 24 h before challenged with bacteria. According to CFUs recovered the kupandin 66 and 132 nM significantly decreased *S. aureus* internalization into bMECs (60%) in relation to vehicle (Fig. 2A).

Interestingly, these concentrations also affected the *S. aureus* adhesion to bMECs (~40%) (Fig. 2B). According to this result, we used the concentration of 66 nM in the rest of experiments.

3.4. Kupandin from avocado seed improve the defense of bMECs

In order to evaluate if the kupandin inhibitory effect on *S. aureus* internalization into bMECs was related to secretion of antimicrobial products of bMECs, we evaluated bacteria viability in the presence of conditioned media (culture media of bMECs treated 24 h with kupandin). Interestingly, bacteria viability diminished ~60% in the conditioned media, which suggest that kupandin induced the secretion of antimicrobial molecules (Fig. 3A).

Then, we evaluate if reactive oxygen and nitrogen species have a role in the antimicrobial effect showed by the conditioned media. The results showed that bMECs treated with kupandin (66 nM) for 24 h increased the NO levels, this effect was maintained even in bMEC challenged with *S. aureus* (Fig. 3B). As well as, the ROS production was increased for kupandin treatment (Fig. 3C). These results suggest that NO and ROS production could be involved in the antimicrobial effect detected in the conditioned media.

3.5. Kupandin regulate the gene expression of innate immune elements from bMECs

We analyzed the mRNA levels of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and the anti-inflammatory cytokine IL-10, chemokine IL-8 and antimicrobial peptides TAP, DEFB1 in kupandin pretreated-bMECs before and after infection. The mRNA levels of proinflammatory cytokine TNF- α in bMECs pretreated with kupandin was increased (~2-fold), as well as the chemokine IL8 and the anti-inflammatory IL-10 mRNA (~1-fold). Notably, the effect on IL-10 was more pronounced in bMEC challenged with *S. aureus* (~12-fold) when cells were treated with kupandin (Table 2). Also, the mRNA levels for IL-1 β , DEFB and TAP were not modified in bMECs. However, the challenge with the bacteria decreased the mRNA expression in all of the conditions.

3.6. Effect of kupandin on histone modifications and HDAC activity in bMECs infected with *S. aureus*

When the global epigenetic changes of bMECs treated with kupandin (66 nM) for 24h were analyzed, no changes were observed for H3K9me3 and H3K9me2 and H3K9ac marks, with

respect to vehicle. However, in kupandin-pretreated bMECs and challenged with bacteria the marks of H3K9ac and H3K9me3 decreased (~0.2 and 0.4-fold), respectively, but H3K9me2 did not change (Fig. 4). On the other hand, *S. aureus* increased HDAC activity in a time-dependent manner (Fig. 5); however, in kupandin-pretreated bMECs and challenged with *S. aureus* for 2, 6, 12 y 24 h, the activity of the HDACs induced by the bacteria was not modified (Fig. 5).

3.7. Kupandin inhibit *S. aureus* internalization through HDACs activity

To correlates internalization and epigenetics mechanisms, bMECs were treated with kupandin during 24 h, then TCA (a potent inhibitor of HDACs activity) was added. The results showed that TCA increased the *S. aureus* internalization until twice compared to vehicle (control without TCA), but when bMECs were treated with kupandin and TCA internalization increased around 50% compared to vehicle (Fig. 6).

4. Discussion

Previously we showed that LEAS decreased the *S. aureus* internalization of up to 80% in bMECs, also killed up to 30% of bacteria before that they could be internalized through the induced-production of antimicrobial molecules such as nitric oxide and defensin BNBD5 (gene expression); besides, LEAS inhibited the proinflammatory cytokine gene expression such as TNF- α and IL-1 β , and increased the expression of IL-10 (anti-inflammatory cytokine), which suggests that LEAS has anti-inflammatory properties. In addition, this modulation of gene expression may be associated with MAPK signaling pathway, mainly p38, and epigenetic mechanisms, since it was reported that LEAS induces di and trimethylation of histone H3K9 as well as miRNAs production (Báez-Magaña et al., 2019). Kupandin is the most abundant acetogenin in LEAS, to analyze whether kupandin was responsible for decreasing the internalization of *S. aureus* in LEAS pretreated- bMECs we purified kupandin and characterized by GC-MS (data not shown). According to the internal standard methyl-tetradecanoate used during GC-MS, the kupandin abundance in LEAS was ~21.5 % (data not shown). Kupandin has a molecular weight of 326 g/ml, and the concentrations of this molecule in LEAS was estimated. According with the concentrations of LEAS that inhibited *S. aureus* internalization (1, 10, 100

and 200 ng/ml), these concentrations correspond to 0.66, 6.6, 66 and 132 nM of kupandin (Báez-Magaña et al., 2019).

Next, we demonstrated that kupandin (0.66- 132 nM) did not affect the viability of *S. aureus* (2-24 h). However, it has been reported that avocado acetogenins have antimicrobial properties against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* from 7.8 and 15.6 mg/L, which is up to 100 times higher concentrations compared to those tested in this work (Salinas-Salazar et al., 2016; Pacheco et al., 2017). Also, acetogenins have cytotoxic properties against oral, leukemia, breast and colon cancer cell lines (D'Ambrosio et al., 2011; Lee et al., 2015; Lara-Márquez, 2015). In addition, in our work group it was determined that LEAS is cytotoxic on bMECs at 50 µg/mL (24 h) (Lara-Marquez, 2015). However, kupandin (132 nM) did not shown cytotoxic on bMECs, because the highest concentration analyzed is up to 10 times lower than the cytotoxic concentration reported.

With respect to *S. aureus* internalization into bMECs, kupandin (66 nM/24h) decreased bacteria internalization, adhesion and viability similar to LEAS (100 ng/ml) (Fig. 2) (Báez-Magaña et al., 2019). To our knowledge, this is the first report of an avocado acetogenin that inhibits of pathogen internalization. On the other hand, production of reactive nitrogen species was increased by kupandin (80%), which was similar to the reported for LEAS that partially explain the reduction in *S. aureus* internalization (Báez-Magaña et al., 2019). However, acetogenins like persenone A and B inhibit NO production on macrophages RAW 267.7, but the concentrations used were 10-fold greater (1.2 µM) (Kim et al., 2000). In relation to the analysis of immunomodulatory properties, the results shown differences between kupandin and LEAS, whereas LEAS inhibits TNF- α expression 0.5-fold before and after infection, kupandin before infection increased the expression of TNF- α up to 3-fold. Although after infection the expression decreased 0.2-fold. Another interesting point was the evaluation of IL-10, LEAS significantly induced the expression of this gene (11-fold) but kupandin only 1.8-fold (Báez-Magaña et al., 2019). These results suggest that kupandin have anti-inflammatory effects, which agrees with acetogenins from avocado called polyhydroxylated fatty alcohols that showed anti-inflammatory effects on keratinocytes damaged with UV light (Rosenblat et al., 2011).

With regard to the epigenetic modulation, to our knowledge this is the first report of a molecule from avocado that modulates epigenetic activation in a pathogen-host interaction model. Kupandin after infection decreased up to 20% H3K9ac, while H3K9me3 after infection

decreased by 40%. Moreover, HDACs activity was not affected by kupandin treatment in the different times analyzed (Fig. 4 and 5). These data suggest that the effects of kupandin on *S. aureus* internalization in bMECs is independent of activity of HDACs. The differences in the mechanisms of action between LEAS and kupandin could be related to the specificity in the biological targets presented by kupandin; however, further experiments are necessary to support this hypothesis. In this way, in leukemia cells, mitochondria is a target of avocatin B (acetogenin 17C), this acetogenin induce apoptosis through the induction of ROS production (Lee et al., 2015). Although these results are a clue about that acetogenins can enter in the cells, the mechanisms underlying are unknown. However, in this work kupandin did not affect the ROS production. In these sense, PPARs receptors act as transcriptional factors, which have important participation in the metabolism, as well as in inflammation response and long-chain fatty acids are ligands for them. Due to the structural similarity between polyunsaturated fatty acids long chain and acetogenins (Wahli and Michalik, 2012), PPARs could be possible targets for acetogenins, but this need to be evaluated. Another remarkable point in this work is that acetogenins concentration is a crucial point for determine the fate of effects, due that high concentrations of acetogenins ($\mu\text{g/mL}$) have cytotoxic and antimicrobial effects, but in low concentrations (ng/mL) the effects are immunomodulatory and anti-inflammatories (D'Ambrosio et al., 2011; Rosenblat et al., 2011; Báez-Magaña et al., 2019).

5. Conclusion

Kupandin is a derivative of long chain fatty acids and is the major compound present in lipid-rich extract of Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*), which was responsible of the inhibition of *S. aureus* internalization into bMECs, and also has anti-inflammatory properties. To our knowledge, this is the first report of an acetogenin from avocado able to regulate epigenetic marks.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

MBM was supported by a scholarship from CONACyT. This work was supported by grants from CONACyT (CB-2013-221363 and INFR-2014-230603) and CIC14.5 to JELM.

References

- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.025
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2017. sodium octanoate modulates the innate immune response of bovine mammary epithelial cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–15. doi:10.3389/fcimb.2017.00078
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 155, 324–331. doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.025
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Cárabaz-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdez-Alarcón, J.J., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 81, 358–361. doi:10.1016/j.rvsc.2006.02.002
- Atalla, H., Gyles, C., Mallard, B., 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143, 319–328. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.030
- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R., López-Meza, J.E., 2019. Lipid-rich extract from Mexican avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* 2019, 1–10. doi:10.1155/2019/7083491
- Cavaillon, J.-M., 2015. Molecular Mediators: Cytokines. *Rev. Cell Biol. Mol. Med.* 1, 1–37. doi:10.1002/3527600906.mcb.200400134.pub2

D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., 2011. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 465–469. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.027

El Mansouri, F.E., Nebbaki, S.S., Kapoor, M., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Benderdour, M., Fahmi, H., 2014. Lysine-specific demethylase 1-mediated demethylation of histone H3 lysine 9 contributes to interleukin 1 β -induced microsomal prostaglandin E synthase 1 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 16, 1–15. doi:10.1186/ar4564

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 61–98. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445

Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K., Höök, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62. doi:10.1038/nrmicro3161

Fraunholz, M., Sinha, B., 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1-10. doi:10.3389/fcimb.2012.00043

Gallo, R.L., Hooper, L. V., 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 503–516. doi:10.1038/nri3228

Garzoni, C., Kelley, W.L., 2011. Return of the Trojan horse: Intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *EMBO Mol. Med.* 3, 115–117. doi:10.1002/emmm.201100123

