

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS: EFECTOS SOBRE LA INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS
EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS REGULADA POR ÁCIDOS GRASOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELO ALEJANDRO SANDOVAL CARRILLO

TEMUCO – CHILE
2014

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*: EFECTOS SOBRE LA INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS REGULADA POR ÁCIDOS GRASOS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELO ALEJANDRO SANDOVAL CARRILLO
PROFESOR GUIA: DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

TEMUCO – CHILE
2014

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: EFECTOS SOBRE LA INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS REGULADA POR ÁCIDOS GRASOS

PROFESOR GUIA:

Dr. Joel Edmundo López Meza
Centro Multidisciplinario de Estudios en
Biotecnología (CMEB)
Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo

PROFESORES CONSEJEROS:

Dra. Priscilla Brevi Mievilla
Laboratorio de Patología Molecular
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

¿Ves estos bloques grises? Son las nuevas rocas; donde el musgo no crece.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mi madre, que con su rol dual de madre y padre me ha dado amor, cariño, consejo y un apoyo ilimitado e incondicional a través de estos 24 años.

Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no fue sólo un trabajo individual, si no fue el resultado de diversas personas que aportaron directa o indirectamente en su finalización.

- A mi madre por su apoyo incondicional y a mi hermano por demostrarme que la constancia trae buenos resultados.
- Quiero agradecer en esta tesis al Doctor Joel E. López Meza por haberme invitado cordialmente a participar en su laboratorio para realizar la pasantía profesional y más tarde la actual tesis presentada. Su invitación a tierras purépechas logró ser un factor fundamental para obtener la beca de movilidad. Le agradezco por la disponibilidad de poder trabajar en el laboratorio libremente, por los consejos precisos y su aprendizaje.
- A Nayeli, por sus importantes consejos y su aporte en los experimentos, su ayuda fue claves para el avance y finalización del trabajo.
- A los integrantes del grupo de trabajo (Violeta, Jaque, Marisol) por sus consejos directos o indirectos en los ensayos y por demostrar constancia en lo que hacen, que reflejó en mí también aplicarla; a Diana y Viry por su amistad.
- También quiero agradecer a Banco Santander por proporcionarme la beca y el dinero que me permitió estar en México.
- A Movilidad Estudiantil y la UFRO por confiar y seleccionarme para poder terminar mi carrera en el extranjero.

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 MASTITIS BOVINA	3
2.2 PATÓGENOS, DAÑO A LA GLÁNDULA E INMUNOLOGÍA EN LA MASTITIS BOVINA	5
2.3 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	9
2.4 VIRULENCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	11
2.5 ADHESIÓN DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	13
2.5.1 Regulación de la virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5.2 Mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.5.3 Células epiteliales mamarias bovinas	17
2.6 ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA Y MEDIA	18
2.6.1 Ácidos grasos de cadena corta en la leche bovina	19
2.6.2 Efectos de los ácidos grasos de cadena corta y media en la virulencia.....	20
2.6.3 Efectos de ácidos grasos de cadena corta en factores de virulencia.....	21
3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	24
3.1 HIPÓTESIS	25
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 METODOLOGÍA.....	26
4.1 CEPAS Y REACTIVOS	26
4.2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i> (ATCC 27543) TRATADO CON BUTIRATO DE SODIO Y OCTANOATO DE SODIO	26
4.3 CULTIVO PRIMARIO DE DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS (CEMB).....	27
4.4 ENSAYO DE PROTECCIÓN DE GENTAMICINA PARA EVALUAR LA INTERNALIZACIÓN DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> PRETRATADO CON BUTIRATO DE SODIO Y OCTANOATO DE SODIO	27
4.5 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNC.....	28
4.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA	28
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 BUTIRATO DE SODIO Y OCTANOATO DE SODIO REDUCEN LA INTERNALIZACIÓN DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS	30
5.2 BUTIRATO DE SODIO Y OCTANOATO DE SODIO INDUCEN CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES DE FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
5.3 EXPRESIÓN DE <i>CLFB</i>	33
5.4 EXPRESIÓN EN <i>AGRA</i>	35
5.5 EXPRESIÓN EN <i>SARA</i>	36
5.6 EXPRESIÓN EN <i>RNAIII</i>	38
6 CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura1. Efecto del pretratamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con butirato y octanoato de sodio por 2 (A y B) ó 24 h (C y D) en la internalización en las CEMB., 31</p> <p>Figura2. Efecto del pretratamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con butirato y octanoato de sodio en la expresión de <i>clfB</i>., 35</p> <p>Figura3. Efecto del pretratamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con butirato y</p>	<p>octanoato de sodio en la expresión de <i>agrA</i>. 37</p> <p>Figura4. Efecto del pretratamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con butirato y octanoato de sodio en la expresión de <i>sarA</i>. 38</p> <p>Figura5. Efecto del pretratamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con butirato y octanoato de sodio en la expresión de <i>rnaIII</i>. 39</p>
---	--

ABREVIACIONES

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

AG: ácidos grasos

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

ARN: ácido ribonucleico

BNa: butirato de sodio

CEMB: células epiteliales mamarias bovinas

DO: densidad óptica

mL: mililitros

nuc: Nucleasa estafilocócica (en inglés *staphylococcal nuclease*)

ONa: octanoato de sodio

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (en inglés: *polymerasechainreaction*)

qPCR: PCR cuantitativa (en inglés *quantitativepolymerasechainreaction*)

RCS: recuento de células somáticas

1 INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es definida como una inflamación de la glándula mamaria junto con un aumento en el número de células somáticas en la leche. Es considerada la enfermedad más común, prevalente y costosa en el ganado bovino lechero. Los efectos son reflejados en la producción, economía y en el bienestar animal.

Diversos patógenos son capaces de inducir mastitis; sin embargo, dentro de los patógenos contagiosos *Staphylococcus aureus* es destacado debido a los daños que produce en la glándula mamaria. Esta bacteria se propaga fácilmente, es prevalente, y provoca una mastitis con ausencia de síntomas y en ocasiones de carácter crónico, lo cual se relaciona especialmente al variado número de factores de virulencia que expresa, junto con su localización intracelular luego de su adhesión e internalización, la generación de variantes de pequeñas colonias que podrían darle prevalencia y la resistencia a antibióticos.

El tratamiento de la mastitis es un problema vigente debido a que no se erradica la enfermedad y se sugiere indagar en métodos sustentables e innovadores que puedan, tanto modular la respuesta inmune como tener efectos en el patógeno a través de vías que no provoquen resistencia. Los ácidos grasos (AG) de cadena corta y media, representan una importante alternativa a esto último, y han demostrado en las investigaciones del grupo de trabajo que son capaces de inhibir la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) incubadas previamente con estas moléculas carboxílicas, y producir una fuerte activación de respuesta de genes relacionados con la inmunidad innata. Sin embargo, no se ha evaluado el posible efecto de estos AG en la patogénesis, especialmente en el mecanismo de internalización en células epiteliales mamarias bovinas. Estudios de otros grupos señalan que los AG pueden modular la expresión de factores de virulencia en bacterias (ej. *Salmonella*) bajo

modelos de cultivo celular intestinal e *in vivo*. Por lo que se especula que estos ácidos podrían tener un efecto en la expresión de genes de virulencia de *S. aureus* durante la internalización de esta bacteria en las CMEB.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el efecto de los ácidos grasos (butirato de sodio y octanoato de sodio) en la expresión de algunos factores de virulencia de *S. aureus* y su relación con la internalización de esta bacteria en las CEMB.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina es definida como una inflamación de la glándula mamaria (Blowey y Edmondson, 1995) y usualmente expresada por un recuento de células somáticas (RCS) superior a 2×10^5 células/mL en la leche. La inflamación ocurre comúnmente en respuesta a infecciones bacterianas, no obstante puede ser producida por otros organismos infecciosos, o por agentes de origen etiológico no infeccioso, estos últimos pueden predisponer el éxito a la infección mediada por bacterias (Zhao y Lacasse, 2008). Sin embargo, está determinado que la mayoría de los casos de mastitis son generados por microorganismos patógenos (Watts, 1988).

La mastitis bovina es considerada la enfermedad más común en el ganado bovino lechero, es altamente prevalente (Sharma et al., 2012); e impacta directamente a la ganadería lechera, debido a los cambios patológicos que experimenta el tejido de la glándula mamaria - enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor, y frecuentemente expresado en un aumento en el número de células somáticas en la leche-, los cuales se ven reflejados en los cambios físicos, químicos y bacteriológicos en el coloide lácteo (Sordillo et al., 1989; Sordillo et al., 1989b). Es considerada una enfermedad infecciosa que conduce a la inflamación de uno o más cuartos de la ubre, y no sólo afecta a un individuo, sino puede afectar a todo el hato o al menos varios animales del mismo (Barkema et al., 1997). Si la enfermedad no es tratada, la condición conduce a un deterioro del bienestar animal que resulta en el sacrificio (Lehenbauer y Oltjen, 1998). Los cambios en la leche, tales como grumos, coágulos, y una apariencia acuosa, son las anomalías más evidentes; el calor, hinchazón y la sensibilidad de la ubre son ligeros o ausentes. Los síntomas sistémicos también pueden estar presentes e incluyen fiebre, pérdida de apetito, reducida función del rumen, debilidad, y depresión (Kitchen, 1981; Medrano-Galarza et al., 2012).

La aparición de la mastitis requiere de múltiples factores, por lo que se le considera una enfermedad multifactorial donde su incidencia depende de la exposición a los patógenos, los mecanismos de defensa de la ubre y los factores ambientales, y de sus interacciones (Oviedo-Boyso et al., 2007). Los factores de predisposición que contribuyen a la aparición de la mastitis pueden ser de carácter fisiológico (edad de la vaca, etapa de lactación, involución de la glándula, nutrición, deficiencias de Co, Cu, Se y vitamina E), genéticos (raza, rasgos genéticos de resistencia, inmunidad innata y anatomía de la ubre), patológicos y ambientales (prácticas de manejo poco higiénicas, tiempo y clima) (Sharma et al., 2012; Tiwari et al., 2013).

Las pérdidas económicas son aproximadamente del 38% de los costos directos en enfermedades (Kossaibati y Esslemont, 1997), siendo la reducción láctea (70%) el principal determinante de los costos económicos (Seegers et al., 2003; Sharma et al., 2012). Otros efectos significativos son los cambios de composición en la leche _el contenido de grasa y proteína de la leche, se modifican por la infección intramamaria- (Kitchen, 1981; Seegers et al., 2003); la existencia de residuos de antibióticos debido a su uso indiscriminado que la hacen no apta para el consumo (Oliver y Murinda, 2012); el incremento en los costos veterinarios y de enfermería, además de labores adicionales para el tratamiento (Neerhof et al., 2000); y es causa principal del sacrificio prematuro lo que conlleva a la pérdida de potencial genético en el hato (Blowey y Edmondson, 1995; Seegers et al., 2003).

La mayoría de los productores asocia a la mastitis con la inflamación de los cuartos de la ubre junto con cambios en la apariencia de la leche; sin embargo, la mastitis puede ocurrir de forma asintomática. Sea o no acompañada de signos clínicos, la infección intramamaria se asocia a un aumento de las células somáticas en la leche, variando según el tipo de agente infeccioso. Es por eso que la mastitis bovina se clasifica en clínica y subclínica dependiendo del grado de inflamación de la glándula mamaria, el *The National Mastitis Council* (Smith, 1997) las define como:

- *Mastitis Clínica*: Se experimenta anomalías visibles en la leche o glándula: la leche tiene apariencia acuosa con coágulos. Las anomalías asociadas con la ubre son el calor, hinchazón y sensibilidad al tacto. Este tipo de mastitis se sub-clasifica en leve, moderada y aguda.
- *Mastitis subclínica*: No se generan cambios visibles ni en la leche y la ubre, pero la producción disminuye al igual que la calidad. Como es indetectable visualmente, se deben montar pruebas indirectas como el recuento de células somáticas.

La mastitis subclínica es la forma más común de la enfermedad, con prevalencia a escala internacional (Rainard y Riollot, 2006); y es considerada por los productores lecheros más costosa que la mastitis clínica, debido a sus efectos a largo plazo en la producción láctea (Zhao y Lacasse, 2008).

La presencia en Chile de *S. aureus* es alta, estudios reportan un 55.53% presente en lecherías especializadas, destacando ser el patógeno más frecuente (San Martín et al., 2002). No se han efectuado estudios a escala nacional que permitan entregar datos epidemiológicos confiables de la mastitis bovina, y la mayoría de los datos existentes corresponden a estudios de los años 70 y a localidades específicas del país. Dentro de estos datos se mantiene la premisa internacional de la mastitis subclínica como la más usual. En México, Castañeda Vázquez et al (2013) reportaron que la mastitis subclínica es la de mayor incidencia, además de que *S. aureus* fue el microorganismo más relevante. En el mismo sentido, otros estudios reportan la existencia de 60% de los casos de mastitis subclínica y 30% en tanques lecheros (Miranda-Morales et al., 2008).

2.2 Patógenos, daño a la glándula e inmunología en la mastitis bovina

La ubre del bovino es un ambiente ideal para el crecimiento microbiano, y bajo óptimas condiciones, los patógenos pueden multiplicarse de forma importante (Sharma et al., 2012); tanto en períodos de lactancia y no lactantes (Zhao y Lacasse, 2008). En la literatura científica se han

reportado más de 137 patógenos causante de mastitis (Watts, 1988); en los últimos años este número aumentó a más de 200 (Blowey y Edmondson, 1995). Los patógenos predominantes son las bacterias, aunque micoplasmas, hongos, levaduras, algas y virus también han sido reportados (Watts, 1988; Wellenberg et al., 2002). Dependiendo del vector de transmisión, los patógenos bacterianos pueden ser clasificados en no contagiosos (más conocidos como ambientales) y los contagiosos (Blowey y Edmondson, 1995): (i) Los ambientales son considerados invasores oportunistas de la glándula y no pueden sobrevivir dentro de ella. Se multiplican e inducen una respuesta inmune que en general termina eliminando al patógeno (Bradley, 2002). La principal fuente de los patógenos ambientales es en donde vive la vaca, y están presentes en materiales orgánicos de la cama, junto con el estiércol y en las áreas húmedas de los establos y lotes. Los agentes de naturaleza ambiental más importantes son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, y especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa. (ii) En el caso de los patógenos contagiosos, son descritos como organismos capaces de sobrevivir dentro de la glándula mamaria, generan mastitis subclínicas y se propagan de vaca en vaca durante el procedimiento de ordeño (Keefe, 2012). Los agentes contagiosos incluyen las bacterias *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Zhao y Lacasse, 2008).

