

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**

**Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



*“Expresión de Péptidos Antimicrobianos en la Glándula Mamaria Bovina con Mastitis Inducida por Staphylococcus aureus”*

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

**M.C. VÍCTOR MANUEL DEL VILLAR PÉREZ**

**DIRECTOR**

**Ph. D. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA.**

La presente tesis “**Expresión de Péptidos Antimicrobianos en la Glándula Mamaria Bovina con Mastitis Inducida por Staphylococcus aureus**” realizada por el **C. Víctor Manuel Del Villar Pérez**, dirigido por la **Ph. D. Alma Rossana Tamayo Sosa**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

## **Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular

---

Ph. D. Alma Rossana Tamayo Sosa.

Director de Tesis

---

Ph. D. Tonatiuh Melgarejo

Co-Director de Tesis

---

Dr. Alberto Barreras Serrano

Asesor

---

Dr. Luis Tinoco Gracia

Asesor

---

Dr. Tomas Benjamín Rentería Evangelista

Asesor

## **Agradecimientos**

Le agradezco a Dios por haberme guiado y acompañado a lo largo de este periodo de mi vida, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad.

A mi padres Rosendo y Lorena así como a mi hermana por su ayuda, comprensión y el estar conmigo en todo momento

A cada una de las personas que convivieron conmigo a lo largo de mi formación profesional y me han brindado su amistad.

Le agradezco la confianza, el apoyo y dedicación a cada uno de mis asesores, profesores, pero sobre todo a Ph. D. Alma Tamayo Sosa por haber compartido su conocimiento pero sobre todo su amistad.

También le agradezco a CONACYT por brindarme el apoyo económico para desarrollar mi doctorado, así como al instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinaria de la Universidad Autónoma de Baja California por facilitarme laboratorios y material requerido para hacer mis experimentos.

## **Dedicatoria**

*Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se la debo  
por su apoyo incondicional*

## Resumen

La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa que más afecta a las vacas lecheras y que causa grandes pérdidas económicas a esta industria. Las bacterias son los principales causales de mastitis, siendo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* dos de los patógenos más comunes. A fin de prevenir y tratar esta enfermedad es importante entender la función inmune de la glándula mamaria.

Como parte de la respuesta inmune innata de la ubre, el canal del pezón limita la entrada de patógenos, además de que en el epitelio estratificado escamoso contiene agentes antimicrobianos y péptidos antimicrobianos para combatir infecciones. Los péptidos antimicrobianos muestran una actividad antimicrobiana directa contra un amplio rango de patógenos y juegan un rol importante en los mecanismos de defensa de la glándula mamaria en contra de organismos causantes de mastitis.

Mediante la técnica de qPCR se determinó la expresión de los péptidos antimicrobianos en glándula mamaria bovina con mastitis crónica causada por *S. aureus*. Los resultados mostraron que LAP y TAP se expresaron mayormente en tejido de la de cisterna, mientras que la proteína S100A7 en el esfínter. Los resultados sugieren que estos péptidos pudieran tener un papel fundamental en la defensa de la glándula mamaria con mastitis causada por *S. aureus*.

En otro estudio se observó que el péptido sintético K9CATH mostró actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus* aislado de casos clínicos de mastitis, por lo que pudiera ser considerado como candidato terapéutico para el tratamiento de la mastitis.

Palabras Clave: **Mastitis Bovina, Péptidos Antimicrobianos, *S. aureus*.**

## Abstract

Bovine mastitis is the most important disease that affects dairy cattle and causes severe economic losses. Bacteria are the main causative agent, being *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* two of the most common pathogens. To prevent and treat mastitis it is important to understand the immune function of the mammary gland.

As part of the innate immune response of the udder, the teat canal limits the entry of pathogens. In addition, the stratified squamous epithelium contains antimicrobial agents and antimicrobial peptides to fight infections. Antimicrobial peptides show a direct antimicrobial activity against a broad range of pathogens and play an important role in the defense mechanisms of the mammary gland against mastitis causing organisms.

Expression of antimicrobial peptides in the bovine mammary gland with mastitis caused by *S. aureus* was determined by qPCR. Results showed that LAP and TAP were highly expressed in cisternal tissue, while the protein S100A7 was mainly expressed in the streak canal. Therefore, these peptides could play a key role in the mammary gland with mastitis by *S. aureus*.

Another experiment revealed that the synthetic peptide K9CATH showed antimicrobial activity in vitro against *S. aureus* isolated from cows with clinical mastitis. Therefore, this peptide could be considered as a therapeutic candidate for mastitis treatment.

Key Words: **bovine mastitis, antimicrobial peptides, *S. aureus***

## Contenido

	Página
Capítulo I Introducción General .....	1
Capítulo II Revisión de Literatura .....	3
<i>Generalidades de la mastitis</i> .....	4
<i>Etiología</i> .....	5
<i>Clasificación</i> .....	6
<i>Mecanismos de defensa de la glándula mamaria</i> .....	7
<i>Péptidos antimicrobianos</i> .....	11
<i>Clasificación de los Péptidos Antimicrobianos</i> .....	12
<i>Mecanismo de acción microbicida de los péptidos antimicrobianos</i> .....	12
<i>Literatura Citada</i> .....	17
Capítulo III Artículos .....	24
Capítulo IV Conclusiones .....	45

# **Capítulo I**

## **Introducción General**

La mastitis se la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta en respuesta a una infección intramamaria originada por bacterias, mycoplasmas, hongos y virus. Así mismo la aparición de mastitis dependerá de la interacción del huésped, el agente etiológico y de los factores ambientales (Zhao y Lacasse, 2008). Estudios sugieren que las vacas lecheras son especialmente susceptibles a tener mastitis en la tercera semana antes de parto, sin embargo la capacidad de controlarla durante este periodo dependerá de que su sistema inmunológico sea capaz de eliminar rápidamente a los patógenos bacterianos y restaurar la función mamaria de la glándula y con ello la producción de leche.

Para el control de la mastitis comúnmente se recurre a la terapia con antibacterianos. Debido al uso indiscriminado de éstos, la frecuencia de estafilococos resistentes se ha incrementado en las últimas décadas (Ochoa-Zarzosa et al., 2008), despertando el interés en la investigación de nuevos tratamientos que permitan la eliminación de las bacterias fármaco resistentes.

Por sus características estructurales y funcionales, así como por su baja toxicidad para células eucarióticas, los péptidos antimicrobianos (AMP) están siendo evaluados como agentes terapéuticos y profilácticos (Gallo y Huttner, 1998). Los AMP son cadenas cortas de entre 12 y 50 aminoácidos, de bajo peso molecular, catiónicos y anfipáticos (Raj y Dentino, 2002), con un amplio espectro antimicrobiano en contra de bacterias Gram positivas y negativas, hongos, parásitos, virus y células tumorales (Gutiérrez y Orduz, 2003), lo que los posicionan como candidatos terapéuticos.

En la actualidad existen varios estudios que demuestran la expresión de péptidos antimicrobianos en la glándula mamaria sana, pero la evidencia de la expresión de péptidos en glándula mamaria con mastitis es poca.

# **Capítulo II**

## **Revisión de Literatura**

## Generalidades de la Mastitis

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón. Se caracteriza por diferentes cambios ya sea físicos o químicos de la glándula mamaria (Seegers et al, 2003; Zhao y Lacasse, 2008). La Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF) (Kastli, 1967), definió a la mastitis como un cambio inflamatorio de la glándula mamaria que va unido a cambios físicos, químicos y microbiológicos, y se caracterizan por un incremento en el conteo de células somáticas y cambios patológicos en el tejido mamario.

Los factores que predisponen la aparición de mastitis son procedimientos de ordeño precarios, máquinas de ordeño defectuosas, lesiones y úlceras en las tetas, así como la exposición a agentes ambientales (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) y contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) (Merck, 2000).

Esta enfermedad es considerada altamente prevalente en el ganado lechero y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera. Ocasiona grandes pérdidas económicas a los productores debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento, servicios veterinarios, y pérdida de animales (Correa y Marin, 2002; Ceron-Muñoz et al., 2002; Wellenberg et al., 2002; Tomasinsig et al., 2010).

## Etiología

La etiología de la mastitis es muy variada e influyen en su aparición una gran diversidad de factores ambientales y de manejo, por lo que se cataloga como una enfermedad polifactorial. Comúnmente es una enfermedad infecciosa causada por más de 137 especies bacterianas, siendo *S. aureus* y *S. agalactiae* los principales microorganismos responsables de la misma (Philpot, 1996).

Los patógenos causantes de mastitis, a su vez, han sido caracterizados en dos clases principales: microorganismos contagiosos y microorganismos ambientales, en base a la fuente infecciosa primaria y las formas de diseminación de la enfermedad.

La mastitis contagiosa es causada por microorganismos como: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*, siendo reservorios de estos la glándula mamaria y la leche de vacas infectadas. Su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño al compartir toallas para lavar y secar las ubres, por medio de las manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas en los ordeños mecánicos (Blowey y Edmondson, 1999).

La mastitis ambiental es producida por gérmenes Gram-negativos, habitantes normales del ambiente como: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Proteus spp.*, así como algunas bacterias Gram positivas como: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Smith y Hogan, 1997).

Existe además otro grupo de microorganismos menos comunes, esporádicos y que afectan a pocas vacas en el rebaño, pero que pueden provocar serios problemas debido a su resistencia a los desinfectantes y antibioterapia. Las infecciones con algunos de estos microorganismos son debidas casi siempre a los malos procedimientos de tratamiento (Wilson et al., 1993). En este grupo se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Nocardia spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Pasteurella spp.*, levaduras (*Cándida spp.*), hongos y algas (*Prototheca spp.*).

## **Clasificación**

Para clasificar a la mastitis se toman en cuenta factores tales como: duración del proceso, apariencia clínica y etiología, curso, severidad y diseminación de la enfermedad. Sin embargo la clasificación más generalizada se realiza de acuerdo con el grado de inflamación según su curso o severidad (Ponce y Armenteros, 2000)

*Mastitis Subclínica:* Es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en la leche (Tollersrud et al., 2000). En la mastitis subclínica la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal, sin que existan cambios organolépticos en la misma. El número de células somáticas en la leche se encuentra elevado, al igual que la presencia de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de secreción láctea. Comúnmente es de larga duración, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche,

afecta la calidad de la leche y puede servir como un reservorio para infectar a otros animales en el hato (Heringstad et al., 2000; Valera et al., 2005).

