



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

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

Evaluación de un efecto inmunomodulador conjunto entre el 17β -estradiol y γ -tionina sobre células epiteliales mamarias bovinas durante la infección con *Staphylococcus aureus*

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Biológicas

Área temática: Biotecnología Pecuaria

Presenta:

IBQ. Liliana Aguilar Chávez

Directora:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Co-Director:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Morelia, Michoacán, Agosto 2022

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 dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y la co-dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.1) y CONACyT (CB-2016-287210 y beca 758646).

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a mi asesora la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y al Dr. Joel Edmundo López Meza por sus valiosas aportaciones a este proyecto, así como a mi comité sinodal conformado por el Dr. Rafael Salgado Garciglia, la Dra. Esperanza Meléndez Herrera y el Dr. Ricardo Ivan Medina Estrada.

Gracias a CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Así mismo, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, porque en algún momento cada uno de ellos me apoyo con técnicas nuevas para mí o incluso con palabras de aliento, sin ustedes la culminación de este proyecto no hubiera sido posible. Agradezco por las nuevas amistades que surgieron en el trayecto de mi formación académica.

Por supuesto quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo y por creer en mí, especialmente quiero agradecer a mi esposo, amigo, colega y compañero de vida Israel Carbajal Núñez por siempre apoyarme y por ser una constante en las subidas y bajadas de mi vida, gracias por siempre motivarme, y por todo tu amor, eres una inspiración para mí, te admiro mucho y este logro es de ambos.

Finalmente agradecer a los viejos amigos que han sido una constante en mi vida, aunque estemos lejos, agradezco sus mensajes de apoyo y oír las mismas anécdotas graciosas de siempre cada que nos reunimos. Gracias amigos.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 2 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
2. MARCO TEÓRICO.....	- 5 -
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	- 5 -
2.2 Mecanismos de <i>S. aureus</i> para evadir la RII de la célula hospedera	- 5 -
2.3 Internalización de <i>S. aureus</i>	- 9 -
2.4 Glándula mamaria bovina.....	- 10 -
2.5 RII en la glándula mamaria bovina	- 12 -
2.6 Mediadores de la inflamación en la glándula mamaria bovina	- 14 -
2.7 Mastitis bovina.....	- 14 -
2.8 Generalidades del 17 β -estradiol.....	- 16 -
2.9 El papel del 17 β -estradiol sobre la regulación de RII en CEMB	- 19 -
2.10 Papel de otros compuestos contra la internalización de <i>S. aureus</i>	- 21 -
2.11 El papel de las defensinas de plantas sobre la RII de las CEMB	- 21 -
2.12 El papel de γ -tionina sobre la regulación de la RII en CEMB.....	- 24 -
2.13 Tratamientos combinados con péptidos antimicrobianos contra <i>S. aureus</i> -	25
-	
3. JUSTIFICACIÓN	- 29 -
4. HIPÓTESIS	- 30 -
5. OBJETIVOS	- 30 -
5.1 Objetivo general	- 30 -
5.2 Objetivos particulares	- 30 -

6.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 31 -
6.1	Estrategia general	- 31 -
6.2	Reactivos y cepas	- 32 -
6.3	Diseño experimental.....	- 32 -
6.4	Cultivo de <i>S. aureus</i>	- 33 -
6.5	Cultivo de CEMB	- 33 -
6.6	Ensayo de viabilidad de <i>S. aureus</i>	- 33 -
6.7	Ensayos de viabilidad de las CEMB	- 34 -
6.8	Evaluación de la inducción de la apoptosis en las CEMB	- 34 -
6.9	Ensayo de invasión de <i>S. aureus</i> en las CEMB	- 35 -
6.10	Efecto del medio condicionado de las CEMB sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> - 36 -	
6.11	Cuantificación de óxido nítrico (NO)	- 36 -
6.12	Análisis estadístico	- 37 -
7.	RESULTADOS	- 38 -
7.1	Efecto de los tratamientos con 17 β -estradiol y γ -tionina sobre el crecimiento y viabilidad de <i>S. aureus</i>	- 38 -
7.2	Efecto de los tratamientos con 17 β -estradiol y γ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB	- 38 -
7.3	Efecto de los tratamientos con γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la inducción de la apoptosis en las CEMB	- 42 -
7.4	Efecto de los tratamientos con γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB	- 45 -
7.5	Efecto de los medios condicionados de los tratamientos de γ -tionina y 17 β - estradiol sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i>	- 46 -

7.6	Efecto de los tratamientos con 17β -estradiol y γ -tionina sobre la producción de NO en las CEMB	- 47 -
8.	DISCUSIÓN.....	- 49 -
9.	CONCLUSIÓN.....	- 57 -
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	- 58 -

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Factores de virulencia en <i>S. aureus</i> expresados diferencialmente de acuerdo a la fase del ciclo celular.	- 6 -
Figura 2. Mecanismos de evasión de la RII de <i>S. aureus</i>	- 7 -
Figura 3. Mecanismo de internalización tipo zipper de <i>S. aureus</i>	- 10 -
Figura 4. Niveles de 17 β -estradiol en bovinos durante el parto.....	- 16 -
Figura 5. Estructura molecular del 17 β -estradiol.....	- 17 -
Figura 6. Síntesis de estrógenos.....	- 18 -
Figura 7. Respuesta inmunomoduladora del 17 β -estradiol sobre las CEMB. ...	- 20 -
Figura 8. Estructura de la defensina γ -tionina de chile habanero.	- 24 -
Figura 9. Efecto inmunomodulador del péptido γ -tionina sobre las CEMB.	- 25 -
Figura 10. Estrategia experimental general.....	- 31 -
Figura 11. Diseño experimental para determinar las interacciones entre γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB.....	- 32 -
Figura 12. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i>	- 39 -
Figura 13. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> determinada a las 24 h.....	- 40 -
Figura 14. Efecto de los tratamientos de γ - tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> determinada a las 2 h.....	- 40 -
Figura 15. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de CEMB determinada por azul tripano.	- 41 -
Figura 16. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de CEMB determinada por MTT.....	- 43 -
Figura 17. Evaluación de la inducción de apoptosis de las CEMB por la combinación de γ -tionina y 17 β -estradiol.....	- 44 -
Figura 18. Efecto de la mezcla de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB.	- 45 -

Figura 19. Efecto de la combinación de γ - tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB..... - 46 -

Figura 20. Efecto de los medios condicionados de las CEMB tratadas con la defensina γ -tionina y el 17β -estradiol sobre la viabilidad de *S. aureus*..... - 47 -

Figura 22. Efectos del 17β -estradiol, la γ -tionina y el tratamiento de 17β -estradiol y γ -tionina sobre la RII de las CEMB y reducción de la internalización de *S. aureus*.. - 56 -

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de citocinas de acuerdo a su función en la glándula mamaria bovina.....	- 15 -
Tabla 2. Efecto de diferentes compuestos sobre la internalización de <i>S. aureus</i> y su viabilidad.....	- 22 -
Tabla 3. Actividad biológica de las familias de péptidos antimicrobianos de plantas.	- 23 -
Tabla 4. Actividad sinérgica reportada entre péptidos antimicrobianos y antibióticos.	- 28 -

RESUMEN

La mastitis bovina es una enfermedad caracterizada por la inflamación de la glándula mamaria que ocasiona pérdidas económicas importantes en la ganadería lechera. *Staphylococcus aureus* es el patógeno predominante en los casos de mastitis subclínica, cuya mayor incidencia ocurre durante el parto. Las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) actúan como primera línea de defensa produciendo citocinas, péptidos antimicrobianos, óxido nítrico (NO), entre otros. Reportes del grupo de trabajo han mostrado que el 17 β -estradiol (50 pg/ml) reduce la internalización de *S. aureus* en las CEMB (40%). Por otra parte, el péptido γ -tionina (100 ng/ml) reduce la internalización de *S. aureus* (~50%). En el presente trabajo se planteó evaluar el efecto conjunto de ambas moléculas durante la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Se evaluaron tres tratamientos: 1) Adición conjunta de 17 β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) durante 24 h, 2) 17 β -estradiol 24 h, y la adición de γ -tionina por 24 h, y 3) similar al tratamiento 2 pero invirtiendo el orden de los compuestos. Los resultados mostraron que los tratamientos no afectaron el crecimiento bacteriano ni la viabilidad de las CEMB. Además, el tratamiento 1 (γ -tionina 100 ng/ml y 17 β -estradiol 50 pg/ml) presentó el mayor efecto sobre la disminución de la internalización bacteriana (~50%). Por su parte, el medio condicionado de las CEMB tratadas con γ -tionina (100 ng/ml) y 17 β -estradiol (50 pg/ml) redujo la viabilidad bacteriana (~31.4%) y mostró un aumento en la producción de NO. Los resultados sugieren que la disminución de la internalización bacteriana con el tratamiento conjunto de γ -tionina (100 ng/ml) y 17 β -estradiol (50 pg/ml) se debe a los elementos de la RII secretados al medio por las CEMB, así como por la producción de NO que pudiera favorecer la resolución de la infección.

Palabras clave: Mastitis bovina, glándula mamaria, péptido antimicrobiano, inmunomodulación, internalización bacteriana.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease characterized by inflammation of the mammary glands that causes significant economic losses in dairy farming. *Staphylococcus aureus* is the predominant pathogen in cases of subclinical mastitis, the highest incidence of which occurs during the peripartum period. Bovine mammary epithelial cells (BMEC) act as the first line of defense by producing cytokines, antimicrobial peptides, nitric oxide (NO), among others. Reports from the working group have shown that 17 β -estradiol (50 pg/ml) reduces the internalization of *S. aureus* into BMEC (40%). On the other hand, the peptide γ -thionin (100 ng/ml) reduces the internalization of *S. aureus* (~50%). In this work, we evaluate the combined effect of both molecules during the internalization of *S. aureus* into BMEC. Three treatments were assessed: 1) addition of 17 β -estradiol (50 pg/ml) and γ -thionin (5, 25, 100, 150, and 200 ng/ml) for 24 h, 2) 17 β -estradiol 24 h, and the addition of γ -thionin for 24 h, and 3) similar to treatment 2 but reversing the order of the compounds. The results showed that the treatments did not affect the bacterial growth or the viability of the BMEC. In addition, treatment 1 (γ -thionin 100 ng/ml and 17 β -estradiol 50 pg/ml) had the greatest effect on the decrease in bacterial internalization (~50%). For its part, the conditioned medium of the BMEC treated with γ -thionin (100 ng/ml) and 17 β -estradiol (50 pg/ml) reduced bacterial viability (~31.4%) and showed an increase in NO production. The results suggest that the decrease in bacterial internalization with the joint treatment of γ -thionin (100 ng/ml) and 17 β -estradiol (50 pg/ml) is due to IIR elements secreted into the medium by BMEC as well as by the production of NO that could favor the resolution of the infection.

Keywords: Bovine mastitis, mammary gland, antimicrobial peptide, immunomodulation, bacterial internalization.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina está relacionada con una disminución en la calidad y producción de la leche, y representa un serio problema para la ganadería lechera en todo el mundo, debido al incremento en los gastos veterinarios o incluso al desecho temprano de animales. Esta enfermedad puede presentarse de manera clínica (aguda) o subclínica (crónica), dependiendo del tipo de microorganismo asociado a la infección. La bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* es el patógeno predominante que se aísla en los casos de mastitis subclínica (>70%), la cual se caracteriza por una inflamación persistente o crónica en la glándula mamaria, que la mayoría de las veces no cursa con signos clínicos (Kerro-Dego, 2002). Diversos reportes señalan que durante el parto y el periodo seco la vaca es más susceptible a desarrollar infecciones intramamarias (Burvenich *et al.*, 1999; Sordillo *et al.*, 2002). Esto se ha asociado con cambios abruptos en los niveles de hormonas sexuales o reproductivas, como el caso de la hormona 17 β -estradiol, cuyos niveles se incrementan en la última semana de la gestación alcanzando su concentración más alta tres días antes del parto, después del cual la concentración disminuye rápidamente hasta llegar a niveles basales (Lamote *et al.*, 2006).

La alta incidencia de mastitis durante el parto se ha asociado con una disminución en la respuesta inmune innata (RII) del animal. En esta respuesta, el epitelio mamario desempeña una función fundamental, ya que es el principal blanco de bacterias intracelulares causantes de la mastitis como *S. aureus*, y participa activamente produciendo citocinas, quimiocinas, péptidos de defensa, enzimas, óxido nítrico (NO), por sus siglas en inglés, etc. (Schukken *et al.*, 2011). Debido al hecho de que el epitelio mamario bovino es uno de los tejidos blanco del 17 β -estradiol, en el grupo de trabajo se ha explorado el papel que juega esta hormona sobre la RII de las células epiteliales mamarias bovinas (CMEB) durante la internalización de *S. aureus*, encontrando que favorece una respuesta antiinflamatoria, además de que inhibe la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK), la cual es elemental en el mecanismo de internalización, logrando de

esta manera una disminución del 40% de la internalización bacteriana (Medina-Estrada *et al.*, 2016).

Por otra parte, y como una alternativa para modular la RII de las CEMB, en el grupo de trabajo se ha analizado el papel que juegan moléculas como las defensinas de plantas en la interacción epitelio-*S. aureus*, como el péptido γ -tionina, el cual favorece la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β y la citocina antiinflamatoria IL-10; así mismo, indujo la producción de NO y la secreción del péptido antimicrobiano DEFB1 (Defensina Bovina β 1), logrando de esta manera una reducción de la internalización del 50% (Díaz-Murillo *et al.*, 2016).

Hasta el momento, se desconoce si el 17 β -estradiol y las defensinas de plantas, en concreto la γ -tionina, pueden tener efectos conjuntos inmunomoduladores sobre el epitelio mamario bovino, el cual constituye el principal objetivo del presente trabajo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, que son catalasa negativos (Cervantes-García *et al.*, 2014).

S. aureus posee una serie de proteínas conocidas como factores de virulencia, las cuales se expresan diferencialmente de acuerdo al ciclo de crecimiento. Durante la fase exponencial se expresan proteínas de superficie, y durante la fase estacionaria se expresan proteínas de secreción (Figura 1). De acuerdo a Lowy (1998) esta expresión secuencial de proteínas podría tener importancia clínica en el proceso de infección; la expresión de proteínas superficiales que se unen a moléculas de la matriz extracelular favorece la colonización exitosa de los tejidos del hospedero, mientras que la síntesis de proteínas de secreción favorece su propagación en tejidos adyacentes.

2.2 Mecanismos de *S. aureus* para evadir la RII de la célula hospedera

S. aureus es uno de los patógenos causante de mastitis bovina más estudiados, normalmente la infección causada por este patógeno es difícil de erradicar y desencadena infecciones crónicas, debido a sus mecanismos de evasión y manipulación de la respuesta inmune a través de sus factores de virulencia (Olivera-Ángel y Huertas-Molina, 2020).

S. aureus cuenta con una variedad de mecanismos con los que evade el sistema inmune de la glándula mamaria que le permiten pasar desapercibido (Figura 2),

entre ellos la capacidad de internalizarse y sobrevivir dentro de varios tipos de células (mecanismo que se describirá a detalle más adelante); así como el fenotipo SCV conocido como variante de colonias pequeñas (Small Colony Variants), las cuales son 10 veces más pequeñas que las cepas originales y pueden sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales y no profesionales, sin desencadenar una respuesta inmune mediada por células, esto debido a su capacidad para reducir la producción de la toxina α que permite que la bacteria persista dentro de las células de los mamíferos sin dañar los tejidos (Cervantes-García *et al.*, 2014; Zaatout *et al.*, 2020).

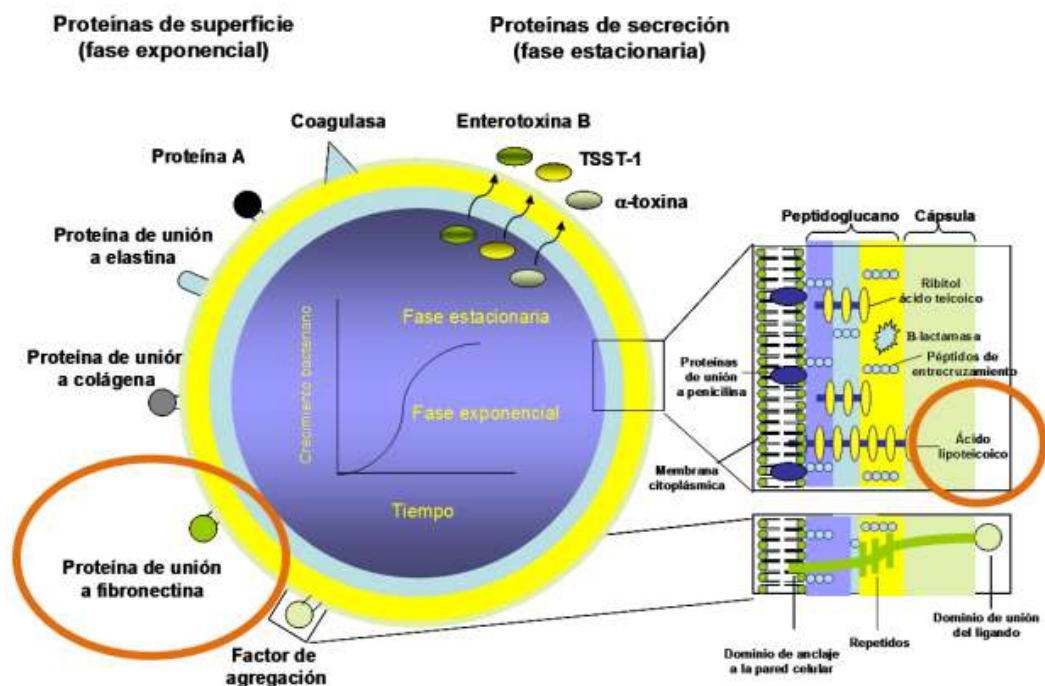


Figura 1. Factores de virulencia en *S. aureus* expresados diferencialmente de acuerdo a la fase del ciclo celular. *S. aureus* expresa sus factores de virulencia de forma diferencial de acuerdo a la fase de crecimiento en la que se encuentra. Durante la fase estacionaria expresa proteínas que favorecen su adhesión a su hospedero, mientras que en la fase exponencial expresa proteínas que le permiten causar daño, por ejemplo, toxinas que dañan la membrana de su hospedero. Por otra parte, el ácido lipoteicoico es uno de los principales componentes de la pared celular de la bacteria, interactúa con receptores TLR de la célula hospedera activando la respuesta inmune de la misma, mientras que la proteína de unión a fibronectina es la implicada en el proceso de internalización en la célula hospedera. Tomado y modificado de Lowy (1998).