Garzoni, C., Kelley, W.L., 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17, 59–65. doi:10.1016/j.tim.2008.11.005

Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J.L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 113–122. doi:10.1016/j.vetimm.2007.09.007

He, Y., Song, M., Zhang, Yi, Li, X., Song, J., Zhang, Yuan, Yu, Y., 2016. Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 17, 1–12. doi:10.1186/s12864-016-2947-0

- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Kapur, V., 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2, e1120. doi:10.1371/journal.pone.0001120
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E.M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., Guan, L.L., 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics*. 15, 1-16. doi:10.1186/1471-2164-15-181
- Kim, O.K., Murakami, A., Nakamura, Y., Kim, H.W., Ohigashi, H., 2000. Inhibition by (-)-Persenone A-related compounds of nitric oxide and superoxide generation from inflammatory leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64, 2500–2503. doi:10.1271/bbb.64.2500
- Lara-Márquez, M. 2015. Efectos citotóxicos de los ácidos grasos y derivados de los ácidos grasos sobre células cancerosas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 63 pp.
- Lee, C.-C., Lin, Y.-H., Chang, W.-H., Lin, P.-C., Wu, Y.-C., Chang, J.-G., 2011. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer*. 2, 1-9. doi:10.1186/1471-2407-11-58
- Lee, E.A., Angka, L., Rota, S., Hanlon, T., Mitchell, A., Hurren, R., Wang, X.M., Gronda, M., Boyaci, E., Bojko, B., Minden, M., Sriskanthadevan, S., Datti, A., Wrana, J.L., Edginton, A., Pawliszyn, J., Joseph, J.W., Quadriatero, J., Schimmer, A.D., Spagnuolo, P.A., 2015. Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Res*. 75, 2478–2489. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2676
- Modak, R., Das Mitra, S., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar, M., Bhat, A. V., Bhuvana, M., Ghosh, S.K., Shome, B.R., 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, 1-15. doi:10.1186/1868-7083-6-12
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog*. 47, 1–7. doi:10.1016/j.micpath.2009.04.006

- Pacheco, A., Rodríguez-Sánchez, D.G., Villarreal-Lara, R., Navarro-Silva, J.M., Senés-Guerrero, C., Hernández-Brenes, C., 2017. Stability of the antimicrobial activity of acetogenins from avocado seed, under common food processing conditions, against *Clostridium sporogenes* vegetative cell growth and endospore germination. *Int. J. Food Sci. Technol.* 52, 2311-2323. doi:10.1111/ijfs.13513
- Rinaldi, M., Li, R.W., Capuco, A. V., 2010. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 267–279. doi:10.1016/J.VETIMM.2010.10.005
- Rodríguez-Lopez, C.E., Hernandez-Brenes, C., de la Garza, R.I.D., 2015. A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Rsc Adv.* 5, 106019–106029. doi:10.1039/C5RA22854A
- Rodríguez-López, C.E., Hernández-Brenes, C., Treviño, V., Díaz de la Garza, R.I., 2017. Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed. *BMC Plant Biol.* 17, 9–12. doi:10.1186/s12870-017-1103-6
- Rodríguez-Saona, C., Millar, J.G., Trumble, J.T., 1998. Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. *J. Nat. Prod.* 61, 1168–1170. doi:10.1021/np980127q
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P., Vandenesch, F., 2014. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1003979
- Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., Hochberg, M., 2011. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 239–246. doi:10.1007/s00403-010-1088-6
- Ruegg, P.L., 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100, 10381–10397 doi:10.3168/jds.2017-13023
- Wahli, W., Michalik, L., 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 351–363. doi:10.1016/j.tem.2012.05.001

Figure captions

Figure 1. Kupandin did not affect the *S. aureus* growth and bMECs viability. **A)** *S. aureus* was grown in LB at 37°C (18 h). The OD₅₉₀ was adjusted at 0.2 (9X10⁷ CFU) and different concentrations of kupandin were added. The growth was monitored measuring the OD at the indicated times. **B)** bMECs were grown in 96-well dishes (80% confluence) and the treatments were added. The viability was determined by MTT assay at 24 and 48 h. The results correspond to three independent experiments performed by triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%) ($P \leq 0.05$, *t*-student).

Figure 2. Kupandin inhibits *S. aureus* internalization and adhesion into bMECs. **A)** The effect of kupandin on the internalization of *S. aureus* into bMECs is presented as the percentage of CFU recovered after the lysis of bMECs. The values were determined considering the vehicle (DMSO 0.1%) as 100% of internalization. The results are the average of three independent experiments performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). The «*» indicates significant changes ($P \leq 0.05$, *t*-student). **B)** The effect of kupandin on *S. aureus* adhesion into bMECs is presented as the percentage of CFU recovered after the lysis of bMECs without gentamicin treatment and subtracting the CFU internalized. The values were determined considering the vehicle as 100% of adhesion. The results are the average of three independent experiments performed in triplicate. Concentrations of kupandin were considered according with the proportion reported for LEAS 1, 10, 100 and 200 ng/ml which are equivalent to 0.66, 6.6, 66 and 132 nM kupandin. Vehicle (DMSO 0.1%). The «*» indicates a significant change ($P \leq 0.05$, *t*-student).

Figure 3. The conditioned media of kupandin-pretreated bMECs shown antimicrobial activity against *S. aureus*. **A)** Effect of conditioned medium from bMECs treated with vehicle (DMSO 0.1%) or kupandin (66 nM) for 24 h on *S. aureus* viability. Bacteria were incubated 2 h with conditioned media. The values were determined considering the vehicle (DMSO 0.1%)

as 100% of CFU recovered. The results are the average of three independent experiments performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). The «*» indicates significant changes ($P \leq 0.05$, t -student). **B)** Nitric oxide and **C)** ROS production in bMECs treated with 66 nM of kupandin for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. NO production was measured as NO₂ concentration in culture medium. ROS production was evaluated by flow cytometry. Each bar shows the mean of triplicates \pm SE of three independent experiments. The «*» indicates significant changes ($P \leq 0.05$, t -student) within the treatment. Vehicle (DMSO 0.1%).

Figure 4. Kupandin induces epigenetic modifications on H3K9 in bMECs challenged with *S. aureus*. The bMECs were treated for 24 h with the kupandin (66 nM) and then infected with *S. aureus* for 2 h. **A)** The epigenetic modifications were analyzed by Western blot using specific antibodies against H3K9ac, H3K9me2 and H3K9me3 (Abcam). Histone 3 (H3) was used as charge control. The graphs represent the WB densitometric analysis of **B)** H3K9ac, **C)** H3K9me2 and **D)** H3K9me3. The WB were analyzed in the Image Studio Lite 5.2 Software LICOR-Biosciences, each band was normalized with the H3 load control with respect to vehicle (DMSO 0.1%). The results are the average of three independent experiments. The «*» indicates a significant change ($P \leq 0.05$, t -student).

Figure 5. Epigenetic effects of kupandin are independent of HDACS activity in bMECs challenged with *S. aureus*. Arbitrary fluorescence units (AFU) of HDACs activity was determined by HDAC fluorometric cellular activity assay kit (fluor de lys). bMECs were treated by 6, 12 and 24 h with kupandin (66 nM), then cells were challenged with *S. aureus* (2 h). The HDAC activity was measured by levels of substrate deacetylation after 4 h of incubation and then stimulation with development and lysis reagents by 15 min. The fluorescence was detected at Ex. 360 nm, Em 460 nm. Different letters above the bars indicate significant changes among the treatments evaluated ($P \leq 0.05$, Tukey-Kramer). Control of inhibition of HDAC activity (TCA), vehicle (DMSO 0.1%).

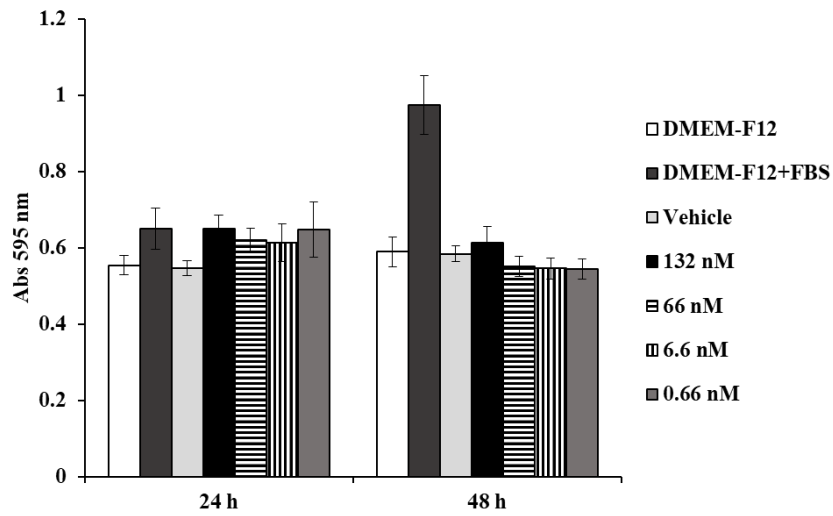
Figure 6. Kupandin inhibits *S. aureus* internalization into bMECs independently of HDACs. Participation of HDACs during kupandin inhibition of internalization of *S. aureus* into bMECs is presented as the percentage of CFU recovered after the lysis of bMECs. bMECs were

treated for 24 h with kupandin (66 nM), 30 min before infection trichostatin (TCA) (0.5 μ M) was added. The values were determined considering the vehicle (DMSO 0.1%) as 100% of internalization. The results are the average of one independent experiment performed in triplicate. Vehicle (DMSO 0.1%). The «*» indicates significant changes ($P \leq 0.05$, *t*-student).

Table 2. Effect of kupandin from avocado seed on expression of innate immune genes of bMECs. Relative expression of genes was determined by RT-qPCR using GAPDH as endogenous control. The results correspond to three independent experiments and show the mean of triplicate \pm SE, letters mean fold change values “a” to values less than 0.5 and “b” to values greater than 2 were considered significant differentially expressed mRNAs with respect to vehicle.

Figure 1.