Entre los microorganismos más comunes causantes de este tipo de mastitis se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp.* (Merck, 2000).

*Mastitis clínica:* Es la enfermedad más común y más costosa en la producción de leche en los países industrializados (Osteras, 2006). Se define como una anomalía observada tanto en la leche y/o ubre por los ganaderos (Tollersrud, 2000). Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y en algunos casos hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido y su composición esta alterada considerablemente (Heringstad et al., 2000). En la forma crónica, se presenta una infección de la ubre de larga duración, la leche tiene apariencia anormal y se detectan cambios en la ubre a la palpación (Schrack et al., 2001)

Los microorganismo que se han descrito como causantes de este tipo de mastitis son *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Mycoplasma bovis* y *Streptococcus dysgalactiae*.

## **Mecanismos de defensa de la glándula mamaria**

La inmunidad innata, también conocida como natural o no específica es el sistema de defensa predominante durante el estadio temprano de la infección. La respuesta no específica está presente o se activa rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida al mismo antígeno. Si el mecanismo de defensa no específico funciona adecuadamente, muchos patógenos son eliminados rápidamente dentro de un período de tiempo corto y antes que la respuesta inmune específica se active. La eliminación rápida de la bacteria con frecuencia no resulta en cambios en la calidad o producción de la leche. Las defensas no específicas o innatas de la glándula mamaria están mediadas por las barreras físicas del pezón, macrófagos, neutrófilos, células NK y ciertos factores solubles (Sordillo y Streicher, 2002).

*Defensas anatómicas:* El canal del pezón es considerado la primera línea de defensa contra la mastitis, ya que ésta es la ruta a través de la cual invaden los patógenos. El pezón contiene un esfínter muscular que mantiene cerrado el canal entre ordeñas e impide la penetración bacteriana. También está cubierto con queratina que es crucial para mantener la función de barrera del mismo y la remoción de la queratina ha sido correlacionada con alta susceptibilidad a la invasión y colonización bacteriana. La acumulación de queratina en el pezón puede proveer una obstrucción física a las bacterias impidiendo la migración de las mismas dentro de la cisterna de la glándula. La queratina puede obstruir completamente el canal del pezón durante el período de cese de lactancia (Nickerson, 1987). Dentro del revestimiento de queratina varios agentes antimicrobianos han sido identificados como lo son los ácidos grasos esterificados y no esterificados presentes en la queratina del pezón con capacidad bacteriostática e incluyen ácido mirístico, ácido palmitoleico y ácido linoleico. Además de la presencia de proteínas catiónicas asociadas con el revestimiento de queratina que se pueden ligar electrostáticamente con patógenos causantes de

mastitis, alterar su pared celular y volverlas más susceptibles a la presión osmótica (Treece y col., 1966; Hogan y col., 1987)

*Defensas solubles:* Los factores solubles específicos e innatos representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria que representan una respuesta protectora en contra de la invasión de patógenos. Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por linfocitos B activados por antígenos. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) conocidas, que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la glándula mamaria: IgG1, IgG2, IgA e IgM (Guidry y Miller, 1986).

En rumiantes la lactoferrina y la IgG1 actúan sinérgicamente para inhibir a *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. En la glándula mamaria bovina en lactancia, la concentración de lactoferrina es menor a la observada durante la involución e inflamación de la glándula. Además, los efectos bacteriostáticos de la lactoferrina pueden ser inhibidos por la presencia de citrato. Este citrato es un buffer producido por las células epiteliales que transforma al hierro en una forma rápidamente utilizable por las bacterias (Bishop et al., 1976). Se ha sugerido que el principal rol de la lactoferrina en las defensas de la glándula mamaria es proteger contra infecciones por coliformes, especialmente durante la involución (Sordillo y Streicher, 2002).

El complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche que pueden impactar en la inmunidad innata y adquirida. Las funciones efectoras del complemento incluyen, lisis de bacterias, opsonización y atracción de los fagocitos al sitio de la activación del complemento. Por ejemplo, las mastitis causadas por bacterias Gram negativas como *E. coli* son especialmente sensibles

a la lisis mediada por complemento. El complemento también funciona como una opsonina que promoverá la fagocitosis y lisis intracelular por neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria (Riollet et al., 2000).

La Lisozima es una proteína bactericida que está presente en leche y funciona degradando los peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas, así como de membranas externas de bacterias Gram negativas. En leche porcina y humana, lisozima en combinación con complemento e IgA secretoria exhiben una significativa actividad bactericida para *E. coli in vitro*. Debido a que la leche de los rumiantes contiene bajas concentraciones de IgA y Lisozima, se considera que este sistema provee una pequeña protección para la glándula mamaria bovina (Sordillo et al., 1997).

Numerosos estudios han mostrado las capacidades inmunomodulatorias de las citoquinas sobre importantes funciones en leucocitos mamaros. El mayor grupo de citoquinas estudiadas incluye: Interleucinas (IL), factor estimulante de colonias (CSF), Interferón (IFN) y factor de necrosis tumoral (TNF) (Fernández Botran et al., 1996). Las IL-1 $\alpha$  y 1 $\beta$  han sido detectadas en células mamaras en leche normal de vaca usando la técnica de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Ito y Kodama, 1996; Okada et al., 1997). La IL-1 es crucial en el proceso inflamatorio en glándulas mamaras inoculadas con endotoxinas o con mastitis por coliformes tanto naturales como experimentales y en células epiteliales mamaras bovinas *in vitro* (Okada et al., 1997)

En la infección por *E. coli* ocasiona una elevación aguda de los niveles de IL-1 que se asocia con el flujo de neutrófilos (Riollet et la., 2000; Shuster et al., 1997) y ha sido postulado que esta Interleucina está involucrada indirectamente en la quimioatracción de neutrófilos en las infecciones por esta bacteria (Shuster y

col., 1997). La contribución de IL-1 en la respuesta a la infección mamaria por *S. aureus* es insignificante o pasajera, lo cual indica un rol menor de esta citoquina en este tipo de mastitis (Riollet et al., 2001). La IL-2 es la mejor caracterizada de todas las citoquinas en bovinos. Originalmente descrita como factor de crecimiento de células T, IL-2 es primariamente producida por linfocitos Th1 y contribuye a la expansión clonal y al establecimiento de la memoria inmunológica. La IL-2 bovina ha sido detectada en células de glándulas mamarias normales y con mastitis (Alluwaimi y Cullor, 2002), sin embargo el rol exacto de esta citoquina en glándula mamaria bovina no ha sido claramente establecido.

### **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son los principales componentes del sistema inmune innato, los cuales están bien conservados a lo largo de la evolución y no representan toxicidad para el huésped (Raj y Dentino, 2002). Representan una defensa potente ya que atacan a diversos microorganismos, entre las que se incluyen: bacterias Gram negativas, Gram positivas, hongos, parásitos, virus e inclusive células tumorales. El espectro de acción de los péptidos antimicrobianos está determinado únicamente por la secuencia de aminoácidos con que esté constituido el péptido que por lo regular son menos de 100 (Zasloff, 2002).

Los péptidos antimicrobianos se pueden definir como cadenas cortas de entre 12 y 50 aminoácidos, de bajo peso molecular, codificados en el genoma. Por lo general son moléculas catiónicas debido a su alto contenido de lisina y arginina, además son anfipáticos, por lo que tienen estabilidad en ambientes acuosos como hidrofóbico y permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos (Boman, 1995).

## **Clasificación de los Péptidos Antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos conforman un grupo heterogéneo de moléculas de difícil clasificación, sin embargo existen tres características principales que la distinguen: su tamaño, la mayoría posee carga neta positiva y adoptan estructuras anfipáticas (Gutiérrez y Orduz, 2003). A pesar de su gran variabilidad se le puede agrupar en cuatro categorías: a) Péptidos alfa-helicoidales, son los más conocidos y estudiados, su estructura es casi exclusivamente helicoidal y por su simplicidad, es el que ha recibido mayor atención por su potencial de síntesis industrial y sus aplicaciones comerciales. Ejemplo de éstos son la maganinas, dermaseptinas y melitina (Benachir y Lafleur, 1995), b) Péptidos de estructura extendida, son péptidos que en su mayoría tienen alto contenido de hojas beta. Se clasifican aquí las defensinas, protegrinas y lactoferrinas (Lehrer y Ganz, 2002), c) Péptidos de composición irregular, son aquellos que tienen una composición inusual de aminoácidos, los más comunes poseen alto contenido de histidinas como las histatinas, o triptófano como la indolicina y triptisina (Brewer et al., 1998; Selsted et al., 1992). En un cuarto grupo se pueden incluir una serie de péptidos con grupos químicos atípicos en las proteínas, como la presencia de enlaces tioéster en los antibióticos (Breukink y de Kruijff, 1999) o los pentaiboles que contienen altas proporciones de  $\alpha$ - aminoácido isobutírico (Sansom, 1993).

## **Mecanismo de acción microbicida de los péptidos antimicrobianos**

El preciso mecanismo de acción no se conoce completamente para todos los AMP. Varias teorías han sido planteadas para explicar los procesos moleculares inducidos por los péptidos, pero ninguna asegura que sea lo más cercano a la

realidad, varios autores proponen la formación de canales o interrupciones en la membranas bacterianas (Dawson y Liu, 2008).

Los AMP tienen un efecto rápido, del orden de minutos bajo condiciones *in vitro* (Giangaspero et al., 2001). La gran variedad estructural de los AMP sugiere que su actividad no está dirigida a blancos celulares concretos como enzimas o receptores, sino más bien a características comunes de la membrana bacteriana (Wade et al., 1990).

En las bacterias Gram negativas, tanto la membrana externa como la interna poseen moléculas aniónicas orientadas hacia el exterior de la célula, mientras que la mayoría de los péptidos son catiónicos. Su interacción con fosfolípidos cargados negativamente explicaría su especificidad por las membranas bacterianas y no por los lípidos zwitteriónicos de la capa extracelular de las células eucarióticas (Lenner et al., 1989). Respecto a la forma como los péptidos destruyen la membrana, es posible que induzcan lisis completa de la bacteria, o que la perturben de manera tal que permita la salida de componentes celulares esenciales, a la vez que se disipa el potencial de membrana (Park et al., 1998).

