



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

**Efecto anti inflamatorio y antimicrobiano del 17 β -Estradiol, en
células de epitelio mamario bovino, durante la internalización de
*Staphylococcus aureus***

Tesis

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Biotecnología Molecular Agropecuaria

Presenta:

M.C. Ricardo Ivan Medina Estrada

Asesora:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Co-asesor:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Sinodales:

Dr. Elva Mayra Toledo Cuevas

Dr. José Herrera Camacho

Dr. Ciro Estrada Chávez

Morelia, Michoacán, Agosto 2017.

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.1) y de CONACyT (CB-2012-178238)

Agradezco a CONACyT por la beca (385460) otorgada durante mis estudios de doctorado.

Para Ivana, mi gran Victoria...
Con todo mi amor, dedico este trabajo a mi princesa...
Gracias mi vida, nada que con palabras...

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis se debió a la colaboración de diversas personas que se dieron a la tarea de apoyarme a lo largo del doctorado y durante la elaboración del presente escrito.

Primeramente agradezco a mi asesora de tesis, la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Por su gran interés prestado en mi formación y crecimiento académico, además de su apoyo incondicional en los aspectos personales. Dra. Alejandra, mi respeto hacia su trayectoria como profesora-investigadora y como ser humano.

En segundo lugar, pero no menos importante. Agradezco al Dr. Joel Edmundo López Meza, por sus invaluable aportaciones al proyecto de tesis y su interés en mi formación académica. También debo reconocer su apoyo en cuestiones personales y por lo cual le estaré siempre agradecido.

A mi familia, por siempre estar... gracias por su apoyo incondicional. Gracias padres por brindarme el derecho a la educación, por siempre motivarme a ser una persona de bien, a capacitarme y prepararme para la vida. Gracias hermanos, porque con su ejemplo, siempre seguí por el camino correcto. Gracias sobrinos, porque me motivan a ser un buen ejemplo para ustedes. Gracias cuñadas por su apoyo en todos los momentos necesarios. Gracias familia, porque todos y cada uno influyeron de una u otra manera, y en menor o mayor proporción, para llegar a este punto. Gracias por su amor.

A mis compañeros, amigos y futuros colegas. La lista es grande y no quisiera cometer el grave error de, por omisión, dejar fuera a alguno. Por tal, quiero agradecerles a todos los compañeros del módulo M3, que siempre me apoyaron en mi proyecto, los que me enseñaron cuestiones de técnica y académicas. Gracias por haber colaborado en mi proyecto y por permitirme colaborar en los suyos. Me llevo una gran experiencia y un gran sabor de boca, porque, sin duda, sé que en más de alguno encontraré colaboraciones importantes en el futuro y grandes amistades.

Agradezco a mis sinodales, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del proyecto, sin duda alguna, sus pertinentes observaciones enriquecieron el trabajo realizado.

Y finalmente quiero agradecer a todo el personal docente y administrativo que forma parte del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, todos fueron pieza fundamental en mi formación académica.

CONTENIDO

	Página
I Abreviaturas	1
1 Resumen	2
2 Abstract	3
3 Introducción	4
3.1 Mastitis bovina	4
3.2 Respuesta inmune innata de la glándula mamaria: el papel del epitelio mamario bovino	5
3.2.1 Relevancia de los epitelios en la respuesta inmune innata	8
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.4 Estrógenos	12
3.4.1 Estradiol	14
3.4.2 Receptores de estrógenos	16
3.5 El Estradiol como inmunomodulador	18
3.5.1 El Estradiol en la respuesta inmune innata de epitelios	19
3.5.2 El Estradiol en el epitelio mamario bovino	19
4 Justificación	22
5 Hipótesis	24
6 Objetivos	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos específicos	24
7 Estrategia experimental	25
8 Resultados	27
8.1 CAPÍTULO I. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during <i>Staphylococcus aureus</i> internalization	28
8.2 CAPÍTULO II. Innate immune response signaling pathway associated to E2 during <i>Staphylococcus aureus</i> internalization into bovine mammary epithelial cells	45
8.3 CAPÍTULO III. Las hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas?	66
8.4 CAPÍTULO IV. Las hormonas, mensajeros químicos reguladores de nuestra salud	73
9 Discusión General	94
10 Conclusión General	99
11 Anexo I: Efecto inmunomodulador de la mezcla hormonal Estradiol/Prolactina durante la internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> en células de epitelio mamario bovino	100
12 Bibliografía Complementaria	122

I ABREVIATURAS

BNBD10: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 10

BNBD4: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 4

BNBD5: Defensina de Neutrófilos Bovina Beta 5

CEMB: Células de Epitelio Mamario Bovino

DEFB1: Defensina Beta 1

E2: 17 β -Estradiol

FAK: Cinasa de Adhesión Focal

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LAP: Péptido Antimicrobiano Lingual

PRL: Prolactina

RE: Receptor de Estrógenos

RIL: Respuesta Inmune Innata

TAP: Péptido Antimicrobiano Traqueal

TLR2: Receptor Tipo Toll 2

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

S100A7: Proteína S100A7 de unión a calcio (Psoriasina)

1 RESUMEN

Durante el parto, el ganado es más susceptible a infecciones (Mastitis). Este periodo se caracteriza por cambios en los niveles de hormonas sexuales, como el 17 β -estradiol (E2), el cual compromete la respuesta inmune innata (RII) del animal. Las células de epitelio mamario bovino (CEMB) son blanco de esta hormona, la cual regula su proliferación y diferenciación a través de sus receptores de estrógenos (RE). Se ha demostrado que el E2 presenta efectos anti inflamatorios, al revertir la respuesta inflamatoria causada por bacterias. Esta inmunomodulación se logra regulando distintas rutas de señalización, las cuales además, inducen la producción de péptidos antimicrobianos (PA). *Staphylococcus aureus* (principal agente causal de mastitis) tiene la capacidad de internalizarse en las CEMB usando el mecanismo zipper, en el cual participan el receptor integrina $\alpha 5 \beta 1$ y la cinasa FAK. El objetivo del trabajo fue evaluar los efectos del E2 sobre la RII en las CEMB durante la internalización de *S. aureus*. Las CEMB fueron tratadas con E2 e infectadas con *S. aureus* (ATCC-27543). Primeramente, se evaluó el efecto del E2 sobre la internalización bacteriana (ensayos de protección con gentamicina). Posteriormente, se midieron los receptores de superficie y la actividad de las cinasas asociadas a la RII (citometría de flujo). Seguimiento del estado de fosforilación de FAK y de los RE (Western blot). Se midió la expresión de genes de la RII y la secreción de las proteínas por RT-PCR y ELISA, respectivamente. Finalmente se evaluó la actividad de los factores transcripcionales asociados a la RII, mediante un ensayo de hibridación con un microarreglo. Los resultados mostraron que el E2 (50 pg/ml) disminuyó la internalización de *S. aureus* en las CEMB (~60%), lo cual se asoció con la reducción de la integrina en membrana (40%) y a la inhibición de FAK (50%). El E2 mostró efectos anti inflamatorios, ya que favoreció la expresión del gen de IL-10 (2 veces). Adicionalmente, la hormona presentó efectos antibacterianos, al inducir la expresión de PA como la DEFB1 (2.5 veces), BNBD5 (2 veces) y S100A7 (3 veces), lo cual se vinculó con la disminución de la viabilidad bacteriana presente en el medio (50%). Los efectos inmunomoduladores del E2 se asociaron a la inhibición de MAPKs cinasas p38 y ERK (~80% y ~90%), además a la activación de la cinasa Akt (2 veces); todo esto, teniendo como resultado la activación de factores transcripcionales, tales como, AP1 y STAT1. En conclusión, el E2 regula rutas de señalización de la RII, induciendo efectos antimicrobianos y anti inflamatorios en las CEMB, resultando en una mejor defensa contra *S. aureus*.

Palabras Clave: Estradiol, *S. aureus*, Internalización, Inflamación y Antimicrobiano.

2 ABSTRACT

During the peripartum, cattle are more susceptible to infectious diseases (i.e. Mastitis). This period is characterized by changes in the concentrations of sexual hormones, such as 17 β -estradiol (E2), which compromises the innate immune response (IIR) of the animal. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) are target tissue for this hormone, which regulates their proliferation and differentiation through estrogen receptors (ERs). In addition, E2 has shown anti-inflammatory effects because reverts the inflammatory response after the stimulation with bacterial components. This hormone mediates signaling pathways by inducing the production of antimicrobial peptides (AP). *Staphylococcus aureus* (principal mastitis pathogen) is able to internalize into bMECs using the “zipper” mechanism associated to α 5 β 1 integrin/FAK. The aim of this work was to evaluate the effects of E2 on elements of the IIR of bMECs during *S. aureus* internalization. bMECs were treated with E2 (24 h) and infected with *S. aureus* (ATCC-27543). We evaluated bacterial internalization by gentamicin protection assays. To measure surface receptors and kinase activity we used flow cytometry. Using Western Blot, we analyzed the phosphorylation state of FAK and ERs. The expression of IIR genes and protein secretion were analyzed by RT-qPCR and ELISA, respectively. We evaluated the activated IIR transcriptional factors using a microarray (Panomics). The results indicate that E2 (50 pg/ml) decreased *S. aureus* internalization (~60%), which was associated with the integrin surface reduction (~40%) and FAK inhibition (~50%). E2 showed anti-inflammatory effects in bMECs, since up-regulated IL-10 (2 fold) and IL-8 (4 fold) gene expression. In addition, E2 showed antibacterial activity because induced the gene expression of the AP DEFB1 (2.5 fold), BNBD5 (2 fold) and S100A7 (3 fold), which was related to the antibacterial effect against non-internalized *S. aureus* (reduction of ~50% of viability) in the conditioned medium from E2-treated bMECs. These effects were associated to the inhibition of p38 (~80%) and ERK (~90%) MAPKs, and with the up-regulation of the activity of the kinase AKT (2 fold), resulting in the activation of the transcriptional factors: AP1, and STAT1. In conclusion, E2 modulates IIR signaling pathways to induce antimicrobial and anti-inflammatory response in bMECs, while reducing *S. aureus* internalization.

Key Words: Estradiol, *S. aureus*, Internalization, Inflammation and Antimicrobial.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina (MB), tanto en México como en todo el mundo, genera pérdidas económicas, estimadas en un gasto anual/vaca de 200 dólares (Østeras, 2000). Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, y se puede presentar de manera subclínica y clínica. La forma clínica se caracteriza por una inflamación evidente de la glándula mamaria, dolor a la palpación, grumos en la leche y secreciones que pueden ser desde purulentas hasta sanguinolentas. En contraste, la mastitis subclínica se presenta en ausencia de signos, a excepción de la disminución en la producción de leche, por lo que su tratamiento es más complicado y su diagnóstico sólo se logra con el conteo de células somáticas en la leche. Este tipo de MB se asocia principalmente al desbalance de la respuesta inmune innata (RII), que puede estar dado por cambios drásticos en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales durante el periodo del parto; hormonas tales como el estradiol (E2) (Lamote et al, 2006). Los principales agentes causales de la MB son microorganismos infecciosos, los cuales atacan los diversos tejidos de la glándula mamaria, incluyendo al epitelio mamario (Wanasinghe, 1981). El principal microorganismo causante de MB es *Staphylococcus aureus*. Éste se aísla en más del 70% de los casos de MB subclínica (*Escherichia coli* es el principal patógeno asociado a mastitis clínica) y tiene la capacidad de infectar células de epitelio mamario bovino (CEMB), tanto *in vivo* como *in vitro* (Kerro-Dego et al, 2002). Algunas cepas de *S. aureus*, pueden internalizarse en las CEMB, no solo evadiendo así la respuesta inmune y antimicrobiana de los organismos, sino también logrando multiplicarse en el interior de las células. Esta característica de la bacteria se ve reflejada en la presentación de infecciones crónicas y recurrentes (Sinha y Hermann, 2002).

Existen reportes de la participación de distintas hormonas y su asociación con la MB. Al respecto, en nuestro grupo de trabajo se ha reportado que la hormona prolactina, a una concentración de 5 ng/ml, estimula la internalización de *S. aureus* en las CEMB y en conjunto con la bacteria, regula elementos de la respuesta inmune innata en estas células, como la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Gutiérrez-Barroso, 2007).

3.2 RESPUESTA INMUNE INNATA DE LA GLÁNDULA MAMARIA: EL PAPEL DEL EPITELIO MAMARIO BOVINO

La RII es la primera línea de defensa y reparación ante un daño al organismo, esta se caracteriza por la producción temprana de mediadores de la inflamación. En las vacas lecheras la principal enfermedad infecciosa es la mastitis subclínica, la cual disminuye la producción y la calidad de la leche, ya que al verse comprometida la glándula mamaria, ésta destinará energía para tratar de eliminar la infección y reparar el daño en el tejido, dejando en segundo plano la producción de leche. La glándula mamaria está conformada por distintos tipos celulares, tales como, fibroblastos (tejido conectivo), mioepitelio (facilita las contracciones) y epitelio mamario bovino (productor de los componentes de la leche), este epitelio al igual que los demás, sirve como primera línea de defensa (barrera física) ante patógenos potenciales. Cuando un patógeno logra atravesar el esfínter del pezón, este llega hasta la cisterna e incluso al lumen alveolar; el epitelio a través de sus receptores membranales, reconoce al patógeno e induce diversas respuestas celulares, las cuales promoverán la producción de mediadores de la inflamación y la llegada de células especializadas, como fagocitos profesionales (Tomasinsig et al, 2010). Tras la activación de la RII, en la mayoría de los casos se logra eliminar la infección y reparar el daño tisular sin que el animal muestre signos de la enfermedad. Pero en ocasiones la RII de la glándula mamaria no es tan efectiva o es evadida por el patógeno, es entonces, cuando se manifiestan signos de la enfermedad y el microorganismo logra invadir, colonizar y persistir en la glándula mamaria (Tuchscher et al, 2010).

La severidad de la infección depende del tipo de patógeno que invade al epitelio mamario, ya que en función de esto será el grado de respuesta inmunológica. *Escherichia coli* es la principal bacteria Gram negativa aislada de casos de mastitis clínica, que se caracteriza por una respuesta inflamatoria exacerbada y signos muy visibles de la enfermedad (dolor, secreciones purulentas, etc.). *S. aureus* es el principal agente causal de la mastitis subclínica, esta bacteria tiene la capacidad de internalizarse en las CEMB. En esta forma de mastitis la respuesta inflamatoria está disminuida y los signos de la enfermedad son inapreciables (a diferencia de la mastitis clínica), haciendo más difícil su diagnóstico y tratamiento ya que, en su mayoría las terapias antimicrobianas no van dirigidas contra bacteria intracelulares (Yunhe et al, 2013).

Las CEMB son las encargadas de la producción y secreción de los componentes de la leche, tales como la κ -caseína. Cuando *S. aureus* infecta el epitelio disminuyen la producción y secreción de estos elementos, lo que se traduce en la reducción de la calidad y cantidad de leche. La capacidad del epitelio mamario para responder ante una infección depende en gran medida del estado inmunológico del animal, existen elementos propios del animal, como las hormonas, las cuales juegan un papel muy importante en la susceptibilidad a presentar o no infecciones intramamarias, estos elementos están íntimamente relacionados con la modulación de la RII en los epitelios (Lamote et al, 2007).

El epitelio mamario se encarga de censar lo que es patógeno de lo que no. Para ello, se expresan en la superficie de las células epiteliales mamarias patrones de reconocimiento de patógenos (PRRs) los cuales interactúan con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los receptores tipo Toll (TLRs) forman parte de los PRRs, este tipo de receptores de superficie se identificaron primeramente en la mosca de la fruta (*Drosophila*), donde inicialmente se les asociaba a vías de señalización en el desarrollo embrionario y posteriormente en la defensa contra hongos. Actualmente, se han descrito estos TLRs en plantas, vertebrados e invertebrados, donde desempeñan funciones de reconocimiento de patógenos y activación de rutas de señalización asociadas a la RII (Fisher et al, 2001). Existen dos vías de señalización de los TLRs, la dependiente de la proteína adaptadora MyD88 y la independiente de esta, por ambas vías se reclutan cinasas de la familia IRAK, las cuales interactúan con TRAK, permitiendo la fosforilación de MAPK cinasas o de otras cinasas como Akt, e inclusive elementos de respuesta a interferón. Estas rutas pueden inducir la fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa B (IKKb), promoviendo su disociación del factor nuclear kappa B (NF-kB), lo cual promueve la translocación al núcleo de NF-kB pudiendo así, inducir la expresión de mediadores de la inflamación (principalmente citocinas pro inflamatorias), además de este factor de transcripción, se pueden activar otros, tales como, AP-1, SP1, CREB, etc. los cuales también están asociados con la RII.

En el caso de los bovinos, se han reportado 10 TLRs, sin embargo, en las CEMB el receptor TLR2 es al que se le ha asociado en el reconocimiento de *S. aureus* (principal causante de MB subclínica) el cual reconoce a dicha bacteria a través del ácido lipoteicoico presente en su membrana. Tras este reconocimiento, TLR2 puede formar

homo o heterodímeros con otros TLRs (TLR1, TLR6, etc.) y así desencadenar rutas de señalización las cuales modularan la expresión y secreción de diversos componentes de la RII, como péptidos antimicrobianos, óxido nítrico, citocinas pro y antiinflamatorias, así como quimiocinas (Rainard y Riollot, 2006; Schukken et al, 2011). La modulación de la RII está mediada en gran parte por la interacción que se genera entre el patógeno y el hospedero; sin embargo, existen elementos que también pueden estar influyendo en la RII de la célula (Kerro-Dego, 2002).

Además de esta interacción entre *S. aureus* y TLR2, la bacteria puede unirse de manera indirecta con otro grupo de receptores membranales, como las integrinas. Las integrinas están conformadas por dos subunidades, una alfa (se conocen 16 cadenas α) y una beta (se conocen 8 cadenas β), estas glicoproteínas tienen principalmente ligandos presentes en la matriz extracelular, como la vimentina, colágena, fibronectina, etc. y sus funciones están centradas en la adherencia a la matriz extracelular, para dar soporte a los tejidos, participan en la migración, diferenciación y proliferación de diversos tipos celulares, además de estar asociados a rutas de la RII y en procesos infecciosos. *S. aureus* logra persistir en el interior del EMB ya que se internaliza a través del mecanismo de internalización tipo zipper (Figura 2) el cual involucra a las proteínas de unión a fibronectina presentes en la superficie de la bacteria que se unen a la fibronectina, la cual es un componente de la matriz extracelular y es el ligando natural de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ presente en la membrana de las CEMB. Este puente molecular conlleva a la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK), la cual participa en la señalización para el re-arreglo del citoesqueleto de actina y la posterior formación del endosoma, donde la bacteria puede persistir y diseminarse causando infecciones crónicas y recurrentes (Alva-Murillo et al, 2014; Medina-Estrada et al, 2015). Este tráfico de integrinas, el cual esta mediado principalmente por la cinasa FAK, se da de manera constante, ya que las integrinas sufren un ciclo endoexocítico, donde pueden estar en vesículas a manera de reservorio y tras un estímulo, llegar a la superficie y posteriormente volverse a internalizar, por lo cual *S. aureus* aprovecha esta facultad para lograr internalizarse.

3.2.1 RELEVANCIA DE LOS EPITELIOS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Los epitelios de todos los tejidos juegan un papel importante en la RII contra microorganismos, ya que pueden “discriminar” a microorganismos patógenos de los no patógenos y montar una respuesta inflamatoria ante los primeros. Los microorganismos expresan moléculas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune innato, dichos elementos son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estos elementos pueden ser reconocidos por receptores transmembranales y citoplasmáticos expresados por las células epiteliales (todas las células somáticas los expresan). Estos receptores son conocidos como receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), de los cuales podemos mencionar a los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs), CD14, CD36, entre otros (Alva-Murillo et al, 2015). No obstante, las células de defensa “clásicas” o fagocitos profesionales, como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas tienen una gran cantidad y variabilidad de este tipo de receptores, las células epiteliales, consideradas fagocitos no profesionales, también poseen este tipo de receptores y son muy efectivas para responder ante infecciones. En el caso de las CEMB, se han reportado 10 TLR y los ligandos de estos receptores son muy variados; pueden ser moléculas de la superficie de bacterias u hongos, moléculas bacterianas, que son inyectadas al hospedero a través de sistemas de secreción especializados o material genético de patógenos. El reconocimiento de dichos ligandos produce la activación de rutas de señalización, que llevan a la activación de factores transcripcionales y la expresión de genes específicos, con la consecuente síntesis y secreción de proteínas asociadas a la RII, con el objetivo de eliminar al patógeno y reparar el daño ocasionado por éste (Figura 1). Algunos de los elementos clásicos de dicha RII son las citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, entre otros (Bannerman et al, 2004; Prossnitz et al, 2007).

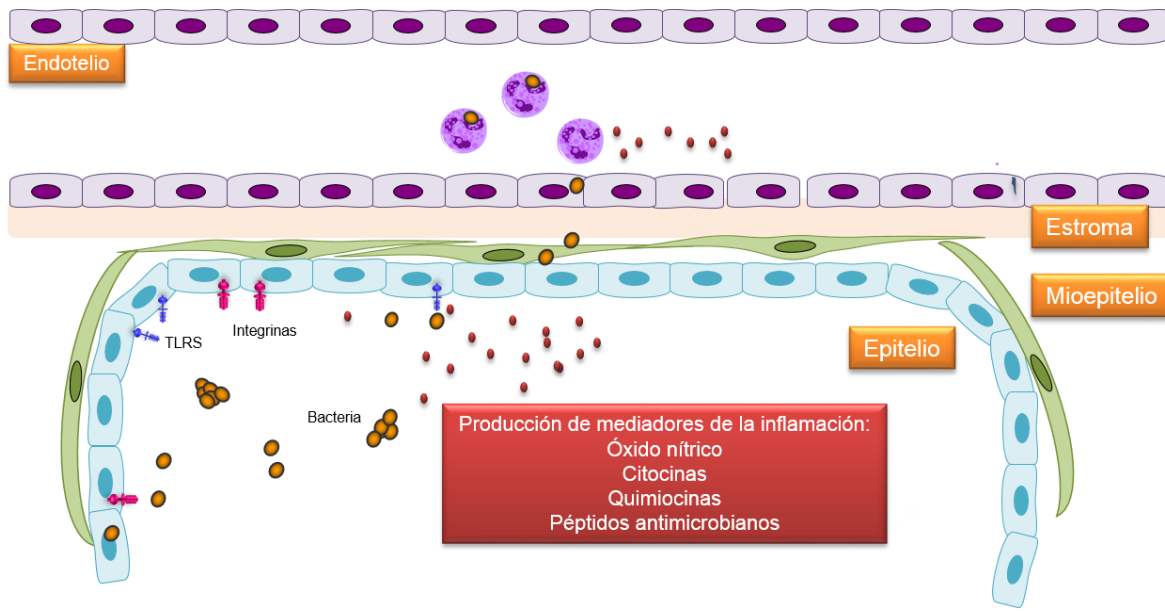


Fig. 1. Interacción del epitelio con el ambiente extracelular. Los epitelios están en constante interacción con microorganismos, por lo cual expresan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones (TLRs, por ejemplo) para detectar potenciales patógenos. Una vez activados dichos receptores, se activarán rutas de señalización para la producción de mediadores de la inflamación y así poder eliminar al patógeno. Modificada de Alva-Murillo (2016).

3.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los principales patógenos asociados a infecciones nosocomiales, además de ser el agente causal de infecciones crónicas en diversos tejidos. Por lo cual es una de las bacterias más relevantes tanto en la medicina humana, como en la medicina veterinaria. Desde inicios de los 40's, se describió su alta tasa de virulencia, a partir de pacientes con bacteriemias en un hospital de la ciudad de Boston, Massachusetts (Velázquez et al, 2005).

Es una bacteria Grampositiva mide aproximadamente 1 μm de diámetro, no móvil, coagulasa positiva, fermenta glucosa y se le considera aerobio facultativo, además de facultativo intracelular, puede formar parte de la flora de diversos tejidos, sin embargo cuando el sistema inmune del hospedero se ve comprometido, la bacteria aprovecha para proliferar, llegando a causar infecciones crónicas. Para lograr esto, *S. aureus* cuenta con una amplia variedad de factores de virulencia, tales como adhesinas, invasinas, toxinas y modulinas, las cuales se expresan diferencialmente y de acuerdo con la fase de

crecimiento en que se encuentre la bacteria. Las proteínas de adhesión principalmente se expresan durante la etapa de crecimiento exponencial, para garantizar el establecimiento y permanencia de la bacteria en el tejido, mientras de las moléculas de secreción se incrementan durante la fase estacionaria (Lara-Zarate, 2008), y son responsables del daño al tejido, así como de la futura diseminación de la bacteria.

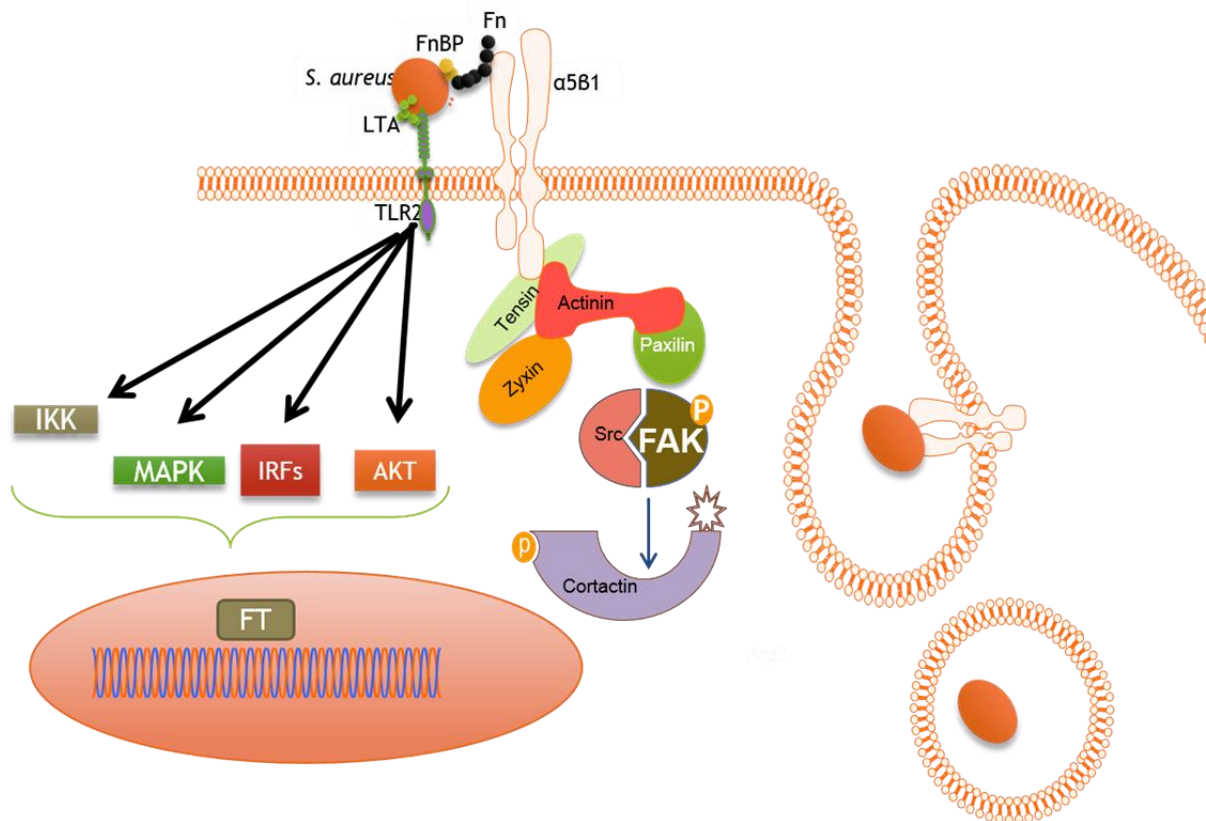


Fig.2. Mecanismo de internalización y reconocimiento de *S. aureus* en las células de epitelio mamario bovino. TLR2 es el principal receptor de reconocimiento de patrones que interactúa con el ácido lipoteicoico de *S. aureus*, posterior a esta interacción se activan diferentes rutas de señalización, como son las rutas dependientes de Akt, de elementos de respuesta a interferón (IRFs), la ruta del factor nuclear kappaB (NF- κ B)/cinasa inhibidora de kappaB (IKK) y las MAPKs cinasas (Lara-Zárate et al, 2007). Cada ruta activa diferentes elementos de la RII. Además, el mecanismo de internalización tipo zipper es el mejor descrito para *S. aureus* en las CEMB. Este mecanismo involucra elementos tanto de la bacteria, como de la célula hospedera, que darán como resultado la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) para inducir un andamiaje proteico el cual inducirá el rearrreglo del citoesqueleto de actina, para la formación del endosoma y la internalización de la bacteria, la cual podrá persistir y replicarse en el interior de la célula. Modificado de Alanko e Ivaska (2016).

Las diversas proteínas expresadas por *S. aureus*, ya sea durante su fase exponencial o estacionaria, le confieren la capacidad de evadir la RII del hospedero y persistir de manera exitosa, esto ha generado que dicha bacteria sea muy complicada de erradicar. En la tabla 1 se muestran los factores de virulencia más relevantes de *S. aureus*, de acuerdo a su ubicación y origen sin embargo, la clasificación puede variar dependiendo los autores consultados, ya que algunos se basan en la actividad o función del factor de virulencia.

Tabla 1.

Componentes Membranales	Toxinas y enzimas extracelulares
Polisacárido capsular	Toxinas con actividad sobre membranas: Hemolisinas α y β Leucocidina
Polisacárido extracelular	Toxinas con actividad de superantígenos: Enterotoxinas Toxina del síndrome de choque tóxico Toxinas epidermolíticas
Proteínas de superficie: Proteína de unión a colágeno Proteína de unión a fibronectina Proteína de unión a fibrinógeno Proteína A	Enzimas extracelulares: Estafiloquinasa Coagulasa Hialuronidasa Lipasas Proteasas ADNasa termoestable Catalasa

Modificado de Garza-Velasco (2013).

Los factores de virulencia (Figura 3) expresados por esta bacteria, están asociados con una alta mortalidad en pacientes con septicemias adquiridas en hospitales (se estima que cerca del 70% están dadas por *S. aureus*). Cuando el sistema inmunológico está comprometido, la bacteria logra proliferar rápidamente y diseminarse en el organismo, causando enfermedades ya sea de naturaleza aguda o crónica. Las principales afecciones en humanos ocasionadas por *S. aureus* comprenden el síndrome de choque

tóxico, la endocarditis, neumonías y artritis mientras que, en animales, se le asocia principalmente con piodermas, neumonías, metritis y mastitis.

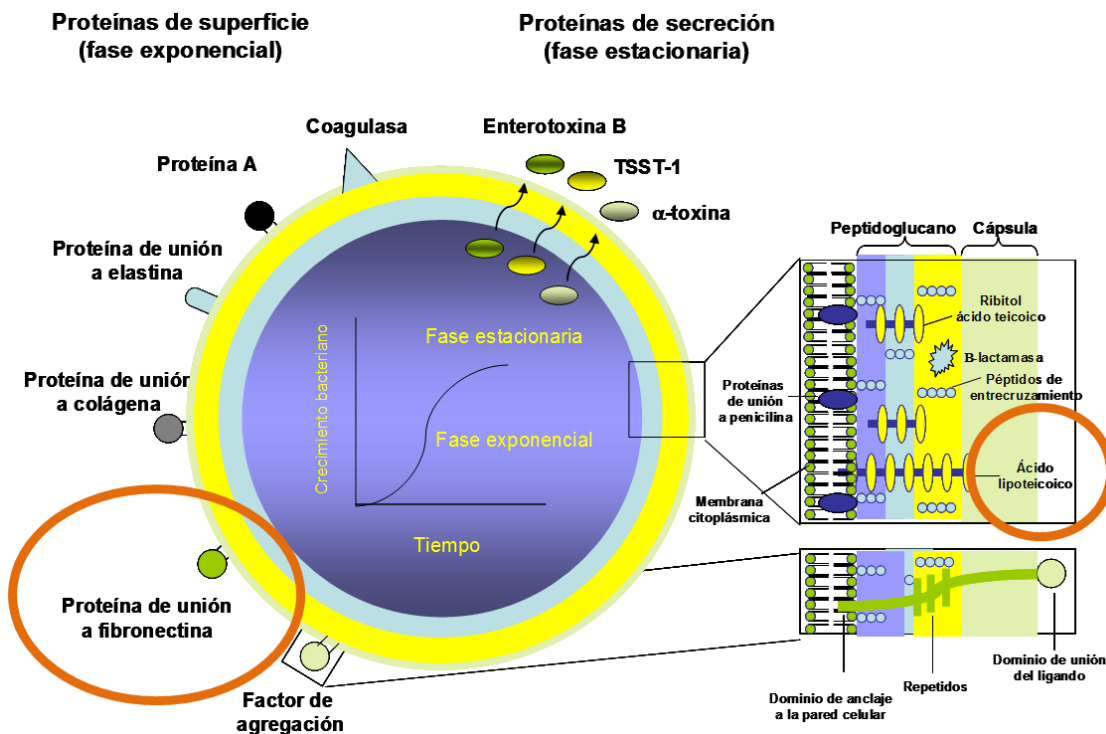


Fig. 3. Factores de virulencia y patogenicidad de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* presenta una amplia gama de elementos que le permiten persistir y colonizar diversos tipos de tejidos, lo cual le ha conferido un gran éxito como bacteria oportunista, causando enfermedades crónicas y recurrentes tanto en la medicina veterinaria, como en la humana. Para internalizarse en las CEMB, la bacteria utiliza principalmente las proteínas de unión a fibronectina, las cuales se expresan mayoritariamente durante la fase de crecimiento exponencial, lo cual incrementa la probabilidad de invasión. Mientras que, el ácido lipoteicoico es el que interactúa con los receptores tipo Toll, mediante los cuales la célula hospedera puede reconocer y activar una respuesta inmunológica.

3.4 ESTRÓGENOS

Los estrógenos son un grupo de hormonas cuya estructura química se caracteriza por la presencia de cuatro anillos: un grupo fenólico (anillo A), 2 ciclohexanos y un anillo ciclopentano (anillo D). Los estrógenos presentan distinta configuración; la estrona (E1) tiene su grupo carbonilo en la posición C17, el estradiol (E2) presenta su grupo hidroxilo en C17 y el estriol (E3) posee 2 grupos alcohol en los C16 y C17, respectivamente (Adeel et al, 2017). Éstas son hormonas sexuales de origen esteroideo, las cuales se sintetizan a partir de la ruta del colesterol, usando las vías delta 5/4, donde se derivan los andrógenos

como la testosterona, esta última es convertida por la aromatasa (P450aro=CYP19) la cuál elimina un carbono y se aromatiza el anillo A, para originar el estradiol (Figura 4). Otra vía de síntesis es mediante la conversión (por la aromatasa) de androstenediona a estrona y ésta puede convertirse en E2 y a su vez en estríol. Los procesos de aromatización se llevan a cabo en el tejido diana de la hormona por ejemplo, en las células de la granulosa del folículo ovárico (Nishida et al, 2013).

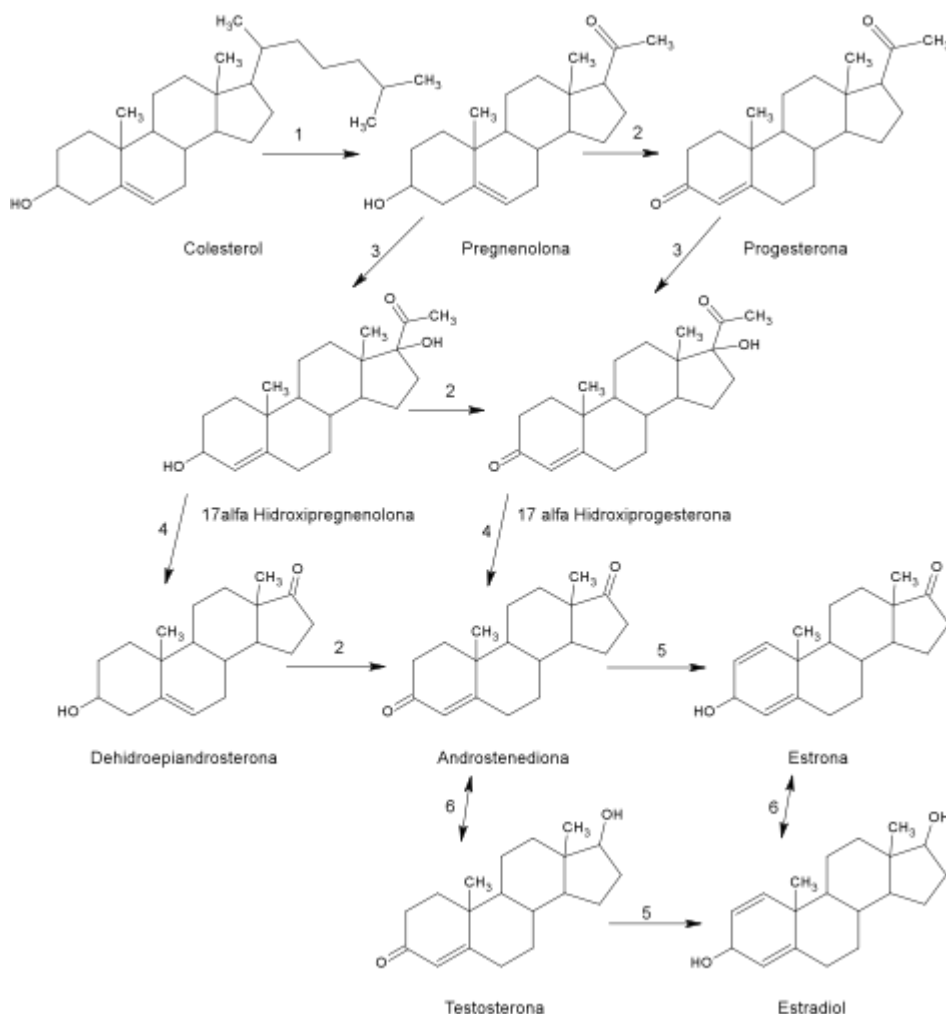


Fig. 4. Síntesis de estrógenos. La biosíntesis de estas hormonas se da a partir del colesterol, el cuál es el precursor de todos los esteroides. Los cuáles en la cara interna de la membrana mitocondrial (STAR y TSPO) se convierte en pregnenolona. La pregnenolona libremente se difunde fuera de la mitocondria y se utiliza para la biosíntesis de androstenediona, la cuál es el precursor de la testosterona y por consecuencia de los estrógenos (p.j. estradiol) (Simpson et al, 2015).

En humanos y animales estas hormonas son producidas por la corteza adrenal, los testículos, ovarios, la placenta y el tejido adiposo, principalmente. La androstenediona es

el intermediario clave para la síntesis de los estrógenos. Cada uno juega una función importante en el desarrollo y crecimiento de las hembras, especialmente en la etapa reproductiva. Sin embargo, el estradiol (E2) es la hormona sexual por excelencia y el más potente de los estrógenos, es también el más abundante durante la etapa reproductiva de las hembras mamíferas (Lamote et al, 2006).