Los patógenos que usualmente invaden la ubre, se multiplican y producen toxinas que son nocivas para la ubre, resultando en una reacción inflamatoria; sin embargo, la glándula posee una fuerte defensa inmunitaria basada en componentes celulares y solubles asociados a los tejidos y a las secreciones (Sordillo y Streicher, 2002). Si esta protección no controla la infección, los niveles bacterianos alcanzan un umbral en donde se produce daño a la glándula orquestado una compleja serie de eventos que reducen la actividad sintética celular láctea, daño en el epitelio mamario y en tejidos adyacentes (Harmon, 1994); los alveolos disminuyen su número de organelos asociados a la síntesis y secreción de leche (Sordillo et al., 1989). Simultáneamente el número de células somáticas sigue incrementándose empeorando el daño tisular. Los alveolos de la glándula pierden integridad estructural permitiendo la entrada del líquido extracelular y mezclándose con la leche, característica de los visibles cambios en la infección (Zhao y Lacasse, 2008).

Las infecciones comienzan cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican en los tejidos productores de la leche. Durante el ordeño mecánico, los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón pueden ser propulsados a través del conducto del pezón a la cisterna. Tras el ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por 1 a 2 horas. Los organismos del medio ambiente (presentes en el estiércol, la ropa de cama, etc.) o los que se encuentran en la piel lesionada en la punta del pezón pueden invadir fácilmente un canal abierto. Las bacterias pueden continuar en la ubre adhiriéndose y colonizando nuevos tejidos. Una vez que las bacterias se encuentran dentro de la ubre, la infección y la inflamación de la zona dañada comienzan. Las bacterias afectan inicialmente los tejidos que recubren los conductos grandes y las cisternas de la leche, esto por la producción de varios factores de virulencia que causan la inflamación y muerte de las células productoras de leche. Las células secretoras de la leche dañadas liberan sustancias que conducen a un aumento de la permeabilidad de los vasos y atraen a los leucocitos que puede engullir y destruir las bacterias. Durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que causan el reclutamiento de leucocitos adicionales de la sangre en la leche. Si las bacterias no son destruidas totalmente se siguen multiplicando y comienzan a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. A veces, los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección desaparece. En este caso, la obstrucción de los conductos se abre y la composición de la leche y la producción retorna a la normalidad en varios días. Sin embargo, si la infección persiste y los conductos siguen siendo obstruidos, la leche encerrada hace que las células secretoras vuelvan a un estado de descanso y los alveolos empiezan a contraerse. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a la destrucción total de las estructuras alveolares, que son sustituidos por los tejidos conectivos. La destrucción del tejido secretor de la leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para el control de la infección. Por lo tanto, como la enfermedad progresa, el número de células somáticas en la leche -atribuido principalmente a neutrófilos- se eleva y se asocia con una reducción permanente de la producción de leche (Akers y Nickerson, 2011; Oviedo-Boyso et al., 2007; Paape et al., 2000).

La glándula mamaria es un órgano único y complejo presente en mamíferos, y con grandes capacidades de síntesis y secreción. Tiene un increíble nivel de organización y una

notable habilidad de convertir nutrientes circulantes a componentes lácteos (Bauman et al., 2006). Proporciona alimentación y protección a enfermedades a las crías recién nacidas a través de la secreción del fluido coloidal lácteo (Vorbach et al., 2006). En los tejidos y las secreciones de la glándula se encuentran factores inmunes innatos y específicos: anatómicos, celulares y solubles, que median un papel vital en la protección de la glándula a enfermedades infecciosas, y la eficiencia de esos mecanismos de defensa determinan la resistencia de la glándula mamaria a una infección intramamaria (Sordillo et al., 1997).

1) Los factores anatómicos pueden ser el canal del pezón, su esfínter y una matriz similar a una malla de queratina asociada a lípidos y proteínas básicas que recubre el canal, la cual posee propiedades bactericidas y bacteriostáticas (Oviedo-Boyso et al., 2007; Rainard y Riollet, 2006).

2) Factores celulares: basada en neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los cuales intervienen en funciones como la fagocitosis de patógenos, la producción de especies reactivas de oxígeno, la síntesis de péptidos antimicrobianos y de enzimas hidrolíticas, además de ser presentadores de antígenos e implicados en la detección de patógenos invasores e iniciación de la respuesta inflamatoria, representando su función esencial de efectores de la inmunidad innata (Oviedo-Boyso et al., 2007; Sordillo et al., 1997). Estos factores perciben la presencia de los patógenos y ponen en movimiento el inicio de la defensa inmune a través de receptores de membrana que sensan componentes moleculares de los patógenos como lipopolisacáridos (gram-) y ácido lipoteicoico (gram+), y activan otros componentes que inician la respuesta inmune innata y la inducción de citocinas proinflamatorias (O'Neill, 2006; Yang et al., 2008); además de otras moléculas lipídicas como leucotrienos y postanglandinas que incrementan la reacción de inflamación (Oviedo-Boyso et al., 2007). En el final de la respuesta, los linfocitos T y B son estimulados e inician la respuesta inmune adquirida.

3) Factores solubles: La inflamación es regulada por citocinas proinflamatorias como la interleucina-(IL-)1 β , IL-6, IL-8, el factor de necrosis tumoral-(TNF-) α e interferon (IFN) que incrementan la capacidad bactericida de los factores celulares, promueven el reclutamiento de neutrófilos, la maduración de células dendríticas y el control de la respuesta inmune adquirida (Riollet, 2002).

El control de la mastitis se basa en métodos preventivos a través de una correcta higiene del ordeño (Keefe, 2012), la reducción de la exposición a patógenos ambientales, y la terapia de antibiótico de secado (Sordillo et al., 1997). Los tratamientos han ido enfocados especialmente en el uso de antibióticos, vacunas y terapias de bacteriófagos, otros enfoques ha sido el mejoramiento genético a partir de elementos genéticos de la inmunidad innata. Además, estrategias no auxiliares como la adición de inmuno-estimulantes no específicos, terapia de lactación, tratamiento al secado y selladores de pezones, también han sido usadas (Sordillo et al., 1997; Tiwari et al., 2013). A pesar de que existe un mayor entendimiento en las infecciones intramamarias, y las prácticas han reducido la aparición de la enfermedad mejorado los tratamientos y las medidas de prevención, la mastitis continua siendo un problema para la ganadería lechera (Tiwari et al., 2013). Sugiriendo la necesidad de nuevos e innovadores enfoques dirigidos hacia alternativas viables y seguras para el control de la mastitis (Sordillo et al., 1997).

2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un miembro de la familia Staphylococcaceae en el orden Bacillales. Fue originalmente agrupado a la familia Micrococcaceae pero estudios recientes de homología de genes, perfiles bioquímicos de estructuras y componentes celulares, ensayos de susceptibilidad a antibióticos, inmunoquímica, hibridación de ADN-ADN, ADN-ARNr y secuenciación de ARNr 16S, han demostrado claras diferencias tanto genéticas y epigenéticas entre estafilococos y micrococos (Dworkin y Falkow, 2006; Toldrá, 2010; Whiley, 2003). Sin embargo, erróneamente se sigue usando la familia Micrococcaceae como taxa para *S. aureus* en diversos textos actuales.

En exámenes microscópicos esta bacteria aparece en la forma de cocos grampositivos formando racimos, y su distinción frente a las otras especies de estafilococos es su pigmentación dorada de las colonias. Su diámetro es de 0.5 – 1.5 μm (Harris et al, 2002). Su metabolismo es anaeróbico facultativo, es no móvil, no esporulante, y en pruebas bioquímicas es catalasa

positivo, oxidasa negativa y coagulasa positivo (Lowy, 1998). Su genoma consiste en un cromosoma circular de aproximadamente 2 megabases, que incluyen elementos genéticos móviles extracromosómicos como profagos, plásmidos y transposones, y también secuencias de inserción, islas de patogenicidad y casetes cromosómicos; estos elementos anteriormente mencionados son identificados como fragmentos de ADN que codifican una variedad de factores de virulencia y determinantes de resistencia, como también de la maquinaria enzimática que media su transferencia e integración al ADN diana (Malachowa y DeLeo, 2010). Los genes de esos elementos extracromosómicos pueden ser transferidos entre cepas de estafilococos u otras especies grampositivas (Lowy, 1998).

S. aureus tiene una marcada habilidad de adaptarse a diversos ambientes y genera infecciones en animales y humanos. Sus principales hábitat son la piel, la superficie de las glándulas y las membranas de las mucosas de mamíferos y aves (Toldrá, 2010). En humanos, es un patógeno persistente y es responsable de una serie de enfermedades que varían considerablemente en la presentación clínica y en la gravedad. El patógeno puede causar una amplia variedad de infecciones, las cuales pueden ser divididas en tres tipos: (i) lesiones superficiales, tales como infecciones de heridas; (ii) toxinosis, como intoxicación por alimentos, el síndrome de la piel escaldada y del shock tóxico; y (iii) condiciones sistémicas y potencialmente mortales, tales como endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteremia. Estas infecciones son difíciles de erradicar, frecuentemente recaen y poseen fuerte adaptación a la terapia antibiótica (Bien et al., 2011; Garzoni et al., 2007). Esta bacteria también tiene relevancia en infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales (intrahospitalaria) (Bien et al., 2011). En la mastitis bovina esta bacteria gram positiva es frecuentemente aislada en casos subclínicos y crónicos alrededor del mundo (Zecconi, 2010). Ha adquirido una dramática importancia en la medicina humana debido al incremento de la prevalencia de cepas resistentes a antibióticos (Zecconi y Scali, 2013).

Su efecto asintomático y crónico, ha establecido durante los últimos años una fuerte evidencia de que el patógeno es capaz de sobrevivir dentro de las células, lo que ha conducido a denominarlo un patógeno intracelular facultativo (Fraunholz y Sinha, 2012). Es capaz de sobrevivir e invadir *in vitro* una variedad de fagocitos profesionales y no profesionales, neutrófilos, células dendríticas y macrófagos, así como también fibroblastos, osteoblastos, endotelio y células epiteliales (Kubica et al., 2008). La internalización es promovida por la fibronectina de la célula hospedera la cual actúa como un puente entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la superficie de la célula y las proteínas de unión a fibronectina de *S. aureus*, esto conduce a mecanismos de transducción de señales que finalmente produce un rearrreglo del citoesqueleto, donde la bacteria es internalizada mediada por mecanismos “zipper” (Sinha et al., 1999). En consiguiente esta bacteria puede persistir intracelularmente escapando de las defensas inmunes y de los agentes antimicrobianos, o continuar multiplicándose y matando células a través del mecanismo de apoptosis (Bayles et al., 1998). Mientras esta dentro de las células requiere de múltiples factores de virulencia para sobrevivir.

2.4 Virulencia de *Staphylococcus aureus*

A pesar de que la resistencia a antibióticos es considerada como el principal problema potencial en una infección, *S. aureus* posee un amplio arsenal de factores de virulencia que son las bases de su patogenicidad y le permiten adaptarse a diversos nichos en el hospedero (Zecconi y Scali, 2013).

Un factor de virulencia es un componente microbiano que puede dañar a un hospedero susceptible (Casadevall y Pirofski, 2009); en *S. aureus* comprenden componentes estructurales de la pared celular tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, proteoglicanos, glicolípidos y productos de secreción. Basado en sus actividades biológicas, los factores de virulencia pueden ser divididos en tres categorías: 1) los que median adhesión (adhesinas); 2) los que promueven el

daño tisular y la proliferación (invasinas); y 3) los que los protegen del sistema inmune. Su patogenicidad depende de la acción combinada de éstos.

La expresión de los factores de virulencia depende de la fase de crecimiento. Una curva ideal de crecimiento puede ser dividida en tres fases: lag, exponencial y estacionaria. Los componentes de superficie son expresados durante la fase exponencial, mientras que los factores de secreción son expresados en la fase post exponencial. Durante la fase exponencial el metabolismo bacteriano es rápido y eficiente para garantizar un crecimiento constante. Como la tasa de crecimiento disminuye, los nuevos sistemas de regulación se activan para reorganizar el metabolismo celular hacia la supervivencia a largo plazo en condiciones desfavorables. Esta reorganización se inicia evidentemente durante un período de transición que se refiere como la fase post-exponencial. Una característica notable de la fase post-exponenciales la rápida síntesis de un conjunto de proteínas no esenciales, muchos de los cuales son secretadas (Harris et al., 2002; Novick et al., 1995).

Las fases de crecimiento se pueden contextualizar biológicamente en los diferentes estadios de infección: (i) colonización, (ii) evasión de defensas inmunes, (iii) crecimiento y división celular, y (iv) propagación (Cheung et al., 2004). La regulación recíproca facilita la progresión de una infección desde los estadios tempranos (fase exponencial) cuando las proteínas de superficie con funciones de adhesión se sintetizan activamente, coincidiendo con las fases de unión al tejido y la colonización; hasta las fases posteriores (post-exponencial y estacionaria), donde la expresión de las proteínas de la pared celulares reprimida, mientras que la síntesis de toxinas extracelulares y de enzimas predomina cuando son requeridas para combatir las defensas inmunes junto con exoenzimas degradativas que facilitan la adquisición de nutrientes (Cheung et al., 2004; Gordon et al., 2013). Las exotoxinas sintetizadas durante la fase post-exponencial probablemente facilitan la invasión local (Cheung et al., 2004). *S. aureus* puede alterarla respuesta inmune innata mediante la secreción de un número de diferentes complejos de proteínas

de evasión inmune que funcionan inhibiendo el reclutamiento de neutrófilos o activando, o matando a los neutrófilos vía lisis (McCarthy y Lindsay, 2013).