A)



B)

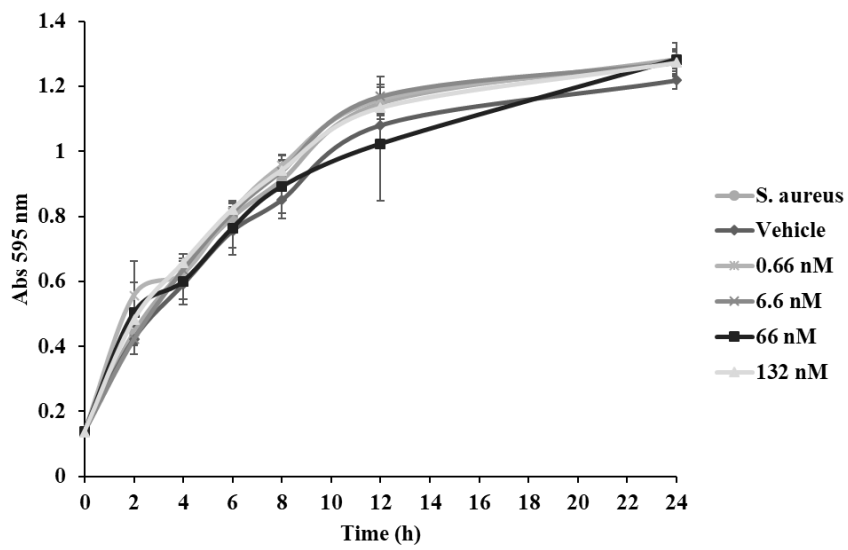
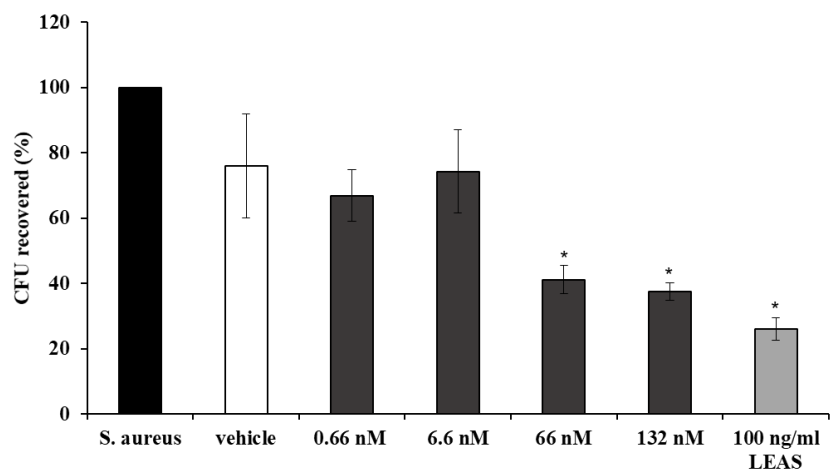


Figure 2.

A)



B)

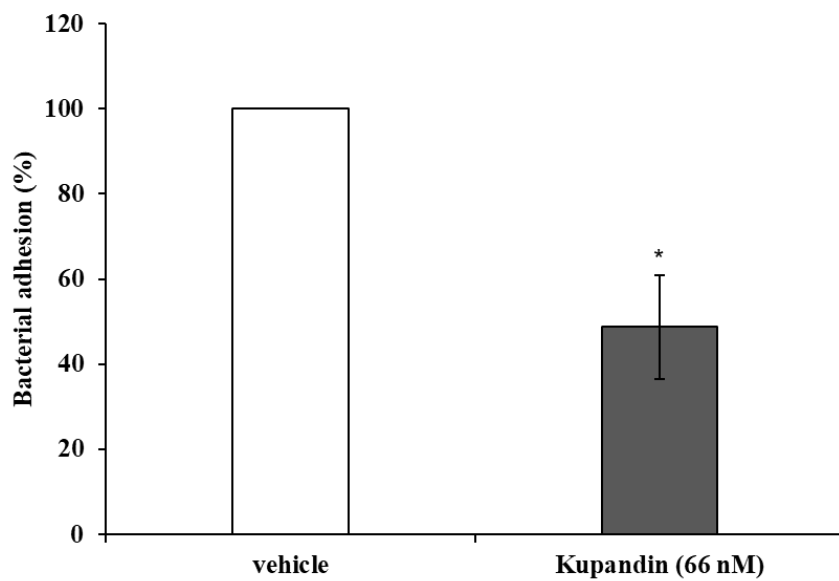
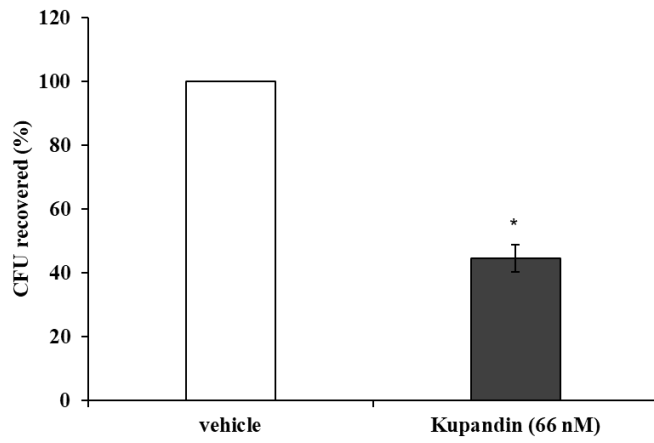
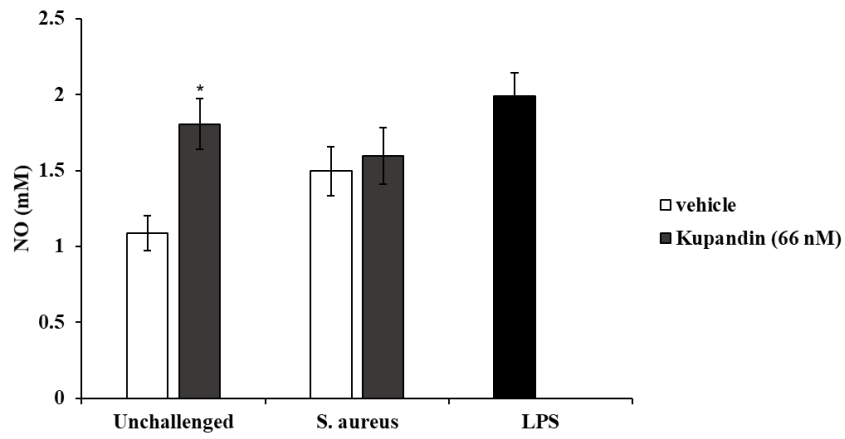


Figure 3.

A)



B)



C)

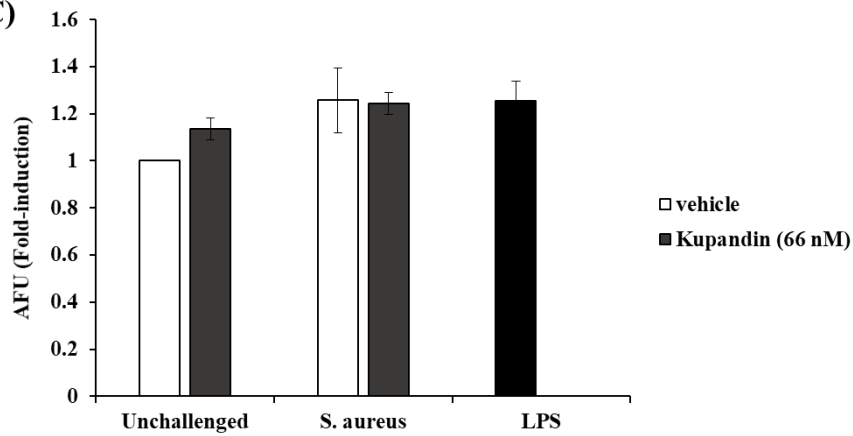


Figure 4.

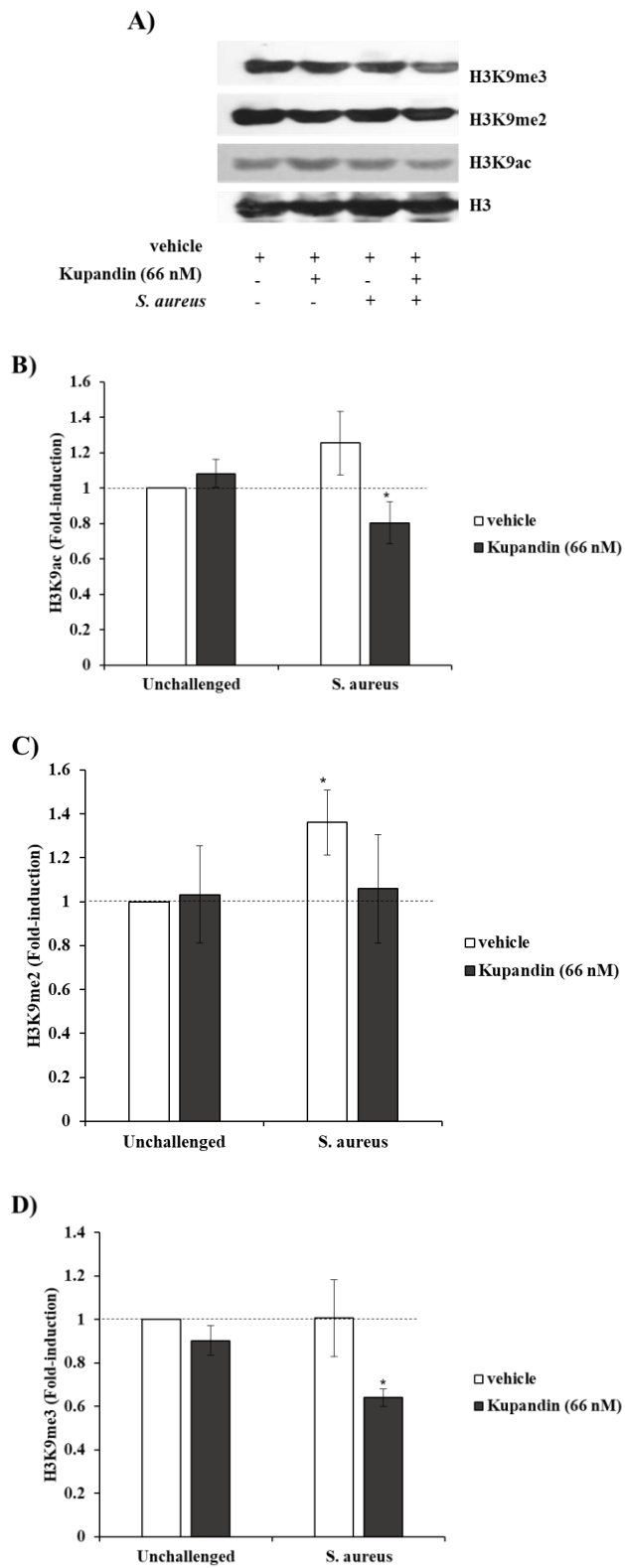


Figure 5.

