



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ANÁLISIS DE TIMILCOSINA COMO REGULADOR DEL PROCESO  
INFLAMATORIO ASOCIADO A INFECCIONES BACTERIANAS EN CÉLULAS  
EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS**

**T E S I S  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**MVZ. M.C. Ismael Martínez Cortés**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Ma. Gloria Melgarejo- IIBO, UNAM**

**COMITÉ TUTOR**

**Dr. Héctor S. Sumano López - FMVZ- UNAM.**

**Dr. Daniel Martínez Gómez - UAM Xochimilco**

**COMITÉ TUTOR INVITADO**

**Dr. Juan J Loor - University of Illinois, USA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**Mayo 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DECLARACIÓN**

El autor autoriza a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la presente tesis se encuentre disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Atentamente

MVZ. MC. Ismael Martínez Cortés

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Marcia por su apoyo incondicional, por guiarme y enseñarme a valorar las cosas importantes de la vida y a mi hijo Eduardo por ser el motivo más grande y hermoso que la vida me ha regalado,

Al Dr. Eduardo García Zepeda por confiar en mi, abrirme las puertas de su laboratorio, motivar la seguridad y el respeto sobre mi trabajo y mi persona, así como por enseñarme a valorar nuestro trabajo y el día a día de la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes me han dado la oportunidad de realizarme como profesionalista.

A mis padres quienes siempre me brindaron apoyo para seguir adelante con cada uno de mis sueños y objetivos.

A mi esposa Marcia a quien admiro y quien me ha enseñado a trabajar en equipo y con quien pasé noches en vela tanto en casa como en el laboratorio siempre dispuesta a ayudarme.

A mi hermano Mike y Lisa por ser parte de mi familia y apoyarme incondicionalmente.

A la Dra. Gloria Soldevila quien no solo fue mi tutora y madre académica, si no que fue una persona que me brindo cariño y que siempre estuvo dispuesta a aconsejarme y sobre todo supo sortear todos los inconvenientes que pasamos a la largo de este proyecto juntos.

Al Dr. Eduardo García Zepeda quien fue mi padre académico y un ejemplo de profesionalismo y amor a la ciencia, quien me brindó respeto y confianza. Gracias por todo doctor hasta donde este, siempre lo llevaré en mi corazón.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez y la Dra Esthela Méndez quienes me brindaron su apoyo, me recibieron con los brazos abiertos en su laboratorio y estuvieron presentes en cada momento de este proyecto brindándome sus consejos, conocimientos y confianza.

Al Dr. José Luis Maravillas quien es un amigo incondicional, que me abrió las puertas de su laboratorio y con quien he compartido muchas cosas lindas de la ciencia y de la vida.

Al Dr. Juan J Loor quien me brindo la oportunidad de obtener una experiencia más en la vida en otro país y quien confió plenamente en mi para desarrollarme en su laboratorio por dos años.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por todos sus consejos, su tiempo y dedicación a mi persona, así como su invaluable amistad.

A Gisela y Oscar, así como Marcó, Rafa y Alicia, por su ayuda, tiempo y profesionalismo, así como el tiempo de charlas, ánimos y porras.

A todos los miembros del jurado quienes con sus valiosas observaciones ayudaron a la mejora de este trabajo.

Al rastro Temamatla por su apoyo en la toma de muestras para realizar los estudios de este proyecto.

A cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM Xochimilco, mis compañeros de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, a mis compañeros de laboratorio de RAI (Rod, Sandy, Itze) y a mis compañeros de laboratorio de Animal Science en la Universidad de Chicago.

A la tipita Cynthia quien desde el primer momento me recibió con los brazos abiertos, quien ha sido mi compañera incondicional todo este tiempo y mi mejor amiga gracias a este doctorado. A Narita quien fue mi compañera incondicional de mesa con quien compartí tantos momentos lindos y considero como mi hijita adoptiva. A mi amigo Arimelek quien siempre estuvo presente cada momento para ayudarme con la citometría y a quien mi hijo adora como su tío. A Roxana, conciencia, gracias por todo. Violeta, gracias por todo tu apoyo.

Abdulrahman, thanks my friend for everything that you did for me and for be my brother the rest of our life.'

## PRODUCTOS GENERADOS

### Artículos en revistas indexadas

**Martínez-Cortés I**, Acevedo-Domínguez NA, Olguin-Alor R, Cortés-Hernández A, Álvarez-Jiménez V, Campillo-Navarro M, Sumano-López HS, Gutiérrez-Olvera L, Martínez-Gómez D, Maravillas-Montero JL, Loor JJ, García-Zepeda EA, Soldevila G. Tilmicosin modulates the innate immune response and preserves casein production in bovine mammary alveolar cells during *Staphylococcus aureus* infection. J Anim Sci. 2019 Feb 1;97(2):644-656. doi: 10.1093/jas/sky463.

Maravillas-Montero JL, **Martínez-Cortés I**. Regulation of immune responses by exosomes derived from antigen presenting cells. Rev Alerg Mex. 2017 Oct - Dec;64(4):463-476.

### Artículos en preparación

**Martínez-Cortés I**, Acevedo-Domínguez NA, Olguin-Alor R, Cortés-Hernández A, Campillo-Navarro M, Maravillas-Montero JL, Loor JJ, García-Zepeda EA, Soldevila G. Exosomes derived of bovine mammary alveolar cells during *Staphylococcus aureus* infection modulates the innate immune response of neighbor cells.

### Foros de Investigación

**Martínez-Cortés I**, Acevedo-Domínguez NA, Olguin-Alor R, Cortés-Hernández A, Álvarez-Jiménez V, Campillo-Navarro M, Sumano-López HS, Gutiérrez-Olvera L, Martínez-Gómez D, Maravillas-Montero JL, Loor JJ, García-Zepeda EA, Soldevila G. Tilmicosin a key regulator of inflammation in bovine mammary gland. 2018 ALAI-SMI Joint Meeting, Cancún, Quintana Roo, Mex. May 14-18, 2018. MEMORIAS.

Martínez-Cortés I., Acevedo-Domínguez NA., Olguin-Alor R., Cortés-Hernández A., Álvarez-Jiménez V., Campillo-Navarro M., Sumano López H., Gutiérrez Olvera L., Martínez-Gómez D., Maravillas-Montero JL., Loor JJ., García Zepeda A., Soldevila Melgarejo G. Tilmicosin a key regulator of inflammation in bovine mammary gland. 2018 World Buiatrics Congress, Sapporo, Japan. Aug. 28 – Sep. 1. 2018. Submitted.



## RESUMEN

La tilmicosina es un antimicrobiano usado para el tratamiento de infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) que también ha mostrado efectos antiinflamatorios clínicos en el tratamiento de enfermedades respiratorias del ganado bovino y porcino. Sin embargo, no se conoce el mecanismo molecular por el cual la tilmicosina regula el proceso inflamatorio en glándula mamaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tilmicosina en la modulación de la respuesta inmune de las células epiteliales mamarias alveolares ante la infección con *S. aureus* y su consecuencia en la producción de caseínas. Para ello, se utilizaron células epiteliales mamarias bovinas inmortalizadas (MAC-T) pre-tratadas con tilmicosina por 12 horas o tratadas 2 horas posterior a la infección con *S. aureus*. Se encontró que tilmicosina disminuye la infección intracelular de *S. aureus* en MAC-T y tuvo un efecto protector en estas células, reduciendo la apoptosis inducida por la infección en un 80%. Además, redujo significativamente la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Para evaluar el mecanismo de acción de tilmicosina, se analizó la fosforilación de MAPK e interesantemente, se demostró un incremento en la fosforilación de ERK1/2, al mismo tiempo que disminuyó la fosforilación de p38. La modulación del proceso inflamatorio favoreció que se conservara la producción de caseínas en MAC-T infectadas con *S. aureus*.

Estos resultados indican que tilmicosina modula la inflamación en glándula mamaria causado por la infección con *S. aureus*, reduciendo el daño al parénquima celular a través de la regulación de la activación de MAPK, la disminución de la producción de ROS y la secreción de citocinas inflamatorias.

En resumen, tilmicosina disminuye el daño celular durante la infección bacteriana y promueve el mantenimiento de las funciones fisiológicas de las células mamarias, a través del rescate de la producción de caseínas.

## ABSTRACT

**Background:** Tilmicosin is an antimicrobial agent used to treat intra-mammary infections *against S. aureus* and has shown to have clinical anti-inflammatory effects. However, the mechanism by which it modulates the inflammatory process in the mammary gland is unknown. We evaluated the effect of tilmicosin treatment on the modulation of the mammary innate immune response after *S. aureus* infection and its effect on casein production by mammary epithelial cells. To achieve this goal, we used immortalized mammary epithelial cells (MAC-T), which were pre-treated with tilmicosin for 12 h or treated after infection with *S. aureus* (ATCC 27543). Our data showed that tilmicosin diminishes intracellular infection in MAC-T and induces a significant decrease of ROS, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  production. Moreover, tilmicosin showed a protective effect on MAC-T reducing an 80% the apoptosis induced by the infection. To investigate the signaling pathways involved in the immunomodulatory effect of tilmicosin, mitogen-activated protein kinases (MAPK) phosphorylation was measured by Fluorescent activated cell sorting (FACS). Interestingly, tilmicosin stimulated ERK1/2 but decreased p38 phosphorylation. Importantly, the anti-inflammatory effect of tilmicosin helped to preserve casein production of mammary epithelial cells. These results indicate that tilmicosin could be an effective modulator of the inflammatory process in the mammary gland and shows a protective effect diminishing the tissue damage produced by *S. aureus* infection through the regulation of MAPK phosphorylation, ROS production and pro-inflammatory cytokine secretion and maintains the physiological function of the bovine mammary epithelial cells.



## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
La leche en la nutrición.....	1
Composición de la leche.....	2
Función biológica de las caseínas.....	4
Mastitis bovina.....	5
Patogénesis de <i>Staphylococcus aureus</i> en glándula mamaria.....	10
Respuesta inmune de la glándula mamaria.....	13
□ Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	17
Activación de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK).....	19
□ Consecuencias fisiológicas del proceso inflamatorio.....	21
Terapia farmacológica de un proceso de mastitis.....	22
Macrólidos.....	23
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>27</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>32</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
<i>Preparación de cultivo primario de células de tejido mamario bovino.....</i>	<i>33</i>
<b>Cultivo de Células Epiteliales Mamarias (MAC-T).....</b>	<b>34</b>
Análisis de la expresión de caseínas y citoqueratinas.....	34
Microscopía de fluorescencia.....	36
Infecciones celulares.....	37
Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
Actividad de Tilmicosina en el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
Efecto de Tilmicosina durante la infección de MAC-T con <i>S. aureus</i> en MAC-T.....	38
Determinación de la producción de ROS.....	40
Efecto de Tilmicosina en la viabilidad de MAC-T.....	40
Determinación de la Producción de Citocinas.....	41
Ensayo de activación de MAPK.....	41
Análisis estadístico.....	42
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
Generación de cultivos primarios de tejido epitelial mamario.....	43

Expresión de citoqueratina 18 (ck18) en cultivos primarios y células MAC-T .....	45
Actividad antimicrobiana de tilmicosina contra <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	48
Modelo de infección celular de <i>S. aureus</i> en células MAC-T. ....	52
Efecto de Tilmicosina en la internalización de <i>S. aureus</i> en células MAC-T. ....	55
Tilmicosina mantiene la viabilidad celular de las células MAC-T durante la infección de <i>S. aureus</i> . ....	57
Tilmicosina modula la producción de ROS durante la infección con <i>S. aureus</i> . ....	58
Tilmicosina reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> . ....	60
Tilmicosina modula la fosforilación de MAPK en células MAC-T estimuladas con <i>S. aureus</i> . ....	62
Tilmicosina mantiene la producción de Caseínas en células MAC-T durante la infección con <i>S. aureus</i> . ....	64
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>80-81</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ABREVIACIONES: .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Migración de células epiteliales a partir de esferoides...	44
<b>Figura 2:</b> Porcentaje de células que expresan <i>ck18</i> por generaciones	46
<b>Figura 3:</b> Células epiteliales expresan Citoqueratina	46
<b>Figura 4.</b> La línea celular MAC-T expresa citoqueratina	18
	47
<b>Figura 5.</b> Concentración mínima inhibitoria de tilmicosina sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i>	50
<b>Figura 6.</b> Tilmicosina ejerce actividad antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> mejor que gentamicina.	51
<b>Figura 7.</b> Las células MAC-T tiene capacidad de internalizar al <i>Staphylococcus aureus</i> .	53
<b>Figura 8.</b> <i>Staphylococcus aureus</i> tiene capacidad de internalizar en células epiteliales mamarias.	54
<b>Figura 9.</b> Tilmicosina disminuye la carga intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).	56
<b>Figura 10.</b> Tilmicosina disminuye la producción de ROS y previene la muerte celular de las células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> .	59
<b>Figura 11.</b> Tilmicosina disminuye la producción de citocinas pro inflamatorias en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> .	61

<b>Figura 12.</b> Tilmicosina modula diferencialmente la fosforilación de MAPK en células MAC-T infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> .....	63
<b>Figura 13.</b> La producción de caseínas en células MAC-T infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> puede ser rescatada por el tratamiento de con Tilmicosina.....	66-67
<b>Figura 14.</b> Modelo putativo de tilmicosina en la infección de células mamarias bovinas inmortalizadas (MAC-T) por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	79



## LISTA DE CUADROS

### PÁGINA

<b>CUADRO 1.</b> Grupo de antibióticos macrólidos organizados según su característica de estructura química. ....	<b>26</b>
---	-----------

## INTRODUCCIÓN

### La leche en la nutrición

La nutrición y el acceso a una dieta adecuada para una buena salud son esenciales para el crecimiento y desarrollo, mantenimiento del cuerpo y protección contra las enfermedades infecciosas, así como de enfermedades no transmisibles (ENT) en la vida adulta. Existe evidencia que describe que la nutrición en la infancia repercute en la salud, la inteligencia, el desempeño educativo e inclusive la situación económica en la edad adulta. La prevención de enfermedades en el futuro será tan importante como el tratamiento de las mismas y una estrategia que opta la población humana para prevenir enfermedades es mediante el consumo de alimentos saludables con beneficios especiales para la salud (Haug y col., 2007).

La leche de bovinos y los productos lácteos son tradicionales en la cadena productiva de la nutrición humana; la leche es un alimento básico para la nutrición de la población humana a nivel mundial (Haug y col., 2007, FAO, 2008). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) con el objetivo de alimentar a una población cada vez más numerosa y más urbanizada ha calculado un incremento en la producción de alimentos para consumo humano del 70 % para el 2050, incluyendo un incremento del 25 al 40% en el consumo de leche a nivel mundial (FAO, 2008, FAOSTAT 2012). La importancia nutricional de este alimento radica como una fuente de energía y nutrientes necesarios para garantizar el correcto desarrollo y crecimiento posnatal (Pereira, 2014). Otro contexto es la importancia social

que existe entre alimentación y salud; al respecto, estudios recientes han demostrado que es muy importante la modificación de ciertos factores de riesgo en la producción de alimentos para preservar la salud (Haug y col., 2007). La mayoría de los constituyentes de la leche no ejercen su función de forma aislada, sino que interactúan con otros componentes y generalmente están involucrados en más de un proceso biológico con efectos en la salud. Por lo tanto, el consumo de leche se asocia con la reducción de ENT y sin embargo existe preocupación acerca de la asociación entre el consumo elevado de lácteos y otras ENT, como la zoonosis (FAO, 2008).

### **Composición de la leche**

La leche es un alimento complejo con numerosos nutrientes que son necesarios para el crecimiento y el desarrollo de neonatos, siendo una fuente de lípidos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y carbohidratos. Por otro lado, también contiene inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, nucleótidos, poliaminas, enzimas y diversos péptidos bioactivos (FAO, 2008). La leche proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía, proteínas de alta calidad y grasas para la dieta del ser humano, reportándose un promedio de 134 kcal de energía/cápita/día, 8 g de proteína/cápita/día y 7.3 g de grasa/cápita/día entre otros componentes como calcio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y ácido pantoténico (FAOSTAT, 2012). La leche de origen animal puede desempeñar un papel importante en las dietas de los niños en poblaciones con bajo nivel de ingestión de grasas y acceso limitado a otros alimentos de origen animal (FAO, 2004). Tanto la grasa como la proteína de la leche son componentes importantes, ya que el

contenido total de proteínas es uno de los principales criterios de calidad que se aplica en el pago de la leche en muchos países.

Con respecto a la composición proteica, la leche de vaca y la leche humana difieren en su contenido; por ejemplo, la leche humana no contiene  $\beta$ -lactoglobulina, una de las principales proteínas asociadas con la alergia a la leche de vaca. Las caseínas representan casi el 80 % de la proteína en la leche de vaca, pero menos del 40 % en la leche humana. La leche humana contiene más  $\beta$ -caseína, que es más susceptible a la hidrólisis péptica que la  $\alpha$ s-caseína, particularmente la caseína  $\alpha$ -s1, que predomina en la leche de vaca (El-Agamy, 2007). El contenido de caseínas de la leche de vaca varía entre las razas y los fabricantes de queso a menudo usan leche de razas con un mayor contenido de  $\kappa$ -caseína (Bonfatti y col., 2010).

Generalmente, la leche se considera una fuente importante de proteínas en la dieta humana, ya que suministra aproximadamente 32 g de proteína por litro. Su fracción proteica se divide en proteínas de la fracción soluble y proteínas de la fracción insoluble (Pereira, 2014). Las proteínas solubles, también llamadas proteínas de suero de leche, representan el 20% de la fracción de proteína de la leche, mientras que las insolubles, donde se encuentran las caseínas, representan el 80% (Haug y col., 2007, Severin and W, 2005). Además de la alta calidad y el valor biológico, las proteínas de la leche y varios péptidos bioactivos han mostrado múltiples funciones biológicas que pueden ejercer una acción protectora en la salud humana (Pereira, 2014, Boye y col., 2012). Las principales acciones biológicas incluyen efectos anti-

bacterianos, anti-virales, anti-fúngicos, anti-oxidantes, anti-hipertensivos, anti-microbianos, anti-trombóticos, opioides e inmunomoduladores, además de mejorar la absorción de otros nutrientes (Mills S. y col., 2011).

### **Función biológica de las caseínas**

Las caseínas (CSN) son las proteínas de mayor concentración en leche y son codificadas por 4 genes de acuerdo a su concentración fisiológica en CSN1S1, CSN2, CSN1S2 y CSN3, los cuales codifican para  $\alpha$ 1-CSN,  $\beta$ -CSN,  $\alpha$ 2-CSN, and  $\kappa$ -CSN respectivamente (Dezhampanah y col., 2018). Estas proteínas representan una fuente importante de nutrientes para los mamíferos y es uno de los elementos lácteos que indican la calidad de la leche producida (Dezhampanah y col., 2018). La función principal de las caseínas es la unión de minerales y el transporte de elementos insolubles, como el calcio y el fósforo, facilitando la formación de un coágulo en el estómago para mejorar su digestión (Holt y col., 2013). Los complejos coloidales de calcio-proteína son denominados micelas de caseínas. Las caseínas dan origen biológico a diferentes péptidos bioactivos que han mostrado beneficios en los distintos órganos y sistemas del cuerpo humano, entre ellos el sistema circulatorio, sistema nervioso central y el sistema digestivo (Zimecki y Kruzel, 2007, Fekete y col., 2013, Noni, 2008). Las caseínas evolucionaron a partir de miembros de fosfoproteínas de unión al calcio (SCPP) (Holt y col., 2013). Las funciones biológicas de las caseínas, así como su actividad chaperona, están determinadas por su conformación flexible y por la forma en que las cadenas polipeptídicas de la proteína interactúan entre sí. Estas mismas propiedades

determinan cómo se comportan las caseínas en la fabricación de muchos productos lácteos y cómo pueden usarse como ingredientes funcionales en otros alimentos (Holt y col., 2013). La composición láctea se ve afectada por diversos factores, que incluyen: la etapa de lactancia, las diferencias de raza, el número de partos, las variaciones estacionales, la edad, los efectos de manejo, incluidos el número de ordeños por día, y la salud animal (Jenkins y McGuire, 2006). La producción de este alimento se ve afectada por diversas patologías que padecen las vacas, entre ellas destaca la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a agresiones infecciosas o no infecciosas, denominada mastitis (Pyorala, 2003).

### **Mastitis bovina**

La mastitis bovina se define como la condición inflamatoria de la glándula mamaria en respuesta a distintas agresiones, principalmente a infecciones por microorganismos como bacterias y hongos y rara vez, se desencadena por traumas físicos o químicos (Rainard y Riollet, 2006). Esta patología se caracteriza por lesiones en el tejido mamario, aumento en el número de células somáticas y cambios físicos, químicos y microbiológicos en la leche. La mastitis puede afectar la composición y las propiedades físico-químicas de la leche y representa uno de los mayores retos en la industria lechera a nivel mundial con una tasa de prevalencia mayor al 40% en los hatos lecheros, aunado al aumento de las tasas de resistencia de distintas cepas bacterianas a varios de los grupos de antibióticos que son utilizados en la terapia farmacológica generando una disminución constante de la respuesta

terapéutica (Huijps y col., 2008, Aghamohammadi y col., 2018, Scali y col., 2015). Las resistencias bacterianas han sido reportadas con variación de un 20 hasta un 60 % dependiendo la cepa bacteriana y el antibiótico evaluado, así como diferencias entre países (Oliver y Murinda., 2012).

Las pérdidas económicas debidas a la mastitis están asociadas a la disminución de la producción láctea ya sea por daño parcial en mastitis subclínicas o por daño irreparable del parénquima glandular en mastitis clínicas lo que genera la pérdida de leche en calidad y cantidad. Además hay que considerar los elevados costos de tratamientos farmacológicos y el desecho prematuro de animales que presentan un cuadro crónico de la enfermedad ascienden a pérdidas económicas que superan los dos billones de dólares al año (Rollin y col., 2015, Jensen y col., 2013, Aghamohammadi y col., 2018). Dentro de estas perdidas económicas se pueden citar: 1) la baja de la producción de láctea, 2) el desecho de leche proveniente de vacas con mastitis clínica, 3) los costos de los medicamentos 4) los costos por servicios veterinarios para el tratamiento de mastitis clínicas, 5) el costo de la implementación de los programas de control y 6) el costo por servicios veterinarios. Existen costos adicionales, como los residuos de anti-microbianos en la leche de las vacas tratadas, el control de la calidad de la leche, la afección en la producción de derivados lácteos, la pérdida de leche por al alto contenido de bacterias o células somáticas y la interferencia del potencial genético de algunas vacas desde el sacrificio involuntario temprano debido a mastitis crónicas (Rollin y col., 2015, Jensen y col., 2013, Aghamohammadi y col., 2018, Asfaw y col., 2017). La mastitis no solo reduce las ganancias del

productor de lácteos, sino que también ocasiona pérdidas importantes y costosas para los procesadores de leche debido a la mala calidad de la leche con un contenido mayor a 400,000 células / ml, lo cual afecta directamente la producción de derivados lácteos principalmente la elaboración de queso (Asfaw y col., 2017).

Las infecciones bacterianas son por mucho la causa más común de la mastitis en el ganado lechero; esta patología es causada por diversos microorganismos, entre ellos destacan las infecciones bacterianas por *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.* *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Jensen y col., 2013, Keane OM, 2019). Se conoce ampliamente el impacto de las infecciones intramamarias bacterianas (IMI) en la composición de la leche, como es la elevación del número de células somáticas en leche signología que se asocia con alteraciones en la calidad de las proteínas, cambios en la composición de los ácidos grasos, lactosa, alteración en la concentración de iones y minerales, así como una mayor actividad enzimática y un mayor pH de la leche cruda (Ogola y col. 2007., Coulon JB y col., 2002), pero no se conoce claramente cómo se producen estos cambios. Las alteraciones que ocasionan las infecciones en la función fisiológica de la glándula mamaria dependerán de distintos factores como son:

- a) La gravedad de las infecciones: su desenlace puede variar desde generar un efecto muy pequeño hasta una inhibición completa de la secreción de leche en función del microorganismo causante de la mastitis, su virulencia y la resistencia del huésped (Pyorala, 2003, Benites y col., 2002).



- b) La distribución de la infección: ya que esta puede estar localizada en unos pocos alveolos o abarcar todos ellos; a este respecto existe una considerable variabilidad en función de las características individuales del animal, la raza, la edad y la etapa fisiológica (Pyorala, 2003).
- c) Alteración de la actividad metabólica de las células productoras de leche, incluida la reducción de la síntesis de leche y la interferencia con los balances iónicos, ya sea por una concentración reducida de una hormona galactopoyética o por una concentración aumentada de una hormona inhibidora y/o un mediador inflamatorio.
- d) Disminución de la disponibilidad de precursores para la síntesis de leche ya sea por anorexia, disminución del flujo sanguíneo en la glándula mamaria o por un desequilibrio hormonal (Pyorala, 2003, Benites y col., 2002).
- e) Descomposición de los componentes de la leche por la acción de las enzimas de los leucocitos inflamatorios y de los organismos causantes de la mastitis.
- f) Interrupción de la integridad epitelial por el proceso inflamatorio (Pyorala, 2003, Benites y col., 2002).

Como se mencionó previamente, *S. aureus* es una de las bacterias causantes de mastitis más comunes, siendo el microorganismo de mayor prevalencia en los hatos lecheros. Esta bacteria representa el 74% de los casos de mastitis a nivel mundial y es el patógeno más importante que afecta la producción láctea debido a su patogenicidad, alta tasa de contagio, persistencia en el ambiente, capacidad de colonización epitelial y las bajas

tasas de cura terapéutica (Mohammadsadegh, 2018, Rainard y col., 2018). *S. aureus* por lo general causa mastitis subclínica, la cual se torna crónica al evadir la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero, tanto en humano como en ganado lechero (Bradley, 2002, Oviedo-Boyso y col., 2007). Esta bacteria tiene una mayor prevalencia por su habilidad de transmitirse entre los cuartos de la ubre y entre animales durante el proceso de ordeño a través de vectores mecánicos, como las máquinas de ordeño o utensilios usados en el ordeño, así como vectores naturales, donde el humano participa importantemente en la transmisión y zoonosis de esta infección bacteriana (Lopez-Boado y Rubin, 2008). Al ser una zoonosis y presentar una alta resistencia bacteriana a fármacos, con tasas de eficacia terapéutica que van del 20 al 70 %, de la cual solo el 10 al 30 % de los tratamientos son efectivos contra el *S. aureus* (Kerro Dego y col., 2002), la mastitis por *S. aureus* constituye un reto importante en materia de salud pública. Considerando el impacto económico, los problemas de seguridad alimentaria y residuos de antibióticos en leche que genera la mastitis por *S. aureus*, existe la necesidad de comprender mejor los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria y mejorar las herramientas terapéuticas disponibles para controlar los casos de mastitis por este patógeno.

## **Patogénesis de *Staphylococcus aureus* en glándula mamaria**

*S. aureus* presenta múltiples factores de virulencia, algunos de los cuales han sido relacionados con la gravedad de la IMI desarrollada en el huésped. La expresión de dichos factores de virulencia está regulada por factores de regulación transcripcional y se sabe que durante el proceso de infección, los factores de virulencia se expresan en dos periodos: los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase pos-logarítmica (Fournier y col., 2008). La patogénesis de *S. aureus* en glándula mamaria involucra tres etapas básicas: 1) la adhesión, 2) la supervivencia y 3) la replicación bacteriana.

La adhesión es una estrategia de las bacterias para asociarse eficientemente y permanecer en ciertos tejidos, en este caso al tejido epitelial de la glándula mamaria (Rainard y col., 2018, Kerro Dego y col., 2002). La adhesión a los epitelios es un proceso multifactorial que involucra tanto al huésped como a factores bacterianos (Pietrocola y Col. 2017). *S. aureus* secreta una gran variedad de adhesinas que favorecen su adherencia al tejido mamario, como es la proteína de unión a la fibronectina (FnBP), el fibrinógeno, el colágeno y la elastina (Oviedo-Boyso y col., 2007, Sutra y Poutrel, 1994). Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocen las estructuras del huésped facilitando la colonización, lo cual es seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hemolisinas, leuco

toxinas, enterotoxinas) y enzimas (serínproteasas, cisteínproteasas, lipasas, etc.) (Oviedo-Boyso y col., 2007).