La mayoría de las hormonas regulan su propia tasa de secreción mediante un mecanismo de retroalimentación. En el caso del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG, el cual regula la secreción de estrógenos), las neuronas del hipotálamo producen como consecuencia a estímulos del sistema nervioso central y del control hormonal interno, a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es transportada a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario al lóbulo anterior de la hipófisis, donde se estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotrópicas de la hipófisis. La FSH estimula el desarrollo de los folículos ováricos y por otra parte la LH estimula la síntesis de androstenediona a partir del colesterol, y bajo influencia de FSH se da la producción y secreción del E2 en las células de la granulosa de los ovarios (Frank et al, 2014).

3.4.1 ESTRADIOL (E2)

El 17 β -estradiol o E2 es una hormona de 18 carbonos de naturaleza hidrofóbica y presenta una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno. Esta hormona tiene como blanco principal a los órganos sexuales femeninos (ovarios, útero, glándula mamaria, etc.), pero a nivel de tipos celulares, el E2 actúa en una amplia gama de poblaciones celulares, principalmente en los epitelios, donde modula la diferenciación, proliferación y apoptosis, fenómenos íntimamente asociados al ciclo reproductivo, desarrollo y crecimiento de las hembras (Nishida et al, 2013).

La producción del E2 se puede dar a distintos niveles, los principales órganos secretores de esta hormona son los ovarios, la corteza adrenal, testículos, placenta y el tejido adiposo. En su actividad endócrina el E2 es secretado a la circulación, donde se une a proteínas como la albúmina y la globulina, las cuales funcionan como transportadores hasta llegar a la célula diana. La disociación de la hormona de sus transportadores se presenta una vez que ésta interactuó con sus receptores. La vía de degradación y eliminación del

E2 comienza en el hígado a través de la enzima 16α -hidroxilasa, que convierte el E2 en E3, esta reacción es irreversible (a diferencia de la conversión de E2 a E1). Las sulfatasas y glucoronidasas comienzan la degradación del E2 (atacando los carbonos 3 y 16 principalmente), lo cual resulta en la conversión a derivados solubles que en parte son reabsorbidos por la circulación entero-hepática y finalmente son eliminados por la vía renal (orina). Los otros derivados solubles que no son reabsorbidos son secretados en las heces. A pesar de que el E2 sufre su degradación, se logra encontrar activo en las heces y como estrona en la orina (Lamote et al, 2003; Yart et al, 2012).

Las funciones predominantes del E2 están mediadas por la interacción con sus receptores y su posterior unión a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN, así como la consecuente iniciación de la transcripción génica. Además, puede presentar respuestas no genómicas, como producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como flujo de calcio, entre otras. Las funciones biológicas del E2, mediadas por sus receptores, son muy diversas (Wira et al, 2015).

1. Es un inductor de la migración celular ya que, a través de sus receptores, induce la activación (fosforilación) de SRC y de la cinasa de adhesión focal (FAK), elementos importantes para llevar a cabo cambios morfológicos en la membrana celular estimulando la migración de las células, con la finalidad de modular la respuesta inflamatoria (quimiotaxis), favorecer la reparación de tejido o regular la acumulación de células en una determinada zona (neoplasias). 2. Está implicado en el metabolismo de las grasas (distribución de grasa corporal), ya que en el hígado modula la expresión de genes involucrados en la síntesis y metabolismo de lípidos. 3. El E2 también favorece el cierre de la epífisis (factor importante para la mineralización de los huesos y el crecimiento). 4. En tejido vascular, el E2 activa receptores acoplados a proteínas G (GPRs) para inducir la actividad de la sintasa de óxido nítrico, además de favorecer la proliferación del endotelio a través de la producción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), por lo cual tiene efectos en la hemodinámica, regulando el tono vascular y la angiogénesis. 5. Dentro de las funciones reproductivas, el E2 está implicado en la maduración del folículo y posterior liberación del óvulo (ovulación), crecimiento uterino, en la libido de las hembras (inducción del estro), en el desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios, en modular la respuesta inmune para evitar el rechazo del producto implantado y en el crecimiento e involución de la glándula mamaria para promover la lactancia (Connor et al,

2007; Frank et al, 2014; Yung-Cheng et al, 2017). Como queda evidenciado en párrafos anteriores, las funciones del E2 son muy diversas y dependen del órgano en el que se produzca o ejerza el efecto, así como de la etapa reproductiva, de su concentración y de la presencia de sus receptores.

3.4.2 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los efectos del E2 están mediados por receptores estrogénicos (RE), existiendo los tipos RE α (565 aa) y RE β (530 aa). Éstos fueron caracterizados por primera vez en 1973 en el útero de rata (Prossnitz et al, 2007). Pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales funcionan como factores de transcripción, e interactúan con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) o asociándose con otros factores de transcripción para inducir la expresión de diversos tipos de genes. Existe un tercer RE, que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPR30) y se localiza en el retículo endoplásmico (Figura 5). Está asociado principalmente a respuestas no genómicas (modificaciones en el flujo de calcio, liberación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno) (Connor et al, 2007).

Los RE α y β se mantienen inactivos mediante un complejo de proteínas de choque térmico (Hsp70 y Hsp90). Tras la unión con su ligando (E2, por ejemplo), se da un cambio conformacional que induce la disociación del RE del complejo inactivo (RE-Hsp) y su fosforilación, lo cual se traduce en su activación y translocación al núcleo. Los REs no necesariamente son producto de la síntesis de NOVO, en ciertas regiones de la membrana plasmática, se encuentran ubicadas las caveolas (invaginaciones de la membrana citoplasmática), en las cuales se encuentran, a manera de reservorio. La señalización mediada por E2/RE puede desencadenar la activación de elementos asociados al crecimiento y proliferación celular; elementos tales como el receptor IGF1, el de EGF, p21 y Raf. La señalización derivada de los E2 también puede inducir la producción de óxido nítrico, la secreción de prolactina y modular el flujo de los canales de calcio. Adicionalmente, la actividad de estos RE activa rutas de señalización asociadas a la RII, como las MAPK cinasas, AKT y PKC (Song et al, 2007). Esta asociación del E2 con las rutas de la RII depende del tipo celular y del RE involucrado. Esencialmente se asocia al RE α con la interacción de las MAPK cinasas, incrementando la proliferación celular. Además, esta interacción favorece la fosforilación de co-activadores como SRC3, RIP140,

p300 y CREB1, promoviendo el relajamiento de la cromatina y la interacción con los ERE (Simpson y Santen, 2015), lo cual favorece la transcripción de genes. Sin embargo, en los modelos de interacción patógeno-hospedero, la interacción del E2/RE con las rutas de señalización asociadas a la RII ha sido poco estudiada.

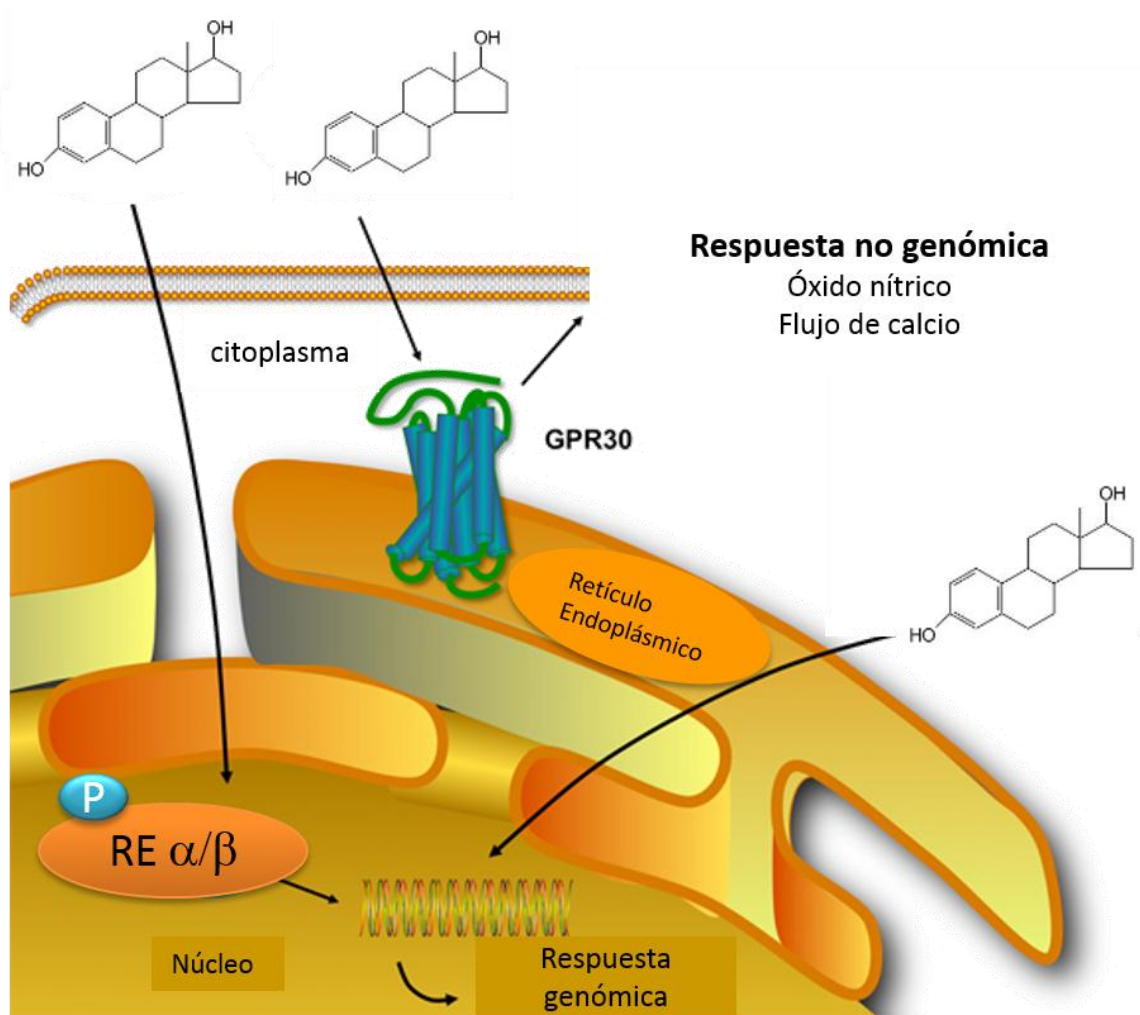


Fig. 5. Receptores de estrógenos. Por su naturaleza lipídica, el estradiol puede atravesar la membrana citoplasmática, dentro de la célula interactúa con sus receptores, los cuales activan respuestas rápidas (no genómicas) y respuestas en las que están implicadas rutas de señalización (respuestas genómicas), las cuales inducen la activación de factores transcripcionales para la expresión de diversos genes asociados a las funciones de los estrógenos. La respuesta depende de los niveles hormonales, y del tipo celular estimulado por la hormona (Prossnitz et al, 2007; Heldring et al, 2007).

3.5 EL ESTRADIOL COMO INMUNOMODULADOR

La actividad de los estrógenos y sus receptores se ha asociado a patologías como el cáncer, siendo el cáncer de mama el principal padecimiento donde se involucran directamente a los RE (Nadkarni y McArthur, 2013). Sin embargo, los estrógenos también se han visto asociados con síndromes reproductivos, enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple) y procesos infecciosos, en donde la RII se ve modificada. Los efectos de esta hormona como inmunomodulador están ampliamente distribuidos; al respecto se sabe que en músculo liso de ratas y en hepatocitos de ratón, el E2 revierte el efecto estimulador de la IL-1 β sobre la producción de óxido nítrico, además de que incrementa la expresión y síntesis del inhibidor del factor transcripcional NF- κ B (I κ B). Este incremento evita la activación de dicho factor de transcripción y por lo tanto la actividad anti-inflamatoria de los estrógenos (Xing et al, 2012). En macrófagos de útero humano, el E2 inhibe la expresión a nivel de proteína del receptor de IL-1 β . Dichos efectos del E2 sobre la regulación de la expresión de genes de la RII se presentan mediante la co-activación de factores de transcripción como SP-1, STAT y AP-1.

E2 puede también modular elementos clave de las rutas de señalización involucradas en la RII, en distintos puntos. Por ejemplo, altos niveles de E2 reducen la abundancia de los TLRs (receptores tipo Toll), en epitelio endometrial humano. Dicha reducción afecta directamente la interacción patógeno-hospedero (Kovats, 2015). Róo abajo de la señalización del TLR2, en epitelio endometrial de roedores se demostró que el E2 disminuye la secreción de IL-6, al inhibir la activación de las cinasas ERK y P38, que se encuentran en una de las rutas de señalización de las MAPK (Breithaupt et al, 2013). El E2 también actúa a nivel de factores de transcripción, por ejemplo, evita la activación de NF- κ B al inhibir su disociación de I κ B, en un modelo de epitelio uterino de rata (Kowsar et al, 2013). Asimismo, el E2 puede estar modulando la activación de otros factores transcripcionales tales como AP-1, SP1, STAT, NF- κ B, VDR, entre otros, los cuales también participan en la RII. Al respecto, se ha descrito que el E2 evita la fosforilación de STAT y promueve la activación del receptor de la vitamina D (VDR), modulando la ruta de señalización de las MAPK (Luthje et al, 2014).

3.5.1 EL ESTRADIOL EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE LOS EPITELIOS

En los apartados anteriores se ha hecho alusión a los efectos inmunomoduladores del E2 en diversos tejidos y tipos celulares. Sin embargo, los modelos más comúnmente estudiados de la relación del E2 con la RII, los constituyen los epitelios del tracto reproductivo de las hembras, uno de los principales blancos de esta hormona, por sus funciones íntimamente asociadas a la reproducción, así como otros epitelios, por la relevancia que representan en la defensa del hospedero (Yakimchuk et al, 2013). Se ha demostrado que el E2 tiene efectos antiinflamatorios, al revertir la producción de elementos de la respuesta inflamatoria tras su estimulación por algún componente bacteriano o con el patógeno en su totalidad; por ejemplo, en endometrio humano revierte los efectos causados por el PAMP Poly I:C (Lesmeister et al, 2005). En útero de rata el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* y la IL-1 β inducen una respuesta inflamatoria, que se disminuye tras la adición de E2; en oviducto bovino el estímulo con LPS incrementa la secreción de IL-1 β y TNF α , además de inducir la expresión de TLR2 y TLR4; sin embargo, el E2 revierte el efecto inflamatorio (Fahey et al, 2008; Kowsar et al, 2013). En epitelio intestinal de rata, el E2 ayuda a revertir los efectos pro-inflamatorios (disminuyendo la producción de óxido nítrico) asociados a un daño mecánico o el inducido por el LPS de *E. coli* (Breithaupt et al, 2013). En la mayoría de los modelos epiteliales donde se ha evaluado la actividad inmunoreguladora del E2, se concluye que tiene efectos anti inflamatorios. Aunado al efecto anti inflamatorio del E2, en algunos modelos se ha reportado su actividad antimicrobiana contra distintos patógenos, mediante la producción de péptidos antimicrobianos (Fahey et al, 2004; Schaefer et al, 2005).

3.5.2 EL ESTRADIOL EN EL EPITELIO MAMARIO BOVINO

El epitelio mamario es de vital importancia para los mamíferos, ya que participa en la producción y almacenamiento de la leche. Las células epiteliales de la glándula mamaria son blanco de hormonas lactogénicas y sexuales, las cuales tienen la finalidad de promover la diferenciación y proliferación de este órgano durante la gestación, posteriormente dichas hormonas participan en la producción y secreción de la leche y en el mantenimiento de la lactancia, para finalmente promover la involución de la glándula mamaria induciendo la apoptosis del epitelio mamario (Schams et al, 2003).

En los mamíferos, la glándula mamaria sufre modificaciones durante la pubertad y después durante la gestación y en la lactancia.

En las vacas lecheras durante el parto y el inicio de la lactancia se observa cierta susceptibilidad de presentar alteraciones inflamatorias en la glándula mamaria (Figura 6) y en el útero. La mastitis bovina (MB) es una de estas afecciones. Esta susceptibilidad se debe en gran medida a los cambios drásticos en las concentraciones de hormonas lactogénicas y sexuales que se presentan durante esta etapa (Gutiérrez-Barroso, 2007; Mustafa, 2011).

El desarrollo de la glándula mamaria está mediado principalmente por hormonas lactogénicas y sexuales, los pulsos de hormonas como el E2 estimulan la diferenciación y proliferación del epitelio mamario, y como consecuencia las estructuras de la glándula, como los lóbulos, alveolos y los ductos alveolares. Estos eventos se modulan por el estado hormonal del animal (Meyer et al, 2006). Las hormonas sexuales o mamogénicas como el E2 estimulan la proliferación de las CEMB, ya que se ha demostrado en ensayos *in vivo* e *in vitro* que el E2 es esencial para el desarrollo del parénquima mamario y de la proliferación de las CEMB (Yart et al, 2012). Durante la gestación, la placenta produce E2 y favorece el correcto desarrollo de los alvéolos mamarios; esta producción es progresiva durante la gestación hasta el inicio del parto, donde los niveles caen abruptamente (Figura 7). En la lactancia se ha observado un papel completamente opuesto del E2 sobre la glándula mamaria (como proliferativo), ya que se ha demostrado que en vacas inyectadas con E2 durante la mitad de la lactancia se acelera la involución del tejido mamario y se modifica la composición de la leche, además de que aumenta la secreción de la hormona estaniocalcina en leche y plasma, la cual está ligada directamente con la involución mamaria (Yart et al, 2012).

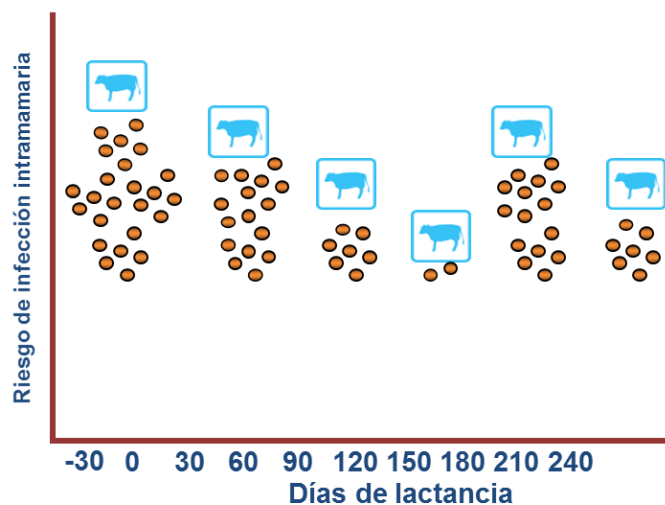


Figura 6. Incidencia de MB. Durante el periodo de transición de la vaca lechera (parto-lactancia), esta presenta cierta susceptibilidad a presentar infecciones intramamarias, las cuales se han asociado al cambio drástico en las concentraciones hormonales. Tomado de Téllez et al (2013).

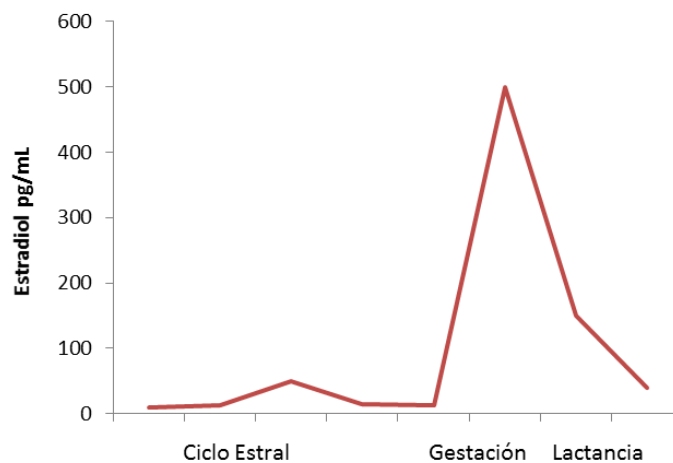


Figura 7. Niveles de E2 en vacas lecheras. Las concentraciones de E2 varían significativamente a lo largo de la etapa reproductiva. Tomado de Lamote et al (2007).

4 JUSTIFICACIÓN

El E2 tiene importantes efectos inmunomoduladores, principalmente como antiinflamatorio y con propiedades antimicrobianas indirectas. Estos efectos se han reportado en una amplia gama de epitelios; sin embargo, en el epitelio mamario bovino se desconocen sus efectos inmunomoduladores. El epitelio mamario bovino es el principal blanco del E2, ya que participa en el desarrollo de la glándula mamaria y en la involución de ésta, fenómenos íntimamente asociados a la lactancia del animal. Además, este tejido es susceptible de presentar infecciones principalmente de origen bacteriano, causando la mastitis bovina. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación aguda (mastitis clínica) o crónica (subclínica), y es el padecimiento que más pérdidas económicas causa en la ganadería lechera a nivel mundial, puesto que la disminución en la producción y calidad de la leche están asociadas a dicha patología.

S. aureus es el principal agente causal de la mastitis subclínica, ya que esta bacteria tiene la capacidad de internalizarse tanto en células fagocitas profesionales (macrófagos) como en no profesionales, como es el caso del epitelio mamario bovino. En las CEMB, *S. aureus* se internaliza y así logra evadir la respuesta inmune del hospedero logrando persistir y causar infecciones crónicas y recurrentes. Estas infecciones suelen presentarse con mayor frecuencia durante el parto y el inicio de la lactancia, etapas caracterizadas por cambios drásticos en las concentraciones de hormonas lactogénicas (prolactina) y sexuales como el E2. Lamote y col. (2007), indican que en las vacas la presentación de enfermedades infecciosas puede verse alterada por la inmunomodulación que ejercen las hormonas en las distintas etapas del ciclo productivo.

Sin embargo, hace falta conocer a detalle cual es el papel de estas hormonas en la modulación de la RII en las CEMB durante su interacción con bacterias como *S. aureus*, para así demostrar cuales hormonas pueden estar favoreciendo la defensa del hospedero y cuales tiene un efecto opuesto en el animal, y con este conocimiento poder generar eventualmente mejores estrategias de control. De acuerdo con lo reportado en otros modelos que exploran la modulación de la RII por el E2, se le han atribuido efectos antiinflamatorios y antimicrobianos, ya que revierte y previene la respuesta inflamatoria exacerbada, además de que es un inductor de la respuesta antimicrobiana, al favorecer la expresión y secreción de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, en las CEMB infectadas

con *S. aureus*, se desconoce el efecto que pudiera tener el E2, pero al ser un modelo epitelial se puede postular que tendrá un efecto inmunomodulador similar a los modelos anteriormente mencionados, incidiendo directamente sobre la internalización de la bacteria.

5 HIPÓTESIS

El E2 estimula la respuesta antiinflamatoria y antimicrobiana de las células epiteliales mamarias bovinas disminuyendo la internalización de *Staphylococcus aureus*.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del E2 sobre la RII de las células epiteliales mamarias bovinas y sus implicaciones en la internalización de *Staphylococcus aureus*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el efecto del E2 sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.
- 2.- Analizar los efectos antimicrobianos del E2 en las CEMB infectadas con *S. aureus*.
- 3.- Determinar la participación y abundancia de los receptores TLR2, integrina $\alpha 5\beta 1$, y REs en las CEMB en presencia del E2 y *S. aureus*.
- 4.- Establecer el estado de activación de las cinasas (MAPKs, Akt y FAK) asociadas a las rutas de señalización dependientes de los receptores TLR2 e integrina $\alpha 5\beta 1$ presentes en la membrana plasmática.
- 5.- Evaluar el estado de activación de factores transcripcionales involucrados en la RII de las CEMB en presencia de E2 y *S. aureus*.
- 6.- Analizar la expresión y secreción de elementos representativos de la RII en las CEMB tratadas con E2 y *S. aureus*.

7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

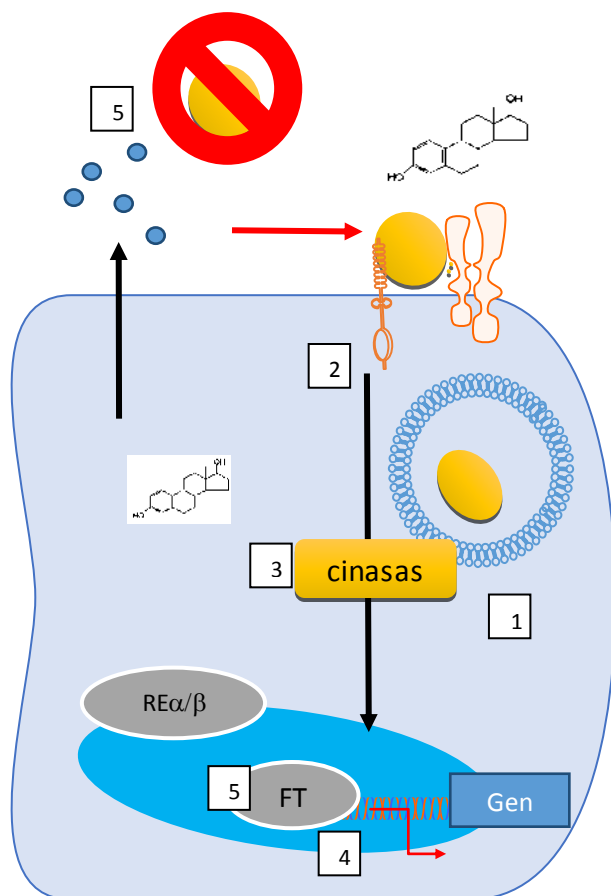
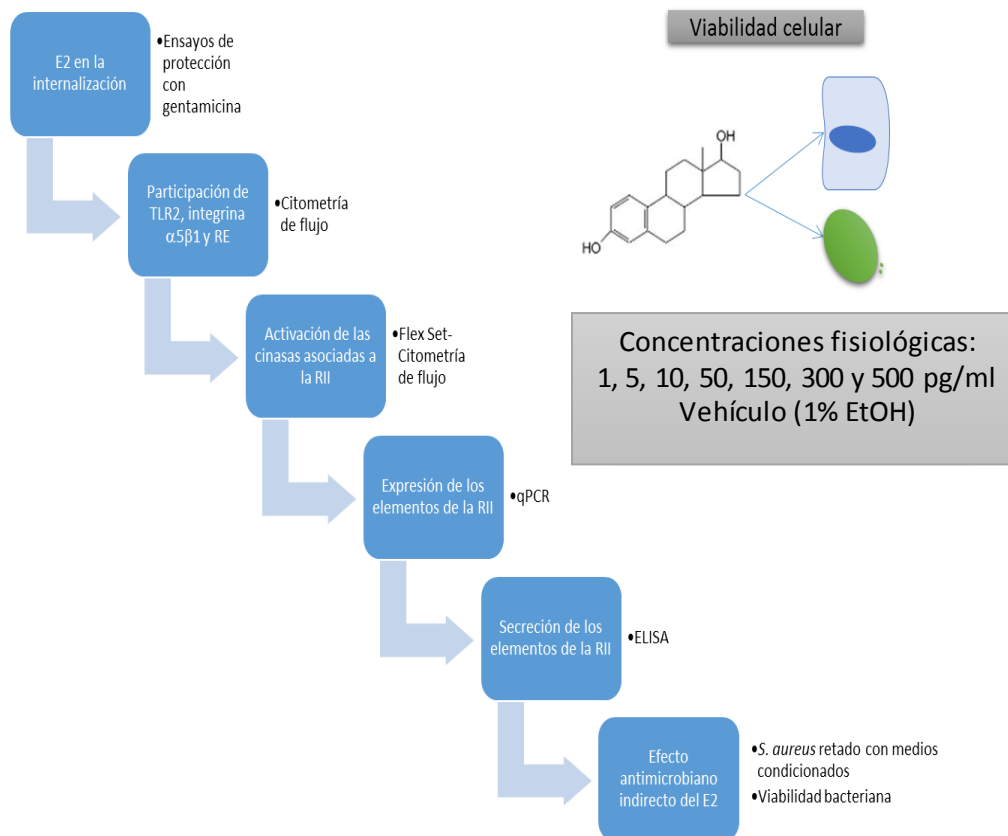


Fig. 6. Estrategia experimental. 1) Se determinó el efecto del E2 sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB mediante ensayos de protección con gentamicina. 2) Se evaluó la participación de los receptores TLR2 e integrina $\alpha 5\beta 1$, ambos involucrados en el reconocimiento e internalización de *S. aureus*; para esto se realizaron ensayos de invasión bloqueando a los receptores y análisis por citometría de flujo, para determinar la abundancia en membrana, así como su expresión génica. 3) La activación de cinasas participantes en las rutas de señalización de los receptores involucrados se analizó mediante citometría de flujo y western blot. 4) Se midió la activación de los factores transcripcionales (FT) asociados a la RII, mediante ensayos de hibridación; la expresión y secreción de elementos representativos de la RII en presencia del E2 se realizó mediante RT-qPCR y ELISA respectivamente. 5) El efecto antimicrobiano del E2 sobre *S. aureus* extracelular se analizó mediante ensayos de viabilidad por citometría de flujo.



8 RESULTADOS

- 1) El capítulo I corresponde al artículo de investigación: “Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization”. Mediators of Inflammation. 2016; 2016:6120509. Doi 10.1155/2016/6120509. Epub 2016 Mar 1. Factor de Impacto 3.232 (2016 JCR Science Edition).
- 2) El capítulo II comprende los resultados del manuscrito titulado: “Innate immune response signaling pathway associate to E2 during *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells”.
- 3) En el capítulo III se presenta el artículo de divulgación: “Las hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas?”. Saber Más-Revista de divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 30. ISSN-2007-7041.<https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos.html>
- 4) El capítulo IV corresponde al artículo de divulgación: “Las hormonas, mensajeros químicos y reguladores de nuestra salud”. Cuadernos de Divulgación Científica y Tecnológica de la Secretaria de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico de Michoacán. Serie 2016, cuaderno número 1. Primera Edición: Diciembre 2016. ISBN: En trámite.

8.1 CAPÍTULO I

Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization

Research Article

Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of Estradiol in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization

Ivan Medina-Estrada, Joel E. López-Meza, and Alejandra Ochoa-Zarzosa

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, 58893 Morelia, MICH, Mexico

Correspondence should be addressed to Alejandra Ochoa-Zarzosa; ochoaz@umich.mx

Received 31 December 2015; Accepted 7 February 2016

Academic Editor: Luis A. Salazar

Copyright © 2016 Ivan Medina-Estrada 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.

17 β -Estradiol (E2), the predominant sexual hormone in females, is associated with the modulation of the innate immune response (IIR), and changes in its levels at parturition are related to intramammary infections, such as mastitis. In bovine mammary epithelial cells (bMECs), E2 regulates differentiation and proliferation, but its immunomodulatory functions have not been explored. *Staphylococcus aureus* is the predominant pathogen causing mastitis, which can persist intracellularly in bMECs. The aim of this work was to analyze whether E2 modulates the IIR of bMECs during *S. aureus* internalization. bMECs treated with E2 (50 pg/mL, 24 h) reduced bacteria internalization (~50%). The host receptors $\alpha 5\beta 1$ and TLR2 do not participate in this reduction. However, E2 activates ER α and modulates the IIR reducing the *S. aureus* induced-mRNA expression of TNF- α (~50%) and IL-1 β (90%). E2 also decreased the secretion of these cytokines as well as IL-6 production; however, in infected bMECs, E2 induced the secretion of IL-1 β . Furthermore, E2 upregulates the expression of the antimicrobial peptides DEFB1, BNBD5, and psoriasin S100A7 (~5-, 3-, and 6-fold, resp.). In addition, E2 induced the production of antimicrobial compounds in bMEC culture medium, which, together with the modulation of the IIR, could be related to the reduction of *S. aureus* internalization.

1. Introduction

Estrogens play crucial roles in the development and maintenance of normal sexual and reproductive function. 17 β -Estradiol (E2) is the predominant and most potent sexual hormone during the reproductive stage in females [1]. Its main functions are associated with reproduction, although it is also involved with different pathologies, such as cancer, autoimmune diseases, and infectious processes, in which the innate immune response plays a key function [2]. In bovines, during the period around parturition, cows experience an increased susceptibility to inflammatory disorders in the mammary gland and uterus, for example, mastitis [3]. This increased susceptibility has been correlated with the decreased functionality of the components of the innate immune response and with abrupt changes in the levels of sex steroids. Parturition and the onset of lactation comprise

extensive alterations in the sex steroid hormones. E2 levels rise abruptly in the last week before parturition, peak in the last 3 days before delivery, and fall rapidly after calving and regain basal values [3, 4]. These changes may be related to the incidence of intramammary infections such as mastitis. Accordingly, Lavon et al. [5] reported that cows with subclinical mastitis (without apparent signs) exhibit low circulating E2 levels. In addition, the immunomodulatory effects of E2 in cows with mastitis are associated with a reduction of neutrophil migration [6].

Most of the genomic actions of estrogens, including E2, are mediated by two estrogen receptors (ERs), ER α and ER β , and bovine mammary epithelial cells express both [7]. However, there is little information concerning the immunomodulatory effects of E2 on epithelial cells from the bovine mammary gland. It is well known that E2 is required for mammary epithelial cell proliferation and ductal

development in the growing animal [7]. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) play a relevant role during intramammary infections because they are in intimate contact with the pathogens responsible for mastitis and are a target for intracellular bacteria causing chronic and subclinical infections, such as *Staphylococcus aureus* [8, 9]. This pathogen can persist for long periods of time in cows and is internalized by a zipper-type mechanism depending on the presence of fibronectin-binding proteins (FnBPs) on the bacterial surface, as well as the interaction of fibronectin and the host-cell $\alpha 5 \beta 1$ integrin, in which integrin is taken up together with its ligands [9]. This mechanism is employed during the internalization process of *S. aureus* by bMECs [10]. In addition, bMECs participate in the innate immune response of the bovine mammary gland producing pro- and anti-inflammatory mediators, as well as antimicrobial peptides, nitric oxide, and so forth [11, 12], but the role of E2 on this response has not been explored. Considering the immunomodulatory effects of E2 in different tissues and that one of its targets is the mammary epithelium, the aim of this work was to analyze whether this hormone modulates the innate immune response of bMECs and its implications during *S. aureus* internalization.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Antibodies. 17β -Estradiol was acquired from Sigma, and working solutions were dissolved in 1% ethanol (1–500 pg/mL). For all of the experiments, 1% ethanol (vehicle) was used as a control. The LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Thermo Scientific) was obtained from Molecular Probes. The monoclonal blocking antibodies anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin (MAB2514) and anti-TLR2 (TLR2.1) were obtained from Millipore and Abcam, respectively. The anti-phospho-ER α (2511S, Ser118) was obtained from Cell Signaling and the anti-ER β (517700) was acquired from Life Technologies. The FITC-conjugated secondary antibodies against mouse and rat IgGs were purchased from Invitrogen and Thermo Scientific, respectively.

2.2. *Staphylococcus aureus* Strain. The *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) strain was used. This strain was isolated from a case of bovine clinical mastitis and has the capacity to invade bMECs [13]. *S. aureus* were grown at 37°C overnight in Luria-Bertani broth (LB Bioxon), and the CFUs were adjusted by measuring the optical density at 600 nm ($OD\ 0.2 = 9.2 \times 10^7$ CFU/mL).

2.3. Primary Culture of Bovine Mammary Epithelial Cells (bMECs). bMECs were isolated from the alveolar tissue of the udders of healthy lactating cows as previously described [13]. 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/F12K, Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (Equitech Bio), 10 μ g/mL insulin (Sigma), 5 μ g/mL hydrocortisone (Sigma), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 1 μ g/mL amphotericin B (Invitrogen). The cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. To perform

the E2 and/or *S. aureus* challenge, polarized monolayers of bMECs (dishes covered with 6–10 μ g/cm² rat-tail type I collagen, Sigma) were cultured in serum-free DMEM/F12K without phenol red (Sigma) and antibiotics (incomplete medium) for 24 h, and then they were treated with the hormone and/or infected with the bacteria.

2.4. Invasion Assays. For the invasion assays, bMEC polarized monolayers were used (~10,000 cells were cultured onto 96-well flat-bottom dishes (Corning)), which were incubated with different concentrations of E2 (1, 5, 10, 50, 150, 300, and 500 pg/mL) in DMEM/F12K (Sigma) without antibiotics, serum, and phenol red (incomplete medium) 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 from a broth of 9.2×10^7 CFU/mL and incubated for 2 h in 5% CO₂ at 37°C. Then, the cells were washed three times with PBS (pH 7.4) and incubated with incomplete medium that was supplemented with 80 μ g/mL gentamicin for 1 h at 37°C to eliminate extracellular bacteria. Finally, the bMEC monolayers were detached with trypsin- (0.05%) EDTA (0.02%) (Sigma) and lysed with 250 μ L of sterile distilled water. The bMEC lysates were diluted 100-fold, plated on LB agar in triplicate, and incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by the standard colony counting technique. The number of bMECs cultured in each well plate was calculated for each invasion assay using an automated cellular counter (BIO-RAD, TC20). The data are presented as the ratio of the CFU recovered per bMEC.

For the invasion assays in the presence of the blocking antibodies, one hour previous to the addition of *S. aureus* to the bMECs, the blocking antibodies anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin or anti-TLR2 were added separately (10 and 5 μ g/mL, resp.) to triplicate wells. Rat IgGs (purified from normal rat serum with protein A-sepharose beads (Sigma)) or mouse IgGs (purified from normal mouse serum and acquired from Pierce) were used as the negative controls. The invasion assays were performed using gentamicin protection assays as previously described [13].

2.5. bMEC Viability and *S. aureus* Growth Assays. To determine the effect of E2 on bMEC viability, 10,000 cells were incubated with different concentrations of the hormone in incomplete medium for 24 h at 37°C in 96-well plates. Then, 10 μ L of a 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) solution in PBS was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. Finally, 100 μ L of acid isopropanol (95% isopropanol and 5% 1 N HCl) were added to dissolve the formazan crystals. The optical density was measured with a microplate reader (BIO-RAD) at 595 nm.

The bMEC viability was also tested using the trypan blue exclusion assay and the cells were counted in an automated cell counter (BIO-RAD, TC20).

To analyze the effect of E2 on *S. aureus* growth, 9.2×10^7 CFU/mL were cultured at 37°C in LB broth. The bacterial suspensions were treated with different concentrations of the hormone (1, 5, 10, 50, 150, 300, and 500 pg/mL) and growth

was monitored turbidimetrically (600 nm) over 24 h (measuring the absorbance at 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h). To evaluate the *S. aureus* viability in the presence of E2, bacteria were grown (as previously described) in LB broth and were treated with E2 for 24 h at 37°C overnight. Later, the bacteria were plated on LB agar in triplicate and were incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined by standard colony counting.

Bacterial viability was also analyzed in the supernatants of the infection assays. To do this, the bMECs were treated with E2 and infected with *S. aureus* as described above. After 2 h of infection, the media were recovered and the bacteria pellet was obtained by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C and was washed three times with PBS. The *S. aureus* viability was measured using a LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit (Thermo Scientific). The pellet was incubated with equal volumes (1.5 mL) of component A (SYTO 9 dye, live indicator) and component B (propidium iodide, dead indicator) at room temperature in the dark for 15 min. After staining the bacteria, the pellet was washed three times with PBS. The fluorescent signals of 10,000 events were measured and evaluated using a BD Accuri™ C6 cytometer. In addition, *S. aureus* growth was also analyzed using the E2-treated bMEC conditioned media. To do this, the bacteria were grown at 37°C overnight, and a *S. aureus* suspension containing 9.2×10^7 CFU/mL (OD 0.2 at 600 nm) was incubated at 37°C for 2 h with the conditioned media. Then, the bacteria were plated on LB agar in triplicate and were incubated overnight at 37°C. The number of CFUs was determined as described previously.