Se han creado 4 modelos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos los cuales son: el mecanismo de barril, el mecanismo forma anular, mecanismo de alfombra y el mecanismo de agregado, donde el mecanismo similar es el daño a la membrana, pero tienen variación en la interacción y ubicación de los péptidos en la superficie de la membrana.

Además del daño a las membranas, se han reportado que los péptidos poseen otros mecanismos de acción, los cuales están relacionados con los ácidos

nucleicos, así como la síntesis, translocación y plegamiento de proteínas (Park et al., 1998). Por ejemplo, la indolicina derivada de los neutrófilos de los bovinos puede alterar la permeabilidad de la membrana, pero también tienen mecanismos alternativos al unirse al ADN o a algunas enzimas asociadas a éste, como la topoisomerasa I y la ARN polimerasa, encontrándose que estos péptidos pueden inhibir el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos (Marchand et al., 2006).

En bovinos domésticos (*Bos taurus*) se han reportado diferentes  $\beta$ -defensinas epiteliales. Por ejemplo se ha demostrado la expresión del Péptido Antimicrobiano Lingual (LAP, por sus siglas en inglés) en el epitelio escamoso estratificado de la lengua bovina (Schönwetter et al., 1995), la  $\beta$ -defensina entérica (EBD, por sus siglas en inglés) en células epiteliales intestinales y su expresión se ha asociado con la infección por *Cryptosporidium parvum* (Tarver et al., 1998). Además mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado la expresión de algunas  $\beta$ -defensinas en las células epiteliales mamarias bovinas como lo son la beta defensina 1 (DEFB1), la beta defensina de neutrófilo bovino 3 (BNBD3), la beta defensina de neutrófilo bovino 9 (BNBD9) y la beta defensina de neutrófilo bovino 12 (BNBD12) (Aono et al, 2006).

Como parte de su papel crucial en la defensa local, las  $\beta$ -defensinas bovinas también podrían estar implicadas en la prevención de infecciones en la glándula mamaria (mastitis). Debido a la gran importancia económica de la mastitis en el ganado lechero, diferentes estudios han sido dirigidos a la determinación de la expresión de  $\beta$ -defensinas en la ubre. La expresión constitutiva de  $\beta$ -defensinas en la glándula mamaria bovina se ha demostrado para LAP y TAP, así como para  $\beta$ -defensinas de neutrófilo bovino (BNBD) 3, 4, 5, 9, y 12,  $\beta$ -defensina 401 y  $\beta$ -defensina 1 (DEFB1), también conocida como  $\beta$ -

defensina entérica bovina (Cormican et al, 2008). La expresión inducible se ha demostrado para BNBD5, que se expresa predominantemente en células epiteliales mamarias y su incremento en la expresión está ligada a mastitis (Goldammer et al., 2004).

El incremento en la inducción parece depender del patógeno causante de mastitis. Por ejemplo se descubrió que la bacteria *E. coli* puede ser un potente inductor de la defensa inmune innata incluyendo la expresión inmediata de las defensinas, mientras que *S. aureus* no fue capaz de desencadenar esta respuesta temprana sino hasta una vez establecida la infección (Petzl et al., 2008).

Los péptidos antimicrobianos LAP, TAP y BNBD12 exhiben elevada actividad contra bacterias Gram negativas como *E. coli* y Gram positivos como *S. aureus* *In vitro* (Mandal et al, 2002). Lo que ha provocado que las  $\beta$ -defensinas hayan sido estudiadas a nivel genómico. Varios estudios han identificado la asociación entre las  $\beta$ -defensinas y conteo de células somáticas en vacas Holstein-Friesian y vacas Jersey. Estas asociaciones permitirían el uso de los genes que expresan  $\beta$ - defensinas como marcadores de susceptibilidad a la enfermedad en vacas lo que podría ayudar a seleccionar a los animales de alto rendimiento con alta resistencia a la mastitis (Bagnicka et al., 2007).

Otra importante agente antimicrobiano presente en los bovinos es la proteína de unión a calcio S100A7 (Hitomi et al, 1996.), también conocido como Psoriasina (Gläser et al, 2005). Es altamente activo contra varias cepas de *E. coli* en los bovinos (Regenhard et al., 2009), y su expresión es inducible por citoquinas proinflamatorias y bacterias (Gläser et al., 2005).

La expresión constitutiva e inducible de los péptidos antimicrobianos en la ubre bovina y la actividad antibacteriana frente a patógenos indican un papel crucial de las  $\beta$ -defensinas y Psoriasina en la defensa local contra la mastitis. Los péptidos antimicrobianos son capaces de establecer una barrera eficaz pero deben mostrar un notable nivel de expresión constitutivo en los sitios de invasión bacteriana, mientras que la expresión de aquellos que actúan para contrarrestar a los patógenos invasores debe ser altamente inducibles (Tetens et al., 2010).

## Literatura Citada

- Alluwaimi A. M. and J. S. Cullor. 2002. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during mid and late stages of lactation. *J. Vet. Med. B.* 49:105-100.
- Aono, S., C. Li, G. Zhang, R. J. Kemppainen, J. Gard, W. Lu, X. Hu, D. D. Schwartz, E. E. Morrison, C. Dykstra and J. Shi. 2006. Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 181-190.
- Bagnicka E., N. Strzałkowska, K. Flisikowski, T. Szreder, A. Jóźwik, B. Prusak, J. Krzyżewski and L. Zwierzchowski. 2007. The polymorphism in the  $\beta$ 4 defensin gene and its association with production and somatic cell count in Holstein-Friesian cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124, 150-156.
- Benachir, T. and M. Lafleur. 1995. Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochim Biophys Acta.* 1.121: 130-136.
- Bishop J. G.; F. L. Schanbacher; L. C. Ferguson and K. L. Smith. 1976. *In vitro* growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apolactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin. *Infect. Immun.* 14:911- 918.
- Blowey, R. y P. Edmondson. 1999. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. *Acricbia S. A. México.* : 33-49 y 157-180.
- Boman H. G. .1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Amm. Rev. Immunol.* 13: 61- 92.
- Breukink E. and B. De Kruijff. 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not?. *Biochim Biophys Acta* 1.462:223-234.
- Brewer, D., H. Hunter and G. Lajoice. 1998. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatina 3 and histatina 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochem Cell Biol* 76: 247- 256.

- Ceron-Muñoz M., H. Tonhati, J. Duarte, J. Oliveira, M. Muñoz-Berrocal and H. Jurado-Gámez. 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:2885-2889.
- Cormican P., K. G. Meade, S. Cahalane, F. Narciandi, A. Chapwanya, A. Lloyd, y C. O'Farrelly. 2008. La evolución, la expresión y la eficacia en un grupo de nuevas especies bovina beta-defensinas. *Inmunogenética* 60:147-156.
- Correa M. G. P. and J. M. Marin. 2002. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology.* 85:125-132.
- Dawson R. M. and G. Liu. 2008. Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. *Crit Rev. Microbiol.* 34 : 89- 107.
- Fernández Botran R.; P. M. Chilton and Y. Ma. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv. Immunol.* 63:269-336.
- Gallo R. L. and K. M. Huttner. 1998. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Investigative Dermatol.* 111: 739-743
- Giangaspero A., L. Sandri and A. Tossi. 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem.* 268: 5589-5600.
- Gläser R, J. Harder, H. Lange, J. Bartels, E. Christophers and J. M. Schröder. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol.* 6(1):57-64.
- Goldammer T., H. Zerbe, A. Molenaar, H.J. Schuberth, R. M. Brunner, S. R. Kata and H. M. Seyfert. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 174-85.
- Guidry A. J. and R. H. Miller. 1986. Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.* 69:1799-1805.

- Gutiérrez P. y S. Orduz. 2003. Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones. *Revista Actualidades Biológicas*, 25(78), 5-15.
- Heringstad B., G. Klemetsdal and J. Ruane. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64:95-106.
- Hitomi J., K. Yamaguchi, Y. Kikuchi, T. Kimura, K. Maruyama and K. Nagasaki. 1996. A novel calcium-binding protein in amniotic fluid, CAAF1: its molecular cloning and tissue distribution. *J Cell Sci* 109 (Pt 4), 805–815
- Hogan J. S.; J. W. Pankey and A. H. Duthie. 1987. Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci*. 70:927-934.
- Ito T and M. Kodama. 1996. Demonstration by reverse transcription-polymerase chain reaction of multiple cytokine mRNA expression in bovine alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Res. Vet. Sci*. 60:94-96.
- Kästli P. 1967. Definition of mastitis. *Bull IDF* 34(3):1-5.
- Lehrer R. I. and T. Ganz. 2002. Defensins of vertebrates animals. *Curr Opin Immunol*. 14: 96-102.
- Lehrer R. I., A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz and M. E. Selsted. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin Invest*. 84: 553- 561.
- Mandal M., M. V. Jagannadham and R. Nagaraj .2002. Antibacterial activities and conformations of bovine beta-defensin BNBD-12 and analogs: structural and disulfide bridge requirements for activity. *Peptides* 23: 413-418.
- Marchand C, K. Krajewski, H. F. Lee, S. Antony, A. A. Johnson, R. Amin, P. Roller, M. Kvaratskhelia and Y Pommier. 2006. Covalent binding of the natural

antimicrobial peptide indolicin to DNA abasic sites. *Nucl Acids Res*;34:5157-65.

Merck & CO. 2000. *El Manual Merck de Veterinaria*. 5ª ed. Editorial Océano. Barcelona. Pp. 457-459.

Nickerson S.C. 1987. Resistance mechanisms of the bovine udder: New implications for mastitis control at the teat end. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 191:1484-1488.

Ochoa-Zarzosa A., P. Loeza-Lara, F. Torres-Rodríguez, H. Loeza-Ángeles, N. Mascot-Chiquito, S. Sánchez- Baca, and J. E. López-Meza. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek* . 94: 199–206.

Okada H.; T. Ito, H. Ohtsuka; R. Kirisawa; H. Iwai; K. Yamashita; T. Yoshino and T. J. Rosol. 1997. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells in vitro. *J. Vet. Med. Sci.* 59:503-507.

Oliver S.P. and L. M. Sordillo. 1988. Udder health in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 71:2584-2606.