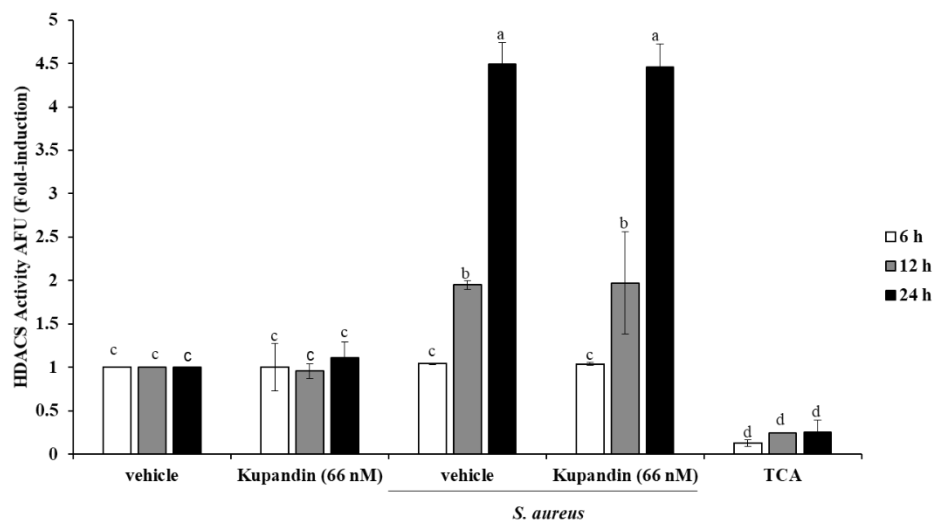


Figure 6.

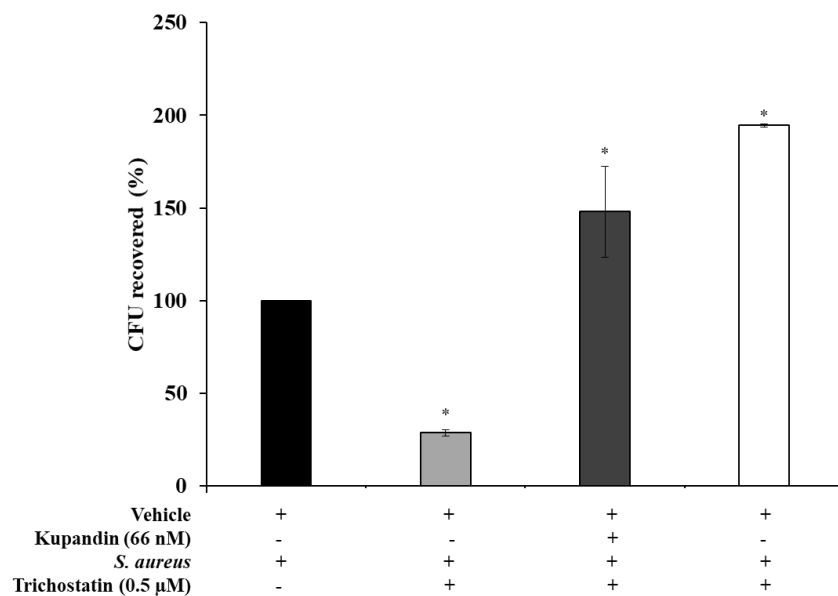


Table 1. Bovine oligonucleotides used in this study.

Specificity	Primer	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
IL-1β	Forward	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG	198	52	Alva-Murillo et al., 2014
	Reverse	CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA			
TNF-α	Forward	CCCCTGGAGATAACCTCCCA	101	56	Alva-Murillo et al., 2014
	Reverse	CAGACGGGAGACAGGAGAGC			
IL-10	Forward	GATGCGAGCACCTGTCTGA	129	59	Alva-Murillo et al., 2014
	Reverse	GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT			
DEFB1	Forward	CCATCACCTGCTCCTCACA	185	54	Téllez-Pérez et al., 2012
	Reverse	ACCTCCACCTGCAGCATT			
TAP	Forward	GCGCTCCTCTTCCTGGTCCTG	216	57	Téllez-Pérez et al., 2012
	Reverse	GCACGTTCTGACTGGGCATTGA			
GAPDH	Forward	TCAACGGGAAGCTCACTGG	237	56.9	Téllez-Pérez et al., 2012
	Reverse	CCCAGCATCGAAGGTAGA			

Table 2. Effect of kupandin from avocado seed on expression of innate immune genes of bMECs.

Activity	Gene	Vehicle	Kupandin (66 nM)	Vehicle + <i>S. aureus</i>	Kupandin (66 nM) + <i>S. aureus</i>
Pro-inflammatory	TNF-α	1 \pm 0	3.19 \pm 1.31^b	1.03 \pm 0.25	0.23 \pm 0.07^a
	IL-1β	1 \pm 0	1.74 \pm 0.58	0.86 \pm 0.29	0.14 \pm 0.08
	IL-8	1 \pm 0	1.92 \pm 0.4	1.0 \pm 0.09	0.81 \pm 0.07
Anti-inflammatory	IL-10	1 \pm 0	1.87 \pm 0.25^b	4.95 \pm 2.09^b	12.19 \pm 8.39^b
Antimicrobial peptides	DEFB1	1 \pm 0	0.98 \pm 0.29	0.51 \pm 0.23^a	0.35 \pm 0.14^a
	TAP	1 \pm 0	0.84 \pm 0.07	0.44 \pm 0.17^a	0.2 \pm 0.08

VI.6. Capítulo 6 – Recordando al enemigo para eliminarlo: Inmunidad innata entrenada

A manera de editorial	2
Inmunidad innata entrenada	3
Marisol Báez Magaña, Rafael Salgado Garciglia y Joel Edmundo López Meza	
Bacteriófagos en lugar de antibióticos	6
María José Martínez Gallardo	
Pruebas forenses moleculares: del ADN a la identidad de la persona	12
Miguel Contreras-Pérez y Gustavo Santoyo-Pizano	
Una mirada al envejecimiento de los seres humanos a través de la termodinámica	12
Rafael Francisco Márquez Caballé y Jorge Antonio Montemayor Aldrete	
Donación de órganos; una predilección cívica	14
Cynthia Jazmín Gonzáles Murillo, Perla Jacaranda De Dienheim Barriguete	
Obesidad infantil en México, un desafío de Salud Pública	
Candy Ramírez-Hernández; Dallely Aguilar-Méndez y Magdalena Lozano-Zúñiga	
Estrés, neurogénesis y tortugas marinas	19
Nancy Marisol Unda Díaz y Alma Lilia Fuentes Farías	
Migración de la mariposa monarca amenazada por el cambio climático	22
Nancy Izquierdo-Calderón, Cuauhtémoc Sáenz-Romero y Eligio García-Serrano	
Bacterias endófitas de plantas y su posible repercusión en la salud humana	25
Daniel Rojas-Solis y Gustavo Santoyo Pizano	
Paradigmas ambientales del desarrollo y la sustentabilidad	28
Dante Ariel Ayala Ortiz	
La enseñanza de la mediación en los niños como forma de resolución pacífica de conflictos	31
Wendy Reyes Vargas y María Elena Pineda Solorio	
Lo que se desconoce sobre la participación deportiva de las mujeres y la importancia de creer en sus propias capacidades	33
Miriam Martínez Fuentes y María Elena Rivera Heredia	
Actividades acuáticas como herramienta para el bienestar y la salud	36
Jaqueline Pisano Báez, Liliana Gómez Pizano, y Blanca Estela Juárez Muñoz	
Una dosis de risa: el clown de hospital	39
Daniel Valdovinos Fernández y Claudia Cervantes Durán	
Dibujando los días	41
Aspirinas para el alma	42

RECORDANDO AL ENEMIGO PARA ELIMINARLO

Inmunidad innata entrenada

Marisol Báez Magaña¹, Rafael Salgado Garciglia²
y Joel Edmundo López Meza¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ²Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. Morelia, Michoacán, México.
Contacto: rsalgadogarciglia@gmail.com

RESUMEN: Todos los seres vivos poseen mecanismos que les permiten defenderse de sus enemigos, de los efectos del ambiente y en general de sustancias que les causan algún tipo de daño o estrés, es decir, tienen la capacidad de discriminar lo propio de lo extraño. A estos mecanismos en su conjunto se les conoce como el sistema inmune. Este sistema es capaz de activar dos tipos de respuestas: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La primera respuesta (sistema inmune innato) está presente en la mayoría de los organismos y constituye la primera barrera de defensa. La adaptativa (sistema inmune adaptativo) se presenta en los vertebrados, como un mecanismo de defensa complementario al sistema inmune innato, considerado más específico. Recientemente, se ha propuesto el término de “inmunidad innata entrenada” para describir que las células en mamíferos del sistema inmune innato también tienen memoria, el que puede ser entrenado para “recordar al enemigo” y eliminarlo. El objetivo de este artículo es abordar el cambio de paradigma de la inmunidad innata y los recientes hallazgos que apuntan a la demostración de una memoria inmune innata y su especificidad.

Palabras clave: Agentes infecciosos, defensa, epigenética, inmunidad.

Diferencias entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa

Hasta hace poco tiempo los inmunólogos consideraban que la respuesta inmune innata era una respuesta sencilla, rápida e inespecífica, carente de memoria y constituida principalmente por barreras físicas, químicas. Sin embargo, con las investigaciones se ha demostrado que es una respuesta compleja. En las plantas estas barreras comprenden la presencia de capas de cera, paredes celulares rígidas, enzimas antimicrobianas y metabolitos secundarios. En los animales las barreras son variadas, como las conchas de los moluscos, el exoesqueleto de los crustáceos e insectos, la piel, las mucosas, las enzimas antimicrobianas y la participación de células especializadas como los macrófagos o sus equivalentes, cuya función es eliminar al agente causante del daño y regresar al organismo a la normalidad lo más pronto posible.