Aunque *S. aureus* no se considera un patógeno intracelular, esta bacteria puede favorecer su absorción en células no fagocíticas. La capacidad de *S. aureus* de ser internalizada por células epiteliales y fagocíticas no profesionales, como células endoteliales y fibroblastos, se considera uno de los elementos esenciales en la patogénesis de *S. aureus*. Parte de los factores clave para la interacción bacteria-epitelio, es el ácido teicoico de *S. aureus* quien interactúa con SREC-I, un receptor “scavenger” tipo F en el epitelio nasal y mamario (Fowler y col., 2000). La expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina (fibronectin binding proteins (FnBPs) A y B, su unión con la fibronectina y su posterior reconocimiento por la integrina  $\alpha_5\beta_1$ ; conducen a la internalización de la bacteria en células epiteliales y endoteliales (Fowler y col., 2000, Pietrocola y col. 2017, Foster y col., 2014). Recientemente, se ha propuesto que la unión del factor de aglomeración A con la anexina A2, la cual es una proteína de unión a membrana regulada por calcio, puede mediar la invasión de *S. aureus* a las células epiteliales mamarias bovinas (Bonora y col., 2015). Como mecanismo de supervivencia, *S. aureus* secreta proteínas extracelulares como la proteína de adherencia extracelular (Eap) y la proteína de unión a fibrinógeno extracelular (Efb), las cuales favorecen la persistencia bacteriana mediante la evasión de la activación del complemento (Jin y col., 2004, Sutra y Poutrel, 1994). Por otro lado, la exposición de células epiteliales a la  $\alpha$  toxina del *S. aureus* (Hla), puede provocar alteraciones en la concentración citosólica de cationes monovalentes o divalentes provocando

cambios en la permeabilidad de la membrana celular a través de la alteración del flujo de calcio y provocando señalizaciones intracelulares erráticas de las vías que median en la reorganización de actina y la adherencia de la matriz extracelular, dicho proceso altera la liberación de citocinas y quimiocinas y provoca la activación errática de vías de señalización intracelular como las MAPK (Eiffler y col. 2016).

Esta bacteria también cuenta con enzimas coagulasa y colagenasa que ayudan a la evasión del sistema inmune (Kerro Deogo y col., 2002), así como la producción de superantígenos y toxinas que dañan las membranas del tejido epitelial (Peton y Le Loir, 2014, Oviedo-Boyso y col., 2007). Algunas moléculas secretadas por *S. aureus* pueden unirse e inhibir las proteasas de serinas de los neutrófilos, que son importantes para varias funciones, incluida la regulación de la formación de trampas extracelulares (Pietrocola y Col. 2017). Esta red regulatoria es la clave en la patogénesis de la infección por *S. aureus* que conduce a la cronicidad de la enfermedad y que, al mismo tiempo permite la adaptación del microorganismo a los cambios del medio ambiente durante el curso de la infección, así como a su supervivencia y persistencia intracelular.

La cronicidad de las infecciones es uno de los distintos mecanismos de resistencia bacteriana, el cual está relacionado con la habilidad de los patógenos de internalizarse en células fagocíticas profesionales y no profesionales, como las células epiteliales mamarias bovinas (bMECs) (Scali, 2015, Zheng, 2016), evadiendo la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero (Spaan y col., 2013). La importancia de la cronicidad de la mastitis

por *S. aureus* radica en que esta bacteria comparte mecanismos de patogenicidad con cepas de origen humano y además un alto potencial de intercambiar genes de resistencia a antibióticos (Rainard y col., 2018).

### **Respuesta inmune de la glándula mamaria**

La mastitis bacteriana se produce cuando la respuesta inmune del huésped no logra impedir el establecimiento de una infección en el extremo del pezón y la posterior invasión bacteriana (Rainard y col., 2018, Kerro Deogo y col., 2002). La glándula mamaria tiene estructuras anatómicas que funcionan como barreras anatómicas a la infección bacteriana. El pezón, así como el canal del pezón son la primera línea de defensa de la glándula mamaria, el tapón de queratina localizado en el canal del pezón provee a la glándula mamaria una barrera tanto física como química a la penetración bacteriana y la roseta de Fustenberg en la parte más dorsal del seno papilar prevé un mecanismo de defensa físico mediante el control de las presiones intramamarias (Capuco y col., 1992). Las infecciones de la glándula mamaria inician con la invasión bacteriana en el ápice del pezón donde el número de bacterias aumenta progresivamente hasta que es imposible ser controlada y las bacterias migran al interior de pezón a través del canal del pezón, el tapón de queratina y la roseta de Furstenberg debido a una progresiva colonización o por cambios en la presión intramamaria principalmente al momento del proceso de ordeño (Rainard y col., 2018, Kerro Deogo y col., 2002). Las bacterias una vez que atraviesan el canal de pezón se localizan en la cisterna del pezón, de ahí difundirán a la cisterna de la glándula mamaria donde las bacterias pueden

colonizar el epitelio mamario y/o los ductos galactóforos evadiendo la respuesta celular y humoral de la glándula mamaria (Sordillo y Streicher, 2002). En esta ubicación, se sugiere que las células epiteliales a través del reconocimiento de patógenos por medio de receptores modulan la respuesta inmune y el proceso inflamatorio de la glándula mamaria en conjunto con los leucocitos inflamatorios presentes en la leche (Rainard and Riollot, 2006) lo que permite favorecer el mantenimiento de un ambiente estéril en el interior de la glándula mamaria; pero si la infección no es eliminada, el aumento del número de bacterias favorecerá el daño del epitelio mamario mediante la liberación de productos bacterianos, la liberación de enzimas y productos oxidativos por fagocitos durante la fagocitosis de organismos invasores la liberación de proteasas sanguíneas y citocinas liberadas durante la respuesta inmune (Zhao and Lacasse, 2002).

Tras la detección de invasión de patógenos en la glándula mamaria, los macrófagos y las células epiteliales liberan quimioatrayentes los cuales favorecen la migración de leucocitos, principalmente polimorfonucleares (PMN), desde la sangre hacia la glándula mamaria y aumentar sus proporciones desde un nivel basal de 5 a 25% hasta aproximadamente 90% del total de células en la leche (Zhao y Lacasse, 2008). Estos PMN son considerados la segunda línea de defensa de la glándula mamaria siendo crucial su presencia para la defensa del hospedero ante patógenos.

Un elemento crucial en la patogénesis de *S. aureus* es la resistencia a la fagocitosis. Considerando que uno de los principales mecanismos de defensa

en la glándula mamaria es la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares (PMNL) (neutrófilos y macrófagos) y por células fagocíticas no profesionales como las células epiteliales alveolares que emplean mecanismos independientes a la opsonización (Sinha y Fraunholz, 2010, Strobel y col., 2016), *S. aureus* es capaz de desplegar varios mecanismos de evasión con el objetivo de interferir con la opsonización, fagocitosis y muerte intracelular (Rainard y col., 2018). Esta habilidad de *S. aureus* para sobrevivir al interior de las células fagocíticas profesionales o epiteliales, se considera un mecanismo de cronicidad que favorece la supervivencia de la bacteria en un medio o tejido independientemente de su replicación.

Los microorganismos que llegan al lumen alveolar son reconocidos por las células epiteliales a través receptores de reconocimiento de patrones (PRR) localizados en la superficie celular o de forma intracelular, los cuales unen moléculas bacterianas. Dichos ligandos son denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Oviedo-Boyso y col., 2007, Fu y col., 2013). Los receptores tipo Toll (TLRs) son uno de los PRR que reconocen los componentes conservados de patógenos, o patrones moleculares asociados a patógenos, e inician la respuesta inmune innata. Hasta ahora han sido descritos 10 diferentes TLRs en bovinos (McGuire y col., 2006, Yang y col., 2015), cada uno de los cuales tiene sus propios ligandos y características funcionales, aunque las cascadas de señalización río abajo de los TLRs parecen tener muchos puntos de convergencia. En general, la activación de TLRs por ligandos puede conducir a la activación de NF- $\kappa$ B (Yang y col., 2015). En la glándula mamaria se ha caracterizado la respuesta inmune de células



epiteliales alveolares a través de la activación de TLR2 por medio del reconocimiento de bacterias completas o del ácido lipoteicoico (LTA) y peptidoglicano (Fu y col., 2013) y del reconocimiento intracelular de remanentes de *S. aureus* por TLR2, TLR9, TLR11 y TLR12 (Gilbert y col., 2013, Susweta y col., 2014).

La estimulación vía TLRs enciende la activación de cascadas de señalización de genes inmunomoduladores seguida de la activación y translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo celular permitiendo en primera instancia la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL6, IL1 $\beta$ , IFNB, IL2, IL23A y quimiocinas CXCL18, CXCL1, CXCL2, CXCL3 CXCL8, CCL2, CCL20, entre otras (Gilbert y col., 2013, Wu y col., 2018). Además, también se da la modulación del proceso inflamatorio a través de la síntesis de citocinas anti-inflamatorias como del factor de crecimiento transformante beta 1 y 2 (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), lo que favorece la cronicidad de la infección, la generación de tejido fibroso posterior a las resolución del proceso inflamatorio y en consecuencia generar daño al parénquima glandular y afectando su función fisiológica (Wu y col., 2018). Por otra parte, *S. aureus* es rápidamente opsonizado por el complemento y anticuerpos para posteriormente ser fagocitado por los neutrófilos presentes en glándula mamaria, los cuales una vez activados generan trampas extracelulares (NETs) con el objetivo de prevenir la diseminación del patógeno, así como favorecer la producción de citocinas pro-inflamatorias (Spaan y col., 2013).

Para asegurar una respuesta inmune adecuada, es necesario la detección temprana de patógenos por medio del sistema inmune innato. Las células epiteliales mamarias (MECs) son células epiteliales cuboidales responsables de la síntesis, empaquetamiento y exportación de elementos lácteos incluidos caseínas, lípidos, vitaminas y minerales (Akers and Nickerson, 2011). Sin embargo las MECs tienen funciones como células inmunes innatas ya que pueden detectar PAMPs y activar mecanismos para prevenir las mastitis (Medina-Estrada y col., 2016). Los PAMPs son reconocidos a través receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) principalmente a través de los TLRs. Las células epiteliales mamarias bovinas (BMEC) desempeñan un papel relevante durante las infecciones intramamarias porque están en contacto íntimo con los patógenos responsables de la mastitis; reconocen *S. aureus* a través de TLRs y median un papel importante en la evasión de la respuesta inmune de las bacterias intracelulares como *S. aureus*, favoreciendo infecciones crónicas y subclínicas (Medina-Estrada y col., 2016).

### **Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Las funciones principales de los PMN son fagocitar a los patógenos y destruirlos a través sistemas actividad oxígeno dependiente y oxígeno independientes (Zhao y Lacasse, 2008). La activación de neutrófilos en conjunto con la activación de células epiteliales induce un proceso inflamatorio a través de la activación de distintas vías de señalización, en la cuales está incluida la generación de ROS (Bergstrom y col., 2015, Menzies and Ingham, 2006, Whelehan y col., 2011, Ezzat Alnakip y col., 2014). La producción de ROS se da en un proceso conocido como estallido respiratorio. Las ROS

representan una mezcla compleja y dinámica de moléculas altamente reactivas que difieren en su estabilidad, reactividad y permeabilidad a través de las membranas, además importantemente pueden eliminar los microorganismos internalizados. Las ROS son clásicamente definidos como aquellos metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos que poseen fuertes capacidades oxidantes; son perjudiciales para las células en altas concentraciones, pero a bajas concentraciones cumplen funciones de señalización complejas (Mittal y col., 2014). Como se menciona, son perjudiciales para los tejidos porque oxidan los componentes celulares de las proteínas, lípidos y dañan el ácido desoxirribonucleico (ADN). En "concentraciones fisiológicas", las ROS funcionan como moléculas de señalización que regulan el crecimiento, la adhesión, la diferenciación celular, la senescencia y la apoptosis (Thannickal y Fanburg, 2000). En condiciones de inflamación, el estrés oxidativo producido por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) conduce a la apertura de uniones inter-endoteliales y promueve la migración de células inflamatorias a través de la barrera endotelial. Una vez que las células inflamatorias migran, no solo ayudan en la eliminación de patógenos y partículas extrañas, también conducen a lesiones tisulares (Mittal y col., 2014). La producción celular de ROS se produce a partir de fuentes tanto enzimáticas como no enzimáticas y cualquier proteína o sistema enzimático de transferencia de electrones puede resultar en la formación de ROS como "subproductos" de las reacciones de transferencia de electrones. El potencial de las ROS mitocondriales para mediar en la señalización celular ha ganado una atención significativa en los últimos años, particularmente con respecto a la regulación de la apoptosis (Bergstrom y col., 2015).

Existe evidencia que sugiere que la producción de ROS mitocondrial puede funcionar como un inductor de la producción de el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y de la apoptosis inducida por interleucina (IL-1 $\beta$ ) (Thannickal y Fanburg, 2000). En el caso de TNF- $\alpha$ , los informes recientes sugieren que se requiere una fuente de ROS mitocondrial para activar a NF- $\kappa$ B (Thannickal y Fanburg, 2000) y desencadenar la producción activa de citocinas proinflamatorias. La activación de cascadas de señalización activa desordenes inflamatorios que pueden implicar procesos de inflamación persistente e incontrolado los cuales culminan en el daño tisular afectado la función (Paljetak y col., 2017).

### **Activación de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK)**

Las MAPK juegan un rol importante en la transducción de señales extracelulares a respuestas celulares. Las vías de señalización de las MAPK transmiten, amplifican e integran señales de una amplia gama de estímulos provocando respuestas fisiológicas apropiadas las cuales incluyen, la proliferación, la diferenciación y el desarrollo celular, la respuesta inflamatoria y la apoptosis en células de mamíferos (Zhang y Liu, 2002). La proliferación celular es un proceso complejo regulado principalmente por factores de crecimiento externos provistos por células adyacentes.

La acumulación excesiva de ROS induce la activación de las MAPK (P38 y ERK1/2), y conlleva a la producción de citocinas y quimiocinas

inflamatorias (Akira y col., 2006, Alva-Murillo y col., 2015, Lutzow y col., 2008). Las MAPK comprenden una gran familia de proteínas cinasas (PK) que incluye ERK1 (p44MAPK), ERK2 (p42MAPK), JNK (también conocido como PK activada por estrés), y p38 MAPKs. Las cascadas de activación de estas proteínas han mostrado tener un rol importante en la traducción de señales extracelulares para generar respuestas específicas por las células. Considerando que las vías MAPK median tanto señales activadas por estrés como por mitógenos, es de interés conocer la regulación redox de éstos ya que se ha demostrado que oxidantes exógenos son capaces de activar a ERK y p38 (Lutzow y col., 2008).

Si consideramos a los mediadores potenciales de las fosfoproteínas de tirosina de la actividad de IL-1 $\beta$ , las MAPK son de particular interés debido a que las MAPK requieren de la fosforilación de la tirosina para su actividad, son inducibles por citocinas y se les ha implicado en la regulación de la transcripción de genes involucrados en el proceso inflamatorio (Davis, 1993). Por otro lado, los miembros de los subgrupos ERK y JNK de la familia MAPK tienen masas moleculares de tamaño similar a las fosfoproteínas de tirosina que son inducidas por el tratamiento con IL-1 $\beta$  de células mesangiales humanas (Wilmer y col., 1997). Wilmer y colaboradores (1997) demostraron la activación de ERK2 y JNK a través de IL-1 $\beta$  en las células mesangiales humanas y esta activación fue inhibida por antioxidantes, sugiriendo que la producción de ROS estimuladas por ligando puede participar como mediadores de la activación de MAPK (Wilmer y col., 1997).

- **Consecuencias fisiológicas del proceso inflamatorio**

La infección de la glándula mamaria provoca un proceso inflamatorio que induce la acumulación de ROS y la activación de MAPK en la glándula mamaria, alterando el metabolismo celular con la disminución de la síntesis de proteínas, aumenta la apoptosis celular y reduciendo la resistencia a la invasión de patógenos, que conducen a la alteración de la polaridad celular y determinan el destino celular (proliferación o muerte) (Reuter y col., 2010, Bae y col., 2017). La apoptosis celular puede causar daño tisular y disminución de la función fisiológica del tejido mamario (Zhao y Lacasse., 2008). La producción excesiva de ROS también promueve la infiltración de monocitos, lo que exacerba el proceso inflamatorio (Moloney y Cotter, 2018). Los neutrófilos pueden promover la lesión tisular y alterar la función mamaria, a través de la generación de metabolitos reactivos del oxígeno, es decir, a través del estallido respiratorio y la degranulación (Zhao y Lacasse., 2008). El estrés oxidativo puede dañar el DNA, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos e inducir daño al tejido. Por lo tanto, las células epiteliales de glándula mamaria sufren un daño que afecta su estructura anatómica y su función fisiológica. Como consecuencia de este proceso, se ha documentado la disminución en la síntesis de los elementos lácteos como la  $\alpha$  y  $\beta$  caseína (Anderson y col., 2007, Caroli y col., 2009).

## **Terapia farmacológica de un proceso de mastitis**

Aunque los mecanismos subyacentes al daño tisular durante la mastitis no se han delineado completamente, se busca que la intervención farmacológica bloquee la cascada proteolítica u oxidativa dentro de la glándula inflamada para reducir el daño tisular durante la mastitis. Hasta ahora, la mayor parte del trabajo en esta área se ha centrado en la reducción de los radicales libres, porque los resultados de las investigaciones que utilizan modelos *in vitro* indican que el LPS estimula el daño inducido por PMN en el epitelio mamario. células produciendo superóxido (Boulanger y col., 2002).

Los tratamientos tradicionales para combatir los casos de mastitis incluyen el uso de una amplia variedad de antibióticos y anti-inflamatorios con el objetivo de eliminar los patógenos que invaden el tejido mamario y disminuir el daño consecuente al proceso inflamatorio activado posterior al reconocimiento de patógenos. Algunos fármacos tienen actividad exclusivamente antibacteriana, que con su efecto eliminan a los patógenos causantes de infección y disminuyen el proceso inflamatorio, pero no así el daño del parénquima y tejido epitelial. Sin embargo, otro grupo de fármacos utilizados principalmente en medicina humana son los macrólidos, los cuales han mostrado actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora independientemente de su mecanismo básico de acción, como bactericidas o bacteriostáticos (Paljetak y col., 2017, Hao y col., 2015).

## Macrólidos.

Los macrólidos representan una diversa clase de productos naturales de policétidos y derivados semisintéticos (12 a 16 miembros) que se caracterizan por la presencia de un anillo de lactona macrocíclica altamente sustituible. El anillo de lactona normalmente se sustituye con uno o más restos de azúcar que contribuyen a las características químicas y biológicas generales (Paljetak y col., 2017). Los macrólidos se utilizan ampliamente tanto en medicina humana como en medicina veterinaria para tratar diferentes tipos de patologías incluida también la mastitis bovina (Rubin, 2004, Lopez-Boado y Rubin, 2008, Ou y col., 2008). Los macrólidos se clasifican según el número de átomos de carbono asociados a la aglicona (anillo de lactona sin restos de azúcar), en consecuencia, existen macrólidos pertenecientes al grupo de 14,15 y 16 átomos (ver cuadro 1) . Estos son antibióticos de amplio espectro con actividad antibacteriana contra cocos Gram-positivos, incluidos *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina, algunas bacterias Gram-negativas como *Bordetella*, *Campylobacter*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, y *Listeria* así como especies de clamidias y rickettsias (Paljetak y col., 2017).

Este grupo de antibióticos tiene la capacidad de difundir en las células, permitiendo una mayor eficiencia contra infecciones de microorganismos intracelulares. El mecanismo de acción de estos antibacterianos está mediada por la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, la interacción de macrólidos con la entrada del túnel peptídico y perturba la unión del peptidil-



ARNt (p-ARNt) (Mazzei y col., 1993). De esta manera, los macrólidos provocan la inhibición de la síntesis de proteínas afectando el crecimiento bacteriano. Generalmente, los macrólidos son bacteriostáticos contra bacterias de importancia clínica, pero en altas concentraciones pueden ser bactericidas contra microorganismos susceptibles a ellos (Paljetak y col., 2017). La resistencia bacteriana a macrólidos implica frecuentemente las alteraciones dentro del sitio objetivo, principalmente mutaciones en el ARNr 23S y las proteínas ribosómicas (Paljetak y col., 2017, Mazzei y col., 1993). El mecanismo de acción de los macrólidos se superpone con el mecanismo de acción y los sitios de unión con antibióticos estructuralmente diferentes como son la lincosamida (L) y la estreptogramina B (SB); en conjunto este grupo de antibióticos se denominan antibióticos MLSB (Macrólido, Lincosamida, Estreptogramina B). La importancia de este grupo de antibióticos radica en que la modificación de algún sitio de actividad causará simultáneamente resistencia bacteriana a múltiples antibióticos.

Aunque la efectividad de un fármaco depende del antibiótico y del tipo de célula en particular, los macrólidos tienen actividad intracelular y son agentes antiinfecciosos, además también han mostrado beneficios terapéuticos adicionales independientemente de su modo de acción primario. La acción antiinflamatoria e inmunomoduladora de los macrólidos se ha demostrado en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* en diferentes patologías, pero principalmente en enfermedades que afectan al sistema respiratorio en humanos como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FC) y el asma, así como el complejo respiratorio en medicina

veterinaria (Kocsis and Szabo, 2017, Hao y col., 2015, Lopez-Boado y Rubin, 2008).

Los mecanismos de acción de los macrólidos presentan una actividad anti-inflamatoria son aún desconocidos, pero se han propuesto que actúan a través de la inhibición de la actividad de células inmunes, modificando la producción de citocinas, la quimiotaxis, la desgranulación, el estrés oxidativo y la muerte celular, afectando diversos mecanismos moleculares y celulares (Paljetak y col., 2017, Lopez-Boado y Rubin, 2008). Por ejemplo, se ha descrito que los macrólidos alteran la quimiotaxis, migración y activación de los neutrófilos y macrófagos, así como ciertos mecanismos celulares que afectan la supervivencia de las células, induciendo la apoptosis celular de diversas estirpes celulares (Sevilla-Sanchez y col., 2010). Algunos macrólidos como la eritromicina, la claritromicina y la roxitromicina han demostrado su capacidad anti-inflamatoria al modular el estrés oxidativo mediante la disminución de la producción de estos factores (Borszcz y col., 2005, Zalewska-Kaszubska y Gorska, 2001). Otros reportes señalan que los macrólidos pueden disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-4, las cuales han sido claramente inhibidas en distintos modelos biológicos pero básicamente en tejido pulmonar, en lavados bronco-alveolares y son utilizados como terapia anti-inflamatoria en implantes dentales (Sevilla-Sanchez y col., 2010, Paljetak y col., 2017, Hao y col., 2015). Del mismo modo, TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  son inhibidas por ciertos grupos de macrólidos en distintos modelos biológicos y en humanos con la terapia de azitromicina (Cigana y col., 2007, Escalante y col., 2015).

Es importante señalar que diversos estudios indican que existe actividad anti-inflamatoria para los macrólidos de los grupos de 14 y 15 átomos de carbono, pero no existe ningún reporte que señale que esta propiedad sea capaz de desarrollarse por la familia de macrólidos de 16 átomos de carbono. Dentro de esta última familia se encuentra la tilmicosina, la cual es un agente antimicrobiano semisintético derivado de la tilosina, con una amplia actividad contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se utiliza con frecuencia en el tratamiento de la infección pulmonar en terneras, ovejas y recientemente para tratar la mastitis (Cao y col., 2006, Buret, 2010).

Grupo	Fármaco
14 átomos	Eritromicina Claritromicina Diritromicina, Roxitromicina
15 átomos	Azitromicina
16 átomos	Tilosina Tilmicosina Espiramicina

**CUADRO 1. Grupo de antibióticos macrólidos organizados según su característica de estructura química.**

## ANTECEDENTES

La tilmicosina se acumula dentro de diferentes tipos de células, incluidas fagocíticas, riñón, epitelio de colon (Buret, 2010, Stuart, 2007) y, aunque en concentraciones más bajas, también se acumula en células epiteliales de la glándula mamaria (Scorneaux and Shryock, 1999). Actualmente se conoce que la tilmicosina puede modular el proceso inflamatorio del tracto respiratorio tanto en cerdos como en bovinos, inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  (Lopez-Boado and Rubin, 2008, Ou y col., 2008). También, en macrófagos y células mononucleares de sangre periférica de ratón activados con lipopolisacárido (LPS), la tilmicosina ejerce un importante efecto anti-inflamatorio (Cao y col., 2006). Además, se ha observado que el tratamiento intramamario con la tilmicosina es efectivo en la eliminación de *S. aureus* de la glándula mamaria de bovinos (Dingwell y col., 2003). Interesantemente, con la administración parenteral de tilmicosina en vacas en lactación, se ha detectado que este fármaco alcanza niveles terapéuticos en leche suficientes para combatir contra *S. aureus* durante 7 días (Dingwell y col., 2003). La modificación de los vehículos utilizados en la preparación de las presentaciones farmacéuticas ha permitido generar una nueva preparación farmacéutica de tilmicosina. De esta manera, se ha observado que las concentraciones terapéuticas de tilmicosina en leche pueden durar 20 días más que la presentación común, y se considera que esta concentración puede prolongarse aun más en las vacas durante el período seco (Mendoza y col., 2016). Diversos estudios señalan la utilidad de la tilmicosina en la terapia parenteral de vaca seca con el objetivo de preservar la integridad del tejido

mamario mediante la inhibición del proceso inflamatorio y la eliminación del *S. aureus* (Mendoza y col., 2016, Mohammadsadegh, 2018). En este contexto, la tilmicosina ha mostrado un potente efecto contra las infecciones por *S. aureus* que llevan a manifestaciones clínicas con relevancia antiinflamatoria (Mendoza y col., 2016, Mohammadsadegh, 2018).

El estrés oxidativo excesivo disminuye la viabilidad de células epiteliales mamarias y altera sus funciones fisiológicas, incluida una disminución de la producción de caseína (CSN1 y CSN2) (Paape, 1995, Akers and Nickerson, 2011). Los estudios *in vitro* sugieren que los macrólidos protegen la explosión del oxidante inhibidor del epitelio bronquial y aumentan la tasa de apoptosis de los neutrófilos (Kohri K y col., 2000., De Diego A y col., 2013). También los macrólidos inhiben específicamente la expresión del gen de la NO sintasa de tipo II y, por consiguiente, reducen la producción de NO por los macrófagos alveolares pulmonares de rata después de la estimulación con LPS (Kohri K y col., 2000, Guet G., 2000) describió los efectos anti-inflamatorios de tilmicosina en macrófagos y neutrófilos de bovinos, así como el favorecimiento de la apoptosis en lugar de la necrosis en principalmente en el complejo respiratorio bovino, pero hasta ahora no se conoce si un efecto similar puede ocurrir en el epitelio mamario y el proceso de mastitis.

Aunque hay muchos informes sobre el potencial anti-inflamatorio de los macrólidos, el mecanismo subyacente por el cual los macrólidos regulan la inflamación de las vías respiratorias y la hipersecreción de moco no se han dilucidado. También es importante señalar que, a pesar de todos los beneficios

descritos, los mecanismos por los cuales la tilmicosina podría modular el proceso inflamatorio en la glándula mamaria son actualmente desconocidos.