Osteras O. 2006. Mastitis epidemiology practical approaches and applications. XXIV World Buiatrics Congress. Nice, France. 14pp.

Park C. B., H. S. Kim and S. C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting celular functions. *Biochem Biophys Res Commun.* 244: 253- 257.

Petzl W., H. Zerbe, J. Günther, W. Yang, H. M Seyfert, G. Nürnberg, y H. J. Schuberth. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 39:18

- Philpot W. N. 1996. La calidad de la Leche y la Mastitis. Disertación pronunciada en la Primera Exposición Latinoamericana de Producción e Industria Lechera: Mundo Lácteo. Argentina. p. 1.
- Ponce P. y Mabelin Armenteros. 2000. Producción y calidad de la leche bajo condiciones del Trópico Americano. CENLAC/CENSA. LaHabana Cuba.
- Raj P. A. and A. R. Dentino. 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* 206 (1): 9–18.
- Regenhard P, M. Leippe, S. Schubert, R. Podschun, E. Kalm, J. Grötzinger and C. Looft. 2009. Antimicrobial activity of bovine psoriasin. *Vet Microbiol.* 12;136(3-4):335-40.
- Riollet C.; P. Rainard and B. Poutrel. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:161-167.
- Sansom M. S. 1993. Alamethicin and related pentaibols- model ion channels. *Eur Biophys J.* 22: 105- 124.
- Schonwetter B. S., E. D. Stolzenberg and M. A. Zasloff. 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science.* 267:1645–1648.
- Schrack F. N., M. E. Hockett, A. M. Saxton, M. J Lewis, H. H Dowlen and S. P Oliver. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84:1407-1412.
- Seegers H., C. Fourichon and F. Beaudeau. 2003. Production Effects Related to Mastitis and Mastitis Economics in Dairy Cattle Herds. *Veterinary Research.* 34(5), 475-491.
- Selsted M. E., D. Szklarek and R. I. Lehrer. 1992. Purification and antibacterial activities of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45: 150- 154.

- Shuster D. E.; M. E. Jr. Kehrl, P. Rainard and M. Paape. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.
- Smith, K. L. and J. S. Hogan. 1997. Epidemiology of Mastitis. Proc. 3rd International Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel, Section 6, 3-12.
- Sordillo L. M and K. L. Streicher. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol.* 7:135-146
- Sordillo L. M.; K. Shafer-Weaver and D. De Rosa. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865.
- Tarver, A. P., D. P. Clark, G. Diamond, J. P. Russell, H. Erdjument- Bromage, P. Tempst, K. S. Cohen, D. E. Jones, R. W. Sweeney, M. Wines, S. Hwang, y C. L. Bevins.1998. Enteric beta-defensin: Molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 66:1045–1056.
- Tetens, J., J. J Friedrich, A. Hartmann, M. Schwerin, E. Kalm, y G. Thaller. 2010. The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *Dairy Sci. J.* 93 :775-783.
- Tollersrud T., K. Kenny, A. J. Jr. Reitz and J. C. Lee. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology.* 38:2998-3003.
- Tomasinsig L, De Conti G, Skerlavaj B, Piccinini R, Mazzilli M, D'Este F, Tossi A, Zanetti M 2010. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect Immun.* 78(4):1781-8.
- Treece J. M.; G. E. Morese and C. Llevy. 1966. Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 49:1240.

- Valera M. R., M. C. Caballero, P. F. Linares, Q. R. Roberto Novoa y C. E. Casanovas. 2005. Efecto de la aplicación del Reylac sobre la calidad de la leche en rebaños con mastitis subclínica bovina. RedVet. Vol. VI(6). : 1-7.
- Wade D., A. Boman, B. Wahlin, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman and R. B Merrifield.1990. all-D amino acid- containing cannell – forming antibiotic peptides. Proc Natl Acad Scie USA. 87: 4761- 4765.
- Wellenberg, G. J., W. H. M. van der Poel and J. T. Van Oirschot. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology. 2361, pp. 2-2.
- Wilson D. J., K. N. Stewart and P. M. Sears. 1993. Factor affecting somatic cell counts in dairy goats. Proc. 32<sup>nd</sup> National Mastitis Council Annual Meeting. Kansas city MO. P-210.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multiceular organisms. Nature. 415: 389 – 395.
- Zhao X. and P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. J. Anim. Sci. 86:57–65.

# **Capítulo III**

## **Artículos**

[AU] Envío recibido

Acciones

Gloria Magaña Cota

09/08/2015

Para: dr victor manuel del villar

dr victor manuel del villar:

Gracias por enviarnos su manuscrito "**Expresión de las  $\beta$ -defensinas LAP (péptidos antimicrobiano lingual) y TAP (péptido antimicrobiano traqueal) así como Psoriasina (S100A7), en la glándula mamaria bovina con mastitis crónica por *Staphylococcus aureus*.**" a Acta Universitaria. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/author/submission/930>

Nombre de usuario/o: delvillar17

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Gloria Magaña Cota

Acta Universitaria

Acta Universitaria

Calzada de Guadalupe s/n, Guanajuato, Gto. México

Tel. 01 (473) 73 2 00 06 Exts. 3105, 5009, 5002 y 1004

[www.actauniversitaria.ugto.mx](http://www.actauniversitaria.ugto.mx)

Expresión de las  $\beta$ -defensinas LAP (péptido antimicrobiano lingual) y TAP (péptido antimicrobiano traqueal, así como Psoriasina (S100A7), en la glándula mamaria bovina con mastitis crónica por *Staphylococcus aureus*

Expression of the  $\beta$ -defensins LAP (lingual antimicrobial peptide) and TAP (antimicrobial peptide tracheal), and Psoriasin (S100A7), in the bovine mammary gland with chronic mastitis by *Staphylococcus aureus*.

*Víctor Manuel Del Villar Pérez*<sup>a</sup>, *Alberto Barreras Serrano*<sup>a</sup>, *Lourdes Carolina Pujol Manríquez*<sup>a</sup>, *Luis Tinoco Gracia*<sup>a</sup>, *Tomas Benjamín Rentería Evangelista*<sup>a</sup>, *Tonatiuh Melgarejo*<sup>b</sup> y *\*Alma Rossana Tamayo Sosa*<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California*

<sup>b</sup> *Department of Human Nutrition. Kansas State University*

***\*autor de correspondencia***

[almartamayo@hotmail.com](mailto:almartamayo@hotmail.com).

Alma Rossana Tamayo-Sosa, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Km 3.5 carretera a San Felipe, Fracc. Campestre S/N. Mexicali, BC Mexico CP 21386, 686-5636906

Expresión de las  $\beta$ -defensinas LAP (péptido antimicrobiano lingual) y TAP (péptido antimicrobiano traqueal, así como Psoriasina (S100A7), en la glándula mamaria bovina con mastitis crónica por *Staphylococcus aureus*

Expression of the  $\beta$ -defensins LAP (lingual antimicrobial peptide) and TAP (antimicrobial peptide tracheal), and Psoriasin (S100A7), in the bovine mammary gland with chronic mastitis by *Staphylococcus aureus*.

## **RESUMEN**

La mastitis bovina es la enfermedad que más afecta al ganado lechero en todo el mundo, y se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria. La severidad de la inflamación depende del agente causal y de la respuesta del huésped. Los péptidos antimicrobianos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa innatos en la glándula mamaria contra los microorganismos causantes de mastitis. Utilizando qPCR en los tejidos de la glándula mamaria: cisterna, parénquima, Rosetta de Fürstenberg, esfínter y linfonódulo inguinal, infectados con mastitis por *Staphylococcus aureus*, se encontró que las  $\beta$ -defensinas LAP y TAP se expresan principalmente en cisterna y parénquima. La proteína S100A7 se expresó mayormente en esfínter, y en menor grado en Roseta de Fürstenberg, cisterna y linfonódulo inguinal, con ausencia en parénquima. Se concluye que estos péptidos pudieran tener un papel fundamental en la defensa antimicrobiana contra mastitis causada por *S. aureus* en la glándula mamaria.

**Palabras Clave:** *Péptidos Antimicrobianos, Mastitis, qPCR.*

## Abstract

Bovine mastitis is a worldwide disease that affects dairy cattle and is characterized by inflammation of the mammary gland. The severity of inflammation depends of the causative agent and the host response to it. The antimicrobial peptides play an important role in the innate immune defense mechanisms of the mammary gland against mastitis causative microorganisms. By qPCR on tissues from cisterna, parenchyma, Rosette de Fürstenberg, streak canal, and inguinal lymph node, from *Staphylococcus aureus* mastitic mammary gland, we found that  $\beta$ -defensins LAP and TAP were mainly expressed in cisternal and parenchymal tissues. The protein S100A7 was highly expressed in streak canal, although some expression was detected in Rosette de Fürstenberg, cisterna, inguinal lymph node, but no in parenchymal tissue. Therefore, these peptides could play a key role in the mammary gland with mastitis by *S. aureus*.

Keywords : Antimicrobial Peptides, Mastitis , qPCR

## Introducción

La mastitis es una de las enfermedades infecciosas que más afecta a las vacas lecheras y que causa grandes pérdidas económicas a esta industria. Las bacterias son los principales causales de mastitis, siendo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* dos de los patógenos más comunes. El desarrollo del proceso inflamatorio y la respuesta inmune en la ubre varía significativamente entre estos dos patógenos (Petzl y col., 2008; Whelehan y col., 2011). Mientras que *E. coli* causa mastitis aguda con severas consecuencias clínicas, *S. aureus* causa predominantemente mastitis subclínica lo que resulta en una infección crónica que puede persistir durante toda la vida del animal (Whelehan y col., 2011).

A fin de prevenir y tratar esta enfermedad es importante entender la función inmune de la glándula mamaria. La inmunidad innata es un mecanismo no específico que antecede a la inmunidad a largo plazo, siendo los péptidos antimicrobianos (AMP) uno de sus principales componentes (Ganz, 2003; Swanson y col., 2004).