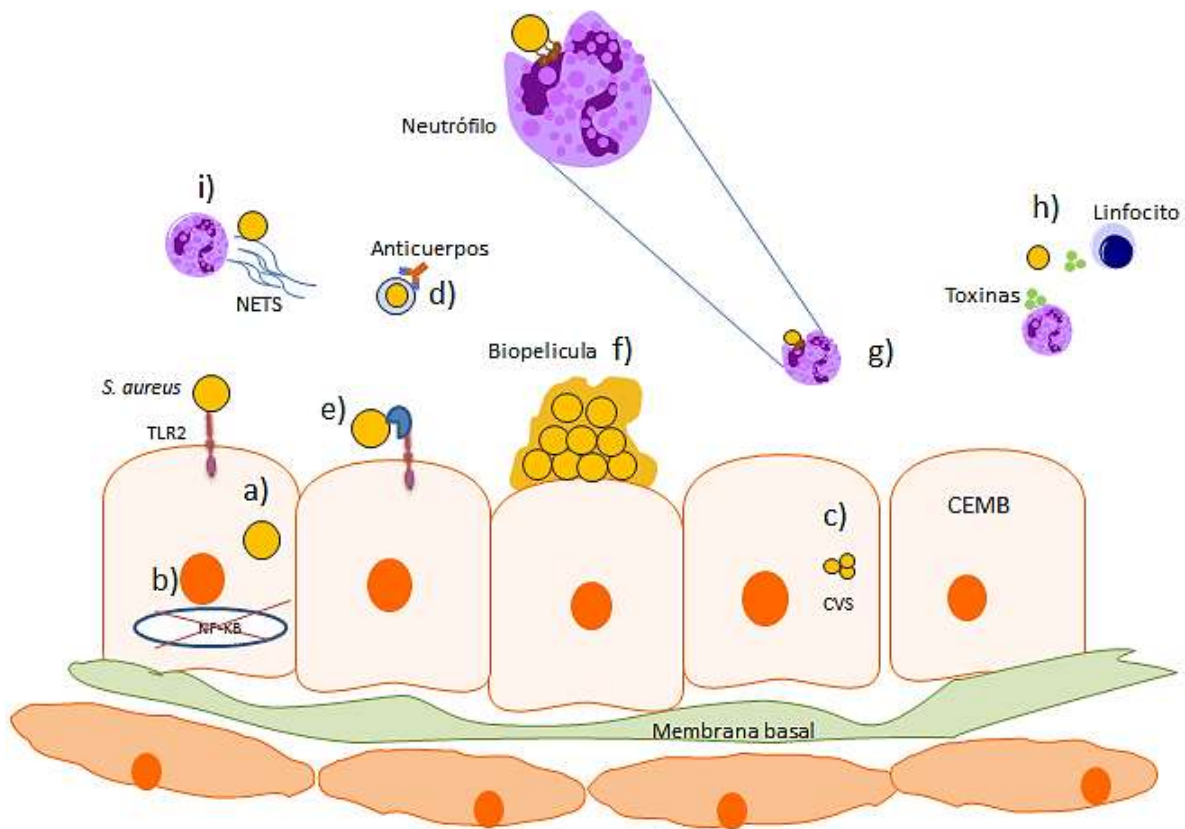


Figura 2. Mecanismos de evasión de la RII de *S. aureus*.

En la figura se muestran algunos de los mecanismos mediante los cuales *S. aureus* evade o manipula a RII del huésped mediante a) Internalización, b) bloqueo de la vía de señalización NF-κB, c) Mediante la transformación a variante de colonia pequeña, d) evitando la opsonización, e) mediante el bloqueo de su reconocimiento por TLR2, f) mediante la formación de biopelículas, g) evitando la fagocitosis, h) mediante el ataque con toxinas y i) mediante la destrucción de NETS. (Modificado de Olivera-Ángel y Huertas-Molina, 2020).

Además, la presencia de polisacáridos capsulares le confiere resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) bovinos (Camus y Calvino, 2013). Así mismo, la producción de proteínas tipo superantígeno de los *Staphylococcus* o SSLs (por sus siglas en inglés) bloquean su reconocimiento, por ejemplo, SSL3 puede unirse a los TLR2 expresados en las células epiteliales e inmunes para bloquear el reconocimiento de la bacteria (Bestebroer *et al.*, 2007).

Otro mecanismo que le permite aislarse del entorno y protegerse, es la formación de biopelículas y abscesos. Las biopelículas son ampliamente definidas como un

grupo de células inmersas en una matriz, permitiendo a la bacteria evadir la respuesta inmune e incrementado la tolerancia frente a los diferentes agentes antimicrobianos, por lo que estas infecciones serán más difíciles de eliminar (Gomes *et al.*, 2016). Por otra parte, los abscesos son comunidades bacterianas que se protegen dentro de una pseudo cápsula formada a base de depósitos de fibrina y rodeada de capas de células inmunes muertas. En ambos casos se evita la fagocitosis y se promueve la persistencia de la infección ya que tampoco son accesibles a la opsonización y fagocitosis, procesos que son fundamentales para la eliminación de las infecciones mamarias (Camussone y Calvinho, 2013; Gomes *et al.*, 2016).

Por otra parte *S. aureus* posee otros factores de virulencia que le permiten manipular al sistema inmune, como las proteínas inhibidoras de la quimiotaxis o CHIPS por sus siglas en inglés (Chemotaxis Inhibitory Protein of *S. aureus* - CHIPS), las cuales bloquean la función de quimiotrayentes, por ejemplo C5a producido por la activación del complemento. La adhesión al endotelio y migración de los neutrófilos puede ser alterada por SSL5 y SSL11, quienes se adhieren a la glicoproteína PSGL-1 presente en las membranas de los fagocitos, evitando su unión con la P-selectina, molécula clave para la adhesión y posterior migración de los leucocitos al sitio de la infección (Bestebroer *et al.*, 2007).

Así mismo, esta bacteria produce toxinas cuya función principal es la destrucción de distintos tipos de células inmunes, como la α -toxina (hla), una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamífero, particularmente eritrocitos cuya función principal es convertir el tejido del hospedero en nutrientes para la bacteria que la expresa. Además de la β -toxina (hly), una exoproteína hemolítica formadora de poros capaz de actuar sobre neutrófilos y linfocitos (Camussone y Calvinho, 2013).

Por otro lado, la fagocitosis de *S. aureus* no garantiza su eliminación, debido a que la bacteria posee estrategias con las que puede alterar los mecanismos efectores de este proceso, hace frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS)

empleando el pigmento estafiloxantina y la catalasa, que son elementos antioxidantes, o la superóxido dismutasa (Cervantes-García *et al.*, 2014).

También tiene la capacidad de degradar las NET (trampas extracelulares de los neutrófilos) mediante DNAsas. Además, secreta aureolisina (Aur) que puede degradar el factor C3, por lo que no se van a generar las fracciones encargadas de la quimioatracción (C3a y C5a), la opsonización (C3b y C5b) y el complejo de ataque a la membrana (Olivera-Ángel y Huertas-Molina, 2020).

2.3 Internalización de *S. aureus*

Como ya se mencionó, *S. aureus* posee la capacidad de evadir al sistema inmune al internalizarse y sobrevivir dentro de células fagocíticas no profesionales, como las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), que actúan como primera línea de defensa, por lo que son blanco principal de la internalización de *S. aureus*. Este patógeno se internaliza mediante un mecanismo tipo zipper (Figura 3), 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 (Alva-Murillo *et al.*, 2014). Este puente molecular conlleva a la activación de FAK, la cual participa en la señalización para el rearrreglo 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). El tráfico de integrinas está mediado principalmente por la cinasa FAK y se da de manera constante, ya que las integrinas sufren un ciclo endo-exocítico, donde pueden estar en vesículas a manera de reservorio, y tras un estímulo, llegan a la superficie para posteriormente volverse a internalizar, *S. aureus* aprovecha esta facultad para lograr internalizarse (Medina- Estrada, 2017).

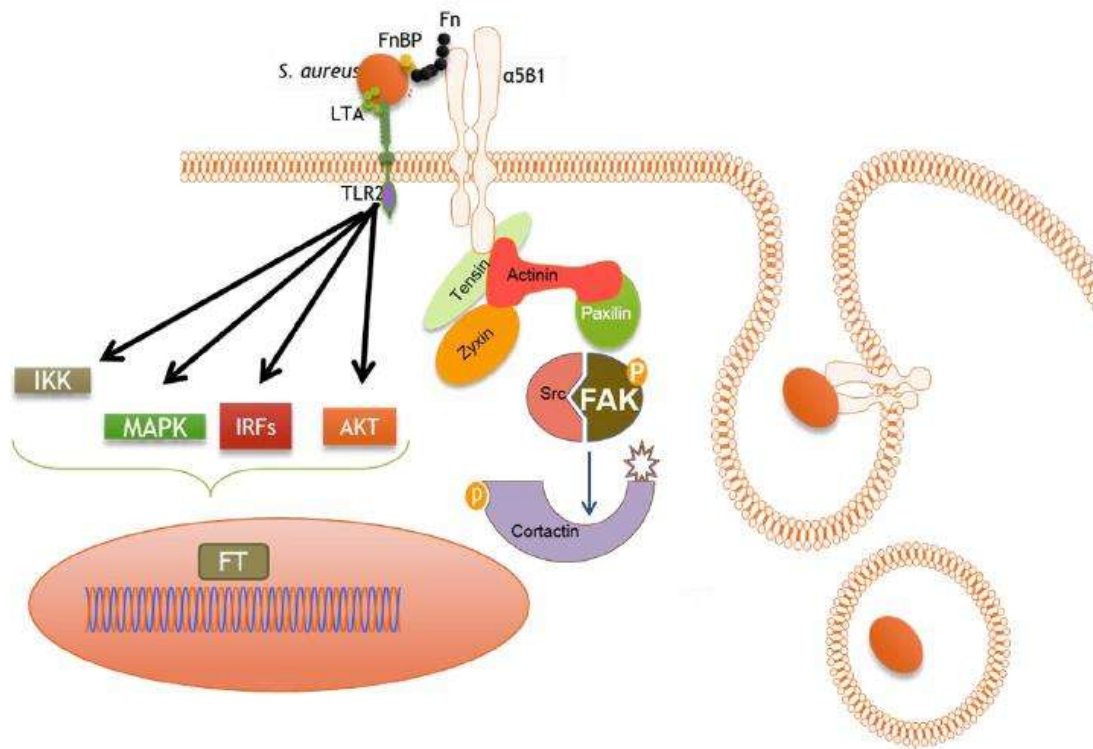


Figura 3. Mecanismo de internalización tipo zipper de *S. aureus*. El ácido lipoteicoico presente en la pared celular de la bacteria es reconocido por el receptor TLR2, la interacción activa vías de señalización como: Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), elementos de respuesta a interferón (IRFs), rutas dependientes de AKT y cinasa inhibidora de kappaB (IKK) que inducen la translocación de factores de transcripción al núcleo para la expresión de elementos de la RII. La internalización de *S. aureus* implica la participación de las integrinas, y su ligando fibronectina, que reconoce a la proteína de unión a fibronectina presente en la superficie de la bacteria. La interacción activa a FAK que posteriormente media el reclutamiento de un complejo proteico e induce el rearreglo del citoesqueleto de actina y la consecuente formación del endosoma (Tomado de Medina- Estrada, 2017).

2.4 Glándula mamaria bovina

La glándula mamaria bovina madura está compuesta por múltiples alvéolos y conductos lo que la clasifica como una glándula alveolar compuesta y ramificada. La formación de la glándula mamaria bovina empieza en la etapa fetal con la aparición de los primeros rudimentos de la glándula y el sistema de ductos; este desarrollo es dirigido principalmente por hormonas como la prolactina (PRL), la hormona del crecimiento (GH) y por factores como la proteína morfogénica ósea (BMP4) y el factor de transcripción T-BOX 38 (Olivera-Ángel y Huertas-Molina,

2020). En la etapa neonatal la PRL y los esteroides ováricos controlan el desarrollo de los ductos en el parénquima mamario (almohadilla grasa y estroma) al inducir su crecimiento (Yart *et al.*, 2014). En la etapa adulta o productiva del animal, el crecimiento y desarrollo mamario se da debido a la disminución de las concentraciones de progesterona (que el cuerpo lúteo ha mantenido altas durante toda la gestación) y al aumento del 17β -estradiol hacia el final de la gestación. La PRL parece tener un papel permisivo ya que no se encuentra ningún cambio en sus niveles asociado a la mamogénesis y a la formación del lóbulo alveolar durante la gestación (Olivera-Ángel y Huertas-Molina, 2020).

Es importante recalcar la relevancia del 17β -estradiol en el presente proyecto, ya que además de participar en la estimulación del crecimiento de los conductos mamarios y el desarrollo lóbulo-alveolar, tiene la capacidad de regular la RII logrando un efecto antiinflamatorio, además de que tiene un efecto positivo en reducción de la internalización de *S. aureus* (el cual se trata a detalle más adelante).

En cuanto al proceso de síntesis y secreción de leche por las células epiteliales de los alveolos mamarios, este comienza durante la lactogénesis (habilidad de producir lactosa) la cual consiste en un periodo de transición caracterizado por la diferenciación funcional de las células del tejido mamario, las cuales cambian de un estado no lactante (no secretorio) a lactante (secretorio). La concentración de progesterona es alta durante la gestación, esta induce la proliferación de lactocitos y prepara la maquinaria celular, aunque inhibe la lactogénesis. Los estrógenos también están involucrados en el inicio de la lactancia estimulando la liberación de PRL desde la adenohipófisis e induciendo receptores para la misma en las células mamarias (Yart *et al.*, 2014). Estos cambios hormonales son los inductores de la lactogénesis antes del parto. El complejo lactogénico está formado principalmente por la asociación de PRL, insulina y cortisol y tiene influencia sobre la secreción de las proteínas de la leche (Boeris y Meglia, 2015).

En lo que respecta a los corticoesteroides, glucocorticoides y cortisol, están asociados con el incremento de la disponibilidad de la glucosa que es precursora de la lactosa (Olivera-Ángel y Huertas-Molina, 2020).

2.5 RII en la glándula mamaria bovina

En la glándula mamaria el primer sistema de defensa es la barrera física del canal del pezón, el cual mantiene cerrado el esfínter evitando la entrada de patógenos, un aumento en la permeabilidad del esfínter está directamente relacionado a un aumento de la mastitis (Sordillo *et al.*; 2002). Para sobrepasar la barrera del esfínter, la bacteria cuenta con mecanismos de adhesión y multiplicación, los cuales le permiten avanzar por el canal, además puede ingresar ayudada por elementos físicos que la arrastran hacia el interior, como las cánulas de aplicación de antibióticos y las diferencias de presión ocasionadas por las fluctuaciones de vacío durante el ordeño mecánico (Philpot y Nickerson, 2000).

Una vez que la bacteria alcanza el interior del pezón, debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente, por lo que en este punto la capacidad de adherencia al tejido influirá sobre la permanencia dentro del cuarto infectado, evento decisivo en la fase temprana de la patogénesis (Philpot y Nickerson, 2000). Si las bacterias logran superar la barrera física del canal del pezón entran en juego las defensas celulares. En la glándula mamaria sana, las células epiteliales superan en número a cualquier otro tipo celular, por lo que la posibilidad de tomar contacto con los patógenos invasores es mayor (Pereyra *et al.*, 2014).

Las células del epitelio mamario poseen una serie de receptores específicos capaces de reconocer patógenos. En el caso de *S. aureus*, éste es reconocido por el receptor TLR2 a través del ácido lipoteicoico presente en su membrana (Schukken *et al.*, 2011), desencadenando una vía de señalización que eventualmente activa a factores transcripcionales, tales como NF- κ B, favoreciendo durante los estadios iniciales de inflamación en la glándula mamaria, el incremento en la producción citosinas como TNF- α , IL-1 β e IL-8, y en las

etapas finales IL-4, IL-10 e IL-17, algunas de las cuales participan en la resolución y finalización de la inflamación (Bannerman, 2009). La quimiocina IL-8 participan en el reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria, mientras que TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales lo que favorece la extravasación de neutrófilos y linfocitos. Por su parte, la IL-6 regula la síntesis de proteínas de la fase aguda, además de favorecer la afluencia de monocitos a la glándula mamaria (Pereyra *et al.*, 2014).

Además de las células del epitelio mamario bovino, en la glándula mamaria se pueden encontrar otros tipos de células, entre las que destacan los neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los neutrófilos son reclutados en etapas tempranas de la inflamación al sitio de la infección, este tipo celular puede fagocitar patógenos; además de tener efectos bactericidas relacionados con la producción de radicales hidroxilo y de oxígeno, así como con la producción de pequeños péptidos antimicrobianos (Sordillo *et al.*, 2002).

Por su parte, los macrófagos tienen la función de fagocitar bacterias y destruirlas con la ayuda de proteasas y ROS. Si el patógeno persiste después del ataque de los neutrófilos, estos son sustituidos por linfocitos, los cuales se clasifican en dos grupos principales, linfocitos T y B, los cuales a su vez tienen otras subclasificaciones. Los linfocitos T se encargan de destruir a las células infectadas, así como de la activación de macrófagos; mientras que, los linfocitos B reconocen antígenos para secretar anticuerpos, los cuales pueden participar en actividades como neutralización de antígenos, favoreciendo la actividad fagocítica de los macrófagos o activación del complemento (Pereyra *et al.*, 2014).

Los factores solubles se encuentran en el microambiente de la glándula mamaria sana y están constituidos por lactoferrina (Lf), lisozima, factores del complemento, citocinas, quimiocinas, inmunoglobulinas y otras moléculas solubles bactericidas y bacteriostáticas. Estos factores poseen una eficacia variable contra los diferentes patógenos causantes de mastitis de acuerdo con las diferentes etapas de la lactancia (Aitken, 2011). La Lf es una proteína de unión al Hierro con capacidades bacteriostáticas producida por las CEMB y los leucocitos. En presencia de

bicarbonato, la Lf puede secuestrar iones férricos libres presentes en la leche y, por lo tanto, impedir el crecimiento de bacterias que tienen requerimientos de Fe, como estafilococos y bacterias coliformes. En lo que respecta a la lisozima, esta es una proteína bactericida presente en la leche que durante la infección rompe la pared celular de bacterias Gram positivas, así como las membranas externas de bacterias Gram negativas (Sordillo *et al.*, 2002).

Por otra parte, el sistema del complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche, sintetizadas principalmente por los hepatocitos, monocitos y macrófagos tisulares. La activación del sistema del complemento genera varios fragmentos proinflamatorios, de los cuales el fragmento C5 está especialmente asociado con la mastitis (Pereyra *et al.*, 2014).