## JUSTIFICACIÓN

Durante la inflamación generada por la mastitis, el proceso inflamatorio afecta la viabilidad y la función celular y afecta la homeostasis del epitelio glandular, principalmente la función de las células epiteliales alveolares, las cuales son encargadas de la síntesis de gran parte de los elementos lácteos. Este proceso induce la expresión de genes dentro del tejido, permitiendo la secreción de citocinas inflamatorias y la disminución de la síntesis de caseínas. De esta manera, la mastitis provoca la pérdida de la estructura del tejido y la disminución de la producción de leche hasta en un 45% (Goldammer y col., 2004, Christian Gray, 2005). Generalmente, el objetivo principal de la terapia de la mastitis es eliminar directamente al patógeno, pero también es importante conocer y contrarrestar la inflamación que se produce ante la infección. Los macrólidos como tilmicosina pueden reducir la inflamación a nivel de expresión de genes y restablecen la síntesis productiva de la glándula mamaria ante una infección, pero no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre este proceso. Debemos considerar que muchos de los efectos moleculares de los fármacos en procesos patológicos, no se conocen y que la búsqueda de terapias más específicas sigue siendo importante, de aquí que describir los mecanismos por los cuales la tilmicosina regula el proceso inflamatorio en la glándula mamaria con la repercusión en la actividad productiva de la misma es importante.

## HIPÓTESIS

La tilmicosina regula la respuesta inflamatoria inducida por *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias alveolares y preserva su función fisiológica de producción de caseínas.



## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la tilmicosina en el proceso inflamatorio y en la síntesis de caseínas por células epiteliales alveolares mamarias infectadas con *Staphylococcus aureus*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un modelo de cultivo primario de células de tejido mamario bovino y de células inmortalizadas alveolares mamarias bovinas (MAC-T).
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria de tilmicosina para la eliminación de *Staphylococcus aureus*.
3. Identificar la expresión de caseínas en células MAC-T pre-tratadas (PreTIL) y tratadas con Tilmicosina post-infección (TxTIL) tras la infección con *Staphylococcus aureus*.
4. Evaluar la producción de ROS en células MAC-T PreTIL y TxTIL tras la infección con *Staphylococcus aureus*.
5. Analizar la viabilidad de células MAC-T PreTIL y TxTIL tras la infección con *Staphylococcus aureus*.
6. Determinar la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  en células MAC-T PreTIL y TxTIL tras la infección con *Staphylococcus aureus*.
7. Evaluar las vías de señalización de MAPK en células MAC-T PreTIL durante la infección con *Staphylococcus aureus*.

## METODOLOGÍA

### ***Preparación de cultivo primario de células de tejido mamario bovino***

La generación del cultivo celular de tejido mamario se realizó a partir de muestras de tejido mamario obtenidas inmediatamente después del sacrificio del animal (15 minutos máximo) en el rastro Temamatla, en el Estado de México. Los animales que se utilizaron fueron vacas de la raza Holstein Friesian, de segunda lactancia. Las muestras obtenidas fueron porciones de tejido mamario de aproximadamente 30 gramos, las cuales fueron lavadas 3 veces con PBS que contenía gentamicina (100 mg/mL). El tejido fue transportado en PBS con gentamicina (100 mg/mL) a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

La digestión del tejido mamario se realizó mediante el uso de colagenasa en medio de cultivo celular (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, sigma-aldrich®). La preparación del medio de digestión se realizó pesando 11.3 mg de colagenasa tipo I la cual fue disuelta en 10 mL de medio de cultivo celular más 4 µL de una suspensión de colagenasa tipo IV (concentración final en el medio 0.04%) y 20 µL de DNasa (1000 U/mL). A continuación, en condiciones de esterilidad, el tejido fue cortado en porciones de 500 mg ± 10 mg, evitando el tejido graso. Las muestras se disgregaron con pinzas y bisturí hasta obtener porciones pequeñas (2-3 mg) y se colocaron en un tubo de fondo cónico con 5 mL de medio de digestión para incubarlas a 37°C por 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron filtradas

en rejilla de 100  $\mu\text{m}$  y la suspensión fue centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. El pellet obtenido fue lavado 3 veces con 2 mL de PBS y posteriormente se resuspendió con 2 mL de medio de cultivo. Por último, las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 6 pozos con medio de mantenimiento (MM) el cual contiene DMEM enriquecido con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hidrocortisona (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (Thermo Fisher Scientific) y 10% de Suero Fetal Bovino (FBS, Gibco®), hasta lograr una confluencia celular del 90%.

### ***Cultivo de Células Epiteliales Mamarias (MAC-T)***

Las células MAC-T fueron cultivadas en placas Petri (Corning–Costar) con medio compuesto por DMEM/F-12 Ham (DMEM/F-12K, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri) suplementado con 10% suero fetal bovino, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hidrocortisona, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B (Thermo Fisher Scientific) (medio de mantenimiento (MM)) a una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  y 37°C de temperatura.

### ***Análisis de la expresión de caseínas y citoqueratinas***

Para la inducción de la síntesis de caseínas, las células MAC-T y los cultivos primarios fueron cultivados en medio MM hasta lograr una confluencia del 80%, posteriormente las células fueron colectadas y colocadas en medio

lactogénico (ML) conformado de la siguiente manera: DMEM suplementado con 10% de SFB, 5 mg/L de insulina, 1 mg/L de hidrocortisona, 5  $\mu\text{mol/L}$  de ácido ascórbico (Thermo Fisher Scientific), 5 mmol/L de acetato de sodio (Thermo Fisher Scientific), 100 U/mL penicilina/estreptomicina, 1  $\mu\text{g/mL}$  progesterona (Thermo Fisher Scientific), 1  $\mu\text{g/mL}$  anfotericina B y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  prolactina (Sigma Aldrich), a una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  y 37°C por 24 horas. Después, 200,000 células fueron colocadas en tubos de ensayo de 12 x 75 mm. Las células fueron lavadas dos veces con 300  $\mu\text{L}$  de PBS, centrifugándolas a 12,000 rpm por 5 minutos para en seguida fijarlas y permeabilizarlas con 300  $\mu\text{L}$  de Phosphoflow Lyse/Fix 1x (BD Biosciences) a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, las células fueron bloqueadas con 10% de suero de cabra por 40 minutos a 4°C y tratadas con 0.1% de Triton X-100 por 20 minutos. Finalmente, se realizó la tinción con 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpos primarios anti-citoqueratina 18 diluido 1:100 (Abcam, Cambridge, UK) y anticuerpo anti-caseína diluido 1:200 (Abcam, Cambridge, UK) por 30 minutos a 4°C y después se incubó con los anticuerpos secundarios Alexa flúor 488 1:1000 para citoqueratina (Thermo Fisher Scientific) y Alexa fluor 647 (1:300 para caseína) (Thermo Fisher Scientific) durante 25 minutos a 4°C en oscuridad. La expresión de citoqueratina y caseínas fueron detectadas en el citómetro FACS Attune NxT Citómetro de enfoque acústico (Thermo Fisher Scientific).

### **Microscopía de fluorescencia**

Para realizar la evaluación de la expresión de proteínas en las células un total de  $2.0 \times 10^5$  células fueron adheridas a un cubreobjetos de vidrio de 20mm el cual fue tratado con una solución de poly-L-lisina (0.01%) o colágeno tipo IV (2mg/mL) e incubadas a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas en una placa para cultivo celular de 12 pozos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con MM. Los tratamientos con tilmicosina y las infecciones con *S. aureus* se realizaron como se describen más adelante. Las células fueron lavadas con tres veces con PBS y fijadas con paraformaldehido 4% en PBS tibio de reciente preparación por 40 minutos seguido de un bloqueo con una solución de BSA al 1%, 22.52 mg/mL glicina\* en PBST (PBS más 0.1% Tween 20) incubadas toda la noche a 4°C y permeabilizadas con Tritón X-100 0.1% por 20 minutos. Las células fueron lavadas con 2 mL de PBS frío por 5 min en agitación y teñidas con un anticuerpo primario anti-citoqueratina 18 (Abcam, Cambridge, UK) por 1 hora a temperatura ambiente y luego a 4°C overnight en una cámara húmeda, se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min e Incubaron las muestras con anticuerpo secundario Alexa flúor 488 F(ab')<sub>2</sub> goat anti-Alexa Fluor 488 (1/200) (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-caseína bovina (Abcam, Cambridge, UK) por 30 minutos a 4°C más una incubación con un anticuerpo secundario Alexa Flúor 647 goat anti-rabbit (H+L) IgG, (Thermo Fisher Scientific) (1/300) por 25 minutos a 4°C en oscuridad. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con 2 mL de PBS por 5 min en agitación y en oscuridad e incubaron las células con 300 µL de DAPI (0.1-1 µg/mL) por 5 min, se lavaron con 2 mL de PBS y se

montaron en portaobjetos con medio de montaje DAKO (Santa Clara, CA). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio invertido (Olympus IX71).

## ***Infecciones celulares***

### **Cultivo de *Staphylococcus aureus***

La bacteria que se utilizó en este estudio fue *Staphylococcus aureus* *subsp. aureus* Rosenbach 27543 de la American Type Culture Collection (ATCC) (*S. aureus*) aislada de un caso de mastitis clínica bovina. La bacteria fue cultivada en Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC) (BD Bioxon®), a 37°C toda la noche y los inóculos bacterianos fueron ajustados midiendo la densidad óptica de 620nm (OD 0.4 =  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL). La bacteria posteriormente fue congelada a -70°C en CICC con 10% de glicerol a una concentración de  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL. Previo al ensayo de infección, la bacteria se descongeló y colocó en CICC por 24 horas. En seguida la bacteria se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y el pellet fue resuspendido en 1 mL de 0.85% de NaCl para de inmediato realizar la infección celular.

### ***Actividad de tilmicosina en el crecimiento de Staphylococcus aureus***

Para analizar el efecto de tilmicosina sobre el crecimiento de *S. aureus*, en una placa de 96 pozos se colocaron  $2.0 \times 10^8$  UFC/pozo con caldo CICC que contenía o no 10 µg/mL de tilmicosina o 10 µg/mL gentamicina. El crecimiento bacteriano fue evaluado midiendo la densidad óptica a 620nm en un lector de placas multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) por diferentes

tiempos hasta las 24 horas. Los datos fueron graficados por la densidad óptica obtenida contra tiempo de incubación.

### ***Efecto de Tilmicosina durante la infección de MAC-T con Staphylococcus aureus***

Para evaluar el efecto de tilmicosina en la infección de células epiteliales mamarias bovinas con *S. aureus*, se sembraron  $5 \times 10^5$  MAC-T por pozo en una placa de 24 pozos (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) con 1 mL de medio de mantenimiento por 12 horas. Cuando las células lograron una confluencia del 80%, estas fueron tratadas con tilmicosina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de la siguiente manera; un grupo de células pre-tratadas por 12 horas (PreTIL), otro grupo de células tratadas por 2 horas post-infección (TxTIL) y un grupo control de células que no recibieron ningún tratamiento. El control de internalización bacteriana se realizó mediante un ensayo de protección con gentamicina desarrollado como se ha describe por Ochoa y colaboradores (Ochoa-Zarzosa y col., 2009). Después de los tratamientos correspondientes, las células fueron infectadas con una multiplicidad de infección (**MOI**) de 50 bacterias por célula durante 2 horas en una atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$  y 37 °C.

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas en medio de crecimiento con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina por 2 horas a 37 °C y una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ , con el fin de retirar las bacterias extracelulares. El grupo TxTIL en lugar de tratamiento con gentamicina recibió un tratamiento con tilmicosina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 2 horas. Pasado el tiempo, las células infectadas se lavaron 3

veces con PBS y fueron despegadas con 200  $\mu$ L de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), en seguida la tripsina fue inactivada con la adición de 500  $\mu$ L de MM/SFB 5%. El pellet celular fue colectado en tubos de 2 mL y las células recibieron dos lavados con PBS y posteriormente fueron lisadas con 250  $\mu$ L de agua. A continuación, las células fueron lisadas con 250  $\mu$ L de agua y diluidas 100 veces para evaluar la viabilidad bacteriana (unidades formadoras de colonias, UFC) con la técnica de plaqueo en agar Luria-Bertani (**LB**), el cual se realizó por triplicado.

La infección intracelular también se observó por microscopía confocal, realizando una tinción fluorescente de la bacteria con Carboxifluoresceína Ester Succinimidil (CEFSE) y los núcleos de MAC-T fueron teñidas con faloidina-rodamina y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Las preparaciones colocadas en medio de montaje y se analizaron en un microscopio confocal (Nikon A1R+ STORM).



### ***Determinación de la producción de ROS***

La producción de ROS fue determinada por la técnica de reducción de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) como se ha descrito previamente (Campillo-Navarro y col., 2017). Para este ensayo se utilizaron  $2.0 \times 10^5$  MAC-T, las cuales fueron sembradas en una placa de 24 pozos fueron infectadas y tratadas, como se describió previamente. Posteriormente, se agregó 20  $\mu$ l of NBT (1 mg/mL), (Sigma Aldrich) a cada uno de los pozos y la placa fue incubada a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> por 20 minutos. Para disolver el formazán formado, se adicionó a cada uno de los pozos 100  $\mu$ l de una mezcla compuesta por: 54  $\mu$ l de KOH 2M y 46  $\mu$ l de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich) Finalmente la solución de formazán fue transferida a una placa de 96 pozos para de inmediato medir la densidad óptica a 620nm en el espectrofotómetro (multiskan GO plate reader, Thermo Fisher Scientific).

### ***Efecto de Tilmicosina en la viabilidad de MAC-T***

La viabilidad celular fue determinada en una placa de 24 pozos con  $2.5 \times 10^5$  MAC-T por pozo, para en seguida infectarlas y tratarlas como se describió previamente. Las células fueron incubadas con 30  $\mu$ L de Zombie Nir™ Fixable Viability Kit (BioLegend, San Diego, CA.) (1:200) por 20 minutos a temperatura ambiente seguido de la fijación con el kit Fix/Perm (Tonbo Biosciences, San Diego, CA) por 1 hora. Después, las células fueron bloqueadas con una solución de PBS con 10% suero de cabra por 40 minutos a 4°C. Las muestras

fueron analizadas en un citómetro Attune NxT Acoustic Focusing (Thermo Fisher Scientific).

### ***Determinación de la producción de citocinas***

Las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) secretadas por las células fueron evaluadas por la técnica de ELISA. Para esta técnica se colocaron  $2.5 \times 10^5$  células por pozo en una placa de 48 pozos y los tratamientos e infecciones se realizaron como se describieron previamente. El sobrenadante celular fue colectado en los diferentes tiempos de incubación y las concentraciones de citocinas fueron medidas con los kits de ELISA bovina para IL-1 $\beta$  e IL-6 (Thermo Fisher Scientific) así como el TNF- $\alpha$  (Kingfisher Biotech, Inc, St Paul, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### ***Evaluación de la activación de MAPK***

La actividad de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) fosfo-p38 MAPK (p-P38) y fosfo-p44/42 MAPK (p-ERK 1/2) fueron determinadas en las células Pre-TIL. Inicialmente, las células incubadas con DMEM 0.2% SFB por 6 y 24 horas, para después tratarlas con tilmicosina (10  $\mu$ g/mL) por 12 horas y estimularlas con *S. aureus* (MOI 50) por 5 minutos. Como control positivo las células fueron tratadas con pervanadato (1 mM) por 20 minutos. Inmediatamente, los niveles de p-ERK y p-P38 fueron evaluados, fijando y permeabilizando a las células con buffer Lyse/Fix por 10 minutos y

seguida de una incubación con Perm Buffer II (BD Phosphoflow™) por 20 minutos a temperatura ambiente. Después las células fueron lavadas con solución de FACS y se colocaron 30 µL del anticuerpo anti-mouse CD16/32 (Fc block) por 30 minutos a 4°C. Nuevamente, las células se lavaron 2 veces con solución de FACS y el pellet fue resuspendido adicionando el anticuerpo correspondiente: dilución 1:200 para phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y dilución 1:800 del anticuerpo phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) por 30 minutos a 4°C. Finalmente, se agregó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 incubado por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para después fijar las células con 600 µL de 0.5% de paraformaldehído. La fosforilación de las MAPK fue analizada por FACS en el citómetro Attune NxT Acoustic Focusing .

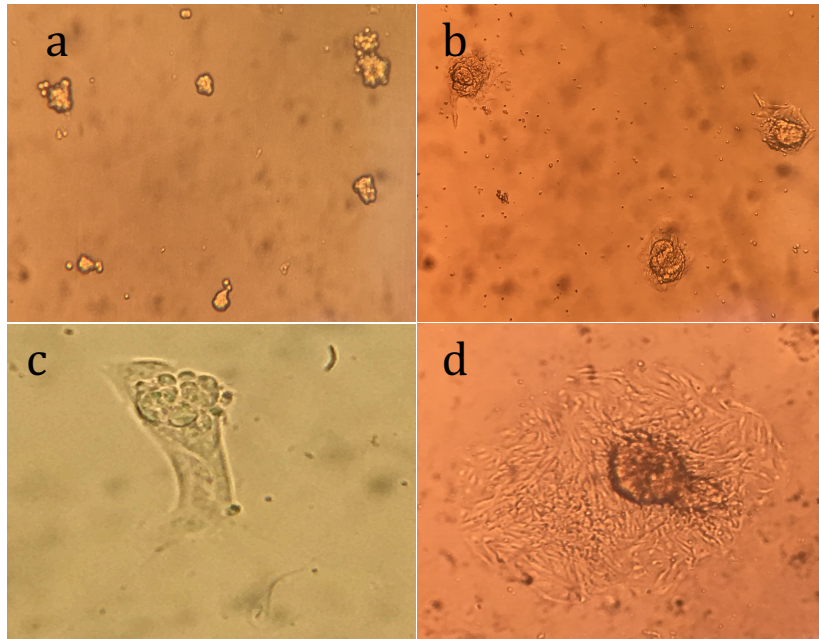
### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos fueron de tres experimentos independientes cada uno realizado por triplicado y analizados por la prueba de ANOVA y una prueba comparativa entre grupos por vía de Tukey. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software GraphPrism 6.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Los resultados presentados son reportados como el promedio  $\pm$  el error estándar (SEM). Los datos con  $P < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### ***Generación de cultivos primarios de tejido epitelial mamario***

Posterior a la degradación enzimática del tejido mamario se obtuvo un pellet celular el cual fue lavado con PBS y posteriormente sembradas en placas adherentes de 6 pozos con medio de crecimiento. A las 24 horas posteriores al sembrado, se observó la formación de esferoides semi-adherentes, así como otras células redondas flotantes (Figura 1a), a las 36 horas dichas esferas aumentaron de tamaño e iniciaban la migración de células a partir de ellas mismas (Figuras 1b-c). Al tercer día, a partir de los esferoides semi-flotantes, se logró observar la proliferación de células epiteliales las cuales logran una confluencia del 80% después de 10 días de cultivo (Figura 1d). Los resultados mostrados indican que el método por digestión enzimática es apto para la obtención de células con características morfológicas de tipo epitelial.

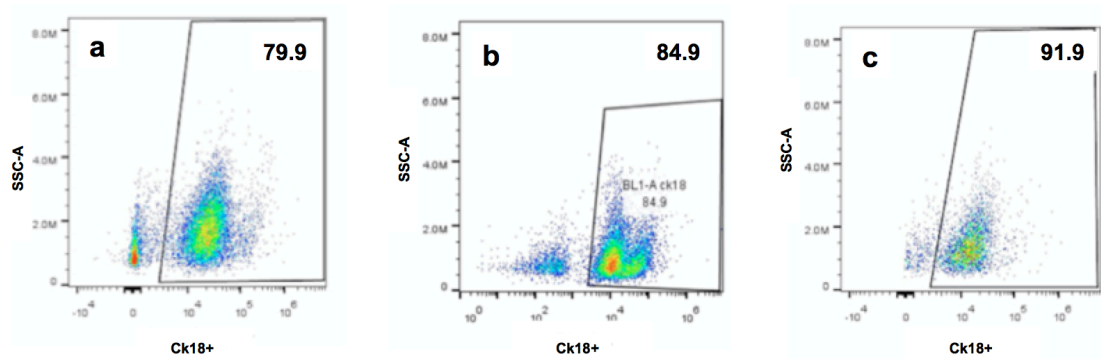


**Figura 1: Migración de células epiteliales a partir de esferoides.** Imágenes representativas de la proliferación celular a partir de esferoides bajo el estímulo hormonal que muestran la formación de esferas semi-adherentes (a), aumento de tamaño de las esferas (b), migración de células epiteliales adherentes (c) y la proliferación de células adherentes (d).

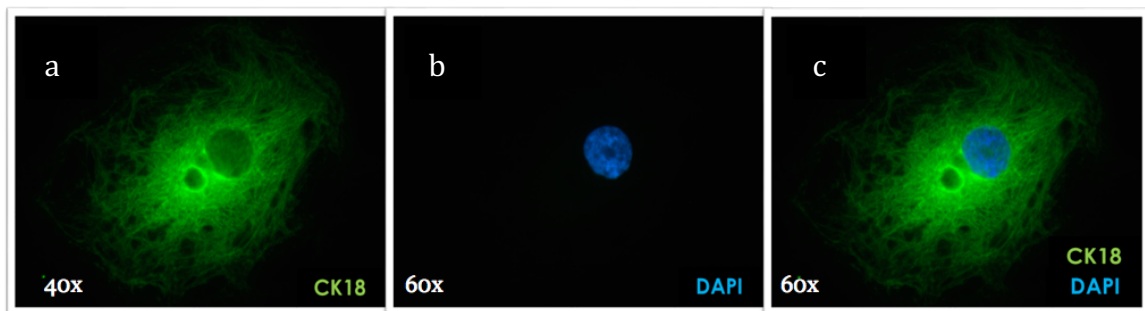
### ***Expresión de citoqueratina 18 (ck18) en cultivos primarios y células MAC-T.***

Las células epiteliales obtenidas de cultivos primarios y las células MAC-T fueron caracterizadas por la expresión de citoqueratina 18, mediante la técnica de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Para ello, las células, después de lograr una confluencia del 80% fueron teñidas un anticuerpo anti-citoqueratina 18. Mediante el análisis por citometría de flujo se identificó un porcentaje de pureza de alrededor del 80% desde la primera generación de los cultivos primarios, así como un incremento constante de este porcentaje entre generaciones posteriores obteniendo para la segunda generación un 84% y un 90% para las células de la tercera generación (Figura 2).

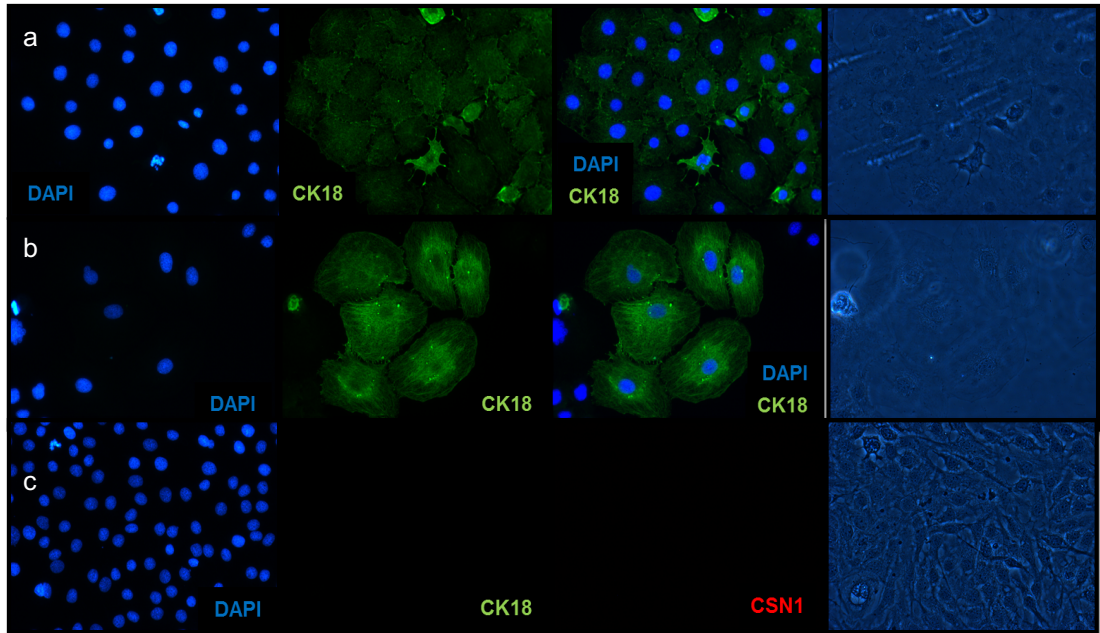
La expresión de citoqueratina 18 se confirmó mediante la técnica de microscopía de fluorescencia, donde se observó la extensa distribución intracelular de la proteína en las células de tercera generación (Figura. 3). Estos resultados muestran que los cultivos primarios están conformados por células epiteliales ck18+, presentando los cultivos de la tercera generación una mayor pureza respecto a las primeras generaciones. Para disminuir la variabilidad de resultados obtenidos, se logró obtener una línea de células inmortalizadas epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), la cual también fue caracterizada mediante la expresión de ck18, observándose que las células de esta línea son más estables en la expresión de ck18 (Figura 4).



**Figura 2: Porcentaje de células que expresan *ck18* por generaciones.** Paneles que muestran el porcentaje de células positivas a la expresión de *ck18* de células epiteliales mamarias de primera generación (a), segunda generación (b) y tercera generación (c).



**Figura 3. Células epiteliales expresan Citoqueratina 18.** Células epiteliales de cultivo primario de tercera generación fueron preparadas para microscopía de fluorescencia para detectar la expresión de *ck18* (verde) (a). Núcleo teñido con DAPI (azul) (b) y la superposición de imágenes (c).



**Figura 4. La línea celular MAC-T expresa citoqueratina 18.** Células MAC-T que fueron preparadas para microscopía de fluorescencia y teñidas para identificar la expresión de *ck18* (verde) (a, b) y controles de fluorescencia (c). Controles con solo anticuerpo secundario (c) (CK18, CSN1)).

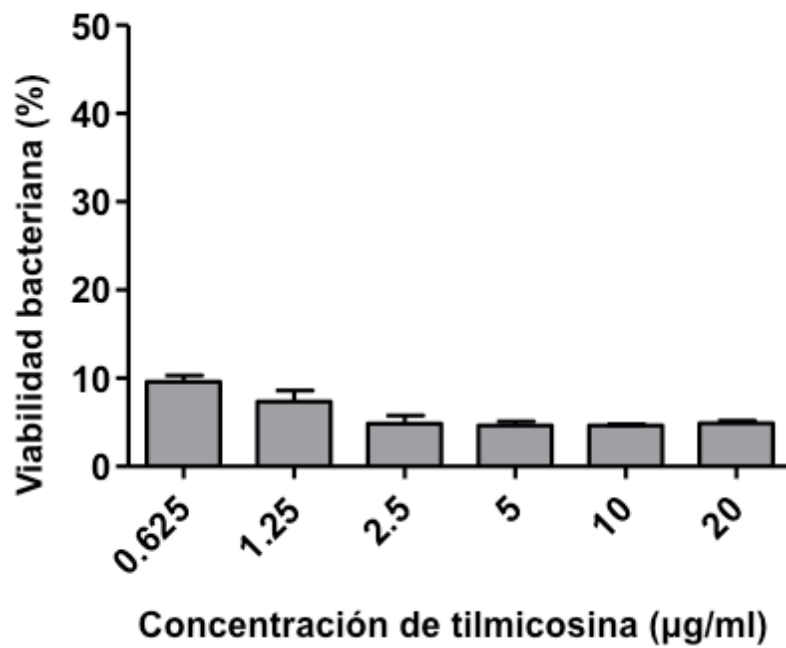


### **Actividad antimicrobiana de tilmicosina contra *Staphylococcus aureus***

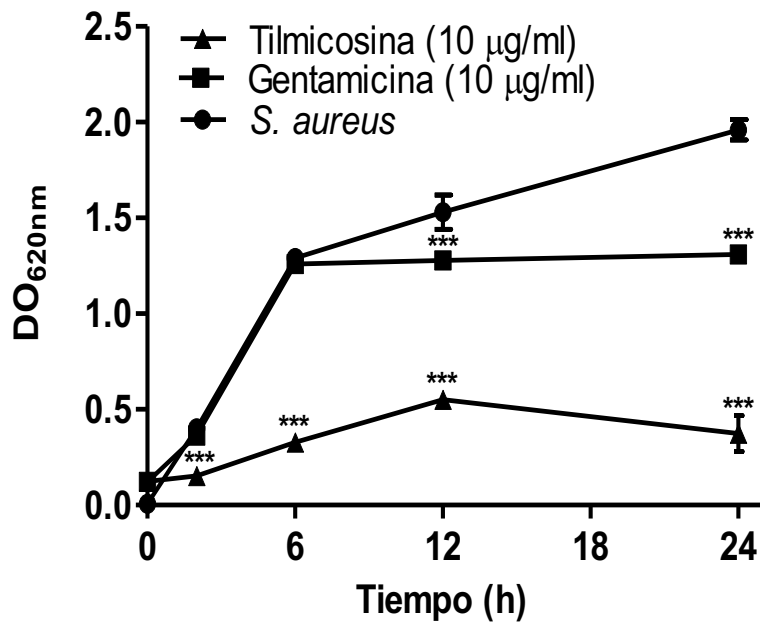
Con el objetivo de determinar la concentración efectiva de tilmicosina que tenga efecto sobre el crecimiento de *S. aureus*, realizamos un ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC) empleando concentraciones variables de tilmicosina que van de 0.625 a 20 µg/mL. El efecto antibacteriano de tilmicosina es evidente desde la dosis más baja de 0.625 µg/mL la cual inhibió el crecimiento bacteriano en 90 % en promedio hasta las 12 horas post-incubación. Las dosis comúnmente utilizadas en clínica que van de 10 a 20 µg/mL, resultaron altamente eficientes con un porcentaje del crecimiento bacteriano menor al 5 % hasta las 12 horas (Figura. 5). Posterior a la obtención de este resultado, se decidió utilizar la dosis de 10 µg/mL la cual es la dosis usada en campo para la terapia de mastitis bovina.