2.5 Adhesión de *Staphylococcus aureus*

La adhesión a las células epiteliales es el primer paso para el proceso de infección por *S. aureus* (Cifrian et al., 1994). Este proceso es mediado por adhesinas, las cuales pueden interactuar con un gran número de proteínas del hospedero. Las adhesinas pueden ser clasificadas en: (i) de naturaleza proteínica y (ii) no-proteínicas. Las proteínicas se clasifican en la familia de proteínas MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules /Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz) que están ancladas a la superficie covalentemente o asociadas por diversos medios como interacciones iónicas o hidrofóbicas; por otro lado existe otro grupo de proteínas ancladas a superficie no-covalentemente que incluyen las autolisinas/adhesinas, SERAM y proteínas que atraviesan membranas. En el caso de las adhesinas no-proteínicas abarcan el polisacárido PIA y los ácidos lipoteicoico y teicoico (Clarke y Foster, 2006; Heilmann, 2011b). La familia MSCRAMM considera los miembros de proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB), proteínas de unión a fibrinógeno (ClfA y ClfB), la familia de Sdr, Proteína A (spA) entre otros (Bien et al., 2011; Heilmann, 2011a). Estas adhesinas son importantes en la mastitis bovina (Klein et al., 2012; Stutz et al., 2011).

Esta clase de adhesinas MSCRAMM de *S. aureus* comprenden proteínas ancladas covalentemente a peptidoglicanos, que se unen específicamente a componentes de la matriz extracelular (MEC). Reconocen los componentes más destacados de la MEC y del plasma sanguíneo, como el fibrinógeno, la fibronectina, y el colágeno. La matriz extracelular se organiza de un complejo proteico, cuya composición y estructura influye en numerosos procesos biológicos tales como la adhesión, migración, proliferación o diferenciación; sin embargo, para los microorganismos sirve como un sustrato de anclaje en situaciones de infección. La habilidad

de adherirse a la matriz extracelular y las proteínas del plasma depositadas en biomateriales (biofilm) es un factor significante en la patogénesis de infecciones basadas en aparatos ortopédicos (Harris et al., 2002). El nivel de adhesión es dependiente de la fase de crecimiento y es regulado por específicos mecanismos de regulación a nivel transcripcional principalmente.

2.5.1 Regulación de la virulencia de *Staphylococcus aureus*

La expresión coordinada de diversos factores de virulencia en respuesta a señales ambientales durante los estadios de infección alude a la existencia de los reguladores globales, en los que un determinante único controla la expresión de muchos genes blanco no vinculados (Cheung et al., 2004). Energéticamente, la expresión de factores de virulencia es costosa y por lo tanto está estrechamente regulada por intrincadas redes reguladoras de genes y sistemas de transducción de señales de dos componentes (Gordon et al., 2013). Estos consisten en un sensor de histidina quinasa y un regulador de respuesta. La quinasa sensora es la proteína de transducción de señal primaria que interactúa directamente con un ligando o con su receptor. La unión del ligando induce una reacción de autofosforilación en la cual el gamma-fosfato del ATP es transferido a un residuo de histidina en la quinasa. La información de la señal ahora existe como un motivo fosforil preparado para ser transferido al regulador de la respuesta. Cada sensor quinasa está acoplado a una proteína reguladora de respuesta que lleva a cabo la acción, por lo general la activación de la transcripción de genes específicos para responder al estímulo. La interacción de la quinasa sensora fosforilada y su regulador de respuesta afín, resulta en una reacción de fosfotransferasa en la cual el grupo fosforil es transferido desde la quinasa sensora a un residuo de aspartato del regulador de respuesta. En general, los reguladores de respuesta consisten en dos dominios principales, el de regulador de respuesta y el dominio de unión a ADN. La cascada de fosforilación termina con la unión del regulador de respuesta a secuencias específicas de ADN, en la cual se activan las funciones de transcripción y regulación (Barrett y Hoch, 1998; Bronner et al., 2004). En muchos casos los reguladores de respuesta pueden ser

moduladores transcripcionales de unión a ADN, pero también pueden ser enzimas que modifican covalentemente moléculas.

La patogenicidad y versatilidad de *S. aureus* es controlada por un red regulatoria que dirige a una integrada expresión de muchos factores de virulencia (Novick, 2003; Ster et al., 2005). La expresión de los factores de virulencia se controla de una manera temporal y dependiente de la densidad celular y es afectada de manera multifactorial por los sistemas reguladores globales. *S. aureus* tiene dos reguladores globales de producción de factores de virulencia muy bien caracterizados, el *agr* (Recsei et al., 1986) y *sar* (Cheung et al., 1992), que regulan la expresión de proteínas de superficie, exoproteínas y otras proteínas esenciales para el crecimiento (Ster et al., 2005); los cuales le permiten la adaptación a ambientes hostiles y sus formidables defensas antibacterianas (Novick, 2003).

El locus *agr* (accessory gene regulator/gen accesorio regulador) contiene dos promotores divergentes P2 y P3. El promotor P2 vía el transcrito RNAII, participa en la transcripción de elementos del *quórum sensing agr* A, C, B y D (Novick et al., 1995). *agrA* es el regulador de respuesta el cual es requerido para la transcripción de RNAIII, la molécula efectora del locus regulador, su transcripción ocurre en la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria y dirige a la represión de proteínas de superficie (adhesinas) y a la activación de exoproteínas (Novick et al., 1993). *sar* (staphylococcal accessory regulator/regulador accesorio estafilocócico) produce proteínas usadas para responder a los cambios de microambientes (Cheung et al., 2008), *agr* es controlada por SarA (Cheung et al., 2008), el cual aumenta la expresión en la fase exponencial de toxinas de secreción directa o indirectamente vía regulación positiva de *agr* (Cheung et al., 2008).

La proteína A y las proteínas de unión a fibronectina son controladas por Sar y Agr (Chien et al., 1999). Rot, otro regulador es un activador de *clfB*, y *agr*/RNAIII puede regular *clfB*

vía Rot (Xue et al., 2012). *sdrC* no es regulado ni por *sar* ni *agr*, pero si por *msa* (Nagarajan y Mississippi, 2008)

Hay una creciente evidencia que sugiere que inhibiendo la producción de factores de virulencia se puede significativamente atenuar la infección, así como la inhibición de la producción y la acción de factores de virulencia a través de vías no bactericidas; además, dado que la mayoría de los factores de virulencia no son esenciales para la viabilidad bacteriana, en principio, el bloqueo de la virulencia puede ejercer una presión menos selectiva para la generación de resistencia (Gordon et al., 2013).

2.5.2 Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los patógenos contagiosos con más frecuencia aislados en casos de mastitis clínica y subclínica, y es posiblemente el agente más estudiado en mastitis bovina (Zadoks et al., 2011). En la mastitis causada por *S. aureus* los valores de RCC son 333,000 frente al control positivo que es 68,000 células/mL⁻¹ (Rainard y Riollot, 2003).

Las investigaciones de este patógeno han llevado al desarrollo de métodos de control basados en higiene y tratamientos de antibióticos (Kerro et al., 2002). Sin embargo, aún es un problema vigente, ya que los tratamientos de antibióticos solo pueden curar un 10-30% de los casos, debido en parte a la sobrevivencia intracelular de la bacteria que la hace inaccesible para los antimicrobianos; además del rango de factores de virulencia que contribuyen a la sobrevivencia y al desarrollo de resistencia reportado en algunas cepas.

Los principales reservorios de *S. aureus* son los cuartos infectados, la piel de la ubre y el pezón (Roberson et al., 1994); la bacteria coloniza la punta del pezón y se mueve a la zona intramamaria ya sea por la colonización progresiva o por los cambios en la presión intramamaria, especialmente al final del ordeño. En el área intramamaria puede adherirse a las células epiteliales, multiplicarse y colonizar el tejido. La adherencia a células epiteliales juega un rol de carácter defensivo importante en la mastitis por *S. aureus* (Hensen et al., 2000), frente a las defensas inmunes y disminuye la eficacia del tratamiento antibiótico (Almeida et al., 1996). Este patrón puede ser uno de los factores que explican el carácter crónico de las infecciones intramamarias de *S. aureus* (Almeida et al., 1997). Así mismo, la habilidad de formar variantes de colonias pequeñas -formas metabólicamente inactivas- puede ser un aspecto importante de sobrevivencia intracelular que promueve el desarrollo de persistencia en infecciones estafilocócicas y resistencia a antibióticos (Proctor et al., 1994). La bacteria es capaz de entrar a las células epiteliales (Sinha et al., 1999), y sobrevivir en células alveolares y macrófagos (Hebert et al., 2000). Es un patógeno silencioso que no induce una alta expresión de citocinas (Lara-Zárate et al., 2011; Yang et al., 2008).

S. aureus puede adherirse a células epiteliales bovinas *in vitro* (Cifrian et al., 1994), e incluso internalizarse e inducir apoptosis en líneas celulares de epitelio mamario bovino (Almeida et al., 1996; Bayles et al., 1998). Ensayos de infección en células epiteliales mamarias bovinas demuestran al patógeno realizando la invasión, la replicación intracelular y necesitando de la participación activa de componentes del citoesqueleto, como también propios de la bacteria (Almeida et al., 1996).

2.5.3 Células epiteliales mamarias bovinas

El epitelio funciona como un punto de apoyo contra patógenos invasores debido a sus múltiples mecanismos de defensa (Ashida et al., 2012). Las células epiteliales tienen interacción con patógenos y en respuesta a ello generan una variedad de mediadores de la inflamación como

citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y metabolitos del ácido araquidónico (Rainard y Riollet, 2006). Las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) tienen contacto directo con las bacterias invasoras y ellas juegan un rol importante en la defensa inmune para prevenir a la glándula de inflamaciones severas (Rainard y Riollet, 2006; Wellnitz et.al, 2006). Esta respuesta rápida se basa a través de la activación de varios receptores de reconocimiento de patrón que identifican patrones moleculares asociados a patógenos, esta interacción termina en la producción de mediadores de la inflamación y la defensa local en las CEMB (Gilbert et al., 2013). En la mastitis bovina, la primera línea de defensa luego que la bacteria logra vencer el pezón, son los receptores de reconocimiento asociados a la superficie celular y los péptidos antimicrobianos que son secretados directamente por las CEMB, además de simultáneamente citocinas y quimiocinas. Es por esto que el epitelio mamario es considerado que juega un rol importante como centinela y contribuye de manera significativa a la defensa inmune de la glándula mamaria.

2.6 Ácidos grasos de cadena corta y media

Los AG son definidos como ácidos carboxílicos con una cola, de los cuales pueden ser clasificados en cadena corta (de 1 a 5 carbonos), media (de 6 a 12 carbonos) y larga (más de 12 carbonos); el ácido butírico (4C) por ejemplo es de cadena corta y el ácido caprílico (8C) de cadena media (Cook y Sellin, 1998; Layden et al., 2013). Los AG han sido utilizados ampliamente como aditivos y preservantes alimentarios, en el control microbiano y en suplementos en dietas de granjas. Los AG, especialmente los de cadena media, son sustancias las cuales pueden ser consideradas como sustitutos de los antibióticos (Hanczakowska et al., 2011).

En el intestino, han sido asociados en el rol vital del mantenimiento de la integridad y el metabolismo del colon (Cook y Sellin, 1998); destacando como un recurso de energía, mantenimiento de un pH alto para prevenir el crecimiento de patógenos, favoreciendo el crecimiento celular, estimulando el crecimiento de bacterias beneficiosas. Además, se les atribuyen efectos benéficos en casos clínicos como el síndrome metabólico, trastornos intestinales (diarrea) y ciertos tipos de cáncer (Roy et al., 2006). También se le han asignado

funciones de mediadores de la inflamación, apoptosis y expresión de genes a través de su actividad de inhibición de la desacetilación de histonas (Pryde et al., 2002). Además, son reconocidos sus efectos en el sistema inmune innato (Vinolo et al., 2011).

2.6.1 Ácidos grasos de cadena corta en la leche bovina

La leche bovina contiene aproximadamente un 87% de agua, 4.6% lactosa, 3.4% de proteína, 4.2% de lípidos, 0.8% minerales y 0.1% de vitaminas. La cantidad de lípidos está constituida principalmente por triglicéridos, junto con pequeñas cantidades de otros lípidos como fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres. Del total de lípidos, alrededor del 11% lo comprenden los ácidos grasos de cadena corta, y casi la mitad de ellos es ácido butírico (Garton, 1963; Mansson, 2008). El butirato y el ácido caprílico están en un rango medio de 2-5 % y 1-3% respectivamente en la grasa de la leche (Jensen, 2002); otros estudios informan 3.1 - 4.4% y 1.0-1.7 %, respectivamente (MacGibbon y Taylor, 2006). Sin embargo, la leche bovina resalta en comparación a otras, ya que contiene mayores cantidades de ácidos butírico, caproico, caprílico y cáprico (Garton, 1963; Jensen, 2002).

Los ácidos grasos de la leche bovina derivan de dos fuentes: 1) síntesis *de novo* en la glándula mamaria, y 2) de los lípidos de la alimentación. Los sintetizados *de novo* son principalmente ácidos grasos de cadena corta y media (4:0 a 14:0), aunque también se sintetizan algunos de 16:0, mientras que los C18 y algunos 16:0 surgen de los lípidos del plasma. La síntesis *de novo* utiliza principalmente acetato y algunos β -hidroxibutirato provenientes de la actividad microbiana del rumen y son utilizados por las células epiteliales mamarias para la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y media (MacGibbon y Taylor, 2006).