2.6 Medidores de la inflamación en la glándula mamaria bovina

Las citocinas son proteínas reguladoras de bajo peso molecular o glucoproteínas secretadas por glóbulos blancos y muchas otras células del organismo en respuesta a diversos estímulos. Estas proteínas ayudan a regular el desarrollo de células inmunitarias efectoras, y algunas citocinas poseen funciones efectoras directas propias (Kindt *et al.*, 2007). Además de las citocinas y quimiocinas, durante la inflamación en la glándula mamaria bovina se expresan péptidos antimicrobianos como la DEFB1, la beta defensina de neutrófilos bovinos (BNBD5) y la psoriasina S100A7 (Medina-Estrada *et al.*, 2016). En la Tabla 1 se presentan algunas de las citocinas más representativas durante el proceso de infección en la glándula mamaria bovina.

2.7 Mastitis bovina

La mastitis es una enfermedad multifactorial que puede definirse como una inflamación de la glándula mamaria. De acuerdo con la investigación de Bedolla (2008), la mastitis subclínica alcanza el 50% en los hatos lecheros de México. Esta

enfermedad es muy costosa para la ganadería lechera, ya que el promedio de gasto por vaca en México para tratar esta enfermedad es de \$1,700 - \$ 2,000 vaca/año.

Tabla 1. Clasificación de citocinas de acuerdo a su función en la glándula mamaria bovina.

Citocinas pro-inflamatorias	IL-1 β	<ul style="list-style-type: none"> • Media la respuesta inflamatoria de fase aguda. • Aumenta el número de neutrófilos. • Mejora la fagocitosis de neutrófilos y actividad bactericida. • Desencadena la migración de neutrófilos a la glándula mamaria.
	IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la síntesis de anticuerpos por linfocitos B.
	TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora la respuesta inflamatoria en la fase aguda. • Mejora la fagocitosis de neutrófilos y actividad bactericida. • Favorece la expresión de moléculas de adhesión endotelial.
Citocinas anti-inflamatorias	IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuye y regula la respuesta inflamatoria producida por las células dendríticas y los macrófagos. • Reduce las respuestas adaptativas de las células T CD4.
Quimiocinas	IL-8	<ul style="list-style-type: none"> • Induce inflamación. • Media la migración de neutrófilos inducida por IL-1β. • Potente quimioatrayente.

Tomado y modificado de Sordillo *et al.*, (2002).

Entre los principales factores de riesgo para que el ganado desarrolle mastitis se encuentra la participación de microorganismos infecciosos, entre los que destaca *S. aureus*. También influyen las características de la vaca, principalmente las relacionadas con el tamaño de la ubre y apertura del pezón, esto debido a que el canal del pezón se considera la vía principal por la cual los patógenos invasores pueden entrar a la glándula mamaria (Sordillo *et al.*, 2002). Otros factores a

considerar son la higiene en el medio ambiente y las buenas prácticas durante el ordeño.

Un factor de gran importancia es el factor hormonal, de acuerdo con Sordillo *et al* (2002) la incidencia de mastitis bovina aumenta cuando los mecanismos de defensa de la glándula mamaria están deteriorados, como ocurre en el periodo del periparto en donde el sistema de defensa se ve disminuido. Durante esta etapa (Figura 4) se observa cómo los niveles de 17β -estradiol suben hasta el pico de concentración más alto tres días antes del parto y descienden de manera drástica después del mismo, lo que se ha relacionado con una disminución de la RII.

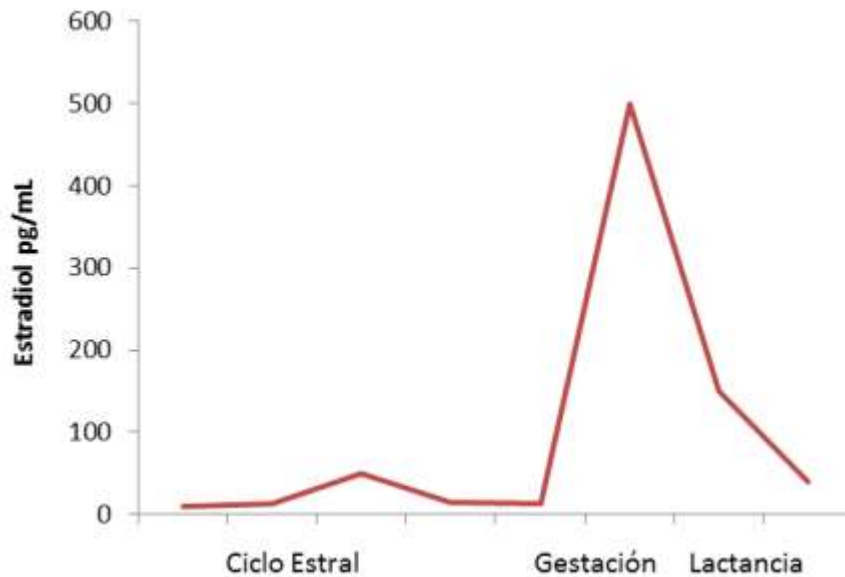


Figura 4. Niveles de 17β -estradiol en bovinos durante el periparto. Los niveles de 17β -estradiol varían durante las distintas etapas reproductivas. Tomada de Lamote *et al.* (2016).

2.8 Generalidades del 17β -estradiol

El 17β -estradiol es una hormona sexual de origen esteroideo de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (Figura 5) (Sanz, 2009).

El 17 β -estradiol pertenece a un grupo de hormonas llamadas estrógenos, al que también pertenecen la estrona, la cual tiene su grupo carbonilo en la posición C17, el 17 β -estradiol que presenta su grupo hidroxilo en C17 y el estriol que posee 2 grupos alcohol en los C16 y C17. Estas hormonas 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 cual elimina un carbono y se aromatiza el anillo A, para originar el 17 β -estradiol (Figura 6). Otra vía de síntesis es mediante la conversión (por la aromatasa) de androstenediona a estrona, y ésta puede convertirse enzimáticamente en 17 β -estradiol y a su vez en estriol. 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 (Yart *et al.*, 2014; Medina, 2017).

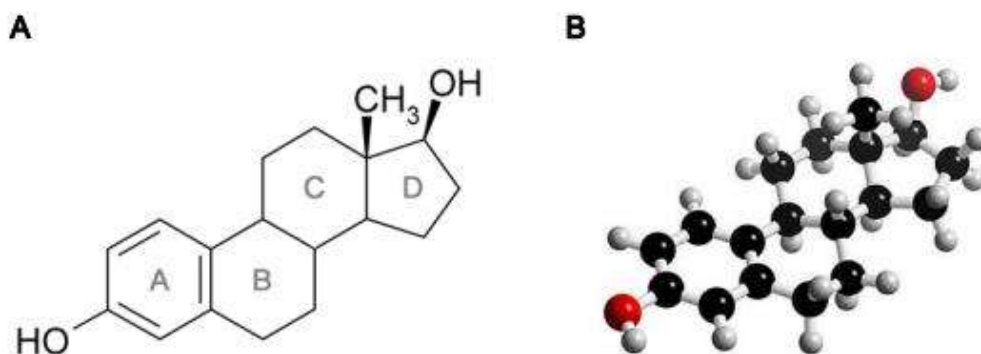


Figura 5. Estructura molecular del 17 β -estradiol. A) Fórmula molecular del 17 β -estradiol. B) Estructura tridimensional de la molécula. Los carbonos se representan por una esfera negra, los hidrógenos por una esfera gris claro y los oxígenos por una esfera roja. Tomado de Sanz (2009).

El 17 β -estradiol actúa sobre varios tipos celulares; sin embargo, su principal blanco son los epitelios, donde modula la diferenciación, proliferación y apoptosis, fenómenos íntimamente asociados al ciclo reproductivo, desarrollo y crecimiento de las hembras (Lamote *et al.*, 2006).

Las acciones del 17β -estradiol se producen principalmente a través de vías genómicas mediante receptores nucleares que actúan como factores de transcripción. Las formas libres de estos receptores se encuentran en el citoplasma cerca del núcleo. La unión de la hormona a su receptor induce un cambio conformacional que permite que el acoplado hormona-receptor pueda ser transferido al núcleo y formar un dímero con otra hormona-receptor acoplado, este dímero se une a secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta hormonal) ubicados en las regiones promotoras de los genes diana, donde recluta ya sea co-activadores o co-represores para estimular o reprimir la transcripción de los genes diana (Yart *et al.*, 2014).

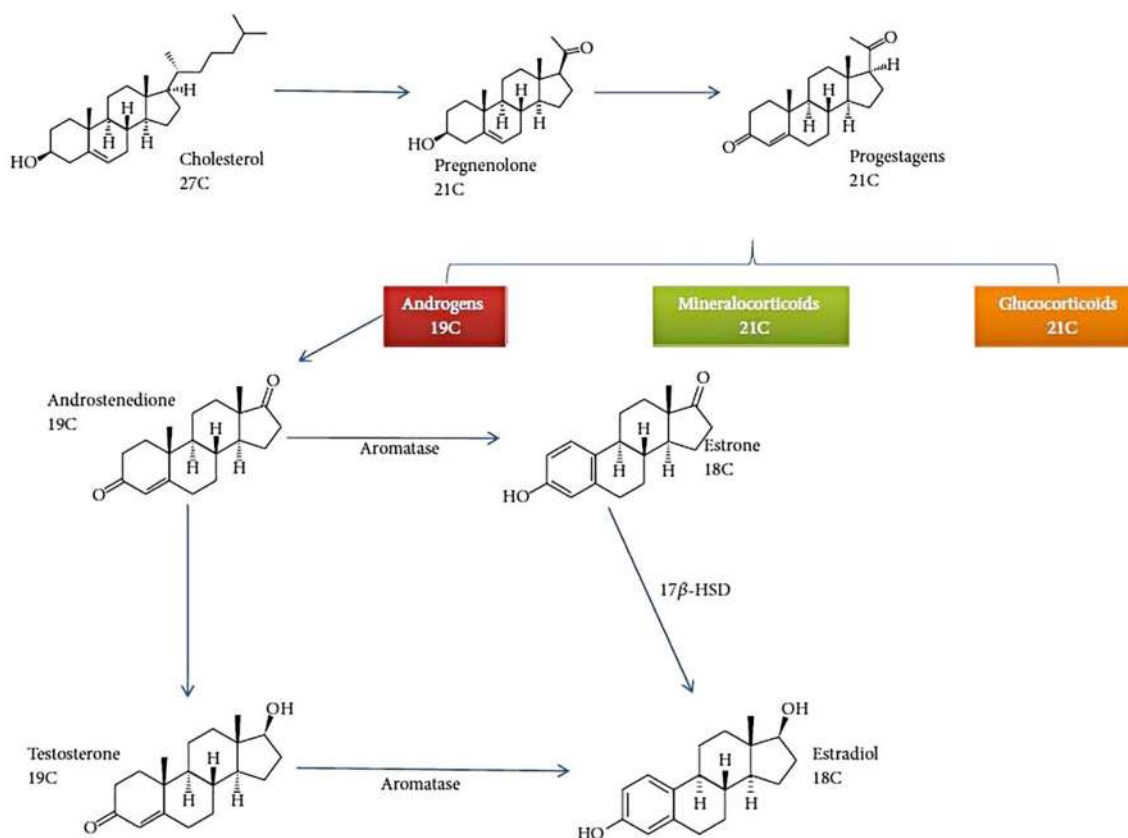


Figura 6. Síntesis de estrógenos. Estas hormonas se sintetizan a partir del colesterol, el cuál es el precursor de todos los esteroides. Las rutas biosintéticas esteroidogénicas activadas en las glándulas suprarrenales implican la producción de precursores para la síntesis de 17β -estradiol y progesterona. La síntesis de esteroides ocurren específicamente en tejido mesodérmico situado en la periferia de la glándula suprarrenal (Lamote *et al.*, 2006). Tomado de Medina-Estrada (2018).

El 17β -estradiol tiene una gran variedad de funciones entre las que se encuentran: inducir la migración celular 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); regular el metabolismo y distribución corporal de las grasas; favorecer del cierre de la epífisis (factor importante para la mineralización de los huesos y el crecimiento); regular el tono vascular y la angiogénesis. Además, participa en funciones reproductivas importantes como la maduración del folículo y posterior liberación del óvulo, crecimiento uterino, inducción del estro, desarrollo de caracteres sexuales primarios y secundarios, 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 (Medina, 2017). Así mismo, se ha demostrado que el 17β -estradiol tiene un efecto inmunoprotector ya que tras su estimulación por algún componente bacteriano o con el patógeno, favorece la producción de niveles más bajos de las citocinas proinflamatorias responsables de la letal naturaleza del shock séptico, y eleva la producción de moléculas antiinflamatorias (Lamote *et al.*, 2006). Además, una vez que las células son estimuladas por el patógeno, el 17β -estradiol induce la secreción de moléculas antimicrobianas aumentando su secreción constitutiva.

2.9 El papel del 17β -estradiol sobre la regulación de RII en CEMB

Reportes recientes del grupo de trabajo han mostrado que el 17β -estradiol (50 pg/ml) reduce significativamente la internalización de *S. aureus* en las CEMB (~40%) (Medina-Estrada *et al.*, 2016). Aunado a esta inhibición, el 17β -estradiol 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 (Figura 7).

Además, el 17β -estradiol activa a la cinasa Akt induciendo su fosforilación, y por consecuencia la translocación al núcleo de factores transcripcionales como AP-1, el cual a su vez favorece la expresión del gen de IL-10, una citocina

2.10 Papel de otros compuestos contra la internalización de *S. aureus*

Debido a la capacidad de *S. aureus* de internalizarse evadiendo el sistema de defensa del hospedero, y de esta manera persistir intracelularmente ocasionando infecciones persistentes y crónicas, en el grupo de trabajo se han probado diferentes compuestos que inhiban la internalización de *S. aureus*, tales como péptidos antimicrobianos, hormonas, vitaminas y ácidos grasos, mostrando resultados favorables. En la Tabla 2 se muestra un resumen de esos compuestos.

2.11 El papel de las defensinas de plantas sobre la RII de las CEMB

Los péptidos antimicrobianos son moléculas relativamente pequeñas que contienen entre 12 y 60 aminoácidos, cuyas familias se encuentran en casi todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos, anfibios, insectos y plantas, formando parte de las moléculas efectoras del sistema inmune. El espectro de actividad de los péptidos antimicrobianos es amplio. Se encuentra actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana, e incluso, en algunos casos, antitumoral. Sus mecanismos de acción son múltiples e incluyen interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, con funciones inmunomoduladoras, quimiotácticas y en el proceso de cicatrización (Téllez y Castaño, 2010; Olascoaga-Del Angel *et al.*, 2018).

Debido a intereses de este proyecto, el enfoque será en péptidos antimicrobianos de plantas, los cuales se agrupan en diferentes familias de acuerdo a sus características. Las más importantes son: defensinas, tioninas, péptidos del tipo heveínas, péptidos del tipo knotinas, proteínas que participan en la transferencia de lípidos, α -harpininas y esnaquinas (Cardillo *et al.*, 2018). Estos péptidos de plantas pueden tener diversos efectos, como antibacterianos, antifúngicos o insecticidas (Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de diferentes compuestos sobre la internalización de *S. aureus* y su viabilidad.

Compuesto	Efecto	Referencia
Prolactina bovina (bPRL, 5 ng/ml)	Incremento de la endocitosis de <i>S. aureus</i> en las CEMB (~3 veces), e inducción de la proliferación bacteriana. Este efecto fue revertido de manera específica tratando las CEMB con IgG anti-bPRL.	Ochoa <i>et al.</i> , (2007).
Butirato de sodio (0.5 mM)	Reducción de la internalización de <i>S. aureus</i> (~50%) en CEMB debido a la regulación de la expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP), β -defensina y óxido nítrico sintasa (iNOS) inducible, así como la producción de NO. Además de un aumento en la acetilación de la histona H3 en las CEMB.	Ochoa-Zarzosa <i>et al.</i> , (2009).
Tionina Thi2.1 2.5 μ g	Inhibición de la viabilidad de aislamientos de <i>S. aureus</i> de casos de mastitis bovina, por el medio condicionado de células endoteliales que expresan el péptido Thi2.1	Loeza-Ángeles <i>et al.</i> , (2010).
Colecalciferol (precursor de vitamina D, 50 nM)	Reducción de la internalización bacteriana en CEMB (~74%) y regulación diferencial de la expresión de péptidos antimicrobianos. Regulación diferencial de la respuesta inflamatoria de CEMB durante la internalización de <i>S. aureus</i> , inhibiendo la abundancia en membrana de TLR2, además reguló negativamente la expresión de ARNm de TNF- α e IL-1 β y reguló positivamente e IL-10.	Télez-Pérez <i>et al.</i> , (2012). Alva-Murillo <i>et al.</i> , (2014).
Ácido propiónico y hexanoico (1 mM)	Reducción en la internalización en CEMB ~55% y ~65%, respectivamente, además de la regulación de la expresión de péptidos antimicrobianos.	Alva-Murillo <i>et al.</i> , (2012).
γ -tionina (100 ng/ml)	Reducción de la internalización de <i>S. aureus</i> en un 50%. Reducción de actividad basal de p38 y ERK1/2, y aumento de la actividad de JNK. Además indujo la activación de histona-desacetilasas.	Díaz-Murillo <i>et al.</i> , (2016).
17 β -estradiol (50 pg/ml)	Reducción de la internalización de <i>S. aureus</i> en las CEMB (~40%). Aumento en la producción de péptidos antimicrobianos y disminución de la respuesta inflamatoria durante la infección bacteriana.	Medina-Estrada <i>et al.</i> , (2016). Medina-Estrada <i>et al.</i> , (2018).
Quitosano y compósito nisina/quitosano	Efecto bactericida sobre aislados multiresistentes de <i>S. aureus</i> (resistentes a varios antibióticos).	Sánchez-Ceja <i>et al.</i> , (2018).
Extracto rico en lípidos de la semilla de aguacate	Reducción de la internalización bacteriana (60-80%), así como la regulación de la RII en CEMB. El efecto fue correlacionado a la producción de NO y expresión génica de IL-10, así como una reducción en la expresión de TNF- α .	Báez-Magaña <i>et al.</i> , (2019).

Tabla 3. Actividad biológica de las familias de péptidos antimicrobianos de plantas.

Familia	Actividad
Tioninas	B, F y C
Defensinas	B, F y C
Ciclótidos	B, F, I y C
Tipo-Knotina	B, F
Seferdinas	B, F
MBP-1	B, F
Ib-AMPs	B, F
LTP	B, F
Esnaquinas	B, F
Tipo-Heveínas	B, F
β -Barrelinas	F
Albuminas 2S	B, F

Nota: B: Antibacteriana, F: Antifúngica, C: Citotóxica, I: Insecticida. Tomado y modificado de Guzmán-Rodríguez *et al.* (2015).