Para conocer si la dosis de 10 µg/mL seleccionada era realmente eficiente controlando el crecimiento, se estandarizó un ensayo de inhibición bacteriana por 24 horas donde se utilizó como control a gentamicina, a una dosis de 10 µg/mL. Este último antibiótico es un control clásico utilizado en ensayos de protección (Klein y col., 2017). Comparado con el grupo de células sin tratamiento (grupo control), la actividad bacteriostática de tilmicosina contra *S. aureus* es evidente y constante desde las 2 hasta las 24 horas de evaluación ( $P < 0.01$ ); este dato es interesante cuando se compara el resultado obtenido por gentamicina, la cual fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano por solo 12 horas durante la incubación ( $P < 0.01$ ) (Figura 6). Este resultado demuestra

que tilmicosina tiene un efecto antibacteriano en el crecimiento del *S. aureus* bajo las condiciones evaluadas en el laboratorio.



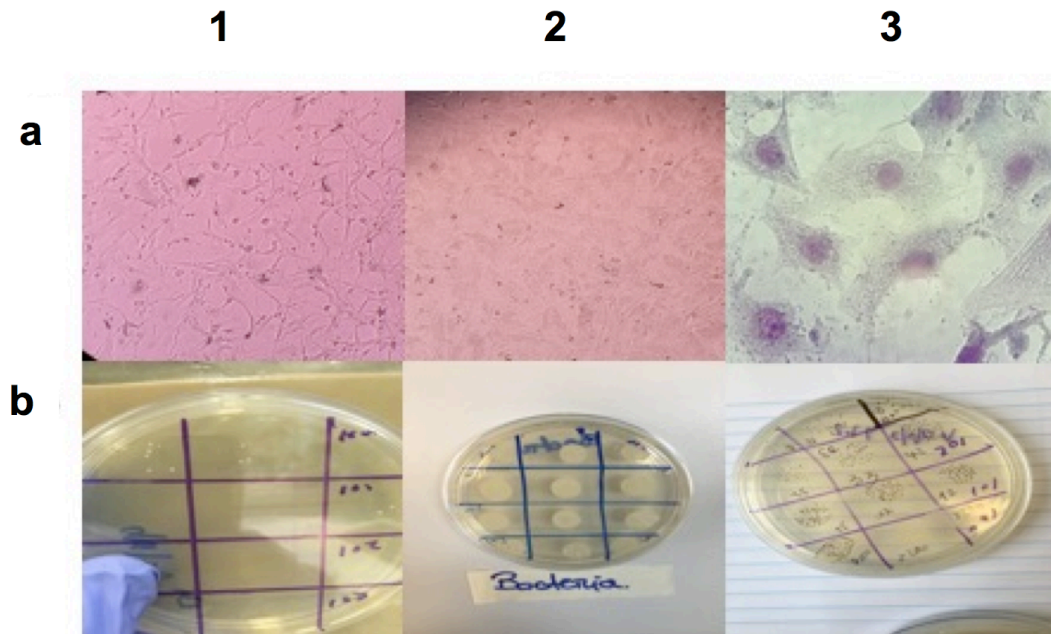
**Figura 5. Concentración mínima inhibitoria de tilmicosina sobre el crecimiento de *S. aureus*.** *S. aureus* fue cultivado en presencia de distintas concentraciones de tilmicosina, el porcentaje de viabilidad bacteriana presentado respecto al control de bacterias sin antibiótico.



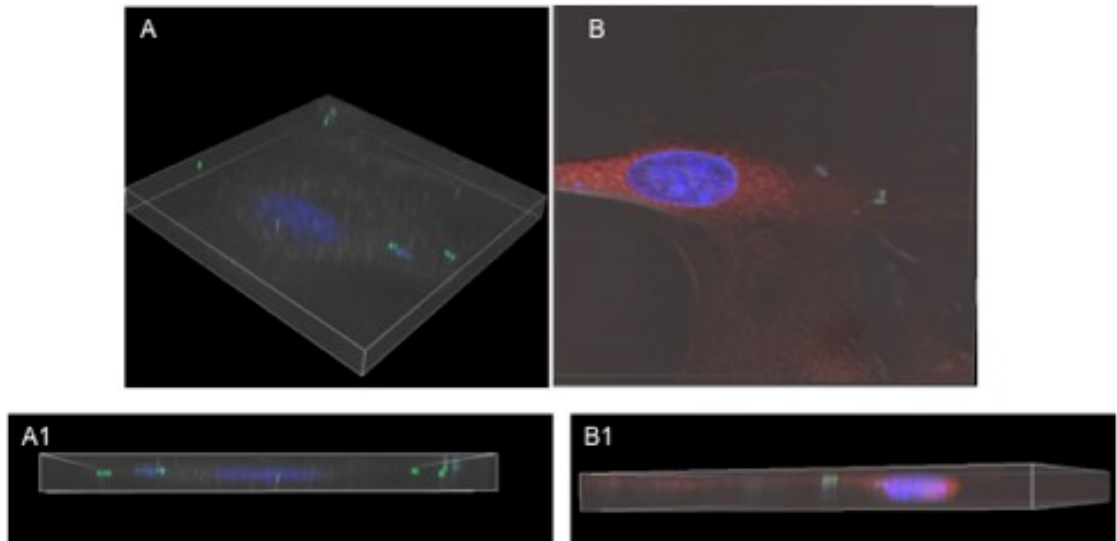
**Figura 6. Tilmicosina ejerce actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* mejor que gentamicina.**  $2 \times 10^8$  *S. aureus* fueron sembrados en CICC y fueron retados con 10 µg/mL de tilmicosina o gentamicina a diferentes tiempos donde por medio de densidad (OD) a 620 nm se evaluó el crecimiento bacteriano. Una \*\*\* $P < 0.01$  denota diferencia estadística significativa al comparar los datos con cultivos de *S. aureus* sin tratamientos.

## **Modelo de infección celular de *S. aureus* en células MAC-T**

Con el objetivo de determinar la capacidad de internalización de *S. aureus* por parte de células MAC-T, se infectaron células con una MOI de 50:1 y por medio de la técnica de plaqueo, se obtuvieron las UFC recuperadas de la infección intracelular de las células MAC-T. *S. aureus* es capaz de infectar a las células epiteliales de glándula mamaria posterior a 2 horas de contacto (Figura 7). Esta bacteria tiene una alta capacidad de sobrevivencia intracelular. La capacidad de *S. aureus* de infectar intracelularmente a las células fue también evaluada por microscopía confocal, en la cual se pudo observar bacterias al interiorizadas por las células y no sobre la membrana celular (Figura 8).



**Figura 7. Las células MAC-T tiene capacidad de internalizar al *Staphylococcus aureus*.** Células MAC-T en medio de mantenimiento sin presencia de antibióticos, imagen representativa de células MAC-T sin infectar (1a) (4x), células infectadas con *s. aureus* (MOI 50:1) (2a, 3a) (4x,40x), e imágenes representativas de la técnica de plaqueo de lisados celulares para la recuperación de bacterias intracelulares (1b-3b).

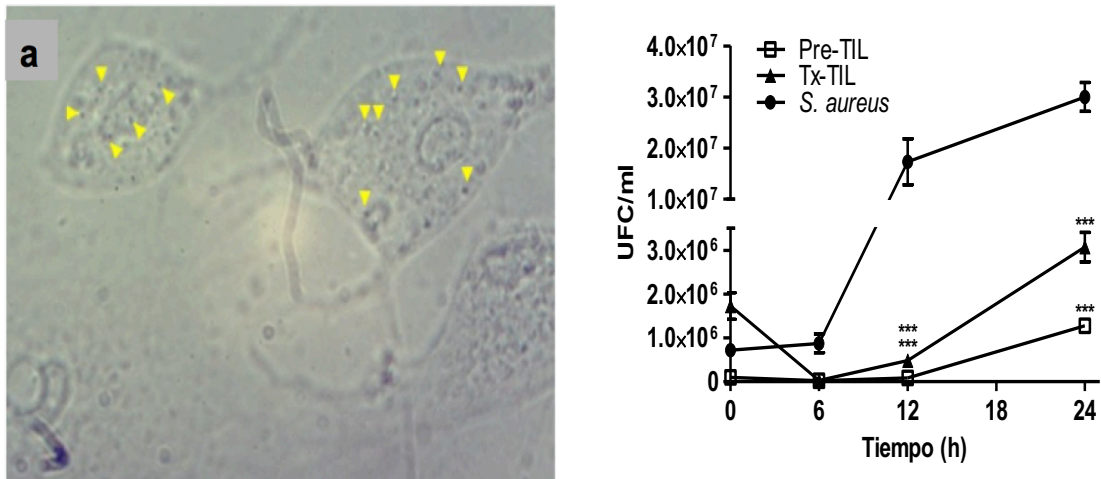


**Figura 8. *Staphylococcus aureus* es internalizado por células epiteliales mamarias.** Tinción fluorescente de *Staphylococcus aureus* con CFSE (MOI de 50:1) que tienen capacidad de internalizarse en células epiteliales mamarias bovinas teñidas con faloidina-rodaminada en matriz de poli-L-lisina al 0.01%. Los puntos verdes indican al *Staphylococcus aureus* en el interior de una célula epitelial (rojo) (a-b), imagen de la localización bacteriana en un perfil lateral de la célula epitelial (a1-b1). Núcleo teñido con DAPI (azul).

## **Efecto de Tilmicosina en la internalización de *S. aureus* en células MAC-T**

Para conocer el efecto que tiene el tratamiento de tilmicosina sobre la internalización de *S. aureus*, como un mecanismo de efecto protector, utilizamos como modelo a las células MAC-T. Para esto, se realizó un ensayo de protección con gentamicina para eliminar a las bacterias extracelulares contenidas en el medio de cultivo o aquellas bacterias adheridas a la membrana celular. Con este ensayo de protección, se evaluó el efecto de tilmicosina en la internalización del *S. aureus* en las células MAC-T. Para este experimento se utilizaron dos grupos de células; 1) un grupo donde las células fueron pre-tratadas con 10 µg/mL de tilmicosin por 12 horas previas a la infección con *S. aureus* (Pre-TIL) o 2) un grupo con células tratadas después de la infección por 2 horas con la misma concentración de tilmicosina. La evaluación de la infección fue realizada por la técnica de microscopía y la técnica de plaqueo de UFCs. Como parte de los resultados por medio de la microscopía electrónica pudimos observar que *S. aureus* fue interiorizado por las células MAC-T después de 2 horas de incubación (Figura 9a). Mediante la técnica de plaqueo, se recuperaron las UFCs y pudimos observar que los grupos de células que recibieron el tratamiento con tilmicosina (Pre-TIL y Tx-TIL) tuvieron una reducción significativa de las UFCs de *S. aureus* ( $P < 0.01$ ) en los tiempos evaluados (Figura 9b). Estos resultados nos ayudan a concluir que tilmicosina no previene la invasión celular por medio del *S. aureus*, pero si disminuye de manera significativa el crecimiento bacteriano intracelular de *S. aureus* en las células MAC-T.





**Figura 9. Tilmicosina disminuye la carga intracelular de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).** a) Células MAC-T en medio de mantenimiento sin tratamientos de tilmicosina, imagen representativa de células MAC-T infectadas con *s. aureus* (flechas indican *S. aureus* al interior de las células). b) Las células MAC-T fueron pretratadas con tilmicosin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 12 horas (Pre-TIL), tratadas por 2 horas post-infección (Tx-TIL) y un grupo de células sin tratamientos. Las células fueron infectadas con *S. aureus* (MOI 50:1) por 2 horas a 37°C bajo una atmosfera con 5% de  $\text{CO}_2$  e incubados por 0, 6, 12 y 24 horas. Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron determinadas para cada una de las condiciones experimentales. \*\*\*P<0.001 denota diferencias estadísticas significativas comparadas con células con *S. aureus*.

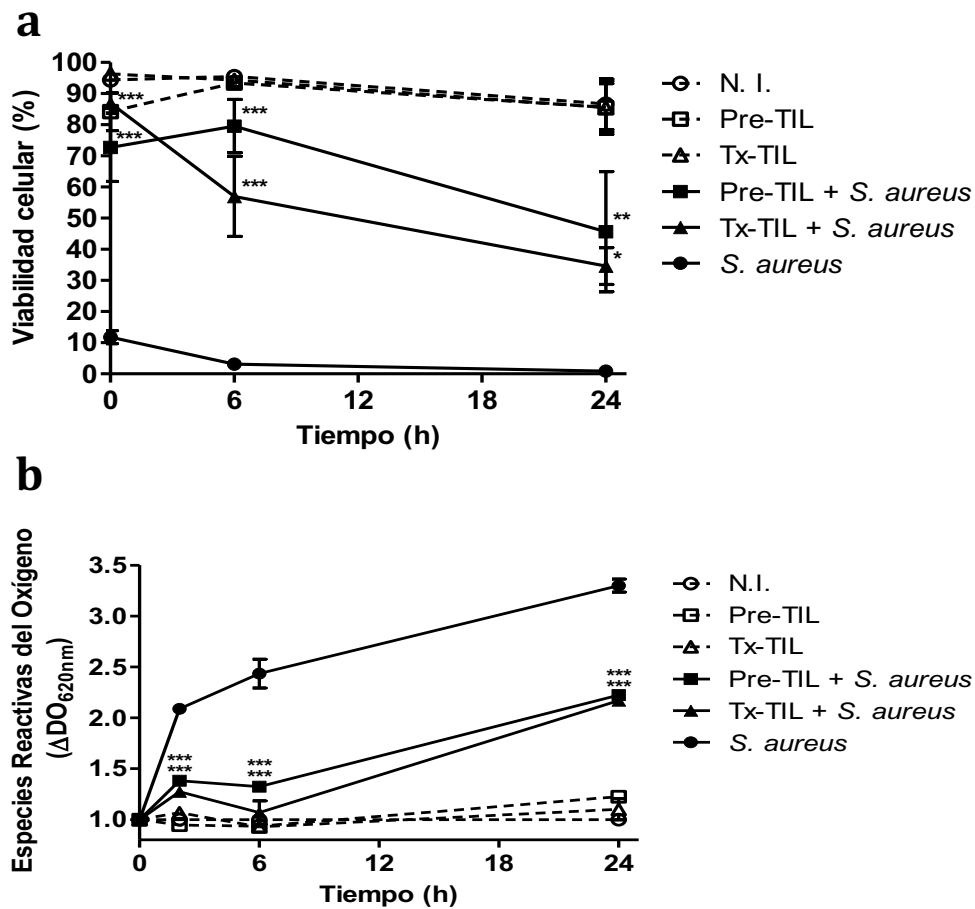
## **Tilmicosina mantiene la viabilidad celular de las células MAC-T durante la infección de *S. aureus***

Para conocer el efecto del fármaco sobre la viabilidad celular, se decidió evaluar el potencial citotóxico de tilmicosina en las células epiteliales. Para ello las células MAC-T fueron tratadas con una dosis de 10 µg/mL de tilmicosina y teñidas con el colorante de viabilidad Zombie NIR y analizadas por citometría de flujo. Los resultados observados en la Figura 10a, indican que la viabilidad de las células MAC-T es severamente afectada por la infección de *S. aureus*. Sin embargo, los tratamientos de tilmicosina no afectaron la viabilidad celular. Interesantemente, podemos observar que ambos tratamientos con tilmicosina disminuyen la muerte de células posterior a la infección siendo más evidente la sobrevivencia celular en el grupo que recibió la pre-incubación con el fármaco (Pre-TIL). Después de la infección de las células MAC-T, la viabilidad celular a las 6 horas fue mayor respecto al grupo celular que no recibió tratamientos con tilmicosina ( $P < 0.001$ ). Esta sobrevivencia celular se mantuvo hasta las 24 horas donde el rescate de la muerte celular fue de entre un 40 a un 50 % en los grupos que recibieron tilmicosina como tratamiento ( $P < 0.01$  (Pre-TIL) and  $P < 0.05$  (Tx-TIL)) (Figura 10a). Estos datos indican que tilmicosina ayuda a prevenir la muerte de células MAC-T durante la infección con *S. aureus*. El efecto observado ha sido definido como un efecto protector de tilmicosina contra la infección con *S. aureus*.

## **Tilmicosina modula la producción de ROS durante la infección con *S.***

### ***aureus***

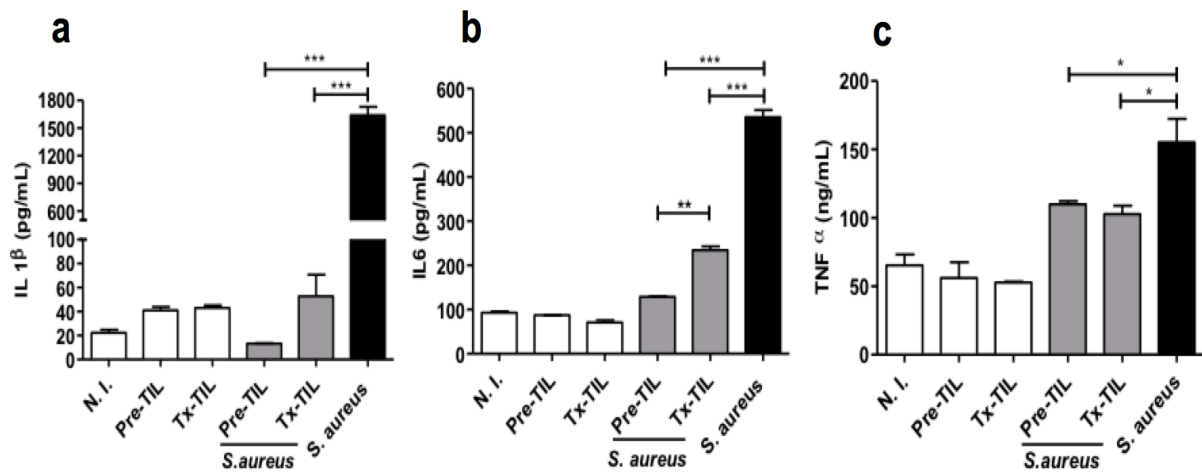
Para determinar si tilmicosina era capaz de modular el proceso inflamatorio en células MAC-T, la producción de ROS fue analizada bajo las mismas condiciones experimentales antes descritas. Comparado con el grupo de células no infectadas, cuando las células no recibieron tratamiento con tilmicosina y fueron infectadas con *S. aureus* se observó una alta producción de ROS ( $P < 0.001$ ) (Figura 10b). De la misma manera, comparado con el grupo de células MAC-T infectadas con *S. aureus* y no tratadas con tilmicosina, los grupos de células que recibieron tilmicosina como pre-tratamiento o como tratamiento post-infección (Pre-TIL o Tx-TIL) mostraron un decremento en la producción de ROS desde las 2-6 horas ( $P < 0.001$ ). A las 24 horas post-infección, estos grupos mostraron un ligero aumento en la producción de ROS comparado con los tiempos antes mencionados, pero en menor cantidad que el grupo de células infectadas sin tratamientos ( $P < 0.001$ ) (Figura 10b). Estos datos demuestran que tilmicosina es capaz de regular la producción de ROS en células MAC-T infectadas con *S. aureus*.



**Figura 10. Tilmicosina disminuye la producción de ROS y previene la muerte celular de las células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) infectadas con *Staphylococcus aureus*.** Las células MAC-T fueron pre-tratadas por 12 horas (Pre-TIL), tratadas por 2 horas posterior a la infección (Tx-TIL) o bien sin tratamiento con tilmicosina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células fueron infectadas con *S. aureus* (MOI 50:1) por 2 horas e incubadas por 0, 6, 12 y 24 horas. La producción de ROS fue determinada en cada condición. a) Imagen representativa de la producción de ROS en células MAC-T infectadas con *S. aureus* y tratadas con Tilmicosina. b) La viabilidad celular fue evaluada por medio de citometría de flujo por medio de la tinción con Zombie NIR Fixable Viability kit. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  muestras diferencias estadísticas comparadas con el grupo de células infectadas con *S. aureus* y sin tratamientos con tilmicosina.

## **Tilmicosina reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias en células MAC-T infectadas con *S. aureus***

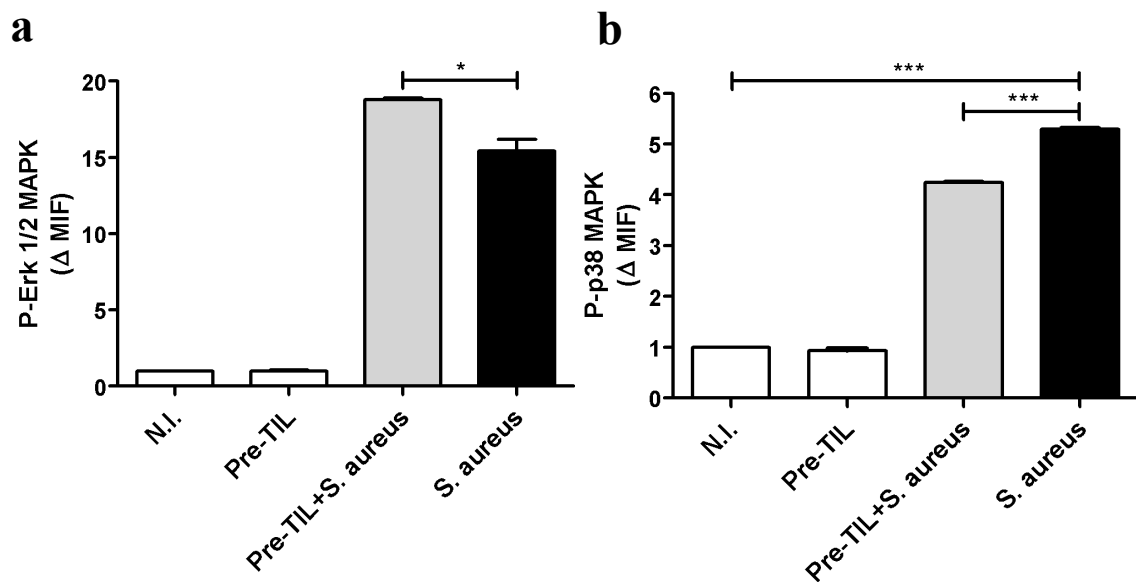
Debido a que observamos una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno, nos preguntamos si el efecto de tilmicosina tenía la capacidad de modular la producción de citocinas pro-inflamatorias secretadas por células MAC-T posterior a la infección con *S. aureus*. Comparado con el grupo de células sin infectar, la infección celular con el *S. aureus* induce una alta producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 ( $P < 0.001$ ) así como de TNF $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) en células MAC-T (Figura 11). Comparado con el grupo de células infectadas sin tratamientos, el grupo celular Tx-TIL después de la infección con *S. aureus* mostró un decremento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 ( $P < 0.001$ ) y del TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) (Figura 11 a, b, c). Interesantemente, el decremento de estas citocinas se vio potenciado en el grupo de células que fueron cultivadas y pretratadas con tilmicosina por 12 horas (Pre-TIL), en el cual se detectó un decremento estadísticamente significativo de IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $P < 0.01$ ), pero no así de TNF- $\alpha$  (Figura 11). Estos resultados demuestran que tilmicosina modula la producción de citocinas pro-inflamatorias de las células MAC-T inducidas por la infección con *S. aureus*.



**Figura 11. Tilmicosina disminuye la producción de citocinas proinflamatorias en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) infectadas con *Staphylococcus aureus*.** Las células MAC-T fueron pretratadas por 12 horas (Pre-TIL), tratadas por 2 horas post-infección (Tx-TIL) o células que no recibieron tratamiento con tilmicosina (10 µg/mL). Las células fueron infectadas con *S. aureus* a una MOI de 50:1 por 2 horas. Los sobrenadantes fueron colectados para determinar IL-6, IL-1-β and TNF-α por la técnica de ELISA. N.I., células sin infectar. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05 indican diferencias estadísticas significativas comparados con las células infectadas con *S. aureus* sin tratamiento con tilmicosina.

## **Tilmicosina modula la fosforilación de MAPK en células MAC-T estimuladas con *S. aureus***

Para analizar el mecanismo de por medio del cual tilmicosina puede reducir la producción de citocinas inflamatorias, decidimos evaluar los niveles de proteínas fosforiladas (p) de ERK1/2 (p-ERK1/2) y P38 (p-P38) en células MAC-T. Los niveles de p-ERK1/2 y p-P38 fueron evaluados solo en el grupo de células pre-tratadas con tilmicosina, 5 minutos después de la infección con *S. aureus*. Comparado con las células sin tratamiento, el pre-tratamiento con tilmicosina mostró un incremento de p-ERK1/2 ( $P < 0.05$ ) (Figura 12a). Por el contrario, también comparado con las células sin tratamiento, la tilmicosina disminuyó los niveles de p-P38 ( $P < 0.001$ ) en las células MAC-T posterior a la infección con *S. aureus* (Figura 12b). Estos resultados demuestran que tilmicosina puede modular diferencialmente la fosforilación de MAPK en células MAC-T estimuladas con *S. aureus*, lo cual está relacionado con el efecto descrito de p-ERK y P38 en la viabilidad celular y la producción de citocinas, respectivamente (Eldik, 2010, Shinkai y col., 2006).