2.6.2 Efectos de los ácidos grasos de cadena corta y media en la virulencia de patógenos bacterianos

El efecto de los AG en la virulencia bacteriana se especuló de estudios en intestino de ratas, donde se administraba un antibiótico que reducía la flora microbiana en el colon y como resultado decrecían los AGCC, reflejando una mayor susceptibilidad para la infección con *Salmonella typhimurium* (Bohnhoff y Miller, 1962).

Se ha demostrado, especialmente en el intestino, que el acetato, propionato, formiato o butirato, influyen profundamente en la función de la barrera intestinal y reflejan una importante función en la inmunidad del hospedador, la proliferación epitelial, y en los últimos años en la patogénesis bacteriana (Ashida et al., 2012; Keeney y Finlay, 2011).

Los AGCC y AGCM han sido utilizados como herramientas de control en la producción animal de aves de corral, lechones destetados, conejos e incluso en la acuicultura (Defoirdt et al., 2009; Dierick et al., 2002; Skrivanova et al., 2010; Van Immerseel et al., 2006). Han sido intensamente estudiados como bactericidas y bacteriostáticos en enterobacterias tales como *Salmonella spp*, *Escherichiacoli* y *Shigella flexneri* (Defoirdt et al., 2009). En la avicultura, los AGCC son usados con el propósito de combatir las infecciones por *Salmonella* (Van Immerseel et al., 2004).

El tracto gastrointestinal de los animales contiene altos niveles de AGCC, incluyendo acetato, propionato y butirato, originados de la acción enzimática de bacterias residentes del colon. Los AGCC pueden proporcionar energía para el hospedador y altos niveles de éstos pueden inhibir el crecimiento de bacterias patogénicas. En el caso del ácido caprílico ha sido reportado su efecto inhibitorio de patógenos de peces (Kollanoor et al., 2007). Otros trabajos con *S. enterica* mostraron un incremento en la invasión de esta bacteria en las líneas celulares HEp-2 e intestinales cuando esta fue incubada en un medio suplementado con acetato. Sin embargo, en un medio suplementado con butirato o propionato disminuyó la invasión del patógeno (Van Immerseel et al., 2003).

Las actividades de los AG son tanto bacteriostáticas y bactericidas, siendo el pH el efector primordial debido a que los AG son débiles, por lo cual pueden disociarse en iones. Los ácidos disociados pueden penetrar fácilmente la membrana plasmática y una vez en el citoplasma, el pH de este los disocia en aniones y protones, reduciendo de este modo el pH interno (Russell y Diez-Gonzalez, 1998). A la larga esto representa un problema a la bacteria en el sentido de mantener el pH neutro del citoplasma para la síntesis de macromoléculas; el exceso de protones debe exportarse provocando un alto uso de ATP que conlleva al agotamiento de la energía celular (Guilloteau et al., 2010). Además, los AGCC son propuestos que interfieren con las estructuras membranales y en las proteínas de membrana, en el desacoplamiento del transporte de electrones y por lo tanto la reducción de la producción de ATP. Esta interferencia puede dirigir al daño de membrana, dando lugar a fugas o en la interrupción de la permeabilidad de la membrana externa. Otras acciones menos directas es la influencia en la síntesis macromolecular o el transporte de nutrientes (Cherrington et al., 1991).

Existen reportes de resistencia de las bacterias a los ácidos orgánicos. A pesar que el foco ha sido los antibióticos, en los cuales la modificación del blanco, la reducción del acceso al blanco o la inactivación por inhibidores han sido los mecanismos descritos; en ácidos orgánicos pueden estar funcionando los dos últimos (Chapman, 1998). Algunos organismos permiten una disminución de su pH interno y por lo tanto son más resistentes a los ácidos orgánicos que otros. También la resistencia inherente vía exclusión de la química antimicrobiana, la secreción del compuesto tóxico o de desintoxicación metabólica, puede influir en la eficacia de los ácidos orgánicos (Guilloteau et al., 2010). Los patógenos transmitidos por alimentos tienen contacto con el bajo pH del estómago, lo que aumenta la respuesta de tolerancia ácida, que podría incrementar su supervivencia en el intestino (Foster y Hall, 1991). Por lo que es razonable especular que los AGCC influyen en la virulencia.

2.6.3 Efectos de ácidos grasos de cadena corta sobre los factores de virulencia bacterianos

Diversos estudios demuestran la existencia de efectos de los AG a nivel de la regulación de la expresión genética en los factores de virulencia bacterianos, por ejemplo pueden decrecer la colonización intestinal por *S. enteritidis* en cerdos, mediando la expresión de los genes de virulencia (Gantois et al., 2006; Van Immerseel et al., 2005; Van Immerseel et al., 2004). En un análisis comparativo de transcriptomas, el butirato demostró disminuir genes de la isla de patogenicidad 1 en *Salmonella* (Gantois et al., 2006). En estudios *in vivo* realizados con ácido caprílico, se observó que redujo la colonización de *S. enterica* serovar Enteritidis en varias partes del tracto intestinal y en órganos internos, tales como el hígado y bazo de pollo de engorde comerciales (Kollanoor-Johny et al., 2012). Los autores encontraron que al cultivar a la bacteria en un medio suplementado con AGCC se inducen cambios en la expresión de *hilA* y *invF* - principales activadores de la isla de patogenicidad (SPI-1)- en *S. typhimurium*, regulando genes de invasión. Los efectos son positivos para acetato, mientras que con butirato y propionato existe decrecimiento en la invasión (Durant et al., 2000; Durant et al., 1999).

En otras bacterias, también se han encontrado efectos en la expresión de factores de virulencia, como en *E. coli*, donde los AGCC disminuyeron el efecto de adhesión debido al decrecimiento de la producción de la toxina shiga en células de colón bovinas (Cobbold y Desmarchelier, 2004). Estudios con acetato, que es producido en alta concentración por bacterias benéficas del intestino, demostraron que previene la infección y la liberación de esta toxina (Fukuda et al., 2011). Efectos sobre la expresión de genes de virulencia podrían explicar porqué los AGCC disminuyen la supervivencia del camarón infectado con *V. campbellii* cuando 20 mM de una mezcla de AGCC fue agregado al cultivo de agua (Defoirdt et al., 2006). Concentraciones de AGCC que simulan las presentes en el intestino activan la expresión de genes *iha* en *E. coli*, responsables de codificar proteínas mediadoras de adherencia (Herold et al., 2009). En *E. coli*, la presencia de AG en el medio DMEM aumentó la expresión de genes del flagelo, vía senso de los reguladores Lpr y Pch, permitiendo movilidad al patógeno (Tobe et al., 2011). También se han reportado cambios de expresión en elementos extracromosómicos, en el cual los AGCC

influyen la expresión de genes de plásmidos de virulencia en *Salmonella dublin* (El-Gedaily et al., 1997).

El ácido caprílico posee una demostrada capacidad bactericida y citotóxica contra patógenos como *E.coli* (Annamalai et al., 2004), *Salmonella* (Vasudevan et al., 2005) y *S. aureus* (Nair et al., 2005). En aves, se ha demostrado que puede disminuir la colonización de *Campylobacter* en pollos en edad de mercado, esto a través del pH, cambios de la microflora intestinal o virulencia (Solis de los Santos et al., 2009). El mecanismo de acción del ácido caprílico puede ser similar a los de los AGCC, los cuales podrían inactivar a la bacteria creando un ambiente ácido o por impacto directo en la expresión de factores de virulencia (Harrison, Balan, y Babu, 2013). Recientemente se ha reportado modificaciones post-traduccionales en la expresión del regulador HilD por parte de propionato en *Salmonella*, HilD es un regulador transcripcional que activa la expresión de proteínas efectoras requeridas para rearrreglos del citoesqueleto en células intestinales (Hung et al., 2013).

Los métodos alternativos para controlar el nivel de infecciones son importantes respecto a la mejora del bienestar animal, como en la producción y salud humana. Estas características, actualmente dan importancia a estos ácidos grasos como biocontroladores en la producción animal, especialmente en la problemática de la mastitis bovina mediada por *S.aureus* (Defoirdt et al., 2009; Van Immerseel et al., 2006).

3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La tesis se justifica en base a la problemática de la mastitis bovina producida por *Staphylococcus aureus*. Previamente el grupo de trabajo ha evaluado el efecto de los AG, butirato de sodio y octanoato de sodio, entre otros compuestos de naturaleza lipídica, y han demostrado que disminuyen la internalización de esta bacteria en células epiteliales mamarias bovinas, junto con un pronunciado aumento de la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune innata (Alva-Murillo et al., 2013; Ochoa-Zarzosa et al., 2009). Estos estudios sugieren que los AG tienen efectivas capacidades de modular la respuesta inmune innata. Dentro del área de investigación del grupo no se ha evaluado los efectos de estos AG en la bacteria y en el mecanismo de internalización. Estudios en *Salmonella*, demuestran que el ácido butírico y el ácido caprílico (ácido octanoico) modulan la expresión de genes de virulencia, que conduce a una reducción de la invasión en células intestinales de aves y porcinos. Otros estudios también han reportado cambios en la expresión de factores de virulencia que finalmente disminuyen la habilidad de los patógenos de realizar la infección. Esas investigaciones especulan en nuestro modelo de que los AG podrían inducir cambios de expresión en los mecanismos de síntesis y regulación de factores de virulencia de *S. aureus*, afectando principalmente los involucrados en la adhesión e internalización en las CEMB. Resulta interesante evaluar el efecto de estos AG con el fin de establecer su papel en el mecanismo de internalización de la bacteria mediada por ácidos grasos de cadena corta y media. Además de fijar una posible acción dual de estos ácidos, tanto en el hospedero como en la bacteria, el estudio podría entregar valiosas evidencias con el fin de mejorar el procedimiento ante la posible inducción o adición de estas moléculas a la glándula mamaria bovina y obtener una mejor defensa frente a una infección intramamaria.

3.1 HIPÓTESIS

El butirato de sodio y octanoato de sodio regulan diferencialmente la expresión de genes de factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* lo que contribuye a la disminución de la internalización bacteriana en células epiteliales mamarias bovinas.

3.2 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del butirato de sodio y octanoato de sodio en la expresión de genes de virulencia de *S. aureus* y su relación con la internalización de la bacteria en células epiteliales mamarias bovinas.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar si el pre-tratamiento de *S. aureus* con AG afecta su internalización en células epiteliales mamarias bovinas.
- Analizar la expresión de los transcritos de genes de virulencia (*clfB*) y de regulación (*sarA*, *agrA* y *RNAIII*) de *S. aureus* bajo el pre-tratamiento de butirato de sodio y octanoato de sodio.

4 METODOLOGÍA

Los experimentos fueron realizados en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Estado de Michoacán, México.

4.1 Cepas y reactivos

En este estudio se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) que proviene de un caso de mastitis clínica y está demostrada su capacidad de internalizar células epiteliales de glándula mamaria bovina (Anaya-Lopez et al., 2006). Las soluciones de trabajo de butirato de sodio y octanoato de sodio (Sigma) fueron disueltas en agua desionizada estéril. Basados en estudios anteriores del grupo de trabajo, se utilizaron las concentraciones de 0.5 (disminuye la internalización) y 2 mM (no variación en internalización) de butirato de sodio; y 0.25 (aumenta internalización) y 1 mM (disminuye internalización) de octanoato de sodio (Alva-Murillo et al., 2013; Ochoa-Zarzosa et al., 2009).

4.2 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) tratado con butirato de sodio y octanoato de sodio

Para aplicar los pre-tratamientos de ácidos grasos de cadena corta y media, las células bacterianas fueron crecidas toda la noche y ajustadas a una densidad óptica (DO) 0.2 (600nm), luego fueron adicionados los tratamientos descritos anteriormente. Una vez completados los tiempos de 2 y 24 h, los cultivos bacterianos fueron ajustados nuevamente a 0,2 (600nm) para realizar las infecciones en las CEMB con una multiplicidad de infección (MDI): 30:1 bacterias

por células. Cuando las bacterias se utilizaron para la extracción de ARN, no se requirió de ajuste de la DO.

4.3 Cultivo primario de células epiteliales mamarias bovinas (CEMB)

Las células se obtuvieron del tejido alveolar de la ubre de vacas en lactancia (Anaya-Lopez et al., 2006). Para los experimentos se utilizaron cultivos de pasajes del 2 al 8 sembrados en placas Petri (Corning Costar, NW, USA) en medio de cultivo DMEM medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F-12 K, Sigma) suplementado con 10% de suero de ternera (Equitech-BioInc, Kerrville, TX, USA), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina (Sigma), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hidrocortisona (Sigma), 100U/mL penicilina y estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y 1 $\mu\text{g}/\text{m}$ Lanfotericina B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células fueron cultivadas en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37°C. Solo se utilizaron CEMB con 80-90% de confluencia para los experimentos de internalización.

4.4 Ensayo de protección de gentamicina para evaluar la internalización de *Staphylococcus aureus* pretratado con butirato de sodio y octanoato de sodio

Se utilizó monocapas de CEMB polarizadas en placas recubiertas con 6–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de colágeno de cola de rata tipo I (Sigma). Para evaluar la internalización de la bacteria se llevó a cabo un ensayo de protección por gentamicina. Para iniciar el ensayo, las células se mantuvieron en F12k incompleto por 16 h para sincronizar el ciclo celular y que todas las células estuvieran en la misma fase al montar el experimento. Luego se adicionó al medio un control externo de butirato de sodio 0.5 mM por 24 h, el cual es reportado que disminuye la internalización al 50%. Las células epiteliales fueron infectadas por 2 h a 37°C con bacterias pre-tratadas con butirato de sodio y octanoato de sodio, bajo una multiplicidad de infección 30:1 (bacterias por célula). Luego de la infección, las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas en F12K incompleto y sin suero, suplementado con 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina por 1 h a 37°C para eliminar la bacteria extracelular. Las CEMB fueron despegadas con Tripsina/EDTA (Sigma) y lisadas en 200 μL de agua desionizada estéril. Las células lisadas fueron sembradas en placas de LB-Agar a 37°C toda

la noche. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado con técnicas de conteo de colonias estándar. Los datos son presentados como porcentaje de internalización respecto al control de CEMB.