El sistema inmune adaptativo de los animales es más complejo, ya que ayuda a construir una respuesta inmunológica adaptativa contra los “enemigos” a los que previamente se ha enfrentado, un mecanismo desarrollado

Milenaria, Ciencia y Arte 3

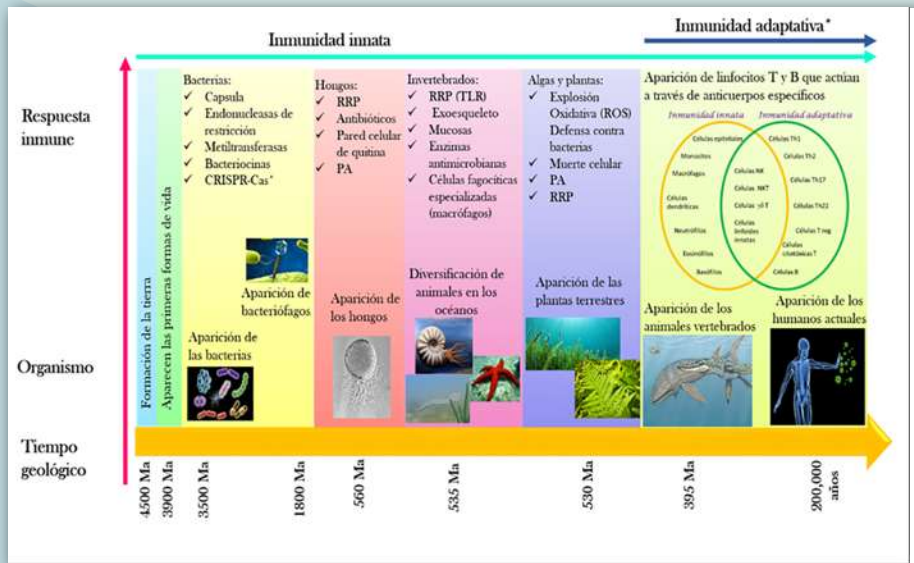


Figura 1. Pistas de la respuesta inmune innata durante la evolución. Desde la aparición de las primeras formas de vida, se desarrollaron mecanismos de defensa que les permitieron defenderse de otros organismos y de las condiciones ambientales. Esta evolución continua dio paso a lo que actualmente conocemos como sistema inmune innato y adaptativo, cuya función principal es reconocer lo propio de lo extraño y regresar la homeostasis del organismo. CRISPR-Cas* es un tipo de sistema inmune adquirido de las bacterias, receptores de reconocimiento de patrones (RRP), péptidos antimicrobianos (PA), receptores tipo Toll (TLR), especies reactivas de oxígeno (ROS), células asesinas naturales (células NK), células NKT (células que pertenecen al tipo NK y a los linfocitos T), células Th (linfocitos T helper), células T reg (linfocitos T reguladores) y células B (linfocitos B).

que “los recuerda” mediante un reconocimiento que realizan los linfocitos, células especializadas procedentes de la médula ósea. Este mecanismo se presenta a través de la generación de anticuerpos, también denominadas inmunoglobulinas, que produce el sistema inmunitario de un organismo cuando detecta microorganismos patógenos (bacterias, hongos o virus) o elementos extraños como los antígenos producidos en ciertas enfermedades (Figura 1).

Recordar al enemigo para eliminarlo

La respuesta inmune innata es vital para la supervivencia de un organismo, ya que si éste tiene un encuentro con un enemigo (ej. microorganismo) y no logra montar una respuesta adecuada, puede morir. Por ello, una de las estrategias para combatirlo es reconocerlo lo más rápido posible, y si ya se tuvo un encuentro previo, la mejor estrategia es almacenar información que permita recordarlo y así deshacerse de él, de manera más eficiente en un encuentro futuro. Por mucho tiempo se consideró que el sistema inmune innato no presentaba memoria, pero en la última década se ha demostrado que las células de este sistema guardan

información de enfrentamientos con “enemigos”, permitiéndoles montar una respuesta inmune más eficiente. Lo anterior establece que un organismo que presente solo la respuesta inmune innata, también puede desarrollar el mecanismo de “recordar al enemigo” para eliminarlo.

Si nos enfocamos en animales, ya sea que presenten ambas respuestas del sistema inmune, el sistema inmune innato presenta una serie de receptores en la membrana celular conocidos como receptores tipo Toll o TLRs (del inglés Toll-like receptor). Estos receptores, descritos por primera vez en la mosca de la fruta, son una especie de antena que se encuentra monitoreando constantemente el ambiente circundante. Cuando se detecta una señal de daño, inmediatamente desencadenan señales de alarma, que conducen a la producción de un arsenal de moléculas como los péptidos antimicrobianos (una especie de antibióticos), especies reactivas de oxígeno (ej. iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos) y de nitrógeno (ej. óxido nítrico y el peroxinitrito), proteínas pro- y anti- inflamatorias como las citocinas y quimiocinas, entre

otras, cuya función es eliminar al agente invasor. Los TLRs, que en humanos se han descrito hasta once, funcionan detectando moléculas que contienen los patógenos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs).

Supongamos que el enemigo es *Escherichia coli*, una bacteria que en su pared celular contiene lipopolisacárido (LPS). El LPS es un tipo de PAMP presente en bacterias Gram negativas que es reconocido por el receptor TLR4 de humanos. La detección de LPS por el TLR4 permite que la célula establezca una respuesta inmune innata adecuada que puede conducir a la eliminación del patógeno. Con este mecanismo, nuestro organismo detecta a la bacteria y la elimina.

Una gran ventaja de los receptores TLR es que pueden discernir entre diferentes patógenos por el reconocimiento de los diferentes PAMPs. Así, la célula responde de manera adecuada para cada uno; pero también, las células del sistema inmune innato pueden reconocer pequeñas variaciones químicas en algún PAMP que les permiten diferenciar entre bacterias que pertenecen al mismo grupo. Por ejemplo, el LPS de *E. coli* está también presente en las bacterias patógenas Gram negativas *Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*, pero las células pueden reconocer a cada una, debido a diferencias químicas del LPS como el tamaño de la cadena del ácido graso, la cantidad de ácidos grasos y el orden en que éstos se encuentran acomodados en la molécula confiriéndole al sistema inmune innato cierto nivel de especificidad. Las células del sistema inmune innato también tienen la capacidad de diferenciar a un microorganismo patógeno de uno benéfico, es decir, diferencia a “los amigos” de “los enemigos” y mayormente ataca a estos últimos para eliminarlos.

Entrenamiento del sistema inmune innato para atacar al enemigo

Un grupo de científicos liderados por el Dr. Mihai Netea de la Universidad Nijmegen (en Holanda)

propuso el término de “inmunidad innata entrenada” para describir que las células del sistema inmune innato de mamíferos tienen memoria. Con sus investigaciones demostraron que el sistema inmune innato de los mamíferos puede ser entrenado para “recordar al enemigo” y eliminarlo. Para esto, los autores estudiaron a un grupo de ratones a los que se les bloqueó la respuesta inmune adaptativa y se enfrentaron en el día 1 a una infección baja de la levadura *Candida albicans*. Posteriormente (7 días después), los ratones se enfrentaron a una infección letal. Los ratones que recibieron la dosis baja de levadura mostraron una tasa de supervivencia mayor que el grupo de ratones con la respuesta inmune adaptativa bloqueada tratados con solo una infección letal de la misma levadura. Lo anterior fue atribuido al entrenamiento que les confirió el primer reto al patógeno en los ratones sin respuesta inmune adaptativa (Figura 2), los que además presentaron un incremento en la producción de citocinas en los monocitos (precursores de los macrófagos).

A nivel molecular observaron que este entrenamiento de la inmunidad innata puede ser atribuido a la epigenética. La epigenética tiene que ver con los cambios químicos que ocurren sobre las histonas sin alterar la secuencia del ADN y que determinan la expresión de ciertos genes que reflejan cambios en el fenotipo (la manifestación visible de la expresión de los genes), en este caso el reconocimiento de un “enemigo”.

Los avances en la epigenética han permitido entender el mecanismo de la respuesta de la inmunidad innata entrenada. Cuando una célula del sistema inmune innato está en contacto con un patógeno se producen una gran cantidad de cambios dentro de la célula, entre ellos los cambios epigenéticos que ocurren en los ARN no codificantes, isla de metilación de ADN y las histonas localizadas en regiones del ADN donde se encuentran los genes de la respuesta inmune innata. Una vez que pasa el proceso infeccioso, estos

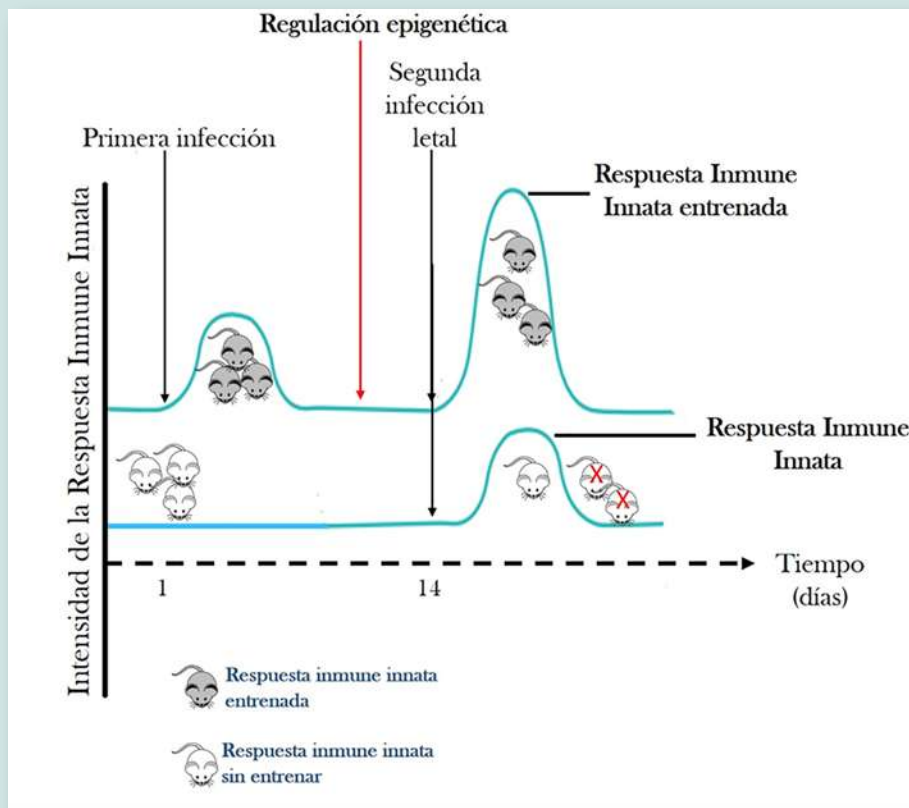


Figura 2. Inmunidad innata entrenada. Durante un segundo evento de infección, la respuesta inmune innata ofrece una mejor respuesta, aumentando la supervivencia de los organismos, este entrenamiento es debido a los diferentes niveles de regulación epigenética que se mantienen durante largos periodos de tiempo, aunque el estímulo no esté presente (modificado de Netea *et al.*, 2016).

cambios se mantienen, permitiendo que las células estén en un estado de alerta para atacar al patógeno invasor. Es por eso que en una segunda infección, las células con memoria reconocen al enemigo y responden de manera eficaz. Ahora se sabe que estos cambios pueden heredarse de una célula madre del sistema inmune innato a su hija, manteniendo estas modificaciones durante meses. Estos avances han permitido romper el dogma de la inmunidad innata, demostrando que ésta puede “recordar al enemigo” para eliminarlo (Figura 2).