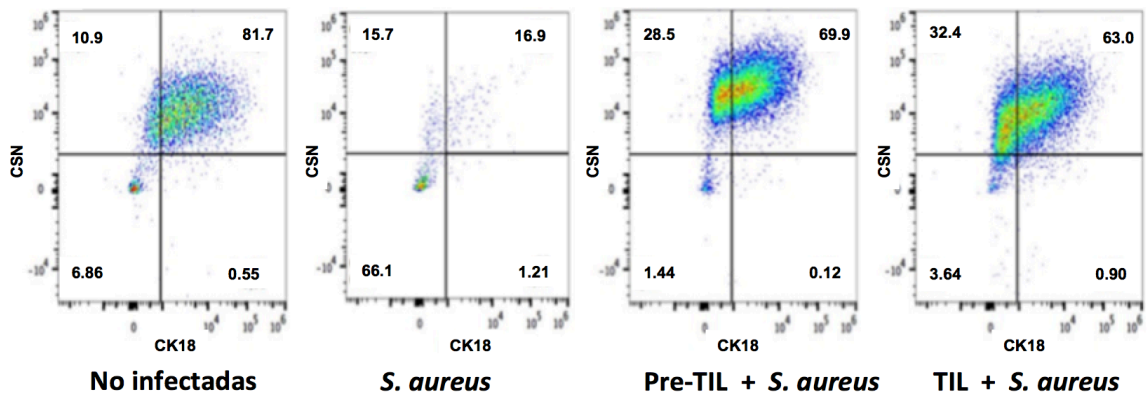
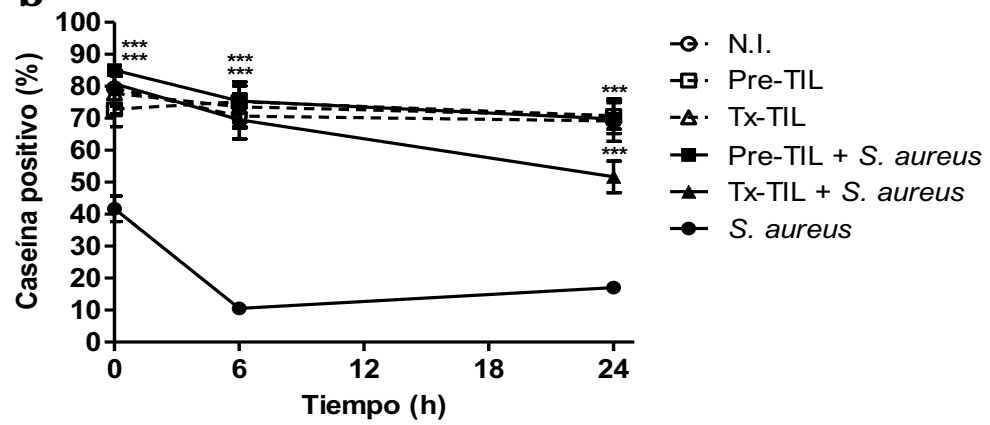
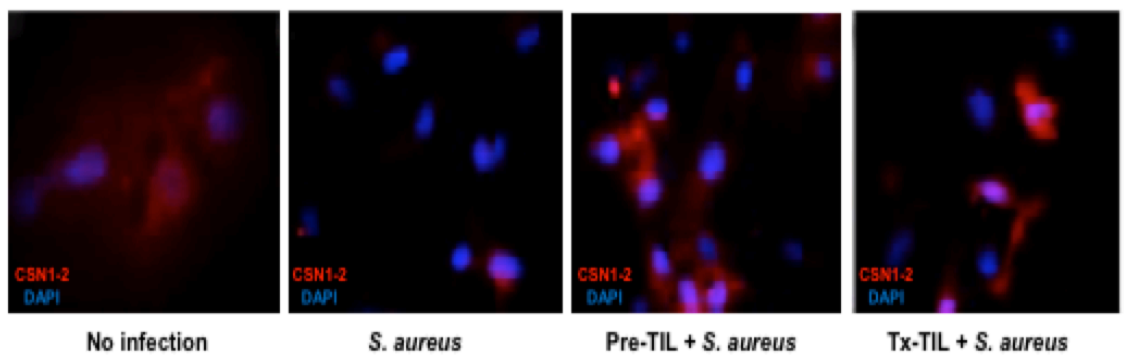
**Figura 12. Tilmicosina modula diferencialmente la fosforilación de MAPK en células MAC-T infectadas con *Staphylococcus aureus*.** Niveles de fosforilación de a) p-ERK 1/2 y b) p-P38 en células MAC-T pre-tratadas por 12 horas (Pre-TIL) o células no tratadas con tilmicosina (10 µg/mL) e infectadas con *S. aureus* (MOI 50:1). Posterior a la infección, las células fueron permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo anti-phospho ERK y un anti-phospho-P38 y los niveles de proteínas fosforiladas fueron determinados por FACS. Los datos representan incrementos relativos de la intensidad media de fluorescencia (MIF) de las respectivas fosfoproteínas respecto a las células no infectadas N.I). \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  indican diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo de células sin tratamiento e infectadas con *S. aureus*.



## **Tilmicosina mantiene la producción de caseínas en células MAC-T durante la infección con *S. aureus***

Como bien es sabido, una de las consecuencias más importantes de las infecciones crónicas en glándula mamaria por *S. aureus* es la reducción de la producción láctea y los sólidos totales en leche, principalmente la afección en la producción de caseínas. Por ende, al observar el efecto de tilmicosina sobre el proceso inflamatorio, decidimos evaluar el efecto de tilmicosina sobre la expresión intracelular de caseínas en células MAC-T posterior a la infección por *S. aureus*. La producción de caseínas fue evaluada por medio de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. En el grupo de células infectadas sin tratamiento de tilmicosina 24 horas posterior a la infección con *S. aureus* la población de células caseína positivas disminuyen significativamente comparado con el grupo control ( $P < 0.001$ ) (Figura 13a). De los grupos de células que recibieron los tratamientos con tilmicosina (Pre-TIL y Tx-TIL) se observó que la producción de caseínas fue sostenida hasta las 6 horas (Figura 13b); posteriormente, la producción de caseínas disminuye hasta el 55% a las 24 horas en el grupo Tx-TIL. La producción de caseínas fue sostenida significativamente hasta las 24 horas después de la infección en el grupo de células que recibieron el pre-tratamiento de tilmicosina (Pre-TIL) y fue que la de las células que fueron tratadas posterior a la infección (Tx-TIL) ( $P < 0.001$ ). Interesantemente, solo el grupo de células pre-tratadas fue capaz de rescatar la producción de caseínas de manera similar al mismo nivel de las células no infectadas (N.I). Este resultado indica que tilmicosina permite una constante

producción de caseínas por parte de las células MAC-T posterior a la infección con *S. aureus*. Por lo tanto, tilmicosina protege a las células epiteliales de la pérdida de al menos una de las funciones fisiológicas de la glándula mamaria como es la producción de caseínas.

**a****b****c**

**Figura 13. La producción de caseínas en células MAC-T infectadas con *Staphylococcus aureus* puede ser rescatada por el tratamiento de con Tilmicosina.** Expresión de caseínas en células MAC-T pre-tratadas por 12 horas (Pre-TIL), tratadas por 2 horas posterior a la infección (Tx-TIL) o células sin tratamiento con tilmicosina (10 µg/mL). Las células fueron infectadas con *S. aureus* (MOI 50) por 2 horas e incubadas por 0, 6, 12 y 24 horas y los niveles de caseína fueron medidos por FACS usando un anticuerpo anti- $\alpha$  and  $\beta$  caseína (CSN 1 & 2). a) Experimento representativo de la producción de caseínas a las 24 horas posterior a la infección. b) Resumen de experimentos de curso temporal de la expresión de caseínas (n=3), \*\*\*P<0.001 muestra las diferencias estadísticamente significativas en la producción de caseínas en los grupos Pre-TIL y Tx-TIL a las 24 horas post infección comparado con las células sin tratamientos e infectados con *S. aureus*. c) Imágenes de microscopía confocal representativas de la producción de caseínas de células MAC-T evaluadas con bajo diferentes condiciones experimentales. Núcleo: azul; Caseínas: rojo.

## DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una patología que a nivel mundial causa severos problemas en la salud animal y un gran impacto económico para la industria lechera a nivel mundial (Zhao and Lacasse, 2008, Viguier y col., 2009). La infección de la glándula mamaria por *S. aureus* tiene presentaciones clínicas variables pero por lo general cursa por un cuadro de mastitis subclínica que a lo largo del tiempo se tornan en infecciones recurrentes, conocidas como mastitis crónicas, que por lo general culminan como mastitis con infecciones persistentes (Matsunaga y col., 1993, Seegers y col., 2003). Estas características de infección se deben principalmente a la habilidad de la bacteria por internalizar en las células epiteliales mamarias. La internalización de las bacterias en las células epiteliales es parte de los distintos mecanismos de patogenicidad que la bacteria posee para el establecimiento de un proceso de mastitis. Este proceso puede ser modulado por diferentes factores como son factores ambientales, factores hormonales (prolactina, estradiol), factores nutricionales (ácidos grasos) o fármacos (Kerro Deogo y col., 2002, Gutierrez-Barroso y col., 2008).

El efecto anti-inflamatorio de los macrólidos ha sido reportado por distintos autores en distintas patologías incluidas las enfermedades respiratorias en humanos y animales, así como su efecto en casos clínicos de mastitis (Buret, 2010, Mohammadsadegh, 2018, Ou y col., 2008). Sin embargo, este efecto modulador se ha reportado para miembros de las familias 14c y

15c. En el presente estudio, se evidenció que tilmicosina tiene actividad, pero hasta ahora no existe evidencia de algún tipo de efecto inmunomoduladora para los miembros 16c. La tilmicosina (Rubin, 2004, Er y Yazar, 2012) mostró anti-microbiana contra *S. aureus*, disminuyendo el crecimiento bacteriano bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, la tilmicosina no fue capaz de inhibir la internalización bacteriana en las células MAC-T pero si disminuyó la carga bacteriana en las células MAC-T y reguló del proceso inflamatorio a través de la reducción de las especies reactivas del oxígeno y la producción de citocinas pro-inflamatorias. De manera interesante, también se demostró que este efecto se debe en parte a alteraciones en la fosforilación de las MAPK.

*Staphylococcus aureus* es capaz de invadir las células epiteliales contenidas en la glándula mamaria y causar mastitis subclínicas (Alva-Murillo y col., 2015, Shompole y col., 2003). La eficacia de tilmicosina contra *S. aureus* es controversial y algunos reportes actualmente indican altos niveles de resistencias bacterianas a tilmicosina, especialmente cuando es usada de forma parenteral para la terapia de vacas al secado (Ling y col., 2017). Por esta razón, decidimos examinar la actividad antibacteriana de la tilmicosina contra el crecimiento de *S. aureus*. En este estudio, se confirmó que el uso de tilmicosina a una concentración de 10 µg/mL aún presenta su clásica actividad bacteriostática (Van Bambeke y col., 1998) en contra de el crecimiento de *S. aureus* bajo las condiciones experimentales antes descritas. Esta actividad es estable hasta las 24 horas y es mucho mayor que el efecto causado por gentamicina a la misma concentración, aún considerando que los aminoglucósidos tienen una actividad bactericida más rápida en comparación

con los macrólidos (Van Bameke y col., 1998). La eficacia de tilmicosina sumado al efecto de estimulación leucocitaria posterior al tratamiento con antibióticos (PALE “post antibiotic leukocyte effect) reportado por los macrólidos, es importante ya que esto favorece que las bacterias sean más susceptibles a la fagocitosis o a la muerte intracelular dentro de leucocitos, cuando se encuentran en la fase post-antibiótica (Van Bambeke y col., 1998).

Considerando que como los macrólidos tiene la habilidad de difundir a través de las membranas celulares y una alta capacidad de acumularse intracelularmente en específico en los fagolisosomas (Van Bambeke y col., 1998) así como ejercer un efecto estimulación leucocitaria post-antibiótico o PALE; se hipotetizó que tilmicosina puede favorecer el mecanismo microbicida de las células MAC-T. Comparado con los grupos de células TX-TIL, nosotros encontramos que tilmicosina reduce la carga bacteriana de la invasión de *S. aureus* en MAC-T durante todos los tiempos evaluados. Interesantemente, los grupos de células que fueron pre-tratadas con tilmicosina (Pre-TIL) fue más eficiente y disminuyó la internalización de *S. aureus*. Este fenómeno puede explicarse por el hecho que los fármacos que se acumulan intracelularmente pueden modificar factores intracelulares mediante los cuales se puede incrementar o disminuir la actividad de estos antibióticos a nivel intracelular y de este modo poder modificar la respuesta de las células en contra de los microorganismos (Van Bambeke y col., 1998). La acumulación intracelular de antibióticos sugiere algún tipo de sinergismo entre el antibiótico y los neutrófilos lo cual se asocia con una mejor destrucción del patógeno por parte de los neutrófilos a través de varios mecanismos potenciales como son: (1) concentración adicional del antibiótico, (2) cooperación con los mecanismos de

muerte dependientes de oxígeno o independientes, (3) estimulación de los neutrófilos por productos liberados de las bacterias durante la pre-incubación, (4) estimulación directa de los neutrófilos por el antibiótico o (5) mejor ingestión debido a una modificación del requerimiento de opsonina que resulta de una exposición corta al antibiótico (Van der Auwera P., 1991).

Hoy en día, existen y se han evaluado diferentes estrategias generadas con el objetivo de inhibir la internalización de *S. aureus* al interior de las células epiteliales mamarias (Alva-Murillo y col., 2015, Alva-Murillo y col., 2017, Asli y col., 2017). A pesar de ello, la mayoría de estas estrategias biomédicas no son utilizadas para el tratamiento de las mastitis en distintas especies. El efecto observado con tilmicosina es similar al efecto mostrado por estradiol y el acetato de sodio los cuales han mostrado la reducción de en la internalización del *S. aureus* en un 50% o más (Medina-Estrada y col., 2016, Wei y col., 2017). Sin embargo, tilmicosina controló también el crecimiento bacteriano hasta por 24 horas posterior a la infección, mientras que con las otras estrategias los compuestos han controlado el crecimiento bacteriano por periodos cortos no mayores a 2 horas.

Los macrólidos presentan una alta penetración tisular y han mostrado que pueden disminuir el daño celular y pueden aumentar la apoptosis (Van Bambeke y col., 1998). Basado en lo antes reportado, se decidió evaluar el efecto de tilmicosina en la viabilidad de las células MAC-T. Sin embargo, de acuerdo con el análisis de viabilidad, ninguno de los tratamientos provocó toxicidad de las células MAC-T. Por el contrario, tilmicosina aumento la



viabilidad de las células infectadas hasta en un 50% en comparación con el grupo de células no infectadas, efecto que duró hasta las 24 horas post infección. Estos datos indican que tilmicosina ayuda a prevenir la muerte de células MAC-T durante la infección con *S. aureus*. Este efecto sobre la viabilidad celular puede ser atribuible a la modificación de mecanismos intracelulares una vez que el antibiótico logra concentraciones intracelulares.

La producción de leche en el ganado depende del número y la actividad de las células epiteliales mamarias (MEC) (Singh y col., 2010). Posterior a un proceso infeccioso, existe la pérdida de células por muerte celular y aumenta la proliferación de fibroblastos favoreciendo la formación de un proceso fibroso del parénquima celular lo cual reduce significativamente la capacidad de síntesis de los elementos lácteos (Akers and Nickerson, 2011, Nickerson, 2009).

El mantenimiento de la viabilidad celular es un resultado fisiológico deseado en el ganado lechero con el objetivo de preservar los altos niveles de producción y calidad de leche (Nickerson, 2009, Sharma and Jeong, 2013). Hoy en día existen muy pocos estudios que demuestren que el uso de alguna terapia tenga efecto en la disminución del daño estructural pos-mastitis de la glándula mamaria (Sharma and Jeong, 2013), sin embargo tilmicosina logró disminuir en un 50% la muerte celular causada por la infección con *S. aureus*. Por lo tanto, tilmicosina puede ser utilizada en la terapia del proceso de mastitis, con el objetivo de proteger a las células epiteliales del daño

ocasionado por el proceso inflamatorio de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Las especies productivas de oxígeno (ROS) son moléculas que están involucradas en el proceso inflamatorio las cuales son liberadas durante un proceso infeccioso como una herramienta para la eliminación de microorganismos intracelulares. Sin embargo, una excesiva producción de ROS puede inducir toxicidad y en procesos crónicos, la muerte celular (Moloney and Cotter, 2018, Son y col., 2013). Nuestros resultados demuestran que, comparado con el grupo de células sin infectar, tilmicosina disminuye la producción de ROS en las células MAC-T las cuales fueron producidas en respuesta a una infección por *S. aureus*; esta reducción de las especies reactivas del oxígeno pudiera estar relacionado con el incremento en la viabilidad celular mostrado en la Figura 9. Se ha demostrado que otros macrólidos disminuyen el estrés oxidativo a través de la inhibición de la expresión de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico en macrófagos (Iannaro y col., 2000). Además, se demostró que la tilmicosina modula la expresión de la abundancia de los genes COX-2 e iNOS en macrófagos de ratón y monocitos estimulados con LPS (Cao y col., 2006). Sin embargo, hasta ahora nada se sabía si la tilmicosina podía o no afectar la producción de ROS en las células epiteliales mamarias. La producción de ROS induce daño oxidativo del DNA, de los lípidos, las proteínas y otros componentes celulares y este daño es suficiente para inducir una transformación aberrante de las poblaciones celulares y desencadena el proceso de inflamación crónica. Este proceso inflamatorio puede ser

acompañado por el incremento de la producción de ROS a nivel tisular, el cual consecuentemente puede promover una respuesta inflamatoria del tejido (Li y col., 2017). Los resultados del presente trabajo demuestran que tilmicosina es capaz de regular la producción de ROS en las células epiteliales desde las 6 hasta la 24 horas posterior a la infección con *S. aureus*. Esta capacidad de modificar la producción de ROS puede explicar el resultado observado en la viabilidad celular observado en las células MAC-T tratadas con tilmicosina.

La modulación de la producción de ROS que tilmicosina ejerció sobre las células MAC-T, concuerda con el efecto observado en esta misma estirpe celular con el uso de aminoácidos como la N-acetil cisteína que modula la producción de ROS e inhibe la translocación nuclear de factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Bae y col., 2017). De igual manera, la taurina también produce una disminución de la producción de ROS, la expresión de mRNA de iNOS así como la producción de citocinas pro-inflamatorias en células MAC-T posterior al reto de infección con *S. aureus* (Zheng y col., 2016). Considerando la capacidad de tilmicosina sobre la inhibición de ROS y el efecto en la viabilidad celular, se hipotetizó que tilmicosina podría actuar como un “scavenger” de la producción de ROS durante la infección con *S. aureus*.

El efecto de la producción de citocinas pro-inflamatorias en la infección de *S. aureus* es controversial, ya que algunos autores han reportado un efecto inhibitorio de la infección por *S. aureus* sobre la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6 (Alva-Murillo y col., 2015; Alva-Murillo y col., 2017). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, la infección con *S. aureus*

estimuló la producción de citocinas pro-inflamatorias. Sobre este efecto, se encontró que tilmicosina disminuye la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  posterior a la infección con *S. aureus*, similar a lo reportado previamente por Cao y col., (2006) quien estimuló macrófagos y monocitos murinos con LPS y posteriormente fueron tratados con tilmicosina. Otras estrategias experimentales que incluyen los ácidos grasos como el butirato y el octanoato de sodio también han demostrado modulación de la producción de citocinas pro-inflamatorias posterior a la infección e invasión de bMECs con *S. aureus* a través de la activación celular por medio a través de las vías de señalización del TLR2 y MAPK (p38, JNK y ERK1/2), activando la respuesta inmune celular previo a la infección con *S. aureus* (Alva-Murillo y col., 2015, Alva-Murillo y col., 2017).

Como es sabido, por medio de la aplicación de agentes anti-oxidantes que evitan la acumulación de ROS se logra la inactivación de las MAPK en las células MAC-T y en consecuencia, se puede inhibir el proceso inflamatorio (Bae y col., 2017). Se decidió investigar las bases moleculares que subyacen al efecto de tilmicosina en la fosforilación de las MAPK después de la infección de las células MAC-T por *S. aureus*. Como se muestra en la Figura 5, el pre-tratamiento con tilmicosina incrementa la fosforilación de ERK posterior a la estimulación con *S. aureus*. Shinkai y col., (2007) reportó previamente sobre el efecto de macrólidos en las MAPK, mostró que el tratamiento de claritromicina en células epiteliales bronquiales humanas (NHBE) infectadas con *Pseudomonas aeruginosa*, favoreció la generación de altos niveles de p-ERK (Shinkai y col., 2007). Por otro lado, se ha reportado que altos niveles de p-

ERK están relacionados con la proliferación celular y la supervivencia celular, así como en modificar ya sea incrementando o disminuyendo el proceso de diferenciación celular (Shinkai y col., 2006, Moloney and Cotter, 2018). Bajo este contexto, se encontró que la estimulación de p-ERK por medio del pre-tratamiento de tilmicosina, está altamente correlacionado con el incremento de la viabilidad celular observado a las 6 horas posterior a la infección con *S. aureus* observado en la Figura 12a. Debido a la activación constitutiva de ERK, decrece la producción activa de citocinas pro-inflamatorias a lo largo del tiempo así como por medio la estimulación cruzada o indirecta entre las vías de transducción de señales con p38 MAPK que regula ERK (Shinkai y col., 2006)

Por otro lado, el proceso activado posterior a la activación de p38 culmina en el incremento de la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 a través de un mecanismo dependiente de la vía de MK2, mientras que las producción de IL-10 es dependiente de la vía de MSK 1/2 (Eldik, 2010). Los resultados obtenidos muestran que posterior a la estimulación con *S. aureus* el tratamiento con tilmicosina por un lado activa la fosforilación de ERK 1/2 pero al mismo tiempo es un inhibidor de p-P38 en células MAC-T (Figura 12b). Este fenómeno es similar a los reportado previamente por Shinkai M y col., (2007) quien demostró que posterior a la aplicación de un tratamiento de 10  $\mu$ g/mL de claritromicina en células epiteliales bronquiales, detectó una activación selectiva de la activación de p-ERK pero no así de p-P38. El resultado obtenido de la activación selectiva de MAPK por parte de tilmicosina puede explicar las reducciones de la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 por las células MAC-T infectadas con *S. aureus* después del tratamiento con tilmicosina. Por lo tanto, la tilmicosina

parece modular de manera diferencial la fosforilación de MAPK en células MAC-T estimuladas con *S. aureus*, que puede estar relacionada con el efecto reportado de p-ERK y P38 sobre la viabilidad celular versus la producción de citoquinas, respectivamente (Shinkai y col., 2006, Eldik, 2010).

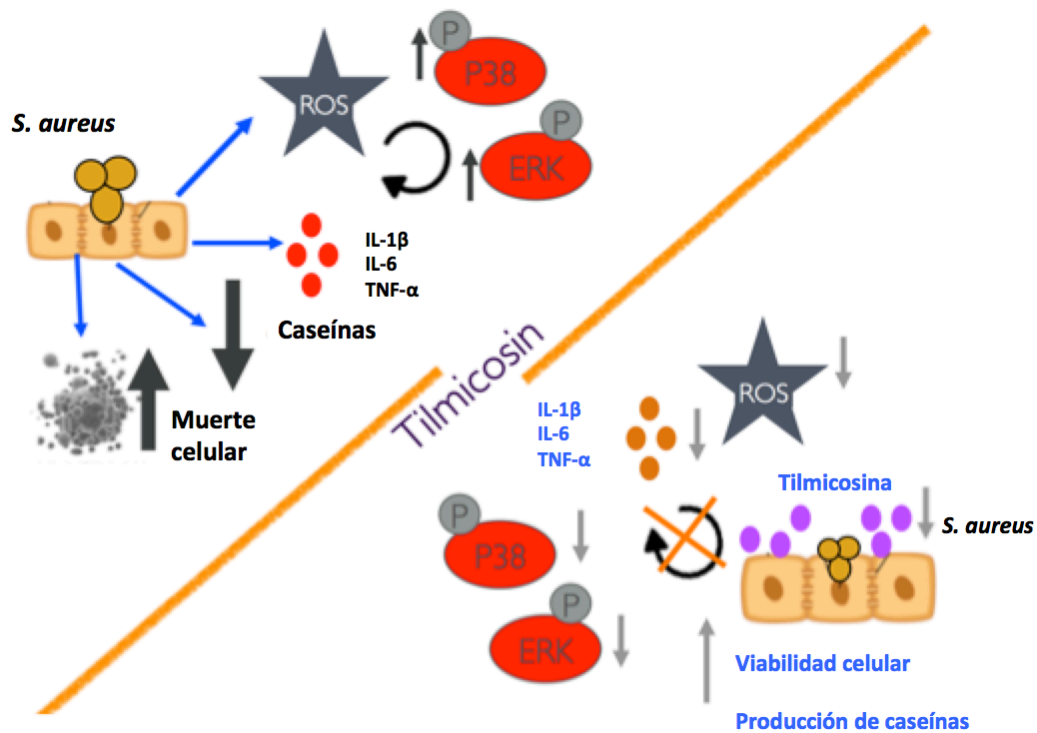
La mastitis por *S. aureus* impacta o afecta la integridad de las células epiteliales y, consecuentemente, la estructura alveolar de la glándula mamaria lo cual afecta la capacidad productiva del tejido, principalmente afecta o favorece la reducción de la producción y formación de micelas de caseínas y las vesículas de grasa, todo esto como resultado del daño al tejido mamario causado por el proceso inflamatorio posterior a un proceso infeccioso (Akers and Nickerson, 2011). Después de ser evaluado el efecto de tilmicosina sobre la fosforilación de MAPK y sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias, decidimos determinar si tilmicosina podría tener o modificar el proceso fisiológico y la función láctea de las células MAC-T por medio de la evaluación de la producción intracelular de caseínas. Los resultados obtenidos demuestran que tilmicosina permite una producción constante de caseínas por parte de las células MAC-T posterior a la infección por *S. aureus* indicando que tilmicosina protege a las células de la pérdida de una de las funciones fisiológicas importantes de las células epiteliales mamarias bovinas.

El pre-tratamiento de las células con tilmicosina fue más eficiente en la preservación de la producción de caseínas en comparación con el tratamiento 2 horas posterior a la infección. Este efecto fue constante hasta las 24 horas posteriores al tratamiento, sin embargo como sugiere un reporte previo

(Scorneaux y Shryock, 1999), no podemos predecir la posibilidad que tilmicosina estimule o favorezca la producción de caseínas con tratamientos prolongados de tilmicosina.

Es importante señalar que este es un trabajo que puntualiza y demuestra un efecto positivo de un tratamiento con antibióticos sobre la función fisiológica de la glándula mamaria y no solo modificando el proceso de infección celular. Considerando que las caseínas tienen un importante valor económico en la cadena de producción láctea, el efecto de tilmicosina parece ser económica y clínicamente relevante para un problema de salud animal que impacta en la salud humana.

En resumen, basados en los resultados obtenidos se propone un modelo en la Figura 14 en el cual se observa que tilmicosina afecta el crecimiento intracelular del *S. aureus* y ejerce un efecto anti-inflamatorio en la glándula mamaria por medio del decremento de la producción de ROS. Así mismo, mediante el aumento de la fosforilación de ERK y por otro lado la inhibición de P38 se favorece la viabilidad celular con una consecuente disminución de la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo cual puede prevenir o inhibir el mecanismo de retroalimentación positiva entre la activación de las MAPK y la producción de citocinas. La reducción de la inflamación protege a las células de la glándula mamaria del daño celular y ayuda a mantener la producción de caseínas.



**Figura 14. Modelo del mecanismo de acción putativo de tilmicosina durante la infección de células mamarias bovinas inmortalizadas (MAC-T) por *Staphylococcus aureus*.** Después del reconocimiento de *S. aureus* por las células epiteliales, el aumento en la producción de ROS provoca un aumento en la fosforilación de las MAPK (P38, ERK) favoreciendo un microambiente inflamatorio que conduce a una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias. Más allá de un cierto umbral, la alta producción de ROS se vuelve tóxica para las células, afectando funciones fisiológicas específicas y aumentando la muerte celular. El tratamiento con tilmicosina es capaz de inhibir la producción de ROS, lo que disminuye la fosforilación de MAPK y la producción de citocinas pro-inflamatorias, produciendo un efecto protector que promueve la supervivencia celular y preserva las funciones fisiológicas de la glándula mamaria. En estas condiciones, se preserva la producción de caseína.



## CONCLUSIONES

- Tilmicosina ejerce actividad anti-microbiana contra *Staphylococcus aureus* mejor que gentamicina.
- Tilmicosina disminuye la carga intracelular de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas.
- Tilmicosina disminuye la producción de ROS y previene la muerte de las células epiteliales mamarias bovinas durante la infección con *Staphylococcus aureus*.
- Tilmicosina afecta la producción de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  de las células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.
- Tilmicosina disminuyó la fosforilación ERK y aumento la fosforilación de P38 después de la infección de células epiteliales mamarias bovinas con *Staphylococcus aureus*.
- Tilmicosina recupera la producción de caseínas en células epiteliales mamarias bovinas infectadas con *Staphylococcus aureus*.