2.6. Analysis of Receptors by Flow Cytometry. The bMEC polarized monolayers were cultured in 24-well dishes (Corning) and were treated with E2 (50 pg/mL) for 24 h and/or *S. aureus* as described above. This concentration was selected considering the highest inhibitory effect on bacterial internalization into bMECs. After the treatment, the cells were washed three times with PBS, detached with trypsin- (0.05%) EDTA (0.02%) (Sigma), centrifuged at 2,500 rpm for 10 min at 4°C, and washed with PBS. The bMEC pellet was blocked with normal goat serum (5% in PBS, Pierce) for 30 min at 4°C with shaking, and then the cells were centrifuged and the pellet was incubated with the primary antibodies anti-TLR2 or anti-integrin separately. To analyze the presence of the ERs (ER α or ER β), nuclei from the bMECs were obtained using the ProteoJet kit (Fermentas), and the procedure continued as described above. To measure the TLR2 membrane abundance (MA) or the nuclear presence of the ERs, the cells were incubated with the antibody at a dilution of 1:50 (PBS containing BSA 0.1%) for 1 h at 4°C with shaking. For the determination of integrin MA, invasion assays were performed using different infection times: 30, 60, and 120 min in control bMECs or E2-treated (50 pg/mL, during 24 h) bMECs. The invasion assay was completed as described previously. The cells were incubated with the anti- $\alpha 5 \beta 1$ integrin at a concentration of 10 μ g/mL for 2 h at 4°C with shaking. In all cases, after the primary antibody incubation, the bMECs were washed three times with PBS and incubated with the respective secondary antibody (diluted 1:50) (FITC-conjugated anti-mouse IgGs for TLR2 and ER α and FITC-conjugated anti-rat IgGs for

ER β and $\alpha 5 \beta 1$ integrin) for 1 h at 4°C with shaking in the dark. The pellet was recovered by centrifugation, washed, and fixed with paraformaldehyde (4%) for 10 min at 4°C and finally washed three times with PBS. The cells were then suspended in 100 μ L of PBS. The fluorescent signals of 10,000 events were measured and evaluated using the BD Accuri C6 cytometer.

2.7. Role of MAP Kinases in *S. aureus* Internalization into bMECs. The polarized bMEC monolayers were cultivated in 96-well flat-bottom plates that were coated (Corning-Costar) with 6–10 μ g/cm² rat-tail type I collagen (Sigma). The bMECs were incubated with E2 (50 pg/mL for 24 h). Prior to the invasion assay (30 min, 1 or 2 h), pharmacological inhibitors of p38 (5 μ M, SB203580), JNK (20 μ M, SP600125), or ERK1/2 (2.5 μ M, U0126) were added separately to the bMECs. The infection assays were performed with the gentamicin protection assays as described above. The cells lysates were plated on LB agar in triplicate and incubated overnight at 37°C. The CFU numbers were determined with the standard colony counting technique or *S. aureus* viability was measured using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit as described above. 0.1% DMSO (vehicle) was used as a control.

To evaluate the MAP kinase activation levels by flow cytometry, the bMECs were treated with E2 (50 pg/mL), *S. aureus*, or both, and the samples (30 μ g of protein) were prepared according to the manufacturer's protocol for adherent cells (Becton Dickinson, Germany). pp38 (T180/Y182), pJNK1/2 (T183/185), and pERK1/2 (T202/Y204) were quantitatively determined using antibodies from a Flex Set Cytometric Bead Array (Becton Dickinson) according to the manufacturer's protocol. The flow cytometric analyses were performed using the BD Accuri C6 and the CBA analysis FCAP software (Becton Dickinson). A total of 3,000 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.

2.8. RNA Isolation and RT-qPCR Analysis. Monolayers of bMECs were cultured in 6-well dishes ($\sim 5 \times 10^5$) and then were incubated with 50 pg/mL of E2 (24 h) and/or *S. aureus* (MOI 30:1) for 2 h, as described above. The RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. DNA contaminations were removed from RNA samples with DNase I treatment (Invitrogen). The RNA was used to synthesize cDNA as described previously [10]. The RT-qPCR assay was performed using the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) with a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The reactions were carried out with a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the internal control. The specific primer pairs were obtained from Invitrogen; their sequences and PCR conditions used to amplify the different bovine mRNAs are detailed in Table 1.

2.9. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). For the measurement of the TNF- α , IL-1 β , IL-6, and bovine β -defensin 1 (DEFB1) concentrations in the medium, the

TABLE 1: Oligonucleotides used in this study.

Gene (bovine)*	Primer	Sequence (5' → 3')	Fragment size (bp)	Tm (°C)	References
TAP	F	GCGCTCCTCTTCCCTGGTCCTG	216	57	[14]
	R	GCACGTTCTGACTGGGCATTGA			
LAP	F	GCCAGCATGAGGCTCCATC	194	54	[14]
	R	CTCCTGCAGCATTTTACTTGGGCT			
DEFB1	F	CCATCACCTGCTCCTCACA	185	54	[14]
	R	ACCTCCACCTGCAGCATT			
BNDB4	F	GCCAGCATGAGGCTCCATC	278	54	This study
	R	CGTTTAAATTTAGACGGTGT			
BNBD5	F	GCCAGCTGAGGCTCCATC	143	55	[14]
	R	TTGCCAGGGCACGAGATCG			
BNBD10	F	GCTCCATCACCTGCTCCTC	152	54	[14]
	R	AGGTGCCAATCTGTCTCATGA			
GAPDH	F	TCAACGGGAAGCTCACTGG	237	57	[14]
	R	CCCCAGCATCGAAGGTAGA			
$\alpha 5$ integrin	F	TGCAGTGTGAGGCCGTGTATGAAG	230	58	[10]
	R	CGGGAGGGAGCGTTTGAAGAAT			
$\beta 1$ integrin	F	TGCGAGTGTGGTTGCCTGTAAGT	123	60	[10]
	R	ATTGAAGGCTCGGCACTGAACA			
TLR2	F	CGACTGGCCCGATGACTACC	146	58.5	[15]
	R	TGAGCAGGAGCAACAGGAAGAG			
TNF- α	F	CCCCTGGAGATAACCTCCCA	101	56	[15]
	R	CAGACGGGAGACAGGAGAGC			
IL-1 β	F	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG	198	52	[15]
	R	CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA			
IL-6	F	AACCACTCCAGCCACAAACACT	179	57	[15]
	R	GAATGCCCAGGAACCTACCACAA			
IL-8	F	TTCCACACCTTTCCACCCCAA	149	53.5	[15]
	R	GCACAACCTTCTGCACCCACTT			
IL-10	F	GATGCGAGCACCTGTCTGA	129	59	[15]
	R	GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT			
S100A7 (psoriasin)	F	GCAGCTCTCAGCTTGAGCAG	221	54	[14]
	R	CCAGCAAGGACAGGAACCTCAG			
ER α	F	TTCGGAAGTGCTATGAGGTTG	139	55	This study
	R	GATATTCTTTGTGTTGGAGTTTTA			
ER β	F	GACCCTACCAGACCTTTCAGTG	153	60	This study
	R	TGCTCCATGCCTTTGTTGC			

*TAP: Tracheal Antimicrobial Peptide; LAP: Lingual Antimicrobial Peptide; DEFB1: Defensin Beta 1; BNBD4: Bovine Neutrophil Beta Defensin 4; BNBD5: Bovine Neutrophil Beta Defensin 5; BNBD10: Bovine Neutrophil Beta Defensin 10; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; TLR2: Toll-Like Receptor 2; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ; IL-1 β : Interleukin 1- β ; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; IL-10: Interleukin-10; S100A7: S100 Calcium-binding protein A7; ER α : Estrogen Receptor α ; ER β : Estrogen Receptor β .

conditioned media from bMECs treated with E2 (50 pg/mL) and/or *S. aureus* were collected. The concentrations of TNF- α were measured using the Duoset ELISA development kit (R&D Systems) to quantify the bovine TNF- α levels according to the manufacturer's instructions, and the concentrations of IL-1 β and IL-6 were assessed using the bovine IL-1 β and IL-6 screening kits, respectively (Thermo Scientific). The

measurement of bovine DEFB1 in bMECs culture medium was analyzed using the ELISA kit for DEFB1 (MyBiosource).

2.10. Nitric Oxide Production Assay. The nitric oxide (NO) secreted by bMECs into culture medium was evaluated by measuring the nitrite concentration (NO $^{2-}$) in cell-free media using the Griess reaction [16]. After the invasion

assays, the medium was filtered through 0.22 μ M membranes (Millipore) to eliminate bacteria.

2.11. Data Analysis. The data were obtained from three independent experiments, each of which was performed in triplicate (except for the ELISA of DEFB1, which was performed in duplicate) and compared by analysis of variance (ANOVA). The results are reported as the means $\pm$ the standard errors (SE) and the significance level was set at $P < 0.05$, except for RT-qPCR analysis where standard deviations are shown and fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significantly differentially expressed mRNAs according to Morey et al. [17]. The results from internalization assays, gene expression analyses, and receptor membrane abundance experiments are shown normalized to the cells treated with vehicle (1% ethanol).

3. Results

3.1. Estradiol Does Not Affect Bacterial Growth and bMEC Viability. To evaluate the effect of E2 on *S. aureus* growth and bMEC viability, we incubated bacteria or bMECs in the presence of different concentrations of this hormone (1–500 pg/mL). Bacterial viability was analyzed by counting the CFUs and by the MTT assay. The results showed that E2 did not have effect on bMEC viability after 24 h of culture (Figures 1(a) and 1(b)), which was determined by a trypan blue exclusion analysis and the MTT assays. In the same way, we showed that E2 did not affect the bacterial viability and growth (Figures 1(c) and 1(d)).

3.2. Estradiol Reduces *S. aureus* Internalization into the bMECs. To determine the effect of E2 on *S. aureus* internalization into the bMECs, we carried out gentamicin protection assays. To achieve this, bMECs were treated with different concentrations of the hormone (1–500 pg/mL) 24 h before the challenge with the bacteria. According to the number of CFUs recovered, a concentration of 50 pg/mL of E2 significantly inhibited *S. aureus* internalization into the bMECs by 50% (Figure 2). The concentrations of 1, 10, and 300 pg/mL also reduced internalization by 20%. The other concentrations did not affect the internalization rate of *S. aureus* into the bMECs. Considering these results, in the following experiments related to the regulation of the innate immune response of bMECs by E2, we analyzed only the concentration of 50 pg/mL.

3.3. $\alpha 5\beta 1$ Integrin Membrane Abundance Is Not Required for the Internalization of *S. aureus* Inhibited by E2. Because $\alpha 5\beta 1$ integrin is one of the main extracellular receptors of epithelial cells employed during *S. aureus* internalization, we wondered whether the specific functional blocking of $\alpha 5\beta 1$ integrin would modify the number of bacteria internalized into the bMECs. To test this, primary cultures of bMECs treated for 24 h with E2 were incubated with a specific antibody against $\alpha 5\beta 1$ integrin (Figure 3(a)). E2 treatment (50 pg/mL) reduced the number of CFUs internalized into the bMECs, but the blockade of $\alpha 5\beta 1$ integrin slightly reduced this number ($\sim 20\%$). In addition, the bMECs treated with vehicle

reduced $\sim 60\%$ of the *S. aureus* internalization when $\alpha 5\beta 1$ integrin was blocked. This finding suggests that, during the internalization of *S. aureus* into the E2-treated bMECs, integrin $\alpha 5\beta 1$ does not participate.

To determine whether this effect is correlated with $\alpha 5\beta 1$ integrin gene expression, we evaluated the gene expression of both subunits by RT-qPCR. *S. aureus* induced the expression of the $\alpha 5$ subunit (~ 8 -fold), and E2 upregulated the expression of both subunits. However, the effect of both treatments was similar to the effect of *S. aureus* (Figure 3(b)). To analyze whether this effect is correlated with the $\alpha 5\beta 1$ integrin MA in the bMECs, we performed a flow cytometry analysis. The mean fluorescence intensity was used as an indicator of the level of integrin expression per cell in the population. This analysis is shown in Figure 3(c). E2 significantly reduces the level of $\alpha 5\beta 1$ integrin MA ($\sim 40\%$); however, after 2 h of challenge with *S. aureus*, the level of $\alpha 5\beta 1$ integrin MA was reduced in a similar manner as that of the E2-treated cells. A similar effect was also observed when the E2-treated bMECs were infected, indicating that integrin is taken up together with bacteria. Typical population profiles from the flow cytometry analysis are also shown in Figure 3(c). We additionally evaluated the level of $\alpha 5\beta 1$ integrin MA at different times of challenge with *S. aureus* in the E2-treated bMECs. The results from this evaluation are shown in Figure 3(d). The presence of $\alpha 5\beta 1$ integrin at the membrane of the bMECs was reduced starting from 30 min of *S. aureus* challenge, showing a similar behavior both in the control and E2-treated cells. Despite the data showing that E2 reduces integrin MA (24 h treatment), these results suggest that bacteria are able to induce integrin trafficking. Thus, $\alpha 5\beta 1$ integrin MA does not contribute to the reduction in internalization detected in the E2-treated bMECs (Figure 2).

3.4. Regulation of TLR2 Expression by E2 in the bMECs. To explore whether TLR2 participates in the reduction of *S. aureus* internalization into the bMECs induced by E2, we investigated whether the blockade of this receptor with a specific antibody would modify bacterial endocytosis. As shown in Figure 4(a), the blockade of TLR2 results in a significant reduction in the amount of *S. aureus* internalized ($\sim 50\%$); however, a slight reduction was detected in the E2-treated cells ($\sim 15\%$). Surprisingly, E2 induces TLR2 gene expression (~ 6 -fold) (Figure 4(b)). As we previously reported [10], *S. aureus* induces TLR2 mRNA expression (~ 3 -fold); however, the effect of both treatments was similar to the effect of *S. aureus* alone. The analysis of the mean fluorescence intensity (Figure 4(c)) shows that only *S. aureus* (~ 1.4 -fold) increased the TLR2 MA, but there is no difference in the TLR2 MA in the presence of E2 and bacteria compared with that obtained with infection alone. Thus, TLR2 could not be involved in *S. aureus* internalization, and it is probably inactivated in E2-treated bMECs.

3.5. Activation of TLR2 Signaling Pathways by E2 and *S. aureus*. Next, we evaluated whether E2 (50 pg/mL) induces the activation of MAPKs (p38, JNK, or ERK1/2), which are activated by TLR2. Initially, we investigated whether these kinases participate in *S. aureus* internalization into bMECs

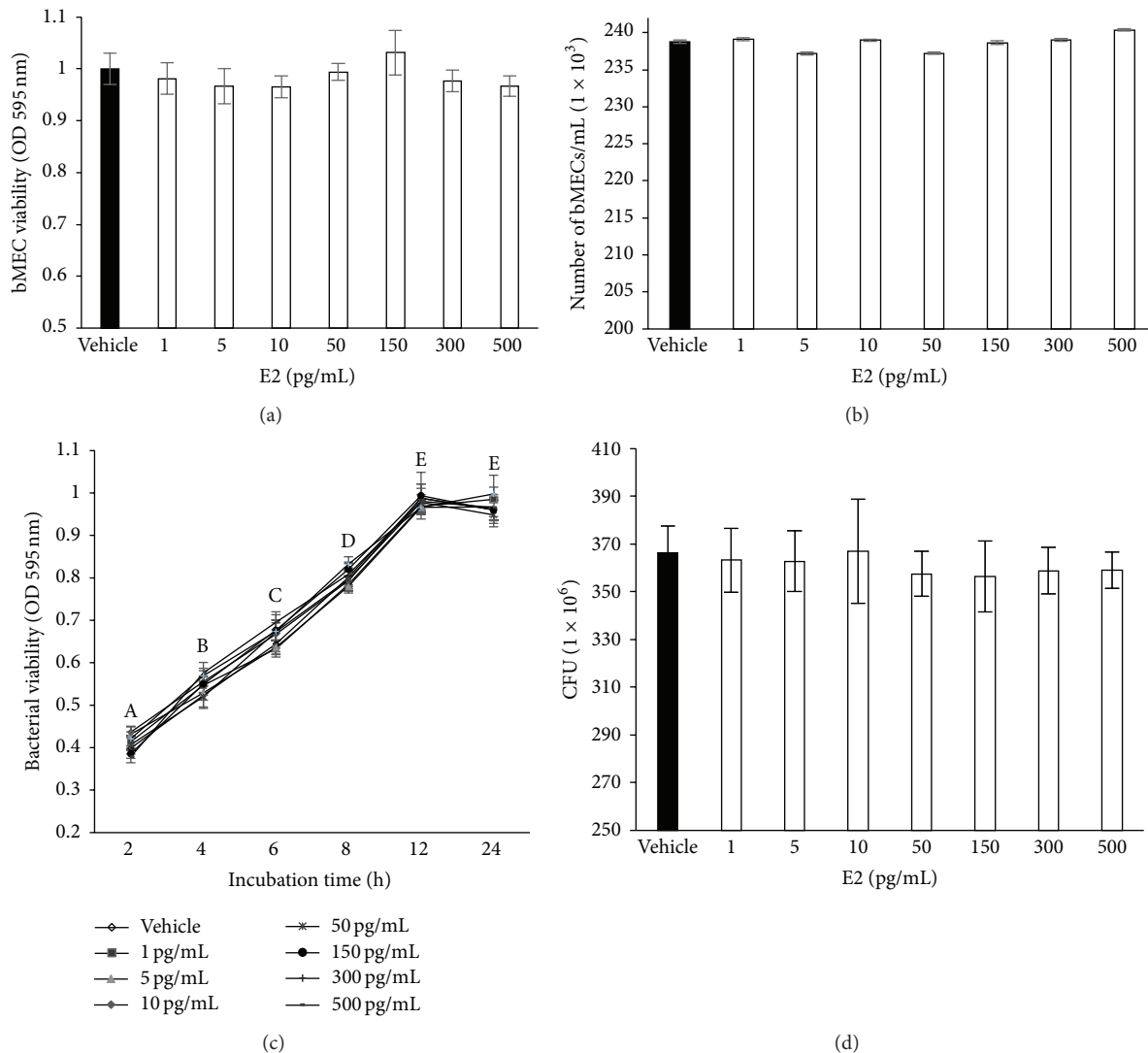


FIGURE 1: Bovine mammary epithelial cell viability and *S. aureus* growth in the presence of E2. (a) bMECs were cultured with E2 and viability was determined by MTT assay at 24 h. (b) bMECs were cultured with the hormone and viability was calculated by a trypan blue exclusion assay. The number of viable bMECs/mL is shown. In all cases, concentrations evaluated were 1, 5, 10, 50, 150, 300, and 500 pg/mL. (c) *S. aureus* was cultured in the presence of E2 at different times during 24 h and bacteria viability was analyzed by MTT assay. (d) Bacterial growth was determined counting the CFUs of *S. aureus* treated with different concentrations of E2 during 24 h. Each point in (a), (b), (c), and (d) shows the mean of triplicates $\pm$ SE of three independent experiments. The vehicle corresponds to bMECs treated with 1% ethanol. Different letters indicate significant changes among the different incubation times ($P < 0.05$).

using pharmacological inhibitors prior to bacterial invasion. bMECs that were incubated (for 30 min or 1 or 2 h) with pharmacological inhibitors of p38 (5 μ M, SB203580), JNK (20 μ M, SP600125), or ERK1/2 (2.5 μ M, U0126) showed a considerable reduction in *S. aureus* internalization (~50–60% reduction), indicating that these kinases are involved in this process (Figure 5(a)). *S. aureus* internalization was also analyzed by CFU counting and flow cytometry, which obtained similar results (Figure 5(b)). Interestingly, these kinases do not participate in the reduction of bacterial internalization induced by E2 because in the presence of inhibitors this reduction persists.

Furthermore, we evaluated p38, JNK, and ERK1/2 phosphorylation to relate their activation states with the E2-mediated reduction of *S. aureus* internalization into bMECs. When the bMECs were *S. aureus*-challenged (2 h), the basal activation of p38 was not modified, phosphorylated JNK1/2 was augmented, and ERK1/2 activation was reduced (Figure 5(c)), as we previously reported [18]. The vehicle employed for the MAPK dilutions was 0.1% DMSO, which did not have an effect on internalization assays (data not showed), as was previously reported [18]. Interestingly, the bMECs that were treated with E2 demonstrated reduced p38 phosphorylation (~5-fold), and the ERK1/2 activation

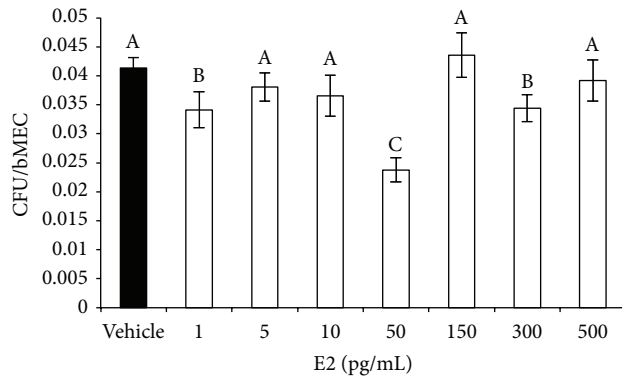


FIGURE 2: E2 decreases *S. aureus* internalization into bMECs. bMECs were treated with the concentrations indicated of E2 (24 h), and then were challenged with *S. aureus* during 2 h. Data are showed as the percentage of CFU recovered after bMEC lysis. Values were determined considering the control (bMECs cultured with the vehicle 1% ethanol) as 100% internalization. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SE of three independent experiments. Different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$).

levels were also reduced by ~ 1 -fold, but JNK1/2 remained unchanged in relation to the control cells. When the E2-treated cells were *S. aureus*-challenged, the p38 activation level was augmented; however, the JNK1/2 and ERK1/2 activation levels were essentially not changed. The MAPK results indicated that E2, prior to bacterial invasion, inhibits the bMEC inflammatory response via p38 and ERK1/2 inactivation.

3.6. E2 Induces the Activation of ER α in bMECs. Estrogens act through the estrogen receptors ER α and ER β , which belong to the nuclear receptor superfamily of transcription factors. To determine whether these receptors are activated in bMECs treated with E2 and/or infected with *S. aureus*, we performed a flow cytometry analysis. We used an anti-ER α antibody, which recognizes its phosphorylated isoform, as an indicator of its activation. To perform these analyses, we isolated bMEC nuclei. In Figure 6(a), we show that E2 slightly induces the activation of ER α ($\sim 20\%$), which was returned to basal levels during *S. aureus* infection. Regarding the expression of ER α mRNA, we observed that E2 also induces the expression of its gene (~ 5 -fold), but after infection this induction is higher (~ 25 -fold) (Figure 6(b)).

With regard to ER β activation, we performed flow cytometry analysis on the bMEC nuclei. In Figure 6(c), we show that only the bMECs infected with *S. aureus* induce the activation of this receptor in both vehicle- or E2-treated cells. However, E2 treatment does not induce ER β activation. In addition, the expression of ER β mRNA was induced both in the E2-treated and the *S. aureus*-challenged bMECs (~ 3.5 -fold) (Figure 6(d)). The infection of the bMECs treated with the hormone maintained the upregulated levels of ER β (~ 2.5 -fold). According to these results, we hypothesized that 50 pg/mL E2 activates the bMECs via ER α .

3.7. E2 Maintains an Anti-Inflammatory Profile in the bMECs. Next, we explored whether E2 modified the inflammatory response of the bMECs before and during *S. aureus* infection. We focused on (i) proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6; (ii) an anti-inflammatory cytokine (IL-10); and (iii) a chemokine, IL-8 (Figure 7). Regarding the proinflammatory cytokines, we performed RT-qPCR for mRNA expression and ELISAs for the evaluation of cytokine secretion. The bMECs treated with E2 (50 pg/mL, 24 h) significantly increased TNF- α and IL-1 β mRNA expression (~ 7 - and 3-fold, resp.) (Figure 7(a)). *S. aureus* infection alone also induced the expression of both cytokines (~ 5 -fold for TNF- α and ~ 3 -fold for IL-1 β). In the presence of *S. aureus*, the E2-treated bMECs reduced the expression of TNF- α and IL-1 β mRNAs. The expression of IL-6 remained unchanged in all of the treatments. Interestingly, in the E2-treated cells the secretion of these proinflammatory cytokines was diminished in relation to bMECs treated with vehicle (Figure 7(c)). Furthermore, 50 pg/mL of E2 also reduced the secretion of TNF- α and IL-6 in the infected bMECs. Only the secretion of IL-1 β was increased when the E2-treated cells were infected with *S. aureus*. In Figure 7(b), we show that E2 also induces the expression of IL-10 and IL-8 mRNAs (~ 2.5 and 4.5-fold, resp.). The infection induced the expression of IL-10 but together with the hormone increased its expression (~ 8 -fold). The expression of IL-8 was not modified in the presence of infection both in the vehicle- and E2-treated cells. Altogether, these results point to the anti-inflammatory effects of E2 on the bMECs infected with *S. aureus*.

3.8. Effects of E2 on the Expression and Secretion of Antimicrobial Molecules in the bMECs. To explore if some antimicrobial mediators are being regulated by E2, which could explain the reduction in *S. aureus* internalization, we measured the viability of *S. aureus* in the infection assays. In Figure 8(a), we show the viability of *S. aureus* from the supernatants obtained from the invasion assays (2 h). *S. aureus* employed in the invasion assays from the E2-treated bMEC cultures showed a reduced viability rate (60% of reduction) compared to the bacteria recovered from the supernatants of the vehicle-treated bMECs. This result suggests that antimicrobial components are present in the culture media from the bMECs treated with 50 pg/mL of E2. With the purpose of reinforcing these data, we incubated *S. aureus* for 2 h with 1 mL of conditioned media obtained from the vehicle- or E2-treated bMECs. According to Figure 8(b), the conditioned medium from the E2-treated bMECs reduces the number of CFU of *S. aureus* (a 60% of reduction). These results suggest that E2-treated bMECs secrete antimicrobial components. Next, we explored whether the gene expression of some antimicrobial elements was induced in the E2-treated bMECs. Figure 8(c) shows the RT-qPCR analysis of different antimicrobial peptides, including several β -defensins and 1 psoriasin (S100A7). E2 upregulates the expression of the β -defensins bovine defensin $\beta 1$ (DEFB1, ~ 5 -fold) and Bovine Neutrophil Beta Defensin 5 (BNBD5, ~ 3 -fold). In addition, E2 induces the expression of psoriasin S100A7 (~ 6.5 -fold). In the presence of infection, only psoriasin S100A7 mRNA was induced (~ 13 -fold). The other peptides analyzed remained unchanged in

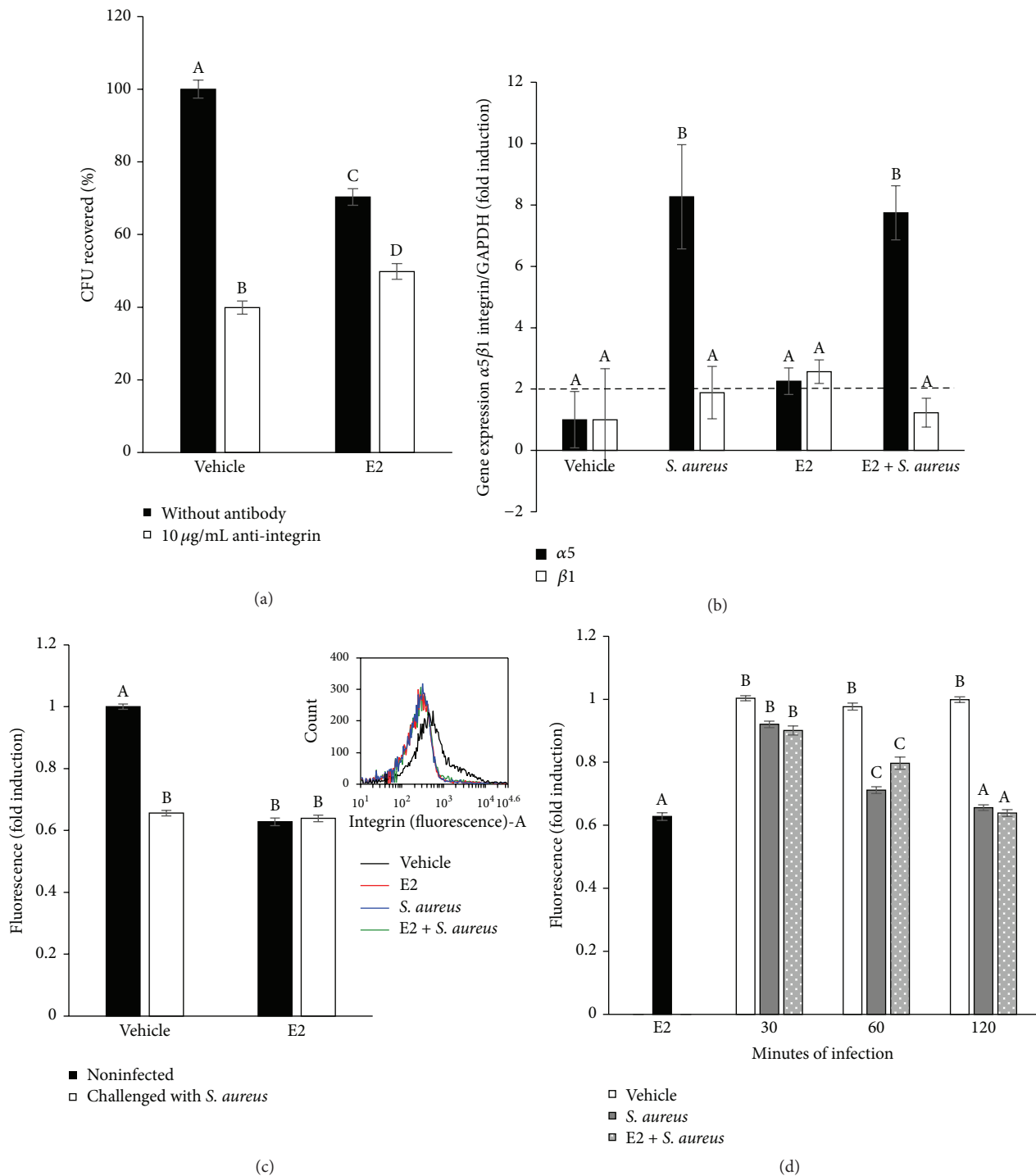


FIGURE 3: Role of $\alpha 5 \beta 1$ integrin during the internalization of *S. aureus* into bMECs inhibited with E2. (a) Primary cultures of bMECs treated for 24 h with E2 (50 μ g/mL) were incubated with 10 μ g/mL of a specific blocking antibody against $\alpha 5 \beta 1$ integrin for 1 h and then challenged with *S. aureus* (MOI 30:1 bacteria per cell). The number of internalized bacteria is represented by the ratio of CFU/bMEC recovered after lysis of bMECs. (b) The $\alpha 5 \beta 1$ mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and GAPDH was used as endogenous gene in all conditions. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. (c) The relative fluorescence intensities of $\alpha 5 \beta 1$ membrane abundance in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus* are shown. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. An inserted histogram plot that shows $\alpha 5 \beta 1$ staining data in vehicle-treated bMECs (black line), cells that were challenged with *S. aureus* (blue line), cells that were stimulated with E2 (red line), and E2-treated bMECs infected with *S. aureus* (green line). The cells were fixed and stained extracellularly with an anti- $\alpha 5 \beta 1$ antibody overnight and analyzed by flow cytometry. (d) The abundance of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the bMEC membrane determined as the mean of the fluorescence of challenged bMECs at different times of infection with the same MOI (30:1 bacteria per cell). A total of 10,000 events were measured. Different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$), except for (b), where different letters above the bars indicate significant changes among the four treatments within the same gene evaluated ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

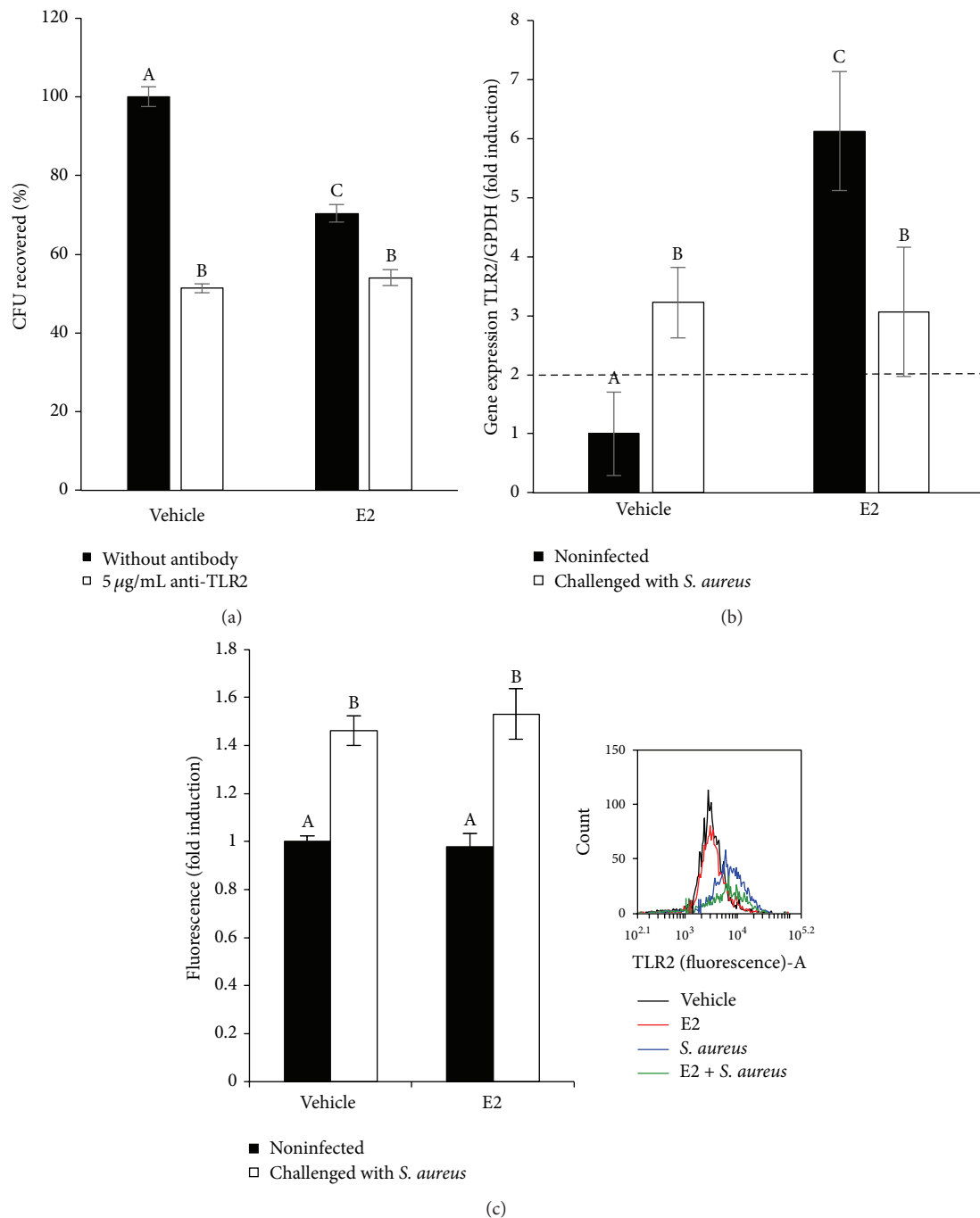


FIGURE 4: Participation of TLR2 in the internalization of *S. aureus* by bMECs inhibited with E2. (a) Primary cultures of bMECs treated for 24 h with E2 (50 pg/mL) were incubated with 5 $\mu\text{g/mL}$ of a specific blocking antibody against TLR2 for 1 h and then challenged with *S. aureus* (MOI 30 : 1 bacteria per cell). The number of internalized bacteria is represented by the ratio of CFU/bMEC recovered after lysis of bMECs. (b) The TLR2 mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and GAPDH was used as endogenous gene in all conditions. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. (c) The relative fluorescence intensities of TLR2 membrane abundance in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus* are shown. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. An inserted histogram plot that shows TLR2 staining data in vehicle-treated bMECs (black line), cells that were challenged with *S. aureus* (blue line), cells that were stimulated with E2 (red line), and E2-treated bMECs infected with *S. aureus* (green line). The cells were fixed and stained extracellularly with an anti-TLR2 antibody overnight and analyzed with flow cytometry. Different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

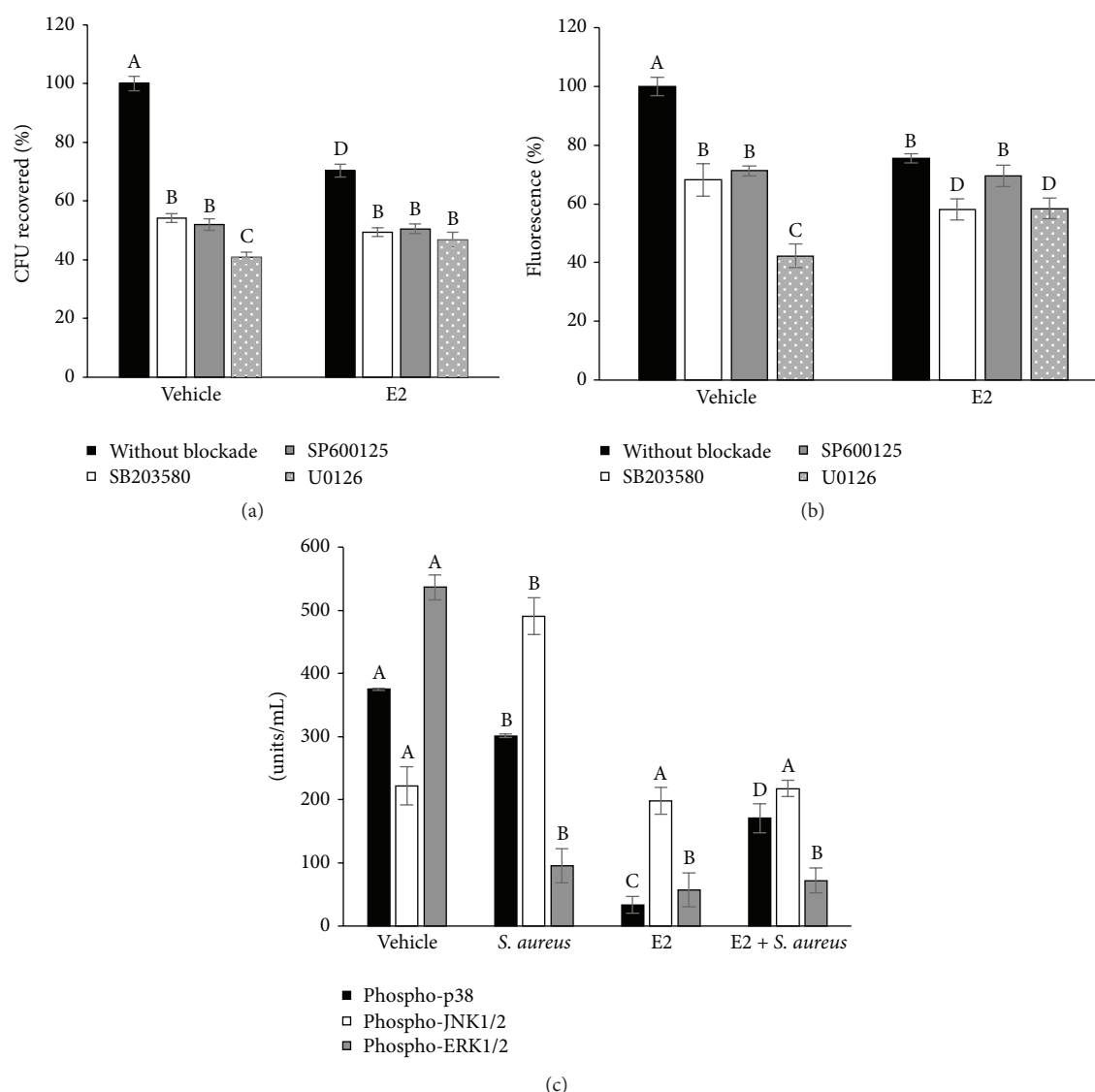


FIGURE 5: Role of MAPKs p38, JNK, and ERK1/2 in E2-treated bMECs during *S. aureus* internalization. (a) Participation of MAPKs in *S. aureus* internalization determined by CFU units. bMECs were incubated (30 min, 1 or 2 h) with pharmacological inhibitors of p38 (5 μ M, SB203580), JNK (20 μ M, SP600125), or ERK1/2 (2.5 μ M, U0126) prior to infection with *S. aureus* (2 h). Values were determined considering the control (bMECs cultured with the vehicle 1% ethanol) as 100% internalization. (b) The same procedure was used to determine *S. aureus* internalization by flow cytometry using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. (c) Phosphorylation was measured in bMECs that were treated with 50 pg/mL E2 and/or challenged with *S. aureus* by flow cytometry. The phosphorylated MAPK concentrations (U/mL) are represented: (a) p38, (b) pJNK, and (c) pERK1/2. SB203580: p38 inhibitor. SP600125: JNK1/2 inhibitor. U0126: ERK1/2 inhibitor. According to manufacturer's protocol 300 events were obtained. In (a) and (b) different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$), and in (c) different letters above the bars indicate significant changes among the four treatments within the same MAPK evaluated ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

relation to the control cells. A similar behavior was observed in the cells treated with E2 and infected with *S. aureus*, where the expression of psoriasin was upregulated by ~9-fold. Considering these results, we measured the accumulation of DEFB1 in the bMEC medium by ELISA. In Figure 8(d), we show that E2 does not induce the secretion of DEFB1 in the culture medium, which is stimulated by infection. *S. aureus* infection in the E2-treated cells reduces the concentration of DEFB1 secreted in relation to infection alone. Thus, this is not the mechanism by which bacterial internalization is

reduced in the E2-treated cells. In addition, the secretion of NO was not modified in the presence of E2 in the bMECs (Figure 8(e)), and thus it is not involved in the reduced internalization detected in the E2-treated bMECs.