En el caso de las defensinas de plantas, estas se expresan de manera constitutiva o son inducidas en respuesta al ataque por patógenos, tienen un peso molecular de 2-10 kDa, son péptidos básicos que contienen cisteínas que forman enlaces disulfuro que les confieren estabilidad (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

Adicional a sus efectos antimicrobianos, antifúngicos y citotóxicos, en el grupo de investigación se ha analizado el efecto inmunomodulador de la defensina PaDef proveniente del aguacate criollo mexicano (*Persea americana*), y γ -tionina proveniente del chile habanero (*Capsicum chinense*), como una alternativa para mejorar la RII de las CEMB ante la infección por *S. aureus* (Díaz-Murillo *et al.*, 2016 y Báez-Magaña *et al.*; 2019). En la presente investigación se trabajó con γ -tionina por lo que a continuación se describirán sus características generales.

2.12 El papel de γ -tionina sobre la regulación de la RII en CEMB

La defensina γ -tionina se identificó a partir del transcriptoma del chile habanero (*C. chinense*) (Figura 8), en el cual se ha propuesto que actúa como agente antifúngico y se ha detectado principalmente en raíces, tallo, flores, semillas.

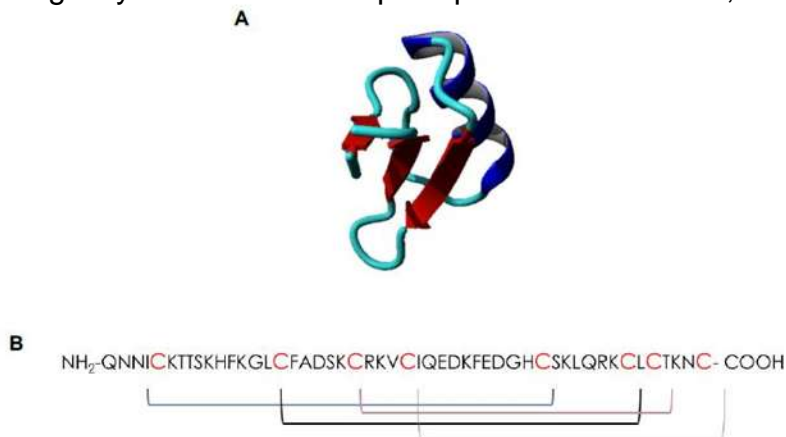


Figura 8. Estructura de la defensina γ -tionina de chile habanero. A. Estructura tridimensional putativa del péptido γ -tionina. B. Secuencia de aminoácidos de la región madura de γ -tionina. Las letras “C” agrandadas y en rojo representan las cisteínas que forman los puentes disulfuro. Tomado de Guzmán-Rodríguez *et al.* (2016).

La región madura de la defensina γ -tionina se compone de 50 aa y tiene un peso molecular de 5.7 kDa, presenta además 8 residuos de cisteína que le permiten formar 4 puentes disulfuro. Así mismo, el análisis *in silico* muestra que la molécula posee una carga neta de +5.99 y un índice de hidrofobicidad Kyte-Doolittle de 0.14, exhibiendo una distribución de los residuos con carga positiva ubicados en la hélice α , orientados hacia el exterior de la molécula, con lo cual se favorece su interacción con los residuos negativos de la membrana plasmática, facilitando la formación de poros transitorios para que el péptido se internalice en las células (Guzmán-Rodríguez, 2016).

En lo que respecta al papel del péptido γ -tionina sobre la regulación de la RII, en el grupo de trabajo se ha reportado que una concentración de 100 ng/ml favorece la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB en un 50% (Díaz-Murillo *et al.*, 2016), favoreciendo principalmente una respuesta pro-inflamatoria. Al

parecer, la regulación de la RII de las CEMB ejercida por esta defensiva es consecuencia de la activación del receptor TLR2, el cual es el principal receptor de reconocimiento de *S. aureus*. Respecto a FAK, la cual está involucrada en la respuesta inflamatoria mediada por TLR2, no se detectaron cambios en su actividad basal. Por otra parte, se detectó una reducción de la activación basal de las cinasas p38 y ERK1/2 y un aumento en la activación de JNK (Figura 9) (Díaz-Murillo *et al.*, 2016).

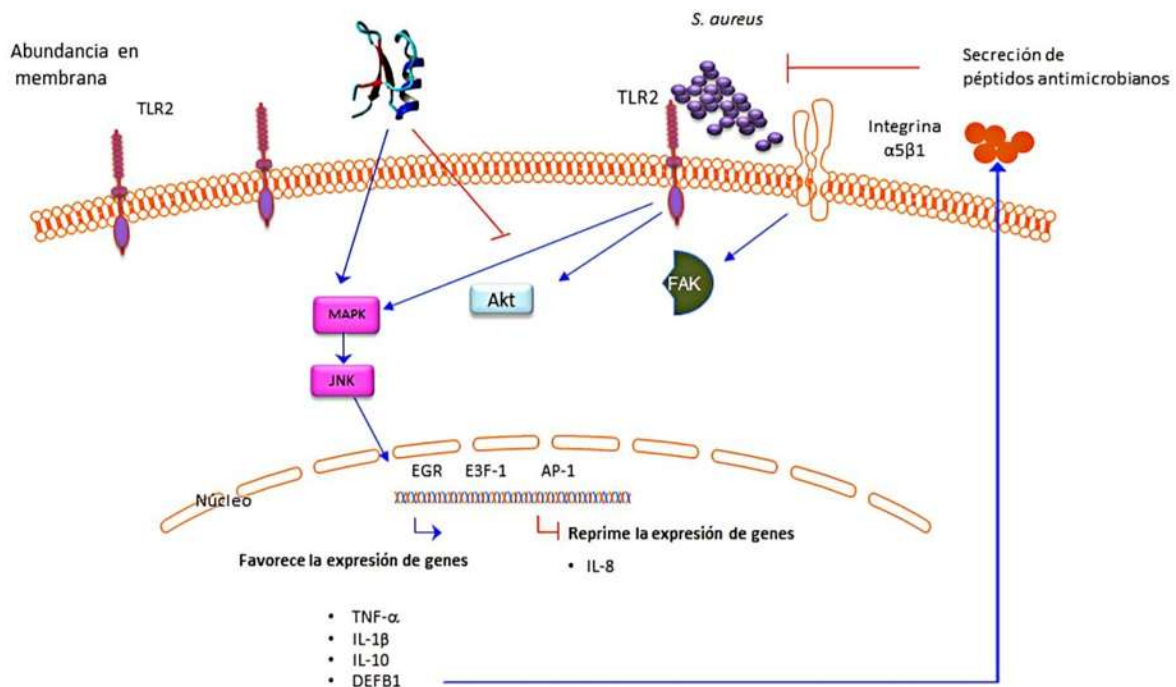


Figura 9. Efecto inmunomodulador del péptido γ -tionina sobre las CEMB. El péptido γ -tionina activa la cinasa JNK favoreciendo la expresión de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β . Por otra parte, indujo la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, así mismo, indujo la producción de NO) la secreción del péptido antimicrobiano DEF B1 (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Modificada de Tomado de Medina-Estrada *et al.* (2018).

2.13 Tratamientos combinados con péptidos antimicrobianos contra *S. aureus*

Debido a que el propósito central de este proyecto fue evaluar el potencial del tratamiento conjunto de la defensiva γ -tionina y el 17 β -estradiol sobre la reducción de la internalización de *S. aureus* en CEMB, y la regulación de elementos de la RII

esperando obtener mejores efectos que los obtenidos de forma individual con cada molécula, resulta importante definir los posibles resultados al probar el potencial de tratamientos combinados.

Un método adecuado para estudiar la actividad antimicrobiana es el llamado ensayo de tablero de ajedrez, a partir del cual se obtiene el índice de fracción inhibitoria (FIC) y se determina el tipo de efecto obtenido. Se obtiene un efecto de sinergia si el índice FIC es ≤ 0.5 ; de adición si oscila entre >0.5 y ≤ 1.0 ; indiferencia si varía entre >1.0 - ≤ 2.0 y antagonismo cuando es >2.0 . Un efecto es aditivo si el efecto total es igual a la suma de los efectos individuales; si el efecto total es mayor a la suma de los efectos individuales se trata de un efecto sinérgico; sin embargo, un efecto es antagónico si el efecto total es menor que la suma de los efectos individuales (Zerweck, *et al.*, 2017; Bolatchiev, *et al.*, 2020).

En el mismo sentido, en la literatura se encuentran reportados tratamientos en los que se combinan dos compuestos para potenciar su actividad contra *S. aureus*. Se ha reportado sinergia en cuanto a actividad antimicrobiana de diversos péptidos, como en el caso del péptido MSI-103 diseñado a partir del péptido membranolítico α -helicoidal anfifílico de piel de rana PGLa, que en combinación 1:1 con el péptido magainina 2 (MAG2) mostró un efecto antimicrobiano sinérgico contra *E. coli* y *S. aureus* a una concentración de 0.03 mM (Zerweck *et al.*, 2017).

Además, se han empleado péptidos de penetración celular (CPP) como vehículos para mejorar la entrega intracelular de numerosas moléculas terapéuticas. Randhawa *et al.* (2016) investigaron los efectos de dos CPP (P3 y P8) en combinación con cuatro antibióticos (oxacilina, eritromicina, norfloxacin y vancomicina), encontrando que ambos CPP se internalizaron en bacterias MRSA de manera eficiente a muy baja concentración ($<10 \mu\text{M}$), observándose una relación entre la concentración del péptido y el tipo de efecto obtenido en la penetración (efecto sinérgico, aditivo o antagónico). Las combinaciones de CPP ($\leq 10 \mu\text{M}$) y los antibióticos mostraron alta toxicidad contra las bacterias MRSA en comparación con los antibióticos solos. Con esta investigación encontraron que P3 y P8 podrían reducir los MIC de la oxacilina, norfloxacin y vancomicina a niveles

sensibles (generalmente $<1 \mu\text{g/ml}$), para casi todos los cinco aislamientos clínicos en los que se probó.

Por otra parte Kang (2021), desarrolló un péptido antimicrobiano análogo de PEP27 (un péptido autolítico que funciona como un importante factor de virulencia de *Streptococcus pneumoniae*), con sustituciones del aminoácido triptófano para mejorar su actividad antimicrobiana. Este péptido denominado PEP27-2, mostró una fuerte actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de bacterias, incluidas las bacterias multirresistentes (MDR). Actuando como un péptido de penetración celular efectivo en células bacterianas y de mamíferos. El modelo de estudio fue con ratones infectados de forma subcutánea con *S. aureus* MDR tratados con una combinación del péptido con antibióticos, obteniendo efectos sinérgicos, reduciendo notablemente el tamaño del absceso y mejorando la tasa de eliminación de bacterias del sitio de la infección. Además, el tratamiento combinado con PEP27-2 y antibióticos redujo la inflamación, reduciendo los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS y la ciclooxigenasa (COX-2) en el tejido del absceso cutáneo. Los resultados de esta investigación sugieren que el péptido PEP27-2 es una opción terapéutica prometedora para combatir las cepas bacterianas MDR al mejorar la penetración de los antibióticos y proteger contra las bacterias MDR (Kang, 2021).

Existen más investigaciones respecto a efectos sinérgicos antimicrobianos contra *S. aureus* entre diversos péptidos y antibióticos como las mostradas en la Tabla 4. Como se ha mencionado, este microorganismo tiene la característica de evadir al sistema inmune internalizándose para sobrevivir de forma intracelular. En estos casos la sinergia se presenta debido a que los péptidos provocan la aparición de poros en las membranas celulares lo que contribuye que el antibiótico pueda penetrar y hacer su trabajo de manera más eficiente. Sin embargo, a la fecha no hay reportes de efectos sinérgicos presentados en tratamientos que incluyan un péptido antimicrobiano con la capacidad de regular la RII y una hormona, como el 17 β - estradiol, la cual tiene como principal blanco a las CEMB. En conjunto estos compuestos podrían regular vías de señalización diferentes logrando una

respuesta más robusta, por lo que resulta interesante analizar el efecto conjunto de estos compuestos sobre la regulación de elementos de la RII en el proceso de infección de las CEMB por el patógeno *S. aureus*.

Tabla 4. Actividad sinérgica reportada entre péptidos antimicrobianos y antibióticos.

Efecto	Referencia
Efecto bactericida sinérgico entre el péptido tetramérico Lactoferricina Bovina LfcinB y vancomicina contra <i>S. aureus</i> (FIC índice 0.06).	Vargas <i>et al.</i> , (2018).
Efecto antibiótico sinérgico del extracto de <i>Calliandra surinamensis</i> y tetramicina contra <i>S. aureus</i> (FIC índice 0.250).	Procopio <i>et al.</i> , (2019).
Efecto sinérgico <i>in vivo</i> en un modelo de herida de ratón con una terapia combinada con PL-5 y clorhidrato de levofloxacin en la disminución significativa del número de UFC de <i>S. aureus</i> .	Feng <i>et al.</i> , (2015).

3. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina constituye una enfermedad relevante para la ganadería lechera ya que representa en muchas ocasiones gastos por servicios veterinarios o desecho de animales que cursan con infecciones crónicas y sin signos aparentes, como las infecciones ocasionadas por *S. aureus*. Esta bacteria puede persistir en el interior de las CEMB, lo que dificulta su tratamiento, por lo que se han buscado estrategias para mejorar la RII de las células epiteliales que permitan eventualmente una mejor defensa de este tejido evitando la internalización bacteriana. En este sentido, el 17β -estradiol, hormona sexual reproductiva que actúa naturalmente sobre las CEMB, muestra efectos inmunomoduladores sobre este tejido a través del ER- α reduciendo la internalización bacteriana. Efectos similares se han reportado en el grupo de trabajo para γ -tionina, perteneciente a péptidos de la familia de las defensinas de las plantas, a través de la regulación de la ruta del receptor TLR2 en las CEMB.

Con base en el hecho de que tanto el 17β -estradiol como la γ -tionina activan diferentes rutas relacionadas con la RII en las CEMB, en el presente trabajo se analizó si el tratamiento conjunto de estas moléculas mejora el efecto individual de las mismas en la reducción de la internalización de *S. aureus* en las CEMB, mediante la regulación de elementos de la RII.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento conjunto de la defensina γ -tionina y el 17β -estradiol mejora el efecto individual de estas moléculas en la reducción de la internalización de *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas, así como en la regulación de elementos de la RII.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento conjunto de la defensina γ -tionina y el 17β -estradiol sobre la internalización de *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas y la regulación de elementos de la RII.

5.2 Objetivos particulares

- 1 Evaluar el efecto del tratamiento conjunto de la defensina γ -tionina y 17β -estradiol sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las células epiteliales mamarias bovinas.
- 2 Determinar el tratamiento conjunto de la defensina γ -tionina y 17β -estradiol que presente el mejor efecto sobre la reducción de la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas.
- 3 Evaluar la secreción de elementos de la respuesta inmune innata en células epiteliales mamarias bovinas tratadas con γ -tionina y 17β -estradiol y su efecto sobre la viabilidad de *S. aureus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

Se evaluó la viabilidad de *S. aureus* y CEMB tratadas con 17β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) (Figura 10) mediante ensayos de azul tripano y MTT.

Además, en las CEMB crecidas a un 80% de confluencia previamente tratadas:

- Se evaluó la inducción de la apoptosis.
- Se determinó el efecto de los tratamientos sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.
- Se recuperaron los medios condicionados de los tratamientos para desafiar a *S. aureus* y evaluar la viabilidad de la bacteria.
- Se evaluó la producción de NO en los medios condicionados con y sin infección.

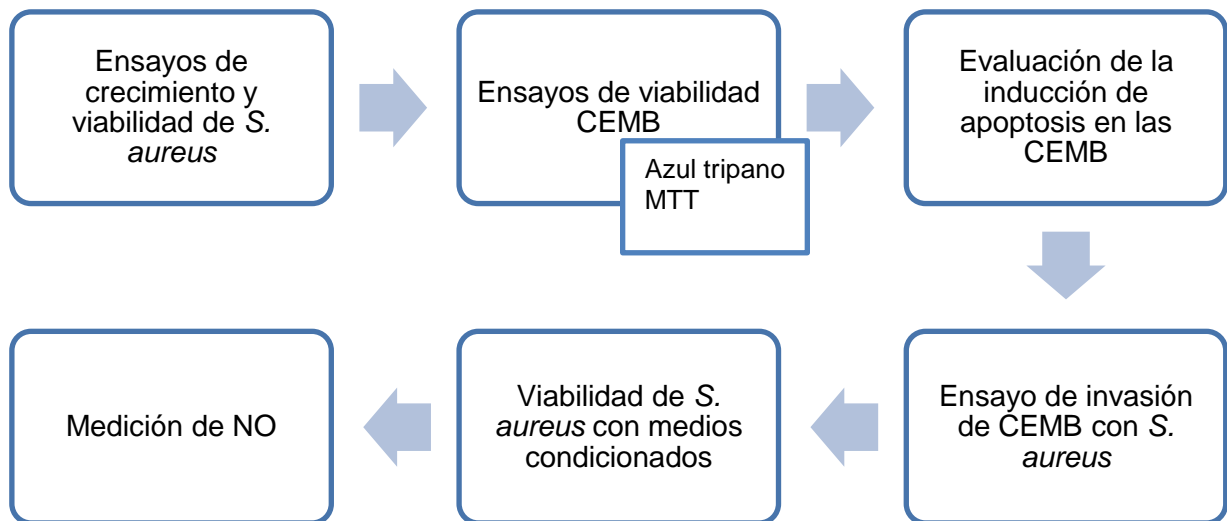


Figura 10. Estrategia experimental general.

6.2 Reactivos y cepas

Se adquirió 17β -estradiol de Sigma y se utilizó una concentración de 50 pg/ml (Medina-Estrada *et al.*, 2016). Así mismo, se trabajó con γ -tionina de *C. chinense* (51 aa) (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) sintetizada por Biomatik. Como controles se emplearon los vehículos: etanol 1% para la hormona, DMSO 0.02% para el péptido, y una mezcla de ambos.

En este 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 las CEMB (Anaya-López *et al.*, 2006).

6.3 Diseño experimental

Se establecieron tres diseños experimentales con las dos moléculas (Figura 11).