4.5 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN total, el cultivo bacteriano fue crecido toda la noche a 37°C y 150 rpm, y se ajustó la DO a 0.2. Los cultivos fueron tratados con las soluciones de butirato de sodio (0.5 mM y 2mM) y octanoato de sodio (0.25 mM y 1mM), en tiempos de 2 y 24 h. Luego de finalizado el tiempo de incubación con los ácidos grasos, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. La pastilla fue suspendida por 3 h en una solución de lisozima (5mg/mL) para dañar la pared celular de la bacteria. El RNA total fue extraído con TRIzolReagent (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante con ligeras modificaciones volumétricas. La integridad del ARN fue verificada en un gel de agarosa 2% y la cantidad de ARN fue determinada en un espectrofotómetro. Para la síntesis de ADNc, el ARN total fue previamente tratado con una solución de DNasa I (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor, con el fin de eliminar contaminación genómica. La síntesis de ADNc fue realizada con el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) utilizando Random primers (hexámeros) como cebadores. Se confirmó la presencia de ADNc de *S. aureus* por amplificación de PCR de los oligonucleótidos 16S y *nuc*, específicos para la especie.

4.6 Análisis de la expresión genética

Los oligonucleótidos de este estudio (ver Tabla 1) fueron evaluados en PCR punto final, con ADNg y ADNc. La cuantificación relativa de la expresión genética (qPCR) fue realizada usando el método comparativo ($\Delta\Delta Ct$) en un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las reacciones fueron

llevadas a cabo con SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA, USA) bajo las condiciones de temperaturas indicadas en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Primer		Secuencia (5'-3')	TM (C°)	Referencia
16S	F	TAT GGAGGAACACCAGTGGCGAAG	50	(Klein et al., 2012)
	R	TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC		
<i>clfB</i>	F	TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC	60	(Klein et al., 2012)
	R	CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTTG		
<i>RNAlII</i>	F	GCATTTATTGGGGCATTGTATT	55	Este estudio
	R	GTGCCGGTCCCTCTTCTTTTAT		
<i>agrA</i>	F	TGCGAAGACGATCCAAAACAA	60	Este estudio
	R	CCAAGTGGGTCATGCTTACGAA		
<i>sarA</i>	F	CATATGGCAATTACAAAAATCAATGATT GCTTTGAG	55	Este estudio
	R	AGCAAGCTTTTA TTATAGTTCAATTCGTTGTTTG		

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 El butirato y octanoato de sodio reducen la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos de cadena corta y media en la internalización de *S. aureus* en las CEMB se llevaron a cabo ensayos de protección por gentamicina, en la cual la bacteria fue incubada con estas moléculas carboxílicas previo a la infección. Es pertinente señalar que en estudios previos se demostró que los dos AG, a las condiciones utilizadas en este trabajo, no afectan la viabilidad ni el crecimiento bacteriano (Alva-Murillo et al., 2013; Ochoa-Zarzosa et al., 2009).

Los resultados indican consistentemente que el pretratamiento de *S. aureus* por 2 h con los AG reduce el número de UFC recuperadas respecto al control (sin ácidos grasos), observándose una inhibición del 40 y 30%, respectivamente (Figura 1A y B). Este efecto fue independiente de la concentración ya que los efectos fueron similares en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados demuestran que los AG inhiben la internalización bacteriana en las CEMB, ya sea por un pretratamiento de las bacterias o de las CEMB. Sin embargo, el comportamiento es distinto en las dos condiciones, ya que en estudios previos se demostró que cuando las CEMB son pretratadas con los AG el efecto inhibitorio si es dependiente de la concentración (Alva-Murillo et al., 2013; Ochoa-Zarzosa et al., 2009). Este comportamiento no es extraño, ya que las células bacterianas no poseen la misma maquinaria de respuesta celular que las CEMB, por lo que se esperaría que los AG no tuvieran un efecto similar. Los efectos dependientes de la concentración de los AG en la internalización se han observado también en otras células. En un estudio realizado con células Caco-2, que imita al epitelio intestinal, la incubación de estas células con butirato condujo a una protección contra la invasión de *Campylobacter jejuni* de una manera dependiente de la concentración (Van Deun et al., 2008). En función de estos resultados, sería interesante evaluar el efecto conjunto del pretratamiento de las bacterias y las CEMB, para ver si existe algún efecto aditivo o potenciador de los AG en la internalización.

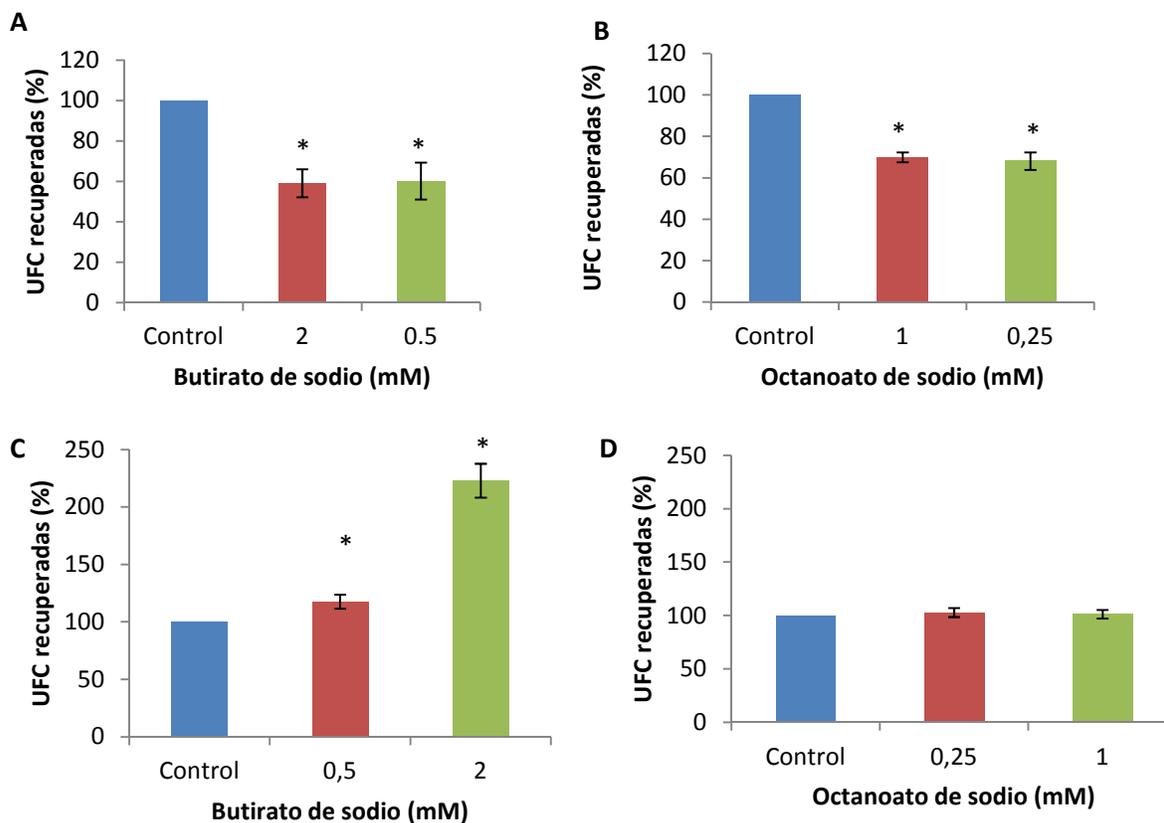


Figura 1. Efecto del pretratamiento de *Staphylococcus aureus* con butirato y octanoato de sodio por 2 (A y B) ó 24 h (C y D) en la internalización en las CEMB. El efecto en la internalización se muestra como el porcentaje de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas luego de la lisis celular después de 2 h de infección. Los valores fueron determinados considerando al control (sin pre-tratamiento del ácido graso) como 100% de internalización. Cada barra muestra el promedio de triplicados \pm SE de tres experimentos independientes. El símbolo (*) indica cambios significativos ($P < 0,05$) en relación al control.

En el caso de las bacterias incubadas con los AG por 24 h, no se observó un efecto del ONa en la internalización, ya que las UFC recuperadas fueron similares al control (Figura 1D). Respecto al BNa, en ambas condiciones se presentó un incremento en las UFC recuperadas,

siendo mayor el efecto en las condición de 2 mM (~2 veces) (Figura 1C). Estos efectos son diferentes a los observados a las 2 h de pretratamiento. Las diferencias observadas podrían estar en función de la fase de crecimiento en la cual *S. aureus* fue tratado con los AG. La bacteria a las 2 h de cultivo está iniciando la fase exponencial de crecimiento, y en ésta expresa algunas de sus proteínas que participan en la adhesión celular, ej. la proteína de unión a fibronectina (FnBP), por lo que es posible que los AG pudieran estar regulando negativamente la expresión de los genes que codifican para estas moléculas. Es conocido que la regulación de la expresión de los factores de virulencia es dependiente de la fase de crecimiento, estos resultados indicarían que en la fase exponencial, los AG podrían estar modulando moléculas de adhesión importantes, que conduce a que la bacteria se internalice menos. Más adelante se discutirá este aspecto con los resultados de expresión genética. Por otro lado, el tratamiento de la bacteria por 24 h implica que la célula está en contacto con los AG hasta la fase estacionaria. Es posible que la bacteria desarrolle mecanismos con el fin de adaptarse al estrés de estas moléculas carboxílicas, ya que la fase estacionaria es considerada como más resistente a estímulos externos.

La propiedad de estos ácidos de modularla internalización bacteriana es una importante característica que ha sido reportada. Algunos estudios demuestran que el butirato disminuye la colonización de *Salmonella* en células epiteliales cecales, cuando el patógeno fue incubado en este ácido graso (Van Immerseel et al., 2004). En el mismo estudio, el ácido acético la aumentó. Por otro lado, el ácido caprílico (denominación trivial al ácido octanoico) disminuyó la colonización en el intestino de aves por el patógeno *Campylobacter*, luego de que estas fueran alimentadas con el ácido (Solis de los Santos et al., 2009). Estos AG son compuestos económicos y su suplementación en la glándula mamaria podría resultar una económica estrategia para controlar procesos infecciosos. No es claro aún el mecanismo mediante el cual estos ácidos disminuyen la internalización en las CEMB, se descarta su actividad antimicrobiana debido a que las condiciones en las que se evaluaron no afecta el crecimiento ni la viabilidad bacteriana. Sin embargo, se ha reportado que los ácidos dañan proteínas de membrana en *E.coli* (Royce et al., 2013). En este sentido, en *S. aureus* las proteínas de superficie son importantes para el anclaje a las células epiteliales (Clarke y Foster, 2006), por lo que los AG podrían ejercer su efecto inhibitorio a través de esta diana. Otro posible mecanismo de acción podría ser que estén

regulando la expresión de algunos factores de virulencia en la bacteria que podría perjudicar a la bacteria a realizar el anclaje en CEMB. A continuación, se presentan los resultados de la evaluación de los efectos de los AG sobre la expresión de algunos genes de virulencia de *S. aureus*.

5.2 El butirato y el octanoato de sodio inducen cambios en la expresión de transcritos de genes de factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Para evaluar los efectos del BNa y ONa en la expresión de genes de virulencia de *S. aureus*, se incubaron las bacterias en las concentraciones descritas y se aisló el ARN total para realizar el análisis de la expresión genética a través de PCR cuantitativa (PCR en tiempo real).

5.3 Expresión de *clfB*

El factor *clfB* se ha identificado en muchos de los aislados de *S. aureus* obtenidos de casos de mastitis, por lo que se le considera un importante factor de virulencia. Ha sido reportado que ClfB es capaz de unirse a epitelio nasal (O'Brien et al., 2002), sin embargo no se ha reportado su adhesión a células epiteliales mamarias. En este trabajo se evaluó el efecto del BNa y ONa en la regulación de la expresión de este gen y su relación con la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

Mediante ensayos de cuantificación relativa de la expresión genética, se observó que el factor de virulencia *clfB* disminuyó su expresión (~50%) en los cultivos bacterianos incubados por 2 h con BNa respecto al control (sin AG) (Figura 2A). La inhibición fue similar en las dos concentraciones. Este resultado correlacionó con la disminución de la internalización observada en las mismas condiciones, sugiriendo que esta adhesina tiene una participación directa en la internalización de *S. aureus* reguladas por BNa en las CEMB. En el caso de ONa (2 h) se observó que a la concentración de 1mM disminuyó ligeramente la expresión de *clfB* (Figura 2B),

coincidiendo con los resultados de los ensayos de protección por gentamicina, donde la internalización se inhibió 40%. Sin embargo, la concentración de 0.25 mM aumentó la expresión del mensajero de esta adhesina, lo cual no correlaciona con la inhibición de la internalización observada a esa concentración. Se conoce que *clfB* se expresa preferentemente en la fase exponencial (Ní Eidhin et al., 1998), por lo que el BNa podría estar regulando negativamente la expresión en dicha fase; sin embargo, en el caso de ONa su efecto modular dependería de la concentración.

Respecto a la expresión de *clfB* en *S. aureus* después de 24 h de incubación, se observó que el BNa 2mM induce una notable expresión (~2.8 veces) de este gen, lo cual correlacionó con el aumento de la internalización bacteriana. En la condición de BNa 0.5mM, *clfB* tuvo una expresión similar a la mostrada a las 2 h, y no se observó una correlación con la internalización. Los niveles de expresión de *clfB* detectados con el tratamiento con ONa a las 24 h no correlacionaron con los datos de los ensayos de internalización. En las dos concentraciones evaluadas se observó un incremento en la expresión de *clfB*; sin embargo, los niveles de internalización de *S. aureus* no se ven modificados.