## CONCLUSION FINAL

La tilmicosina mostró un “efecto protector” en las células de la glándula mamaria ante la infección con *S. aureus*; este efecto es generado a través de la regulación de la respuesta inflamatoria, el incremento de la viabilidad celular y la preservación de la producción de caseínas. Esto refuerza la idea del uso tilmicosina para la terapia profiláctica contra la infección por *S. aureus* en ganado productor de leche, con el objetivo de reducir el daño al parénquima glandular causado por la infección y preservar la fisiología celular de la glándula mamaria, previendo disminuir las pérdidas económicas causadas por los costos de tratamientos, la baja en la producción láctea y la pérdida de elementos lácteos.

## PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de tilmicosina sobre la regulación de NF $\kappa$ B en células MAC-T.
- Evaluar la actividad biológica de exosomas provenientes de células MAC-T bajo distintos estímulos hormonales en la angiogénesis y regulación del microambiente inflamatorios, en un modelo de ratones bovinizados.
- Evaluar la actividad de exosomas liberados por células epiteliales de glándula mamaria bovina infectados con *S. aureus* en la regulación de la respuesta inmune de células de glándula mamaria bovinas vecinas.
- Evaluar el cargo de miRNAs en exosomas provenientes de células epiteliales de glándula mamaria bovina infectados con *S. aureus*.
- Evaluar el cargo de miRNAs en exosomas provenientes de células epiteliales de glándula mamaria bovina infectados con *S. aureus* tratadas con tilmicosina.

## ABREVIACIONES:

**MAC-T** = células inmortalizadas epiteliales mamarias

**ROS** = especies reactivas del oxígeno

**MAPK** = proteínas cinasas activados por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)

**FACS** = sorteo celular activado por fluorescencia (Fluorescent activated cell sorting)

**bMECs** = células epiteliales mamarias bovinas

**PAMPS** = patrones moleculares asociados a patógenos

**TLR** = receptores tipo TOLL

**CSN** = caseínas

**ATCC** = American type culture collection

**UFCs** = unidades formadoras de colonias

**Pre-TIL** = grupo de células pretratadas con tilmicosina por 12 h

**Tx-TIL** = Grupo de células tratadas con tilmicosin por 2 h

**MOI** = Multiplicidad de infección

**NBT** = Nitroblue tetrazolium

**SEM** = Error estándar

**MIC** = Concentración mínima inhibitoria

**PALE** = Efecto post-antibióticos de estimulación leucocitaria (Post-antibiotic leukocyte enhancement effect)

## REFERENCIAS

- Aghamohammadi, M., Haine, D., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Hogeveen, H., Keefe, G. P., Dufour, S. 2018. Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Front Vet Sci*, 5, 100.
- Akers, R. M., Nickerson, S. C. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16, 275-89.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Baez-Magana, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E. 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol Immunol*, 68, 445-55.
- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E. 2017. Sodium Octanoate Modulates the Innate Immune Response of Bovine Mammary Epithelial Cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 Pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 78.
- Anderson, S. M., Rudolph, M. C., Mcmanaman, J. L., Neville, M. C. 2007. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res*, 9, 204.
- Asfaw M, Negash A. 2017. Review on Impact of Bovine Mastitis in Dairy Production. *Advances in Biological Research* 11 (3): 126-131.
- Asli, A., Brouillette, E., Ster, C., Ghinet, M. G., Brzezinski, R., Lacasse, P., Jacques, M., Malouin, F. 2017. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One*, 12, e0176988.
- Bae, H., Jeong, C. H., Cheng, W. N., Hong, K., Seo, H. G., Han, S. G. 2017. Oxidative stress-induced inflammatory responses and effects of N-acetylcysteine in bovine mammary alveolar cells. *J Dairy Res*, 84, 418-425.
- Banchstetter A. D, Van Eldik L. J. 2010. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. *Aging Dis.* , 1, 199-211.
- Benites, N. R., Guerra, J. L., Melville, P. A., Da Costa, E. O. 2002. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49, 366-70.
- Bergstrom, B., Aune, M. H., Awuh, J. A., Kojen, J. F., Blix, K. J., Ryan, L., Flo, T. H., Mollnes, T. E., Espevik, T. Y Stenvik, J. 2015. TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN-beta Production via a TAK1-IKKbeta-IRF5 Signaling Pathway. *J Immunol*, 195, 1100-11.
- Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Degano, L. Y Carnier, P. 2010. Effects of beta-kappa-casein (CSN2-CSN3) haplotypes, beta-lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *J Dairy Sci*, 93, 3809-17.

- Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L. 2015. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34:1608. doi: 10.1038/onc.2014.462
- Borszcz, P. D., Befus, D., Moqbel, R., Sin, D. D., Adamko, D. J., Man, S. F. Y Lacy, P. 2005. Effects of clarithromycin on inflammatory cell mediator release and survival. *Chemotherapy*, 51, 206-10.
- Boulanger, V., X. Zhao, P. Lacasse. 2002. Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. *J. Dairy Sci.* 85:562–569.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R. Burlingame, B. 2012. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr*, 108 Suppl 2, S183-211.
- Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, 164, 116-28.
- Buret, A. G. 2010. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can J Vet Res*, 74, 1-10.
- Campillo-Navarro, M., Leyva-Paredes, K., Donis-Maturano, L., Gonzalez-Jimenez, M., Paredes-Vivas, Y., Cerbulo-Vazquez, A., Serafin-Lopez, J., Garcia-Perez, B., Ullrich, S. E., Flores-Romo, L., Perez-Tapia, S. M., Estrada-Parra, S., Estrada-Garcia, I., Chacon-Salinas, R. 2017. *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*, 222, 432-439.
- Cao, X. Y., Dong, M., Shen, J. Z., Wu, B. B., Wu, C. M., Du, X. D., Wang, Z., Qi, Y. T., Li, B. Y. 2006. Tilmicosin and tylosin have anti-inflammatory properties via modulation of COX-2 and iNOS gene expression and production of cytokines in LPS-induced macrophages and monocytes. *Int J Antimicrob Agents*, 27, 431-8.s
- Capuco, A. V., S. A. Bright, J. W. Pankey, D. L. Wood, R. H. Miller, J. Bitman. 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 75:2126–2130.
- Caroli, A. M., Chessa, S., Erhardt, G. J. 2009. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci*, 92, 5335-52.
- Cigana, C., Assael, B. M., Melotti, P. 2007. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 975-81.
- Coulon J.b, Gasqui P, Barnouin J, Ollier A, Pradel P, Pomiès D. 2002. Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Anim Res.* ;51:383–393
- Davis, R. J. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 268, 14553-6.
- De Diego, A., Milara, J., Martinez, E., Palop, M., León, M., y Cortijo, J. 2013. *Effects of Long-term Azithromycin Therapy on Airway Oxidative Stress Markers in non-Cystic Fibrosis bronchiectasis. Respirology*, n/a–n/a. doi:10.1111/resp.12130
- Dezhampanah, H., Esmaili, M. Y Hasani, L. 2018. Milk caseins as useful vehicle for delivery of dipyridamole drug. *J Biomol Struct Dyn*, 36, 1602-1616.
- Dingwell, R. T., Leslie, K. E., Duffield, T. F., Schukken, Y. H., Descoteaux, L., Keefe, G. P., Kelton, D. F., Lissemore, K. D., Shewfelt, W., Dick, P. Y Bagg, R. 2003. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for

- cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. *J Dairy Sci*, 86, 159-68.
- Eiffler, I, Behnke, J, Ziesemern S, Müller C, Hildebrandt J. P. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin-mediated cation entry depolarizes membrane potential and activates p38 MAP kinase in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311: L676–L685, 2016. doi:10.1152/ajplung.00090.2016.
- El-Agamy, E. I. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68, 64-72.
- Er, A., Yazar E. 2012. Effects of tylosin, tilmicosin and tulathromycin on inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid of lipopolysaccharide-induced lung injury. *Acta Vet Hung*, 60, 465-76.
- Escalante, M. G., Eubank, T. D., Leblebicioglu, B., Walters, J. D. 2015. Comparison of Azithromycin and Amoxicillin Before Dental Implant Placement: An Exploratory Study of Bioavailability and Resolution of Postoperative Inflammation. *J Periodontol*, 86, 1190-200.
- Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Bohme, K., Fernandez-No, I., Caamano-Antelo, S., Calo-Mata, P. Y Barros-Velazquez, J. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J Vet Med*, 2014, 659801.
- FAO 2004. Milk producer group resource book: a practical guide to assist milk producer groups, by Jurjen Draaijer. Rome.
- FAO 2008. Milk and dairy products [web page]. *Animal Production and Health Division, FAO, Rome*.
- FAOSTAT 2012. FAO statistical database. Available at: <http://faostat.fao.org/>.
- Fekete, AA, Givens, DI, Lovegrove, JA. 2013. The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: a review of evidence from human intervention studies. *Nutr Res Rev*, 26, 177-90.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A, Graber, HU. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci*, 85, 439-48.
- Foster, T. J, Geoghegan, J. A, Ganesh, V. K, Höök, M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 49–62. doi: 10.1038/nrmicro3161
- Fowler, T, Wann, E. R, Joh, D, Johansson, S, Foster, T. J, Hook, M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol*, 79, 672-9.
- Fu, Y, Zhou, E, Liu, Z, Li, F, Liang, D, Liu, B, Song, X, Zhao, F, Fen, X, Li, D, Cao, Y, Zhang, X, Zhang, N, Yang, Z. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 155, 245-52.
- Gray C., Donaldson L, Tellam R. L. 2005. Bovine mammary epithelial cells, initiators of innate immune response to mastitis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45, 757-761.
- Gilbert, FB, Cunha, P, Jensen, K, Glass, EJ, Foucras, G, Robert-Granie, C, Rupp, R, 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.
- Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Kata, S. R. Y Seyfert, H. M. 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, 174-85.
- Gutierrez-Barroso, A., Anaya-Lopez, J. L., Lara-Zarate, L., Loeza-Lara, P. D., Lopez-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A. 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 121, 113-22.
- Hao, M., Lin, J., Shu, J., Zhang, X., Luo, Q., Pan, L., Guo, J. 2015. Clarithromycin might attenuate the airway inflammation of smoke-exposed asthmatic mice via affecting HDAC2. *J Thorac Dis*, 7, 1189-97.
- Haug, A., Hostmark, A. T., Harstad, O. M. 2007. Bovine milk in human nutrition- a review. *Lipids Health Dis*, 6, 25.
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H. Y Thorn, D. C. 2013. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. *J Dairy Sci*, 96, 6127-46.
- Huijps, K., Lam, T. J., Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res*, 75, 113-20.
- Ianaro, A., Ialenti, A., Maffia, P., Sautebin, L., Rombola, L., Carnuccio, R., Iuvone, T., D'acquisto, F., Di Rosa, M. 2000. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther*, 292, 156-63.
- Jenkins, T. C., Mcguire, M. A. 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J Dairy Sci*, 89, 1302-10.
- Jensen, K., Gunther, J., Talbot, R., Petzl, W., Zerbe, H., Schuberth, H. J., Seyfert, H. M., Glass, E. J. 2013. *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics*, 14, 36.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., Tarkowski, A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*, 172, 1169-76.
- Keane. O. M. Symposium review: Intramammary infections Major pathogens and strain-associated complexity. *J. Dairy Sci.* 102:1–14 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15326>
- Kerro Deigo, O., Van Dijk, J. E., Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q*, 24, 181-98.
- Klein, J. A., Powers, T. R., Knodler, L. A. 2017. Measurement of *Salmonella enterica* Internalization and Vacuole Lysis in Epithelial Cells. *Methods Mol Biol*, 1519, 285-296.
- Kocsis, B., Szabo, D. 2017. New treatment options for lower respiratory tract infections. *Expert Opin Pharmacother*, 18, 1345-1355.
- Kohri K, Tamaoki J, Kondo M. 2000; Macrolide antibiotics inhibit nitric oxide generation by rat pulmonary alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* 15: 62–7.



- Li, L., Chen, J., Xiong, G., St Clair, D. K., Xu, W., Xu, R. 2017. Increased ROS production in non-polarized mammary epithelial cells induces monocyte infiltration in 3D culture. *J Cell Sci*, 130, 190-202.
- Ling, Z., Yonghong, L., Changqing, S., Junfeng, L., Li, Z., Chunyu, J., Xianqiang, L. 2017. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of tilmicosin- and florfenicol-loaded hydrogenated castor oil-solid lipid nanoparticles. *J Vet Pharmacol Ther*, 40, 293-303.
- Lopez-Boado, Y. S., Rubin, B. K. 2008. Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 286-91.
- Lutzow, Y. C., Donaldson, L., Gray, C. P., Vuocolo, T., Pearson, R. D., Reverter, A., Byrne, K. A., Sheehy, P. A., Windon, R., Tellam, R. L. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res*, 4, 18.
- Paape, M. J., Capuco, A.J., Guidry, C. Burvenich 1995. Morphology, Function, and Adaptation of Mammary Cells in Normal and Disease States. *Journal of Animal Science*, 73, 1-17.
- Matsunaga, T., Kamata, S., Kakiichi, N., Uchida, K. 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci*, 55, 297-300.
- Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., Periti, P. 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother*, 31 Suppl C, 1-9.
- Mcguire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J. L., Glass, E. J., Jann, O. 2006. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim Genet*, 37, 47-50.
- Medina-Estrada, I., Lopez-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A. 2016. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effects of Estradiol in Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus* Internalization. *Mediators Inflamm*, 2016, 6120509.
- Mendoza, J., Martinez-Cortes, I., Lopez-Ordaz, R., Gutierrez, L. Y Sumano, H. 2016. Concentrations of tilmicosin in mammary gland secretions of dairy cows following subcutaneous administration of one or two doses of an experimental preparation of tilmicosin and its efficacy against intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res*, 77, 922-30.
- Menzies, M., Ingham, A. 2006. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol*, 109, 23-30.
- Mills S, Ross. R., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., 2011. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, 21, 377-401.
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., Malik, A. B. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1126-67.
- Mohammadsadegh, M. 2018. Impact of intramammary tilmicosin infusion as a dry cow therapy. *J Vet Pharmacol Ther*, 41, 22-27.
- Moloney, J. N., Cotter, T. G. 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 80, 50-64.

- Nickerson, S. C. 2009. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. *Vet Microbiol*, 134, 128-35.
- Noni, I. D. 2008. Release of beta-casomorphins 5 and 7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine beta-casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chem*, 110, 897-903.
- Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernandez, E., Cano-Camacho, H., 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, 1-7.
- Ogola H, Shitandi A, Nanua J. 2007. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J. Vet. Sci*, 8(3), 237–242
- Oliver S. P, Murinda S. E. 2012. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* Jul;28(2):165-85. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.005
- Ou, X. M., Feng, Y. L., Wen, F. Q., Wang, K., Yang, J., Deng, Z. P., Liu, D. S., Li, Y. P. 2008. Macrolides attenuate mucus hypersecretion in rat airways through inactivation of NF-kappaB. *Respirology*, 13, 63-72.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E., Bravo-Patino, A., Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect*, 54, 399-409.
- Paljetak, H. C., Tomaskovic, L., Matijasic, M., Bukvic, M., Fajdetic, A., Verbanac, D., Peric, M. 2017. Macrolide Hybrid Compounds: Drug Discovery Opportunities in Anti- Infective and Anti-inflammatory Area. *Curr Top Med Chem*, 17, 919-940.
- Pereira, P. C. 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30, 619-27.
- Peton, V., Le Loir, Y. 2014. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol*, 21, 602-15.
- Pietrocola G, Nobile G, Rindi S, Speziale P. 2017. *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:166. doi: 10.3389/fcimb.2017.00166
- Pyorala, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 34, 565-78.
- Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G. Y Middleton, J. R. 2018. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis*, 65 Suppl 1, 149-165.
- Rainard, P., Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res*, 37, 369-400.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49, 1603-16.
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., Overton, M. W. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev Vet Med*, 122, 257-64.
- Rubin, B. K. 2004. Immunomodulatory properties of macrolides: overview and historical perspective. *Am J Med*, 117 Suppl 9A, 2S-4S.

- Scali, F., Camussone, C., Calvinho, L. F., Cipolla, M., Zecconi, A. 2015. Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Res Vet Sci*, 100, 88-99.
- Scoreaux, B., Shryock, T. R. 1999. The determination of the cellular volume of avian, porcine and bovine phagocytes and bovine mammary epithelial cells and its relationship to uptake of tilmicosin. *J Vet Pharmacol Ther*, 22, 6-12.
- Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res*, 34, 475-91.
- Severin, S., Wenshui, X. 2005. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45, 645-56.
- Sevilla-Sanchez, D., Soy-Muner, D., Soler-Porcar, N. 2010. Usefulness of macrolides as anti-inflammatories in respiratory diseases. *Arch Bronconeumol*, 46, 244-54.
- Sharma, N., Jeong, D. K. 2013. Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management. *Int J Biol Sci*, 9, 818-29.
- Shinkai, M., Foster, G. H., Rubin, B. K. 2006. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L75-85.
- Shinkai, M., Lopez-Boado, Y. S., Rubin, B. K. 2007. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Antimicrob Chemother*, 59, 1096-101.
- Shompole, S., Henon, K. T., Liou, L. E., Dziewanowska, K., Bohach, G. A., Bayles, K. W. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol*, 49, 919-27.
- Singh, K., Erdman, R. A., Swanson, K. M., Molenaar, A. J., Maqbool, N. J., Wheeler, T. T., Arias, J. A., Quinn-Walsh, E. C., Stelwagen, K. 2010. Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 101-12.
- Sinha, B., Fraunholz, M. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol*, 300, 170-5.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., Pae, H. O. 2013. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol*, 528, 27-48.
- Sordillo, L. M., Streicher K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:135–146.
- Spaan, A. N., Surewaard, B. G., Nijland, R., Van Strijp, J. A. 2013. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol*, 67, 629-50.
- Strobel, M., Pfortner, H., Tuchscher, L., Volker, U., Schmidt, F., Kramko, N., Schnittler, H. J., Fraunholz, M. J., Loffler, B., Peters, G., Niemann, S. 2016. Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. *Clin Microbiol Infect*, 22, 799-809.
- Stuart, A., Brown, T, Imrie, G , Tasker, J, Mockett, A. 2007. Intra-cellular accumulation and trans-epithelial transport of aivlosin, tylosin and tilmicosin. *The Pig Journal*, 60, 26-35.

- Susweta D. M, Sankar G, Krishnamoorthy P, Anamika C, Nimita VC, Manisha R, Bibek S, Habibur R. 2014. Characterization of TLR expression in Staphylococcus aureus induced mastitis in mice model by probe based real time PCR. *Indian Journal of Animal Sciences*, 84, 1043-1047.
- Sutra, L., Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus. *J Med Microbiol*, 40, 79-89.
- Thannickal, V. J. Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-28.
- Van Bambeke, F., Gerbaux, C., Michot, JM., D'yvoire, MB., Montenez, JP., Tulkens, PM. 1998. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *J Antimicrob Chemother*, 42, 761-7.
- Van Der Auwera, P., Prinz, G., Petrikkos, G. 1991. Activity of intracellular antibiotics, 19 (Suppl 4): S216. <https://doi.org/10.1007/BF01644037>
- Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'kenedy, R. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol*, 27, 486-93.
- Wei, Z., Xiao, C., Guo, C., Zhang, X., Wang, Y., Wang, J., Yang, Z., Fu, Y. 2017. Sodium acetate inhibits Staphylococcus aureus internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF-kappaB activation. *Microb Pathog*, 107, 116-121.
- Whelehan, C. J., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Young, F. J., O'farrelly, C. 2011. Experimental Staphylococcus aureus infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol*, 140, 181-9.
- Wilmer, W. A., Tan, L. C., Dickerson, J. A., Danne, M., Rovin, B. H. 1997. Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem*, 272, 10877-81.
- Wu, J., Ding, Y., Wang, J., Wang, F. 2018. Staphylococcus aureus induces TGF-beta1 and bFGF expression through the activation of AP-1 and NF-kappaB transcription factors in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog*, 117, 276-284.
- Yang, Z., Fu, Y., Gong, P., Zheng, J., Liu, L., Yu, Y., Li, J., Li, H., Yang, J. Zhang, X. 2015. Bovine TLR2 and TLR4 mediate Cryptosporidium parvum recognition in bovine intestinal epithelial cells. *Microb Pathog*, 85, 29-34.
- Zalewska-Kaszubska, J., Gorska, D. 2001. Anti-inflammatory capabilities of macrolides. *Pharmacol Res*, 44, 451-4.
- Zhang, W., Liu, H. T. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, 12, 9-18.
- Zhao, X., Lacasse, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci*, 86, 57-65.
- Zhao, X., Lacasse, P.. 2002. Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. *J. Dairy Sci.* 85:562–569.

- Zheng, L., Xu, Y., Lu, J., Liu, M., Bin, D., Miao, J., Yin, Y. 2016. Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and the regulating effect of taurine on these bioprocesses. *Free Radic Biol Med*, 96, 166-80.
- Zimecki, M., Kruzel, M. L. 2007. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J Exp Ther Oncol*, 6, 89-106.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/329454267>

# Tilmicosin modulates the innate immune response and preserves casein production in bovine mammary alveolar cells during *Staphylococcus aureus* infection

Article in *Journal of Animal Science* · December 2018

DOI: 10.1093/jas/sky463/5229277

CITATIONS

0

READS

64

13 authors, including:



**Ismael Martinez Cortes**

Universidad Nacional Autónoma de México

11 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Roxana Olguin Alor**

Universidad Nacional Autónoma de México

13 PUBLICATIONS 9 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Marcia Campillo Navarro**

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

14 PUBLICATIONS 41 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Lilia Gutierrez**

Universidad Nacional Autónoma de México

119 PUBLICATIONS 174 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Quality and safety of animal food products [View project](#)



Trace mineral nutrition of dairy cows during the periparturient period [View project](#)

# Tilmicosin modulates the innate immune response and preserves casein production in bovine mammary alveolar cells during *Staphylococcus aureus* infection<sup>1</sup>

Ismael Martínez-Cortés,<sup>†,‡</sup> Naray A. Acevedo-Domínguez,<sup>†,‡</sup> Roxana Olguin-Alor,<sup>‡</sup>  
Arimelek Cortés-Hernández,<sup>‡</sup> Violeta Álvarez-Jiménez,<sup>†,‡</sup> Marcia Campillo-Navarro,<sup>†</sup>  
Héctor S. Sumano-López,<sup>§</sup> Lilia Gutiérrez-Olvera,<sup>§</sup> Daniel Martínez-Gómez,<sup>¶</sup>  
José L. Maravillas-Montero,<sup>\*\*</sup> Juan J. Loor,<sup>††</sup> Eduardo A. García-Zepeda,<sup>†,‡</sup> and Gloria Soldevila<sup>‡,2,⊙</sup>

<sup>†</sup>Chemokine Biology Research Laboratory, UNAM, Ciudad de México, Mexico; <sup>‡</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México 04510, Mexico; <sup>§</sup>Laboratorio de Inmunología Integrativa-INER, Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México 04502, Mexico; <sup>¶</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad de México 04510, Mexico; <sup>¶</sup>Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, UAM-Xochimilco, Ciudad de México 04960, Mexico; <sup>\*\*</sup>Research Support Network, INCMNSZ-UNAM, Ciudad de México 14080, Mexico; and <sup>††</sup>Mammalian NutriPhysioGenomics-University of Illinois, Urbana 61801, IL

**ABSTRACT:** Tilmicosin is an antimicrobial agent used to treat intramammary infections against *Staphylococcus aureus* and has clinical anti-inflammatory effects. However, the mechanism by which it modulates the inflammatory process in the mammary gland is unknown. We evaluated the effect of tilmicosin treatment on the modulation of the mammary innate immune response after *S. aureus* infection and its effect on casein production in mammary epithelial cells. To achieve this goal, we used immortalized mammary epithelial cells (MAC-T), pretreated for 12 h or treated with tilmicosin after infection with *S. aureus* (ATCC 27543). Our data showed that tilmicosin decreases intracellular infection ( $P < 0.01$ ) and had a protective effect on MAC-T reducing apoptosis after infection by 80% ( $P < 0.01$ ). Furthermore, tilmicosin reduced reactive oxygen species (ROS) ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$  ( $P < 0.01$ ), IL-6

( $P < 0.01$ ), and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) production. In an attempt to investigate the signaling pathways involved in the immunomodulatory effect of tilmicosin, mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation was measured by fluorescent-activated cell sorting. Pretreatment with tilmicosin increased ERK1/2 ( $P < 0.05$ ) but decreased P38 phosphorylation ( $P < 0.01$ ). In addition, the anti-inflammatory effect of tilmicosin helped to preserve casein synthesis in mammary epithelial cells ( $P < 0.01$ ). This result indicates that tilmicosin could be an effective modulator inflammation in the mammary gland. Through regulation of MAPK phosphorylation, ROS production and pro-inflammatory cytokine secretion tilmicosin can provide protection from cellular damage due to *S. aureus* infection and help to maintain normal physiological functions of the bovine mammary epithelial cell.

**Keywords:** inflammation, innate immunity, mammary epithelial cells, *S. aureus*, tilmicosin

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society of Animal Science. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

J. Anim. Sci. 2019.97:644–656  
doi: 10.1093/jas/sky463

<sup>1</sup>Funding for this study was supplied by the grant DGAPA-PAPIIT IT201116 from UNAM, Mexico.

<sup>2</sup>Corresponding author: [soldevi@unam.mx](mailto:soldevi@unam.mx)

Received September 29, 2018.

Accepted December 1, 2018.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is the major pathogen causing clinical and subclinical mastitis, which usually turns into chronic infection (Reshi et al., 2015; Scali et al., 2015). Chronic infection is one

of the mechanisms of antibacterial resistance and is related to the ability of the pathogen to internalize into professional and nonprofessional phagocytic cells like bovine mammary epithelial cells (bMECs) (Scali et al., 2015; Zheng et al., 2016).

The bMECs are cuboid epithelial cells responsible for the synthesis, package, and export of milk components including caseins, lipids, vitamins, and minerals. In addition, bMECs function as innate immune cells because they can sense pathogen-associated molecular patterns and activate early mechanisms to prevent mastitis (Yang et al., 2008; Akers and Nickerson, 2011; Ezzat Alnakip et al., 2014). Toll-like receptors (TLR2 and TLR8) on the surface of bMECs recognize *S. aureus* or its remnants, inducing the activation of an inflammatory process through a series of activation pathways including the production of reactive oxygen species (ROS) (Menzies and Ingham, 2006; Whelehan et al., 2011; Ezzat Alnakip et al., 2014; Bergström et al., 2015). Excessive accumulation of ROS is responsible for the oxidative stress and the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) (P38 and ERK1/2), with the consequent production of inflammatory cytokines and chemokines (Akira et al., 2006; Lutzow et al., 2008; Alva-Murillo et al., 2015).

The complex oxidative processes induced by ROS accumulation and the activation of MAPK in the mammary gland alter cell metabolism, protein synthesis, cellular apoptosis, reduce the resistance to invasion of pathogens, lead to disruption of cell polarity and determine the cell fate (proliferation or death) (Simone Reuter, 2011; Son et al., 2013; Bae et al., 2017). Excessive ROS production also promotes monocyte infiltration, exacerbating the inflammatory process (Moloney and Cotter, 2018). Furthermore, excessive oxidative stress decreases immortalized mammary epithelial cells (MAC-T) viability and alters their physiological functions, including a decrease of casein (CSN1 and CSN2) production (Paape et al., 1995; Akers and Nickerson, 2011).