1. En el primer tratamiento el 17β -estradiol se adicionó al medio de cultivo 24 h previo a la adición del péptido. Posteriormente, se agregó γ -tionina, y las células se cultivaron por 24 h adicionales en presencia de las dos moléculas.
2. En el segundo tratamiento, el péptido γ -tionina se adicionó al medio de cultivo 24 h previo a la adición de la hormona. Luego se adicionó 17β -estradiol, y las células se cultivaron por 24 h adicionales en presencia de las dos moléculas.
3. El tercer tratamiento consistió en agregar de manera conjunta γ -tionina y 17β -estradiol con un tiempo de incubación de 24 h.

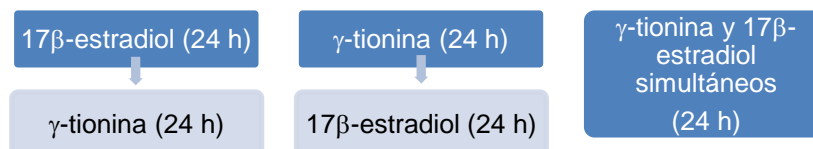


Figura 11. Diseño experimental para determinar las interacciones entre γ -tionina y 17β -estradiol sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

6.4 Cultivo de *S. aureus*

La bacteria se cultivó 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), y se incubó a 37°C durante 12-14 h. Para los experimentos, el cultivo bacteriano se ajustó a una D.O. de 0.2 (600 nm), la cual equivale a 9.2×10^7 UFC/ml (Medina-Estrada *et al.*, 2016).

6.5 Cultivo de CEMB

Se trabajó con el cultivo primario de CEMB (pasajes 2-8) obtenidas del tejido alveolar de la ubre de una vaca en estado lactante y libre de mastitis bovina. Las CEMB se cultivaron en placas de Petri 100 x15 mm (Costar) a una densidad de 1×10^5 células/ml en medio de crecimiento (GM) compuesto por Medio Eagles modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma), suplementado con 10% de suero de ternera (FCS) (Equitech-Bio), 10 µg/ml de insulina (Sigma), 5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 100 U/ml de penicilina y estreptomycin y 1 µg/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 (Anaya-López *et al.*, 2006).

6.6 Ensayo de viabilidad de *S. aureus*

Para evaluar la viabilidad bacteriana, *S. aureus* se cultivó toda la noche en medio LB y posteriormente se ajustó la D.O. a 0.2 (600 nm equivalente 9.2×10^7 UFC/ml). Después la bacteria se creció con los diferentes tratamientos en tubos falcón de 15 ml, teniendo un volumen total de 2 ml y se monitoreó el crecimiento bacteriano cada 2 h, midiendo la D.O. hasta un tiempo de 24 h.

Así mismo, a partir del cultivo, después de 2 y 24 h con los tratamientos, se realizó una dilución de 1: 1,000,000 y se distribuyó en cajas Petri (10x15mm) con agar LB mediante el uso de perlas de vidrio. Las cajas se incubaron 24 h a 37°C y

posteriormente se llevó a cabo el conteo de colonias empleando el contador de colonias automático (Interscience, Scan®500).

6.7 Ensayos de viabilidad de las CEMB

La medición de la viabilidad de las CEMB se realizó mediante el ensayo de azul tripano, el cual mide la viabilidad basándose en la integridad de la membrana, y mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) que mide la viabilidad basándose en la actividad metabólica de las células. Para estos ensayos se incubaron 10,000 células/pozo en una placa de 96 pozos durante 24 h con medio F12 completo. Posteriormente se incubaron 24 h con medio F12 incompleto, finalizado este tiempo se agregaron los tratamientos conjuntos de 17 β -estradiol con γ -tionina (Figura 11).

Para el ensayo de azul tripano el siguiente paso fue retirar los tratamientos y despegar las células mediante el uso de tripsina, la cual se inactivó con medio completo. Posteriormente se tomaron 10 μ l de las células y se mezclaron con 10 μ l de azul tripano y se cargaron a la cámara de conteo, la cual se colocó en el contador de células automatizado (BIO-RAD, TC20).

Para el ensayo de MTT, una vez que se retiraron los tratamientos se agregaron 10 μ l de MTT y 90 μ l de medio F12 y se incubó durante 4 h. Al término de ese tiempo se retiró el MTT y se agregó HCl: Isopropanol 1:19 para favorecer la formación de cristales violetas y se leyó en un lector de micro-placas (BIORAD) a una longitud de onda de 595 nm (Medina-Estrada, 2017).

6.8 Evaluación de la inducción de la apoptosis en las CEMB

Para este ensayo se cultivaron 150,000 células en placa de 24 pozos. Como controles se usaron células sin tratamiento con y sin los fluorocromos (7AAD y anexina V), células tratadas con actinomicina teñidas con anexina como control de

apoptosis y células tratadas con EDTA teñidas con 7AAD como control de necrosis.

Una vez transcurridas las 24 h con los tratamientos (Figura 11), las células se despegaron con tripsina, se recuperaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml junto con los sobrenadantes, posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se procedió a agregar 10 µl PBS sin resuspender y se centrifugó a 2,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y posteriormente se agregaron 10 µl de anexina y 10 µl de 7AAD ya diluidos (se diluyó 1 µl de anexina en 39 µl de buffer y 1 µl de 7AAD en 249 µl de buffer) a los pozos tratados y, se esperó 15 minutos a que la células se tiñeran. Enseguida se agregaron 80 µl del buffer de anexina (se preparó mezclando 100 µl de HEPES 1M, 90 µl de agua destilada estéril filtrada, 1,400 µl de una solución de NaCl 1M, 25 µl de una solución de CaCl₂ 1M y 500 µl de agua desionizada estéril filtrada, pH a 7.4 y se lleva a un volumen final de 10 ml con agua desionizada estéril filtrada) y se procedió a resuspender las células y a leer en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD-Bioscience). Se colectaron 10,000 eventos, a una velocidad de flujo media. Finalmente, el análisis se realizó con el software flowjo FlowJo™ v10.8.

6.9 Ensayo de invasión de *S. aureus* en las CEMB

Para llevar a cabo el ensayo de invasión, se sembraron las CEMB (1.5×10^5 células/ml) en placas de 24 pozos. Posteriormente, se sincronizaron con medio F12 incompleto y al día siguiente se agregaron los tratamientos correspondientes (Figura 11). Una vez finalizadas las 24 h de tratamiento, las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 30:1 (bacterias por célula). Para esto se incubaron con una suspensión de *S. aureus* ajustada a una densidad óptica de 0.2 nm (9.2×10^7 UFC/ml) durante 2 h en 5% CO₂ a 37°C (Medina-Estrada, 2017).

Finalizado el tiempo de infección, las monocapas de las CEMB se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se trataron con 80 µg/ml de gentamicina durante 1 h en 5% CO₂ a 37°C. Luego, las monocapas de las CEMB se separaron con

tripsina, se recuperaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, posteriormente los tubos se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se agregó 250 µl de agua destilada estéril a cada tubo para lisar la células. Los lisados de las CEMB se diluyeron en proporción 1:100, se cultivaron por triplicado en cajas Petri con agar LB y se incubaron durante toda la noche a 37°C. El número de UFCs se determinó mediante un contador automático de colonias (Interscience, Scan®500) (Anaya-López *et al.*, 2006).

6.10 Efecto del medio condicionado de las CEMB sobre la viabilidad de *S. aureus*

Para evaluar si el medio condicionado tiene un efecto sobre la viabilidad bacteriana, una vez transcurridas las 24 h con los tratamientos (Figura 11) se recuperó el medio condicionado de las CEMB (previamente crecidas en placas de 24 pozos). Por otra parte, se procedió a centrifugar en tubos de microcentrifuga un volumen del inóculo de *S. aureus* equivalente a la MOI usada en los ensayos de invasión, se recuperó la pastilla de bacterias y se resuspendió en 1 ml del medio condicionado previamente recuperado. Posteriormente se incubó 2 h a 37°C en agitación, después de este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se recuperó la pastilla de bacterias, la cual se resuspendió en 250 µl de medio LB, se hizo una dilución 1:1,000,000 y se cultivó en cajas con agar LB, las cuales se incubaron a 37°C toda la noche. Finalmente, el número de UFCs se determinó mediante un contador automático de colonias (Interscience, Scan®500).

6.11 Cuantificación de óxido nítrico (NO)

Mediante la recolección de los sobrenadantes de CEMB tratadas con 17β-estradiol (50 pg/ml) y γ-tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) con y sin infectar con *S. aureus*, se cuantificó la producción de NO de forma indirecta mediante la reacción de

Griess (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008), que mide la producción de nitrito (NO_2^-). La reacción de Griess se llevó a cabo mezclando un volumen igual de la solución A (10% sulfanilamida y 40% de ácido fosfórico, Sigma) y de la solución B [1% N-(1-naftiletilendiamida dihidroclorada, Sigma) con la muestra problema. Posteriormente la concentración de NO_2^- se determinó por medio de una curva estándar de NaNO_2 en medio F12 incompleto estéril (0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM). Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Varioskan™ Flash spectral scanning multimode reader).

6.12 Análisis estadístico

Los datos que se muestran provienen de tres experimentos independientes, por triplicado, los cuales se compararon mediante una *t*-student. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Con excepción de la curva de crecimiento de *S. aureus* en donde los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA y la prueba post hoc fue HSD Tukey.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de los tratamientos con 17β -estradiol y γ -tionina sobre el crecimiento y viabilidad de *S. aureus*

Debido a que se ha reportado que a ciertas concentraciones el péptido γ - tionina presenta actividad antimicrobiana, se evaluó la actividad bacteriostática y antimicrobiana de los tratamientos conjuntos para descartar efectos antimicrobianos con las concentraciones seleccionadas. Para ello, se determinó el crecimiento bacteriano a través del tiempo mediante la medición de la densidad óptica (600 nm) (Figura 12). De acuerdo a los resultados obtenidos, los tratamientos con 17β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) no afectaron el crecimiento de *S. aureus* en ninguno de los tiempos y concentraciones evaluados, habiendo una diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de los tiempos. Sin embargo, mediante la recuperación de UFC's a las 24 h se observó que el tratamiento de 17β -estradiol y γ - tionina (200 ng/ml) mostró una reducción de la viabilidad del 34.7%, mientras el resto de los tratamientos no afectaron la viabilidad bacteriana (Figura 13).

Así mismo, se llevó a cabo la recuperación de UFC's a las 2 h con los tratamientos, ya que este es el tiempo que se mantiene en contacto *S. aureus* con las CEMB en los ensayos de infección (Figura 14). En este ensayo hubo diferencia significativa entre el control y el tratamiento con 17β -estradiol y γ - tionina a 25 ng/ml, el cual mostró un aumento del 17.8% de UFC recuperadas respecto al vehículo. En lo que respecta al tratamiento de 17β -estradiol y γ - tionina a 150 ng/ml, este mostró una disminución de la viabilidad bacteriana de 19.4%.

7.2 Efecto de los tratamientos con 17β -estradiol y γ -tionina sobre la viabilidad de las CEMB

Por otra parte, se evaluó si los tratamientos afectaban la viabilidad de las CEMB mediante ensayos de azul tripano y MTT. En el ensayo de azul tripano las células

vivas con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio el colorante penetra en las células con lesión de la membrana celular ocasionando que tomen una coloración azul. En la Figura 15 se observa que los diferentes grupos de tratamientos no tienen diferencia significativa respecto al control, lo cual es un indicio de que los tratamientos no afectaron la viabilidad celular.

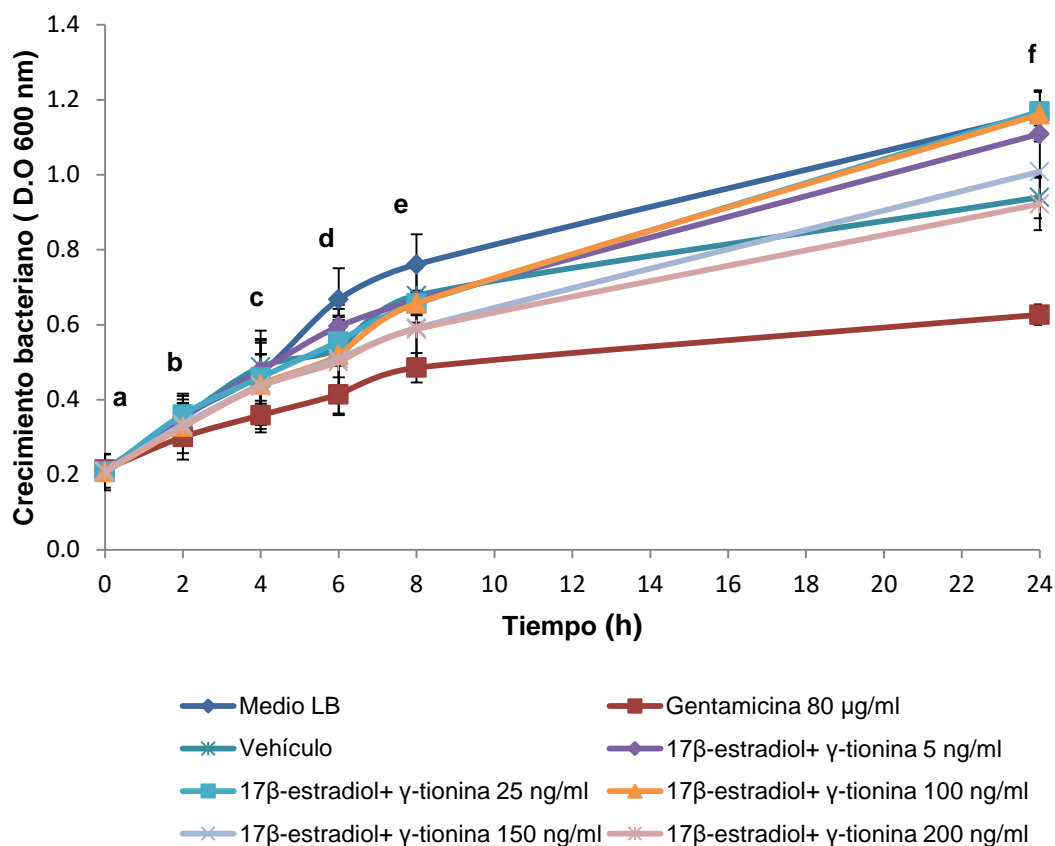


Figura 12. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17β -estradiol sobre el crecimiento de *S. aureus*. La bacteria se cultivó toda la noche, luego se ajustó la D.O. (600 nm) a 0.2 (9.2×10^7 /ml) y se adicionaron los tratamientos 17β -estradiol (50 pg/ml) + γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a *S. aureus* tratado con una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Los datos se analizaron mediante una ANOVA y la prueba post hoc fue HSD Tukey. Letras diferentes indican cambios significativos entre los diferentes tiempos de incubación ($p < 0.05$).

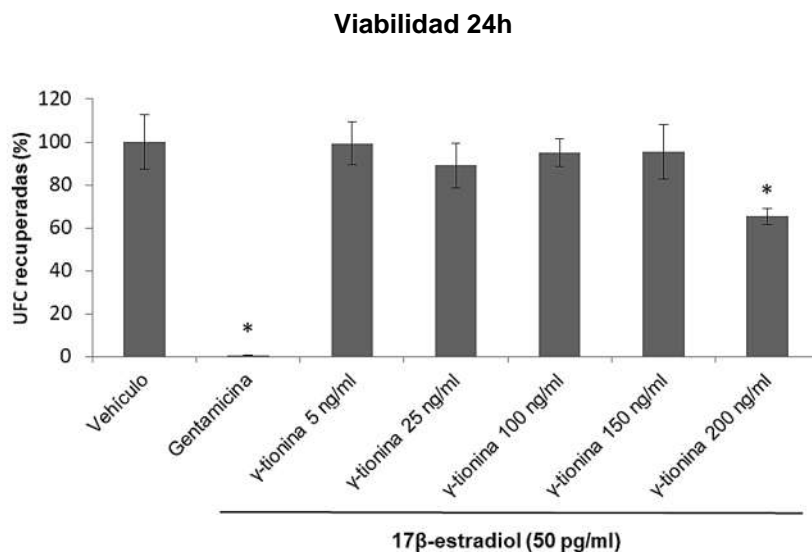


Figura 13. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de *S. aureus* determinada a las 24 h. Se determinaron las UFC a las 24 h de los tratamientos conjuntos de 17 β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a *S. aureus* tratado con una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

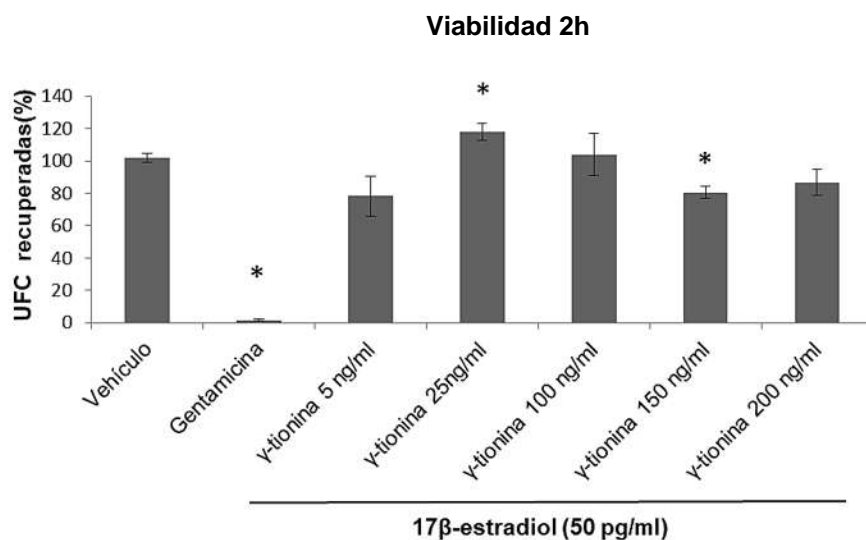


Figura 14. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de *S. aureus* determinada a las 2 h. Se determinó mediante el conteo de UFC a las 2 h de cultivo en presencia de los tratamientos de 17 β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a *S. aureus* tratado con una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