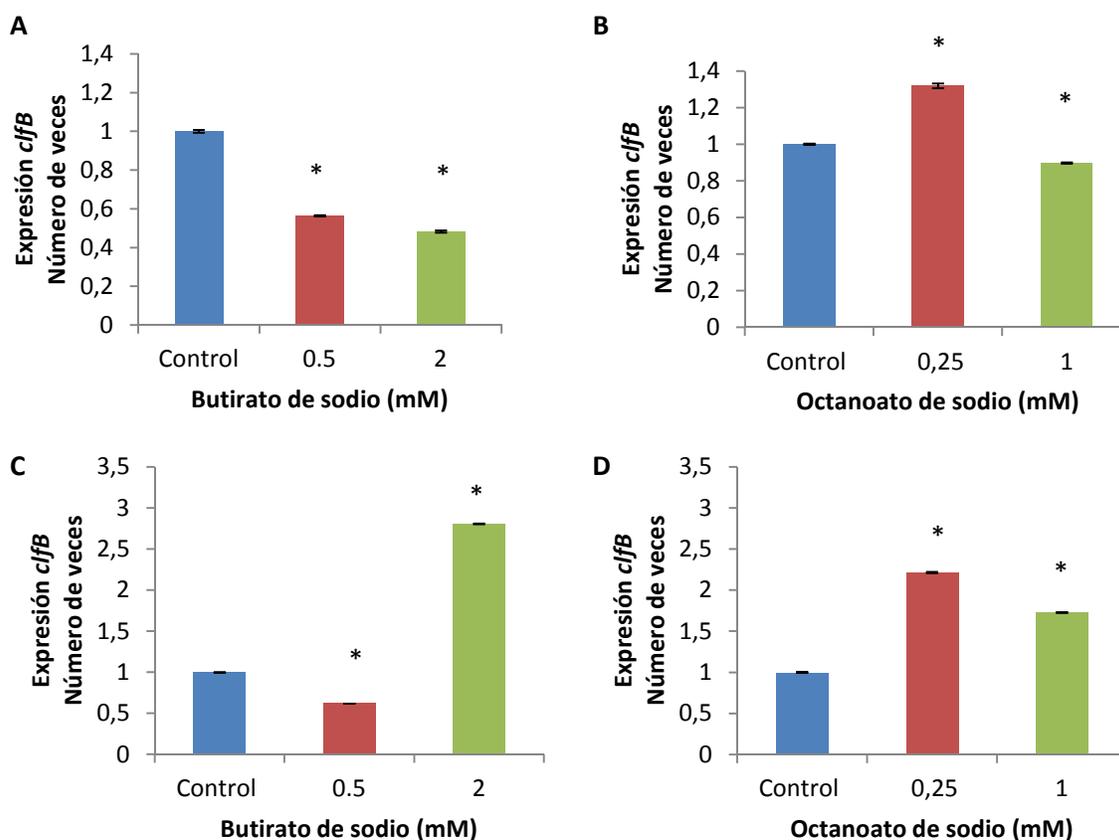


Figura 2. Efecto del pretratamiento de *Staphylococcus aureus* con butirato y octanoato de sodio en la expresión de *clfB*. Análisis de qPCR que muestra la expresión de *clfB* en *Staphylococcus aureus* estimulado por 2 h con butirato de sodio (A) y octanoato de sodio (B), y a las 24 h con butirato de sodio (C) y octanoato de sodio (D). El control corresponde a las bacterias incubadas sin AG. Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el gen 16S como el control endógeno. El símbolo (*) indica cambios significantes ($P < 0.05$) en relación al control sin ácidos grasos.

5.4 Expresión en *agrA*

El análisis de la expresión de *agrA* en bacterias incubadas por 2 h con BNa 2 mM mostró que disminuye la expresión ~ 0.5 veces con respecto al control. En el caso del ONa las dos condiciones inhibieron la expresión del gen de *agrA*, siendo mayor el efecto a 0.25 mM (Figura 3). Estos resultados son interesantes, ya que este gen es un regulador global y su expresión regula

negativamente la transcripción de adhesinas (Novick et al., 1995). Es decir, si aumenta la expresión de *agrA* se activa la regulación para inhibir las proteínas de superficie, al contrario una disminución de este regulador, como en los resultados obtenidos, permitiría a la bacteria tener activamente sus adhesinas expresadas. Por otro lado, como se esperaba a las 24 h de incubación con los AG se observó, en general, un aumento de la expresión de este gen. Estos datos coinciden con lo reportado, ya que se conoce que en la fase post-exponencial este regulador alcanza su máxima expresión. Sin embargo, esto no coincide con los datos de internalización. Es pertinente señalar que en los ensayos de invasión realizados los valores obtenidos corresponden a los efectos conjuntos de adhesión e internalización, por lo que es necesario realizar experimentos dirigidos a discernir cual de los dos eventos pudiera estar siendo regulados por los AG.

5.5 Expresión en *sarA*

La expresión de *sarA* fue regulada diferencialmente por el BNa a las 2h. La concentración de 0.5 mM indujo la expresión 2 veces, pero la concentración de 2mM la inhibió (0.5 veces) (Figura 4). Respecto a los efectos del ONa, también mostró un efecto diferencial; aunque estos fueron diferentes a los mostrados por el BNa, la concentración inhibitoria fue la de 0.25 mM y la de 1 mM tuvo un efecto inductor. Por lo general, la expresión de *sarA* coincide con la de las adhesinas en la etapa exponencial como es en el caso de la concentración 2mM de ONa. Un resultado interesante fue el observado en la concentración a 2mM de BNa en la cual se mantienen bajos los niveles de *sarA*, correlacionado estos resultados con los de *agrA*, se podría sugerir que *sarA* regula la expresión de *agr* permitiendo que no se inhiba la transcripción de las adhesinas.

En relación a los efectos de los AG en la expresión de *sarA* a las 24 h, se observó que el BNa, no modificó la expresión de este gen (Figura 4). Sin embargo, el ONa tuvo un efecto inductor, el cual fue dependiente de la concentración, observando un efecto inductor notable a 1 mM (~ 6 veces).

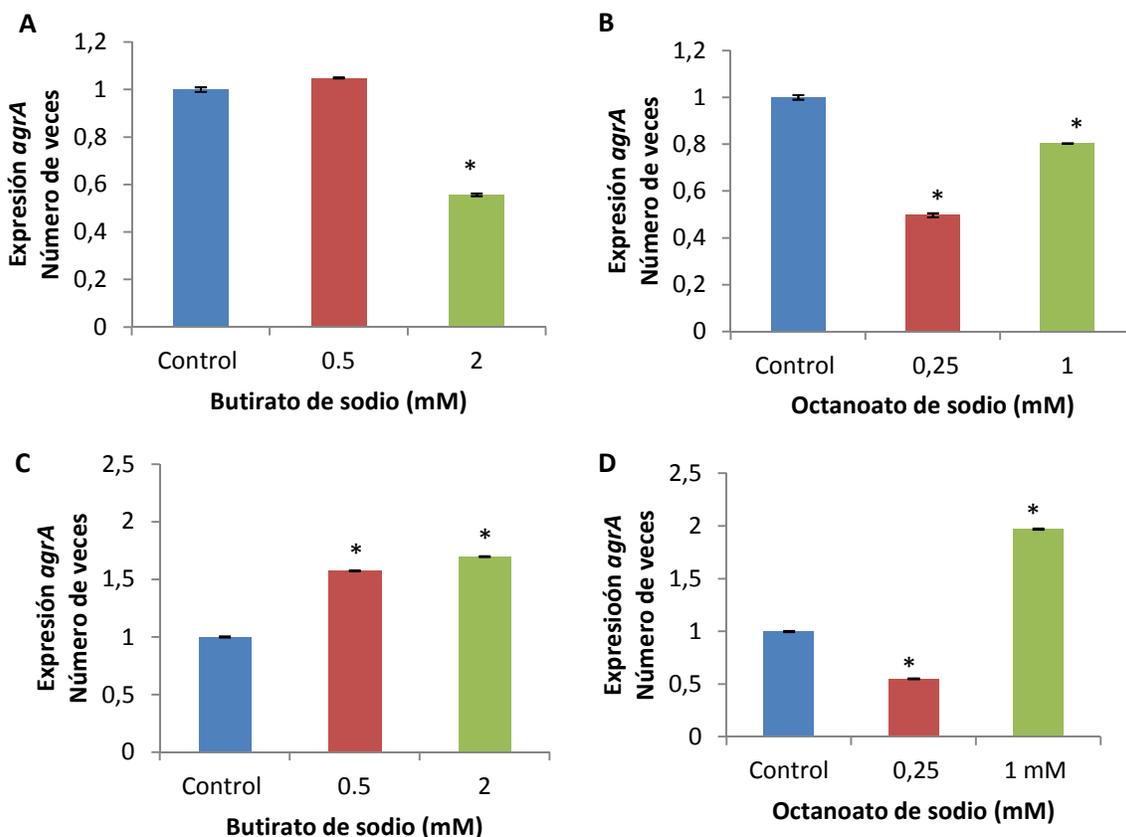


Figura3. Efecto del pretratamiento de *Staphylococcus aureus* con butirato y octanoato de sodio en la expresión de *agrA*. Análisis de qPCR que muestra la expresión de *agrA* en *Staphylococcus aureus* estimulado por 2 h con butirato de sodio (A) y octanoato de sodio (B), y a las 24 h con butirato de sodio (C) y octanoato de sodio (D). El control corresponde a las bacterias incubadas sin AG. Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el gen 16S como el control endógeno. El símbolo (*) indica cambios significantes ($P < 0.05$) en relación al control sin ácidos grasos.

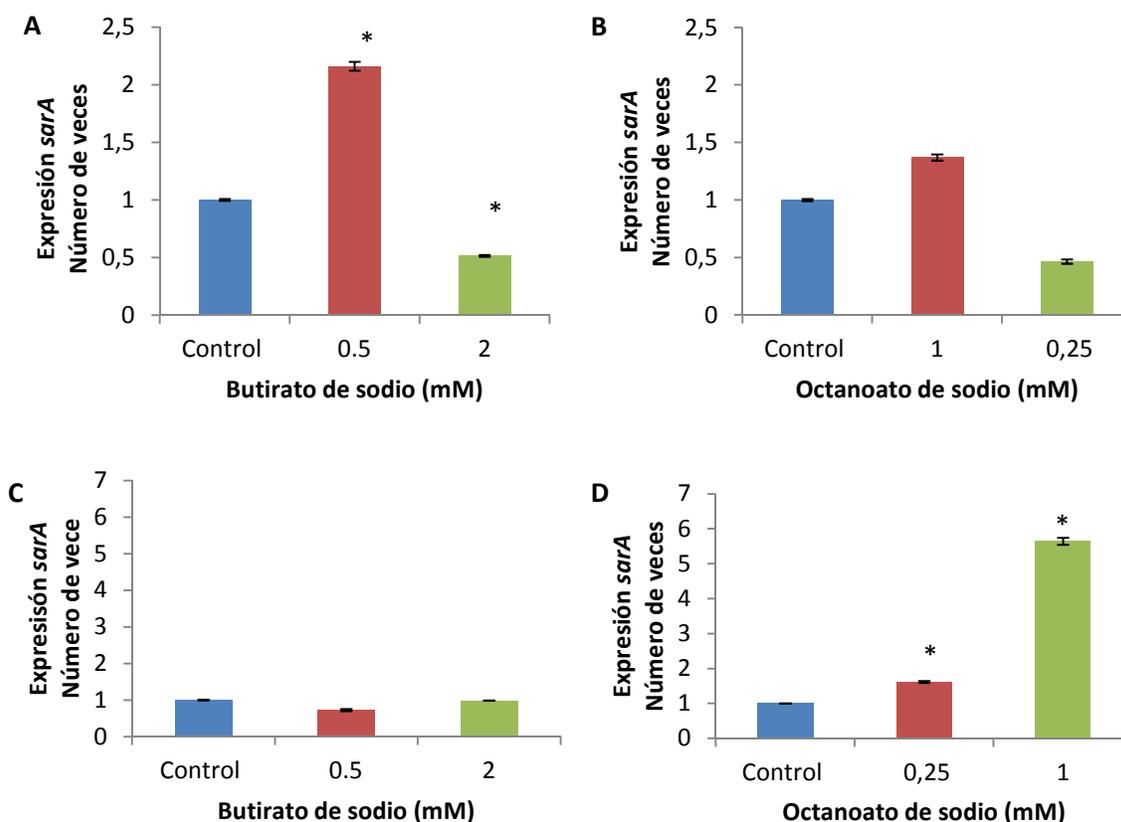


Figura4. Efecto del pretratamiento de *Staphylococcus aureus* con butirato y octanoato de sodio en la expresión de *sarA*. Análisis de qPCR que muestra la expresión de *sarA* en *Staphylococcus aureus* estimulado por 2 h con butirato de sodio (A) y octanoato de sodio (B), y a las 24 h con butirato de sodio (C) y octanoato de sodio (D). El control corresponde a las bacterias incubadas sin AG. Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el gen 16S como el control endógeno. El símbolo (*) indica cambios significantes ($P < 0.05$) en relación al control sin ácidos grasos.

5.6 Expresión en *rnaIII*

Los dos AG esencialmente no modificaron la expresión del gen de *rnaIII* a las dos 2 h de tratamiento, excepto en la condición de BNa 2 mM, donde se presentó una disminución en la expresión (Figura 5A). Estos datos correlacionan con los patrones de expresión de *agrA* y *sarA*. Esto permite concluir que el butirato 2 mM inhibe la expresión de adhesinas al inicio de la fase

exponencial. Un resultado similar se observó para el ONa 0.25 mM (Figura 5B). En el caso de la incubación por 24 h, se observaron patrones de expresión similares a *agrA* para los dos AG, ya que se presentó una inducción en la expresión de *rnaIII* en todas las condiciones evaluadas (Figura 5C y D).