Macrolides are drugs with a macrocyclic lactone ring of 12 or more elements that are widely used in human and veterinary medicine to treat different kinds of pathologies and also bovine mastitis (Rubin, 2004; López-Boado and Rubin, 2008; Ou et al., 2008). The ability of an antibiotic to enter into cells enables it to be effective against susceptible intracellular organisms. Although their effectiveness depends on the particular antibiotic and cell type, macrolides can have intracellular activity. Tilmicosin is a 16-member semi-synthetic macrolide antimicrobial agent obtained from tylosin

with broad activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and frequently used in the treatment of pulmonary infection in calves, sheep, and lately to treat mastitis (Cao et al., 2006; Buret, 2010). Tilmicosin accumulates inside different types of cells including phagocytic, kidney, colon epithelial (Stuart et al., 2007; Buret, 2010), and (although at lower concentrations) also mammary gland epithelial cells (Scorneaux and Shryock, 1999).

Tilmicosin can modulate the inflammatory process in respiratory tissue in pigs and cattle (López-Boado and Rubin, 2008; Ou et al., 2008) and exerts an important anti-inflammatory effect in macrophages and mouse peripheral blood mononuclear cells stimulated with Lipopolisaccharide (LPS) (Cao et al., 2006). In addition, tilmicosin is effective in the elimination of *S. aureus* from the mammary gland (Dingwell et al., 2003). Through the parenteral administration in lactating cows, tilmicosin reaches therapeutic concentrations in milk against *S. aureus* for 7 d (Dingwell et al., 2003). Using a new long-acting preparation, therapeutic concentrations can last 20 d or more in cows during the dry period (Mendoza et al., 2016). These findings underscore the usefulness of tilmicosin in parenteral dry-cow therapy (Mendoza et al., 2016; Mohammadsadegh, 2018). In this context, tilmicosin showed a potent effect against *S. aureus* infections leading to important anti-inflammatory clinical effects (Mendoza et al., 2016; Mohammadsadegh, 2018). Despite all these well-established benefits, the mechanisms whereby tilmicosin could modulate the inflammatory process in the mammary gland are currently unknown.

The objective of this work was to assess the potential effect of tilmicosin in the regulation of the inflammatory process of bMECs induced by *S. aureus* infection. To achieve this, ROS and pro-inflammatory cytokine production, MAPK phosphorylation and its physiological effect on epithelial cell viability and the casein production in vitro were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### *Staphylococcus aureus* Strain

The American type culture collection (ATCC) *S. aureus* subsp. *Aureus* Rosenbach 27543 strain isolated from a case of bovine clinical mastitis was used in this study. Bacteria were grown at 37 °C overnight in Brain-Heart Infusion (BHI) (BD Bioxon), and the CFUs were adjusted at an optical density of 620 nm (OD 0.4 =  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL).



Bacteria were frozen in BHI 10% glycerol at a concentration of  $3.0 \times 10^7$  CFU/mL at  $-70^\circ\text{C}$ .

### ***Culture of Mammary Epithelial Cell Line (MAC-T)***

*MAC-T cells were kindly donated by Dr. Loor.* Cells were cultured in Petri dishes (Corning-Costar) in growth medium (GM) composed of DMEM medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F-12K, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal calf serum, 10  $\mu\text{g/mL}$  insulin, 5  $\mu\text{g/mL}$  hydrocortisone, 100 U/mL penicillin and streptomycin (100  $\mu\text{g/mL}$ ), and 1  $\mu\text{g/mL}$  amphotericin B (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Cells were grown in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at  $37^\circ\text{C}$ .

For casein induction, MAC-T were cultured in lactogenic media composed by Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 mg/L insulin, 1 mg/L (50  $\mu\text{mol}$ ) hydrocortisone, 5  $\mu\text{mol/L}$  ascorbic acid, 5 mmol/L sodium acetate, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 1  $\mu\text{g/mL}$  progesterone, 0.5 mg/mL 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin, 1  $\mu\text{g/mL}$  amphotericin B (all from Thermo Fisher Scientific), and 2.5  $\mu\text{g/mL}$  prolactin (Sigma-Aldrich). Cells were incubated in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h.

### ***Effect of Tilmicosin on S. aureus Growth***

To analyze the anti-microbial effect of tilmicosin on *S. aureus*,  $2.0 \times 10^8$  CFU/mL were cultured at  $37^\circ\text{C}$  in BHI supplemented with 10  $\mu\text{g/mL}$  of tilmicosin or gentamicin and the bacterial growth was measured by OD (620 nm) in a multiskan GO plate reader (Thermo Fisher Scientific) at different time points up to 24 h.

### ***Effect of Tilmicosin on Internalization of S. aureus in MAC-T***

For the infection assay,  $5 \times 10^5$  MAC-T cells per well were cultured on plates (Sigma-Aldrich) with maintenance media for 12 h. When cells reached confluence, they were treated with tilmicosin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) as follows: pre-treatment for 12 h (pre-TIL), treatment for 2 h post-infection (Tx-TIL) or control without treatment. Internalization assays (gentamicin protection assay) were carried out as described (Ochoa-Zarzosa et al., 2009).

Cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 50:1 bacteria per cell. MAC-T

monolayers were then washed three times with PBS, pH 7.4, inoculated with 1,650  $\mu\text{L}$  of bacterial suspensions at a density of  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL and incubated for 2 h in 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .

After infection, MAC-T monolayers were washed three times with PBS (Gibco, Waltham, MA) and incubated in GM without serum, supplemented with 50  $\mu\text{g/mL}$  gentamicin for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  to eliminate extracellular bacteria. Then the Tx-TIL group was treated with tilmicosin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) for 2 h. Next, MAC-T monolayers were detached with trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and lysed with 250  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water. MAC-T lysates were diluted 100-fold, plated on LB agar in triplicate and incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$ . The total number of CFU was determined by the standard colony counting technique. Data are presented as the percentage of internalization in relation to untreated MAC-T cultures.

### ***Determination of ROS Production***

ROS production was determined via the nitro blue tetrazolium (NBT) reduction as described previously (Campillo-Navarro et al., 2017). For this assay,  $2.0 \times 10^5$  MAC-T per well were plated in a 24-well plates. Tilmicosin treatments and infection were done as described above. Subsequently, 20  $\mu\text{L}$  of NBT (Sigma Aldrich) (1 mg/mL) were added to every well and incubated for 20 min in 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ . Finally, a mix of 54  $\mu\text{L}$  of 2 M KOH and 46  $\mu\text{L}$  of dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) were added to dissolve formazan crystals and the formazan solution was transferred to a 96-well plate. OD was measured with a microplate spectrophotometer at 620 nm (multiskan GO plate reader, Thermo Fisher Scientific).

### ***Effect of Tilmicosin on MAC-T Viability***

MAC-T viability was determined by seeding of  $2.5 \times 10^5$  cells per well in a 24-well plate. Tilmicosin treatments and infection assay were done as described above. Cells were incubated with 30  $\mu\text{L}$  of Zombie Nir Fixable Viability Kit (BioLegend, San Diego, CA) (1/200) for 20 min at room temperature followed by fixation with Fix/Perm kit (Tonbo Biosciences, San Diego, CA) for 1 h. Cells were then blocked with 10% goat serum in PBS for 40 min at  $4^\circ\text{C}$ . Samples were acquired in a fluorescent-activated cell sorting (FACS) Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

### **Determination of Cytokines Production**

Pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) secreted by MAC-T into culture medium were evaluated via ELISA from  $2.5 \times 10^5$  cells per well that were plated in 48-well dishes, treated and infected as described above. For this, medium was collected at different points and the concentrations of cytokines measured using the bovine IL-1 $\beta$  and IL-6 (Thermo Fisher Scientific) and TNF- $\alpha$  (Kingfisher Biotech, Inc., St Paul, MN) ELISA kits according to the manufacturer's instructions.

### **MAPK Activation Assay**

Phospho-p38 MAPK (p-P38) and phospho p44/42 MAPK (p-ERK 1/2) were determined only in pretreated (pre-TIL) cells after starving with DMEM 0.2% FBS for 6 and 24 h, respectively. Cells were pre-treated with tilmicosin (10  $\mu$ g/mL) for 12 h and stimulated with *S. aureus* (MOI 50:1). The levels of p-ERK and p-P38 were measured at 5 min after stimulation with *S. aureus*. As positive control, cells were treated with pervanadate (1 mM) for 20 min. After stimulation, cells were fixed and lysed with Lyse/Fix Buffer (Phosphoflow, BD Biosciences, San Jose, CA) for 10 min at room temperature followed by incubation with Perm Buffer II (BD Phosphoflow) for 20 min at room temperature. Then, cells were washed with FACS buffer solution, centrifuged and suspended in 30  $\mu$ L of purified anti-mouse CD16/32 antibody (Fc block) for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. After washing twice with FACS buffer solution, the pellet was resuspended in the desired antibody as follows, 1/200 for phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology) and 1/800 for phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. Cells were then incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG H&L) for 15 min at room temperature in the dark; finally, cells were resuspended in 600  $\mu$ L of 0.5% paraformaldehyde. MAPK activation levels were evaluated by flow cytometry in FACS Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

### **Analysis of Casein Expression**

MAC-T were cultured in lactogenic media for 24 h, and after that period cells were washed with PBS and incubated with GM. Tilmicosin treatments and infection were performed as previously described for casein detection MAC-T were fixed with 300  $\mu$ L

of BD Phosphoflow Lyse/Fix 1 $\times$  with incubation at 37  $^{\circ}$ C for 10 min following by blocking with 10% goat serum to 4  $^{\circ}$ C for 40 min and permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 20 min. MAC-T were stained with anti-cytokeratin 18 antibody and one anti casein antibody (both from Abcam, Cambridge, UK) for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. Finally, cells were incubated with Alexa fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> goat anti-Alexa Fluor 488 (1/1,000) and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit Ig H+L (Thermo Fisher Scientific) (1/300) for 25 min at 4  $^{\circ}$ C in the dark. Cytokeratin and casein expression were evaluated by flow cytometry in a FACS Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

### **Fluorescence Microscopy**

A total of  $2.0 \times 10^5$  MAC-T were adhered to 20 mm glass coverslips treated with poly-L-lysine solution (0.01%) and cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37  $^{\circ}$ C for 24 h with LM. After that period, cells were washed with PBS and changed for GM. Tilmicosin treatments and infection were done as previously described. Then, cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature followed by blocking with 10% goat serum at 4  $^{\circ}$ C for 40 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 20 min. Cells were stained with anti-bovine casein antibody (Abcam, Cambridge, UK) for 30 min at 4  $^{\circ}$ C. Finally, cells were incubated with Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit (H+L) IgG (Thermo Fisher Scientific) (1/300) for 25 min at 4  $^{\circ}$ C in the dark. Images were captured with an inverted microscope (Olympus IX71).

### **Statistical Analysis**

Data were obtained from three independent experiments each performed in triplicate, analyzed by ANOVA test and compared between groups via Tukey test. All statistical analyses were performed using Prism 6.0 statistical software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). The results are reported as SEM. Data with  $P < 0.05$  were considered as statistically significant.

## **RESULTS**

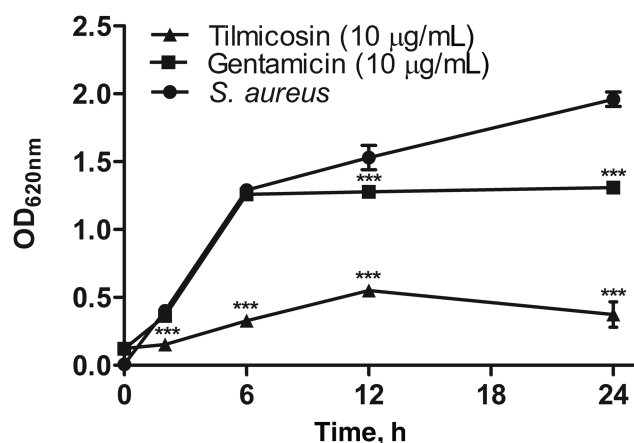
### **Antimicrobial Activity of Tilmicosin Against *S. aureus***

To investigate the potential antibacterial activity of tilmicosin on *S. aureus* growth, we performed a minimal inhibitory concentration (MIC) assay

at a concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$ . This concentration was determined by performing dose–response experiments (Supplementary Figure 1). We used gentamicin at the same dose as a control. This is the reference antimicrobial agent used in protection assays (Klein et al., 2017). Compared with the untreated control, tilmicosin had a bacteriostatic activity against *S. aureus* from 2 up to the 24 h evaluated ( $P < 0.01$ ). Gentamicin inhibited bacterial growth from 12 h of incubation ( $P < 0.01$ ) (Figure 1).

### Effect of Tilmicosin on the Internalization of *S. aureus* into MAC-T

We used a model of immortalized bMECs (MAC-T) to evaluate the protective effect of tilmicosin against *S. aureus* invasion. Gentamicin protection assays were carried out to eliminate the bacteria adhered to the cellular membrane or residing in the medium and assessed the effect of tilmicosin in the internalization of *S. aureus* into MAC-T. Cells were pre-treated with 10  $\mu\text{g/mL}$  of tilmicosin for 12 h previous to challenge with *S. aureus* (pre-TIL) or treated after infection for 2 h with the same concentration of tilmicosin (Tx-TIL). By microscopic evaluation, we observed that *S. aureus* was internalized by MAC-T after 2 h of incubation (Figure 2A). Based on the number of CFU recovered, we observed that MAC-T treated with tilmicosin (pre-TIL and Tx-TIL) had a reduction in CFU of *S. aureus* ( $P < 0.01$ ) at the time points evaluated (Figure 2B).

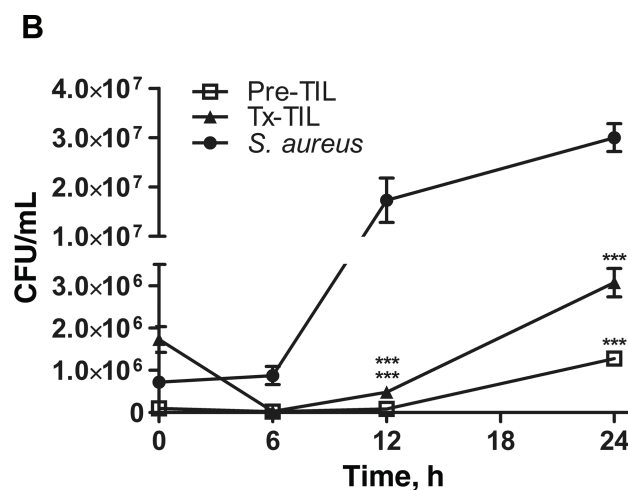
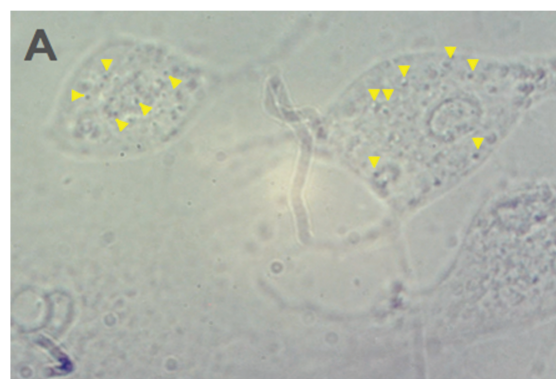


**Figure 1.** Tilmicosin exerts antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* faster than gentamicin. *S. aureus* ( $2 \times 10^8$  bacteria) were challenged with 10  $\mu\text{g/mL}$  of tilmicosin or gentamicin for different times and the optical density (OD) was measured at 620 nm. \*\*\* $P < 0.01$  denotes statistical differences compared with cultures infected *S. aureus* without treatment.

### Tilmicosin Maintains MAC-T Viability During *S. aureus* Infection

The cytotoxic potential of tilmicosin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) on cell viability was evaluated after Zombie NIR staining and FACS analysis after incubation of MAC-T with tilmicosin. The results indicated that cell viability was not affected by tilmicosin alone (control) ( $P = 0.5$ ) (Figure 3A), ensuring that the effects of tilmicosin on MAC-T were not attributable to cytotoxic effects caused by the drug.

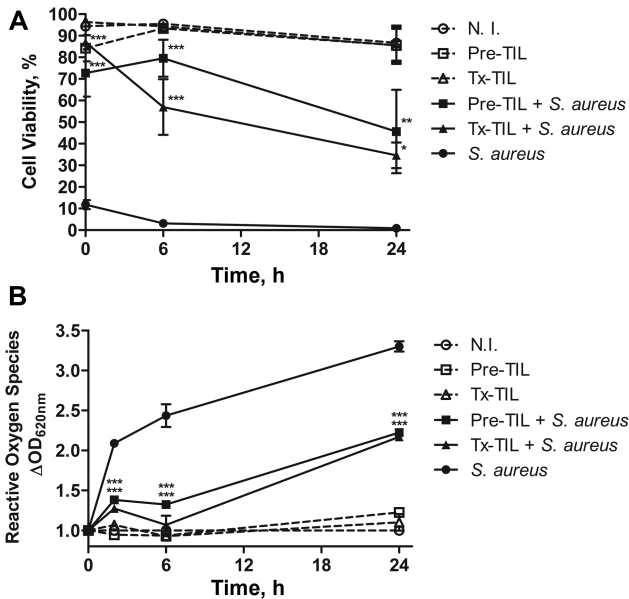
After infection of MAC-T with *S. aureus*, viability of cells at 6 h in the pre-TIL and Tx-TIL cultures was higher than that of MAC-T that had not been treated with tilmicosin ( $P < 0.001$ ) up to 24 h postinfection ( $P < 0.01$  (pre-Til) and  $P < 0.05$  (Tx-Til)) (Figure 3A).



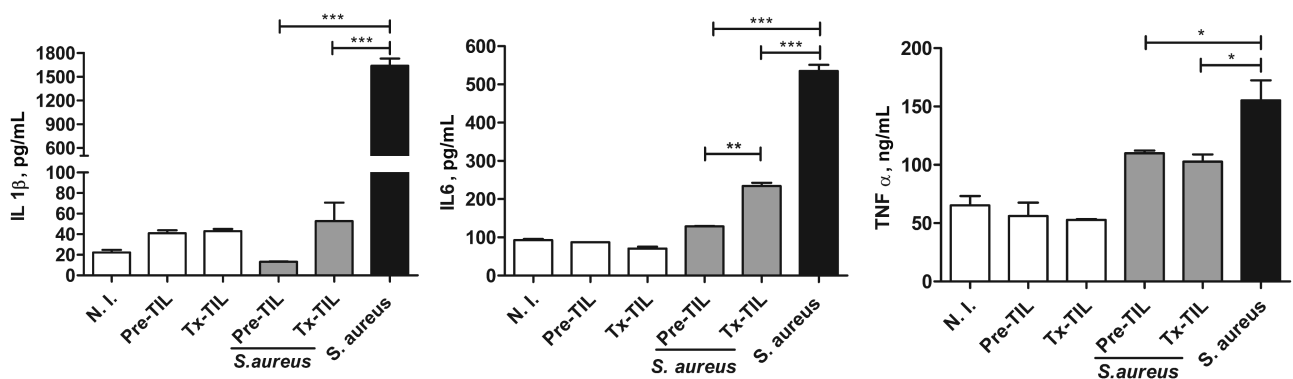
**Figure 2.** Tilmicosin diminishes *Staphylococcus aureus* load in bovine mammary epithelial cells (MAC-T). (A) Representative image of infected MAC-T (arrows indicate *S. aureus* inside the cells). (B) MAC-T were pre-treated with tilmicosin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) for 12 h (pre-TIL), treated for 2 h postinfection (Tx-TIL) or left untreated. Cells were infected with *S. aureus* (MOI 50:1) for 2 h at 37 °C under 5%  $\text{CO}_2$  and incubated for 0, 6, 12, and 24 h. CFUs were determined for each condition. \*\*\* $P < 0.001$  denotes statistical differences compared with *S. aureus*.

### Tilmicosin Modulates ROS Production During *S. aureus* Infection

To determine whether tilmicosin modulates the inflammatory process in MAC-T, ROS production was analyzed under the same experimental conditions. Compared with uninfected MAC-T, when MAC-T cells were challenged only with *S. aureus*, we observed high amounts of ROS production



**Figure 3.** Tilmicosin diminishes ROS production and prevents death of bovine mammary epithelial cells (MAC-T) infected with *Staphylococcus aureus*. MAC-T were either pre-treated for 12 h (pre-TIL), treated for 2 h postinfection (Tx-TIL) or without treatment with tilmicosin (10 μg/mL). Cells were infected with *S. aureus* (MOI 50:1) for 2 h and incubated for 0, 6, 12, and 24 h and ROS production was determined for each condition. (A) Representative image of ROS production in MAC-T infected with *S. aureus* and treated with Tilmicosin. (B) Cellular viability after Zombie Nir staining and analysis by FACS. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  show statistical differences compared with *S. aureus*-infected untreated cells.



**Figure 4.** Tilmicosin decreases proinflammatory cytokine production in bovine mammary epithelial cells (MAC-T) infected with *Staphylococcus aureus*. MAC-T were pre-treated for 12 h (pre-TIL), treated for 2 h postinfection (Tx-TIL) or without treatment with tilmicosin (10 μg/mL). Cells were infected with *S. aureus* (MOI 50:1) for 2 h and the supernatant was collected to determine IL-6, IL-1β, and TNF-α by ELISA technique. N.I., cells without infection. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  indicate statistical differences compared with *S. aureus*-infected untreated cells.

( $P < 0.001$ ) (Figure 3B). Compared with MAC-T infected with *S. aureus* and not treated with tilmicosin, pre-TIL or Tx-TIL cultures had a decrease in ROS production at 2, 6, and 24 h postinfection ( $P < 0.001$ ) (Figure 3B).

### Tilmicosin Reduces the Production of Pro-inflammatory Cytokines in *S. aureus*-Infected MAC-T

As we previously found a reduction in ROS production by tilmicosin effect, we next evaluated whether tilmicosin was able to modulate the production of pro-inflammatory cytokines in these cells after *S. aureus* infection. Compared with uninfected cells, infection with *S. aureus* induced a high production of IL-1β, IL-6 ( $P < 0.001$ ), and TNF-α ( $P < 0.01$ ) in MAC-T (Figure 4). Tx-TIL treatment of infected cells decreased IL-1β, IL-6 ( $P < 0.001$ ), and TNF-α ( $P < 0.05$ ) production compared with infection alone (Figure 4A–C). Interestingly, the pre-TIL treatment further decreased the production of IL-6 in MAC-T compared to Tx-TIL cultures, while pre-TIL did not significantly decreased TNF production.

### Tilmicosin Modulates MAPK Phosphorylation in MAC-T Stimulated with *S. aureus*

To analyze the mechanism by which tilmicosin could reduce inflammatory cytokine production, we evaluated the levels of phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) and phospho-P38 (p-P38) in MAC-T pre-treated with tilmicosin and after stimulation with *S. aureus* for 5 min. Compared with untreated cells, tilmicosin pre-treated cells had an increase of p-ERK1/2 levels ( $P < 0.05$ ) (Figure 5A). In contrast to p-ERK1/2, compared to untreated cells,

tilmicosin decreased p-P38 levels ( $P < 0.001$ ) in MAC-T after *S. aureus* stimulation (Figure 5B).

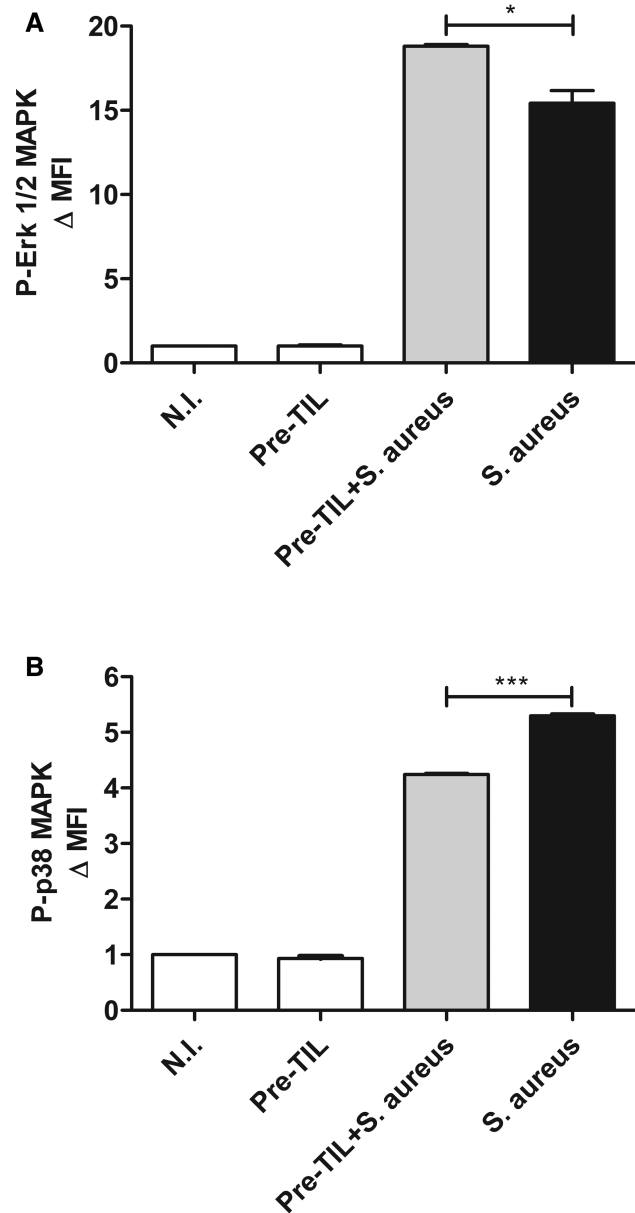
### *Tilmicosin Maintains the Production of Casein in MAC-T During Infection with S. aureus*

One of the consequences of a chronic *S. aureus* infection in the mammary gland is the reduction of casein production. Therefore, we next evaluated the effect of tilmicosin on the expression of intracellular caseins after *S. aureus* infection of MAC-T. Compared with untreated cells, after infection with *S. aureus* tilmicosin allowed for sustained production of caseins ( $P < 0.001$ ) (Figure 6). Casein production was better sustained up to 24 h after infection in pre-treated cells (pre-Til), than in cells treated after infection (Tx-Til) ( $P < 0.001$ ). Interestingly, only tilmicosin pre-treatment rescued the casein production to the same level as non-infected cells (N.I.).

## DISCUSSION

Bovine mastitis is a serious prevalent disease with high economic impact to the dairy industry worldwide (Zhao and Lacasse, 2008; Viguier et al., 2009). *Staphylococcus aureus* infection of the bovine mammary gland is commonly characterized by a persistent, recurrent, and subclinical mastitis that can turn into chronic infection (Matsunaga et al., 1993; Seegers et al., 2003) due to the ability of the bacteria to internalize into mammary epithelial cells. Bacterial internalization into epithelial cells is one of the most important pathogenic mechanisms that bacteria possess for the establishment of mastitis. This process can be modulated by different factors such as environment, hormonal factors (prolactin, estradiol), nutrients (fatty acids), or drugs (DeGo et al., 2002; Gutiérrez-Barroso et al., 2008).