Los AMP son una familia de aproximadamente 900 moléculas que forman parte del sistema inmune innato más primitivo en los vertebrados, insectos y plantas (Tomasinsig y col 2010). Las defensinas son componentes importantes de estos mecanismos de defensa en células epiteliales y constituyen una familia de pequeños péptidos catiónicos (3–6 kDa). Se clasifican en defensinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ , aunque en bovinos solo se han descrito las tipo  $\beta$  y actualmente se conocen aproximadamente 18 secuencias completas. Dentro de la familia de las  $\beta$ -defensinas en los bovinos se incluyen al péptido antimicrobiano lingual (LAP) (Schonwetter y col., 1995; Isobe y col., 2011), la  $\beta$ -defensina entérica (EBD) (Tarver y col., 1998), la  $\beta$ -defensina de neutrófilo bovino (BNBD) (Selsted y col., 1993; Goldammer y col., 2004), el péptido antimicrobiano traqueal (TAP) (Diamond y col., 1991), y otras  $\beta$ -defensinas bovinas (Cormican y col., 2008). Además, Se ha demostrado la expresión constitutiva de las  $\beta$ -defensinas LAP, TAP y Psoriasina (PS100A7) en la glándula mamaria bovina sana a fin de determinar su posible participación en la prevención de la mastitis (Tetens y col., 2010). La expresión de TAP ha sido reportada en la leche y en las glándulas mamarias de vacas sanas e infectadas (Roosen y col., 2004; Cormican y col., 2008). Aunque se desconoce el tipo de célula que la produce, se ha demostrado la expresión de LAP y TAP en células epiteliales mamarias bovinas mediante hibridación in situ (Swanson y col., 2004; Goldammer y col., 2004). Así mismo, mediante inmunohistoquímica se ha determinado la expresión de LAP en tejido mamario sano (Isobe y col., 2009a) y en tejido mamario inoculado con *E. coli* y *S. aureus* (Petzl y col., 2008). Isobe y col (2009b) encontraron que LAP era secretado en leche bovina.

Otro importante agente antimicrobiano presente en bovinos es la proteína de unión a calcio S100A7, también conocida como Psoriasina (Tetens y col., 2010). A la fecha se conoce poco acerca de su función fisiológica en bovinos y particularmente en la glándula mamaria. En humanos se ha observado que protege la piel de infecciones contra *E. coli*, aunque también se expresa en piel sana. En bovinos se ha demostrado que es altamente activa en contra de diferentes cepas de *E. coli* (Regenhard y col., 2009), y su expresión es inducible por citocinas proinflamatorias y bacterias (Glaser y col., 2005), sin embargo su función fisiológica exacta aún no está bien descrita (Regenhard y col., 2009). Regenhard y col (2010) reportaron por primera vez que la proteína bovina psoriasina se expresa en glándula mamaria y pudiera ser una proteína de defensa del huésped y parte de la inmunidad innata. De hecho, S100A7 se ha detectado en muestras de leche después de 24 h de la infección con *E. coli*, solo en los cuartos inoculados, mientras que Lutzow et al. (2008) encontró niveles aumentados de otra proteína de unión a calcio, similar a Psoriasina, la S100A12, en leche de vacas inoculadas con *S. aureus*.

La importancia de las  $\beta$ -defensinas y Psoriasina en la defensa local contra la mastitis radica en la expresión constitutiva e inducible de los péptidos antimicrobianos en la glándula mamaria bovina y su actividad antibacteriana frente a patógenos. Sin embargo deben mostrar un notable nivel de expresión constitutivo en los sitios de invasión bacteriana y ser altamente inducibles una vez que se desarrolla la infección.

Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el nivel de expresión de las  $\beta$ -defensinas LAP y TAP, así como de Psoriasina (S100A7), en diferentes regiones de la glándula mamaria bovina con mastitis crónica causada por *S. aureus*.

## **Materiales y Métodos**

### *Recolección de muestras de tejido mamario*

Se utilizaron dos vacas Holstein Friesian diagnosticadas con mastitis crónica confirmadas mediante la prueba de california y el conteo de células somáticas (Calvinho, 1998). La presencia de *S. aureus* se realizó mediante el análisis bacteriológico de muestras de leche y confirmado con pruebas bioquímicas comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (API Staph, bioMérieux, U.S.A). Las vacas fueron sacrificadas y se tomaron muestras de tejido de la glándula mamaria de las siguientes regiones: cisterna, parénquima, Rosetta de Fürstenberg, esfínter y linfonódulo inguinal, en cada uno de los cuartos. Las muestras fueron de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> cada uno. Los tejidos fueron colocados en solución de RNAlater (Ambion, Austin, Texas) y mantenidos a -20°C hasta la extracción de RNA.

### *Extracción de RNA y obtención de cDNA*

Para la extracción de RNA, 30 mg de cada uno de los tejidos fueron congelados con nitrógeno líquido a -80°C y pulverizados con un mortero. El RNA fue extraído usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. El RNA se cuantificó por espectrofotometría (260/280) y su calidad comprobada por electroforesis en agarosa al 1%.

El cDNA se obtuvo mediante transcripción inversa utilizando 250 ng de RNA y 200 U de Superscript III reverse transcriptasa (Invitrogen, Carlsbad, California), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esto se repitió para cada una de las muestras. Para la expresión génica de cada uno de los péptidos se utilizaron los primers R y F específicos previamente descrito por Tetens y col (2010).

### *PCR en tiempo real cuantitativo*

Para el qPCR se utilizó el equipo CFX96 real time PCR (Bio- rad) y el kit Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvo un volumen final de 20µL que contiene 25µmol/L de dNTPs y 0.5 µM de primers oligo-dT. Las condiciones del ciclo fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, y los siguientes 40 ciclos fueron realizados de la siguiente manera: desnaturalización (95°C por 15 segundos), hibridación (58° C por 30 segundos), elongación (72°C por 30 segundos).

Se construyó una curva estándar con las diluciones del producto de PCR de punto final obtenido para cada uno de los genes, utilizando diluciones de  $1 \times 10^{10}$  hasta  $1 \times 10^2$ , así como los controles negativos (agua + primers; primer + dNTPs). Las cantidades del mRNA específico de cada gen y cada región anatómica fueron determinadas de acuerdo a la curva estándar. El mRNA de GAPDH, por ser expresado constitutivamente, fue usado como control interno invariante (Infante et al., 2005).

Los resultados de qPCR fueron reportados como la razón de la cantidad de mRNA de cada uno de los péptidos específicos sobre  $1 \times 10^6$  copias del gen GAPDH.

## **Resultados**

### *Rendimiento de qPCR*

El límite de detección para el qPCR fue de 100 copias de mRNA de acuerdo a la última dilución de la curva estándar ( $1 \times 10^2$ ). En general el análisis de las curvas de fusión para cada gen no mostró signos de productos inespecíficos de qPCR, indicando que los pares de primers fueron específicos. En la figura 1 se muestra la curva de fusión para el péptido LAP como ejemplo. Dado

que el gen constitutivo (GADPH) en su valor de Ct estuvo por debajo de los  $\leq 0.5$  ciclos en sus medidas repetidas se puede decir que dicho gen fue estable.

#### *Expresión de los péptidos antimicrobianos en la glándula mamaria con mastitis.*

Los niveles de expresión de mRNA de los péptidos antimicrobianos LAP, TAP y S100A7 se muestran en la figura 2. Las  $\beta$ - defensinas LAP y TAP muestran un mayor número de copias de mRNA en tejido de la cisterna (LAP:  $1.36 \times 10^7$  y TAP  $9.05 \times 10^8$ , respectivamente), seguido por el parénquima (LAP  $9.75 \times 10^6$  y TAP  $4.3 \times 10^6$ , respectivamente). También, el nivel de expresión de LAP en tejido de la Roseta de Fürstenberg (aproximadamente  $4.72 \times 10^6$ ) fue similar al nivel de expresión de TAP en el parénquima (aproximadamente  $4.3 \times 10^6$ ). Por el contrario, los niveles de expresión de LAP en esfínter y linfonódulo inguinal fueron los más bajos, respectivamente (aproximadamente  $2 \times 10^5$  y  $9.52 \times 10^5$ , respectivamente). En cuanto a TAP, los niveles de expresión fueron similares tanto en la Roseta de Fürstenberg como en el esfínter (aproximadamente  $2.31 \times 10^6$  y  $2.12 \times 10^6$ , respectivamente) y menor a la expresión en cisterna y parénquima. En el linfonódulo inguinal la expresión de TAP fue casi nula (aproximadamente  $2.12 \times 10^6$ ).

El patrón de expresión de mRNA para S100A7 fue muy alto en el esfínter y Roseta de Fürstenberg, con aproximadamente  $2.04 \times 10^9$  y  $2.85 \times 10^8$  copias de mRNA, respectivamente. En cisterna el nivel de expresión fue menor (aproximadamente  $1.42 \times 10^8$ ) con respecto al mismo sitio para LAP y TAP. En el linfonódulo inguinal fue menor (aproximadamente  $5.59 \times 10^7$ ) respecto a los sitios anteriores. El más bajo nivel de expresión se encontró en el parénquima con aproximadamente  $1.62 \times 10^4$  copias de mRNA.

## **Discusión**

En este estudio se muestra por primera vez el nivel de expresión de las  $\beta$ -defensinas bovinas LAP y TAP, y la proteína S100A7 en diferentes localizaciones de la glándula mamaria con mastitis crónica causada por *S. aureus*.

La expresión más abundante de los péptidos LAP y TAP se restringió principalmente a la cisterna y parénquima, con niveles muy bajos en Roseta de Fürstenberg, esfínter y en linfonódulo inguinal. Solo LAP fue relativamente mayor en cuanto a TAP en linfonódulo inguinal. Este hallazgo pudiera sugerir que LAP es inducible en el sitio de infección, como lo demuestra Swanson y col (2004), quien reportó abundante expresión de LAP mRNA en epitelio de la cisterna, epitelio alveolar y regiones periféricas de tejido infectado con *Corynebacterium species*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, mientras que no se detectó expresión de este péptido en tejido no infectado, por lo que sugirieron que la expresión de LAP era inducida en el sitio de infección ya que estos tejidos eran los primeros expuestos a microorganismos invasores. De la misma manera, datos obtenidos por Singh y col (2004), mediante análisis de hibridación *In situ*, reportaron una expresión predominante de LAP en los cuartos con mastitis en tejido de la cisterna mamaria, lo cual concuerdan con lo encontrado en este trabajo. Así mismo, Ptzel y col (2008) encontraron que la expresión de LAP en la glándula mamaria es inducida significativamente entre las 72-84 horas seguidas de la inoculación con *S. aureus*. Roosen y col (2004) afirman que LAP también es expresado constitutivamente en tejido mamario sano y con mastitis. Por lo que LAP es considerado un péptido tanto constitutivo como inducible en epitelio secretor de la teta indicando su papel en la defensa inmunológica de la glándula mamaria, ya que el LAP representa un mecanismo no-oxidativo microbicida para contener a los microbios patógenos (Das et al., 2010).