4. Discussion

It is well known that, during the postpartum period, dairy cows experience an increased incidence of mammary infectious diseases, such as mastitis. This augmented frequency

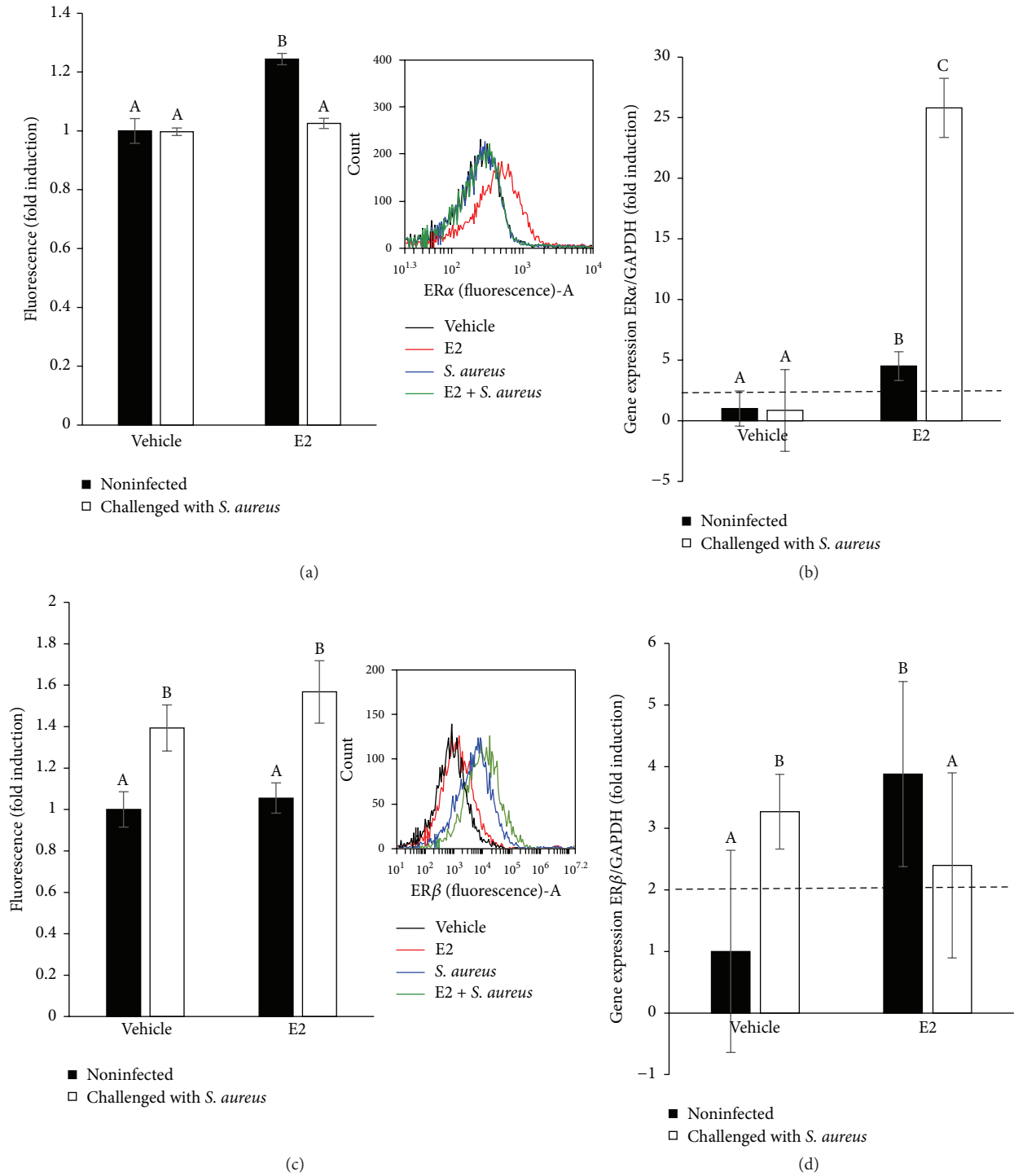


FIGURE 6: Participation of ERs in E2-treated bMECs. (a) The relative fluorescence intensities of ER α activation in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus* are shown. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. An inserted histogram plot that shows ER α staining data in vehicle-treated bMECs (black line), cells that were challenged with *S. aureus* (blue line), cells that were stimulated with E2 (red line), and E2-treated bMECs infected with *S. aureus* (green line). The bMEC nuclei were fixed and stained with an anti-pER α antibody overnight and analyzed with flow cytometry. (b) The ER α mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and GAPDH was used as endogenous gene in all conditions. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. (c) The relative fluorescence intensities of ER β activation in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus* are shown. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. An inserted histogram plot that shows ER β staining data in vehicle-treated bMECs (black line), cells that were challenged with *S. aureus* (blue line), cells that were stimulated with E2 (red line), and E2-treated bMECs infected with *S. aureus* (green line). The bMEC nuclei were fixed and stained with an anti-ER β antibody overnight and analyzed with flow cytometry. (d) The ER β mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and GAPDH was used as endogenous gene in all conditions. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. Different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

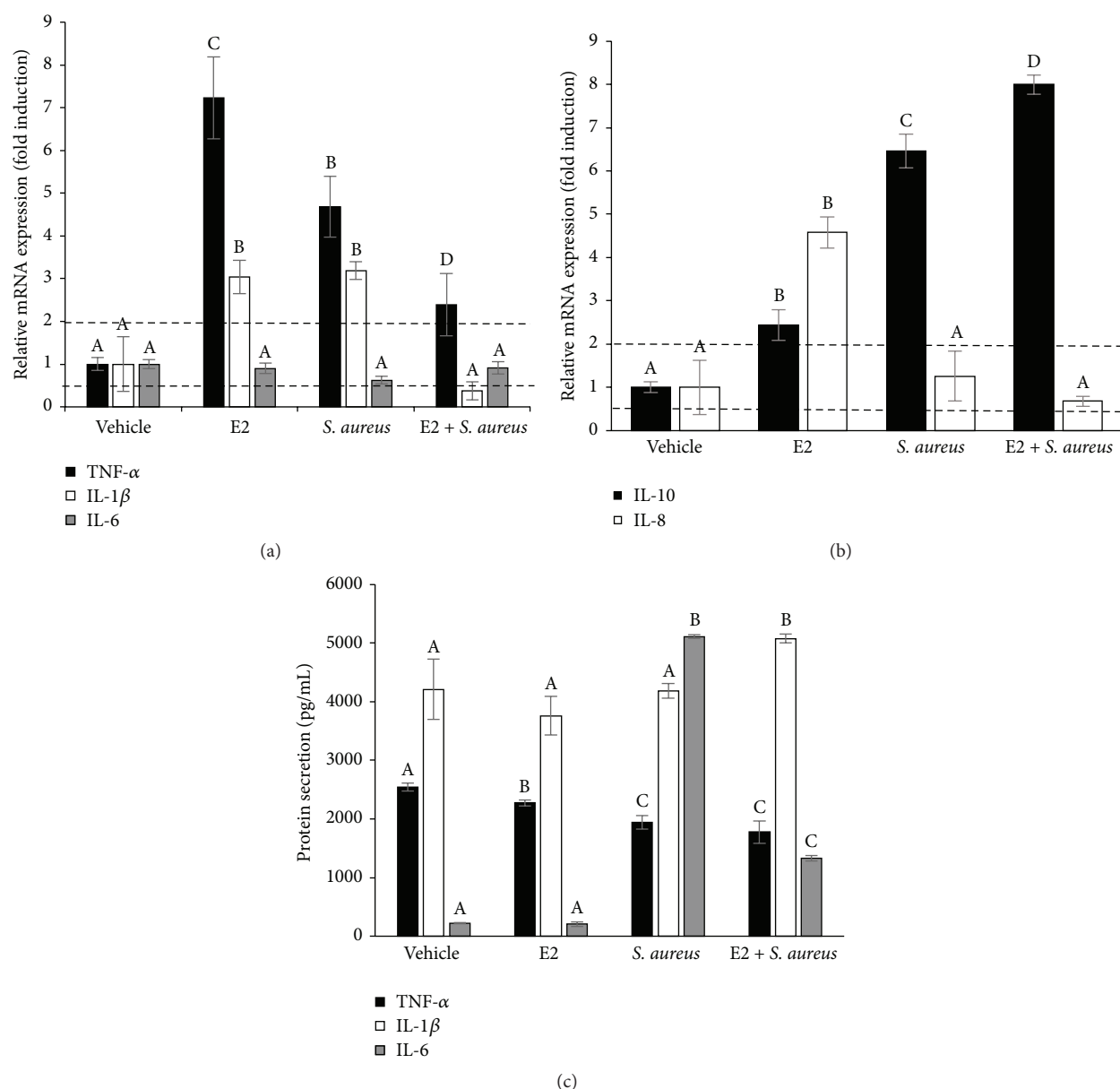


FIGURE 7: Expression of pro- and anti-inflammatory genes in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus*. (a) RT-qPCR analysis showing the mRNA expression levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6. The bMECs were treated with 0.5 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. (b) RT-qPCR analysis showing the mRNA expression levels of IL-10 and IL-8. The bMECs were treated with 50 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. The data are presented as the ratio of the target gene expression compared with the expression level of GAPDH. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. (c) Concentrations of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in culture medium of bMECs treated with 50 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. The protein concentrations were determined by ELISA. Different letters above the bars indicate significant changes among the four treatments within the same gene or cytokine evaluated ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

has been correlated with a decreased functionality of the innate immune system [3]. During this period, E2 levels rise abruptly in the last week before parturition, peak in the last 3 days before delivery, and fall rapidly after calving and regain basal values [3, 4]. It has been described that estrogens have both anti-inflammatory and proinflammatory functions, and their role in the modulation of the innate immune response of

epithelial cells during infection has been documented [19]. It has been shown that E2 is required for mammary epithelial cell proliferation and ductal development in the growing animal [20]. In addition, the presence of ERs has been shown in this tissue [20]. The goal of this work was to study the immunomodulatory functions of E2 on bMECs during *S. aureus* infection, which have not been explored to date.

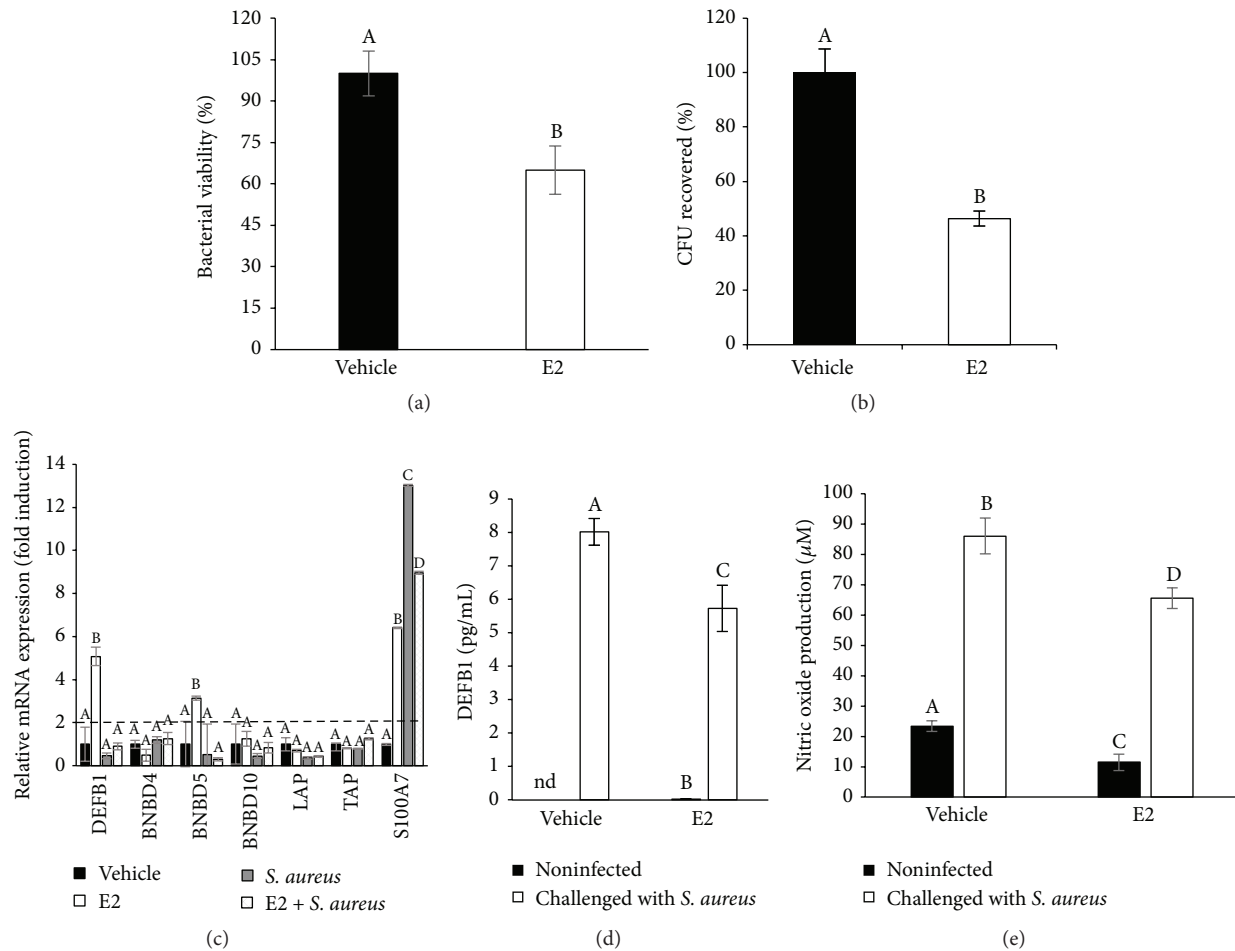


FIGURE 8: Expression and production of antimicrobial molecules in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus*. (a) *S. aureus* viability from supernatants of infection assays performed in the absence of gentamicin. Noninternalized bacteria viability was analyzed by flow cytometry using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. Values were determined considering the effect of control (bMECs cultured with the vehicle 1% ethanol) as 100% of viability. (b) Effect of conditioned medium from bMECs treated with vehicle (1% ethanol) or E2 (50 pg/mL) for 24 h on *S. aureus* viability. Bacteria were incubated 2 h with conditioned media and viability was analyzed by flow cytometry using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit. Fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. Values were determined considering the effect of control-conditioned medium (bMECs cultured with the vehicle 1% ethanol) as 100% of viability. (c) RT-qPCR analysis showing the mRNA expression levels of DEFBI, BNBD4, BNBD5, BNBD10, LAP, TAP, and S100A7. The bMECs were treated with 50 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. The data are presented as the ratio of the target gene expression compared with the expression level of GAPDH. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SD of three independent experiments. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered as significant differentially expressed mRNAs. (d) Concentration of DEFBI in culture medium of bMECs treated with 50 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h. The protein concentrations were determined by ELISA. Each bar shows the mean of duplicates $\pm$ SD from different experiments, nd: nondetermined. (e) Nitric oxide production in bMECs treated with 50 pg/mL of E2 for 24 h and then challenged with *S. aureus* for 2 h, measured as NO_2 concentration in culture medium. Each bar shows the mean of triplicates $\pm$ SE of three independent experiments. Different letters indicate significant changes among treatments ($P < 0.05$), except for (c), where different letters above the bars indicate significant changes among the four treatments within the same gene evaluated ($P < 0.05$). Vehicle: 1% ethanol.

According to previous reports showing immunomodulatory functions of E2 on bovine neutrophils, we evaluated E2 in a range of concentrations between 1 and 500 pg/mL [6]. Bacteria are capable of metabolizing sex steroid hormones, such as estradiol [21]. Thus, it is important to analyze whether E2 alters *S. aureus* viability or growth. At the incubation times and the range of E2 concentrations analyzed we did not detect a bacteriostatic or a bactericidal effect of E2 on *S. aureus* (Figure 1). In agreement, Hosoda et al. [22] showed that

different steroid hormones were not bactericidal for *S. aureus*. In addition, at the range of concentrations tested, E2 was not toxic to the bovine mammary epithelial cells. Sobolewska et al. [23] have reported that similar concentrations of E2 and progesterone exert stimulatory effects on autophagy in bMECs after 48 h, which is implied during the involution of the bovine mammary gland in the dry period. In the present study, we cannot discard the possibility that longer incubation times with E2 could be cytotoxic for these cells.

In this work, we demonstrated that 50 pg/mL of E2 significantly inhibits ~50% *S. aureus* internalization into the bMECs (Figure 2). Because E2 does not have antibacterial activity, this reduction might be the result of the immunomodulatory effects that have been associated with this hormone. According to our results, the effect of E2 on *S. aureus* internalization shows a nonmonotonic dose-response curve. This behavior requires further investigation, however; nonmonotonic effects of E2 have been described on the development of mammary gland in *in vivo* models, as well as in human breast cancer cells. A possible explanation could be related to the versatility of E2 actions, which include the classic genomic functions, as well as nongenomic or membrane-initiated estrogen-signaling pathway [24, 25]. The inhibitory effect of E2 on *S. aureus* internalization cannot be attributable to the reduction in integrin $\alpha 5 \beta 1$ MA because this receptor does not participate in the internalization of *S. aureus* in E2-treated bMECs. In addition, although E2 reduces $\alpha 5 \beta 1$ MA, the presence of bacteria promotes its traffic at early times of infection (Figure 3), as we reported previously [10]. Considering this, the inhibition on *S. aureus* internalization in the E2-treated bMECs could be a consequence of the activation of immunomodulatory pathways. To explore this possibility, we analyzed the participation of the receptor TLR2 in this process. Accordingly, the results shown in Figure 4 suggest that E2 does not induce the MA of this receptor despite the fact that it upregulates the expression of its gene. Mammary epithelial cells play an essential role in the surveillance of mammary tissue during infections because they help in immune cell recruitment and bacterial recognition via the TLR signaling pathways [26, 27]. TLR2 is the major receptor for *S. aureus* detection and also mediates immunomodulatory functions [28]. We have previously demonstrated that *S. aureus* induces TLR2 MA and activation in bMECs in the same way that the lactogenic hormone prolactin stimulates *S. aureus* internalization in the bMECs [10]. E2 shows differential effects on TLR2 expression and/or activation; for example, in THP-1 cells, it increases the expression of TLR2 mRNA [29], but, in a bovine oviduct epithelial cell culture, it reduces the LPS-induced TLR2 mRNA expression [30]. Thus, the activation of the TLR2 pathways by E2 depends on the tissue and the physiological condition of the organism. In agreement with the absence of TLR2 activation in E2-treated bMECs, we detected that the MAPK p38 and ERK1/2 are inactivated in these cells (Figure 5). In addition, these kinases are not employed during the inhibition of *S. aureus* internalization induced by E2 (Figure 5). We have previously reported that these three MAPKs are required during *S. aureus* internalization into the bMECs [18].

We next explored whether E2 or infection regulates ERs activation because the direct effects of this hormone are exerted via intracellular ERs. In Figure 6, we showed that E2 induces the intracellular activation of ER α , as well as upregulating the expression of its gene. Likewise, *S. aureus* infection increases ER α mRNA expression in the E2-treated bMECs, but this induction is not related with ER α activation. In agreement, Yart et al. [31] reported that in a cell line of bMECs (MAC-T) the expression of ER α protein increases in response

to E2 treatment. However, the activation of ER α by infection has not been extensively explored to date. Accordingly, Holm et al. [32] described that LPS from Gram-negative bacteria reduces ER α protein in endothelial cells. The presence of ER β in the nuclei from infected bMECs (Figure 6(c)) indicates the participation of this receptor during *S. aureus* infection, which has not been reported. Nevertheless, flow cytometry analysis reveals that E2 does not activate ER β . Taken together, these results suggest that E2 activates ER α in bMECs, which might be directly or indirectly implicated in the reduction of *S. aureus* internalization. Because we did not detect the activation of MAPKs in the E2-treated bMECs (Figure 5(c)) it is probable that E2 triggers the direct activation of ER α in bMECs, which up- and/or downregulates the transcription of various genes by binding to the estrogen response element of the genes or by interacting with other transcription factors [33]. To address this hypothesis, we analyzed some inflammatory genes in the E2-treated bMECs in the absence or presence of *S. aureus* infection. We previously reported that, with the exception of TNF- α , *S. aureus* inhibits the innate immune response of bMECs, as it is unable to induce the gene expression of some proinflammatory cytokines, such as IL-1 β or IL-6 [10]. However, we also reported that, in the presence of ethanol as vehicle (2%), *S. aureus* slightly induces IL-1 β mRNA expression [15]. The results from this work strengthen previous reports. Interestingly, E2 at 50 pg/mL significantly increases proinflammatory cytokine mRNA expression such as TNF- α and IL-1 β , prior to *S. aureus* infection. However, upon infection, the levels of both cytokine mRNAs were downregulated in E2-treated bMECs. The differential influence of E2 on the expression of innate immune response genes depends on multiple factors, such as the hormone concentration or the physiological condition of the individuals [34]. These results coincide with other reports using urinary epithelial cells, where E2 reduces the LPS-induced cytokine expression [19]. Steroids have the ability to suppress (and/or resolve) an inflammatory response. In agreement with the anti-inflammatory function of E2 on bMECs, we detected a significant reduction in the secretion of proinflammatory cytokines (Figure 7(c)) in the E2-treated cells. This effect was maintained in the presence of *S. aureus*, with exception of IL-1 β , which was induced in the infected E2-treated cells. This effect can be the consequence of the activation of other mechanisms, such as inflammasome activation, which requires further research [35]. Interestingly, and in agreement with the anti-inflammatory actions of the hormone, E2 also induces the mRNA expression of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, which was upregulated by the hormone in the E2-treated cells challenged with *S. aureus*.

In addition to the immunomodulatory role of E2, it has been reported that this hormone also induces the production of antibacterial compounds in uterine epithelial cells [19]; a similar effect in the present model could explain the reduction in the internalization of *S. aureus*. Our data suggest that E2-treated bMECs produce an antibacterial compound, which is secreted into the culture medium (Figures 8(a) and 8(b)). To determine the origin of this activity, we analyzed the mRNA expression of different antimicrobial peptides (β -defensins and psoriasin). E2 induces the expression of DEFBI,

BNBD5, and psoriasin SI00A7 mRNAs. We also analyzed the secretion of DEFB1 into the culture medium, which was only induced by bacteria and not by E2. It is necessary to analyze the concentrations of BNBD5 or psoriasin in the culture medium to resolve if they are implicated in the reduction of *S. aureus* internalization in the E2-treated bMECs. Accordingly, Fahey et al. [19] determined that in uterine epithelial cells E2 exerts anti-inflammatory effects and enhances the production of antimicrobial peptides, which display direct defense actions during the infection of this tissue. It is possible that a similar effect could be occurring in bMECs, but further research is necessary to corroborate this possibility. In addition, the induction of psoriasin expression by E2 has been demonstrated in the human mammary epithelial cell line MCF-7 [36]. According to our results, E2 is not favoring the production of NO as a possible antimicrobial compound. Altogether, these results indicate that E2 at 50 pg/mL reduces *S. aureus* internalization in the bMECs by modulating the innate immune response through the activation of ER α . Because we did not detect ER α activation in *S. aureus*-challenged bMECs, we can hypothesize that 50 pg/mL of E2 during 24 h activates ER α in bMECs, which promotes a slightly anti-inflammatory response that is enhanced during infection. It is possible that during infection other mechanisms (i.e., transcription factors) are participating because the activation of ER α is turned off. In this process, the TLR2/MAPK pathway is not activated.

5. Conclusions

E2 (50 pg/mL) induces the anti-inflammatory response of the bMECs during *S. aureus* internalization through the participation of ER α . This leads to the increased production of antimicrobial molecules, favoring *S. aureus* elimination.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

Ivan Medina-Estrada was supported by a scholarship from CONACyT. This work was supported by grants from CONACyT (CB-2012-178238), CIC-UMSNH (14.1), and ICGEB (CRP-ICGEB/MEX13-01) to Alejandra Ochoa-Zarzosa and from CONACyT (INFR-2014-02-230603) to Joel E. López-Meza. The authors thank Nayeli Alva-Murillo for her technical assistance in ELISA determinations and Norma Guijosa-García and Ana Laura Álvarez-Araiza for the performance of bacterial growth and cell viability assays.

References

- [1] I. Lamote, E. Meyer, A. M. Massart-Leën, and C. Burvenich, "Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution," *Steroids*, vol. 69, no. 3, pp. 145–159, 2004.
- [2] S. Nadkarni and S. McArthur, "Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 13, no. 4, pp. 576–581, 2013.
- [3] I. Lamote, E. Meyer, A. De Ketelaere, L. Duchateau, and C. Burvenich, "Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period," *Theriogenology*, vol. 65, no. 6, pp. 1082–1098, 2006.
- [4] R. M. Akers, "Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 4, pp. 1222–1234, 2006.
- [5] Y. Lavon, G. Leitner, H. Voet, and D. Wolfenson, "Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows," *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 3, pp. 911–921, 2010.
- [6] I. Lamote, E. Meyer, A. De Ketelaere, L. Duchateau, and C. Burvenich, "Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation," *Veterinary Research*, vol. 37, no. 1, pp. 61–74, 2006.
- [7] E. E. Connor, M. J. Meyer, R. W. Li, M. E. Van Amburgh, Y. R. Boisclair, and A. V. Capuco, "Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. E55–E65, 2007.
- [8] O. Kerro 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," *Veterinary Quarterly*, vol. 24, no. 4, pp. 181–198, 2002.
- [9] 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.
- [10] I. Medina-Estrada, N. Alva-Murillo, J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa, "Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization," *Microbial Pathogenesis*, vol. 89, pp. 43–53, 2015.
- [11] P. Rainard and C. Riollot, "Innate immunity of the bovine mammary gland," *Veterinary Research*, vol. 37, no. 3, pp. 369–400, 2006.
- [12] 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.
- [13] J. L. Anaya-López, O. E. Contreras-Guzmán, A. Cárabez-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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] A. Gutiérrez-Barroso, J. L. Anaya-López, L. Lara-Zárate, P. D. Loeza-Lara, J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa, "Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 121, no. 1-2, pp. 113–122, 2008.
 - [17] J. S. Morey, J. C. Ryan, and F. M. Van Dolah, "Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR," *Biological Procedures Online*, vol. 8, no. 1, pp. 175–193, 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] J. V. Fahey, J. A. Wright, L. Shen et al., "Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture," *Mucosal Immunology*, vol. 1, no. 4, pp. 317–325, 2008.
 - [20] E. E. Connor, D. L. Wood, T. S. Sonstegard et al., "Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland," *Journal of Endocrinology*, vol. 185, no. 3, pp. 593–603, 2005.
 - [21] E. García-Gómez, B. González-Pedrajo, and I. Camacho-Arroyo, "Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 928290, 10 pages, 2013.
 - [22] K. Hosoda, H. Shimomura, S. Hayashi, K. Yokota, and Y. Hirai, "Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 318, no. 1, pp. 68–75, 2011.
 - [23] A. Sobolewska, M. Gajewska, J. Zarzyńska, B. Gajkowska, and T. Motyl, "IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway," *European Journal of Cell Biology*, vol. 88, no. 2, pp. 117–130, 2009.
 - [24] L. N. Vandenberg, P. R. Wadia, C. M. Schaeberle, B. S. Rubin, C. Sonnenschein, and A. M. Soto, "The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization?" *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 101, no. 4-5, pp. 263–274, 2006.
 - [25] X.-T. Zhang, L. Ding, L.-G. Kang, and Z.-Y. Wang, "Involvement of ER- α 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells," *Oncology Reports*, vol. 27, no. 6, pp. 2057–2065, 2012.
 - [26] H. Lahouassa, E. Moussay, P. Rainard, and C. Riollot, "Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Cytokine*, vol. 38, no. 1, pp. 12–21, 2007.
 - [27] F. B. Gilbert, P. Cunha, K. Jensen et al., "Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system," *Veterinary Research*, vol. 44, article 40, 2013.
 - [28] K. Takeda and S. Akira, "Microbial recognition by Toll-like receptors," *Journal of Dermatological Science*, vol. 34, no. 2, pp. 73–82, 2004.
 - [29] X. Li, M. Li, and X. Bai, "Upregulation of TLR2 expression is induced by estrogen via an estrogen-response element (ERE)," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 549, pp. 26–31, 2014.
 - [30] R. Kowsar, N. Hambruch, J. Liu, T. Shimizu, C. Pfarrer, and A. Miyamoto, "Regulation of innate immune function in bovine oviduct epithelial cells in culture: the homeostatic role of epithelial cells in balancing Th1/Th2 response," *Journal of Reproduction and Development*, vol. 59, no. 5, pp. 470–478, 2013.
 - [31] L. Yart, L. Finot, V. Lollivier, and F. Dessauge, "Oestradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells in vitro," *Journal of Dairy Research*, vol. 80, no. 1, pp. 113–121, 2013.
 - [32] A. Holm, K. E. Andersson, I. Nordström, P. Hellstrand, and B.-O. Nilsson, "Down-regulation of endothelial cell estrogen receptor expression by the inflammation promoter LPS," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 319, no. 1-2, pp. 8–13, 2010.
 - [33] N. L. Weigel and N. L. Moore, "Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action," *Nuclear Receptor Signaling*, vol. 5, article e005, 2007.
 - [34] S. Kovats, "Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways," *Cellular Immunology*, vol. 294, no. 2, pp. 63–69, 2015.
 - [35] 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 ID e105680, 2014.
 - [36] S. E. Yu and Y. K. Jang, "The histone demethylase LSD1 is required for estrogen-dependent S100A7 gene expression in human breast cancer cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 427, no. 2, pp. 336–342, 2012.

8.2 CAPÍTULO II

Innate immune response signaling pathway associate to E2 during *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells

Innate immune response signaling pathway associate to E2 during *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells

Ivan Medina-Estrada, Joel E. López-Meza and Alejandra Ochoa-Zarzosa*.

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

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

E-mail address: aleocho@hotmail.com(A. Ochoa-Zarzosa)

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:

Abstract

Bovine mastitis (BM) is a pathology characterized by inflammatory and infectious processes. *Staphylococcus aureus* is the infectious agent primarily responsible for BM. This bacteria can internalize into bovine mammary epithelial cells (bMECs) causing chronic infections. The incidence of mastitis in dairy cattle is highest at the drying off period and parturition, which are characterized by changes in the concentrations of sex steroids hormones, such as 17 β -estradiol (E2). The hormones can modulate the innate immune response (IIR) activating different signaling pathways, such as TLRs via. TLR2 recognized *S. aureus* and activate different kinases (MAPK, Akt, etc.) resulting in the transcriptional factor (TF) translocation to nucleus and gene transcription. Among them, NF- κ B is the canonic TF of the inflammatory response, but AP1 TF can induce the expression of various IIR genes. In a previous study, we have shown that E2 inhibits *S. aureus* internalization into bMECs by regulating several host IIR elements. However, the signaling pathways of the IIR activated by E2 during *S. aureus* infection has not been studied. The aim of this work was to evaluate the IIR signaling pathway mediated by E2 during *S. aureus* internalization into bMECs. Cells were treated with E2 (24 h) and then infected with *S. aureus* (ATCC-27543, 2 h). Using Western Blot we analyzed the phosphorylation state of FAK kinase and estrogen receptors. Then, by flow cytometry we evaluate the α 5 β 1 integrin membrane abundance and the AKT activation. Finally, we evaluated the activated transcriptional factors related to the IIR using a microarray (Panomics). The results indicate that E2 (50 pg/ml) reduce the α 5 β 1 integrin surface abundance (~40%) and induce the FAK inhibition (~50%). E2 showed anti-inflammatory effects in bMECs, since up-regulated anti-inflammatory kinases. These effects are associated to the up-regulation in the activity of the kinase AKT (2 fold), resulting in the activation of the IIR transcriptional factors (TF), such as AP-1, E2F1, EGR, ER, MEF1, NF1, PPAR and STAT1. AP1 is one of the most important TF associate to the IIR. For these reasons we conclude that E2 modulates IIR signaling pathway TLR2/Akt/AP-1 in bMECs, while reducing *S. aureus* internalization.

Keywords: Estradiol; *S. aureus* internalization; innate immune response, bovine mammary epithelial cells.

1. Introduction

The innate immune response (IIR) is under hormonal control. 17β -Estradiol (E2) is a sexually hormone important during the mammal reproductive cycle, it is immune modulatory for epithelial cells, which are the first line of defense against incoming bacteria. E2 regulates various pathophysiological processes including bacterial infections in epithelial cells. Cellular E2 signaling pathways associated to IIR are mediated by estrogen receptors (ERs). E2-ERs regulate inflammatory and antimicrobial elements such as cytokines and antimicrobial peptides, whereas genomic signaling events mediated by E2 include the activation of Toll like receptors (TLRs) and the activation of different protein/lipid kinase pathways (PI-3k, Akt, MAPKs, Scr and PKA/PKC) (Nadkarni and McArthur, 2013). The diversity of E2-ER signaling pathways described include many pathways associated to the IIR. It has been proven that E2 has effects downstream the TLRs signaling. In endometrium E2 diminishes the secretion of IL-6 by inhibiting the activation of ERK and p38 kinases, which are part of the MAPK signaling pathways in response to the activation of TLR2. At level of transcriptional factors, it has been observed in rat uterine epithelial cells that E2 inhibits the activation of NF- κ B by avoiding its dissociation from I κ B (Crane-Godreau and Wira, 2005). Also, E2 modulates transcriptional factor activation such as AP-1, SP-1, STAT, NF- κ B, VDR, etc., which participate in the IIR. In addition, E2 inhibits STAT phosphorylation and promotes the activation of vitamin D receptor (VDR), modulating the MAPK signaling pathway (Fahey et al 2008; Luthje et al, 2014).

It is well known that during the postpartum period, dairy cows experience an increased incidence of mammary infectious diseases, such as mastitis. This period is characterized by drastic changes in the concentrations of E2, which compromise the IIR of the animal. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) are target tissue of E2, which regulates their proliferation and differentiation. It has been shown that E2 is required for mammary epithelial cell proliferation and ductal development in the growing animal. In addition, the presence of ERs has been shown in this tissue (Yart et al, 2012; Medina-Estrada et al, 2016).

S. aureus is the principal pathogen associated to bovine mastitis. This pathogen has the ability to internalize into bMECs, leading to a low response for conventional therapy and

results in chronic and recurrent infections (Kerro-Dego et al, 2002). *S. aureus* is internalized by a zipper-type mechanism, depending of $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor (present in the host cells), which activates Focal Adhesion Kinase (FAK) to induce the endocytosis of *S. aureus* and integrin (Alva-Murillo et al, 2015).

The modulation of E2 upon the signaling pathways associated to the IIR. For example, in human uterus, E2 inhibits the expression of the IL-1 β receptor protein. E2 regulates the gene expression of the IIR trough the co-activation of transcriptional factors such as SP-1, STAT and AP-1, besides, it is known that it modulates key elements of the signaling pathways (from receptors to transcriptional factors). Its immunomodulatory role has been mostly studied in epithelial models, mainly in the female reproductive tract (Fahey 2008).

It appears that both an anti-inflammatory environment and the antimicrobial response are essential for the maintenance of homeostatic epithelial flora; during an infection, the host sets an inflammatory response, sometimes aggravated, which means more damage to the tissue. However, in the case of E2 in all of the models using PAMPs or pathogens, the inflammatory response is inhibited due to the inactivation of NF- κ B. On the other side, the antimicrobial production is enhanced, presumably via AP-1 or SP-1, which act in response to the pathogen, favoring its elimination (Soboll et al, 2006; Wen et al, 2012).

In a previous work from our group, we showed that E2 has immunomodulatory effects on bMECs. We demonstrated that 50 pg/ml of E2 significantly inhibits *S. aureus* internalization into bMECs (~50%), and induces elements of the anti-inflammatory response in these cells. Because E2 does not have direct antibacterial activity this reduction might be the result of the immunomodulatory effects (such as kinases regulation) that have been associated with this hormone (Medina-Estrada et al, 2016). The inhibitory effect of E2 on *S. aureus* internalization can be attributable to the traffic regulation of the $\alpha 5\beta 1$ /FAK pathway. TLR2 recognized lipoteicoic acid of *S. aureus* and modulates different IIR pathways (Alva-Murillo et al, 2014) including Akt kinase, which are associated to the modulation of cytokines and antimicrobial peptides (Yung-Cheng et al, 2009). Thus, the aim of this work was to study the signaling pathways associated to the inhibition of *S. aureus* internalization into the bMECs regulated by E2. We suggest that in bMECs, E2-ER α activate the TLR2/AP-1 signaling pathway conducting a better defense during *S. aureus* infection.