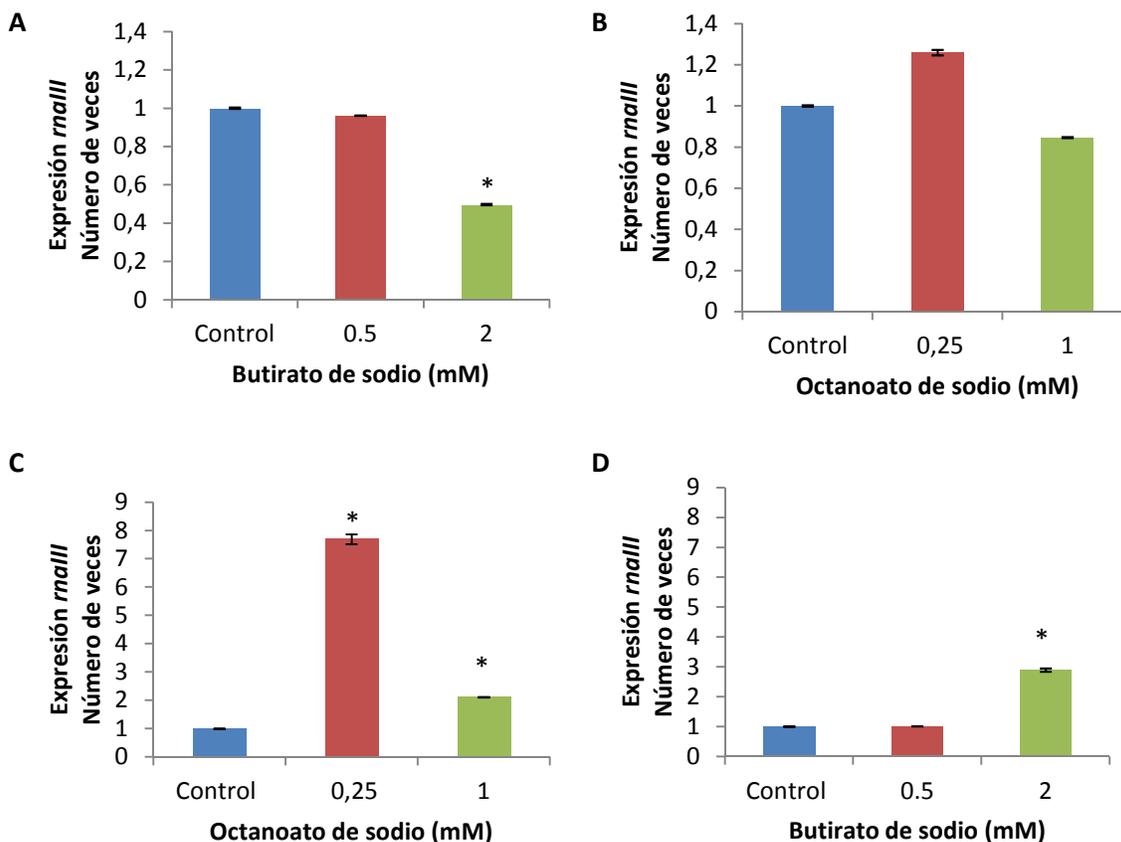


Figura 5. Efecto del pretratamiento de *Staphylococcus aureus* con butirato y octanoato de sodio en la expresión de *rnaIII*. Análisis de qPCR que muestra la expresión de *rnaIII* en *Staphylococcus aureus* estimulado por 2 h con butirato de sodio (A) y octanoato de sodio (B), y a las 24 h con butirato de sodio (C) y octanoato de sodio (D). El control corresponde a las bacterias incubadas sin AG. Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos independientes. Se utilizó el gen 16S como el control endógeno. El símbolo (*) indica cambios significantes ($P < 0.05$) en relación al control sin ácidos grasos.

Los resultados indican que el butirato y el octanoato de sodio reducen la internalización de *S. aureus* pre-tratados con estas moléculas en la etapa exponencial. Esta fase es importante ya que en ella se sintetizan activamente adhesinas con el fin de cumplir el primer paso crítico en la infección en las CMEB. El resultado de la expresión de la adhesina *clfB* indica que ésta se ve inhibida por los AG en la etapa exponencial, esto podría sugerir que los ácidos grasos tienen en esa fase su efecto crítico con el fin que la bacteria no se ancle a las CEMB. No obstante, es necesario analizar la expresión de otras adhesinas importantes como *fnbA*, *fnbB* y *spa* los cuales están descritos como genes regulados por *sarA* y *agrA*, esos resultados podrían dar una idea más clara acerca del papel de los AG en la internalización. Incluso, los genes *fnbA* y *fnbB* se han correlacionado positivamente con la expresión de *clfB* (Tsompanidou et al., 2012), por lo que podría esperarse que también fueran regulados negativamente en la fase exponencial. Además, mutaciones en los reguladores globales *agr* y *sar* no tienen efectos en la transcripción de *clfB* (Fionnuala et al., 2001).

En los ensayos de expresión de *agrA*, *sarA* y *rnaIII*, se observó que con BNa se ve aumentada la expresión, pero esto no se correlacionó con los resultados de internalización. Esto quiere decir que los BNa no están regulando a nivel transcripcional la expresión de *agrA* ni *sarA*, si no probablemente afecta la internalización regulando la expresión de otros genes de adhesinas o de mecanismos no descritos. A pesar de que los resultados de expresión de los genes reguladores *agrA*, *sarA* y *rnaIII* no se esperaban, se observó que los AG modulan su expresión diferencialmente, la relevancia de esto aun no está claro y se requiere de más estudios al respecto. En el caso del ON a los efectos en la internalización aparentemente no estarían vinculados a los cambios de expresión de los genes de las adhesinas, por lo que su efecto de decrecer la internalización debe ser por otras vías desconocidas.

Es difícil definir con estos resultados los efectos de los AG sobre los genes de las adhesinas en un contexto de infección, debido a las complejas interacciones. Además, existen

otros reguladores como *saeRS*, *srrAB*, *arlSR* y *lytRS* (Bronner et al., 2004), que tienen implicaciones en la regulación de los factores de virulencia, actuando de manera independiente como en conjunto. Entender como participan los factores de virulencia en la habilidad de colonizar y mantener infecciones, permitirá encontrar apropiados tratamientos que podrían decrecer el impacto de *S. aureus* en el ganado lechero y en otros hospederos. La adhesión e internalización son importantes procesos para la producción de una infección intramamaria, las cuales son aparentemente inhibidas por los AG; sin embargo, se requiere estudiar más factores de virulencias para encontrar posibles respuestas de cómo los AG están inhibiendo la internalización. Para ello, se requiere también considerar los estudios a nivel proteico.

6 CONCLUSIONES

Los resultados indican que los ácidos grasos (butirato y octanoato de sodio) decrecen la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas, cuando la bacteria es incubada por 2 h en estos ácidos. En tiempos tardíos se observa incluso un mantenimiento y aumento en la internalización. Los resultados de la evaluación de la expresión génica de los transcritos de los diversos genes de virulencia de *S. aureus* analizados, reflejan que los AG modulan diferencialmente las tasas de expresión de los transcritos, siendo la expresión de la adhesina a tiempos tempranos la que podría explicar la disminución de la internalización. Los genes reguladores no tendrían explicación en el proceso de internalización a ese nivel de expresión. Se requiere estudiar otros genes de virulencia además de evaluar expresión a niveles proteicos.

RESUMEN

La glándula mamaria del bovino es frecuentemente alterada por la presencia de patógenos que causan mastitis bovina. Esta enfermedad trae graves problemas a la ganadería lechera y al bienestar del animal. *Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos que causa mastitis, principalmente subclínicas y crónicas, muy difíciles de tratar. Este éxito se debe, en parte, a diversas características del patógeno reflejado en su arsenal de factores de virulencia que es capaz de expresar reguladamente, su localización intracelular que lo protege de antibióticos y la respuesta inmune, la formación de variantes de colonias pequeñas que le proporciona prevalencia dentro de la glándula y la resistencia a antibióticos de algunas cepas. Los ácidos grasos de cadena corta han demostrado propiedades bactericidas y bacteriostáticas contra este patógeno. En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) tratadas con estas moléculas, disminuyen la internalización de *S. aureus* ATCC 27543 y activan la expresión de genes de la respuesta inmune innata. Sin embargo no se ha analizado los efectos de estas moléculas en la bacteria y en la expresión de genes de virulencia bajo el contexto de internalización. Los resultados indican que las sales de butirato y octanoato de sodio disminuyen la internalización de *S. aureus* de fase exponencial en las CEMB. Además inhiben la expresión de la adhesina *clfB*, pero no la de los reguladores *agrA*, *sarA* y *RNAIII*. La modulación que ejercen los AG sobre la expresión de genes de adhesinas y sus reguladores no tiene una relación directa con la inhibición de la internalización. Se sugiere realizar un análisis de la expresión de otros factores de virulencia para tratar de entender el mecanismo mediante el cual los AG disminuyen la internalización de *S. aureus* en las CEMB.

LITERATURA CITADA

- Akers, R. M., y Nickerson, S. C.** (2011). Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 275-289.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E., Guidry, A. J., y Oliver, S. P.** (1996). Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, 79(6), 1021-1026.
- Almeida, R. A., Matthews, K. R., y Oliver, S. P.** (1997). Eukaryotic and prokaryotic cell functions required for invasion of Staphylococcus aureus into bovine mammary epithelial cells. *Zentralbl Veterinarmed B*, 44(3), 139-145.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., y Lopez-Meza, J. E.** (2013). Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during Staphylococcus aureus internalization. *Biomed Res Int*, 2013, 927643.
- Anaya-Lopez, J. L., Contreras-Guzman, O. E., Carabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V. M., Lopez-Meza, J. E., Valdez-Alarcon, J. J., y Ochoa-Zarzosa, A.** (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci*, 81(3), 358-361.
- Annamalai, Thirunavukkarasu, Mohan Nair, Manoj Kumar, Marek, Patrick, Vasudevan, Pradeep, Schreiber, David, Knight, Randall, . . . Venkitanarayanan, Kumar.** (2004). In Vitro Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Bovine Rumen Fluid by Caprylic Acid. *Journal of Food Protection*, 67(5), 884-888.
- Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., y Sasakawa, C.** (2012). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol*, 8(1), 36-45.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J., Galligan, D. T., Beiboer, M. L., y Brand, A.** (1997). Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *J Dairy Sci*, 80(8), 1592-1599.
- Barrett, John F., y Hoch, James A.** (1998). Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(7), 1529-1536.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., y Lock, A. L.** (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1235-1243.
- Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A., y Trumble, W. R.** (1998). Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, 66(1), 336-342.
- Bien, J., Sokolova, O., y Bozko, P.** (2011). Characterization of Virulence Factors of Staphylococcus aureus: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog*, 2011, 601905.
- Blowey, R.W., y Edmondson, P. (1995). *Mastitis Control in Dairy Herds: An Illustrated and Practical Guide*: Farming Press Limited.
- Bohnhoff, Marjorie, y Miller, C. Phillip.** (1962). Enhanced Susceptibility to Salmonella Infection in Streptomycin-Treated Mice. *Journal of Infectious Diseases*, 111(2), 117-127.

- Bradley, A.** (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, 164(2), 116-128.
- Bronner, S., Monteil, H., y Prevost, G.** (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 28(2), 183-200.
- Casadevall, A., y Pirofski, L. A.** (2009). Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework. *Journal of Water and Health*, 7(SUPPL. 1), S2-S18.
- Castañeda Vázquez, H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda Vazquez, M.A., y El-Sayed, A.** (2013). Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 377-382.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N., Nickerson, S. C., y Marquardt, W. W.** (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, 77(4), 970-983.
- Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N., Nickerson, S. C., y Marquardt, W. W.** (1994). Adherence of *Staphylococcus aureus* to Cultured Bovine Mammary Epithelial Cells. *J Dairy Sci*, 77(4), 970-983.
- Clarke, S. R., y Foster, S. J.** (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol*, 51, 187-224.
- Cobbold, R. N., y Desmarchelier, P. M.** (2004). In vitro studies on the colonization of bovine colonic mucosa by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC). *Epidemiol Infect*, 132(1), 87-94.
- Cook, S. I., y Sellin, J. H.** (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 12(6), 499-507.
- Chapman, John S.** (1998). Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3-4), 241-245.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C., y Chopra, I.** (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv Microb Physiol*, 32, 87-108.
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H., y Xiong, Y. Q.** (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40(1), 1-9.
- Cheung, A. L., Koomey, J. M., Butler, C. A., Projan, S. J., y Fischetti, V. A.** (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14), 6462-6466.
- Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trottonda, M. P., y Tamber, S.** (2008). The *SarA* protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(3), 355-361.
- Chien, Y., Manna, A. C., Projan, S. J., y Cheung, A. L.** (1999). *SarA*, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J Biol Chem*, 274(52), 37169-37176.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., y Bossier, P.** (2009). Short-chain fatty acids and poly-beta-hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol Adv*, 27(6), 680-685.
- Defoirdt, Tom, Halet, Dirk, Sorgeloos, Patrick, Bossier, Peter, y Verstraete, Willy.** (2006). Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture*, 261(2), 804-808.

- Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., Van Beek, E., y Vanderbeke, E.** (2002). The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition: II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livestock Production Science*, 76(1), 1-16.
- Dunman, P. M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., . . . Projan, S. J.** (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*, 183(24), 7341-7353.
- Durant, J. A., Corrier, D. E., y Ricke, S. C.** (2000). Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot*, 63(5), 573-578.
- Durant, J. A., Lowry, V. K., Nisbet, D. J., Stanker, L. H., Corrier, D. E., y Ricke, S. C.** (1999). Short-chain fatty acids affect cell-association and invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *J Environ Sci Health B*, 34(6), 1083-1099.
- Dworkin, M., y Falkow, S.** (2006). *The Prokaryotes: Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*: Springer.
- El-Gedaily, A, Paesold, G, Chen, C Y, Guiney, D G, y Krause, M.** (1997). Plasmid virulence gene expression induced by short-chain fatty acids in *Salmonella dublin*: identification of *rpoS*-dependent and *rpoS*-independent mechanisms. *J Bacteriol*, 179(4), 1409-1412.
- Foster, J. W., y Hall, H. K.** (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 173(16), 5129-5135.
- Fraunholz, M., y Sinha, B.** (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 43.
- Fukuda, Shinji, Toh, Hidehiro, Hase, Koji, Oshima, Kenshiro, Nakanishi, Yumiko, Yoshimura, Kazutoshi, . . . Ohno, Hiroshi.** (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., . . . Van Immerseel, F.** (2006). Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol*, 72(1), 946-949.
- Garton, G. A.** (1963). The Composition and Biosynthesis of Milk Lipids. *J Lipid Res*, 4, 237-254.
- Garzoni, C., Francois, P., Huyghe, A., Couzinet, S., Tapparel, C., Charbonnier, Y., . . . Schrenzel, J.** (2007). A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics*, 8, 171.
- Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granie, C., . . . Rainard, P.** (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Vet Res*, 44, 40.
- Gordon, C. P., Williams, P., y Chan, W. C.** (2013). Attenuating *Staphylococcus aureus* Virulence Gene Regulation: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem*, 56(4), 1389-1404.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., y Van Immerseel, F.** (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*, 23(2), 366-384.