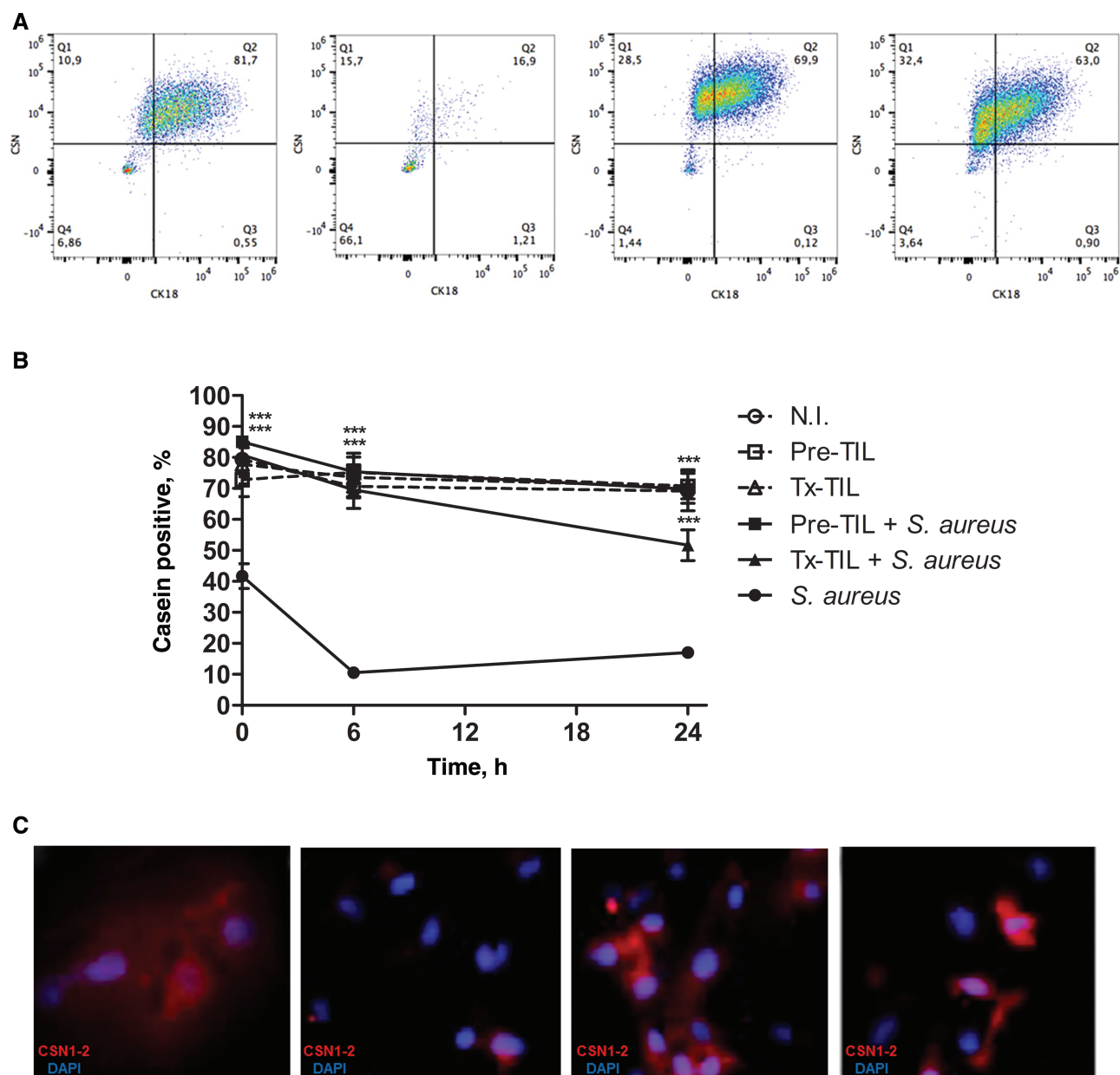
It has been reported that some macrolides have anti-inflammatory properties in several pathologies, including respiratory diseases and mastitis (Buret, 2010; Mohammadsadegh, 2018; Ou et al., 2008). However, to date, there is no evidence of the immunomodulatory properties of a 16-member macrolide such as tilmicosin (Rubin, 2004; Er and Yazar, 2012). In the present study, we show that tilmicosin has antimicrobial activity against *S. aureus*. Our results demonstrate that tilmicosin has an anti-bacterial effect on bacterial growth under the conditions evaluated. Moreover, we showed that it did not inhibit bacterial internalization but helped to control the infection in MAC-T, and regulated the inflammatory process through a reduction of ROS



**Figure 5.** Tilmicosin differentially modulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in MAC-T cells infected with *Staphylococcus aureus*. Time course of MAPK phosphorylation. (A) ERK, (B) P38 of MAC-T cells pretreated for 12 h (pre-TIL) or untreated with tilmicosin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and infected with *S. aureus* (MOI 50:1). After infection, cells were permeabilized and incubated with anti-phospho ERK and anti-phospho-P38 antibodies and the levels of phosphorylated protein were measured by FACS. \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$  indicate statistical differences compared with *S. aureus*-infected untreated cells.

and pro-inflammatory cytokine, in part through alteration in MAPK phosphorylation.

*Staphylococcus aureus* is capable of invading the epithelial cells within the mammary gland and cause subclinical mastitis (Shompole et al., 2003; Alva-Murillo et al., 2017). Especially, when used by parenteral administration for dry-cow therapy, the efficacy of tilmicosin against *Staphylococcus* is mixed and some reports actually addressed high bacterial resistance rates to tilmicosin (Ling, 2016).



**Figure 6.** Casein production in MAC-T cells infected with *Staphylococcus aureus* can be rescued by treatment with tilmicosin. Casein expression in MAC-T cells pre-treated for 12 h (pre-TIL), treated 2 h post-infection (Tx-TIL), or without treatment with tilmicosin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cells were infected with *S. aureus* (MOI 50) for 2 h and incubated for 0, 6, 12, and 24 h, and casein levels were measured by FACS using anti- $\alpha$  and  $\beta$  casein (CSN 1 and 2) antibodies. (A) Representative experiment of casein production at 24 h, (B) time course experiment  $n = 3$  independent experiments,  $***P < 0.001$  shows significant differences in casein production in pre-TIL and Tx-TIL groups at all the time points evaluated compared with *S. aureus*-infected untreated cells. (C) Representative confocal images of casein production in MAC-T cells with the different conditions evaluated at 24 h. Nucleus: blue; casein: red.

For this reason, we examined the antimicrobial activity of tilmicosin against *S. aureus* growth. We confirmed that tilmicosin at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  has the classic bacteriostatic activity (Van Bambeke et al., 1998) against *S. aureus* growth. This activity is stable up to 24 h and is better than gentamicin at the same concentration although that aminoglycosides have faster bacterial killing activity compared with macrolides (Van Bambeke et al., 1998). The efficacy of tilmicosin plus the post-antibiotic leukocyte enhancement effect (PALE) in

microorganisms reported in macrolides is important since those render the bacteria more susceptible to phagocytosis and killing by innate immune cells (Van Bambeke et al., 1998).

As macrolides have the ability to diffuse through cellular membranes, accumulate in phagolysosomes (Van Bambeke et al., 1998) and exert PALE activity, we hypothesized that tilmicosin could increase the microbicidal mechanisms of MAC-T. Compared with TX-TIL, we found that tilmicosin reduced the bacteria load of *S. aureus* invasion

into MAC-T at the times evaluated. Interestingly, pre-TIL was more efficient at decreasing *S. aureus* internalization. This could be explained by the fact that intracellular drugs can modulate factors inside the cells that may increase or decrease the activity of the intracellular antibiotic and, thereby, modify the cellular response against microorganisms (Van Bambeke et al., 1998).

Although the majority of them are not used for treatment of mastitis, different strategies have been evaluated to inhibit *S. aureus* internalization into mammary cells (Alva-Murillo et al., 2015, 2017; Asli et al., 2017). The effect observed with tilmicosin is similar to the effect of estradiol and sodium acetate, which reduce internalization of *S. aureus* by 50% or more (Medina-Estrada et al., 2016; Wei et al., 2017). However, tilmicosin controlled the growth of bacteria up to 24 h postinfection, while the other compounds elicit a shorter time response (2 h).

After long-term administration, the high tissue penetration of macrolides has been shown to cause cell damage after use in animals and can also increase the cellular apoptosis (Van Bambeke et al., 1998). Based on this knowledge, we evaluated the effect of tilmicosin on MAC-T viability. However, none of the treatments elicited toxicity on MAC-T according to the analysis of cell viability. On the contrary, tilmicosin improved cell viability of infected cells at 24 h postinfection up to 50% in comparison with untreated cells. These data indicate that tilmicosin helps prevent death of MAC-T during infection with *S. aureus*.

Milk production in dairy cattle depends of the number and activity of bMEC (Singh et al., 2010) and cellular death and parenchymal fibrosis after infection can reduce synthetic capacity (Nickerson, 2009; Akers and Nickerson, 2011); increased cell viability is a desired physiological outcome in dairy cattle as a means to preserve high levels of milk production and milk quality (Nickerson, 2009; Sharma and Jeong, 2013). To our knowledge, there are very few studies showing an improvement of more than 50% of postmastitis structural damage of the mammary gland (Sharma and Jeong, 2013) as that of tilmicosin. Tilmicosin could be used to protect epithelial cells against the inflammatory damage after infection of *S. aureus*.

ROS are molecules involved in the inflammatory process triggered after infection and are important in the elimination of intracellular microorganisms. However, excessive ROS production can induce toxicity and cell death (Son et al., 2013; Moloney and Cotter, 2018). Compared with uninfected cells, our results showed that tilmicosin decreased ROS

production in MAC-T in response to *S. aureus* infection, which correlated with increased cell viability. Other macrolides have been shown to diminish oxidative stress through inhibition of inducible Nitric Oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide production in macrophages (Janaro et al., 2000). In addition, tilmicosin was shown to modulate the expression of COX-2 and iNOs gene abundance in mouse macrophages and monocytes stimulated with LPS (Cao et al., 2006). However, it was unknown whether tilmicosin had an effect on ROS production in bovine mammary cells. ROS induce oxidative damage in DNA, lipids, proteins, and other cellular components, and this damage is sufficient to induce malignant transformation and chronic inflammation. This can be accompanied by increased production of tissue ROS that can promote an inflammatory response of the tissue (Li et al., 2017). Our results demonstrate that tilmicosin downregulates ROS production in MAC-T at 6 and 24 h after infection with *S. aureus*, which could explain the increased viability observed in MAC-T treated with tilmicosin.

The modulation of ROS production in mammary epithelial cells by tilmicosin is consistent with the effect observed with AA like *N*-acetyl cysteine that modulate ROS production and inhibit NF- $\kappa$ B nuclear translocation in MAC-T cells (Bae et al., 2017). Similarly, taurine treatment reduces ROS production, iNOs mRNA expression and pro-inflammatory cytokines in MAC-T after *S. aureus* challenge (Zheng et al., 2016). Tilmicosin could act as an ROS scavenger during *S. aureus* infection.

The effect of *S. aureus* on pro-inflammatory cytokines is controversial, as some authors have reported an inhibitory effect of *S. aureus* on IL-1 $\beta$  and IL-6 production (Alva-Murillo et al., 2015, 2017). We found that tilmicosin inhibited IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  production after infection, similar to a previous report (Cao et al., 2006) with murine macrophages and monocytes stimulated with LPS and treated with tilmicosin. Fatty acids like sodium butyrate and octanoate also modulate cytokine production after the inhibition of *S. aureus* invasion of bMEC (Alva-Murillo et al., 2015, 2017).

The inactivation of MAPK in MAC-T can inhibit the inflammation after treatment with antioxidant reagents that serves as an ROS scavenger (Bae et al., 2017). We investigated the molecular basis underlying the effect of tilmicosin on MAPK phosphorylation after *S. aureus* infection of MAC-T cells. Tilmicosin pretreatment resulted in increased ERK phosphorylation after *S. aureus* stimulation, similarly to a previous report (Shinkai et al., 2007)

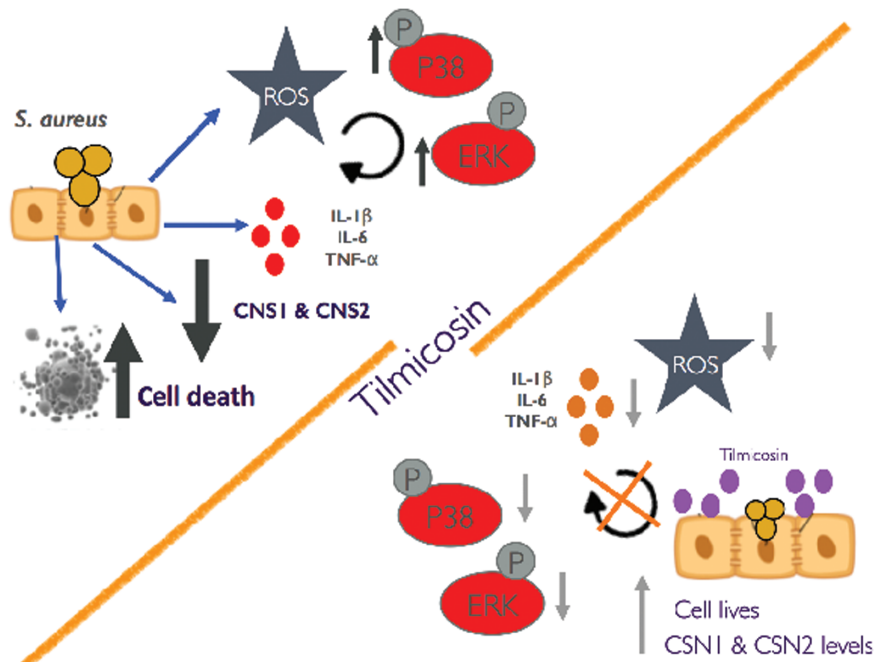
in which clarithromycin treatment of human bronchial epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa* led to higher levels of p-ERK. High levels of p-ERK are related with cellular proliferation and survival, and the increase or decrease of cell differentiation (Shinkai M et al., 2006; Moloney and Cotter, 2018). In this context, we found that p-ERK stimulation in pretreated cells correlated with the increased in cell viability observed at 6 h after *S. aureus* infection.

It is known that constitutive ERK activation decreases pro-inflammatory cytokine production over time. On the other hand the activation of p38 culminates in increased production IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 through an MK2-dependent pathway, while IL-10 production depends on MSK 1/2 (Bachstetter and Van Eldik, 2010). Our results show that after infection with *S. aureus* tilmicosin activates p-ERK 1/2 but at the same time is a potent inhibitor of p-P38 in MAC-T. These results could explain the reduction of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 production and increased viability of MAC-T infected with *S. aureus* after tilmicosin treatment.

Therefore, tilmicosin appears to differentially modulate MAPK phosphorylation in MAC-T stimulated with *S. aureus*, which may be related to the reported effect of p-ERK and P38 on cell viability and cytokine production, respectively (Shinkai

M et al., 2006; Bachstetter and Van Eldik, 2010). This differential modulation of MAPK has shown to be induced by other drugs such clarithromycin, which selectively activated p-ERK but not p-P38 in human bronchial epithelial cells, promoting cell viability by modulation of the inflammatory process (Shinkai M et al., 2006).

*Staphylococcus aureus* mastitis impacts the secretory cells differentiation and the alveolar structure with the consequent reduction of casein micelles and lipids droplets as a result of tissue damage caused by inflammation (Akers and Nickerson, 2011). After evaluating the effect of tilmicosin on MAPK phosphorylation and the synthesis of pro-inflammatory cytokines, we sought to determine the effects on the physiologic function of MAC-T cells by evaluating intracellular casein production. The pretreatment with tilmicosin was more efficient in preserving casein production than the posttreatment up to 24 h. However, as previously reported (Scorneaux and Shryock, 1999), we cannot rule out the possibility of further improvements in casein production with higher doses of tilmicosin. It is worth pointing out that this is the first report that shows a positive effect of an antibiotic treatment on the physiological function of the mammary gland; considering that caseins have important economic



**Figure 7.** Putative model of Tilmicosin on *Staphylococcus aureus* infection in immortalized bovine mammary cells (MAC-T). After *S. aureus* recognition by epithelial cells, the increase in ROS production elicits an increase in phosphorylation of MAPK (P38, ERK) favoring a micro-inflammatory environment leading to increased production of pro-inflammatory cytokines. Beyond a certain threshold, the high production of ROS becomes toxic for the cells, affecting specific physiological functions and increasing cell death. Tilmicosin treatment is able to inhibit ROS production, which decreases MAPK phosphorylation and pro-inflammatory cytokine production, resulting in a protective effect promoting cell survival and preserving the physiological functions of the mammary gland. Under these conditions, casein production is preserved.



value in dairy production, the effect of tilmicosin appears clinically relevant.

*Staphylococcus aureus* infection leads to an inflammatory response of MAC-T that includes ROS and pro-inflammatory cytokine production (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) as a result of MAPK (P38, ERK) activation. Overproduction of ROS can lead to toxicity and affect cell viability and the physiological functions of mammary cells. Tilmicosin treatment appears to decrease the infection of MAC-T and modulate the inflammatory microenvironment by inhibiting ROS and pro-inflammatory cytokine production, in association with a selective phosphorylation of MAPK (P38 and ERK), thereby preserving the viability and function of MAC-T. In conclusion, tilmicosin exerts a protective effect of the mammary epithelium, restraining the inflammatory process induced by *S. aureus* infection and promoting cell survival and casein production by the mammary gland. This proposed model of tilmicosin action is provided in Figure 7.

Our data suggest that tilmicosin could be used as a prophylactic drug against *S. aureus* infection in dry dairy cow therapy, as it may reduce the parenchymal damage caused by infection and preserve the physiological function of the mammary gland, thereby diminishing the economic costs caused by mastitis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank to Gisela Dupont and Oscar Hernández for technical assistance. We also thank Dr. Cynthia López-Pacheco for helpful discussion and analysis of the data. We thank the LabNaCit-UNAM (CONACYT) for technical support in the acquisition of flow cytometry samples.

*Conflict of interest statement.* There is no conflict of interest.

#### LITERATURE CITED

- Akers, R. M., and S. C. Nickerson. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 16:275–289. doi:10.1007/s10911-011-9231-3
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Alva-Murillo, N., I. Medina-Estrada, M. Báez-Magaña, A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza. 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of staphylococcus aureus internalization. *Mol. Immunol.* 68(2 Pt B):445–455. doi:10.1016/j.molimm.2015.09.025
- Alva-Murillo, N., A. Ochoa-Zarzosa, and J. E. López-Meza. 2017. Sodium octanoate modulates the innate immune response of bovine mammary epithelial cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 Pathway: implications during staphylococcus aureus internalization. *Front. Infect. Microbiol.* 7:1–15. doi:10.3389/fcimb.2017.00078
- Asli, A., E. Brouillette, C. Ster, M. G. Ghinet, R. Brzezinski, P. Lacasse, M. Jacques, and F. Malouin. 2017. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One*. 12:e0176988. doi:10.1371/journal.pone.0176988
- Bachstetter, A. D., and L. J. Van Eldik. 2010. The p38 MAP kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS. *Aging Dis.* 1:199–211.
- Bae, H., C. H. Jeong, W. N. Cheng, K. Hong, H. G. Seo, and S. G. Han. 2017. Oxidative stress-induced inflammatory responses and effects of N-acetylcysteine in bovine mammary alveolar cells. *J. Dairy Res.* 84:418–425. doi:10.1017/S002202991700067X
- Bergstrom, B., M. H. Aune, J. A. Awuh, J. F. Kojen, K. J. Blix, L. Ryan, T. H. Flo, T. E. Mollnes, T. Espevik, and J. Stenvik. 2015. TLR8 senses *staphylococcus aureus* RNA in human primary monocytes and macrophages and induces IFN- $\beta$  production via a TAK1-ikk $\beta$ -IRF5 signaling pathway. *J. Immunol.* 195:1100–1111. doi:10.4049/jimmunol.1403176
- Buret, A. G. 2010. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: the example of tilmicosin. *Can. J. Vet. Res.* 74:1–10. PMC2801304.
- Campillo-Navarro, M., K. Leyva-Paredes, L. Donis-Maturano, M. González-Jiménez, Y. Paredes-Vivas, A. Cerbulo-Vázquez, J. Serafin-López, B. García-Pérez, S. E. Ullrich, L. Flores-Romo, et al. 2017. *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*. 222:432–439. doi:10.1016/j.imbio.2016.08.006
- Cao, X. Y., M. Dong, J. Z. Shen, B. B. Wu, C. M. Wu, X. D. Du, Z. Wang, Y. T. Qi, and B. Y. Li. 2006. Tilmicosin and tylosin have anti-inflammatory properties via modulation of COX-2 and iNOS gene expression and production of cytokines in LPS-induced macrophages and monocytes. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27:431–438. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.12.010
- Dego, O. K., J. E. van Dijk, and H. Nederbragt. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24:181–198. doi:10.1080/1652176.2002.9695135
- Dingwell, R. T., K. E. Leslie, T. F. Duffield, Y. H. Schukken, L. DesCoteaux, G. P. Keefe, D. F. Kelton, K. D. Lissemore, W. Shewfelt, P. Dick, et al. 2003. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of staphylococcus aureus infection in the dry period. *J. Dairy Sci.* 86:159–168. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73596-6
- Er, A., and E. Yazar. 2012. Effects of tylosin, tilmicosin and tulathromycin on inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid of lipopolysaccharide-induced lung injury. *Acta Vet. Hung.* 60:465–476. doi:10.1556/AVet.2012.041
- Ezzat Alnakip, M., M. Quintela-Balujá, K. Böhme, I. Fernández-No, S. Caamaño-Antelo, P. Calo-Mata, and J. Barros-Velázquez. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy

- and inflammatory conditions. *J. Vet. Med.* 2014:659801. doi:10.1155/2014/659801
- Gutiérrez-Barroso, A., J. L. Anaya-López, L. Lara-Zárate, P. D. Loeza-Lara, J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa. 2008. Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121:113–122. doi:10.1016/j.vetimm.2007.09.007
- Ianaro, A., A. Ialenti, P. Maffia, L. Sautebin, L. Rombolà, R. Carnuccio, T. Iuvone, F. D'Acquisto, and M. Di Rosa. 2000. Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:156–163. PMID: 10604943.
- Klein, J. A., T. R. Powers, and L. A. Knodler. 2017. Measurement of salmonella enterica internalization and vacuole lysis in epithelial cells. *Methods Mol. Biol.* 1519:285–296. doi:10.1007/978-1-4939-6581-6\_19
- Li, L., J. Chen, G. Xiong, D. K. St Clair, W. Xu, and R. Xu. 2017. Increased ROS production in non-polarized mammary epithelial cells induces monocyte infiltration in 3D culture. *J. Cell Sci.* 130:190–202. doi:10.1242/jcs.186031
- Ling, Z. 2016. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of tilmicosin- and florfenicol-loaded hydrogenated castor oil-solid lipid nanoparticles. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40:293–303. doi:10.1111/jvp.12356
- López-Boado, Y. S., and B. K. Rubin. 2008. Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8:286–291. doi:10.1016/j.coph.2008.01.010
- 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* infection. *BMC Vet. Res.* 4:18. doi:10.1186/1746-6148-4-18
- Matsunaga, T., S. Kamata, N. Kakiichi, and K. Uchida. 1993. Characteristics of *staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 55:297–300. doi:10.1292/jvms.55.297
- Medina-Estrada, I., J. E. López-Meza, and A. Ochoa-Zarzosa. 2016. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of estradiol in bovine mammary epithelial cells during *staphylococcus aureus* internalization. *Mediators Inflamm.* 2016:6120509. doi:10.1155/2016/6120509
- Mendoza, J., I. Martínez-Cortés, R. López-Ordaz, L. Gutiérrez, and H. Sumano. 2016. Concentrations of tilmicosin in mammary gland secretions of dairy cows following subcutaneous administration of one or two doses of an experimental preparation of tilmicosin and its efficacy against intramammary infections caused by *staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* 77:922–930. doi:10.2460/ajvr.77.9.922
- Menzies, M., and A. Ingham. 2006. Identification and expression of toll-like receptors 1–10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109:23–30. doi:10.1016/j.vetimm.2005.06.014
- Mohammadsadegh, M. 2018. Impact of intramammary tilmicosin infusion as a dry cow therapy. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 41:22–27. doi:10.1111/jvp.12427
- Moloney, J. N., and T. G. Cotter. 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 80:50–64. doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023
- Nickerson, S. C. 2009. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. *Vet. Microbiol.* 134:128–135. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.019
- Ochoa-Zarzosa, A., E. Villarreal-Fernández, H. Cano-Camacho, and J. E. López-Meza. 2009. Sodium butyrate inhibits *staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microb. Pathog.* 47:1–7. doi:10.1016/j.micpath.2009.04.006
- Ou, X. M., Y. L. Feng, F. Q. Wen, K. Wang, J. Yang, Z. P. Deng, D. S. Liu, and Y. P. Li. 2008. Macrolides attenuate mucus hypersecretion in rat airways through inactivation of NF- $\kappa$ B. *Respirology.* 13:63–72. doi:10.1111/j.1440-1843.2007.01213.x
- Paape, M. J., A. V. Capuco, A. J. Guidry, and C. Burvenicht. 1995. Morphology, function, and adaptation of mammary cells in normal and disease states. *J. Anim. Sci.* 73:1–17.
- Reshi, A. A., I. Husain, S. A. Bhat, M. U. Rehman, R. Razak, S. Bilal, and M. R. Mir. 2015. Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 7:48–55.
- Rubin, B. K. 2004. Immunomodulatory properties of macrolides: overview and historical perspective. *Am. J. Med.* 117(Suppl. 9A):2S–4S. doi:10.1016/j.amjmed.2004.07.021
- Scali, F., C. Camussone, L. F. Calvino, M. Cipolla, and A. Zecconi. 2015. Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? *Res. Vet. Sci.* 100:88–99. doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.019
- Scorneaux, B., and T. R. Shryock. 1999. The determination of the cellular volume of avian, porcine and bovine phagocytes and bovine mammary epithelial cells and its relationship to uptake of tilmicosin. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 22:6–12. doi:10.1046/j.1365-2885.1999.00185.x
- Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491. doi:10.1051/vetres:2003027
- Sharma, N., and D. K. Jeong. 2013. Stem cell research: a novel boulevard towards improved bovine mastitis management. *Int. J. Biol. Sci.* 9:818–829. doi:10.7150/ijbs.6901
- Shinkai, M., G. H. Foster, and B. K. Rubin. 2006. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290:L75–L85. doi:10.1152/ajplung.00093.2005
- Shinkai, M., Y. S. López-Boado, and B. K. Rubin. 2007. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1096–1101. doi:10.1093/jac/dkm084
- Shompole, S., K. T. Henon, L. E. Liou, K. Dziewanowska, G. A. Bohach, and K. W. Bayles. 2003. Biphasic intracellular expression of *staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for agr-mediated diffusion sensing. *Mol. Microbiol.* 49:919–927. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03618.x
- Simone Reuter, B. B. A. 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med.* 49:1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006. Oxidative
- Singh, K., R. A. Erdman, K. M. Swanson, A. J. Molenaar, N. J. Maqbool, T. T. Wheeler, J. A. Arias, E. C. Quinn-Walsh, and K. Stelwagen. 2010. Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 15:101–112. doi:10.1007/s10911-010-9164-2
- Son, Y., S. Kim, H. T. Chung, and H. O. Pae. 2013. Reactive oxygen species in the activation of MAP

- kinases. *Methods Enzymol.* 528:27–48. doi:10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1.
- Stuart, A. D., T. D. K. Brown, and J. B. Tasker. 2007. Intracellular accumulation and trans-epithelial transport of Aivlosin, Tylosin and Tilmicosin. *Pig J.* 60:26–35.
- Van Bambeke, F., C. Gerbaux, J. M. Michot, M. B. d'Yvoire, J. P. Montenez, and P. M. Tulkens. 1998. Lysosomal alterations induced in cultured rat fibroblasts by long-term exposure to low concentrations of azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:761–767. doi:10.1093/jac/42.6.761
- Viguié, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck, and R. O'Kennedy. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27:486–493. doi:10.1016/j.tibtech.2009.05.004
- Wei, Z., C. Xiao, C. Guo, X. Zhang, Y. Wang, J. Wang, Z. Yang, and Y. Fu. 2017. Sodium acetate inhibits staphylococcus aureus internalization into bovine mammary epithelial cells by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Microb. Pathog.* 107:116–121. doi:10.1016/j.micpath.2017.03.030
- 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.* 140:181–189. doi:10.1016/j.vetimm.2010.11.013
- Yang, W., H. Zerbe, W. Petzl, R. M. Brunner, J. Günther, C. Draing, S. von Aulock, H. J. Schuberth, and H. M. Seyfert. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from staphylococcus aureus and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- $\kappa$ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol. Immunol.* 45:1385–1397. doi:10.1016/j.molimm.2007.09.004
- Zhao, X., and P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim. Sci.* 86(13 Suppl.):57–65. doi:10.2527/jas.2007-0302
- Zheng, L., Y. Xu, J. Lu, M. Liu, Bin Dai, J. Miao, and Y. Yin. 2016. Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by staphylococcus aureus, *Escherichia coli* and the regulating effect of taurine on these bioprocesses. *Free Radic. Biol. Med.* 96:166–180. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.022