2. Material and Methods

2.1 Reagents and antibodies

17 β -Estradiol was acquired from Sigma, and working solutions were dissolved in 1% ethanol (50 pg/ml). For all of experiments, 1% ethanol (vehicle) was used as a control. The anti-phospho-ER α (2511S, Ser118) was obtained from Cell Signalling and the anti-ER β (517700) was acquired from Life Technologies. The anti-phospho-Akt was obtained from BD Biosciences(560378, pS473), and the anti-FAK and anti-phospho-FAK was acquired from Abcam (ab 28152 and ab24781, Y397). The secondary antibodies against mouse and rat IgGs were purchased from Thermo Scientific.

2.2 *Staphylococcus aureus* strain

The *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC27543) strain was used. This strain was isolated from a case of bovine clinical mastitis and has the capacity to invade bMECs. *S. aureus* were grown at 37 °C overnight in Luria-Bertain broth (LB, Bioxon), and the CFUs were adjusted by measuring the optical density at 600 nm (OD 0.2 = 9.2×10^7 CFU/ml).

2.3 Primary Culture of Bovine Mammary Epithelial Cells (bMECs)

bMECs were isolated from the alveolar tissue of the udders of healthy lactating cows as described (Lara-Zarate et al, 2007). 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/F12K, Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (Equitech Bio), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 1 μ g/ml amphotericin B (Invitrogen). The cells were grown in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. To perform the E2 and/or *S. aureus* challenge, monolayers of bMECs (dishes covered with 6-10 μ g/cm² rat-tail type I collagen, Sigma) were cultured in serum-free DMEM/F12K without phenol red (Sigma) and antibiotics (incomplete medium) for 24 h, and then were treated with the hormone and/or infected with the bacteria.

2.4 Western Blot assays

Confluent cell cultures were treated with E2 (50 pg/ml) for 24 h and/or *S. aureus* as described previously (Medina-Estrada et al, 2016). Proteins were obtained from bMECs using ProteoJET™ Cytoplasmatic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas, Life Sciences, K0311). Extraction kit was employed according to the manufacturer's

instructions. Protein concentrations were measured by Bradford method, and 20-30 μg of each sample was analyzed on 8% SDS-PAGE gels. Membranes were blocked with PBS-skimmilk (0.5%) for 16 h at 4 °C, and then incubated with primary antibodies overnight at 4 °C at the following dilutions: anti-ER α and anti-phospho-ER β 1:250, anti-FAK and anti-phospho-FAK 1:500. The specific bound antibody was detected with a rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody and enhanced chemiluminescence (Luminol, Li-Cor, C41008-02). Finally, blots were exposed to X-ray film.

2.5 Flow Cytometry

The bMECs were cultured in 24-well dishes (Corning) and were treated with E2 (50 pg/ml) for 24 h and/or *S. aureus* as described above. After the treatment, the cells were washed three times with PBS, detached with trypsin-(0.05%) EDTA (0.02%) (Sigma), centrifuged at 2,500 rpm for 10 min at 4 °C, and washed with PBS. The bMECs pellet was blocked with normal goat serum (5% in PBS, Pierce) for 30 min at 4 °C with shaking, and then the cells were centrifuged and the pellet was incubated with 5 μl of the primary antibody PE mouse anti-Akt (pS473BD Bioscience) 1 h at 4 °C with shaking in the dark, and finally washed three times with PBS. Then, cells were re-suspended in 100 μl of PBS. The fluorescent signals of 10,000 events were measured using the BD Accuri C6 cytometer.

2.6 Transcription factor-DNA interactions

Nuclear proteins were obtained from bMECs using the NE-PER Nuclear and cytoplasmic Extraction kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Rockford, IL). Protein concentrations were determined with the Bradford assay. The nuclear extracts were subjected to the TransSignal Protein/DNA array (Panomics, Fremont, CA, USA). Briefly, biotin-labeled DNA-binding oligonucleotides (TransSignal™ Probe Mix) were incubated with 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nuclear extracts to allow the formation of transcription factor/DNA complexes. These complexes were separated from free probes and hybridized to a protein/DNA array, and then the complexes were detected using a HRP-bases chemiluminescence method according to the manufacturer's protocol.

2.7 Analysis of the promoter region of IIR genes associate to transcriptional factors

We detected the promoter region of the selected IIR genes using the DNASTar program, and then we employed PROMO 3.0.2 to analyze the putative transcription binding sites for the factors that are activated in the different experimental conditions.

2.8 Data analysis

The data were obtained from three independent experiments each of which was performed in triplicate, and compared with analysis of variance (ANOVA). The results are reported as the means $\pm$ the standard errors (SE), and the significance level was set at $P < 0.05$. The results from all of the experiments are shown.

3. Results

3.1 FAK is necessary for *S. aureus* internalization into bMECs regulated by E2

Previously, we demonstrated that E2 inhibits *S. aureus* internalization and down regulates the integrin $\alpha 5 \beta 1$ traffic. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates *S. aureus* internalization into bMECs and FAK is crucial in the integrin signaling pathway. For this reason, we measured the FAK activation by Western Blot (Fig. 1B). In bMECs treated 24 h with E2 (50 pg/ml), the FAK activity was inhibited (2 fold) compared to bMECs infected with *S. aureus*. As shown in Fig. 1A, FAK phosphorylation decreased, indicated that FAK participates in the reduction of *S. aureus* internalization mediated by E2.

3.2 ER α contributes in the bMECs IIR signaling pathway

Estrogen receptors activate different signaling pathways associated to proliferation, differentiation and IIR due its interact with different transcriptional factors for regulate gene transcription. ER α and ER β are member of the nuclear receptor superfamily and can be activate by E2 inducing different responses. To determinate whether these receptors are activated in bMECs treated with E2, we measured their activity by Western Blot (Fig. 2). Using nuclear extracts, we identified that E2 induces the activation of ER α (2fold) but the infection did not affect the ER α phosphorylation (Fig. 2B). The ER β was slightly induced by infection (1.5 fold) but this remained in basal levels in the rest of conditions (Fig. 2A). These results suggest that ER α could be indirectly implicated in this phenomenon.

3.3 E2 induces Akt activation in bMECs

Previously we demonstrated that E2 activates TLR2 (Medina-Estrada et al, 2016). Also, it has been reported that Akt is involved in the TLR2-mediated inflammatory response. In agreement, bMECs treated with E2 showed an increase in Akt phosphorylation (2.5 fold)

(Fig. 3). In the rest of conditions, Akt phosphorylation remained unchanged. These results indicate that Akt activation is mediated by E2/ER α .

3.4 Activation of transcriptional factors associated to the IIR of bMECs by E2

E2, via ER α , can activate TLR2 and modulates FAK/Akt signaling pathway, the result of these events is the activation of different transcriptional factors (TFs) related to the IIR, such as AP-1, NF- κ B, STAT, etc. To determine the activation of the TFs we performed a hybridization (Protein/DNA) assay to evaluate the activation state of 56 TFs related to the IIR. In the control membrane (Fig. 4A), is shown the basal activation of the TFs. Notably E2 induced the TFs activation levels, activating TF associated to the proliferation, differentiation and IIR, such as EGR, STA1, AP-1 and others (Fig. 4B). bMECs infected 2 h showed a reduction in TF activation (Fig. 4C) and, interestingly the E2-*S. aureus* condition reverts the TF activation and increased notably the activity of the TF AP-1 (~50%) (Fig. 4D). The analysis of densitometry is showed in Fig. 4E. To correlate the TF activation and the previously IIR genes analyzed (Medina-Estrada et al, 2016), we carried out an analysis of the promoter regions of antimicrobial peptides and cytokine genes to find out putative transcription binding sites for the TFs activated by E2 and/or *S. aureus* in bMECs (Fig. 5). Notably, genes coding for antimicrobial peptide and cytokines have putative transcription binding sites for AP-1, which may explain the modulation exerted by E2 of the IIR genes, which leads to a better response against *S. aureus*.

4. Discussion

E2 plays a crucial role in the IIR of many epithelial cells. bMECs are essential for the surveillance of mammary tissue during infections, because they help during pathogen recognition via TLR receptor-signaling pathways. TLR2 is the mayor receptor for *S. aureus* detection and also mediates the production of immune effectors. However, the participation of TLR2 signaling pathway is still not clear in E2 treated-bMECs. Previously, we demonstrated that E2 inhibits the *S. aureus* internalization and induces anti-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides through MAPKs activation, but exist other elements that can participate in the regulation of IIR mediated by E2. A MAPKs alternative signaling pathway is the Akt via, which can activate different TF associated to the IIR, including NF- κ B and AP-1.

Toll like receptors, participates in the recognition of patterns molecular associates to pathogens (PAMPs), such as the TLR2, this receptor recruits MyD88 and induces kinase/TNFR-associated factor 6, activating downstream signaling molecules such as MAPKs (JNK1/2, ERK1/2, and p38) (Yung-Cheng et al, 2017). Furthermore, the TLR2 via can also activate the Akt kinase. It is reported that Akt participates in the NF- κ B modulation associated to the inflammatory response (Fang et al, 2017), furthermore in bMECs infected with *S. aureus*, the NF- κ B transcriptional factor is inactivated (Lara-Zarate et al, 2007).

Previously, we demonstrated that E2 inactivates MAPK such as p38 and ERK. In agreement, the activation of Akt kinase has been shown to inhibit some MAPKs (Luyendyk et al, 2008). We showed that E2 induced the phosphorylation of Akt; probably this activity causes the inactivation of other MAPK signaling pathways. In contrast, decreasing PI3K-Akt pathway activation enhances LPS activation of ERK1/2 and JNK1/2 (Luyendyk et al, 2010). Akt is a family of serine/threonine kinases that play important roles in signal transduction. It is phosphorylated within the activation loop at threonine 308 and the C-terminus at serine 473 (S473). Phospho-Akt promotes cell survival by inhibiting apoptosis and modulates IIR signaling pathways. Additionally, Akt has been referred to as an oncogene because it has increased activity in a number of tumors (Yung-Cheng et al, 2009).

The TLR-signaling pathway can activate Akt to regulate the production of TNF- α and IL-12. TLR2 prevents interactions between TRAF6/IRAK1 and TAK1 (elements related to TLR signaling) and therefore, abrogating NF- κ B activation. Suggesting the critical involvement of the PI3K/Akt pathway in the control of the inflammatory response (Liu et al, 2016).

In our model, E2 may regulate similar pathways inducing an anti-inflammatory response in the bMECs infected with *S. aureus*. Our data suggest that E2 induce Akt activation and modulates via TLR the IIR. The DNA sequence that recognizes AP-1 belongs to members of the Jun and Fos families of TF. These nuclear proteins interact with the AP-1 site as Jun homodimers or Jun-Fos heterodimers formed by protein dimerization, inducing the expression of antimicrobial peptides and cytokines (Yung-Cheng et al 2009).

On the other hand, it has been reported that E2 induces the expression of antimicrobial peptides and anti-inflammatory cytokines, for example, in pregnancy changes in salivary levels of antimicrobial peptides (hBD1/2/3 and HNP-1) is mediated by E2 and other steroids (Gursoy et al, 2016). Some antimicrobial peptides genes shown in their promoter regions in the DNA a high affinity sites to the AP-1 transcriptional factor. In this study, we observed that E2 activated AP1 TF suggesting that E2 acts as an inducer of the TLR2/Akt/AP-1 and enhances the IIR of bMECs infected with *S. aureus*.

It has been shown that FAK is involved in the TLR2-mediated inflammatory response. We demonstrated that E2 reduces FAK phosphorylation, this inhibition was associated to the down-regulation in the integrin traffic, resulting in the reduction of the *S. aureus* internalization. In agreement, FAK-deficient cells (mouse fibroblasts) are severely impaired in their ability to internalize *S. aureus*. (Agerer et al, 2005).

The activation and clustering of the integrin trigger particular signaling pathways and the accumulation of FAK complex in the vicinity of attached bacteria, which is characterized by the recruitment of actinin, paxillin, zyxin, tensin, Src kinase. A crucial step in these signaling events is the reorganization of the actin cytoskeleton. We found that during *S. aureus* internalization into bMECs the FAK phosphorylation was induced. Cortactin and actin-binding protein, has been identified as one of the effector of activated FAK and Src kinases, which are associated with Arp2/3 complex to promote actin polymerization and binds to dynamin-2, a regulator of endocytosis (Schroder et al, 2006). Interestingly, E2 inhibits the FAK activation, there not exist yet evidence to conclude that the ERs crosstalk with the integrin's signaling pathways, but in our study, we correlated the FAK inhibition with the ER α activation. In addition, E2 effects via ER, affects the expression of adhesion molecules (E-Selectin, ICAM-1, VCAM-1 and integrins), although the outcome seems to depend on E2 (at pregnancy levels) (Kayisli et al, 2004; Cervallati et al, 2013). ER modulates different signaling of the IIR, it regulates various pathophysiological processes including bacterial infections and could modulate the inflammatory activity of different cells. We found that *S. aureus* induce ER β phosphorylation in bMECs and associate to a down regulation of the inflammatory response (Gosselin and Rivest, 2011). Both ER α and ER β have been shown to inhibit NF- κ B activity (Pelzer et al, 2001). The *S. aureus*-NF- κ B inhibition have been reported previously in our work group (Lara-Zarate et al, 2007). Now we have new evidence of the *S. aureus*-NF- κ B mechanism of inhibition via E2-ERs.

We suggest that E2-ER α induce an anti-inflammatory response in the bMECs, before *S. aureus* infection, the objective of this, could be bring protection to the bMECs, and then to enhance the antimicrobial response. The bMECs with an effective IIR response can eliminate *S. aureus* extra and intra cellular, in addition, the E2 regulation of the zipper mechanism diminishes the *S. aureus* internalization.

5. Conclusion

Altogether, these results showed that E2 at 50 pg/ml induces an anti-inflammatory response associated to the TLR2/Akt/AP-1 signaling pathway in bMECs infected with *S. aureus*. In this way, E2 can inhibit the *S. aureus* internalization into bMECs enhancing the IIR and the endocytosis process via ER α .

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

6. References

- Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, and Fazeli A. "Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium", Human Reproduction, 2007. 22(2):586-593.
- Alanko J, and Ivaska J. "Endosomes: Emerging platforms for integrin-mediated FAK signaling", Trends in Cell Biology, 2016. 26(6):91-398.
- Beagley KW, and Gockel CM. "Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone", FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003. 38:13-22.
- Caswell P and Norman J. "Integrin trafficking and the control of cell migration". Traffic, 2006, 7:14-21.
- Cervellati F, Valacchi G, Lunghi L, Fabbri E, Valbonesi P, Marci R, Biondi C, and Vesce F. "17- β -estradiol counteracts the effects of high frequency electromagnetic fields on

trophoblastic connexins and integrins”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. 2013.

Chang YL, Hsu YK, Wu TF, Huang CM, Liou YL, Chiu YW, Hsiao YH, Luo FJ and Yuan TC. “Regulation of estrogen receptor a function in oral squamous cell carcinoma cells by FAK signaling”, 2014. 21(4): 555-565.

Fahey JV, Wright JA, and Shen L. “Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture”. *Mucosal Immunology*, 2008. 1(4):317–325.

Fahey JV, Rossoll RM, and Wira CR. “Sex hormone regulation of anti-bacterial activity in rat uterine secretions and apical release of anti-bacterial factor(s) by uterine epithelial cells in culture”, *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004. 93:59-66.

Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, and Schwartz B. “Regulation of vitamin D receptor expression via strogen-induced activation of the ERK $\frac{1}{2}$ signaling pathway in colon and breast cancer cells”, *Journal of Endocrinology*, 2005. 185:577-592.

Hoffmann C, Ohlsen K, and Hauck CR. “Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria”, *European Journal of Cell Biology*, 2011. 90:891-896.

Hu X, Chen J, Wang L, and Ivanshiv LB. “Crosstalk among Jak-STAT, toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation”, *Journal of Leukocyte Biology*, 2007. 82

Kayisli UA, Korgun ET, Akkoyunlu G, Arici A, and Demir R. “Expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 4$ and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation”, *Acta Histochemica*, 2005. 107:173-185.

Kovats S. “Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways”, *Cell Immunol.* 2015. 294(2):63.69.

Kumar C. “Signaling by integrin receptor”. *Oncogene*, 1998. 17:1365:1373.

Lara-Zarate, L., López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, “*Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells”. *Microbial pathogenesis*, 2001. 51(5):113-8.

Li X, Li M, and Bai X, "Upregulation of TLR2 expression is induced by estrogen via an estrogen-response element (ERE).

Lien, E. "Toll-Like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products". The journal of biological chemistry, 1990. 274(47): 419-25.

Lüthje P, Hirschberg AL, and Bruner A. "Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract", Maturitas, 2014. 77:32-36.

Medina-Estrada I, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A. "Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization", Mediators of inflammation. 2016. 2016.

Meng R, Tang H-Y, Westfall J, London D, Cao JH, Mousa SA, Luidens M, Hebergers A, Davis FB, Davis PJ, and Lin H-Y- "Crosstalk between integrin $\alpha v \beta 3$ and estrogen receptor α is involved in thyroid hormone-induced proliferation in human lung carcinoma cells", Plos one, 2011. 6(11)

Prossnitz ER, Arterburn AB, and Sklar LA. "GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen", Mol Cell Endocrinol, 2007. 265 (266):138-142.

Sisci D, Middea E, Morelli C, Lanzino M, Aquila S, Rizza P, Catalano S, Casaburi I, Maggiolini M, and Andó S. "17 β -estradiol enhances $\alpha 5$ integrin subunit gene expression through ER α -Sp1 interaction and reduces cell motility and invasion of ER α -positive breast cancer cells", Breast Cancer, 2010. 124:63-77.

Simpson E, and Santen RJ. "Celebrating 75 years of Oestradiol", J of Mol Endocrinol, 2015. 55:1-20.

Sinha B, and Herman M. "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectins binding to integrin $\alpha 5 \beta 1$ ". Cellular microbiology, 1999. 1(2):101-17.

Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Clana P, Chambon P, and Maggi A. "Estrogen receptor- α mediates the brain anti-inflammatory activity of estradiol", Pharmacology, 2003. 100(16).

Villaggio B, Soldano S, and Cutolo M. "1,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages", Clinical and Experimental Rheumatology, 2012. 30.

Uray IP, Liang Y, and Hyder SM. "Estradiol down-regulates CD36 expression in human breast cancer cells", *Cancer Letters*, 2004. 207:101-107.

Yakimchuk K, Jondal M, and Okret S. "Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies", 2013. 375:121-129.

Zhang XT, Ding L, Kang LG, and Wang ZY, "Involvement of ER- α 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells," *Oncology Reports*, 2012. 27(6):2057–2065.

7. Figure Captions

Fig. 1 The role of FAK in *S. aureus* internalization into bMECs modulated by E2. bMECs were treated with 50 pg/ml E2 for 24 h and/or challenged with *S. aureus* for 2 h, the cytoplasmic proteins were used to evaluate the FAK phosphorylation by Western Blot. **A)** The FAK activation was calculated with an analysis of densitometry (with the ImageJ software) using actin as control. **B)** In the WB assay, we identified the FAK and pFAK kinase in the bMECs treatment with E2 and or *S. aureus*, we used actin protein such a control. The symbol "*" indicates significant changes ($p < 0.05$) in relation to unchallenged bMECs.

Fig 2. Participation of ERs in response to E2. Nuclear extracts were obtained to identify by western blot the ER phosphorylation in bMECs treated with E2 and infected with *S. aureus*. An analysis of densitometry was performed to estimate the ER activation (A and B), using the Image J software. **C)** Western Blot. The symbol "*" indicates significant changes ($p < 0.05$) in relation to unchallenged bMECs.

Fig. 3. Modulation of Akt kinase activation by E2 in the bMECs. Cells were incubated with E2 24 h and/or infected with *S. aureus*. Using an anti-phospho-Akt antibody, we evaluate the Akt activation by flow cytometry. The fluorescence intensity was estimated from 10,000 events. Each bar shows the mean to triplicates $\pm$ SE of three independent experiments.

Fig. 4. Transcription factor activation by E2 in *S. aureus*-challenged bMECs.

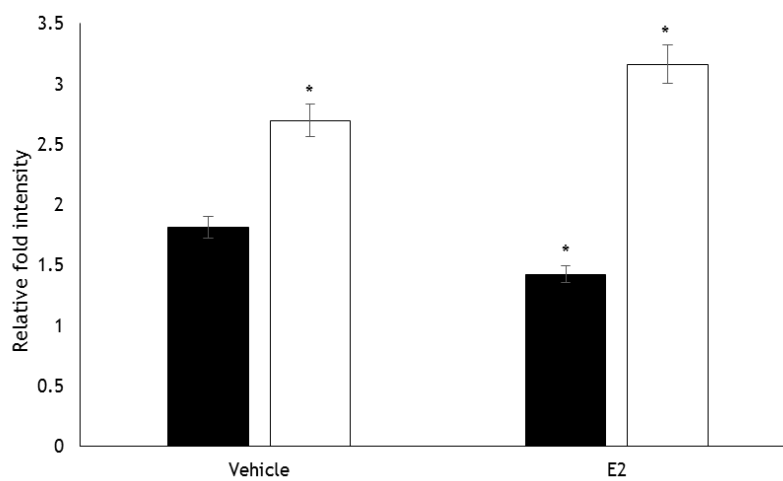
Protein/DNA array blots were utilized to analyze 56 different transcription factor DNA-binding sites from samples that were obtained from bMECs nuclear extracts (control A), bMECs that were treated with E2 (B), bMECs that were challenged with *S. aureus* (C) and cells that were treated with E2 and challenged with *S. aureus* (D). The DNA samples were spotted in duplicate in two rows (top: undiluted; bottom: dilution 1/10). Biotinylated DNA was spotted for alignment along the right and bottom sides of the arrays. The intensity from each spot from the membranes was quantified using Image J software. The bars show the mean intensity of duplicated of the ratio TF/control. The symbol “*” indicated significant changes ($p < 0.05$) in relation to the unchallenged bMECs.

Fig. 5. Transcription binding site analysis in the promoters of innate immune elements.

The program PROMO V 3.0.2 was used. The putative binding sites were analyzed in 1.5 kb upstream of the ATG in each gene. All gene sequences were obtained from Genbank. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 8 (IL-8), Tracheal antimicrobial peptide (TAP), Lingual antimicrobial peptide (LAP), Bovine neutrophil beta-defensin 4 (BNBD4), Bovine neutrophil beta-defensin 5 (BNBD5), Defensin bovine 1 (DEFB1), Bovine neutrophil beta-defensin 10 (BNBD10), Psoriasin (S100A7).

Figure 1

A)



B)

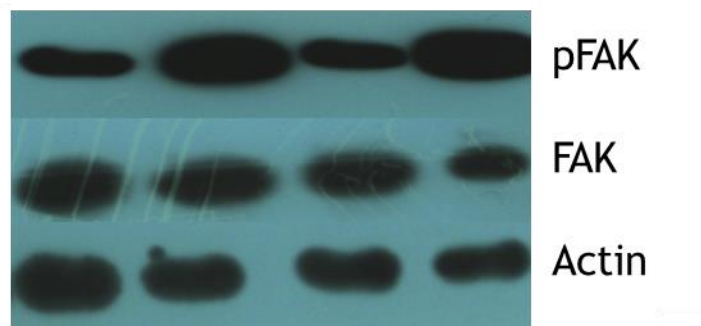
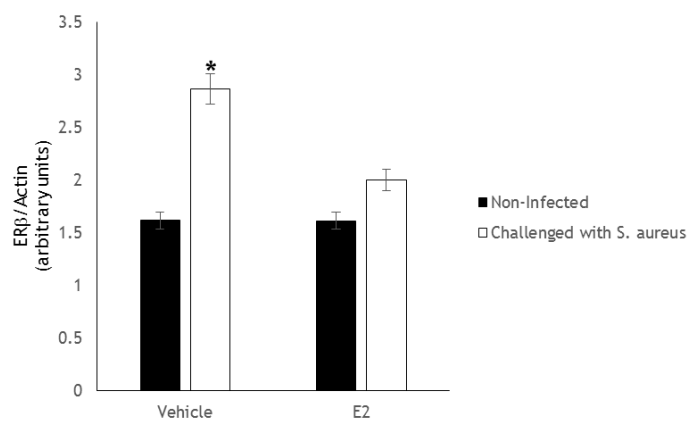
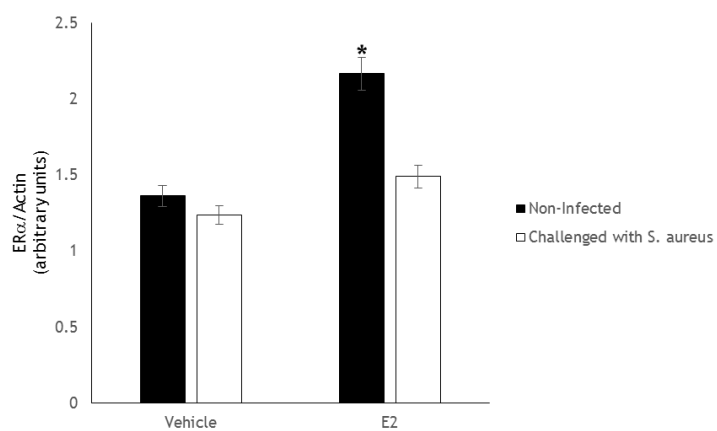
Control *S. aureus* E2 E2+*S.aureus*

Figure 2

A)



B)



C)

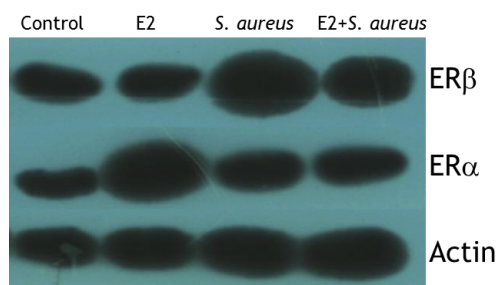


Figure 3

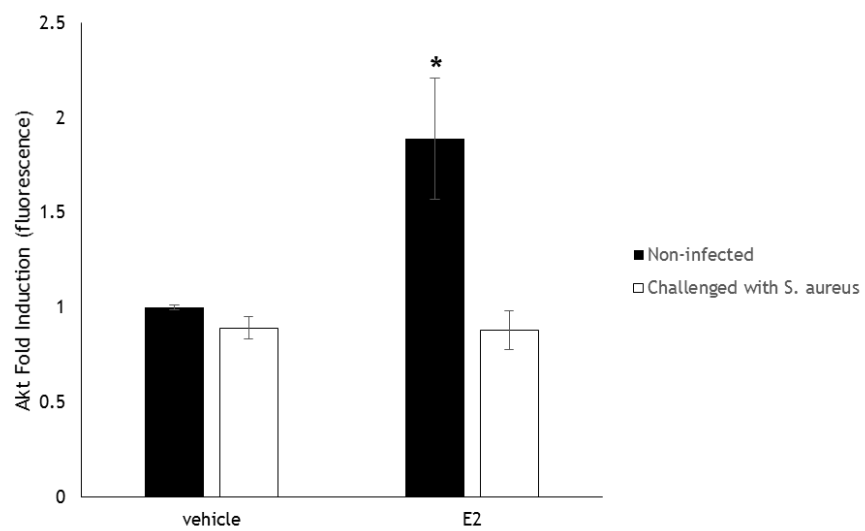


Figure 4

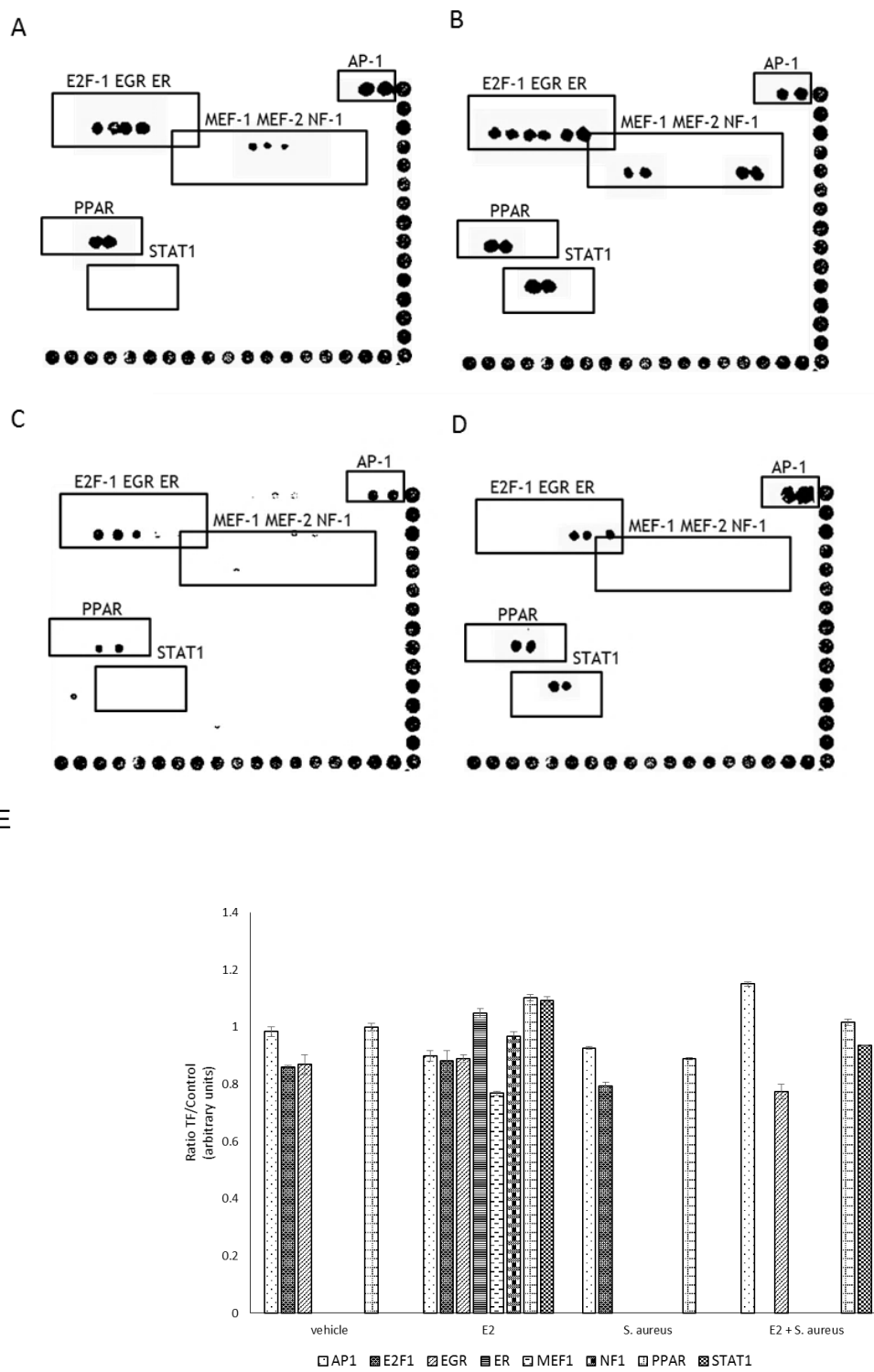
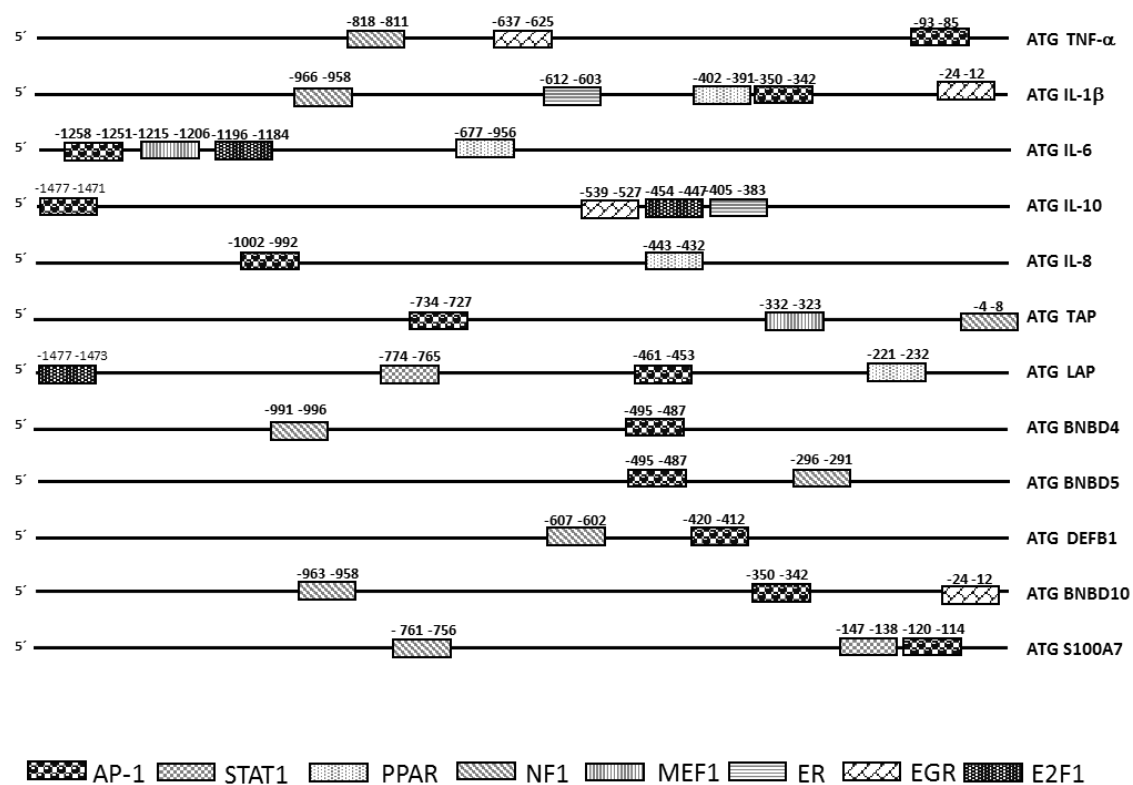


Figure 5



8.3 CAPITULO III

Las hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas?

Saber Más

Revista de Divulgación

de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Arrecifales del Mar Caribe



Entrevista a Rosa Elva Norma del Río Torres,
profesora e investigadora en el
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas UMSNH

Año 5 / No. 30 / Noviembre-Diciembre / 2016
Morelia, Michoacán, México
U.M.S.N.H.



- El color y habitat de un pequeño dinosaurio
- Una amistad ancestral: orquídeas y hongos
- Microencapsulación de sabores y aromas
- Ganadería, medio ambiente y cambio climático
- Hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas?

Contenido



Entérate

- ¿Por qué las aves tienen pico? 5
- Cienpiés del desierto: estudian su veneno 6
- Premio Nacional de Investigación 2016: Fabián Herrera 7

Entrevista

- Rosa Elva Norma del Río Torres 8

Artículos

- El color y habitat de un pequeño dinosaurio 13
- Una amistad ancestral: orquídeas y hongos 15
- Microencapsulación de sabores y aromas 19
- Arrecifales del Mar Caribe** 24
- Ganadería, medio ambiente y cambio climático 32
- Hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas? 35

Tecnología

- Impresión 3D con PET 39

Una probada de ciencia

- ¿De cuantas maneras diferentes nos podemos contagiar? 41

Ciencia en pocas palabras

- Definiendo la Robótica 43

La ciencia en el cine

- Morgan 45
- Experimenta
- Crea tu propia baba 48



Artículos



Las hormonas: ¿mensajeros reguladores de nuestras defensas?

Ricardo Iván Medina Estrada y Alejandra Ochoa Zarzosa

Cuando escuchamos la palabra hormona, inmediatamente pensamos en cuestiones relacionadas con la pubertad, el embarazo, la menopausia o el estrés; eventos o circunstancias en los que la mayoría de nosotros conocemos que las hormonas juegan un papel relevante.

Sabemos que estas moléculas tienen diversos efectos sobre nuestro cuerpo. Por ejemplo, durante la pubertad, los jóvenes comienzan a sufrir diferentes cambios morfológicos y psicológicos producto del efecto de las hormonas sexuales (estradiol o testosterona, principalmente). Tanto

en hombres como en mujeres, las hormonas durante la pubertad ayudan a realzar los caracteres sexuales de cada género. En ambos se presenta el crecimiento y desarrollo de sus órganos reproductores, hecho que quizá sea uno de los eventos más representativos del efecto que tienen las hormonas en nuestro organismo. Sin embargo, es muy difícil que cuando hablamos de hormonas, pensemos en ellas como reguladoras de nuestro sistema inmune y sobre la protección o susceptibilidad que éstas nos brindan ante múltiples enfermedades, algunas de ellas infecciosas.

EL M. en C. Iván Medina Estrada es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la UMSNH.

D. en C. Alejandra Ochoa Zarzosa es Profesora-Investigadora, ambos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH.

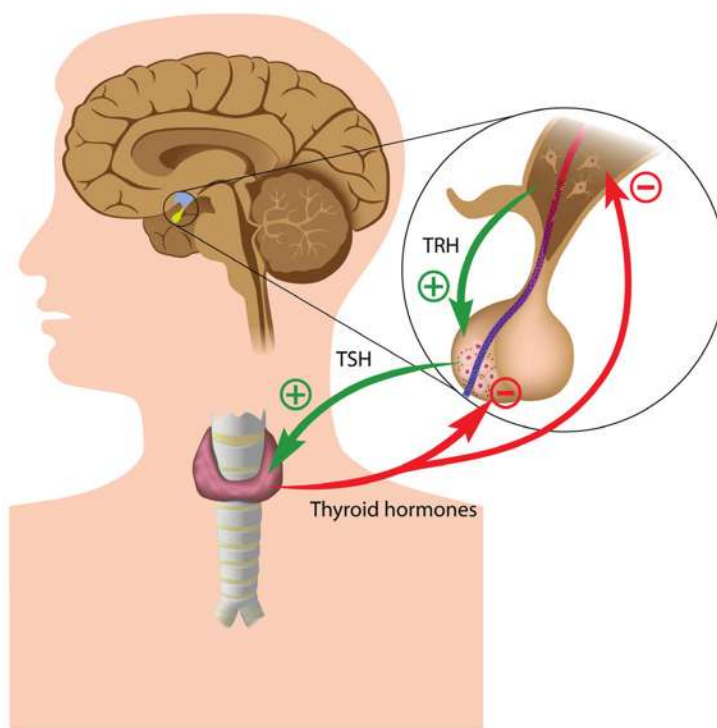
Cuando hablamos del sistema inmune nos referimos al sistema de defensa de nuestro organismo o de los animales, que a través de una serie de pasos denominados respuesta inmune, se ataca a organismos infecciosos y otros agentes que invaden nuestro cuerpo, al que potencialmente le podrían provocar enfermedades.

Es por eso, que en este artículo nos adentraremos en conocer la acción de las hormonas como mensajeros que regulan algunos mecanismos de defensa de nuestro cuerpo.

El sistema neuroinmunoendócrino

La manera en la que se abordaba el estudio de la fisiología humana a finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX (propiciada en parte por los trabajos de Claude Bernard), obligó a que el cuerpo humano fuera "separado" en diversos sistemas para facilitar su estudio, por ejemplo: el estudiar el sistema circulatorio y el sistema respiratorio por separado nos ayuda a comprender de mejor manera cómo nuestra sangre se oxigena en los pulmones y cómo el oxígeno llega a cada rincón de nuestro cuerpo.

Sin embargo, esta separación ha prevalecido a lo largo del tiempo complicando el estudio integrado del cuerpo humano. A pesar de ello, esta tendencia de integración de sistemas está cobrando más auge de manera reciente, y desde hace algunas décadas (a finales de los 90, siglo pasado) se habla de un sistema Neuro-Inmuno-Endócrino (NIE), ya que se conoce que hay una interrelación entre los tres sistemas: podemos encontrar hormonas y mediadores inmunes en el sistema nervioso, así como neurotransmisores y hormonas en el sistema inmune. Por lo



tanto, nuestras hormonas son capaces de alterar a nuestro sistema nervioso y modificar nuestra respuesta inmune.