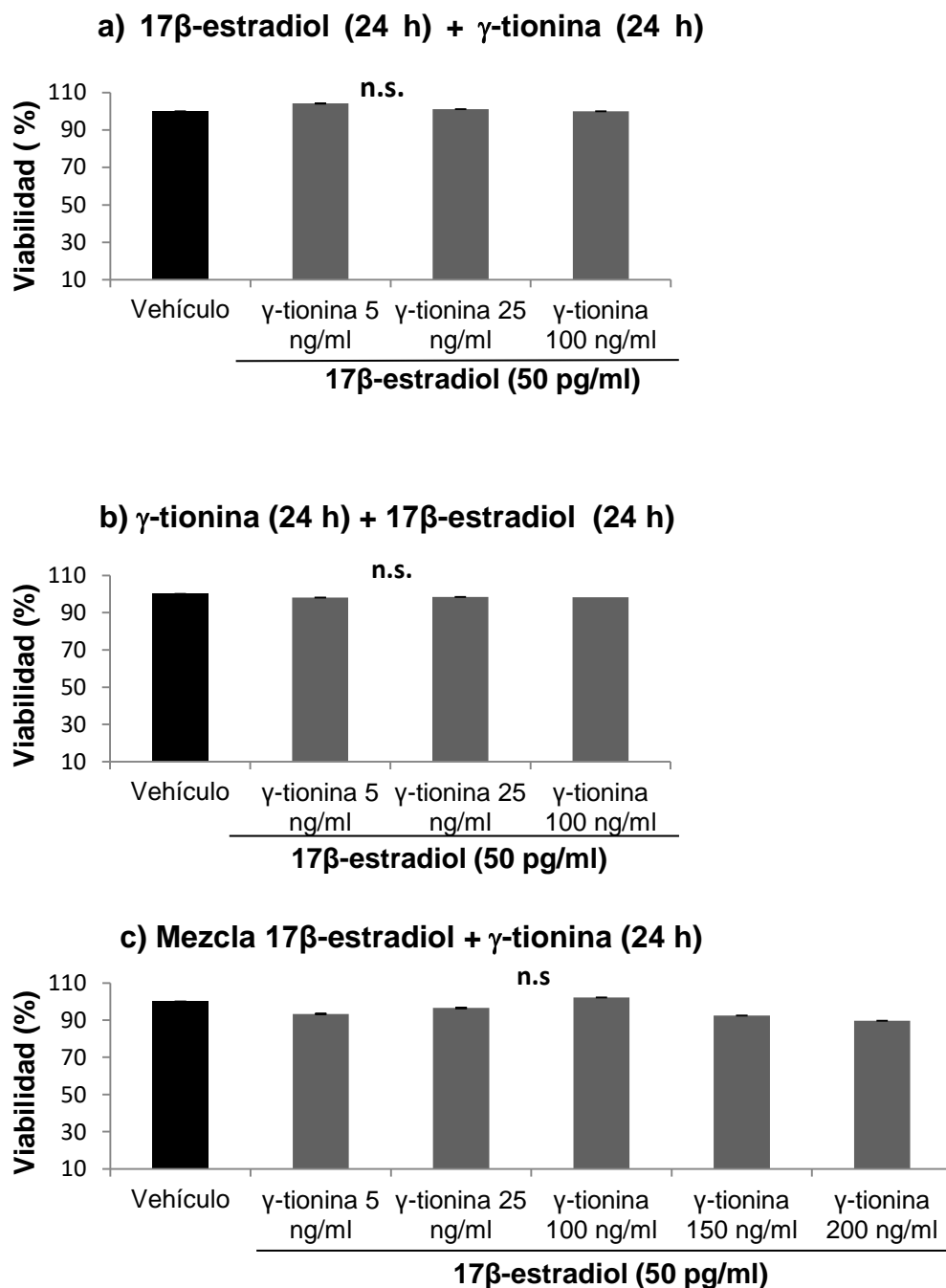


Figura 15. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de CEMB determinada por azul tripano. La viabilidad celular se midió a través del ensayo de azul tripano para los tratamientos de 17 β -estradiol + γ tionina: a) Se agregó 17 β -estradiol (50 pg/ml) 24 h y luego γ -tionina (5, 25, 100 ng/ml), b) invirtiendo el orden de adición, y c) la mezcla de ambos al mismo tiempo. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos respecto y el vehículo, se usó una $p < 0.05$ (n.s.= no significativo).

Por otra parte, se midió la viabilidad mediante el ensayo basado en la reducción metabólica del MTT, cuyos resultados se muestran en la Figura 16. En el primer arreglo experimental (Figura 16 a), los tratamientos de 17β -estradiol con γ -tionina (5 y 100 ng/ml) mostraron diferencias estadísticamente significativas en su porcentaje de viabilidad respecto al vehículo de 75.26 y 79.79%, respectivamente. En el segundo arreglo experimental (Figura 16 b), se observó que al igual que en el arreglo anterior, los tratamientos que incluyen γ -tionina a las concentraciones de 5 y 100 ng/ml presentaron una disminución de la viabilidad respecto al control, de 82.70 y 82.78%, respectivamente. Finalmente, en el tercer arreglo experimental (Figura 16 c) únicamente el tratamiento que contenía γ -tionina (5 ng/ml) mostró una disminución de la viabilidad de 83.89% respecto al vehículo usado como control.

De acuerdo a estos resultados, el tratamiento de 17β -estradiol con 5 ng/ml de γ -tionina disminuyó la viabilidad celular en los tres arreglos experimentales, mientras que la concentración de 25 ng/ml no afectó la viabilidad en ningún arreglo experimental.

7.3 Efecto de los tratamientos con γ -tionina y 17β -estradiol sobre la inducción de la apoptosis en las CEMB

La inducción de la apoptosis de las CEMB por los tratamientos se evaluó mediante citometría de flujo y tinción Anexina V/7AAD. De acuerdo a los resultados obtenidos existe una diferencia significativa entre el vehículo y la actinomicina usada como control positivo de la apoptosis (Figura 17a). El único tratamiento que indujo apoptosis (22.22% con respecto al vehículo) en las CEMB fue la mezcla de 17β -estradiol y γ -tionina (25 ng/ml) (Figura 17h).

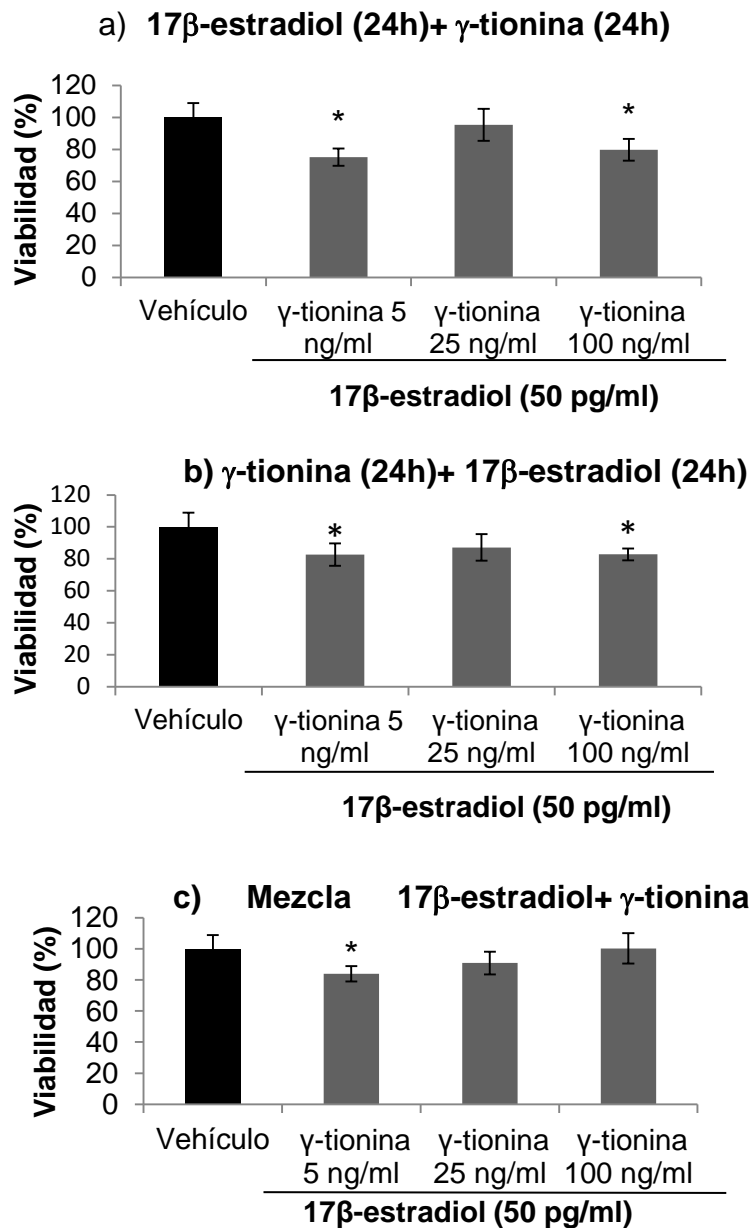


Figura 16. Efecto de los tratamientos de γ -tionina y 17 β -estradiol sobre la viabilidad de CEMB determinada por MTT. La viabilidad se midió mediante el ensayo de MTT para los tratamientos de 17 β -estradiol + γ -tionina: a) agregando 17 β -estradiol 24 h (50 pg/ml) y luego γ -tionina (5, 25, 100 ng/ml), b) invirtiendo el orden de adición y c) la mezcla de ambos. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

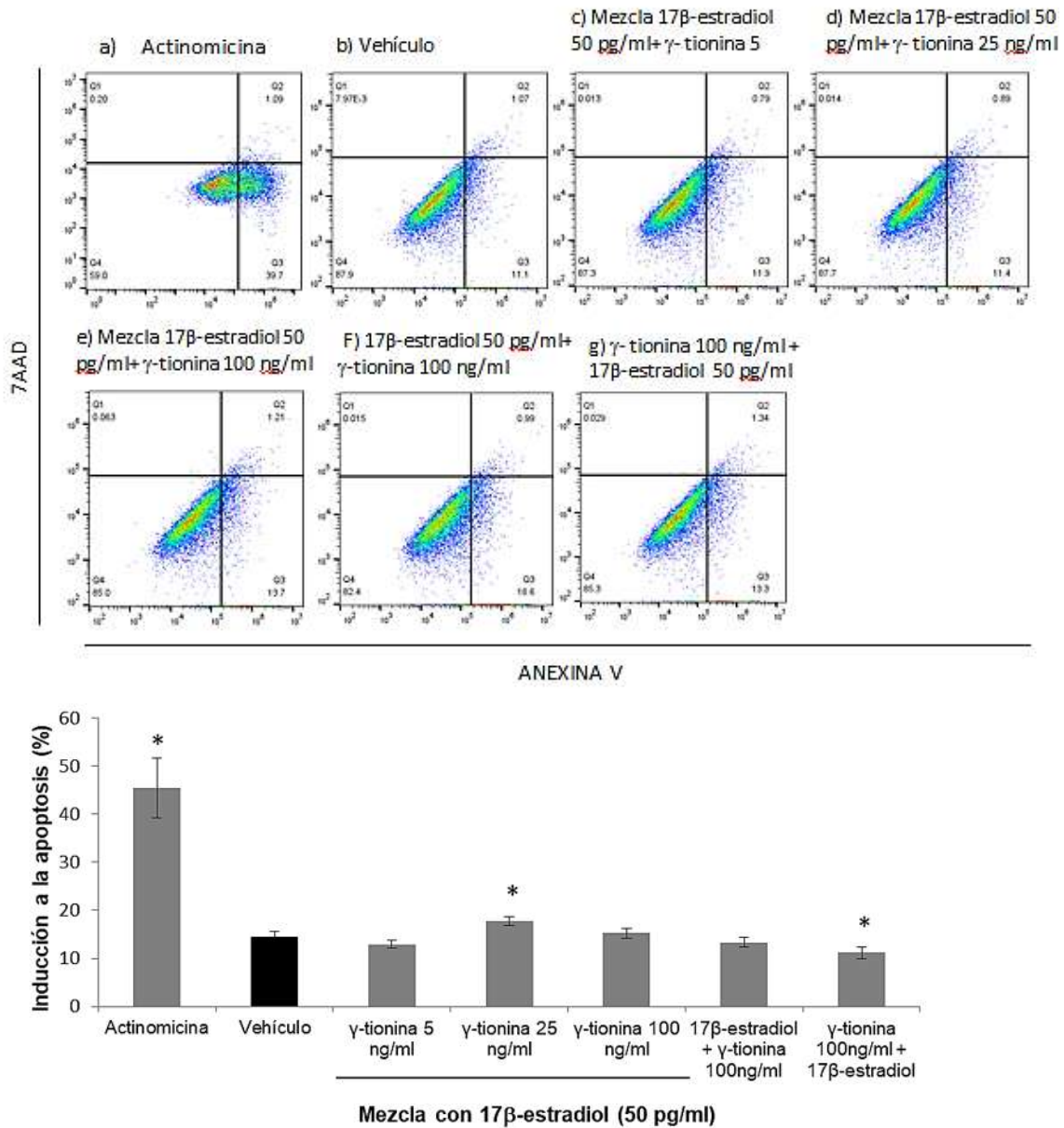


Figura 17. Evaluación de la inducción de apoptosis de las CEM6 por la combinación de γ -tionina y 17 β -estradiol.

Se evaluó la apoptosis mediante citometría de flujo y tinción con anexina V/7AAD. a) actinomicina, b) vehículo, c) mezcla 17 β -estradiol y γ - tionina (5 ng/ml), d) mezcla 17 β -estradiol y γ - tionina (25 ng/ml), e) mezcla 17 β -estradiol y γ - tionina (100 ng/ml), f) 17 β -estradiol + γ - tionina (100 ng/ml), g) γ -tionina (100 ng/ml) + 17 β -estradiol, y h) Grafica de inducción a la apoptosis por tratamiento. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. La significancia estadística se estableció por la prueba de t-Student. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

7.4 Efecto de los tratamientos con γ -tionina y 17β -estradiol sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB

La internalización bacteriana es uno de los principales mecanismos de evasión de la RII del hospedero que posee *S. aureus*, y una de las causas más importantes de la persistencia de la infección en la mastitis bovina crónica. En primer lugar se realizaron ensayos de invasión para el arreglo experimental de la mezcla de compuestos, en donde se agregó de forma simultánea el péptido y la hormona durante un tiempo de 24 h (Figura 18), ya que con ese arreglo experimental se observó una menor disminución de la viabilidad celular (ver Figura 16c). De acuerdo a las UFC recuperadas, el tratamiento de γ -tionina (100 ng/ml)/ 17β -estradiol fue la que tuvo un mayor efecto sobre la internalización bacteriana, ya que esta disminuyó ~50%.

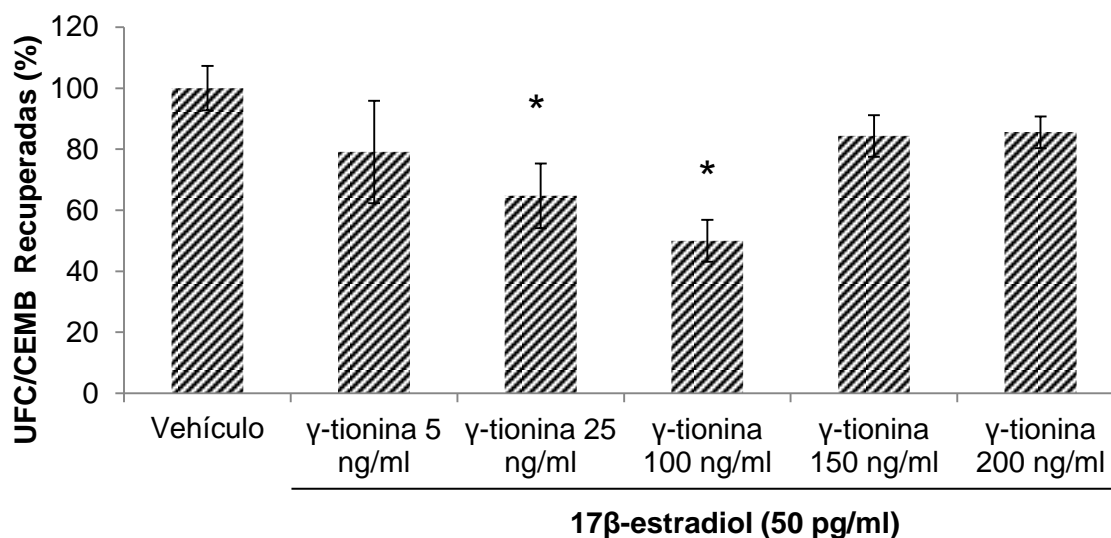


Figura 18. Efecto de la mezcla de γ -tionina y 17β -estradiol sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Se evaluó la internalización bacteriana mediante ensayos de protección con gentamicina, en donde después de lisar las células se realizó un cultivo en agar LB para finalmente llevar a cabo el conteo de UFC's. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

Debido a que en el tratamiento con la concentración de 100 ng/ml de γ - tionina se obtuvo el mejor resultado, se realizaron ensayos de invasión con esa concentración de péptido para los otros arreglos experimentales (Figura 19). No obstante, en ninguno de estos arreglos se mejoró el efecto sobre la disminución de la internalización bacteriana.

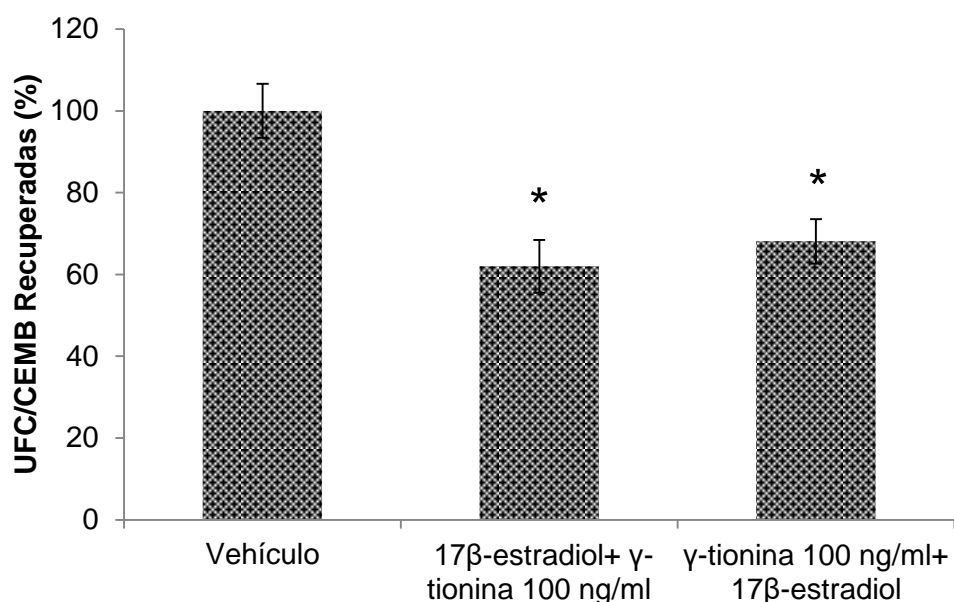


Figura 19. Efecto de la combinación de γ - tionina (100 ng/ml) y 17β-estradiol sobre la internalización de *S. aureus* en las CEMB. Se evaluó la internalización bacteriana mediante ensayos de protección con gentamicina, en donde después de lisar las células se realizó un cultivo en agar LB para finalmente llevar a cabo el conteo de UFC's. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo ($p < 0.05$).