- Hanczakowska, E., Szewczyk, A., y Okoń, K.** (2011). Effects of dietary caprylic and capric acids on piglet performance and mucosal epithelium structure of the ileum. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20(4), 556-565.
- Harmon, R. J.** (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 77(7), 2103-2112.
- Harris, L. G., Foster, S. J., y Richards, R. G.** (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*, 4, 39-60.
- Harrison, L. M., Balan, K. V., y Babu, U. S.** (2013). Dietary fatty acids and immune response to food-borne bacterial infections. *Nutrients*, 5(5), 1801-1822.
- Hebert, A., Sayasith, K., Senechal, S., Dubreuil, P., y Lagace, J.** (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett*, 193(1), 57-62.
- Heilmann, C.** (2011a). Adhesion Mechanisms of Staphylococci. *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*, 715, 105-123.
- Heilmann, C.** (2011b). Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol*, 715, 105-123.
- Hensen, S. M., Pavicic, M. J., Lohuis, J. A., y Poutrel, B.** (2000). Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci*, 83(3), 418-429.
- Herold, S., Paton, J. C., Srimanote, P., y Paton, A. W.** (2009). Differential effects of short-chain fatty acids and iron on expression of *iha* in Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(Pt 11), 3554-3563.
- Hung, C. C., Garner, C. D., Slauch, J. M., Dwyer, Z. W., Lawhon, S. D., Frye, J. G., . . . Altier, C.** (2013). The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Mol Microbiol*, 87(5), 1045-1060.
- Jensen, R. G.** (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci*, 85(2), 295-350.
- Keefe, G.** (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(2), 203-216.
- Keeney, K. M., y Finlay, B. B.** (2011). Enteric pathogen exploitation of the microbiota-generated nutrient environment of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 14(1), 92-98.
- 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. *Vet Q*, 24(4), 181-198.
- Kitchen, Barry J.** (1981). Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48(01), 167-188.
- Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., Brito, M. A., Fietto, L. G., y Ribon Ade, O.** (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol*, 160(1-2), 183-188.
- Kollanoor-Johny, A., Mattson, T., Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A., Hoagland, T. A., Darre, M. J., . . . Venkitanarayanan, K.** (2012). Caprylic acid reduces *Salmonella* Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. *Poult Sci*, 91(7), 1686-1694.

- Kollanoor, Anup, Vasudevan, Pradeep, Nair, Manoj Kumar Mohan, Hoagland, Thomas, y Venkitanarayanan, Kumar.** (2007). Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). *Aquaculture Research*, 38(12), 1293-1300.
- Kossaibati, M. A., y Esslemont, R. J.** (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J*, 154(1), 41-51.
- Kubica, M., Guzik, K., Koziel, J., Zarebski, M., Richter, W., Gajkowska, B., . . . Potempa, J.** (2008). A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 3(1), e1409.
- Lammers, Aart, Nuijten, Piet J. M., y Smith, Hilde E.** (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiology Letters*, 180(1), 103-109.
- Lara-Zárata, Leticia, López-Meza, Joel E., y Ochoa-Zarzosa, Alejandra.** (2011). *Staphylococcus aureus* inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 51(5), 313-318.
- Layden, B. T., Angueira, A. R., Brodsky, M., Durai, V., y Lowe Jr, W. L.** (2013). Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Translational Research*, 161(3), 131-140.
- Lehenbauer, Terry W., y Oltjen, James W.** (1998). Dairy Cow Culling Strategies: Making Economical Culling Decisions. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 264-271.
- Lowy, F. D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8), 520-532.
- MacGibbon, A. K. H., y Taylor, M. W.** (2006). Composition and Structure of Bovine Milk Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 1-42): Springer US.
- Malachowa, N., y DeLeo, F. R.** (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci*, 67(18), 3057-3071.
- Mansson, H. L.** (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*, 52.
- McAleese, F. M., Walsh, E. J., Sieprawska, M., Potempa, J., y Foster, T. J.** (2001). Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J Biol Chem*, 276(32), 29969-29978.
- McAleese, Fionnuala M., Walsh, Evelyn J., Sieprawska, Magdalena, Potempa, Jan, y Foster, Timothy J.** (2001). Loss of Clumping Factor B Fibrinogen Binding Activity by *Staphylococcus aureus* Involves Cessation of Transcription, Shedding and Cleavage by Metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 29969-29978.
- McCarthy, Alex J., y Lindsay, Jodi A.** (2013). *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study. *Infection, Genetics and Evolution*, 19(0), 7-14.
- Medrano-Galarza, C., Gibbons, J., Wagner, S., de Passillé, A. M., y Rushen, J.** (2012). Behavioral changes in dairy cows with mastitis. *Journal of dairy science*, 95(12), 6994-7002.
- Miranda-Morales, R. E., Rojas-Trejo, V., Segura-Candelas, R., Carrillo-Casas, E. M., Sánchez-Gonzalez, Ma G., Castor, R. S., y Trigo-Tavera, F. J.** (2008) Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Vol. 1149* (pp. 300-302).

- Nagarajan, V.** (2008). *The Role of Msa in the Global Regulation of Virulence in Staphylococcus Aureus*: The University of Southern Mississippi.
- Nair, M. K., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T. A., y Venkitanarayanan, K. S.** (2005). Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 88(10), 3488-3495.
- Neerhof, H. J., Madsen, P., Ducrocq, V. P., Vollema, A. R., Jensen, J., y Korsgaard, I. R.** (2000). Relationships Between Mastitis and Functional Longevity in Danish Black and White Dairy Cattle Estimated Using Survival Analysis. *Journal of Dairy Science*, 83(5), 1064-1071.
- Ní Eidhin, Déirdre, Perkins, Samuel, Francois, Patrice, Vaudaux, Pierre, Höök, Magnus, y Foster, Timothy J.** (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 30(2), 245-257.
- Novick, R. P.** (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 48(6), 1429-1449.
- Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., . . . Moghazeh, S.** (1995). The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 248(4), 446-458.
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., y Moghazeh, S.** (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J*, 12(10), 3967-3975.
- O'Brien, Louise M., Walsh, Evelyn J., Massey, Ruth C., Peacock, Sharon J., y Foster, Timothy J.** (2002). *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cellular Microbiology*, 4(11), 759-770.
- O'Neill, Luke A. J.** (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 3-9.
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernandez, E., Cano-Camacho, H., y Lopez-Meza, J. E.** (2009). Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb Pathog*, 47(1), 1-7.
- Oliver, S. P., y Murinda, S. E.** (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 28(2), 165-185.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E., Bravo-Patino, A., y Baizabal-Aguirre, V. M.** (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect*, 54(4), 399-409.
- Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K., y Burvenich, C.** (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol*, 480, 259-277.
- Proctor, R. A., Balwit, J. M., y Vesga, O.** (1994). Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis*, 3(6), 302-312.
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S., y Flint, H. J.** (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*, 217(2), 133-139.

- Rainard, P., y Riollet, C.** (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod Nutr Dev*, 43(5), 439-457.
- Rainard, P., y Riollet, C.** (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*, 37(3), 369-400.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., y Novick, R. P.** (1986). Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet*, 202(1), 58-61.
- Riollet, Céline, Rainard, Pascal, y Poutrel, Bernard.** (2002). Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. In J. Mol & R. Clegg (Eds.), *Biology of the Mammary Gland* (Vol. 480, pp. 247-258): Springer US.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M., y Besser, T. E.** (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Sites on Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 77(11), 3354-3364.
- Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L., y Levy, E.** (2006). Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract*, 21(4), 351-366.
- Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., y Jarboe, L. R.** (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(18), 8317-8327.
- Russell, J. B., y Diez-Gonzalez, F.** (1998). The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol*, 39, 205-234.
- San Martín, B, Kruze, J, Morales, M, Agüero, H, Leon, B, Espinoza, S, . . . Borie, C.** (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2), 221-234.
- Seegers, H., Fourichon, C., y Beaudeau, F.** (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res*, 34(5), 475-491.
- Sharma, N., Rho, G. J., Hong, Y. H., Kang, T. Y., Lee, H. K., Hur, T. Y., y Jeong, D. K.** (2012). Bovine mastitis: An Asian perspective. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(6), 454-476.
- Sinha, B., Francois, P. P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., . . . Krause, K. H.** (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol*, 1(2), 101-117.
- Skrivanova, E., Worgan, H. J., Pinloche, E., Marounek, M., Newbold, C. J., y McEwan, N. R.** (2010). Changes in the bacterial population of the caecum and stomach of the rabbit in response to addition of dietary caprylic acid. *Vet Microbiol*, 144(3-4), 334-339.
- Smith, C. A.** (1997). Food safety, milk quality international issues for National Mastitis Council. *J Am Vet Med Assoc*, 210(8), 1091, 1096.
- Solis de los Santos, F., Donoghue, A. M., Venkitanarayanan, K., Metcalf, J. H., Reyes-Herrera, I., Dirain, M. L., . . . Donoghue, D. J.** (2009). The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. *Poult Sci*, 88(1), 61-64.
- Sordillo, L. M., Doymaz, M. Z., y Oliver, S. P.** (1989). Morphological study of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in the lactating bovine mammary gland. *Res Vet Sci*, 47(2), 247-252.

- Sordillo, L. M., Nickerson, S. C., y Akers, R. M.** (1989). Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *J Dairy Sci*, 72(1), 228-240.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., y DeRosa, D.** (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80(8), 1851-1865.
- Sordillo, L. M., y Streicher, K. L.** (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(2), 135-146.
- Ster, C., Gilbert, F. B., Cochard, T., y Poutrel, B.** (2005). Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes*, 19(4), 227-235.
- Stutz, Katrin, Stephan, Roger, y Tasara, Taurai.** (2011). SpA, ClfA, and FnbA Genetic Variations Lead to Staphaurex Test-Negative Phenotypes in Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 638-646.
- Tiwari, J. G., Babra, C., Tiwari, H. K., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., . . . Mukkur, T.** (2013). Trends in therapeutic and prevention strategies for management of Bovine Mastitis: An overview. *Journal of Vaccines and Vaccination*, 4(2).
- Tobe, T., Nakanishi, N., y Sugimoto, N.** (2011). Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 79(3), 1016-1024.
- Toldrá, F.** (2010). *Handbook of Meat Processing*: Wiley.
- Tsompanidou, E., Denham, E. L., Sibbald, M. J., Yang, X. M., Seinen, J., Friedrich, A. W., . . . van Dijl, J. M.** (2012). The sortase A substrates FnbpA, FnbpB, ClfA and ClfB antagonize colony spreading of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 7(9), e44646.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., y Haesebrouck, F.** (2008). Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. *Br J Nutr*, 100(3), 480-484.
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., . . . Ducatelle, R.** (2005). Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci*, 84(12), 1851-1856.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., . . . Ducatelle, R.** (2004). Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol*, 70(6), 3582-3587.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., De Smet, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F., y Ducatelle, R.** (2004). Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated *Salmonella* with chicken primary cecal epithelial cells in vitro. *Avian Dis*, 48(2), 384-391.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., . . . Ducatelle, R.** (2003). Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *Int J Food Microbiol*, 85(3), 237-248.
- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., . . . Ducatelle, R.** (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol*, 35(3), 182-188.
- Vasudevan, P., Marek, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., Darre, M., Khan, M., y Venkitanarayanan, K.** (2005). In Vitro Inactivation of *Salmonella enteritidis* in

- Autoclaved Chicken Cecal Contents by Caprylic Acid. *The Journal of Applied Poultry Research*, 14(1), 122-125.
- Vinolo, M. A., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., y Curi, R.** (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3(10), 858-876.
- Vorbach, C., Capecchi, M. R., y Penninger, J. M.** (2006). Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays*, 28(6), 606-616.
- Watts, J. L.** (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 16(1), 41-66.
- Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H., y Van Oirschot, J. T.** (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol*, 88(1), 27-45.
- Wellnitz, O., Reith, P., Haas, S. C., y Meyer, H. H. D.** (2006). Immune relevant gene expression of mammary epithelial cells and their influence on leukocyte chemotaxis in response to different mastitis pathogens. *Veterinari Medicina*, 51(4), 125-132.
- Whiley, R. A.** (2003). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci: Minutes of the closed meeting, 13 October 1999, Auckland, New Zealand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 913-914.
- Xue, Ting, You, Yibo, Shang, Fei, y Sun, Baolin.** (2012). Rot and Agr system modulate fibrinogen-binding ability mainly by regulating clfB expression in *Staphylococcus aureus* NCTC8325. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(1), 81-92.
- Yang, Wei, Zerbe, Holm, Petzl, Wolfram, Brunner, Ronald Marco, Günther, Juliane, Draing, Christian, . . . Seyfert, Hans-Martin.** (2008). Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular Immunology*, 45(5), 1385-1397.
- Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., y Schukken, Y. H.** (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16(4), 357-372.
- Zecconi, A.** (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: What we need to know to control them. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65(3), 93-99.
- Zecconi, A., y Scali, F.** (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett*, 150(1-2), 12-22.
- Zhao, X., y Lacasse, P.** (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci*, 86(13 Suppl), 57-65.