En particular nos enfocaremos a precisar un poco más el papel que juegan las hormonas en el sistema inmune.

Las hormonas son mensajeros químicos que pueden tener distinta etiología (pueden ser proteínas, lípidos, o aminoácidos, principalmente). Anteriormente se pensaba

que una hormona era aquel mensajero secretado exclusivamente por una glándula del sistema endócrino hacia el torrente sanguíneo, pero ahora sabemos que no es así. Prácticamente cualquier tipo celular puede producir algún tipo de hormona o mensajero químico.

El efecto que tienen las hormonas sobre nuestra respuesta inmune es muy diversa y puede verse influida por el sexo (hembras o machos) de los organismos. Los principales ejes endócrinos regulados por diferentes hormonas son el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA), el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) y el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). Los primeros dos ejes son los más estudiados con relación a sus efectos sobre la respuesta inmune.

Principales ejes hormonales regulados por hormonas y su papel en la respuesta inmune:

Eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA)

En la mayoría de los animales este eje está relacionado al estrés. Para el caso de condiciones que nos resultan estresantes, como pudiera ser la pérdida de un ser querido o el periodo de exámenes en la escuela, se induce la activación de este eje, ya que el hipotálamo produce la hor-

mona vasopresina o la hormona liberadora de corticotropina, las cuales estimulan en la glándula pituitaria la secreción de la hormona corticotropina la cual, a su vez, estimula la secreción de corticoides en las glándulas adrenales (cortisol o hidrocortisona).

La hidrocortisona incrementa la glucosa en la sangre e inhibe la liberación de moléculas que ayudan al correcto funcionamiento de nuestro sistema inmune. Además, los glucocorticoides influyen en la migración de diferentes células de defensa (linfocitos, neutrófilos, etc.). La activación de este eje puede ser bidireccional, es decir que se activa y produce el efecto inmunosupresor, o también como consecuencia de la activación de la respuesta inmune se puede activar el eje HHA. Por lo tanto, se considera que el estrés genera un estado de inmunosupresión, el cual en muchas ocasiones se relaciona con que los individuos inmunosuprimidos por efecto post-estrés puedan ser más susceptibles a diversas infecciones por virus, hongos o bacterias.

Un estado de inmunosupresión hace que nuestras células de defensa no sean capaces de detectar agentes infecciosos y por consecuencia eliminarlos. Incluso se sabe que estados crónicos de estrés se ven traducidos en inflamaciones crónicas, lo cual puede llevar a la aparición de diversos tipos de cáncer, tales como el cáncer de colon, y a muchas otras patologías.

En contraparte, se puede sostener que cuando no nos encontramos bajo condiciones de estrés crónico, la respuesta inmune ayuda a combatir a los agentes infecciosos con los que interactuamos día con día.

Un estado de bienestar favorece la

liberación de las llamadas "hormonas de la felicidad", tales como la dopamina, serotonina y endorfinas. Actividades como el ejercicio, la meditación (para el caso de los humanos), y el bienestar animal en su caso, han demostrado tener efectos positivos en la salud.

Realizar actividades físicas (correr, ir al gimnasio, etc.), favorecen la activación de este eje, ya que se activa la hipófisis lo cual conlleva a la liberación principalmente de cortisol y epinefrina en las glándulas adrenales, capaces de volver a estimular la hipófisis para que se liberen endorfinas -por ejemplo, brindarnos una sensación de euforia y bienestar-.

Por otra parte, las neuronas al activarse secretan serotonina y dopamina, las cuales funcionan como neurotransmisores que ayudan al equilibrio de los estados de ánimo y a la regulación del sueño. Mantener estable la producción de estas hormonas promueve sensaciones de euforia, plenitud, buen estado de ánimo y también se refleja en el correcto funcionamiento de nuestro sistema inmunológico. Por contraparte, el desbalance de estas hormonas se ha relacionado con problemas de insomnio, mal humor, migraña y problemas de salud asociados a una

deficiente respuesta inmunológica. Por otra parte, en los sistemas de producción animal, se ha comprobado que el bienestar de los animales mejora la producción y disminuye el riesgo de presentar enfermedades infecciosas.

Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG)

La activación de este eje se inicia cuando el hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula a la hipófisis para la producción de la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante (FSH y LH, respec-



tivamente). Estas hormonas estimulan la síntesis de androstenediona, precursor de los andrógenos y de los estrógenos (testosterona y estradiol, por ejemplo), hormonas sexuales que generarán una retroalimentación positiva sobre el eje HHG, aumentando los pulsos de GnRH para liberar más LH o FSH.

Durante la pubertad y la gestación la producción hormonal se ve modificada drásticamente. Para el caso de las enfermedades periodontales esto cobra especial importancia, ya que los tejidos gingivales se ven alterados con las elevadas concentraciones de hormonas sexuales. Durante estas etapas las bacterias de la cavidad oral se ven favorecidas en su crecimiento y es la razón por la cual es más común observar problemas periodontales (como la gingivitis) durante estos periodos.

Este eje tiene especial relevancia en las mujeres ya que regula el ciclo menstrual y como consecuencia, también afecta el estado inmunológico del sistema genitourinario; se sabe que durante la etapa premestrua, los niveles de estrógenos, especialmente el estradiol, disminuyen y como consecuencia se altera el epitelio vaginal, afectando la flora vaginal normal, generando en consecuencia, la presentación de infecciones de origen bacteriano o micótico -principalmente infecciones ocasionadas por *Candida albicans*-.

De manera similar ocurre durante el parto y el inicio de la lactancia, las mujeres suelen ser más susceptibles a infecciones de la glándula mamaria o del tracto genitourinario. Las hormonas sexuales (estrógenos) y las hormonas lactogénicas (prolactina) juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune ante infecciones, ya que regulan la capacidad de los epitelios (capa que recubre los tejidos) para responder ante el ataque por patógenos. Dependiendo de las concentraciones y las combinacio-

nes hormonales, la respuesta inmune puede variar sustancialmente.

Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT)

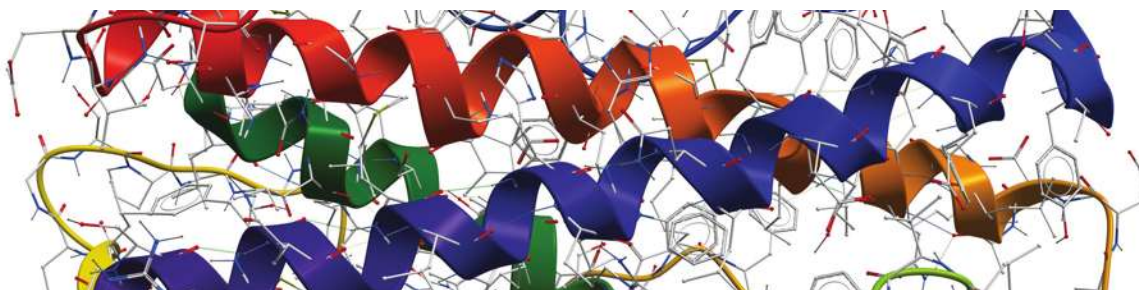
Finalmente, el eje HHT también tiene implicaciones en la inmunidad. El hipotálamo libera la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que estimula a la hipófisis para liberar a la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), induciendo a la tiroides a secretar las hormonas tiroideas T_3 y T_4 . Las alteraciones en este eje pueden generar problemas como el hipertiroidismo o el hipotiroidismo, que se ven reflejados en desórdenes del sistema inmunológico, ya que las hormonas tiroideas regulan la proliferación de diversos linfocitos y ayudan a mantener en correcto estado todo el sistema linfático y a la misma glándula tiroides.

Los desórdenes de la tiroides también pueden desencadenar que la propia glándula se vea afectada por reacciones autoinmunes, que en general son controladas por este eje.

¡Para saber más... explorar más!

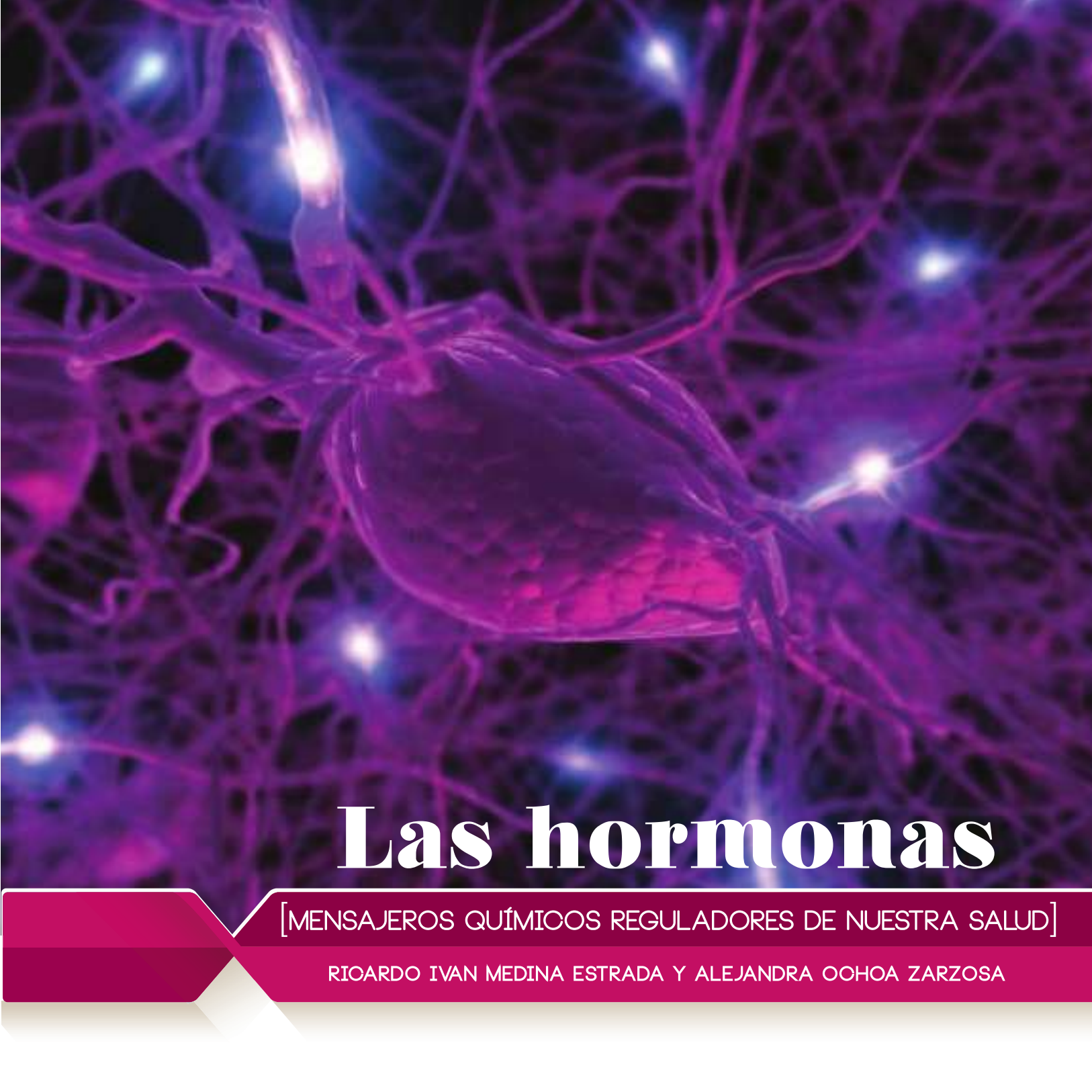
Si bien ahora sabemos un poco más del efecto que ejercen las hormonas sobre nuestro organismo y en especial sobre nuestro sistema de defensa, aún hace falta mucho por explorar en este vasto sistema neuroinmunoendócrino. Los ejemplos citados son solo una pequeña muestra de los múltiples efectos que ejercen las hormonas sobre la respuesta inmune.

Una de las principales perspectivas de los científicos en esta área, es buscar posibles blancos terapéuticos, como por ejemplo el tratar diversas enfermedades inmunológicas con hormonas. Adicionalmente, la visión simplificada que hasta hace poco prevalecía de estudiar a los seres vivos en órganos y sistemas, debe de ser sustituida por una visión integral.



8.4 CAPÍTULO IV

Las hormonas, mensajeros químicos reguladores de nuestra salud



Las hormonas

[MENSAJEROS QUÍMICOS REGULADORES DE NUESTRA SALUD]

RIOARDO IVAN MEDINA ESTRADA Y ALEJANDRA OOHOA ZARZOSA

DIRECTORIO DE GOBIERNO

Silvano Aureoles Conejo
Gobernador Constitucional del Estado de Michoacán

Miguel Alonso Olamendi
Secretario Particular

Jesús Melgoza Velázquez
Secretario Técnico

Jessica Rosalba Rosales Sánchez
Secretaria Privada

Guillermo Rizo Hernández
Coordinador de Asesores

Adrián López Solís
Secretario de Gobierno

Alberto Frutis Solís
Secretario de Educación

Carlos Maldonado Mendoza
Secretario de Finanzas y Administración

Silvia María Concepción Figueroa Zamudio
Secretaria de Cultura

Silvia Estrada Esquivel
Secretaria de Contraloría

Silvia Hernández Capi
Secretaria de Salud

Juan Bernardo Corona Martínez
Secretario de Seguridad Pública

Miriam Tinoco Soto
Secretaria de Política Social

Antonio Soto Sánchez
Secretario de Desarrollo Económico

Martín García Avilés
Secretario de Pueblos Indígenas

Claudia Chávez López
Secretaria de Turismo

José Luis Gutiérrez Pérez
Secretario del Migrante

Francisco Huergo Maurín
Secretario de Desarrollo Rural y Agroalimentario

Ma. Fabiola Alanis Sámano
Secretaria de Igualdad Sustantiva
y Desarrollo de las Mujeres Michoacanas

José Juan Domínguez López
Secretario de Comunicaciones y Obras Públicas

José Martín Godoy Castro
Procurador General de Justicia

Ricardo Luna García
Secretario de Medio Ambiente, Recursos Naturales y
Cambio Climático

Victor Lichtinger Waisman
Coordinador General de Gabinete y Planeación

Sergio Adem Argueta
Secretario de Desarrollo Territorial, Urbano
y Movilidad

José Luis Montañez Espinosa
Secretario de Innovación, Ciencia
y Desarrollo Tecnológico

DIRECTORIO SICDET

José Luis Montañez Espinosa

Secretario de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico

Pedro Mata Vázquez

Subsecretario de Innovación, Ciencia y Tecnología

Luis Antonio Arciga Anzo

Secretario Particular

Rubén Ignacio Pedraza Barrera

Secretario Técnico

Gaspar Efraín Guzmán Sánchez

Director de Vinculación

Rubén Salazar Jasso

Director de Innovación

María Natividad Palominos Mariles

Delegada Administrativa

María Piedad Trujillo García

Asesora

Guadalupe Juan Carlos Corona Suazo

Asesor

América Paola De Jesús Zuluaga

Departamento de Vinculación

Omar Jaimes Brito

Departamento de Estadística

Araceli López Valdez

Departamento de Difusión y Divulgación

Mariana Ortiz Andrade

Departamento de Desarrollo Tecnológico

Norma Elisa Valencia Farías

Departamento de Desarrollo Científico

Jesús Giovanni Medina García

Departamento de Fomento de las Ciencias Sociales y Humanidades

Nubia Lizbeth García Pérez

Departamento para la Innovación

María Teresa Martínez Sánchez

Departamento de Emprendimiento y Prospectiva de Mercados

Emerson Adrián Lua García

Departamento para la Cultura de la Innovación Empresarial

Mayra Muñoz Suárez

Departamento de Recursos Financieros

Las hormonas, mensajeros químicos reguladores de nuestra salud
Cuadernos de Divulgación Científica y Tecnológica de la
Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico de Michoacán.
Serie 2016, cuaderno número 1

¹Ricardo Ivan Medina Estrada y ¹Alejandra Ochoa Zarzosa
¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. aleocho@hotmail.
com; ochoaz@umich.mx y yunian2013@hotmail.com

Primera Edición: Diciembre del 2016
D.R. Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico de
Michoacán (SICDET).
Calzada Juárez No. 1446, Villa Universidad. C.P. 58060, Morelia,
Michoacán, México.
<http://sicdet.michoacan.gob.mx/>

ISBN de la serie: En trámite
ISBN del cuaderno: En trámite

Coordinación general:
Dr. José Luis Montañez Espinosa
Secretario de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico

Coordinación editorial:
Gaspar Efraín Gúzman Sánchez
Elia Catalina Cruz Barajas

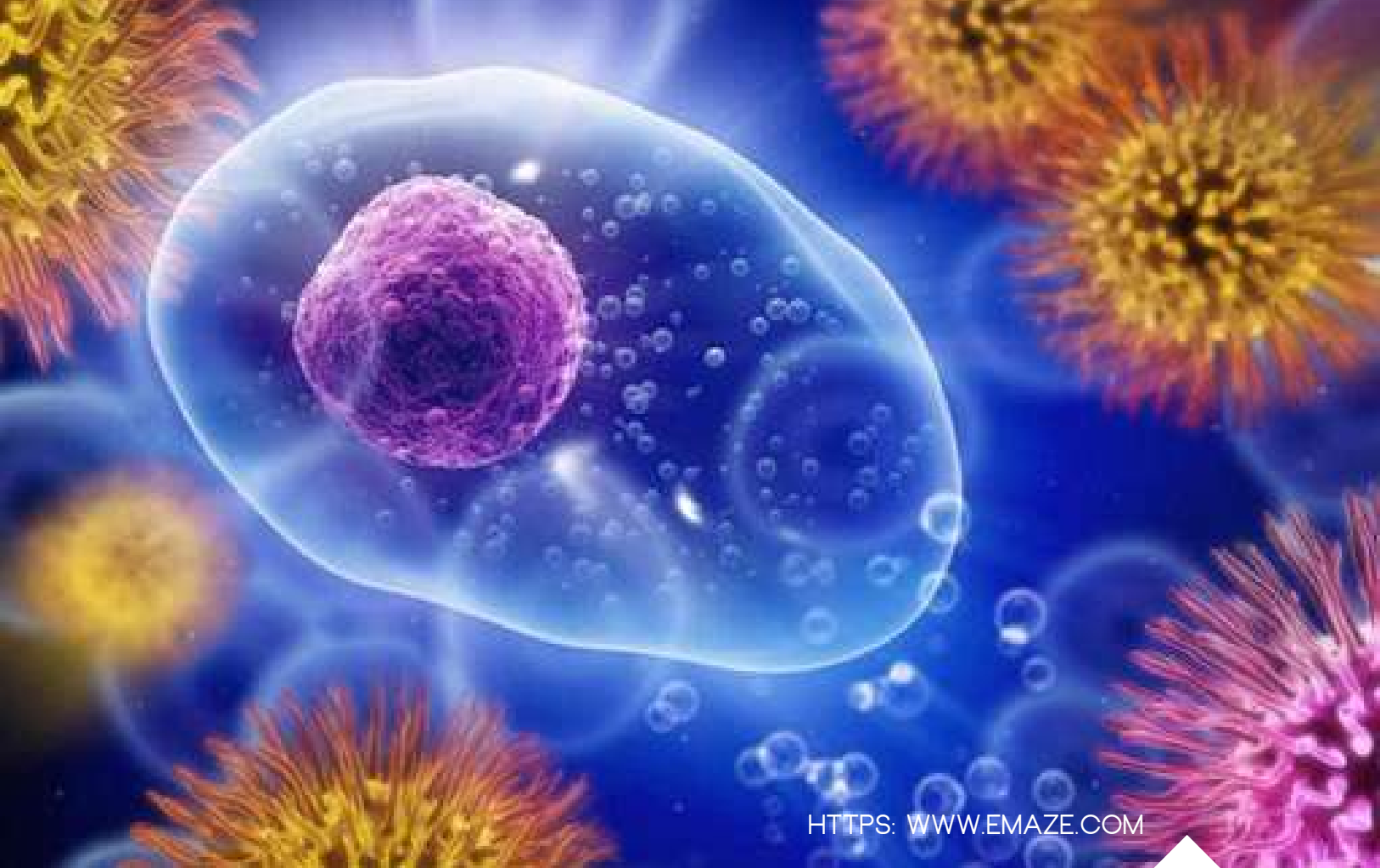
Edición y Corrección de estilo:
Francisco Valenzuela Martínez

Diseño editorial y formación:
Areli Vázquez Ferreira

Las opiniones expresadas en este documento son de exclusiva responsabilidad de los autores y no necesariamente representan la opinión de la SICDET. Se autoriza la reproducción parcial o total, siempre y cuando se cite la fuente de referencia.

Editado por la Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico de Michoacán.

Edición digital albergada en los espacios oficiales de la SICDET. Se permite su descarga para fines de consulta académica.



[HTTPS: WWW.EMAZE.COM](https://www.EMAZE.COM)

Cuando escuchamos la palabra hormona, frecuentemente la asociamos con eventos como el crecimiento y desarrollo corporal o con cambios en el estado de ánimo de las personas. Incluso, hemos escuchado la frase "andas muy hormonal", haciendo alusión a una persona que está alterada o con cambios bruscos en su estado de ánimo. En general, es correcto hacer estas asociaciones

puesto que las hormonas juegan un papel muy importante en los casos anteriormente mencionados. Sin embargo, es necesario enfatizar que las hormonas son muy versátiles y pueden participar prácticamente en todos los procesos que realiza nuestro organismo y el de muchos otros animales, incluyendo a las plantas.

Pero, ¿qué son las hormonas? Por principio, constituyen moléculas pequeñísimas que se producen y liberan en lugares muy específicos a lo largo de todo nuestro cuerpo (y en el de prácticamente todos los animales). Aunque no es una regla, muchas de ellas tienen la capacidad de viajar por nuestra sangre y llegar a lugares muy alejados de donde se produjeron inicialmente. Por lo anterior, las hormonas son consideradas como mensajeros químicos que permiten la comunicación entre las células. Regulan el funcionamiento de muchos órganos y, en ocasiones, se necesita la participación de más de un tipo de hormona para llevar a cabo alguna determinada función. Cabe señalar que en la mayoría de las ocasiones se requiere de un estímulo para que se produzca y libere una hormona, además de que ésta puede regular también la producción de otra hormona constituyendo ejes de regulación hormonal.

El cerebro es uno de los principales órganos que regula la producción de muchas de las hormonas que generamos a través de los ejes anteriormente mencionados. Para los fines de este artículo, hablaremos únicamente de los tres principales ejes hormonales cuya activación inicial radica en el sistema nervioso central.

QUE ES UNA HORMONA?

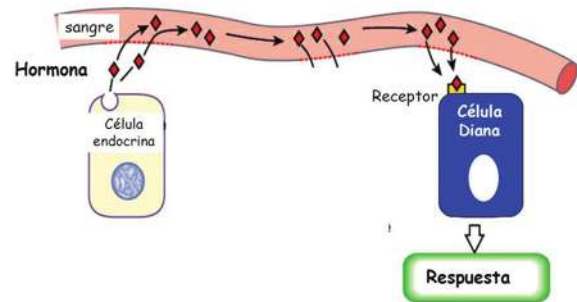


FIGURA 1. LAS HORMONAS COMÚNMENTE SE PRODUCEN EN CELULAS ENDOCRINAS.

El primero de ellos es el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), el cual está involucrado en la regulación del crecimiento y desarrollo del feto, así como durante la progresión de la infancia. Participa también en otros procesos metabólicos (regulación del colesterol) a través de la producción de las hormonas tiroideas. Un segundo eje es el hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG), íntimamente ligado con la reproducción puesto que participa en la ovulación, el embarazo, la lactancia, maduración de los espermatozoides, etc. Por último, se encuentra el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA), que se encarga de regular la respuesta al estrés y también participa en procesos de desarrollo y crecimiento (Everaus et al., 1993).



Las funciones descritas anteriormente son las más representativas de estos ejes, pero pueden llegar a participar en muchas otras actividades e incluso interactuar entre ellos mismos. Como se observa, todos los ejes están regulados por el hipotálamo, el cual recibe el primer estímulo (señal de alerta, señal de daño, etc.) para liberar las hormonas que posteriormente estimularán a la hipófisis, que a su vez libera a otras hormonas y, dependiendo del estímulo, la hormona liberada llevará el mensaje hacia la tiroides, las gónadas o las adrenales (consideradas glándulas secretoras de hormonas). A continuación se explicará de

manera un poco más detallada las vías que son importantes para la regulación de estos ejes, así como sus funciones y la forma en la que repercuten en nuestra vida diaria. Para hacer un poco más comprensible la función de las hormonas, mencionaremos algunos ejemplos conocidos que nos ayudarán a entender de manera más fácil su papel en nuestro organismo.

Cuando un niño inicia la etapa de la pubertad suele sufrir muchos cambios físicos y emocionales, producto de la evolución hormonal que se presenta en este periodo. Todo comienza cuando las concentraciones de hormonas sexuales (testosterona para los hombres y estradiol para las mujeres), comienzan a incrementarse y esto genera cambios físicos muy notorios tanto en niños como en niñas. Los cambios corporales consisten en la presentación de los denominados caracteres sexuales secundarios, como lo son el cambio en el timbre de voz, el crecimiento de vello en zonas como las axilas, piernas, en los genitales y en otras zonas para el caso particular de los hombres (pecho, barba, bigote, etc.). Otro efecto muy común en la pubertad y que está íntimamente asociado a los cambios hormonales que se sufren, es la aparición del acné



FIGURA 2. EL ACNÉ EN LA PUBERTAD ESTÁ RELACIONADO AL DESBALANCE HORMONAL.

Las hormonas generan cambios en la textura y propiedades de la piel, lo cual favorece la producción de grasa en zonas como la frente, nariz y barbilla (la denominada zona T). Además, los cambios hormonales afectan la flora bacteriana que vive naturalmente en esas zonas de la piel y favorece que algunas bacterias se reproduzcan de manera descontrolada; este desbalance genera microinfecciones que incrementan la producción

de grasa en la piel y, por lo tanto, observamos la aparición de barros y/o espinillas (Ilanosi et al., 2016).

En uno de los eventos biológicos más complejos como lo es el embarazo, forzosamente tienen que estar implicadas las hormonas, las cuales también regulan el apareamiento y la fecundación. Para que una hembra acepte aparearse con un macho (entrar en la etapa de celo), necesita tener altas concentraciones

de la hormona llamada estradiol, que es la hormona sexual por excelencia de las hembras, ya que está directamente asociada con la libido, es decir, con el deseo de aparearse. El estradiol regula a su vez la producción de otras hormonas como la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante (LH y FSH, por sus siglas en inglés), ambas participan en la ovulación y en la preparación del útero para recibir al óvulo, el cual posteriormente será fecundado por el espermatozoide



FIGURA 3. EL CUERPO DE LA MADRE PRODUCE LECHE, SIN EMBARGO, LA SUCCION DEL BEBE ESTIMULA AL EJE HORMONAL.



El embarazo es una condición que se caracteriza por una serie de cambios sistémicos en diferentes niveles del organismo, tales como alteraciones endócrinas, con un incremento en la producción de diferentes hormonas. Una vez establecida la fecundación, el cuerpo de la hembra sufre una lucha interna para no rechazar todo lo que le resulta ajeno y en este caso, el óvulo fecundado parece ser ese

agente extraño. Cuando nuestro cuerpo rechaza algo, activa su sistema de defensa, y es así como comienza a defenderse de lo que considera ajeno. Pero para evitar este rechazo y que se logre una gestación exitosa, participan también algunas hormonas. Es el caso nuevamente del estradiol, ya que logra reducir la respuesta inmunológica en el útero y es así como se logra no rechazar al producto.

Una vez logrado, la hormona progesterona comienza a aumentar sus niveles y permanece activa durante todo el embarazo para favorecer el correcto desarrollo del útero, de la placenta y del embrión (Baraño, 2011). Al término del embarazo, se lleva a cabo un reajuste en los niveles hormonales: la progesterona comienza a disminuir e intervienen otras hormonas como la prostaglandina y la oxitocina. La primera está asociada con activar al sistema inmunológico, lo cual generara un ambiente inflamatorio y tendrá como consecuencia el inicio del trabajo de parto, y la última está relacionada con inducir las contracciones uterinas y facilitar la labor del alumbramiento. En la fase de lactancia participan otras hormonas como la prolactina, que con ayuda de



FUENTE: DE ARCHIVO

la oxitocina regulan la producción y secreción de la leche. Además del efecto que ejercen las hormonas a nivel del útero y sobre el embrión, la madre sufre distintas alteraciones en todo su cuerpo, producto de los cambios en las concentraciones hormonales. El sistema circulatorio, encargado de bombear sangre a todas las partes del cuerpo, incrementa su actividad al igual que el sistema respiratorio. Se presentan cambios en los hábitos alimenticios, principalmente el aumento en el consumo de carbohidratos, y hay una aparición de náuseas y vómitos entre muchos otros efectos. Algunos tienen la finalidad de compensar la demanda energética que requiere desarrollar una nueva vida dentro del útero y otros son meramente efectos secundarios de los cambios tan drásticos en las concentraciones hormonales y de la adaptación del organismo a la nueva etapa que está sufriendo (Barañao, 2011).

Como puede apreciarse, el embarazo es un proceso complejo en donde están involucradas diversas hormonas, unas regulando a otras en un sistema interconectado, y así sucede en todo nuestro cuerpo; no existe un sistema o aparato que no tenga alguna relación con otro.



FIGURA 4. CLAUDE BERNARD ILUSTRANDO A SUS COLEGAS
(LEÓN LHERMITTE, 1889).

A finales del siglo XIX algunos médicos (siguiendo los ideales de Claude Bernard) establecieron un método para facilitar el estudio del cuerpo humano que consistía en segmentarlo. Es ahí donde se establecieron las bases para denominar a los aparatos o sistemas (aparato respiratorio, sistema digestivo, etc.) que posteriormente se describieron con base en sus funciones comunes. Sin embargo, en la actualidad esta división en órganos o sistemas está obsoleta y se

están comenzando a dejar de lado dichos conceptos. Cada día es más difícil explicar fenómenos que ocurren en nuestro cuerpo o en el de algunos otros animales sin relacionar a dos o más aparatos o sistemas. De esta lógica surge por ejemplo el concepto del sistema neuroinmunoendócrino, en el cual se trata de conectar el aparato neuronal (sistema nervioso), el sistema inmunológico y el endócrino, para así tratar de explicar de manera más clara cómo

se da la estimulación a nivel neuronal para que se produzcan hormonas, mismas que tendrán repercusiones en nuestro sistema inmunológico. Como ejemplo, retomemos el caso del embarazo, en el que las hormonas evitan el rechazo del producto para que se lleve a cabo la implantación y el correcto desarrollo del embrión.

El sistema inmunológico es el encargado de mantener a nuestro cuerpo libre de enfermedades, de protegernos y reparar a nuestro organismo cuando sufrimos una enfermedad o lesión. Son muchas las causas por las que podemos contraer enfermedades, desde las que son originadas por microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, virus, etc.); por los factores climáticos (cambios bruscos de temperatura, radiación UV, etc.), hasta por la misma



FUENTE: DE ARCHIVO

alimentación, la cual puede ocasionarnos problemas de salud o propiciar la presentación de diversas enfermedades. Nuestro cuerpo siempre trata de mantener un equilibrio para evitar enfermarnos, pero existen ocasiones en donde el balance del sistema inmunológico se rompe. Muchas veces, la disminución en nuestras defensas es ocasionada porque nos encontramos

en circunstancias de mucho estrés (periodo de exámenes, muerte de un ser querido, etc.) o a que estamos en situaciones que le exigen mucho a nuestro cuerpo (ejercicio extremo), lo cual se traduce en una inmunosupresión. De manera normal, nuestro sistema de defensa mantiene al límite a los microorganismos con los que interactuamos día a día, cuando respiramos, cuando comemos algo e inclusive

cuando tocamos algo; constantemente estamos en contacto con muchos microorganismos que nos podrían causar enfermedades si nuestro sistema inmunológico fuera deficiente (Roved, 2016). Además, en nuestro cuerpo (piel, intestinos, ojos, etc.) tenemos muchos microorganismos que viven de manera natural en las distintas partes del mismo, los cuales componen nuestra microbiota que interactúa y participa en muchos procesos que son esenciales para el cuerpo (en la digestión, mantenimiento de la piel, producción de vitaminas, ácidos grasos, etc.). Por eso cuando nuestro sistema de defensa está en óptimas condiciones, todos los microorganismos se mantienen controlados, evitando el crecimiento sin regulación de la microbiota con la que convivimos y

eliminando a los potenciales patógenos. Sin embargo, cuando el sistema de defensa comienza a presentar fallas, se genera un desequilibrio en las poblaciones de los microorganismos que componen nuestra microbiota y es cuando se generan las enfermedades de origen infeccioso. Cuando el sistema inmunológico está comprometido y nos contagiamos con algún microorganismo patógeno (un virus causante de la Influenza, por ejemplo), nuestro cuerpo no es capaz de defenderse, y es así como este microorganismo puede ingresar y multiplicarse atacando a las células, lo cual se ve reflejado en una enfermedad (Wira, 2010).

Hasta que nuestro cuerpo, y en especial hasta que el sistema de defensa pueda recuperar su capacidad de



respuesta ante este microorganismo, es cuando podemos eliminar la enfermedad. De lo contrario (si nuestro sistema es incapaz de eliminar al patógeno) la enfermedad continuará y generará un proceso crónico; es decir, que siempre estará presente el microorganismo, causando daño en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones inmunológicas en las que nos encontremos. Existen microorganismos que entran al cuerpo y no suelen causar mucho daño a nuestros órganos; pero cuando el sistema de defensa está débil, estos microorganismos aprovechan para invadir otras partes del cuerpo y causar más daño. Una vez que nuestro cuerpo logra recuperarse y enfrentarse al patógeno, este microorganismo puede mantenerse en una fase de latencia, pues no causa daño y pasa desapercibido por el sistema inmunológico

esperando de nuevo las condiciones adecuadas para volver a invadir (Engelen, 2016).

La capacidad de nuestro sistema inmunológico para defendernos depende de muchos factores, uno de ellos es el hormonal, pues muchas hormonas regulan las poblaciones de las diferentes células que forman parte de este sistema. Hay hormonas que favorecen que las células de defensa lleguen a los sitios donde hay una infección, o bien, que estas mismas células sean más efectivas para matar a los patógenos. Sin embargo, algunas hormonas tienen efectos opuestos, ya que pueden llegar a disminuir la cantidad de células disponibles para defendernos de algún patógeno o dejar desprotegidas ciertas zonas del cuerpo, lo que será aprovechado por los

microorganismos. Una de las asociaciones más comunes entre el sistema inmunológico y las hormonas es el estrés.



FUENTE DE ARCHIVO

El estrés es considerado como la enfermedad del siglo XXI, puesto que está relacionado con la presentación de diversas patologías. Por lo general se considera como un estado mental cuando pasamos por situaciones difíciles en nuestra vida cotidiana, por ejemplo: la pérdida de un ser querido, problemas económicos, problemas con las personas con las que convivimos o

dificultades en el trabajo. El estrés puede presentarse en todos los niveles, y aunque el más evidente sea el emocional (al estar irritable o triste), éste puede manifestarse en diversas partes del cuerpo (estómago, piel, etc.). El estrés se puede definir como la respuesta ante una condición adversa, la cual logra romper el equilibrio y generar efectos secundarios como producto de esta alteración. Como consecuencia del estrés se activan distintas respuestas hormonales que provienen de nuestro cerebro y llegan hasta las glándulas adrenales, en donde se liberan otras hormonas que tendrán los efectos que describimos a continuación. Supongamos que mañana será nuestro primer día de escuela o de trabajo; a muchos de nosotros esto nos genera



FIGURA 5. EL ESTRÉS ES UNO DE LOS PRINCIPALES CAUSANTES DE ENFERMEDADES, YA QUE ALTERA SISTEMAS COMO EL INMUNOLÓGICO.

una gran ansiedad, miedo o distintas emociones que se interpretan como estresantes. Esta situación hace que en nuestro cuerpo se active el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), que forma parte de este complejo sistema denominado neuroinmunoendócrino. El cerebro, al percibir una sensación estresante, activa al hipotálamo para que se liberen hormonas como la vasopresina o la hormona

liberadora de corticotropina, que a su vez estimulan a otra parte del cerebro (glándula hipófisis). La hipófisis produce en respuesta otras hormonas, como la corticotropina, la cual viajará hasta las glándulas adrenales y estimulará la secreción de cortisol o hidrocortisona, hormonas que están íntimamente ligadas con la regulación del sistema inmunológico. Se ha demostrado que el estrés, o las hormonas liberadas tras

esta condición, disminuyen la capacidad del cuerpo para defenderse de infecciones y propician un estado inflamatorio crónico, mismo que se ha relacionado con la presentación de diversos tipos de cáncer y de enfermedades metabólicas. Por lo tanto, las personas que se encuentran en constante estrés son más propensas a presentar enfermedades infecciosas o algunos tipos de cáncer como el de colon



y de estómago (Park, 2016; Holdstock et al., 1982), así como también de padecer obesidad.

Afortunadamente existen elementos que favorecen la activación del sistema inmunológico. Se conoce que las personas que llevan una vida alegre, tranquila, es decir, libre de estrés, tienden a presentar menos complicaciones de salud. Esto puede ser explicado por la participación de otras hormonas que se activan por el mismo eje HHA pero bajo circunstancias totalmente contrarias a las del estrés; la epinefrina, adrenalina y bajas dosis de cortisol (todas producidas en las glándulas

adrenales) son necesarias para mantener un estado óptimo en nuestro sistema inmunológico. De igual manera, también ayudan las hormonas que actúan directamente sobre nuestro cerebro como las endorfinas, la serotonina y melatonina, las cuales nos brindan sensaciones de euforia, felicidad, relajamiento y descanso. Todo esto favorece las condiciones para que nuestro cuerpo se defienda de manera más efectiva contra las diferentes infecciones existentes, y también ayuda a mantener a nuestro cuerpo en un equilibrio metabólico, evitando así enfermedades como el cáncer o la diabetes. (Balchin, 2016).

Los anteriores son ejemplos claros de cómo el sistema neuroinmunoendócrino puede verse influenciado



FIGURA 6. MANTENER NUESTRA MENTE EN EQUILIBRIO FAVORECE UN ESTADO DE BIENESTAR.

por factores externos que influyen en nuestra salud. Sin embargo, este sistema también puede ser modificado por el propio organismo, como el ya citado caso del embarazo. En esta etapa se sufren otros efectos inmunológicos en diferentes partes del cuerpo, además del útero, como por ejemplo en la boca. Los problemas bucales durante el embarazo se presentan porque las hormonas, particularmente el estradiol y la progesterona, hacen que las defensas de la boca disminuyan y como consecuencia las bacterias



FUENTE: DE ARCHIVO

FIGURA 7. UNA SANA ALIMENTACIÓN FAVORECE AL SISTEMA INMUNOLÓGICO Y NOS MANTIENE SALUDABLES.

crecen de manera descontrolada, lo que se refleja principalmente en la aparición de caries, mal olor y gingivitis (Figuro-Ruíz, 2006).