La respuesta inmune innata entrenada es una respuesta muy compleja en la que aún falta una gran cantidad de preguntas por responder y mecanismos por descubrir. Las investigaciones en esta área podrían permitir desarrollar nuevas terapias no solo contra agentes infecciosos con el uso de antibióticos, sino además para poder entender la naturaleza de enfermedades crónicas como la inflamación crónica e inclusive el cáncer.

Referencias

- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. *Front Immunol.*, 5:1-8.
- Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.*, 26(4):186-92.
- Netea, M.G. (2013). Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.*, 43(8):881-884.
- Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Latz, E., Mills, K.H.G., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O'Neill, L.A. y Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352(6284):aaf1098-aaf1098.
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H.H.D., Rao, N.A., Matarese, F., Cheng, S.C., Ratter, J., Berentsen, K., van der Ent, M.A., Sharifi, N., Janssen-Megens, E.M., Ter Huurne, M., Mandoli, A., van Schaik, T., Ng, A., Burden, F., Downes, K., Frontini, M., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Ouwehand, W.H., van der Meer, J.W., Joosten, L.A., Wijkema, C., Martens, J.H., Xavier, R.J., Logie, C., Netea, M.G., Stunnenberg, H.G. (2014). Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204):1-26.
- Takeda, K. y Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.*, 16(1):3-9.

VII. Discusión general

Previamente se reportó que un extracto de semilla de aguacate rico en derivados lipídicos de cadena larga (DLCL), el cual posee mayoritariamente acetogeninas y ácidos grasos de cadena larga, inhibió la internalización de *S. aureus* en las CEMB hasta un 80% en una concentración de 100 ng/ml (Báez-Magaña et al., 2019). El DLCL es una mezcla de diferentes compuestos y en este trabajo se purificó el compuesto mayoritario, el cual es una acetogenina de 17 carbonos presente únicamente en el aguacate, que fue llamada kupandina. En este trabajo se reportó que la kupandina en una concentración equivalente a 66 nM inhibe la internalización de forma equivalente a los DLCL, también el mecanismo de inhibición de la internalización entre el DLCL y la kupandina es similar, ambos inhibieron la adhesión de *S. aureus* a la CEMB hasta un 35 y 50% respectivamente, e indujeron la producción de compuestos antimicrobianos como el óxido nítrico (NO) que son liberados al medio extracelular y eliminan alrededor de un 40 a un 55% de las bacterias (Tabla 2), debido a los efectos similares entre los DLCL y la kupandina, se sugiere que la kupandina de la semilla de aguacate es la responsable de inhibir la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, el pretratamiento de las CEMB con DLCL y la kupandina inducen la eliminación extracelular de aproximadamente el 40% de las bacterias, esto pudiera ser debido a la inducción de la secreción de antimicrobianos al medio extracelular, evitando de esta manera que las bacterias puedan ser internalizadas por las células epiteliales. Estos resultados corresponden con lo reportado en otras moléculas de naturaleza lipídica como el estradiol, el cual indujo la secreción de moléculas al medio condicionado disminuyendo la viabilidad de *S. aureus* hasta un 35%, debido a la secreción de NO y la defensina β 1 bovina (DEFB1) (Medina-Estrada et al., 2016), o la vitamina D, que disminuyó la internalización de *S. aureus* e indujo la producción de varios péptidos antimicrobianos (Téllez-Pérez et al., 2012a; Alva-Murillo et al., 2014c). Sin embargo, éste es el primer reporte sobre la inducción de moléculas antimicrobianas por las acetogeninas de aguacate en CEMB.

La vía canónica de la interacción entre las CEMB y *S. aureus* es a través de la ruta TLR-2/p38/AP-1, estos elementos son clave para que se lleve a cabo el reconocimiento e internalización de la bacteria así como la producción de péptidos antimicrobianos y algunas citocinas (Alva-Murillo et al., 2014a, 2015). Al analizar la abundancia en membrana del receptor

TLR2, se observó que los DLCL mostraron un efecto sobre la disminución de este receptor, sin embargo no se descarta la idea de que los DLCL pudieran estar actuando a través de otros receptores como los GPR40 y los GPR120. Además, existe la hipótesis de que los DLCL así como la kupandina que es una acetogenina logren ingresar a la células, esto se basa en el mecanismo reportado en un modelo de leucemia en el que la acetogenina de aguacate (Avocatina B) ingresa a la célula teniendo como blanco la mitocondria (Lee et al., 2015). También uno de los posibles blancos pueden ser los receptores PPAR, los cuales son receptores intracelulares que también actúan como factores transcripcionales, cuyos ligandos son los ácidos grasos de cadena larga (Liou et al., 2011; Wahli and Michalik, 2012). Sin embargo, en este trabajo aún falta determinar cuál es el posible mecanismo de entrada de los DLCL y/o la kupandina. Otro punto clave durante la internalización de *S. aureus* es la fosforilación de la MAPK cinasa p38 (Alva-Murillo et al., 2015, 2017; Medina-Estrada et al., 2016), en este trabajo se demostró que el DLCL inhibió la fosforilación de esta cinasa, aunque, el efecto de la kupandina sobre la activación de las MAPK no fue evaluado.

Por otra parte, se analizó la capacidad inmunomoduladora de los DLCL y de la kupandina, aunque ambos indujeron la expresión de la citocina IL-10, los DLCL antes de la infección incrementaron la expresión hasta 12 veces y la kupandina lo indujo 1.8 veces; después de la infección, la expresión incrementó 21 veces para el DLCL y 12 veces para la kupandina. Después de la infección, ambos tratamientos inhibieron la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α 0.4 veces para DLCL y 0.8 veces por la kupandina, además de que los DLCL inducen la expresión de la defensina BNBD5 hasta 4 veces. Estos resultados sugieren que las acetogeninas de aguacate presentan efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores en un modelo de interacción hospedero patógeno, lo cual coincide con los efectos antiinflamatorios reportados en queratinocitos dañados por luz UV (Rosenblat et al., 2011), y los efectos antiinflamatorios de la mezcla de aceite de aguacate y soya en el tratamiento de la osteoartritis (Au et al., 2007; Heinecke et al., 2010).

Durante la interacción hospedero-patógeno, los mecanismos epigenéticos tienen un papel importante para que se establezca una respuesta inmune adecuada, además las modificaciones epigenéticas en algunas ocasiones son inducidas por los propios patógenos como estrategia para garantizar el éxito de la infección (Hamon and Cossart, 2008; Bierne et al., 2012; Duval et al., 2016). Los lípidos y algunos derivados de lípidos son moduladores de los mecanismos

epigenéticos de la célula, tal es el caso del ácido eicosapentaenoico, alfa-linoleico, docosahexaenoico y linoleico, los cuales se han relacionado con alteraciones en la metilación de ADN, modificaciones de histonas y expresión de ARN no codificantes, aunque se desconocen los mecanismos por los que ocurren estas modificaciones (Lau et al., 2019). Asimismo, las plantas son una fuente de derivados de lípidos, como el ácido anacárdico y la escuamocina que inducen modificaciones epigenéticas. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte de las propiedades epigenéticas de las acetogeninas del aguacate, ya que tanto los DLCL como la kupandina inducen cambios químicos sobre la cola de la histona H3. En el caso de los DLCL, éstos incrementaron la di y trimetilación en la lisina 9 (H3K9me2 y H3K9me3), efecto que se vio potenciado cuando las CEMB fueron infectadas con *S. aureus*. En cambio, la kupandina disminuyó estas modificaciones. También se evaluó la actividad de las HDACs (enzimas responsables de eliminar las marcas de acetilación) y se observó que los efectos de los DLCL y la kupandina sobre las marcas químicas de las histonas son independientes de la actividad de estas enzimas. Para complementar esta función es necesario evaluar las interacciones que pueden tener con otras enzimas remodeladoras de la cromatina como las HAT, KDM, entre otras.

Las modificaciones epigenéticas en las infecciones brindan información sobre la interacción entre los microorganismos y el hospedero, actúan como marcadores moleculares de la enfermedad, además amplían el panorama de blancos biológicos en la búsqueda de nuevos tratamientos (Cole et al., 2016). Las infecciones ocasionadas por *S. aureus* son complejas y la internalización de la bacteria es un paso clave para el éxito de la infección. De manera general, durante la internalización de *S. aureus* en el epitelio mamario bovino se requiere de la participación de receptores llamados integrinas, la formación de un foco de adhesión regulado por diferentes cinasas como FAK que inducen el rearrreglo del citoesqueleto de actina, y la internalización de la bacteria a través del endosoma (Alva-Murillo et al., 2014a; Josse et al., 2017). Sin embargo, este proceso es muy complejo y aún se desconocen muchos de los elementos que pueden estar involucrados.

En bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, ésta induce los niveles de HDAC1 en macrófagos y el bloqueo de esta enzima, está relacionado con la disminución de la supervivencia intracelular de la bacteria (Chandran et al., 2015). Como ya se mencionó anteriormente, *S. aureus* es un inductor de modificaciones epigenéticas que se han relacionado

con la modulación de la respuesta inmune; sin embargo, en esta investigación se demostró que *S. aureus* requiere de la participación de las HDACs para llevar a cabo la internalización, y de acuerdo con la literatura este es el primer reporte sobre la relación directa entre el proceso de internalización y las HDACs. También se analizó el efecto entre los DLCL y la kupandina en la interacción de las HDACs durante el proceso de internalización y los resultados mostraron que solo la kupandina actúa de forma conjunta con las HDACs, por lo que de esta manera pudiera inhibir la internalización de *S. aureus*. Otros lípidos como los ácidos grasos de cadena corta (ej. ácido butírico) han demostrado presentar efectos inmunomodulares, ser modificadores epigenéticos e inhibir la internalización de *S. aureus*. Por todo lo anterior, los lípidos son una alternativa potencial para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *S. aureus* como es la mastitis bovina.