Con respecto al péptido TAP, que al igual que LAP tuvo un mayor nivel de expresión en cisterna y parénquima, estos resultados concuerdan con los de Whelehan y col (2011), quienes demostraron la expresión de TAP en la región alveolar, ducto, cisterna y canal del pezón de la

glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*. Además, Roosen y col (2004), han reportado la expresión constitutiva del péptido TAP en tejido de ubres sanas de vacas en lactación pero no en los tejidos infectados, mientras que Cormican y col (2008), confirmaron la expresión de TAP tanto en epitelio mamario como en tejido mamario. Así mismo, estudios reportan que el péptido antimicrobiano TAP se expresa de manera constitutiva pero también de manera inducible, y que los niveles de expresión en los tejidos mamaros aumentan en respuesta a la inflamación, tal sería el caso de tejidos con mastitis (Diamond et al., 1993, Roosen et al. 2004), esto debido a que el péptido TAP ha mostrado una alta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* principalmente en la fase aguda de la mastitis (Eckersall et al., 2006). Kosciuczuk y col (2014), reportan que en el parénquima no hay expresión de este péptido, contrario a los resultados aquí mostrados en los que se detecta la expresión del péptido TAP en parénquima, esto pudiera deberse a que el límite de detección del qPCR fue mucho menor y con ello se pudo detectar una menor cantidad de este péptido.

Por otra parte, el patrón de expresión para LAP y TAP encontrado en este estudio difiere de lo encontrado en vacas sanas, en donde se ha reportado que las defensinas LAP y TAP se expresan mayormente en la región del linfonódulo inguinal (Tetens et al., 2010) y no en las regiones distales de la glándula mamaria, lo que podría sugerir que son los sitios en donde son inducibles ante la infección.

En cuanto al péptido S100A7, este mostró un patrón y nivel de expresión opuesto a LAP y TAP, prevaleciendo su expresión en esfínter, Roseta Fürstenberg, cisterna y nódulo inguinal, en orden de mayor a menor número de copias de mRNA; mientras que en el parénquima el nivel de expresión fue muy escaso.

El esfínter fue el tejido donde hubo la mayor expresión de S100A7, lo que concuerda con lo publicado por Regenhard y col (2010), quienes reportan una abundante expresión de este péptido en

esta region. Así mismo, concuerda con su expresión constitutiva en vacas sanas (Tetens et al., 2010), lo cual pudiera sugerir que también es inducible. De acuerdo al patrón de infección galactogénico, el epitelio del pezón es el primer tejido expuesto a microorganismos patógenos y por tanto la primera línea de defensa, de ahí su mayor expresión tanto en vacas sanas como en vacas con mastitis.

Además, este estudio mostró la expresión de S10A7 en tejidos de la cisterna de vacas con mastitis crónica por *S. aureus*, datos que concuerdan con los reportados por Regenhard y col (2010), quienes detectaron la expresión de psoriasina en el epitelio de la cisterna después de 24 h de la infección con *E. coli*, y no en vacas sanas, lo que sugiere que su expresión podría ser inducida también por *S. aureus*. Sin embargo, en este estudio no se observó la expresión de S100A7 en el parénquima de vacas infectadas con *S. aureus*, datos que concuerdan con lo observado por Regenhard y col (2010) que no detectaron la expresión de psoriasina después de 24 h de la infección con *E. coli*, ni tampoco en vacas sanas. El canal del pezón forma una barrera que protege a la cisterna y al parénquima del contacto con el medio ambiente, por lo que no se detectó la expresión de Psoriasina en cisterna y parénquima de vacas sanas, pero sí en vacas infectadas con *E. coli* y *S. aureus*. La expresión de Psoriasin en la glándula mamaria es parte de los mecanismos de defensa innatos que actúan de manera local, con actividad antimicrobiana contra patógenos como *E. coli* y *S. aureus* (Regenhard y col., 2010).

## **Conclusión**

El presente estudio muestra por primera vez el patrón y nivel de expresión de los péptidos antimicrobianos LAP, TAP y S100A7 en diferentes regiones de la glándula mamaria con mastitis clínica crónica por *S. aureus*. La mayor expresión de LAP y TAP se limitó a las regiones de la cisterna y el parénquima, lo cual podría sugerir que su expresión se ve aumentada una vez que el patógeno se establece en esta región de la glándula mamaria, lo que podría sugerir un papel

quimiotáctico de ahí la inflamación crónica de la glándula mamaria sin eliminación del patógeno *S. aureus*. Mientras que S100A7 mostró una mayor expresión en los tejidos que están en contacto constante e inmediato con el patógeno como el esfínter y Roseta de Fürstenberg, sugiriendo que este péptido pudiera tener un papel fundamental en la disminución en el número de colonias en la glándula mamaria por *S. aureus*.

### **Agradecimiento**

Los autores agradecen a MC. Vasti Lozano Ordaz, MC. José Luis Rodríguez por su asesoría y al Ph. D. Tonatiuh Melgarejo por su apoyo para la realización de este estudio.

### **Literatura Citada**

- Calvinho, L.F. 1998. Diagnóstico bacteriológico de mastitis. En: Primer Seminario Internacional Capacitagro. 115 – 118. Pergamino, Buenos Aires
- Cormican, P., K. G. Meade, S. Cahalane, F. Narciandi, A. Chapwanya, A. Lloyd, y C. O'Farrelly. 2008. La evolución, la expresión y la eficacia en un grupo de nuevas especies bovina beta-defensinas. *Inmunogenética* 60:147-156.
- Das H., S.U. Ahmed, S.K. Shukla, S. Shukla, A. Latif, and D. Sharma. 2010. Two  $\beta$  defensin cationic peptides from mastitic milk of *Bubalus bubalis*. *Asian Journal of Animal Sciences*. 4: 1-12.
- Diamond G., D. E. Jones and C. L. Bevins. 1993. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4596–4600.
- Diamond, G., M. Zasloff, H. Eck, M. Brasseur, W. L. Maloy, and C. L. Bevins. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3952-3956.
- Eckersall, P.D., F. J. Young, A. M. Nolan, C. H. Knight, C. McComb, M. M. Waterston, C. J. Hogarth, E. M. Scott, and J. X. Fitzpatrick. 2006. Acute proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:1488-1501.
- Ganz. T 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*.3:710-20.

- Gläser R, J. Harder, H. Lange, J. Bartels, E. Christophers and J. M. Schröder. 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol.* 6:57-64.
- Goldammer T., H. Zerbe, A. Molenaar, H.J. Schuberth, R.M. Brunner, S. R. Kata, and H. M. Seyfert. 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11(1):174-85.
- Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, and Pando RH. 2005. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clinical and Experimental Immunology.* 141:21-28.
- Isobe N, K. Morimoto, J. Nakamura, A. Yamasaki, and Y. Yoshimura. 2009b. Intramammary challenge of lipopolysaccharide stimulates secretion of lingual antimicrobial peptide into milk of dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:6046-51
- Isobe N., T. Sugino, K. Taniguchi, N. Moriya, K. Hosoda, and Y. Yoshimura. 2011. Differential localization of lingual antimicrobial peptide in the digestive tract mucosal epithelium of calves. *Vet Immunol Immunopathol.* 142(1-2):87-9.
- Isobe, N., K. Hosoda, and Y. Yoshimura. 2009a. Immunolocalization of lingual antimicrobial peptide (LAP) in the bovine mammary gland. *Animal Science Journal.* 80:446-450.
- Kościuczuk E. M., P. Lisowski, J. Jarczak, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski, and E. Bagnicka. 2014. Expression patterns of  $\beta$ -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Vet Res.* 6:10:246-259
- Lutzow Y.C., L. Donaldson, C. P. Gray, T. Vuocolo, R. D. Pearson, A. Reverter, K. A. Byrne, P. A. Sheehy, R. Windon, and R. L. Tellam. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res.* 4: 18
- Petzl, W., H. Zerbe, J. Günther, W. Yang, H. M Seyfert, G. Nürnberg, and H. J. Schuberth. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet. Res.* 39:18
- Regenhard P, M. Leippe, S. Schubert, R. Podschun, E. Kalm, J. Grötzinger and C. Looft. 2009. Antimicrobial activity of bovine psoriasin. *Vet Microbiol.* 12;136(3-4):335-40.