Las hormonas sexuales, es decir, la testosterona en el caso de los hombres (machos) y el estradiol en las mujeres (hembras), además de sus efectos sobre la reproducción, parecen jugar papeles importantes como reguladores de la inmunidad y así participar en la presentación de algunas enfermedades autoinmunes (donde nuestro cuerpo comienza a dañar ciertas zonas del mismo). Un ejemplo de lo anterior son las enfermedades reumáticas con implicaciones autoinmunes como la artritis-reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Gjertsson, 2012).

Recordando que todos los órganos y sistemas de nuestro cuerpo están vinculados, tenemos que mantener atención en todas las partes de nuestro organismo, ya que solo así lograremos el equilibrio deseado para mantener un buen estado de salud.

El sistema neuroinmunoendócrino no es exclusivo de los humanos; es bien sabido que en otros animales se presentan efectos similares donde las hormonas juegan papeles cruciales en la respuesta inmunológica. Todos los mamíferos se estresan, crecen y maduran para reproducirse, y por consecuencia sus ejes hormonales también sufren alteraciones constantes muy similares a los de los humanos y en ocasiones idénticas. Por mencionar algunos ejemplos, se ha demostrado que

el separar a los cachorros o las crías (ratas, ratones, etc.) de su madre a muy temprana edad (destete temprano) genera estrés por separación, lo que conlleva a que sean animales más susceptibles de presentar enfermedades. Otro ejemplo en las vacas muestra que durante el parto y el inicio de la lactancia, el ganado bovino es más susceptible de presentar enfermedades de origen infeccioso, lo cual se ha relacionado con cambios bruscos que se presentan durante estas etapas en las concentraciones de hormonas sexuales y lactogénicas (estradiol y prolactina, respectivamente).

Para finalizar, la cantidad de efectos asociados al sistema neuroinmunoendócrino es inmensa, y refuerza el concepto de un sistema interconectado. La importancia de conocer la interrelación que existe entre los diversos sistemas puede conllevar a generar mejores estrategias de control para tratar las enfermedades de manera integral, y no de forma separada como se ha hecho durante mucho tiempo. Hay que recordar que si afectamos al cerebro por ejemplo, es muy probable que podamos ver también alteraciones hormonales o inmunológicas, o viceversa.



FUENTE: DE ARCHIVO

REFERENCIAS

- Balchin R, Linde J, Blackhurst D, Rauch HL, Schonbachler G. 2016. Sweating away depression? The impact of intensive exercise on depression. *J Affect Disord.* 200-2018-21.
- Baraño RI. 2011. Inmunología del embarazo. *Invest Clin.* (2):175.194.
- Everaus H, Hein M, Zilmer K. 1993. Possible imbalance of the immune-hormonal axis in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* (5-6):453-8.
- Figuro-Ruiz E, Prieto I, Bascones-Martínez A. 2006. Cambios hormonales asociados al embarazo. *Afectación gingivo-periodontal.*
- Gjertsson I, Lagerquist MK, Kristiansson E, Carlsten H, Lindholm C. 2012. Estradiol ameliorates arthritis and protects against systemic bone loss in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Arth Res & The.* (14):R76.
- Engelen L, Gale J, Chau JY, Hardy LL, Mackey M, Johnson N, Shirley D, Bauman A. 2016. Who is at risk of chronic disease? Associations between risk profiles of physical activity, sitting and cardio-metabolic disease in Australian adults. *Aust N Z J.*
- Holdstock G, Chastenay BF, Krawitt EL. 1982. Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clin Exp Immunol.* (47):449-456.
- Ianosí S, Ianosí G, Neagoe D, Ionescu O, Zlatian O, Docea AO, Badiu C, Sifaki M, Tsoukalas D, Tsatsakis AM, Spandidos DA, Calina D. 2016. Age-dependent endocrine disorders involved in the pathogenesis of refractor acne in women. *Mol Med Rep.* (6):5501-5506.
- Park MH, Kim HG, Lee HK. 2016. Analysis of stress, musculoskeletal disorders, and fatigue among broadcasting actors. *J Phys Ther Sci.* (11):3047-3053.
- Roved J, Westerdahl H, Hasselquist D. 2016. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Horm Behav.* (16):30394-4.
- Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. 2010. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am J Reprod Immunol* (6).

SOBRE LOS AUTORES

Alejandra Ochoa Zarzosa es egresada de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica de la UNAM y cuenta con Maestría en Ciencias Fisiológicas y Doctorado en Ciencias Biomédicas por la UNAM. Actualmente tiene la distinción de Investigador Nacional Nivel II (SNI) y es miembro de la Academia Mexicana de las Ciencias. Su línea de investigación está relacionada con el estudio de la respuesta inmune innata durante la interacción hospedero-patógeno en modelos animales y humanos. Desde 2005 es directora del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la FMVZ de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Ricardo Ivan Medina Estrada es egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; maestro en Ciencias Biológicas con especialidad en Biotecnología Pecuaria. Actualmente cursa el séptimo semestre del Doctorado en Ciencias Biológicas cuya línea de investigación se enfoca en describir las modificaciones en la respuesta inmune innata que sufre el hospedero en presencia de hormonas y sus repercusiones en la internalización de la bacteria *Staphylococcus aureus* en células de epitelio mamario bovino.

9 DISCUSIÓN GENERAL

El E2 es una hormona que modula la RII de diversos tipos celulares. En diferentes estudios se ha demostrado que esta molécula revierte los efectos anti-inflamatorios causados por bacterias o componentes derivados de éstas, además regula la expresión y producción de péptidos antimicrobianos. Estos efectos se han demostrado principalmente en epitelios del aparato genitourinario, ya que al ser una hormona sexual sus blancos principales son los epitelios asociados a la reproducción (Wira et al, 2010). En estos modelos se ha evaluado su efecto inmunomodulador en diferentes enfermedades infecciosas, tanto en animales como en humanos. Sin embargo, a pesar de que el epitelio mamario es otro de los principales blancos del E2, ha sido poco estudiado su efecto sobre la RII y su repercusión en la interacción patógeno-hospedero. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo hemos evaluado el efecto de hormonas, que también tienen como blanco el epitelio mamario bovino, sobre la RII durante la infección con *S. aureus*, el cual es el principal agente causal de la mastitis y uno de los patógenos más comunmente asociado a la mastitis bovina subclínica (enfermedad crónica y recurrente), principalmente por su capacidad de internalizarse y por tanto evadir la respuesta inmune del hospedero. Una de las hormonas evaluadas es la hormona lactogénica prolactina (PRL), la cual incrementa la internalización de la bacteria en las CEMB y regula elementos de la RII (Medina-Estrada et al, 2015). Sin embargo, se desconoce el efecto del E2 sobre la RII en las CEMB infectadas con *S. aureus*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el E2 a una concentración fisiológica (50 pg/ml) inhibe la internalización de *S. aureus* en las CEMB y modula elementos de la RII, con una tendencia a favorecer la respuesta anti-inflamatoria, ya que a través de la ruta de señalización de TLR2 apaga MAPK cinasas como ERK y p38. Por otro lado, el E2 incrementa la actividad de la cinasa Akt, lo cual se ve reflejado en el incremento de la actividad del factor transcripcional AP-1. Éste a su vez favorece la expresión del gen de IL-10, una citocina anti-inflamatoria, y de la IL-8, una quimiocina. El ambiente anti-inflamatorio podría prevenir la el daño al tejido causado por *S. aureus*. Además, el E2 estimula la expresióngénica de los péptidos antimicrobianosDEFB1 y DNBD10. El resultado final de esta regulación es la modificación de la RII, favoreciendo la respuesta de las CEMB ante la infección por *S. aureus*, aunado al efecto antimicrobiano indirecto. Es decir, que el E2 favorece la expresión de péptidos, los cuales atacaran a la bacteria.

Adicionalmente, el E2 disminuye la invasión al reducir la actividad (fosforilación) de la cinasa FAK, lo cual se ve reflejado en un menor tráfico de integrinas $\alpha 5 \beta 1$, las cuales son utilizadas por la bacteria para internalizarse. Sin embargo, cuando FAK no se fosforila, la ruta de las integrinas se ve inhibida, lo cual podría explicar uno de los mecanismos por los que el E2 disminuye la invasión bacteriana.

El efecto inmunomodulador del E2 en las CEMB, induce la secreción de elementos antimicrobianos para mejorar la respuesta ante la infección. Esto se comprobó al recuperar los medios condicionados de las CEMB, tratadas 24 h con el E2, y se incubó en ellos a *S. aureus*. Posteriormente, se midió la viabilidad bacteriana, observando que ésta disminuye hasta en un 50%. Este resultado indica que las CEMB secretan componentes con efecto antimicrobiano contra *S. aureus*, tales como péptidos antimicrobianos (Defensinas). En diversos modelos humanos epiteliales (uterino, vaginal, endometrial) se ha descrito la secreción de péptidos antimicrobianos (ej. HDB2/1) mediada por E2, los cuales protegen a la célula epitelial frente a los retos bacterianos.

Las hormonas llevan a cabo sus efectos inmunomoduladores a través de sus receptores específicos, los cuales activan cascadas de señalización y desembocan en la activación de factores transcripcionales, modulación de la expresión génica, cambios epigenéticos y postraduccionales, además de inducir respuestas no genómicas, como flujo de calcio y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (García-Gómez et al, 2013). TLR2 es el principal receptor asociado al reconocimiento de *S. aureus*, a través de la interacción con el LTA de la bacteria. Una vez que el TLR2 interactúa con la bacteria, éste puede activar río abajo, en la ruta de señalización, a las MAPK cinasas o a elementos de respuesta a interferón e incluso a otras cinasas (Li et al, 2013). En el caso particular de *S. aureus*, en su interacción con el epitelio mamario bovino, se sabe que la bacteria inhibe la translocación al núcleo del factor transcripcional NF- κ B (Lara-Zarate et al, 2007) y como resultado mantiene una respuesta inflamatoria atenuada, ya que NF- κ B es un elemento canónico de ésta al modular la transcripción de diversas citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Kerro-Dego et al, 2002). Esta disminución de la respuesta inflamatoria está asociada con la persistencia de la bacteria y su capacidad para generar infecciones crónicas y recurrentes, tales como la mastitis bovina subclínica.

En este trabajo se encontró que E2 está apagando la ruta de las MAPK cinasas pero está activando una ruta alterna dependiente de la cinasa Akt. A través de ésta, desencadena la translocación al núcleo del factor transcripcional AP-1, el cual está asociado con la modulación de la transcripción de genes relacionados a la RII, tales como, péptidos antimicrobianos y citocinas pro y anti inflamatorias. Interesantemente, todos los demás factores transcripcionales asociados a la RII se mantienen inactivos durante el tratamiento con la hormona.

Además, las hormonas están modificando el tráfico de integrinas, las cuales son esenciales para que la bacteria se internalice. La integrina $\alpha 5\beta 1$ interactúa con la bacteria e induce el andamiaje de diversas proteínas, que favorecen el re-arreglo del citoesqueleto de actina para la formación del endosoma y la internalización de *S. aureus* en las CEMB (Faiya et al, 2003). En este trabajo encontramos que el E2 modula el tráfico de las integrinas, al inhibir la fosforilación de la cinasa de adhesión focal FAK, la cual es elemental para que continúe la señalización dependiente de integrinas y por consecuencia el tráfico de estas. Además, se ha reportado que las rutas de señalización dependientes de integrinas convergen con rutas de la RII, la cinasa FAK modula la actividad de las cinasas como Akt y esta última también puede estar modulando a las MAPK cinasas (Yung-Cheng et al, 2017), por lo cual las rutas de señalización de los receptores TLR2 e integrina $\alpha 5\beta 1$, pueden estar convergiendo en algún punto de la cascada de señalización, durante la interacción con *S. aureus*.

Los datos indican que el E2 activa a las CEMB mediante la ruta de señalización de TLR2/Akt-FAK/AP-1 favoreciendo la respuesta antimicrobiana y anti inflamatoria antes y después de la internalización de *S. aureus* (Fig. 7).

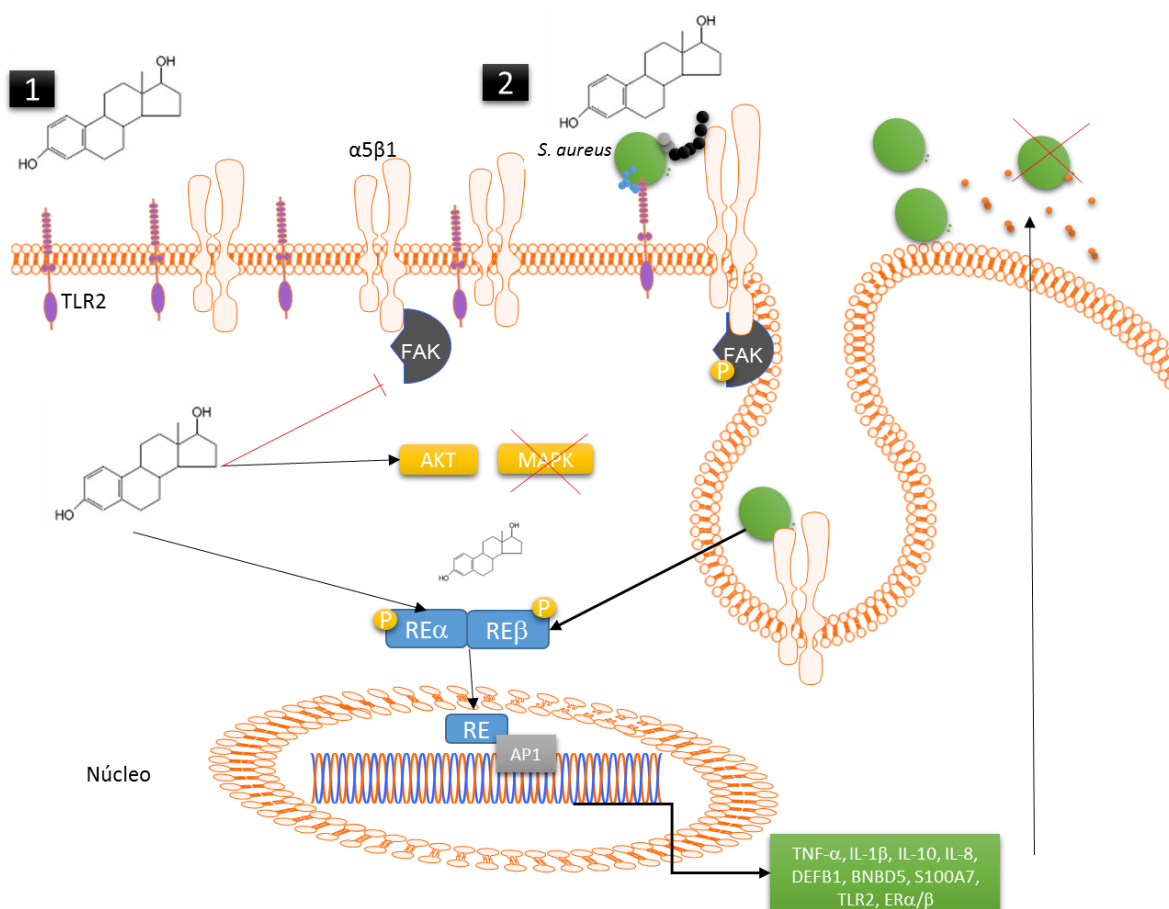


Figura 7. Efecto del E2 sobre la RII de CEMB y sus implicaciones en la internalización de *S. aureus*. (1) El E2 modula la RII de las CEMB manteniéndolas alerta ante la posible infección de patógenos. Cuando *S. aureus* invade a las CEMB (2), el E2 sigue brindando un efecto protector al inducir la secreción de moléculas con actividad antimicrobiana. Por lo cual, en ambos casos, antes y después de la infección, la RII de las CEMB se encuentra activada. Esto significa que presentan una mejor respuesta ante la invasión de *S. aureus* como consecuencia se disminuye la internalización. De acuerdo con los resultados obtenidos, el E2 presenta un efecto anti-inflamatorio, ya que inhibe la activación de MAPK cinasas (ERK y p38), necesarias para la ruta de señalización de TLR2 y así poder inducir la activación de factores transcripcionales. Por otro lado, el E2 mostró también actividad sobre Akt, al inducir su fosforilación y por consecuencia la translocación al núcleo de factores como AP-1. Este factor está íntimamente relacionado con la transcripción de genes de la RII, tales como, citocinas pro y antiinflamatorias, así como de péptidos antimicrobianos. Todos estos efectos reducen la internalización de *S. aureus*. Así mismo se encontró que E2 presenta un efecto antimicrobiano indirecto, ya que estimula la secreción moléculas con carácter antimicrobiano y reducen la viabilidad de la bacteria durante el proceso de internalización.

10 CONCLUSIÓN GENERAL

El E2 vía RE α inhibe la internalización de *S. aureus* en las CEMB, favoreciendo la RII de la célula hospedera, mediante la regulación de rutas de señalización (TLR2/Akt/AP-1 e integrina $\alpha 5\beta 1$ /FAK). Estas rutas de transducción favorecen la producción y secreción de elementos antimicrobianos y mantienen un ambiente antiinflamatorio. Además, estas rutas modulan el tráfico de integrinas, las cuales son elementales para la internalización bacteriana.

11 ANEXO I

Efecto inmunomodulador de la mezcla hormonal de estradiol y prolactina durante la internalización de *Staphylococcus aureus*, en células de epitelio mamario bovino

Ricardo Iván Medina Estrada¹, Joel Edmundo López Meza¹ y Alejandra Ochoa Zarzosa*¹

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5, Carr. Morelia-Zinapécuaro, La Posta Veterinaria, CP 58893, Morelia, Mich. Tel (443) 2958029. Correo: * ochoaz@umich.mx

*Autor para correspondencia:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

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.

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

E-mail: aleocho@hotmail.com

Resumen

Durante el parto, en el ganado bovino, se incrementa la susceptibilidad a presentar enfermedades infecciosas, como la mastitis bovina. Este periodo se caracteriza por cambios drásticos en las concentraciones de 17β -Estradiol (E2) y prolactina (PRL), los cuales pueden comprometer la respuesta inmune innata (RII) del animal. Las células del epitelio mamario bovino (CEMB) son blanco de estas hormonas, ya que regulan diversos procesos celulares. Adicionalmente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que por separado estas hormonas tienen efectos inmunomoduladores sobre las CEMB; la PRL (5 ng/ml) induce la internalización de *Staphylococcus aureus* (principal agente causal de la mastitis bovina), por el contrario, el E2 (50 pg/ml) la reduce. La RII es estimulada por la PRL; sin embargo,

el E2 reduce esta respuesta, causando un ambiente antiinflamatorio. No obstante, el efecto sobre la internalización bacteriana y la RII de las CEMB con la mezcla hormonal se desconoce. Para resolver esto, se utilizó un cultivo primario de CEMB, el cual se trató con la mezcla hormonal y posteriormente se infectó con la cepa de *S. aureus* (ATCC 27543). La viabilidad celular se midió por el método de reducción de MTT y por ensayos de exclusión de azul tripano; la viabilidad bacteriana fue analizada por conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y por citometría de flujo (CF). La invasión se analizó usando ensayos de protección con gentamicina; la CF se empleó para el análisis de los receptores y de las cinasas involucrados. Además, se realizó qPCR y ensayos de ELISA para determinar la expresión de genes y secreción de proteínas de la RII, respectivamente. La mezcla disminuyó la internalización (~50%) de *S. aureus* en las CEMB, este efecto se asoció con la reducción de la abundancia en la membrana de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (~80%). Además, la mezcla inhibió la activación de las cinasas p38 y ERK. Adicionalmente, la secreción del péptido antimicrobiano DEFB1 incrementó en presencia de la mezcla hormonal y la bacteria (2 veces). La expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α incrementó en presencia de la mezcla hormonal (4 y 12 veces, respectivamente). En conclusión, la mezcla hormonal de E2 y PRL induce elementos de la RII en las CEMB, lo cual se ve reflejado en la reducción de la internalización de *S. aureus* aparentemente porque regulan el tráfico de integrinas, sin embargo, es necesario elucidar las rutas de señalización asociadas a este fenómeno.

Abstract

Cattle are more susceptible to infectious diseases during the peripartum such as mastitis. This period is characterized by drastic changes in the concentrations of 17 β -estradiol (E2) and prolactin (PRL), which compromise the innate immune response (IIR) of the animal. Bovine mammary epithelial cells (bMECs) are target tissue of these hormones, which regulate different cellular process. In addition, previous work from our group shows that these hormones have immunomodulatory effects on bMECs: PRL induces (5 ng/ml) the internalization of *Staphylococcus aureus* (principal mastitis pathogen) and E2 decreases it (50 pg/ml). The IIR was stimulated by PRL and inhibited in the present of E2 induces an anti-inflammatory response in bMECs. In spite of both hormones play a relevant role for bovine mammary tissue in vivo their combined effects on the IIR of bMECs during infection are unknown. For this study, we used a primary culture of bMECs that was treatment with

hormonal mixture and then were infected with a *S. aureus* strain (ATCC-27543). Viability assays for bMECs treated with mixture were determined by MTT reduction and trypan blue exclusion assay; bacterial viability was analyzed by CFU counting and flow cytometry (FC). The invasion was analyzed using gentamicin protection assays; FC was employed for receptor and kinase analysis, and RT-qPCR and ELISA assays were used to determine the expression of IIR genes and protein secretion, respectively. The results indicated that the mixture did not modify bMECs or bacteria viability after 24 h. The mixture decreased *S. aureus* internalization (~50%) in bMECs. This effect was associated with a membrane reduction of integrin $\alpha 5\beta 1$ abundance (~80%). The mixture inhibited p38 and ERK kinases activation compared with control bMECs. In addition, the secretion of the antimicrobial peptide DEFB1 increased in the presence of the mixture and *S. aureus* (~2 fold), with respect to infected bMECs. The gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α were up-regulated in the presence of the mixture (~4 and 12 fold, respectively). In conclusion, the hormonal combination of PRL and E2 induces elements of the pro-inflammatory response in bMECs, while reducing *S. aureus* internalization via integrins. It is necessary to elucidate the signal pathways involved in these effects since MAPK activation does not participate.

1. Introducción

Las hormonas tienen una función importante en el desarrollo y crecimiento de los organismos, especialmente en su etapa reproductiva. Las hormonas sexuales y lactogénicas, como el 17β -estradiol (E2) y la prolactina (PRL), son esenciales para la proliferación y diferenciación del epitelio mamario bovino y, por lo tanto para la producción de leche y en el mantenimiento de la lactancia (Lamote et al, 2006). A dichas hormonas se les asocian diversas funciones reproductivas. Sin embargo, también juegan un papel importante en patologías como el cáncer, enfermedades autoinmunes y en procesos infecciosos, donde la respuesta inmune innata (RII) se ve modificada (Nadkarni y McArthur, 2013). En las vacas lecheras, durante el parto, se observa una mayor susceptibilidad a presentar alteraciones inflamatorias en la glándula mamaria y el útero. La mastitis bovina (MB) subclínica es una de estas afecciones, la cual se asocia principalmente al desbalance de la RII, lo cual puede estar dado por cambios drásticos en las hormonas sexuales y lactogénicas, durante las etapas mencionadas (Lamote et al, 2006).

Para que los estrógenos lleven a cabo sus funciones es necesario su reconocimiento intracelular mediante los receptores de estrógenos (RE). Estos receptores nucleares pueden encontrarse en forma de dímeros o heterodímeros (RE α y RE β), y están encargados de la transcripción o modulación de diversos genes asociados a la RII y al desarrollo (Connor et al, 2007). De igual manera, la PRL tiene su receptor específico (RPRL) en las células del epitelio mamario bovino (CEMB), donde se expresa y participa en la regulación de genes asociados al crecimiento de la glándula mamaria, como en la modulación de la RII de dicho tejido (Connor et al, 2007). El epitelio mamario bovino (EMB) sirve como barrera contra diversos microorganismos; sin embargo, *Staphylococcus aureus* es el principal agente causal de la MB subclínica (Kerro-Dego, 2002). Una de las principales causas de lo anterior es la capacidad de *S. aureus* a persistir en el interior de las CEMB, debido a su estrategia de internalización. La endocitosis ocurre por el mecanismo de internalización tipo zipper, el cual involucra a las proteínas de unión a fibronectina de la bacteria, a la fibronectina (presente en la matriz extracelular), y a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ (en la membrana de las CEMB). Este puente molecular activa la vía de señalización dependiente de la cinasa de adhesión focal (FAK), que induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la posterior formación del endosoma, lo que se ha asociado a infecciones crónicas y persistentes (Alva-Murillo et al, 2014; Medina-Estrada et al, 2015).

Por otro lado, las CEMB expresan en su superficie receptores tipo Toll (TLRs), como el TLR2, el cual reconoce al ácido lipoteicoico de *S. aureus*. Tras este reconocimiento se activan diversas cinasas dependientes de la ruta de señalización de TLR2. En el caso de la MB subclínica, se ha observado que *S. aureus* induce una respuesta inflamatoria disminuida en las CEMB, ya que inhibe la activación del factor transcripcional NF- κ B, el cual es un elemento canónico de la respuesta inflamatoria y, en consecuencia, modula la expresión y secreción de diversos componentes de la RII, como péptidos antimicrobianos, óxido nítrico, citocinas pro y antiinflamatorias y quimiocinas (Rainard y Riollot, 2006; Schukken et al, 2011). Adicionalmente, la proteína cinasa B (PKB), o también conocida como AKT, forma parte de la respuesta inflamatoria mediada por la ruta PI3K/AKT dependiente de TLR2. Se ha observado que esta ruta induce la activación del factor transcripcional AP-1, el cual se considera una ruta alterna a NF- κ B. AP-1 está asociado a la expresión de genes de la RII como TNF- α , IL-1 β , etc. Y se ha observado que *S. aureus* vía TLRs puede activar este factor transcripcional (Yung-Cheng et al, 2017).

El papel inmunomodulador de hormonas como el E2 en modelos epiteliales (vaginal, uterino, etc.) está ampliamente descrito y se ha observado que induce una respuesta antiinflamatoria ante un agente estresor, además de favorecer la expresión de péptidos antimicrobianos (Fahey and Wira, 2002). Para el caso de la PRL, se ha visto que ésta favorece la respuesta inflamatoria, al inducir la expresión de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e interleucinas (Estrada-Chavéz et al, 2014). Pero en las CEMB no ha sido estudiado a fondo el efecto dual de dichas hormonas, las cuales se encuentran presentes en el tejido mamario, en condiciones fisiológicas. Recientemente en nuestro grupo de trabajo se demostró que el E2 disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB, al disminuir la respuesta inflamatoria e inducir la expresión de péptidos antimicrobianos. Además, se encontró que esta hormona regula esta respuesta inmune a través de la ruta de señalización TLR2/Akt/AP-1, donde la cinasa FAK está regulando el tráfico de integrinas, todo lo anterior se ve reflejado en la disminución de la internalización de *S. aureus* (Medina-Estrada et al 2016). Por otra parte, la PRL favorece la internalización de *S. aureus*, al modular la abundancia en membrana de los receptores de superficie TLR2 e integrina $\alpha 5\beta 1$, y en conjunto con la bacteria regulan positivamente elementos de la RII, que van desde citocinas, receptores de superficie y factores transcripcionales (Medina-Estrada et al 2015). Sin embargo, el efecto conjunto de estas hormonas no ha sido probado en este modelo de interacción patógeno-hospedero. A pesar de que existe una íntima relación entre los efectos hormonales y las infecciones bacterianas. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la mezcla hormonal (a concentraciones previamente reportadas) sobre la internalización de *S. aureus* en CEMB y sus implicaciones sobre la RII.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos y cepas

Se utilizó la hormona 17β -Estradiol de Sigma disuelta en 1% de etanol a una concentración de 50 pg/ml. La hormona bovina PRL (5 ng/ml) (lote AFP7170E) fue obtenida de A. F. Parlow (NHPP, NIDDK, Torrance, CA, USA), la cual se disolvió en agua.

Para el presente estudio se utilizó una cepa certificada de *S. aureus* subsp *aureus* (ATCC 27543) proveniente de un caso de mastitis bovina clínica, con la capacidad de internalizarse en CEMB (Ochoa Zarzosa et al, 2009). 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. Para los experimentos

se ajustó el cultivo bacteriano a una D.O. (600 nm) de 0.2, la cual equivale a 9.2×10^7 UFC/ml.

2.2 Cultivo celular

Se utilizó un cultivo primario de CEMB (pasajes 2-8) obtenido de tejido alveolar de la ubre de una vaca en estado lactante y libre de mastitis bovina. Se aisló y cultivó como se ha descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (Anaya-López et al, 2006). Se cultivaron en cajas Petri (Costar-Corning), con medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12K, Sigma), suplementado con 10% de suero de ternera (Equitech-Bio), 1% de penicilina-estreptomicina (400 U/ml, GIBCO), 10 μ g/ml insulina, 10 μ g/ml hidrocortisona (Sigma), 250 ng/ml de anfotericina B (Invitrogen), ajustado a un pH de 7.4. Las células se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C.

2.3 Viabilidad de CEMB y crecimiento de *S. aureus*

Para determinar el efecto de la mezcla hormonal en la viabilidad de las CEMB, las células se crecieron en placas de 96 pozos (Costar-Corning). Se sembraron 10,000 células/pozo y se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos, 24 h antes de adicionar la mezcla hormonal (24 h) a las concentraciones en las que se observó el efecto en la internalización y en la inmunomodulación de cada hormona (E2, 50 pg/ml y PRL, 5ng/ml) (Medina-Estrada et al, 2014; Medina-Estrada et al, 2016), a 37°C. Posteriormente se agregaron 10 μ l de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT Sigma, 5mg/ml) a cada pozo, y se incubó durante 4 h, a 37°C. Finalmente, se agregaron 100 μ l de ácido isopropanol (95% de isopropanol y 1 N de HCl) para disolver los cristales de formazan. La lectura se realizó en un espectrofotómetro lector de micro-placas (BIO-RAD) a una longitud de onda de 595 nm. Además, la viabilidad de las CEMB se analizó mediante el ensayo de exclusión de azul tripano, iniciando con la metodología descrita. Al final se agregó azul tripano 1:1 y se contaron las células vivas y muertas, en un contador automático de células (BIO-RAD, TC20).

Para analizar el crecimiento de las bacterias con la mezcla hormonal, se creció *S. aureus* (9.2×10^7 UFC/ml) en medio LB, a 37°C. La suspensión bacteriana se trató con la mezcla hormonal y se dejó incubando durante 24 h, a 37°C, en agitación. Pasado el tiempo, se realizó una dilución 1:100,000 para plaquar el cultivo bacteriano previamente expuesto ante la mezcla hormonal, en cajas con agar LB y dejar incubando a 37°C, durante 16-18 h.

Posteriormente se realizó el conteo de UFC, mediante un contador de colonias (Interscience, Scan®500). Asimismo, se realizó un ensayo de viabilidad bacteriana, mediante la misma metodología mencionada anteriormente y utilizando un kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (L7012, Invitrogen). Las bacterias tratadas con la mezcla hormonal fueron incubadas con 1000 µl del kit (1.5 µl de SYTO9, 1.5 µl de IP y 997 µl de PBS frío), durante 15 min, a temperatura ambiente y a resguardo de la luz. Posteriormente, la muestra se leyó en el citómetro Accuri C6 (BD-Bioscience), colectando 10,000 eventos, a una velocidad de flujo lento.

2.4 Ensayos de protección con gentamicina

Para llevar a cabo estos ensayos, se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning), con monocapas confluentes de CEMB, compuestas por aproximadamente 200,000 células/pozo. Las células se trataron 24 h con la mezcla hormonal (E2 50 pg/ml y PRL 5 ng/ml), en medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos. Posteriormente se infectaron durante 2 h a 37°C con la cepa de *S. aureus*, a una multiplicidad de infección de 30:1. Pasado el tiempo de infección, y para eliminar las bacterias que no lograron internalizarse, se les adicionó gentamicina (80 µg/ml) durante 1 h, a 37°C. Las CEMB se lavaron 3 veces con PBS, se despegaron con tripsina-EDTA (Sigma) y se lisaron en 200 µl de agua destilada estéril, para liberar las bacterias endocitadas. Los lisados se vertieron en cajas Petri de 100 mm con medio sólido LB y se incubaron 16-18 h, a 37°C. Pasado el tiempo se determinó el número de unidades formadoras de colonias, mediante un contador automático (Interscience, Scan®500), para establecer la relación de UFC/CEMB.

2.5 Abundancia de integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la membrana plasmática de 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 (80,000 células/pozo). Se agregó medio DMEM/F12K sin suero y sin antibióticos 24 h antes de adicionar la mezcla hormonal (24 h). Se llevó a cabo el ensayo de protección con gentamicina como se describió anteriormente. Se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se despegaron con 0.05% de tripsina-EDTA (Gibco). Se recuperaron las células por centrifugación (10 min/600 g), a 4°C. La pastilla se lavó 2 veces con PBS frío para luego recuperar las células por centrifugación (2 min/600 g), a 4°C, sin resuspender. Posteriormente, se adicionó suero de cabra al 5% en PBS (para bloquear las uniones inespecíficas) y se resuspendió, se incubó 30 min en hielo. Se recuperó la pastilla centrifugando y se incubó con el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$

MAB2514 (10 $\mu\text{g/ml}$) por 2 h, a 4°C, en agitación. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células en PBS frío, con centrifugación, y se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína (1:50 en PBS), para dejar incubando durante 1 h en agitación en hielo y cubierto de la luz. Finalmente se lavaron las células con PBS frío y se recuperó la pastilla mediante centrifugación, para adicionarles 100 ml de PBS. Posteriormente fueron analizadas en un citometro de flujo Accuri C6, colectando 10,000 eventos por condición, a una velocidad de flujo medio.

2.6 Determinación de la activación de las MAPK cinasas

Para evaluar la concentración de las MAPK cinasas fosforiladas (activas), se usó un Flex Set Cytometric Bead Array (Becton Dickinson), en el cual, a partir de extractos de proteínas citoplasmáticas (30 mg), se incubaron con un anticuerpo específico para cada cinasa de interés. Posteriormente, se adicionó una segunda esfera la cual está acoplada a un fluorocromo, el cual emitirá la señal. El protocolo fue montado en base a lo recomendado por el proveedor. El análisis de las muestras se realizó en el citometro de flujo Accuri C6 y posteriormente estos datos se exportaron a un programa de análisis (FCAP 3.1), para su cuantificación en base a la curva estándar.

2.7 Oligonucleótidos para qPCR

Para medir la expresión de genes de la RII y de los receptores involucrados en el fenómeno, se diseñaron oligos específicos mediante el programa DNASTAR-Lasergene-PrimerSelect. Los primers usados se muestran en la Tabla 1. La extracción de ARN y posterior síntesis de ADNc, se realizó como se ha descrito previamente (Alva-Murillo et al, 2014). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo StepOne Plus, mediante el método $\Delta\Delta\text{CT}$, con SyberGreen.

2.8 Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes, por triplicado, y se compararon mediante un análisis de varianza y la prueba t de Student, así como una prueba de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados

3.1 La mezcla hormonal no afecta la viabilidad de las CEMB ni de *S. aureus*

Para descartar algún posible efecto citotóxico sobre las CEMB con la mezcla hormonal (PRL 5 ng/ml y E2 50 pg/ml), se realizaron ensayos de reducción de MTT y de exclusión de azul tripano (Fig. 1A y B). No se observaron cambios significativos sobre la viabilidad celular hasta las 24 h de tratamiento con la mezcla hormonal, en comparación con las CEMB sin tratamiento. De igual manera se evaluó la viabilidad de la bacteria, mediante conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) y mediante un kit de viabilidad bacteriana, por citometría de flujo (Fig. 1C y D). Tampoco se observaron alteraciones en la viabilidad bacteriana con la mezcla hormonal.

3.2 Efecto de las hormonas sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB

En estudios previos se había evaluado los efectos sobre la internalización de *S. aureus* en CEMB con las hormonas por separado, donde la PRL induce la internalización (5 veces) y el E2 la inhibe (50%). Sin embargo, se desconoce el efecto de la mezcla. Mediante ensayos de protección con gentamicina se probó el efecto de la mezcla hormonal en la invasión bacteriana. Se observó que la mezcla inhibió (Fig. 2) hasta en un 40% la internalización de *S. aureus* en las CEMB, dato que indica el aparente efecto predominante del E2 sobre la PRL.

3.3 La mezcla hormonal disminuye la abundancia de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en las CEMB

Previamente se había demostrado que en las CEMB infectadas con *S. aureus*, la integrina disminuye su abundancia (60%), debido a que se internaliza mediante el mecanismo tipo zipper, junto con la bacteria. Interesantemente, la mezcla hormonal disminuyó aún más la abundancia del receptor (Fig. 3), con y sin la infección, 80 y 70%, respectivamente. Esto coincide con lo reportado por nuestro grupo de investigación, donde se encontró que las hormonas por separado regulan el tráfico de integrinas y por consecuencia su abundancia en la membrana plasmática.

3.4 Regulación de rutas de señalización en las CEMB tratadas con la mezcla hormonal

Mediante citometría de flujo, utilizando un sistema Set Flex, se analizó la actividad de las MAPK cinasas: JNK, ERK y p38 (Fig. 4A). De igual manera, se analizó la activación de la cinasa Akt. Se observó que la mezcla hormonal inhibió la fosforilación de ERK y p38, con

respecto al control sin tratamiento. Anteriormente, se había observado que E2 inhibe a las MAPK cinasas, las cuales están asociadas a la activación de los TLR2. Sin embargo, la mezcla hormonal favoreció aún más este efecto. La cinasa Akt no sufrió modificaciones en su estado de activación con la mezcla hormonal (Fig. 4B).

3.5 Modulación de la RII en CEMB tratadas con la mezcla hormonal

Para determinar la expresión y secreción de elementos de la RII, se realizaron qPCR (Fig. 5A y B) y ensayos de ELISA (Fig. 6). Los resultados indican que la expresión de citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α fue inducida en presencia de la mezcla (4 y 12 veces, respectivamente). La expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) se incrementó con la mezcla (10 veces). Respecto a la secreción del péptido antimicrobiano DEFB1, ésta se incrementó en presencia de la mezcla y la bacteria (2 veces). Estos resultados demuestran que la mezcla hormonal está regulando diferencialmente la expresión de elementos de la RII en presencia de la bacteria. La modulación de la expresión de elementos de la RII está viéndose potenciada con la mezcla hormonal, puesto que por separado las hormonas inducen la expresión, pero en menor proporción.

4. Discusión

Uno de los principales patógenos asociados a la mastitis bovina es *S. aureus*, el cual se ha reportado que tiene la capacidad de internalizarse en células fagocíticas no profesionales, como las CEMB. Las cepas que se internalizan de esta bacteria presentan la ventaja de evadir de manera efectiva la RII del hospedero, además de volver obsoletas las terapias antimicrobianas. Resultado de esta estrategia, *S. aureus* logra persistir, multiplicarse y causar infecciones crónicas y recurrentes, por lo cual cobra gran importancia tanto en la medicina veterinaria y como humana (Aitken et al, 2001).

Se ha reportado que TLR2 presente en las CEMB, es el receptor de superficie que reconoce al ácido lipoteicoico de *S. aureus* y participa en la activación de distintas rutas de señalización de la RII, así mismo *S. aureus* necesita de la integrina $\alpha 5\beta 1$ para lograr internalizarse en las CEMB (Alva-Murillo et al, 2014; Medina-Estrada et al, 2015). Nuestros datos mostraron que la mezcla hormonal de PRL (5 ng/ml) y el E2 (50 pg/ml) inhiben la internalización de *S. aureus* en las CEMB, resultados que concuerdan con una significativa disminución en la abundancia en membrana de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la cual es esencial para

la internalización bacteriana. Esto sugiere que la mezcla modifica el tráfico de integrinas y como consecuencia la disponibilidad de éstas se ve disminuida, afectando la interacción de estos receptores con la bacteria. Dicho fenómeno podría asociarse a una menor invasión o una mejor defensa del hospedero.