Una parte importante de la regulación epigenética es la expresión de miRNAs no codificantes, los resultados muestran que los DLCL incrementan el perfil de los miRNA durante el proceso infeccioso, además algunos de estos están relacionados con elementos de la respuesta inmune como las citocinas y péptidos antimicrobianos. Aunque se requieren más análisis que permita determinar si los DLCL son capaces de regular la expresión de genes de la RII a través de los miRNA durante el proceso infeccioso, además es interesante evaluar los efectos de la kupandina sobre el perfil de los miRNAs y compararlos con los DLCL. Estos resultados muestran que las acetogeninas de aguacate además de presentar propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y citotóxicas contra líneas cancerosas (D'Ambrosio et al., 2011; Rosenblat et al., 2011; Rodríguez-Sánchez et al., 2013; Lee et al., 2015), también son inmunomodulares y moduladores epigenéticos lo que puede estar relacionado con la inhibición de la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

Tabla 2. Comparación de los efectos de los DLCL y la kupandina en la internalización de *S. aureus* en las CEMB

Efecto	DLCL	Kupandina
Actividad antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i>	No (1-500 ng/ml) hasta 24 h	No (0.66 – 132 nM) hasta 24 h

Tabla 2. Continuación

Citotoxicidad sobre las CEMB	No (1-500 ng/ml) 24 y 48 h	No (0.66 – 132 nM) 24 y 48 h
Internalización de <i>S. aureus</i>	Pretratamiento 24 h inhibió ~80 % (100 ng/ml)	Pretratamiento 24 h inhibió ~80 % (66 nM)
Adhesión bacteriana	Pretratamiento 24 h inhibió ~35 % (100 ng/ml)	Pretratamiento 24 h inhibió ~50 % (66 nM)
Viabilidad de <i>S. aureus</i> en medio condicionado	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (100 ng/ml) inhibió la viabilidad de <i>S. aureus</i> ~40 %	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (66 nM) inhibió la viabilidad de <i>S. aureus</i> ~55 %
Producción de óxido nítrico (NO ₂)	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (100 ng/ml) incrementó ~80%	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (66 nM) incrementó ~80%
Producción de especies reactivas de oxígeno (EROS)	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (100 ng/ml) no cambió la producción	Medio condicionado de las CEMB pretratadas 24 h (100 ng/ml) no cambió la producción

VIII. CONCLUSIÓN GENERAL

Los DLCL de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhiben la internalización de *S. aureus*, modulan diferencialmente el estado de activación de las cinasas MAPKs/Akt y la expresión de genes de la respuesta inmune innata, mostrando un perfil antiinflamatorio, además de modular las modificaciones epigenéticas.

La kupandina de semilla de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) es el compuesto mayoritario responsable de inhibir la internalización de *S. aureus* en las CEMB de manera similar a los DLCL, además de regular la expresión de genes de la RII y de inducir modificaciones epigenéticas en estas células.

IX. REFERENCIAS

- Aitken, S.L., Corl, C.M., Sordillo, L.M., 2011. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 16, 291–304. doi:10.1007/s10911-011-9230-4
- Allis, C.D., Jenuwein, T., 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500. doi:10.1038/nrg.2016.59
- Allis, D.C., Caparros, M. L., Jenuwein, T., Lachner, M., Reinberg, D., 2015. Chapter 3: Overview and concepts, *Epigenetics*, Second. ed. pp 47-105
- Allis, D.C., Jenuwein, T., Reinberg, D., 2007. Chapter 3: Overview and Concepts. *Epigenetics*. pp 23–40
- Alva-Murillo, N., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2014a. Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/538546
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.025
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2017. Sodium Octanoate Modulates the Innate Immune Response of Bovine Mammary Epithelial Cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 Pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–15. doi:10.3389/fcimb.2017.00078
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2013. Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Biomed Res. Int.* 2013. doi:10.1155/2013/927643
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol.* 155, 324–331. doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.025
- Alva-Murillo, N., Téllez-Pérez, A.D., Medina-Estrada, I., Álvarez-Aguilar, C., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2014b. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary

epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microb. Pathog.* 77, 24–30. doi:10.1016/j.micpath.2014.10.006

Atalla, H., Gyles, C., Mallard, B., 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143, 319–328. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.030

Au, R.Y., Al-Talib, T.K., Au, A.Y., Phan, P.V., Frondoza, C.G., 2007. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte/macrophages. *Osteoarthr. Cartil.* 15, 1249–1255. doi:10.1016/J.JOCA.2007.07.009

Báez-Magaña, M., 2014. Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 74

Báez-Magaña, M., Díaz-Murillo, V., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2018. Immunomodulatory effects of thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on bovine mammary epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 57, 47-54. doi:10.1016/j.intimp.2018.02.001

Baravalle, C., Dallard, B.E., Ortega, H.H., Neder, V.E., Canavesio, V.R., Calvinho, L.F., 2010. Effect of *Panax ginseng* on cytokine expression in bovine mammary glands at drying off. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 224–230. doi:10.1016/j.vetimm.2010.07.019

Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89, 1877–95. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1

Barth, T.K., Imhof, A., 2010. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem. Sci.* 35, 618–626. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.006

Beccaria, C., Silvestrini, P., Renna, M.S., Ortega, H.H., Calvinho, L.F., Dallard, B.E., Baravalle, C., 2018. *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. *Microb. Pathog.* 122, 63–72. doi:10.1016/j.micpath.2018.06.010

Bierne, H., Hamon, M., Cossart, P., 2012. Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1-24. doi:10.1101/cshperspect.a010272

- Cassone, A., 2018. The case for an expanded concept of trained immunity. *mBio* 9:e00570-18. doi.org/10.1128/mBio .00570-18
- Cavaillon, J.-M., 2015. Molecular Mediators: Cytokines. *Rev. Cell Biol. Mol. Med.* 1, 1–37. doi:10.1002/3527600906.mcb.200400134.pub2
- Chandran, A., Antony, C., Jose, L., Mundayoor, S., Natarajan, K., Ajay Kumar, R., 2015. *Mycobacterium tuberculosis* infection induces HDAC1-mediated suppression of IL-12B gene expression in macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–14. doi:10.3389/fcimb.2015.00090
- Chappell, C.P., Jacob, J., 2007. Crossroads between Innate and Adaptive Immunity IV. doi:10.1007/978-0-387-34814-8_10. Pp 43-48
- Cole, J., Morris, P., Dickman, M.J., Dockrell, D.H., 2016. The therapeutic potential of epigenetic manipulation during infectious diseases. *Pharmacol. Ther.* 167, 85–99. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.07.013
- D'Ambrosio, S.M., Han, C., Pan, L., Douglas Kinghorn, A., Ding, H., 2011. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 465–469. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.027
- Daley, M.J., Coyle, P.A., Williams, T.J., Furda, G., Dougherty, R., Hayes, P.W., 2010. Staphylococcus aureus Mastitis: Pathogenesis and Treatment with Bovine Interleukin-1 β and Interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74, 4413–4424. doi:10.3168/jds.s0022-0302(91)78637-2
- Dancy, B.M., Cole, P.A., 2015. Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem. Rev.* 115, 2419–2452. doi:10.1021/cr500452k
- de Lima, T.M., de Sa Lima, L., Scavone, C., Curi, R., 2006. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. *FEBS Lett.* 580, 3287–3295. doi:10.1016/J.FEBSLET.2006.04.091
- 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. doi:10.1016/j.peptides.2016.02.008

Duval, M., Cossart, P., Lebreton, A., 2017. Mammalian microRNAs and long noncoding RNAs in the host-bacterial pathogen crosstalk. *Semin. Cell Dev. Biol.* 65, 11-19. doi:10.1016/j.semcdb.2016.06.016

Erskine, R.J., Bartlett, P.C., Tavernier, S.R., Fowler, L.H., Walker, R.D., Seguin, J.H., Shuster, D., 2010. Recombinant bovine Interleukin-2 and dry cow therapy: Efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation. *J. Dairy Sci.* 81, 107–115. doi:10.3168/jds.s0022-0302(98)75557-2

Farber, D.L., Netea, M.G., Radbruch, A., Rajewsky, K., Zinkernagel, R.M., 2016. Immunological memory: Lessons from the past and a look to the future. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 124–128. doi:10.1038/nri.2016.13

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 61–98. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445

Fraunholz, M., Sinha, B., 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 1-10. doi:10.3389/fcimb.2012.00043

Ganz, T., 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43, 300–304. doi:10.1093/icb/43.2.300

Garzoni, C., Kelley, W.L., 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* 17, 59–65. doi:10.1016/j.tim.2008.11.005

Gayon, J., 2016. De Mendel à l'épigénétique : histoire de la génétique. *Comptes Rendus - Biol.* 339, 225–230. doi:10.1016/j.crv.2016.05.009

German, T., Barash, I., 2002. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 38, 282. doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0282:coaekl>2.0.co;2

Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–8. doi:10.1016/j.cell.2007.02.006

Gordon, S., 2016. Phagocytosis: An immunobiologic process. *Immunity* 44, 463–475. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026

Guzmán-Rodríguez, J.J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., López-Meza, J.E., 2015. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *Biomed Res. Int.* 2015, 1-11. doi:10.1155/2015/735087

Hamon, M.A., Cossart, P., 2008. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe* 4, 100–9. doi:10.1016/j.chom.2008.07.009

He, Y., Song, M., Zhang, Yi, Li, X., Song, J., Zhang, Yuan, Yu, Y., 2016. Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 17, 1–12. doi:10.1186/s12864-016-2947-0

Heine, H., 2008. Innate immunity of plants, animals, and humans. *Nucleic acids and molecular biology*. 21, 1-237. doi:10.1007/978-3-540-73930-2

Heinecke, L.F., Grzanna, M.W., Au, A.Y., Mochal, C.A., Rashmir-Raven, A., Frondoza, C.G., 2010. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in chondrocytes by avocado soybean unsaponifiables and epigallocatechin gallate. *Osteoarthritis. Cartil.* 18, 220–227. doi:10.1016/j.joca.2009.08.015

Hiitiö, H., Vakkamäki, J., Simojoki, H., Autio, T., Junnila, J., Pelkonen, S., Pyörälä, S., 2017. Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Vet. Scand.* 59, 22. doi:10.1186/s13028-017-0288-x

Hoffmann, C., Ohlsen, K., Hauck, C.R., 2011. Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 891–896. doi:10.1016/j.ejcb.2011.03.001

Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S., 2010. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci.* 75, 399–405. doi:10.3168/jds.s0022-0302(92)77775-3

Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M., 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16–23. doi:10.1080/00480169.2011.547165

Hoque, M.N., Das, Z.C., Rahman, A.N.M.A., Hoque, M.M., 2016. Effect of administration of vitamin E, selenium and antimicrobial therapy on incidence of mastitis, productive and reproductive performances in dairy cows. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 4, 63–70. doi:10.1016/j.ijvsm.2016.11.001

Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Pérez-Torres, C.A., Albert, V.A., Mockaitis, K., Kilaru, A., López-Gómez, R., Cervantes-Luevano, J.I., Herrera-Estrella, L., 2015. Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics* 16, 1–18. doi:10.1186/s12864-015-1775-y

- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33 Suppl, 245–254. doi:10.1038/ng1089
- Jin, W., Ibeagha-Awemu, E.M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X., Guan, L.L., 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics.* 15, 1-16. doi:10.1186/1471-2164-15-181
- Josse, J., Laurent, F., Diot, A., 2017. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Front. Microbiol.* 8, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2017.02433
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Kerro Dego, O., van Dijk, J.E., Nederbragt, H., 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24, 181–198. doi:10.1080/01652176.2002.9695135
- Lara-Zárate, L., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., 2011. *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 51, 313–318. doi:10.1016/j.micpath.2011.07.010
- Lau, A.T.Y., Yu, F.-Y., Xu, Y.-M., 2019. Epigenetic effects of essential fatty acids. *Curr. Pharmacol. Reports* 5, 68–78. doi:10.1007/s40495-019-00166-9
- Lebish, I.J., Moraski, R.M., 1987. Mechanisms of immunomodulation by drugs. *Toxicol. Pathol.* 15, 338–345. doi:10.1177/019262338701500312
- Lee, C.-C., Lin, Y.-H., Chang, W.-H., Lin, P.-C., Wu, Y.-C., Chang, J.-G., 2011. Squamocin modulates histone H3 phosphorylation levels and induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells. *BMC Cancer* 11, 1-9. doi:10.1186/1471-2407-11-58
- Lee, E.A., Angka, L., Rota, S., Hanlon, T., Mitchell, A., Hurren, R., Wang, X.M., Gronda, M., Boyaci, E., Bojko, B., Minden, M., Sriskanthadevan, S., Datti, A., Wrana, J.L., Edginton, A., Pawliszyn, J., Joseph, J.W., Quadriatero, J., Schimmer, A.D., Spagnuolo, P.A., 2015. Targeting mitochondria with Avocatin B induces selective leukemia cell death. *Cancer Res.* 75, 2478–2489. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2676

- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673. doi:10.1038/nrg887
- Li, Y., Gong, Q., Guo, W., Kan, X., Xu, D., Ma, H., Fu, S., Liu, J., 2018. Farrerol relieve lipopolysaccharide (LPS)-induced mastitis by inhibiting AKT/NF- κ B p65, ERK1/2 and P38 signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–12. doi:10.3390/ijms19061770
- Ling, H., Fabbri, M., Calin, G.A., 2013. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 847-865. doi:10.1038/nrd4140
- Liou, A.P., Lu, X., Sei, Y., Zhao, X., Pechhold, S., Carrero, R.J., Raybould, H.E., Wank, S., 2011. The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates Long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology.* 140, 903-912.e4. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.012
- Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sacco, R.A., Nonnecke, B.J., Nelson, C.D., 2011. Treatment of an intramammary bacterial infection with 25-hydroxyvitamin D 3. *PLoS One.* 6, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0025479
- Medina-Estrada, I., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Ochoa-Zarzosa, A., 2016. Anti-Inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Mediators Inflamm.* 2016, 1–16. doi:10.1155/2016/6120509
- Modak, R., Das Mitra, S., Vasudevan, M., Krishnamoorthy, P., Kumar, M., Bhat, A. V., Bhuvana, M., Ghosh, S.K., Shome, B.R., 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, 1-15. doi:10.1186/1868-7083-6-12
- Modak, R., Mitra, S. Das, Krishnamoorthy, P., Bhat, A., Banerjee, A., Gowsica, B.R., Bhuvana, M., Dhanikachalam, V., Natesan, K., Shome, R., Shome, B.R., Kundu, T.K., 2012. Histone H3K14 and H4K8 hyperacetylation is associated with *Escherichia coli* induced mastitis in mice. *Epigenetics* 7, 492–501. doi:10.4161/epi.19742
- Morales-Pérez, A. 2018. Efecto del péptido antimicrobiano PaDef (*Persea americana*) sobre la expresión de genes de la respuesta inmune innata de células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*, Tesis Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.

Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Lippolis, J.D., Sacco, R.E., Nonnecke, B.J., 2012. Vitamin D signaling in the bovine immune system: A model for understanding human vitamin D requirements. *Nutrients* 4, 181–196. doi:10.3390/nu4030181

Netea, M.G., 2013. Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 881–884. doi:10.1111/eci.12132

Netea, M.G., Quintin, J., Van Der Meer, J.W.M., 2011. Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. doi:10.1016/j.chom.2011.04.006

Newton, K., Dixit, V.M., 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1-19. doi:10.1101/cshperspect.a006049

Nickerson, S.C., 2011. Mastitis pathogens. *Encycl. Dairy Sci.* 408–414.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–12. doi:10.3389/fendo.2018.00402

Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H., López-Meza, J.E., 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog.* 47, 1–7. doi:10.1016/j.micpath.2009.04.006

Oikonomou, G., Machado, V.S., Santisteban, C., Schukken, Y.H., Bicalho, R.C., 2012. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS One*, 7, 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0047671

Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L.M., 2012. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front. Immunol.* 3, 1-17. doi:10.3389/fimmu.2012.00079

Park, A.J., Okhovat, J.P., Kim, J., 2017. Antimicrobial peptides. *Clin. Basic Immunodermatology Second Ed.* 26, 81–95. doi:10.1007/978-3-319-29785-9_6

Peterson, C.L., Laniel, M., 2004. Histones and histone modifications. 14, 546–551. doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 1619–1633. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012

- Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J.W., Netea, M.G., 2014. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 29C, 1–7. doi:10.1016/j.coi.2014.02.006
- Rodríguez-López, C.E., Hernández-Brenes, C., de la Garza, R.I.D., 2015. A targeted metabolomics approach to characterize acetogenin profiles in avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Rsc Adv.* 5, 106019–106029. doi:10.1039/C5RA22854A
- Rodríguez-López, C.E., Hernández-Brenes, C., Treviño, V., Díaz de la Garza, R.I., 2017. Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed. *BMC Plant Biol.* 17, 9–12. doi:10.1186/s12870-017-1103-6
- Rodríguez-Sánchez, D., Silva-Platas, C., Rojo, R.P., García, N., Cisneros-Zevallos, L., García-Rivas, G., Hernández-Brenes, C., 2013. Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea americana*). *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 942–943, 37–45. doi:10.1016/j.jchromb.2013.10.013
- Rodríguez-Saona, C., Millar, J.G., Trumble, J.T., 1998. Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. *J. Nat. Prod.* 61, 1168–1170. doi:10.1021/np980127q
- Rosenblat, G., Meretski, S., Segal, J., Tarshis, M., Schroeder, A., Zanin-Zhorov, A., Lion, G., Ingber, A., Hochberg, M., 2011. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 239–246. doi:10.1007/s00403-010-1088-6
- Schauber, J., Gallo, R.L., 2008. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 261–266. doi:10.1016/j.jaci.2008.03.027
- Schleimer, R.P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., Avila, P.C., 2007. Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 1279–1284. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.046
- Seto, E., Yoshida, M., 2015. Epigenetic Erasers of histone acetylation. *Epigenetics*, second ed. pp. 984.
- Shmaryahu, A., Carrasco, M., Valenzuela, P.D.T., 2014. Prediction of bacterial microRNAs and possible targets in human cell transcriptome. *J. Microbiol.* 52, 482–489. doi:10.1007/s12275-014-3658-3

Song, M., He, Y., Zhou, H., Zhang, Y., Li, X., Yu, Y., 2016. Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. Nat. Publ. Gr. 6, 1-15. doi:10.1038/srep29390

Sordillo, L.M., Snider, M., Babiuk, L.A., 1992. Physiological and morphological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interferon-gamma. Can. J. Vet. Res. 56, 22–27.

Sordillo, L.M., Snider, M., Hughes, H., Afseth, G., Campos, M., Babiuk, L.A., 2010. Pathological Changes in Bovine Mammary Glands Following Intramammary Infusion of Recombinant Interleukin-2. J. Dairy Sci. 74, 4164–4174. doi:10.3168/jds.s0022-0302(91)78611-6

Strahl, B.D., Allis, D.C., 2000. The language of covalent histone modifications. Nature. 403, 41–5. doi:10.1038/47412

Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., Sekerkova, A., 2014. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. Clin. Sci. 126, 593–612. doi:10.1042/CS20130497

Sullivan, K.E., Reddy, a B.M., Dietzmann, K., Suriano, a R., Kocieda, V.P., Stewart, M., Bhatia, M., 2007. Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. Mol. Cell. Biol. 27, 5147–5160. doi:10.1128/MCB.02429-06

Sun, J., Aswath, K., Schroeder, S.G., Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Sonstegard, T.S., 2015. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. BMC Genomics 16, 1–10. doi:10.1186/s12864-015-2044-9

Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T., Chaturvedi, M.M., Liu, M., Aggarwal, B.B., 2015. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B – regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B kinase, leading to potentiation of apoptosis. 111, 4880–4892. doi:10.1182/blood-2007-10-117994.

Téllez-Pérez, A.D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2012. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. Vet. Microbiol. 160, 91–98. doi:10.1016/j.vetmic.2012.05.007

- Vanselow, J., Yang, W., Herrmann, J., Zerbe, H., Schuberth, H.J., Petzl, W., Tomek, W., Seyfert, H.M., 2006. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the α S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of a α S1-casein synthesis during acute mastitis. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 463–477. doi:10.1677/jme.1.02131
- Wahli, W., Michalik, L., 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 351–363. doi:10.1016/j.tem.2012.05.001
- Wang, J., Wei, Z., Zhang, X., Wang, Y., Yang, Z., Fu, Y., 2017. Propionate protects against lipopolysaccharide-induced mastitis in mice by restoring blood-milk barrier disruption and suppressing inflammatory response. *Front. Immunol.* 8, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2017.01108
- Wang, X., Beno-Moualem, D., Kobiler, I., Leikin-Frenkel, A., Lichter, A., Prusky, D., 2004. Expression of Δ 12 fatty acid desaturase during the induced accumulation of the antifungal diene in avocado fruits. *Mol. Plant Pathol.* doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00249.X
- Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet. J.* 192, 148–152. doi:10.1016/j.tvjl.2011.09.013
- World Health Organization, 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO Press 1–28. doi:ISBN 978 92 4 150976 3
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R.M., Günther, J., Draing, C., von Aulock, S., Schuberth, H.J., Seyfert, H.M., 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45, 1385–1397. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.004
- Yang, Z., Fu, Y., Liu, B., Zhou, E., Liu, Z., Song, X., Li, D., Zhang, N., 2013. Farnesol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 65, 1–6. doi:10.1016/j.micpath.2013.08.002
- 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, 357–372. doi:10.1007/s10911-011-9236-y
- Zhou, V.W., Goren, A., Bernstein, B.E., 2011. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18. doi:10.1038/nrg2905