7.5 Efecto de los medios condicionados de los tratamientos de γ -tionina y 17β-estradiol sobre la viabilidad de *S. aureus*

Con el objetivo de evaluar el efecto de los medios condicionados sobre la viabilidad de *S. aureus*, se creció la bacteria con los medios recuperados de las CEMB después de los tratamientos en los que se agregó el péptido γ - tionina y el 17-β estradiol de manera simultánea. Los resultados mostraron una gráfica con

forma de campana invertida, en donde únicamente con el medio condicionado de las CEMB tratadas con γ - tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml) se obtuvo una reducción del 31.4% de la viabilidad bacteriana (Figura 20).

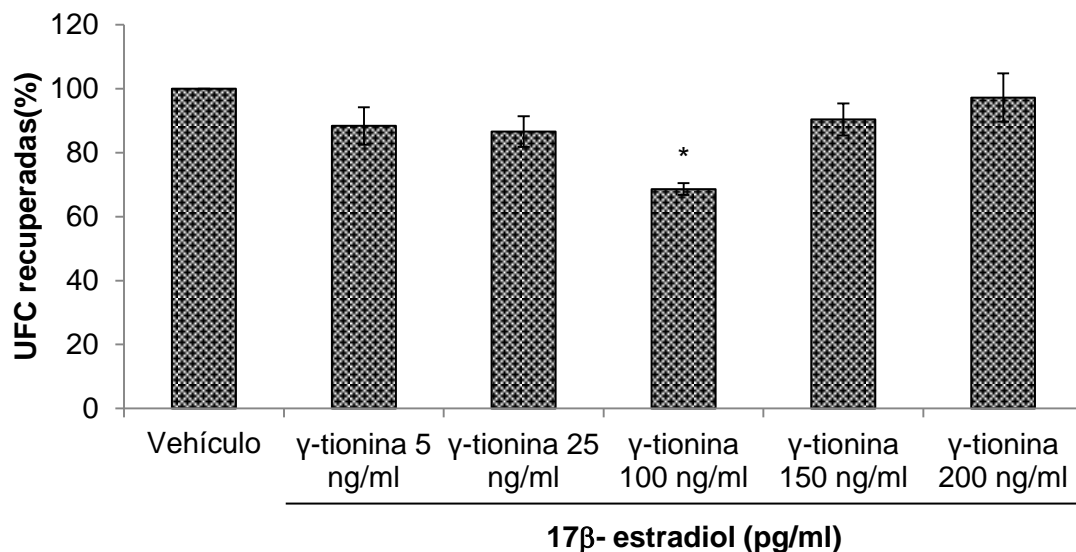


Figura 20. Efecto de los medios condicionados de las CEMB tratadas con la defensa γ -tionina y el 17β -estradiol sobre la viabilidad de *S. aureus*. Se evaluó la viabilidad de *S. aureus*, inoculando la bacteria durante 2h con los medios condicionados de las CEMB crecidas con los tratamientos de γ -tionina (5, 25, 50, 100, 150 y 200 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de t-Student para encontrar diferencias significativas. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo (n.s. = no significativo, * $p < 0.05$).

7.6 Efecto de los tratamientos con 17β -estradiol y γ -tionina sobre la producción de NO en las CEMB

La cuantificación de NO se llevó a cabo con los medios condicionados de las CEMB tratadas con γ -tionina y 17β -estradiol y los medios recuperados de las células desafiadas con *S. aureus* durante el ensayo de invasión. Los resultados mostraron un aumento en la producción de NO en el medio recuperado de las células desafiadas con *S. aureus* y los tratamientos con γ - tionina y 17β -estradiol, respecto a los medios condicionados de CEMB que no se enfrentaron a la bacteria. En donde se observa una mayor producción de NO con el tratamiento de

γ -tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol 50 pg/ml, sin embargo ninguno de los tratamientos muestra diferencia significativa respecto al vehículo (Figura 21).

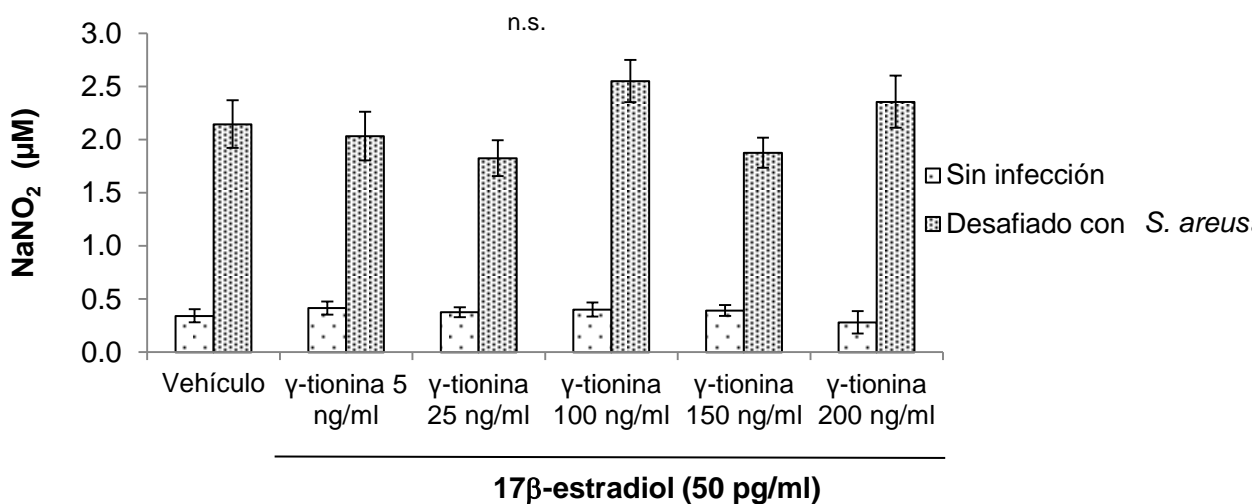


Figura 21. Producción de NO en las CEMB tratadas con la defensiva γ -tionina y el 17β -estradiol, con y sin desafío con *S. aureus*. Se recuperaron los medios condicionados de las células tratadas con γ - tionina (5, 25, 100, 150 y 200 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml), con y sin infección, y se realizó la cuantificación de NaNO_2 mediante el ensayo colorimétrico de Griess. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm EE. El vehículo corresponde a una combinación de etanol al 1% y DMSO al 0.02%. Se realizó la prueba de *t*-Student para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos respecto y el vehículo. Los asteriscos denotan diferencias significativas de los diferentes tratamientos respecto al vehículo (n.s. no significativo, $p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad frecuente en el ganado lechero, la cual representa un serio problema debido a que ocasiona pérdidas económicas importantes ya que hay una disminución en la producción de leche así como gastos veterinarios o incluso desecho temprano de animales.

Esta enfermedad puede presentarse de manera aguda o crónica, esta última siendo la más recurrente, ya que por cada caso de mastitis aguda se presentan de 20-40 casos de mastitis crónica (Bedolla, 2008). *Staphylococcus aureus* es el patógeno que se aísla con mayor frecuencia en los casos de mastitis crónica (>70%), la persistencia de esta enfermedad se ve favorecida por los mecanismos de virulencia que *S. aureus* utiliza, principalmente la internalización bacteriana, ya que de esta manera la bacteria queda protegida de la terapia con antibióticos y atenúa la respuesta inmune del hospedero (Kerro-Dego, 2002).

La hormona 17β -estradiol y el péptido γ -tionina presentan propiedades contra la internalización de *S. aureus* en las CEMB, inhibiendo la internalización un 40 y 50%, respectivamente (Medina-Estrada *et al.*, 2016 y Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay reportes donde se evalúen los efectos conjuntos de estos tratamientos, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto conjunto de ambas moléculas, esperando tener un mejor efecto que el obtenido de forma individual. Los resultados mostraron una disminución de la internalización bacteriana del 50% con el tratamiento conjunto de γ -tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml). Además, con el medio condicionado de las CEMB con ese tratamiento se obtuvo una reducción del 31.4% de la viabilidad bacteriana y una producción superior de NO en el medio condicionado de CEMB desafiadas con *S. aureus*.

Se ha demostrado que la actividad de los péptidos antimicrobianos es dependiente de su concentración, mostrando un efecto inmunomodulador en el rango de concentraciones de 5 - 10,000 ng/ml (Meade *et al.*, 2014). En el presente trabajo se usaron concentraciones de γ -tionina que entran dentro de este rango, ya que el

objetivo fue evaluar la actividad inmunomoduladora de un tratamiento conjunto de la defensina γ - tionina con el 17β -estradiol. Sin embargo, se evaluó la actividad bacteriostática y antimicrobiana de los tratamientos sobre *S. aureus*. Esto debido a que a pesar de que se trabajó con concentraciones de γ -tionina que no afectan la viabilidad bacteriana (Díaz-Murillo *et al.*, 2016), se desconocía el efecto de la combinación de este péptido con el 17β -estradiol sobre la bacteria. Los resultados mostraron que a las 24 h los tratamientos no afectaron el crecimiento bacteriano (Figura 12), lo que coincide con lo reportado previamente. En lo que respecta a la viabilidad bacteriana a las 2 h, el tratamiento con 17β -estradiol y γ - tionina (25 ng/ml) se observó un aumento en la viabilidad bacteriana (17.8%), este aumento sugiere que *S. aureus* podría estar utilizando al 17β - estradiol como fuente de carbono; ya que de acuerdo a García-Gonzales *et al* (2013), algunas bacterias pueden metabolizar las hormonas esteroideas sexuales mediante enzimas como la hidroxisteroide deshidrogenasa, producidas principalmente por actinobacterias, proteobacterias y firmicutes.

Así mismo, ningún tratamiento afectó el crecimiento bacteriano, excepto el tratamiento de 17β -estradiol y γ - tionina a 150 ng/ml, mostró una disminución de la viabilidad bacteriana de 19.4% (Figura 14). Así mismo, a las 24 h los tratamientos no afectaron la viabilidad bacteriana, con excepción del tratamiento que consiste de 17β -estradiol y γ - tionina a 200 ng/ ml el cual mostró una reducción de la viabilidad del 34.7% (Figura 13). Debido a que los tratamientos con 17β - estradiol y γ - tionina a 150 ng/ml (2h) y 17β -estradiol y γ - tionina a 200 ng/ ml (24h) mostraron una reducción de la viabilidad bacteriana se consideró descartarlos. El hecho de que los tratamientos no disminuyeran la viabilidad bacteriana se debe a que se trabajó con concentraciones inferiores al rango de concentraciones en las que se ha reportado actividad antimicrobiana para el péptido; además, este resultado sugiere que los efectos observados en los niveles de internalización se deben a la modulación de la RII y no a un efecto antimicrobiano directo por parte de los compuestos. Estos resultados son similares a los reportados

individualmente para el 17β -estradiol y la γ -tionina (Díaz-Murillo *et al.*, 2016; Medina-Estrada *et al.*, 2016).

Por otra parte, se evaluó la integridad de la membrana y el metabolismo celular de las CEMB mediante ensayos de azul tripano y MTT, respectivamente, para descartar efectos adversos en las células. En el ensayo de azul tripano no se observó disminución significativa de la viabilidad en ningún arreglo experimental a ninguna concentración, por lo que se puede inferir que los tratamientos no están dañando la membrana celular (Figura 15). Estos resultados coinciden con lo reportado individualmente para cada molécula (Díaz-Murillo *et al.*, 2016; Medina-Estrada *et al.*, 2016). Sin embargo, en el ensayo de MTT (Figura 16) el tratamiento de 17β -estradiol con la concentración de 5 ng /ml de γ -tionina disminuyó la viabilidad celular en los tres arreglos experimentales, mientras que la concentración de 25 ng/ml no la afectó en ningún arreglo experimental. Además, la concentración de 100 ng/ml de γ -tionina redujo la viabilidad celular en los arreglos a) y b). Estos resultados no coinciden con lo reportado individualmente para el péptido y la hormona a esas concentraciones, por lo que el tratamiento conjunto podría estar facilitando alguna interacción entre la γ -tionina y el 17β -estradiol que favorezca una disminución del metabolismo celular. En la literatura se han reportado péptidos cortos usados para favorecer la penetración de otras moléculas, por ejemplo, antibióticos como los péptidos P3 y P8 reportados por Randhawa *et al* (2016), que demostraron favorecer una mayor penetración de antibióticos como la oxacilina, norfloxacin y vancomicina logrando de esta manera una mayor toxicidad con menores concentraciones en cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina. En este caso se podría sugerir que la γ -tionina pudiera estar propiciando que una mayor cantidad de moléculas de 17β -estradiol entren a la célula, favoreciendo una disminución del metabolismo celular en los tratamientos antes mencionados.

La diferencia de resultados entre los ensayos de azul tripano y MTT se puede deber a que, aunque la membrana se conserva íntegra, en algunos tratamientos hay una disminución del metabolismo celular, lo cual podría sugerir que se está

llevando a cabo un proceso de apoptosis tardía. Debido a esto, se llevó a cabo una evaluación de la inducción a la apoptosis (Figura 17). De acuerdo a los resultados obtenidos los tratamientos no inducen de manera significativa la apoptosis, por lo que se pueden usar sin el riesgo de afectar a las CEMB; con excepción del tratamiento que consiste de la mezcla de 17β -estradiol y γ -tionina (25 ng/ml) que indujo la apoptosis 22% más que el vehículo (Figura 17h), por lo tanto este tratamiento se descartó para el resto de los ensayos. La inducción de la apoptosis con el tratamiento de 17β -estradiol y γ -tionina a la concentración de 25 ng/ml sugiere que es la mezcla lo que induce a la célula a un proceso apoptótico, ya que la concentración de 17β -estradiol se mantuvo fija en todos los tratamientos. En el mismo sentido, en el trabajo de Velásquez (2017) se ilustra un comportamiento similar al obtenido con los tratamientos con 17β -estradiol y γ -tionina a 5 y 100 ng/ml. En esa investigación se evaluó la inducción de la apoptosis en las CEMB por efecto de γ -tionina 3.5 μ M y butirato 5 mM, así como un tratamiento conjunto, obteniendo que la inducción de la apoptosis inducida por el butirato (43.6%) no aumentó por el tratamiento en conjunto con la γ -tionina. Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio, con excepción del tratamiento de 17β -estradiol y γ -tionina a la concentración de 25 ng/ml, en el que pareciera que el péptido está aumentando la inducción de la apoptosis obtenida de forma individual con la hormona.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de los tratamientos para disminuir la internalización de *S. aureus* en las CEMB, obteniendo como resultado una reducción de la internalización del 50% con el tratamiento de 17β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (100 ng/ml) (Figura 18). Este resultado es similar al efecto individual obtenido con la γ -tionina (Díaz-Murillo *et al.*, 2016). Por ello, esas concentraciones se probaron para los arreglos experimentales restantes (Figura 19). Sin embargo, el mejor resultado se obtuvo con la mezcla añadida al mismo tiempo, por lo que se podría sugerir que el orden de adición de los tratamientos sí tiene un efecto en la modulación de la RII durante la internalización bacteriana. Aunque se esperaba un mayor efecto sobre la internalización bacteriana con los

tratamientos probados, el efecto si es mayor a los obtenidos por otros péptidos con propiedades inmunomoduladoras como el reportado por Díaz-Murillo (2015) para Thi2.1, la cual a una concentración de 5 µg/ml disminuyó la internalización de *S. aureus* en CEMB un 20%. Además, se observó un comportamiento dependiente de la concentración, en el cual las concentraciones de los extremos mostraron una menor disminución de la internalización, en comparación al tratamiento con 17β-estradiol (50 pg/ml) y γ-tionina (100 ng/ml). Este comportamiento es similar al que muestra el péptido γ-tionina de forma individual (Díaz-Murillo *et al.*, 2016), ya que la mezcla de tratamientos con 17β-estradiol con concentraciones de γ-tionina menores a 100 ng/ml no tienen un efecto marcado en la modulación de la respuesta inmune; sin embargo, los tratamientos con concentraciones mayores a 100 ng/ml tampoco muestran un efecto. Esto podría sugerir la existencia de un sistema de regulación del péptido y sus efectos, como lo que sucede con los péptidos natriuréticos, pertenecientes a una familia de péptidos que incluyen el péptido natriuretico auricular, el tipo cerebral y el tipo C, los cuales ejercen sus acciones fisiológicas a través de los receptores natriureticos tipo A y tipo B, respectivamente y están acoplados a la enzima guanil ciclasa (Manzur *et al.*, 2013). Sin embargo, para confirmar esta información sería necesario llevar a cabo otro tipo de aproximaciones experimentales.

Por otro lado, al retar a *S. aureus* con los medios condicionados de CEMB tratadas con 17β-estradiol (50 pg/ml) y γ-tionina (100 ng/ml) se obtuvo una disminución de la viabilidad bacteriana del 31.4% (Figura 20). Esto sugiere que el tratamiento promueve un efecto inmunomodulador en las CEMB, favoreciendo la secreción de elementos de la RII que mejoran la respuesta ante la infección, y que además pudieran estar modulando los factores de virulencia de la bacteria. En este sentido, en estudios previos hechos en el grupo de trabajo (Frutis-Murillo *et al.*, 2019) se ha evaluado la expresión de factores de virulencia como lo son las adhesinas y se ha relacionado con una reducción en la internalización de *S. aureus* obteniendo que con un tratamiento previo de 2 h con butirato de sodio 2 mM se obtenía una menor expresión de adhesinas, como el factor de aglomeración B (ClfB) y sdrC. Además, el tratamiento con colecalciferol a

las 2 h reguló la expresión de ARNm de los genes *spa* y *sdrC* a la baja, mientras que el mismo tratamiento a las 24 h logró una disminución de la expresión de *fnba* y *clfB*. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar que los tratamientos conjuntos de 17β -estradiol y γ - tionina modulan los factores de virulencia de *S. aureus*.

Por otra parte, en comparación a los resultados de Medina-Estrada *et al* (2016), en donde los medios condicionados de las CEMB tratadas con 50 pg/ml de 17β -estradiol redujeron 60% la viabilidad bacteriana, en el presente estudio las CEMB tratadas con 17β -estradiol (50pg/ml) con γ - tionina(100 ng/ml) mostraron una menor reducción de la viabilidad bacteriana de 31%. Lo cual podría sugerir que la interacción de 17β -estradiol con γ - tionina podría estar reduciendo la capacidad de la hormona para favorecer una respuesta antimicrobiana indirecta en las CEMB.