- Regenhard P., W. Petzl, H. Zerbe, and H. Sauerwein. 2010. The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Vet Microbiol.* 143(2-4):293-8.
- Roosen, S., K. Exner, S. Paul, JM Schröder, E. Kalm, y C. Looft. 2004. Bovine beta-defensins: Identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mamm. Genome* 15:834–842.
- Schonwetter B. S., E. D. Stolzenberg, and M. A. Zasloff. 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science.* 267:1645–1648.
- Selsted, M.E., Y. Tang, W. L. Morris, P. A. McGuire, M. J. Novotny, W. Smith, A. H. Henschen, and J. S. Cullor. 1993. Purification, primary structure, and antibacterial activities of 13-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6641-6648.
- Singh, V.K., T. More, and S. Kumar. 2004. Separation of cationic proteins and antibiotic peptides from buffalo polymorphonuclear cells. *Buffalo J.* 2: 173-182.
- Smolenski G., S. Haines ,F. Y. Kwan, J. Bond, V. Farr, S. R. Davis, K. Stelwagen, and T. T. Wheeler. 2007. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *J. Proteome Res.* 6(1):207-215.
- Swanson, K., S. Gorodetsky, L. Good, S. Davis, D. Musgrave, K. Stelwagen, V. Farr, and A. Molenaar. 2004. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect. Immun.* 72:7311–7314.
- Tarver, A. P., D. P. Clark, G. Diamond, J. P. Russell, H. Erdjument- Bromage, P. Tempst, K. S. Cohen, D. E. Jones, R. W. Sweeney, M. Wines, S. Hwang, and C. L. Bevins. 1998. Enteric beta-defensin: Molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* 66:1045–1056.
- Tetens, J., J. J Friedrich, A. Hartmann, M. Schwerin, E. Kalm, and G. Thaller. 2010. The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *J Dairy Sci.* 93:775-783.
- Tomasinsig L., G. De Conti, B. Skerlavaj, R. Piccinini, M. Mazzilli, F. D'Este, A. Tossi and M. Zanetti. 2010. Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infect Immun.* 78:1781-8.
- Whelehan C. J., K. G. Meade, P. D. Eckersall, F. J. Young, and C. O'Farrelly. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 140(3-4):181-9

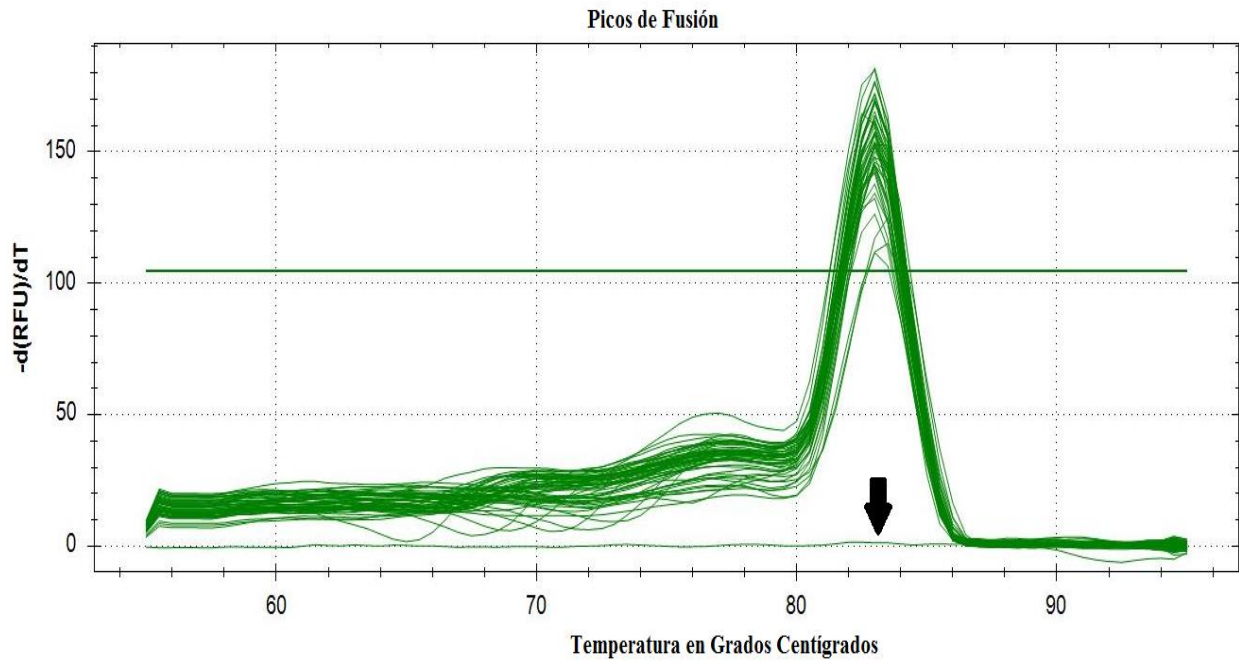


Figura 1 Curva de fusión del péptido antimicrobiano LAP, nótese que los controles negativos (indicado en la imagen con una flecha) no amplificaron lo que indica que los pares de primers fueron específicos, además, tanto las muestras como controles positivos mostraron la misma temperatura de fusión.

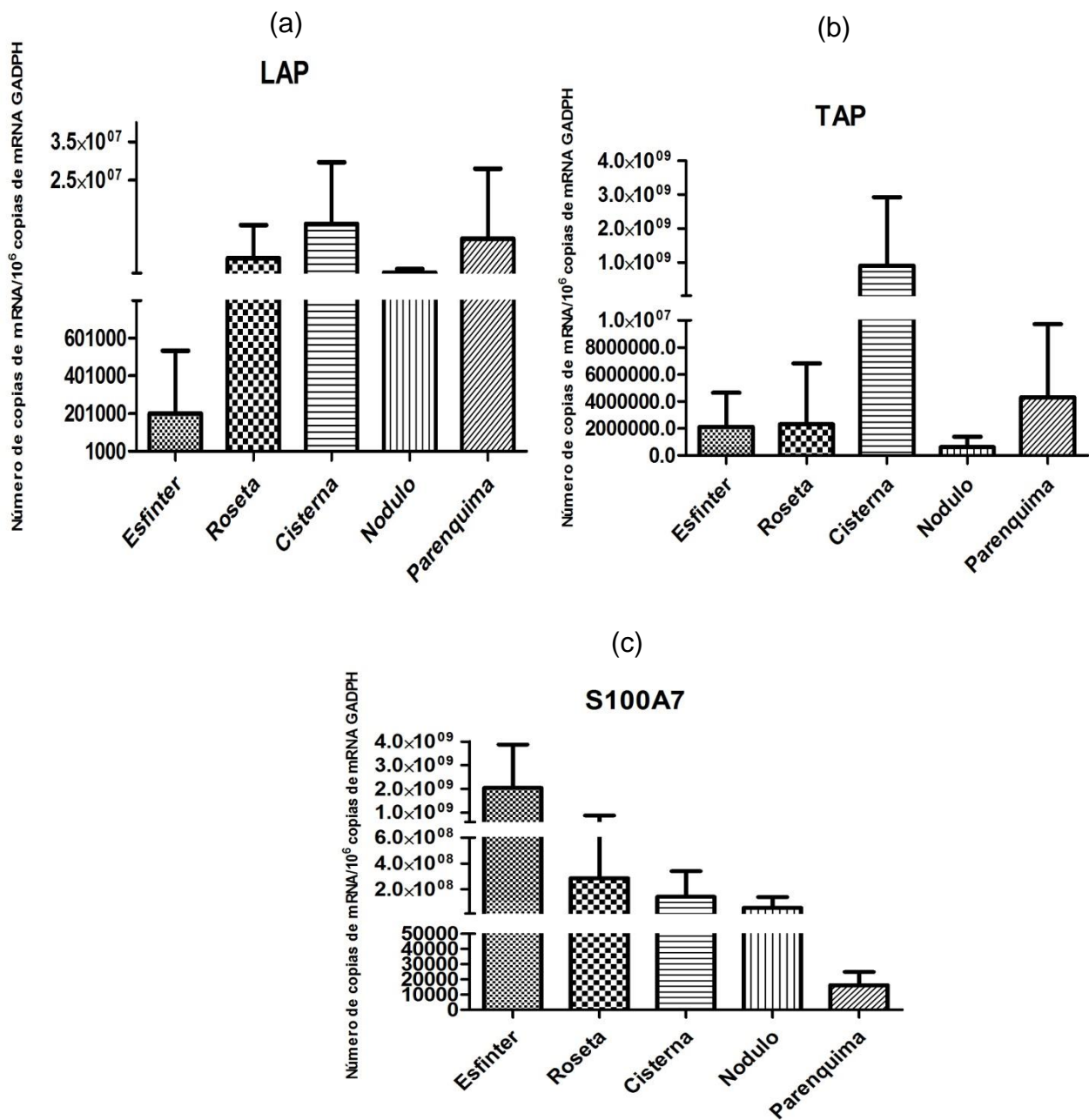


Figura 2 Se muestran los niveles de expresión de mRNA de los péptidos LAP (a), TAP (b) y S100A7 (c) en 5 diferentes regiones anatómicas de la glándula mamaria bovina. El número de copias de mRNA esta normalizado contra la expresión de GADPH bovino. Las barras representan la desviación estándar. LAP (péptido antimicrobiano lingual); TAP (péptido antimicrobiano traquela); S100A7 (Psoriasina).

## Evaluation of the Antimicrobial Activity of the K9CATH Peptide (38 Amino Acids) Against a Mastitis Isolated Strain of *Staphylococcus aureus* by the Resazurin microtiter Method

<sup>1</sup>Albero Barreras-Serrano, <sup>1</sup>Alma Rossana Tamayo-Sosa, <sup>1</sup>Victor Manuel del Villar-Perez,

<sup>1</sup>Alma Angelina Castellanos-Félix, <sup>1</sup>Luis Tinoco-Gracia and <sup>2</sup>Tonatiuh Melgarejo

<sup>1</sup>Research Institute of Veterinary Science, University of Baja California, Mexicali, BC Mexico

<sup>2</sup>Department of Human Nutrition, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

**Abstract:** The antimicrobial activity of the synthetic peptide K9CATH was determined by the Resazurin microtitre Method (RMM) against a strain of *S. aureus* isolated from a case of mastitis. To the antibiogram this bacteria strain showed to be resistant to Ampicillin, Erythromycin, Cefepime, Dicloxaciline and Penicillin (10 U), while the MIC obtained for the K9CATH was 5.66 µg/mL. Unlike the reference broth method, visual reading for MIC determination with the RMM showed to be easier, rapid, inexpensive and more sensitive for antimicrobial peptide screening, based in a color change from blue (not growth) to pink (growth). This is the first time that the resazurin method is used to determine the MIC of the 38 aa's K9CATH peptide against a mastitic isolate of *S. aureus*.

**Keywords:** AMPs and mastitis, K9CATH peptide, resazurin assay, *Staphylococcus aureus*

### INTRODUCTION

Mastitis is the inflammation of the mammary gland and is the disease with the highest incidence in milk production worldwide (Bradley, 2002). Annual worldwide losses are estimated at 35 billion U.S. dollars. Mastitis is treated with antibiotics such as tetracycline and penicillin (Deluyker *et al.*, 2005), however the indiscriminate use of antibiotics is favoring the emergence of bacteria resistance and the elimination of antibiotics in milk is undesirable (Erskine and Barlett, 1996). One of the main challenges to overcome for the milk industry is to reduce the use of antibiotics and therefore the development of new antimicrobial therapies to treat mastitis is necessary.

The use of Antimicrobial Peptides (AMP's) could be an alternative to conventional antibiotics because of its wide spectrum (Gutiérrez and Orduz, 2003). Specifically the synthetic K9CATH peptide has shown antimicrobial activity against gram positive, gram negative and yeast by the Broth Microdilution Method (BMM) (Sang *et al.*, 2007).