El análisis de los genes asociados a la respuesta inmune indicó que la mezcla hormonal favoreció la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, las cuales pueden participar en la resolución de la infección, además los péptidos antimicrobianos TAP y BNDB10 se vieron incrementados en su expresión génica. Estos elementos pueden favorecer la respuesta del hospedero, aunado al incremento en la secreción de la DEFB1 al medio extracelular, que puede contribuir a la eliminación de la bacteria. Los efectos conjuntos de la PRL y el E2, sobre la regulación de la RII en CEMB infectadas con *S. aureus*, no se había abordado con anterioridad. Sin embargo, es necesario explorar otros elementos de las rutas de señalización en las que estas hormonas puedan estar participando con la finalidad elucidar todos los mecanismos involucrados en esta interacción patógeno-hospedero, mediada por hormonas. En este sentido la mezcla hormonal también está regulando algunas de las MAPK cinasas asociadas a la vía dependiente de TLR2; donde p38 y ERK se vieron inhibidas en su actividad. Lo anterior podría explicar la baja expresión de algunos genes de la RII (citocinas pro inflamatorias, principalmente).

Cabe resaltar que las concentraciones hormonales son fisiológicas, además de que en un sistema *in vivo* están involucradas otras hormonas, las cuales también deben estar afectando la RII de la glándula mamaria bovina y por consecuencia, participando en los procesos de interacción patógeno-hospedero. Por lo cual una de las perspectivas, será evaluar varias hormonas a la vez en un sistema *in vitro*. Otro aspecto relevante, sería evaluar las concentraciones hormonales en suero y leche, de las vacas con y sin mastitis causada por *S. aureus*, para tratar de identificar indicadores o marcas asociadas, ya sea a las concentraciones hormonales o a la infección.

5. Conclusión

Los resultados en el presente trabajo indican que las hormonas E2 y PRL, en conjunto, modulan la RII de las CEMB, favoreciendo la respuesta ante la infección causada por *S. aureus*, el efecto sobre la RII de las CEMB se ve potenciado respecto al efecto individual de las hormonas.

6. Referencias

Adamson, A.D., "Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor-alpha signaling". *Endocrinology*, 2008. 149(2): 687-94.

Arnal JF, Fontaine C, Billon-Galés A, Favre J, Laurell H, Lenfant F, and Gourdy P. "Estrogen receptors and endothelium", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30:1506-1512.

Beagley KW, and Gockel CM. "Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003. 38:13-22.

Best GK, Abney TO, Kling JM, Kirkland JJ, and Scott DF. "Hormonal influence on experimental infections by toxic shock strain of *Staphylococcus aureus*", *Infect. Immun*, 1986. 51(1):331.

Connor EE, Meyer MJ, Li RW, Van Amburgh ME, Boisclair YR, and Capuco AV. "Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids", *J Dairy Sci*. 2007. 90:55-65.

Johnson AD, and Ulberg LC. "Some physiological manifestations in the bovine estrous cycle during control with exogenous hormones" *Journal of Animal Science*, 2014. 24:403-408.

Fahey JV, Rossoli RM, and Wira CR. "Sex hormone regulation of anti-bacterial activity in rat uterine secretions and apical release of anti-bacterial factor(s) by uterine epithelial cells in culture", *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004. 93:59-66.

Gursoy M, Gursoy UK, Liukkonen A, Kauko T, Penkkala S, Konomi E. "Salivary antimicrobial defensins in pregnancy". *J Clin Periodontol*. 2016, 43: 807-815.

Gutiérrez-Barroso A, Anaya-López J, Lara-Zarate L, Loeza-Gúzman P, López-Meza J, and Ochoa-Zarzosa A. "Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells". *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 121:113-122.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, and Gustafsson JA. "Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets", *Physiol Rev*. 2007. 87:905-931.

Hu X, Chen J, Wang L, and Ivanshiv LB. "Crosstalk among Jak-STAT, toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation", *Journal of Leukocyte Biology*, 2007. 82

Kerro Dego O, van Dijk JE, y Nederbragt H, "Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion", A review. *Vet Q*, 2002. 24:181-198.

Lara-Zarate, L., López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, "*Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells". *Microbial pathogenesis*, 2001. 51(5):113-8.

Lien, E. "Toll-Like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products". *The journal of biological chemistry*, 1990. 274(47): 419-25.

Medina-Estrada I, Alva-Murillo N, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, "Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization", *Microb Pathog*, 2015. 89:43-53.

Medina-Estrada I, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A. "Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization", *Mediators of inflammation*. 2016. 2016.

Rainard P, and Riollot C, "Innate immunity of the bovine mammary gland", *Vet Res*, 2006. 37:369-400.

Rasmussen SB, Reinert LS, and Paludan SR. "Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense", *Journal Complilation*, 2009. 117:323-337.

Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, and Avila PC. "Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses", *J. Allergy Clin Immunol*. 2007. 120(6):1279-1284.

Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, and Seyfert HM, "Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows", *Vet Immunol Immunopathol*, 2011. 144:270-289.

Sinha B, and Herman M. "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectins binding to integrin alpha5beta1". Cellular microbiology, 1999. 1(2):101-17.

Tomasinsig L, De Conti G, Skerlavaj B, Piccinini R, Mazzilli M, D'Este F, Tossi A, and Zanetti M. "Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis", Infection and Immunity, 2010. 78(4):1781-1788.

Vom Steeg LG, and Klein SL. "Sex steroids mediate bidirectional interactions between host and microbes", Hormones and Behavior, 2017. 88:45-51.

Yuan L, Jian-Yun L, Su-Ting C, Hai-Rong H, and Hong C. "The rLrp of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits proinflammatory cytokine production and down regulates APC function in mouse macrophages via a TLR2-mediated PI3K/Akt pathway activation-dependent mechanism". Cell Mol Immunol. 2016, 13(6):729-746.

Yunhe F, Ershun Z, Zhicheng L, Fenyang L, Dejie L, Bo L, Xiaojing S, Fuyi Z, Xiaosheng F, Depeng L, Yongguo C, Xichen Z, Naisheng Z, and Zhengtao Y. "*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells", Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013. 155:245-252.

7. Leyendas de las figuras

Fig. 1. Viabilidad de las CEMB y de *S. aureus* con la mezcla hormonal. Las CEMB fueron tratadas con el E2 (50 pg/ml) y la PRL (5 ng/ml) durante 24 h, para posteriormente evaluar la viabilidad mediante ensayos de MTT (A) y azul tripano (B). La bacteria fue tratada con la mezcla hormonal a diferentes tiempos, y posteriormente se determinó su viabilidad, mediante conteo de UFC (C) y citometría de flujo (D). Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes, por triplicado ($p < 0.05$).

Fig. 2. La mezcla hormonal disminuye la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Las CEMB fueron tratadas con la mezcla hormonal durante 24 h y posteriormente infectadas con *S. aureus* durante 2 h, con una multiplicidad de infección de 30:1. Los datos muestran el porcentaje de UFC recuperadas, después de lisar las CEMB. Los valores fueron determinados considerando como el 100% de internalización a las CEMB sin tratamiento. Cada barra muestra el promedio de tres experimentos independientes, por triplicado. El “*” indica cambios significativos, con respecto al control sin tratamiento ($P < 0.05$).

Fig. 3. Papel de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB tratadas con la mezcla hormonal. La abundancia en membrana de la integrina se muestra en unidades relativas de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se estimó en 10,000 eventos analizados para cada condición. Las CEMB fueron recuperadas posterior a sus respectivos tratamientos e incubadas con el anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína, para ser analizado por citometría de flujo. Letras diferentes indican cambios significativos entre las distintas condiciones ($P < 0.05$).

Fig. 4. Participación de las rutas de señalización MAPKs y Akt en las CEMB tratadas con E2 y PRL. Las CEMB fueron tratadas con la mezcla hormonal 24 h y/o infectadas con *S. aureus*. Utilizando un sistema flex set para citometría de flujo se detectaron las MAPK cinasas fosforiladas (A), y para determinar la actividad de Akt se utilizó un anticuerpo acoplado a PE (anti-fosfo-Akt) (B). Para el caso de las MAPKs se muestra la cuantificación de las proteínas mediante el software de análisis FCAP 3.1 y para la cinasa Akt se muestran las unidades relativas de fluorescencia obtenidas con el citómetro Accuri C6. Se colectaron

10,000 eventos, a una velocidad de flujo lento. Las letras indican cambios significativos ($P < 0.05$) entre las distintas condiciones experimentales.

Fig. 5. Expresión de elementos de la RII en las CEMB tratadas con la mezcla hormonal.

Mediante PCR en tiempo real se determinó la expresión relativa de genes de citocinas pro y anti-inflamatorias (A), así como de péptidos antimicrobianos (B). Las CEMB fueron tratadas durante 24 h con la mezcla hormonal y/o infectadas con *S. aureus* durante 2 h. Los datos representan la comparación entre la expresión del gen de interés y el gen endógeno GAPDH (Mediante el método $\Delta\Delta CT$). Cada barra muestra el resultado de 3 experimentos independientes, por triplicado. Los cambios en la expresión del gen, mayores a 2 o menores a 0.5, son considerados como cambios significativos en la expresión del gen.

Fig. 6. Secreción del péptido DEFB1 en las CEMB tratadas con E2 y PRL.

La concentración de la DEFB1 en el medio condicionado de las CEMB tratadas con la mezcla hormonal y/o infectadas con *S. aureus*, se determinó por ensayo de ELISA. El “*” indica cambios significativos con respecto al control de CEMB sin tratamiento y sin infección ($P < 0.05$).

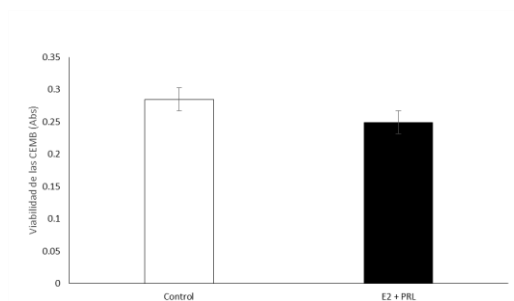
Tabla 1. Oligos para la evaluación de la expresión génica de los distintos elementos de la RII

Gen (bovino)	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento (pb)	T (°C)	Referencia
TAP	D R	GCGCTCCTCTTCCTGGTCCTG GCACGTTCTGACTGGGCATTGA	216	57	Tellez-Pérez et al, 2012
LAP	D R	GCCAGCATGAGGCTCCATC CTCCTGCAGCATTTTACTTGGGCT	194	54	Tellez-Pérez et al, 2012
BNBD5	D R	GCCAGCTGAGGCTCCATC TTGCCAGGGCACGAGATCG	143	55	Tellez-Pérez et al, 2012
BNBD10	D R	GCTCCATCACCTGCTCCTC AGGTGCCAATCTGTCTCATGA	152	54	Tellez-Pérez et al, 2012
DEFB1	D R	CCATCACCTGCTCCTCACA ACCTCCACCTGCAGCATT	185	54	Tellez-Pérez et al, 2012
S100A7	D R	GCAGCTCTCAGCTTGAGCAG CCAGCAAGGACAGGAAGCTCAG	221	54	Tellez-Pérez et al, 2012
IL-1 β	D R	GCAGAAGGGAAGGGAAGAATGTAG CAGGCTGGCTTTGAGTGAGTAGAA	198	52	Alva-Murillo et al, 2014
IL-6	D R	AACCACTCCAGCCACAAACACT GAATGCCCAGGAAGTACCACAA	179	57	Alva-Murillo et al, 2014
TNF- α	D R	CCCCTGGAGATAACCTCCCA CAGACGGGAGACAGGAGAGC	101	56	Alva-Murillo et al, 2014
IL-8	D R	TTCCACACCTTTCCACCCCAA GCACAACCTTCTGCACCCACTT	149	53.5	Alva-Murillo et al, 2014
IL-10	D R	GATGCGAGCACCTGTCTGA GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT	129	59	Alva-Murillo et al, 2014
GAPDH	D R	TCAACGGGAAGCTCACTGG CCCCAGCATCGAAGGTAGA	237	57	Alva-Murillo et al, 2014

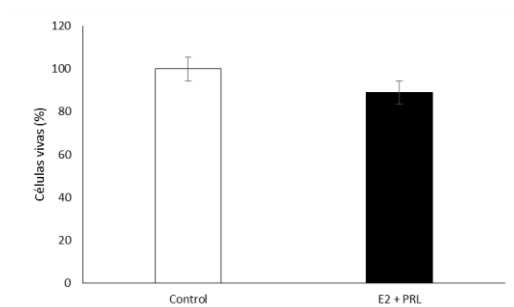
TAP: Tracheal Antimicrobial Peptide; LAP: Lingual Antimicrobial Peptide; DEFB1: Defensin Beta 1; BNBD5: Bovine Neutrophil Beta Defensin 5; BNBD10: Bovine Neutrophil Beta Defensin 10; S100A7: S100 Calcium-binding protein A7; TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ; IL-1 β : Interleukin 1- β ; IL-6: Interleukin-6; IL-8: Interleukin-8; IL-10: Interleukin-10; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Fig. 1.

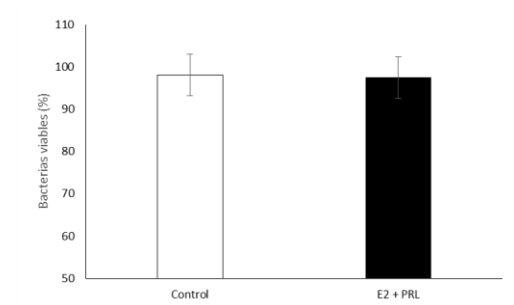
A



B



C



D

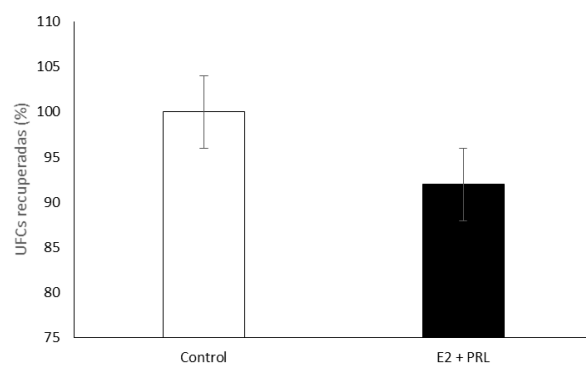


Fig. 2.

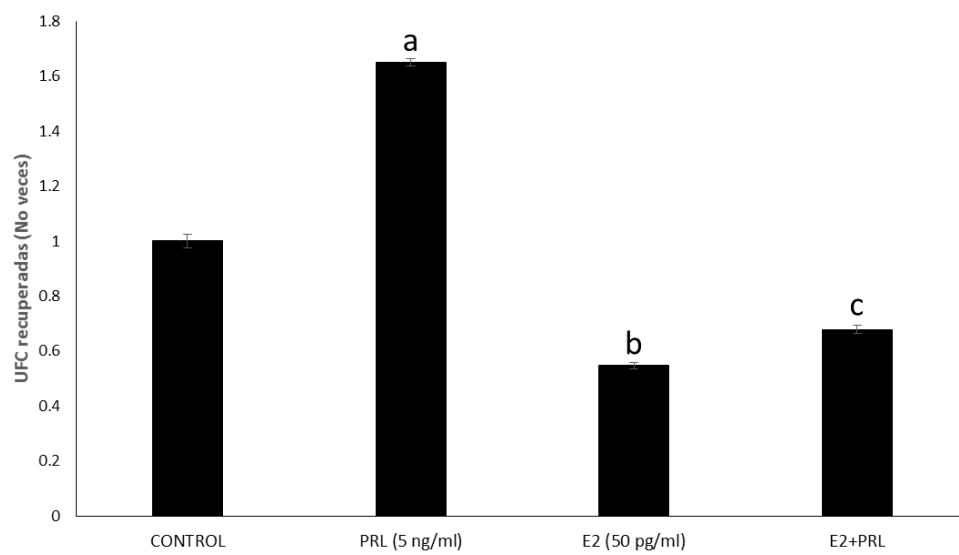


Fig. 3.

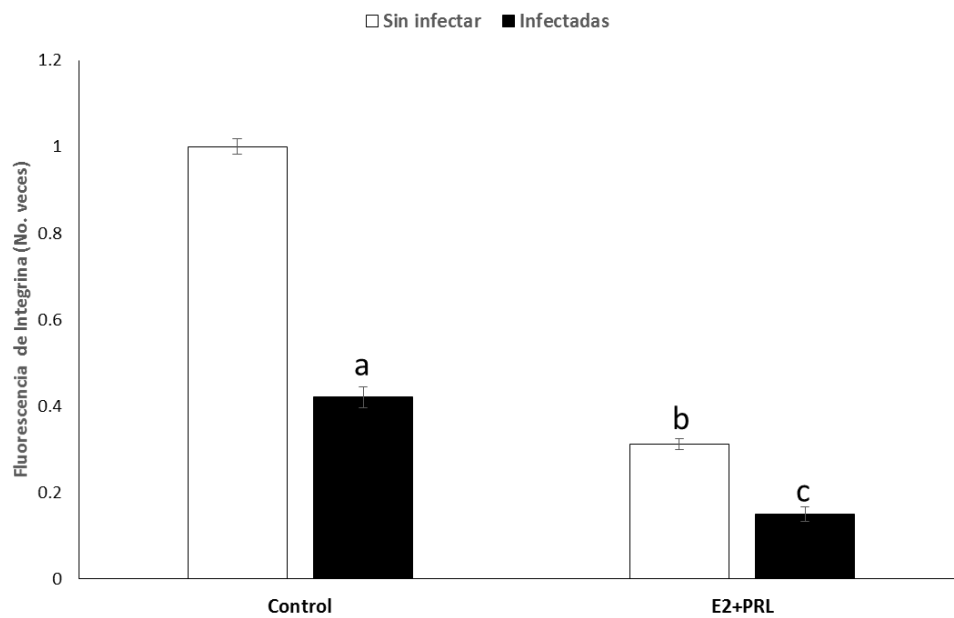
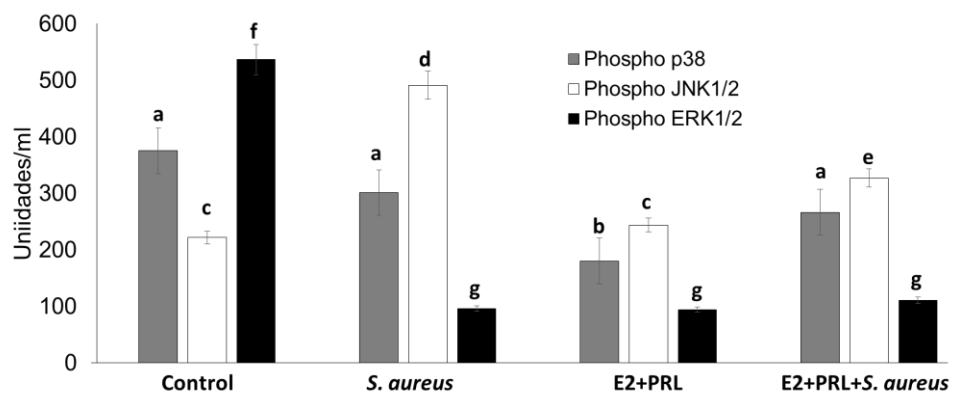


Fig. 4

A



B

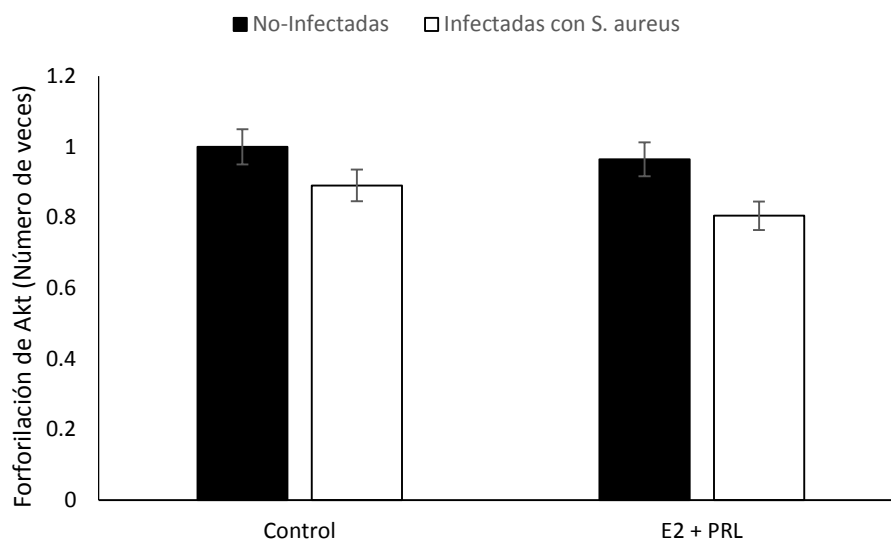
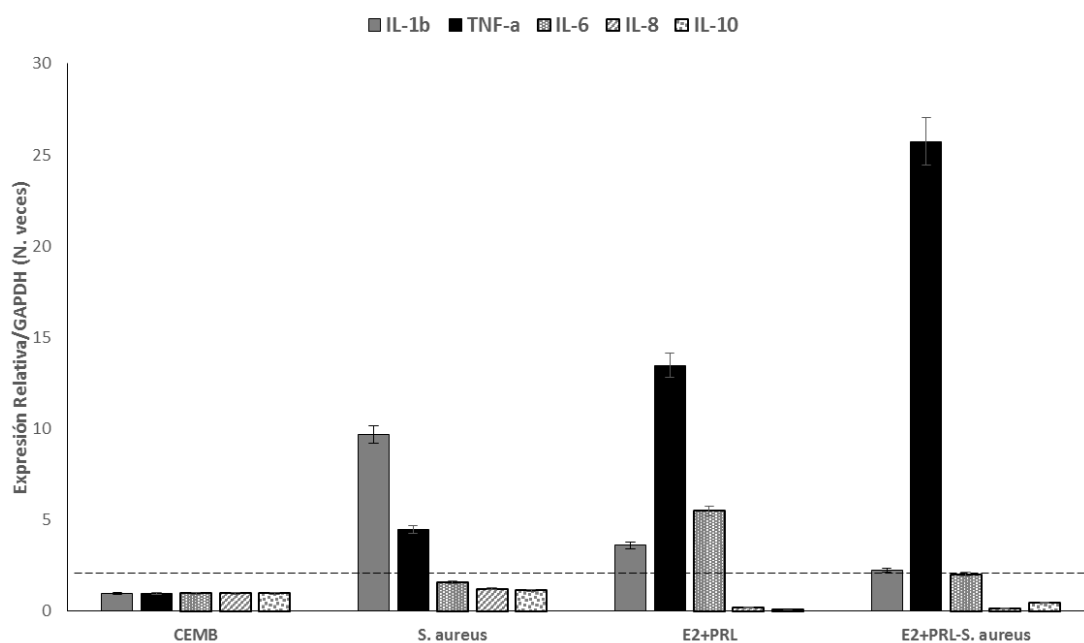


Fig. 5

A



B

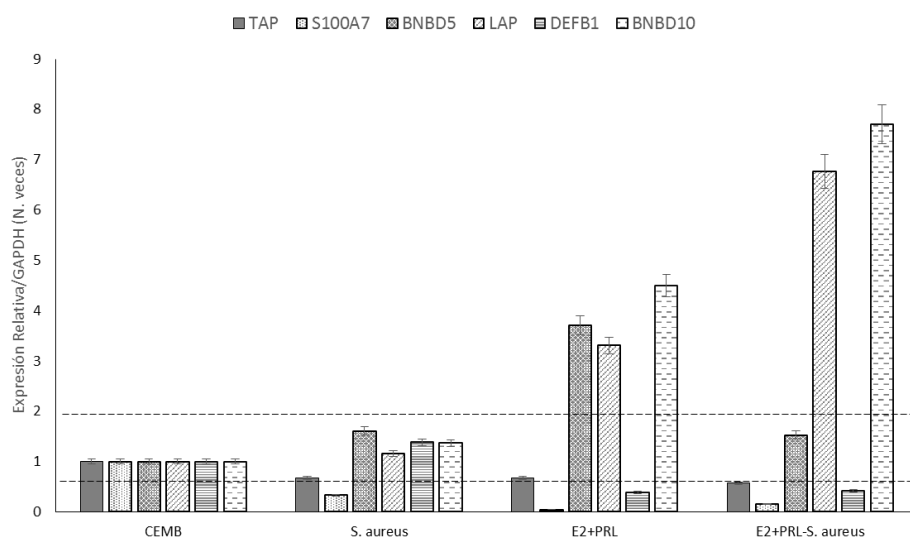
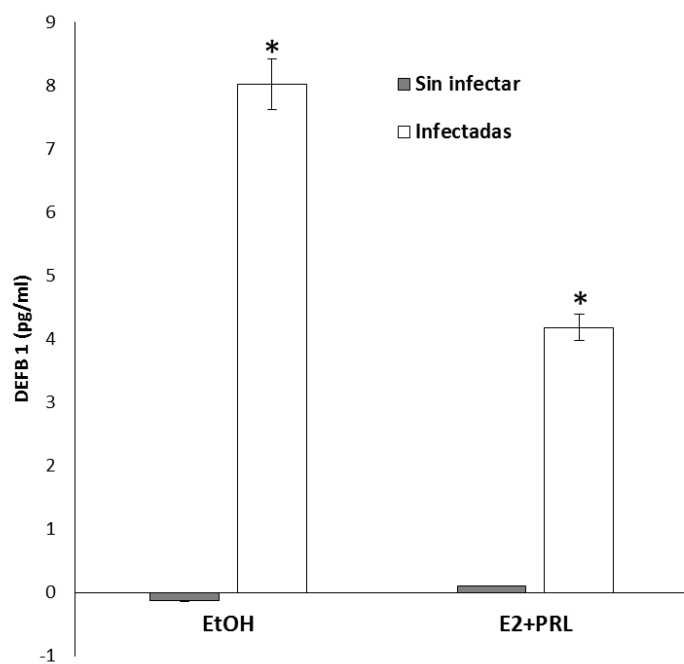


Fig. 6.



11 BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

Adamson, A.D., "Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor-alpha signaling". *Endocrinology*, 2008. 149(2): 687-94.

Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, and Fazeli A. "Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium", *Human Reproduction*, 2007. 22(2):586-593.

Aitken, S.L., C.M. Corl, and L.M. Sordillo, "Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution". *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2001. 16(4):291-304

Alanko J, and Ivaska J. "Endosomes: Emerging platforms for integrin-mediated FAK signaling", *Trends in Cell Biology*, 2016. 26(6):91-398.

Alanko J, Mai A, Jacquemet G, Schauer K, Kaukonen R, Saari M, Goud B, Ivaska J. "Integrin endosomal signaling suppresses anoikis", *Nat Cell Biol*, 2015. 17(11):1412-21

Alva-Murillo N, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, "Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization", *Biomed Res Int*, 2014.

Alva-Murillo N. "Análisis de las rutas de señalización involucradas en la internalización de *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas regulada por ácidos grasos", Tesis de doctorado, 2016.

Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ, y Ochoa-Zarzosa A, "Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis", *Res Vet Sci*, 2006. 81:358-361.

Arnal JF, Fontaine C, Billon-Galés A, Favre J, Laurell H, Lenfant F, and Gourdy P. "Estrogen receptors and endothelium", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30:1506-1512.

Beagley KW, and Gockel CM. "Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003. 38:13-22.

Best GK, Abney TO, Kling JM, Kirkland JJ, and Scott DF. "Hormonal influence on experimental infections by toxic shock strain of *Staphylococcus aureus*", *Infect. Immun*, 1986. 51(1):331.

Caswell P and Norman J. "Integrin trafficking and the control of cell migration". *Traffic*, 2006, 7:14-21.

Cervellati F, Valacchi G, Lunghi L, Fabbri E, Valbonesi P, Marci R, Biondi C, and Vesce F. "17- β -estradiol counteracts the effects of high frequency electromagnetic fields on trophoblastic connexins and integrins", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. 2013.

Chang YL, Hsu YK, Wu TF, Huang CM, Liou YL, Chiu YW, Hsiao YH, Luo FJ and Yuan TC. "Regulation of estrogen receptor a function in oral squamous cell carcinoma cells by FAK signaling", 2014. 21(4): 555-565.

Connor EE, Meyer MJ, Li RW, Van Amburgh ME, Boisclair YR, and Capuco AV. "Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids", *J Dairy Sci.* 2007. 90:55-65.

Connor EE, Wood DI, and Sonstegard TS. "Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland," *Journal of Endocrinology*, 2005. 185 (3):593–603.

Garza-Velasco R, Zúñiga-Rangle O, and Perea-Mejía LM. "Current perspective on clinical significance of *Staphylococcus aureus* in the hospital environment", *Educ. Quim*, 2013. 24(1).

Johnson AD, and Ulberg LC. "Some physiological manifestations in the bovine estrous cycle during control with exogenous hormones", *Journal of Animal Science*, 2014. 24:403-408.

Fahey JV, Wright JA, and Shen L. "Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture", *Mucosal Immunology*, 2008. 1(4):317–325.

Fahey JV, Rossoll RM, and Wira CR. "Sex hormone regulation of anti-bacterial activity in rat uterine secretions and apical release of anti-bacterial factor(s) by uterine epithelial cells in culture", *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2004. 93:59-66.

Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weldner W, Klug J, Bergmann M. "Expression pattern of estrogen receptor α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis". *Histochem Cell Biol.* 2014. 142 (4):421-432.

Frank A, Brown LM, and Clegg DJ. "The role of hypothalamic estrogen receptor in metabolic regulation. Front Neuroendocrinol, 2014. 35(4):550-557.

Garcia-Gómez E, González-Pedrajo B, and Camacho-Arroyo I, "Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions," BioMed Research International, 2013. 2013.

Gilad LA, Bresler T, Gnainsky J, Smirnoff P, and Schwartz B. "Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells", Journal of Endocrinology, 2005. 185:577-592.

Gosselin D, and Rivest S. "Estrogen receptor transrepresses brain inflammation" Cell Leading Edge Previews, 2011. 145: 495-497.

Gursoy M, Gursoy UK, Liukkonen A, Kauko T, Penkkala S, Kononen E. "Salivary antimicrobial defensins in pregnancy". J Clin Periodontol. 2016, 43: 807-815.

Gutiérrez-Barroso A, Anaya-López J, Lara-Zarate L, Loeza-Gúzman P, López-Meza J, and Ochoa-Zarzosa A. "Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells". Vet Immunol Immunopathol, 2007, 121:113-122.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, and Gustafsson JA. "Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets", Physiol Rev. 2007. 87:905-931.

Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Takemura Y, Koga K, Yoshino O, Tajima T, Hasegawa A, Yano T, and Taketani Y. "Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle", Journal of Reproductive Immunology, 2007. 74:53-60.

Hoffmann C, Ohlsen K, and Hauck CR. "Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria", European Journal of Cell Biology, 2011. 90:891-896.

Holst F. "Estrogen receptor alpha gene amplification in breast cancer: 25 years of debate", World Journal of Clinical Oncology. 2016. 7(2):160-173.

Hu X, Chen J, Wang L, and Ivanshiv LB. "Crosstalk among Jak-STAT, toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation", Journal of Leukocyte Biology, 2007. 82

Jinks EM, Smith MF, Atkins JA, Pohler KG, Perry GA, MacNeil MD, Roberts AJ, Waterman RC, Alexander LJ, and Geary TW. "Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows", *Journal of Animal Science*, 2013. 91:1176-1185.

Kayisli UA, Korgun ET, Akkoyunlu G, Arici A, and Demir R. "Expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 4$ and their extracellular ligands fibronectin and laminin in human decidua during early pregnancy and its sex steroid-mediated regulation", *Acta Histochemica*, 2005. 107:173-185.

Kerro Dego O, van Dijk JE, y Nederbragt H, "Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion", A review. *Vet Q*, 2002. 24:181-198.

Kovats S. "Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways", *Cell Immunol*. 2015. 294(2):63.69.

Kumar C. "Signaling by integrin receptor". *Oncogene*, 1998. 17:1365:1373.

Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, and Burvenich C, "Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation", *Vet Res*, 2006. 37:61-74.

Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, and Burvenich C. "Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution", *Steroids*, 2003. 69:145-159.

Lamote I, Demeyere K, Notebaert S, Burvenich C, and Meyer E. "Flow cytometric assessment of estrogen receptor β expression in bovine blood neutrophils", *Journal of Immunological Methods*, 2007. 323:88-92.

Lara-Zarate, L., López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, "*Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells". *Microbial pathogenesis*, 2001. 51(5):113-8.

Li RW, Meyer MJ, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Connor EE, Van Amburgh ME, Boisclair YR, and Capuco AV. "Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of bovine mammary gland by microarray analysis", *Physiol Genomics*, 2006. 27:42-53.

Li X, Li M, and Bai X, "Upregulation of TLR2 expression is induced by estrogen via an estrogen-response element (ERE).

Lien, E. "Toll-Like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products". The journal of biological chemistry, 1990. 274(47): 419-25.

Lüthje P, Hirschberg AL, and Bruner A. "Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract", Maturitas, 2014. 77:32-36.

Medina-Estrada I, Alva-Murillo N, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A, "Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization", Microb Pathog, 2015. 89:43-53.

Medina-Estrada I, López-Meza JE, and Ochoa-Zarzosa A. "Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization", Mediators of inflammation. 2016. 2016.

Meng R, Tang H-Y, Westfall J, London D, Cao JH, Mousa SA, Luidens M, Hebergers A, Davis FB, Davis PJ, and Lin H-Y- "Crosstalk between integrin $\alpha v \beta 3$ and estrogen receptor α is involved in thyroid hormone-induced proliferation in human lung carcinoma cells", Plos one, 2011. 6(11)

Nadkarni S, and McArthur S, "Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity", Curr Opin Pharmacol, 2013. 13: 576-581.

Nishida CR, Everett S, and Ortiz de Montellano PR. "Specificity determinants of CYP1B1 estradiol hydroxylation", Mol Pharmacol, 2013. 84:451-458.

Noriega-Reyes MY, y Langley E. "Correguladores del receptor de estrógenos y sus implicaciones en el cáncer mamario". Cancerología, 2008. 3:29-40.

Prossnitz ER, Arterburn AB, and Sklar LA. "GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen", Mol Cell Endocrinol, 2007. 265 (266):138-142.

Rainard P, and Riollot C, "Innate immunity of the bovine mammary gland", Vet Res, 2006. 37:369-400.

Rasmussen SB, Reinert LS, and Paludan SR. "Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense", Journal Complilation, 2009. 117:323-337.

Saintiier D, Burde MA, Rey JM, Maudelonde T, De Vernejoul MC, and Cohen-Solal ME. "17 β -estradiol downregulates β 3-integrin expression in differentiating and mature human osteoclasts", *Journal of Cellular Physiology*, 2004. 196:269-276.

Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, and Avila PC. "Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses", *J. Allergy Clin Immunol*. 2007. 120(6):1279-1284.

Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, and Seyfert HM, "Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows", *Vet Immunol Immunopathol*, 2011. 144:270-289.

Sisci D, Middea E, Morelli C, Lanzino M, Aquila S, Rizza P, Catalano S, Casaburi I, Maggiolini M, and Andó S. "17 β -estradiol enhances α 5 integrin subunit gene expression through ER α -Sp1 interaction and reduces cell motility and invasion of ER α -positive breast cancer cells", *Breast Cancer*, 2010. 124:63-77.

Simpson E, and Santen RJ. "Celebrating 75 years of Oestradiol", *J of Mol Endocrinol*, 2015. 55:1-20.

Sinha B, and Herman M. "Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectins binding to integrin alpha5beta1", *Cellular microbiology*, 1999. 1(2):101-17.

Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, and Motyl T. "IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway", *European Journal of Cell Biology*, 2009. 88(2): 117–130.

Tomasinsig L, De Conti G, Skerlavaj B, Piccinini R, Mazzilli M, D'Este F, Tossi A, and Zanetti M. "Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis", *Infection and Immunity*, 2010. 78(4):1781-1788.

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

Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Clana P, Chambon P, and Maggi A. "Estrogen receptor- α mediates the brain anti-inflammatory activity of estradiol", *Pharmacology*, 2003. 100 (16).

Villaggio B, Soldano S, and Cutolo M. "1,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages", *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2012. 30.

Vom Steeg LG, and Klein SL. "Sex steroids mediate bidirectional interactions between host and microbes", *Hormones and Behavior*, 2017. 88:45-51.

Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JA, and Katzenellenbogen BS. "Antagonists selective for estrogen receptor α ", *Endocrinology*, 2002. 142(3):941-947.

Sutra L, and Poutrel B. "Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*", *J. Med. Microbiol*, 1994. 40:79-89.

Tasker C, Ding J, Schmolke M, Rivera-Medina A, García-Sastre A, and Chang TL. "17 β -Estradiol protects primary macrophages against HIV infection through induction or interferon-alpha", *Viral Immunology*, 2014. 27(4):140-150.

Tuchscher L, Medina E, Hussain M, Volker W, Heitmann V, Niemann S, Holzinger D, Roth J, Proctor RA, Becker K, Peters G, and Loffer B. "*Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish chronic infections", *EMBO Molecular Medicine*, 2011. 3:129-141.

Uray IP, Liang Y, and Hyder SM. "Estradiol down-regulates CD36 expression in human breast cancer cells", *Cancer Letters*, 2004. 207:101-107.

Vandenberg IN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, and Soto AM, "The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization?" *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006. 101(4-5):263–274.

Weishan F, Decheng Bi, Ruijin Z, Nan C, Hong X, Rui Z, Jun L, Min W, and Xu X. "Identification and activation of TLR4-mediated signaling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages". *Sci Rep*, 2017. 7:1663.

Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, and Ochiel DO. "Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: The role of epithelial cells in

balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens”, *Am J Reprod Immunol*, 2010. 63(6).

Wira CR, Rodríguez-García M, and Patel MV. “The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract”, 2015. 15:218-230.

Yakimchuk K, Jondal M, and Okret S. “Estrogen receptor α and β in the normal immune system and in lymphoid malignancies”, 2013. 375:121-129.

Yart L, Finot L, Lollivier V, and Dessauge F. “Oestradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells in vitro”, *J. Dairy Research*, 2013. 80:113-121.

Yuan L, Jian-Yun L, Su-Ting C, Hai-Rong H, and Hong C. “The rLrp of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits proinflammatory cytokine production and downregulates APC function in mouse macrophages via a TLR2-mediated PI3K/Akt pathway activation-dependent mechanism”. *Cell Mol Immunol*. 2016, 13(6):729-746.

Yunhe F, Ershun Z, Zhicheng L, Fenyang L, Dejie L, Bo L, Xiaojing S, Fuyi Z, Xiaosheng F, Depeng L, Yongguo C, Xichen Z, Naisheng Z, and Zhengtao Y. “*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells”, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013. 155:245-252.

Zhang XT, Ding L, Kang LG, and Wang ZY, “Involvement of ER- α 36, Src, EGFR and STAT5 in the biphasic estrogen signaling of ER-negative breast cancer cells,” *Oncology Reports*, 2012. 27(6):2057–2065.