Aunado a lo anterior, Loeza-Ángeles (2010) demostró que el péptido γ -tionina producido por células endoteliales bovinas tiene actividad antibacteriana indirecta contra *S. aureus*, a través de la regulación de la producción de NO. El NO es una molécula involucrada en la RII, que puede ser producida por las CEMB durante la respuesta inflamatoria. En el presente trabajo se evaluó el nivel de producción de NO, obteniendo como resultado un aumento en la producción de NO en las células desafiadas con *S. aureus* para todas las concentraciones, en comparación a los tratamientos sin infección; así mismo, la mayor producción de NO se obtuvo con el tratamiento de γ -tionina a (100 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml). En lo que respecta a los niveles de producción de NO inducidos por la γ -tionina, esta provocó una mayor producción en CEMB sin infección que en aquellas infectadas, mostrando la mayor producción en el medio condicionado sin infección tratado con 100 ng/ml de γ - tionina (Díaz-Murillo *et al.*, 2016), lo cual podría sugerir que el tratamiento de γ -tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml) induce la producción de NO en CEMB mediante la modulación de la RII como respuesta a la infección con *S. aureus*. En lo que respecta a los resultados reportados por Medina-Estrada *et al* (2016) para el 17β -estradiol, no coinciden con los obtenidos en el presente estudio, en el sentido de que no hay un aumento en los niveles de NO en los

medios condicionados de células tratadas con 17β -estradiol con y sin desafío con *S. aureus*. Además, difieren en cuanto a los valores de NO, esta diferencia podría deberse a que en ambos estudios se trabajó con diferentes aislados de CEMB, así como al uso de pasajes más viejos en este estudio.

Tomando en conjunto los resultados de este trabajo, se sugiere que la disminución de la internalización bacteriana con el tratamiento conjunto de γ -tionina (100 ng/ml) y 17β -estradiol (50 pg/ml) se podría deber al efecto de los elementos de la RII secretados al medio, como resultado de la estimulación de las CEMB por el tratamiento, por ejemplo, péptidos antimicrobianos, entre otros, así como por la producción de NO que pudiera favorecer la resolución de la infección.

Los resultados obtenidos se integran en la Figura 22, donde se incluyen los resultados de los tratamientos conjuntos obtenidos en la presente investigación, así como los resultados reportados por Medina-Estrada *et al* (2016) y Díaz-Murillo *et al* (2016) para el 17β - estradiol y la γ - tionina, respectivamente. Por otro lado, resultaría interesante evaluar la expresión de elementos de la RII, así como 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 para robustecer los resultados obtenidos en el presente trabajo.

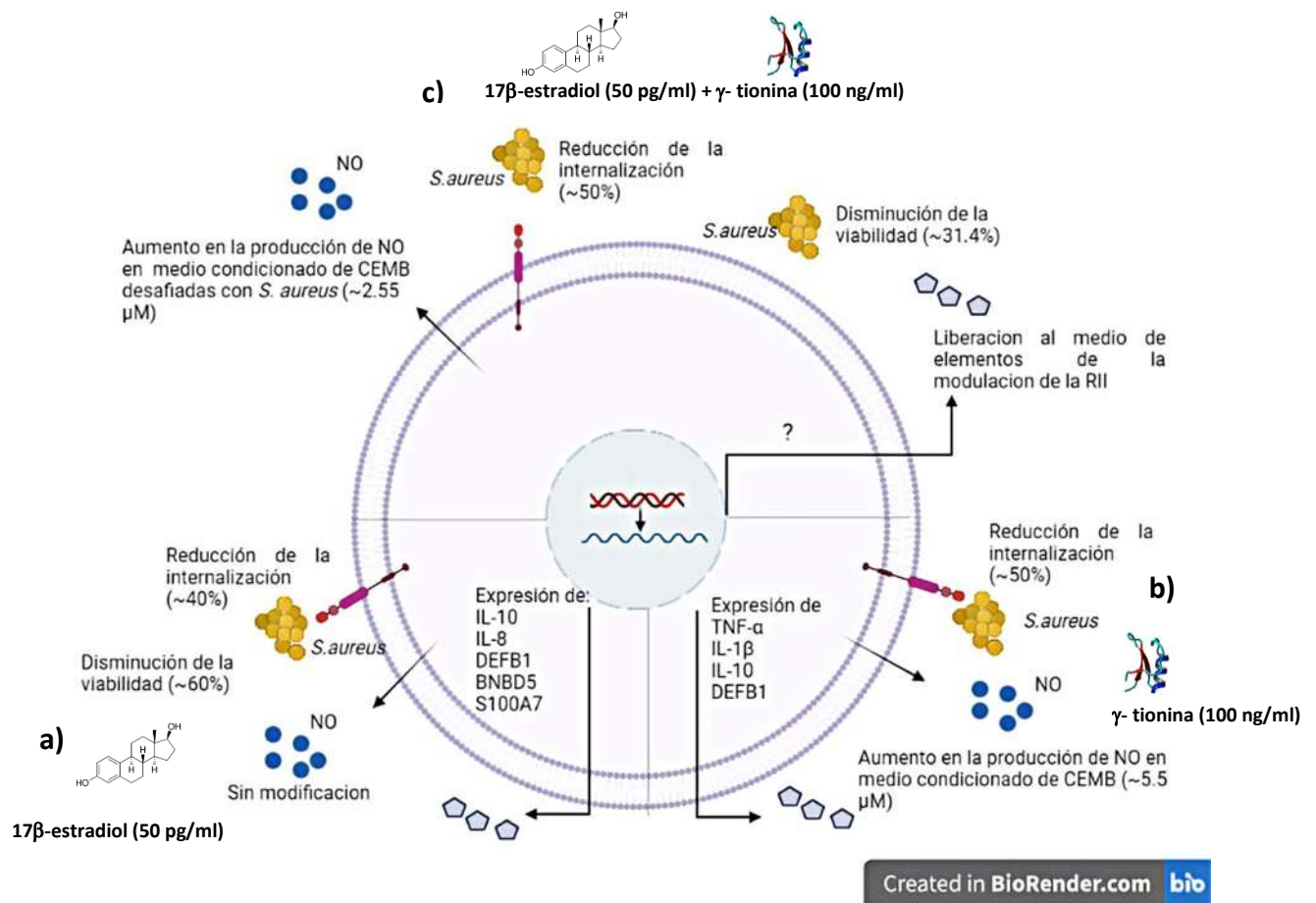


Figura 22. Efectos del 17β-estradiol, la γ-tionina y el tratamiento de 17β-estradiol y γ-tionina sobre la RII de las CEMB y reducción de la internalización de *S. aureus*. **a)** El 17β-estradiol (50 pg/ml) disminuye la internalización de *S. aureus* 40% mediante un efecto antimicrobiano indirecto, ya que se expresan genes de péptidos antimicrobianos como DEFB1, BNBD5 y S100A7; además, se favorece un efecto antiinflamatorio mediante la expresión de citocinas como IL-10 y IL-8. Sin embargo, no se favorece la producción de NO, por otra parte, el medio condicionado logra una reducción de la viabilidad bacteriana del 60%. **b)** El tratamiento con el péptido γ-tionina (100 ng/ml) logra una reducción de la internalización del 50% mediante un efecto antimicrobiano indirecto, ya que se expresa la DEFB1, además de TNF-α, IL-1β y IL-10, mientras hay un aumento en la producción de NO en el medio condicionado de las CEMB sin infección. **c)** El tratamiento conjunto de 17β-estradiol (50 pg/ml) y γ-tionina (100 ng/ml) favorece una reducción de la internalización de ~50%, similar al efecto individual de la γ-tionina, esta disminución se podría estar viendo favorecida por la secreción de elementos de la RII (sin determinar), ya que hubo una disminución de la viabilidad de *S. aureus* con el medio condicionado de las células tratadas ambas moléculas; además, por la producción de NO por las CEMB posterior a la infección con *S. aureus*. Creado con BioRender.com

9. CONCLUSIÓN

El tratamiento simultaneo de 17β -estradiol (50 pg/ml) y γ -tionina (100 ng/ml) reduce la internalización de *Staphylococcus aureus* en las CEMB en un 50%, sin embargo, no muestra un efecto aditivo respecto a los tratamientos individuales. Por otra parte, este tratamiento favorece la secreción al medio de elementos de la RII los cuales reducen la viabilidad de *S. aureus* e incrementan la producción de NO. Indicando que la mezcla de los compuestos puede disminuir la internalización y a su vez tener un efecto sobre las bacterias no internalizadas en las CEMB.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2012). Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.025>
- Alva-Murillo, N., Téllez-Pérez, A. D., Medina-Estrada, I., Álvarez-Aguilar, C., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2014). Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis*, 77, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.006>
- Anaya-López, J. L. (2006). Actividad antifúngica y citotóxica de la defensina tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*) producida por células endoteliales bovinas. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Cáramez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdez-Alarcón, J.J. y Ochoa-Zarzosa, A. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in veterinary science*. 81(2006), 358-361. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.02.002>
- Aitken, S. L., Corl, C. M., y Sordillo, L. M. (2011). Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16(4), 291-304. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9230-4>
- Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., Alva-Murillo, N., Salgado-Garciglia, R. y López-Meza, J.(2019). Lipid-rich extract from mexican avocado seed (*persea americana var. Drymifolia*) reduces *Staphylococcus aureus* internalization and

- regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *Journal of immunology research*. 2019, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2019/7083491>
- Bannerman, D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of animal science*, 87(suppl_13), 10-25. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1187>
- Bedolla, C. C., y de León, M. P. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Revista electrónica de veterinaria*, 9(4), 1-26.
- Bestebroer, J., Poppelier, M. J., Ulfman, L. H., Lenting, P. J., Denis, C. V., van Kessel, K. P., van Strijp, J. A., y de Haas, C. J. (2007). *Staphylococcal* superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. *Blood*, 109(7), 2936–2943. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-015461>
- Boeris, M.A.; Genero, G.A. y Meglia, G.E. (2015). *Gandula mamaria y lactación*. EdUNLPam.<http://www.unlpam.edu.ar/images/extension/edunlpam/QuedateEnCasa/glandula-mamaria-y-lactacion.pdf>.
- Bolatchiev, A., Baturin, V., Bazikov, I., Maltsev, A., y Kunitsina, E. (2020). Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo*. *Fundamental y clinical pharmacology*, 34(1), 102-108. <https://doi.org/10.1111/fcp.12499>
- Burvenich, C., Paape, M. J., Hoeben, D., Dosogne, H., Massart-Leen, A.M. y Blum, J. (1999). Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domestic animal endocrinology*. 17,149-159. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(99\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(99)00032-6)
- Camussone, C. M., y Calvino, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 119-130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)

- Cardillo, A. B., Ceron, M. C. M., Romero, S. M., y Cascone, O. (2018). Péptidos antimicrobianos de plantas. *Revista farmacéutica*, 160, 28–46.
- Cervantes-García, E., García-González, R., y Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista mexicana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Díaz Murillo, V. (2015). Efecto inmunomodulador de péptidos antimicrobianos de plantas en células de mamífero infectadas con *Staphylococcus aureus*. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Repositorio UMSNH.
- Díaz-Murillo, V., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E. y Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Defensin γ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides*, 78, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.008>
- Feng, Q., Huang, Y., Chen, M., Li, G., y Chen, Y. (2015). Functional synergy of α -helical antimicrobial peptides and traditional antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria *in vitro* and *in vivo*. *European journal of clinical microbiology y infectious diseases*, 34(1), 197-204. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2219-3>
- Frutis-Murillo, M., Sandoval-Carrillo, M. A., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2019). Immunomodulatory molecules regulate adhesin gene expression in *Staphylococcus aureus*: Effect on bacterial internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 131, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.030>
- García-Gómez, E., González-Pedrajo, B., y Camacho-Arroyo, I. (2013). Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed research international*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/928290>
- Geitani, R., Moubareck, C. A., Touqui, L., y Sarkis, D. K. (2019). Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 19(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1416-8>
- Gomes, F., Saavedra, M., y Henriques, M. (2016). Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathogens and disease*, 74(3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López-Meza, J. E., y Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 121(1-2), 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.007>
- Guzmán-Rodríguez, J. J. (2016). Citotoxicidad de las defensinas PaDef (Persea americana var. drymifolia) y γ -tionina (Capsicum chinense) contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., y López-Meza, J. E. (2015). Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/735087>
- Kang, H. K., Park, J., Seo, C. H., y Park, Y. (2021). PEP27-2, a potent antimicrobial cell-penetrating peptide, reduces skin abscess formation during *Staphylococcus aureus* infections in mouse when used in combination with antibiotics. *ACS infectious diseases*, 7(9), 2620-2636. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00894>
- Kerro Dego, O., Van Dijk, J. E. y Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion a review. *Veterinary quarterly*, 24(4), 181-198. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695135>

- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., y Palacios Martínez, R. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana.
- Lamote, I., Meyer, E., De Ketelaere, A., Duchateau, L., y Burvenich, C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology*, 65(6), 1082-1098. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.017>
- Loeza Ángeles, H. (2010). Efecto de los péptidos antimicrobianos γ -tionina de *Capsicum chinense* y Thi2. 1 de *Arabidopsis thaliana* producidos por células endoteliales bovinas sobre patógenos intracelulares: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Repositorio UMSNH.
- Loeza-Angeles, H., Sagrero-Cisneros, E., Lara-Zárate, L., Villagómez-Gómez, E., López-Meza, J. E., y Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Thionin Thi2. 1 from *Arabidopsis thaliana* expressed in endothelial cells shows antibacterial, antifungal and cytotoxic activity. *Biotechnology Letters*, 30(10), 1713. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9756-8>
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The new england journal of medicine*, 339(8), 520-532. 10.1056/NEJM199808203390806
- Manzur, F., Villarreal, T., y Moneriz, C. (2013). Inhibición dual de la neprilisina y el receptor de angiotensina II: nueva estrategia prometedora en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. *Revista colombiana de cardiología*, 20(6), 386-393. [https://doi.org/10.1016/S0120-5633\(13\)70090-1](https://doi.org/10.1016/S0120-5633(13)70090-1)
- Meade, K. G., Cormican, P., Narciandi, F., Lloyd, A., y O'Farrelly, C. (2014). Bovine β -defensin gene family: opportunities to improve animal health?. *Physiological genomics*, 46(1), 17-28. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00085.2013>
- Medina-Estrada, (2017). Efecto antiinflamatorio y antimicrobiano del 17 β -Estradiol, en células de epitelio mamario bovino, durante la internalización de *Staphylococcus aureus*. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., y Ochoa-Zarzosa, A. (2015). Non-classical effects of prolactin on the innate immune response of bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis*, 89, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.018>
- Medina-Estrada, I., Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., y Ochoa-Zarzosa, A. (2018). Immunomodulatory Effects of 17 β -Estradiol on Epithelial Cells during Bacterial Infections. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/6098961>
- Medina-Estrada, I., López-Meza J. E. y Ochoa-Zarzosa A. (2016). Antiinflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *staphylococcus aureus* internalization. *Mediators of inflammation*. 2016: 1-16. <https://doi.org/10.1155/2016/6120509>
- Ochoa Zarzosa, Alejandra; Gutiérrez Barroso, Angelina; Lara Zárate, Leticia; Loeza Lara, Pedro Damián; Anaya López, José Luis; López Meza, Joel Edmundo (2007). La prolactina estimula la endocitosis de *Staphylococcus aureus* en epitelio mamario bovino. *Veterinaria México*, 38 (4), 455-465.
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H.y López-Meza J.E. (2009). Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microbial pathogenesis*, 47(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.04.006>
- Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., del Carmen Galicia-Sánchez, M., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., y Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta médica de México*, 154(6), 681-688.

- Olivera-Ángel, M. (Ed.) y Huertas-Molina, O.F. (Ed.). (2020). La lactancia vista desde múltiples enfoques. Primera parte: biología e inmunología. Biogénesis.
- Pereyra, E. A., Dallard, B. E., y Calvinho, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista argentina de microbiología*, 46(4), 363-375. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70096-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70096-3)
- Philpot, N., y Nickerson, S. (2000). Ganando la lucha contra la mastitis (Vol. 1). Westfalia.
- Procópio, T. F., Moura, M. C., Bento, E. F., Soares, T., Coelho, L. C., Bezerra, R. P. y Napoleón, T. H. (2019). Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. *MicrobiologyOpen*, 8(11), e869. <https://doi.org/10.1002/mbo3.869>
- Randhawa, H. K., Gautam, A., Sharma, M., Bhatia, R., Varshney, G. C., Raghava, G. P. S., y Nandanwar, H. (2016). Cell-penetrating peptide and antibiotic combination therapy: a potential alternative to combat drug resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 4073-4083.
- Sanz, A. (2009). Regulación por la ovariectomía, la síntesis local de estradiol y la terapia hormonal, del estado de activación de quinasas implicadas en señalización intracelular, en el cerebro de rata. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid
- Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martínez, M.T., Sandoval-Flores, M. G., Alva-Murillo, P. N., Jiménez- Mejía, R. y Loeza-Lara, P. D. (2018). Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos asociado a mastitis bovina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(4) ,792-810. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4468>

- Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H. J., Sipka, A., Smith, D. G., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R. N., Seyfert, H. M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4), 270-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.022>
- Sordillo, L. M., y Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(2), 135-146. <https://doi.org/10.1023/A:1020347818725>
- Téllez, G. A., y Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infection*, 14(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X).
- Téllez-Pérez, A. D., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., y López-Meza, J. E. (2012). Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Veterinary microbiology*, 160(1-2), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.007>
- Vargas-Casanova, Y., Rodríguez-Mayor, A. V., Cardenas, K. J., Leal-Castro, A. L., Muñoz-Molina, L. C., Fierro-Medina, R., ... y García-Castañeda, J. E. (2019). Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Advances*, 9(13), 7239-7245. [10.1039/C9RA00708C](https://doi.org/10.1039/C9RA00708C)
- Wira, C. R., Fahey, J. V., Ghosh, M., Patel, M. V., Hickey, D. K., y Ochiel, D. O. (2010). Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *American journal of reproductive immunology*, 63(6), 544-565. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x>

- Yart, L., Lollivier, V., Marnet, P. G., y Dessauge, F. (2014). Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. *Animal*, 8(1), 72–85. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001638>
- Zaatout, N., Ayachi, A., y Kecha, M. (2020). *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of applied microbiology*, 129(5), 1102-1119. <https://doi.org/10.1111/jam.14706>
- Zerweck, J., Strandberg, E., Kukhareenko, O., Reichert, J., Bürck, J., Wadhvani, P., y Ulrich, A. S. (2017). Molecular mechanism of synergy between the antimicrobial peptides PGLa and magainin 2. *Scientific reports*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12599-7>