Although the BMM is easy to perform a disadvantage could be the MIC interpretation due to inoculum sedimentation or very scant or transparent growth that occurs with some species of bacteria (Baker and Tenover, 1996). For this reason the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) was developed by Alamar Biosciences, Inc., Sacramento, California and is based on the conventional broth microdilution method but with a color indicator. However MABA could be unaffordable to low income laboratories and for this

reason the Resazurin microtitre Method (RMM) was developed, where resazurin dye is used as a colorimetric indicator and is based in the reference method as well. Resazurin is an oxy-reduction indicator that has been employed as MIC indicator (Mann and Markham, 1998). The validity of the RMM to predict MIC is due to the correlation of visible color change (from blue to pink) with bacterial densities in the microplate wells. In the present study the antimicrobial activity of the peptide K9CATH (38 aa's) was evaluated against a bovine mastitic isolate of *Staphylococcus aureus* by the resazurin microtiter method.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacteria isolation and identification:** A 50 mL milk sample was aseptically collected in a sterile falcon tube from a first lactation cow diagnosed with mastitis by the California Mastitis Test (CMT). Milk sample was stripped onto MacConkey and blood agar and incubated for 24 h at 37°C. Grown colonies were subjected to a gram stain to identify morphology and also the catalase and potassium hydroxide tests were performed. Then, bacteria were grown in Brain Heart Infusion (BHI) media (Becton, Dickinson, USA) for 24 h at 37°C and identified by the API staph identification system (API® staph BioMerieux). An antibiogram was used to determine bacteria susceptibility or resistance to conventional antibiotics by a commercial multi-disks kit (Biorad).

**Corresponding Author:** Alma Rossana Tamayo-Sosa, Research Institute of Veterinary Science, University of Baja California, Km 3.5 Highway to San Felipe, Fracc. Campestre S/N. Mexicali, BC Mexico (Spanish), CP 21386, Tel: +52 662 666 6666

For the resazurin assay, after bacteria was grown in BHI media a suspension was prepared in saline solution with a turbidity equal to that of the 0.5 McFarland standard. A 1:100 bacteria dilution was further done in BHI media for a final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

**Antimicrobial peptide K9 CATH:** The K9CATH antimicrobial peptide was donated by Dr. Melgarejo from Kansas State University. A vial of 2 mg of lyophilized synthetic antimicrobial peptide K9CATH (38 amino acids) was reconstituted in 500  $\mu$ L of sterile deionized water obtaining a final concentration of 4  $\mu$ g/ $\mu$ L. This stock solution was stored at  $-70^\circ\text{C}$  until used. For the assay a 4x working solution was prepared (512  $\mu$ g/mL) to make twofold dilutions with the following concentrations: 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 and 1  $\mu$ g/mL.

**Resazurin Microplate Method (RMM):** Minimal inhibitory concentration for the K9CATH was determined following the protocol described by Franzblau *et al.* (1998) with a minor modification. Briefly, 200  $\mu$ L of sterile deionized water was added to all outer-perimeter wells of sterile 96-well plates (Falcon 3072; Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J.) to minimize evaporation of the medium in the test wells during incubation. The wells in rows B to G in columns 2 to 11 received 100  $\mu$ L of BHI media. One hundred microliters of 4x antimicrobial peptide solution were added to wells B3 to B5 and B8 to B10 and by using a multichannel pipette 100  $\mu$ L were transferred from column 3 to 5 and from column 8 to 10 down the rows until G to make twofold dilutions and from last dilution 100  $\mu$ L of excess medium was discarded. One hundred microliters of *S. aureus* inoculum was added to all the wells, except wells B6 and B7 that served as drug-free (inoculum-only) controls. The plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. Thirty microliters of freshly prepared resazurin at 0.01% diluted in BHI media was added to all the wells and reincubated at  $37^\circ\text{C}$  for 6 h and the colors of all wells were recorded. A blue color in the well was interpreted as no growth and a pink color was scored as growth. The MIC was defined as the lowest drug concentration which prevented a color change from blue to pink.

## RESULTS AND DISCUSSION

Bacteria isolated from milk was determined to be *Staphylococcus aureus* according to presence of clusters of cocci gram positive, catalase positive, potassium hydroxide and by biochemical identification. For the antibiogram this strain of *S. aureus* showed to be susceptible to 5 of the 12 antibiotics indicated for the treatment of gram positive bacteria, while resistance was shown to Ampicillin (10  $\mu$ g), Erythromycin (15  $\mu$ g), Cefepime (30  $\mu$ g), Dicloxaciline (1  $\mu$ g) and

Penicillin (10 U). However the antimicrobial peptide K9CATH inhibited *S. aureus* growth in vitro at 5  $\mu$ g/mL, a concentration lower than those of antibiotics in the antibiogram.

The MIC obtained with this method are similar to those obtained with the peptide WBC14 (water buffalo cathelicidin 14) from water buffalo with antimicrobial activity against *Streptococcus dysgalactiae* (12.5  $\mu$ M), *Klebsiella pneumoniae* (25  $\mu$ M), *Corynebacterium jeikeium* (12.5  $\mu$ M) and *Staphylococcus aureus* (25  $\mu$ M) all isolated from mastitis clinical cases (Tamayo *et al.* 2010). Furthermore, Sang *et al.* (2007) reported that 38 aa's K9CATH peptide have shown antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis* and *Neisseria gonorrhoeae*) and yeast (*Candida albicans*). Although in both cases the antimicrobial activity of these peptides has been evaluated *in-vitro* using the reference broth microdilution method. Furthermore, antimicrobial susceptibility and resistance for *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium smegmatis* has been evaluated successfully with the RMM and proved to be sensitive and specific (Taneja and Tyagi, 2007; Rivoire *et al.* 2007; Campanerut *et al.*, 2011; Palomino *et al.*, 2002).

The resazurin method follows the principle of the reference broth method and differs only in the addition of resazurin and depends on the observation of a color change from blue (indicating inhibition of the organism) to pink (no inhibition). This color change appears when surrounding medium is reduced as a result of bacterial depletion of dissolved oxygen and acid production and therefore it is necessary to adjust reduction densities for each organism tested (Mann and Markham, 1998).

## CONCLUSION

The K9CATH peptide (38 aa's) antimicrobial activity against a field strain of *S. aureus* was effectively determined by the resazurin method. The resazurin method could be an alternative to the reference NCCLS method for its easy interpretation and to the color indicator. Further studies are necessary to validate the resazurin assay and determine if the MIC are in concordance with those of the reference method for this peptide.

## REFERENCES

- Baker, C.N. and F.C. Tenover, 1996. Evaluation of the alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. J. Clin. Microbiol., 34(12): 2654-2659.

- Bradley, A., 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.*, 164(2): 116-128.
- Campanerut, P.A., L.D. Ghiraldi, F.L. Sposito, D.N. Sato, C.Q. Leite, M.H. Hirata, R.D. Hirata and R.F. Cardoso, 2011. Rapid detection of resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* using the resazurin microtitre assay. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 66(5): 1044-1046.
- Deluyker, H.A., S.N. Van Oye and J.F. Boucher, 2005. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 88(2): 604-614.
- Erskine, R.J. and P.C. Barlett, 1996. Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of streptococcus agalactiae mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208(2): 258-260.
- Franzblau, S.G., R.S. Witzig, J.C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M.T. Degnan, M.B. Cook, V.K. Quenzer, R.M. Ferguson and R.H. Gilman, 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J. Clin. Microbiol.*, 36(2): 362-366.
- Gutiérrez, P. and S. Orduz, 2003. Antimicrobial peptides: Structure, function and applications. *Actual Biol.*, 25(78): 5-15.
- Mann, C.M. and J.L. Markham, 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.*, 84(4): 538-544.
- Palomino, J.C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings and F. Portaels, 2002. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 46(8): 2720-2722.
- Rivoire, N., P. Ravololonandriana, T. Rasolonavalona, A. Martin, F. Portaels, H. Ramarokoto and V. Rasolofo Razanamparany, 2007. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int. J. Tuberc. Lung D.*, 11(6): 683-688.
- Sang, Y., M. Teresa Ortega, K. Rune, W. Xiau, G. Zhang, J.L. Soulages, G.H. Lushington, J. Fang, T.D. Williams, F. Blecha and T. Melgarejo, 2007. Canine cathelicidin (K9CATH): Gene cloning, expression and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide. *Dev. Comp. Immunol.*, 31(12): 1278-1296.
- Tamayo, A.R.S., L. Tinoco, T.B. Rentería, L.E. Silva and T. Melgarejo, 2010. Water buffalo cathelicidin peptide 14: A pro-myeloid peptide with potent antimicrobial activity against common dairy cattle mastitis pathogens. *Proceeding of 20th International Meeting on Meat and Milk in Warm Climates (Spanish)*. ICA-UABC, Mexicali, B.C. Octubre 2010.
- Taneja, N.K. and J.S. Tyagi, 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 60(2): 288-293.

# **Capítulo IV**

## **Conclusiones**

Los péptidos antimicrobianos representan una alternativa factible como agentes terapéuticos en la mastitis ya que su mecanismo de acción se basa en atacar estructuras altamente conservadas, con ello el riesgo de resistencia antimicrobiana es bajo. Por lo que es necesaria la investigación para la expresión o sobreexpresión de los péptidos que se encuentran en la ubre y evaluar su actividad protectora contra la colonización bacteriana.

A pesar de que actualmente existen en bibliotecas más de 800 péptidos antimicrobianos descritos, solo unos pocos se encuentran en fase clínicas y la mayoría para enfermedades que afectan la salud del ser humano, por lo que es necesario la investigación de estas moléculas en enfermedades tan importantes para los productores de leche, ya que sus pérdidas económicas por desperdicio de leche son altos.

Es necesario el análisis in vitro de estos péptidos que se encuentran en la ubre normalmente para determinar la concentración mínima inhibitoria a la cual *S. aureus*. es inhibido y de esta forma determinar una concentración necesaria para mantener la salud de la ubre en perfecto estado, ya sea por la aplicación externa de péptidos antimicrobianos sintéticos o bien por la aplicación de sustancias que estimulen la expresión de estos.