



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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**INMUNOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**Efecto de la tilmicosina en la regulación de NF- $\kappa$ B en células**  
**MAC-T**

**T E S I S**

**Que para optar por el grado de**  
**Maestro en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**PRESENTA**

Erick Yoshimi González Tinajero

**Tutor principal:**

José Luis Maravillas Montero-CIC-UNAM-RAI-INCMNSZ

**Miembros del comité tutor:**

Inda Marcela Figueroa Ochoa-FMVZ-UNAM

Lourdes Andrea Arriaga Pizano-IMSS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Marzo 2020



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.

### *Dedicatorías:*

Dedico este trabajo a Yeshua mi Señor y salvador y al Padre mi Dios eterno YAWH que sin su perdón y misericordia nada de esto hubiera sido posible. Gracias Dios por la sabiduría y guía que me has brindado y por la profecía que me diste lo cual hizo posible que me dedicara a la ciencia.

### **Agradecimientos**

Gracias a mis padres por su apoyo, disciplina y amor.

A mis hermanos que me enseñaron tanto y nunca cerraron su mano para brindarme ayuda.

Al Dr. José Luis Maravillas Montero que aceptó ser mi tutor y siempre estuvo dispuesto a enseñarme y que me aceptó en su grupo de trabajo.

A mis compañeros de la RAI y el INCMNSZ por sus amistad, apoyo y compañía.

A la UNAM y a la FMVZ por su calidez y atención del personal.

A mi comité tutor, al Honorable Jurado y los médicos que apoyaron este trabajo.

A los chicos de microbiología de la FMVZ y el grupo de la UIM en Inmunoquímica del Centro Médico Siglo XXI.

## **Financiamientos**

- CONACyT 240314
- UNAM-DGAPA-PAPIIT IA202318

## Resumen

La mastitis bovina, es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria que ocasiona grandes pérdidas económicas. *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico del 30% de los casos, en donde se sabe que preferentemente se producen moléculas antiinflamatorias como TFG- $\beta$ , IL-10, así como rearrreglos del citoesqueleto, con discreta activación de NF- $\kappa$ B en las células alveolares mamarias bovinas. Se ha reportado que diversos macrólidos como la tilmicosina (TMS) ejercen funciones inmunomoduladoras, sin embargo se desconoce los detalles moleculares de dichos efectos. Para conocer si el tratamiento con TMS pre y post-infección modula la vía de NF- $\kappa$ B en células alveolares mamarias bovinas inmortalizadas (MAC-T) infectadas con *S. aureus*, se cultivaron células MAC-T en medio DMEM incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se generó un modelo de expresión de Proteína Verde Fluorescente (GFP)-RelA (subunidad de NF- $\kappa$ B) en células MAC-T utilizando dosis crecientes de lipofectamina 2000<sup>®</sup> (1, 1.5, 2, 4,  $\mu$ L) + 5  $\mu$ g de plásmido GFP-RelA; se obtuvo una eficiencia del 15 % de transfección a la dosis de 1  $\mu$ L de lipofectamina con la cual se trabajó. En las pruebas de infección con *S. aureus* a diferentes MOI (multiplicidad de infección) se encontró una inhibición de la traslocación de RelA a MOI 100:1 vs Ctrl- ( $p < 0.05$ ). En la infección con *S. aureus* + post-tratamiento con TMS se encontró que los niveles de RelA nuclear se recuperaron significativamente ( $p < 0.05$ ) vs *S. aureus*. Lo cual sugiere que la tilmicosina tiene un efecto proinflamatorio protector frente a la infección por *S. aureus* en células MAC-T.

Palabras clave: Mastítis bovina, inflamación, *S. aureus*, NF- $\kappa$ B, células MAC-T, tilmicosina.

## Abstract

Bovine mastitis is an inflammatory disease of the mammary gland tissue that causes severe economic losses. *Staphylococcus aureus* is the main contagious agent of 30% of all cases, where it is known that anti-inflammatory molecules such as TFG- $\beta$  and IL-10 are preferably produced, and responses related to cytoskeleton rearrangements, without significant activation of NF- $\kappa$ B in bovine mammary alveolar cells. It has also been reported that macrolides such as tilimicosin (TMS) exert immunomodulatory functions, however the molecular details are not completely understood. To know the role of TMS treatment in the NF- $\kappa$ B pathway in Inmortalized Bovine Mammary Alveolar Cells (MAC-T) under infection with *S. aureus*, MAC-T cells, were cultured in supplemented DMEM medium and incubated at 37 ° C + 5% CO<sub>2</sub>. Increasing doses of lipofectamine 2000® (1, 1.5, 2, 4,  $\mu$ L) + 5  $\mu$ g of plasmid GFP (Green Fluorescent Protein)-RelA (subunit of NF- $\kappa$ B) were use for generate a model of expression of GFP-RelA protein in MAC-T cells with approximately 15% of GFP positive cells. Firstly our data shows an inhibition of RelA traslocation with multiplicity of infection (MOI) 100:1 vs Ctrl- (p<0.05). In infection with *S. aureus* + TMS post-treatment we observe a statistical significant increase of RelA traslocation (vs *S. aureus*) p<0.05. This data suggest a protective and proinflammatory effect of tilimicosin against *S. aureus* infection in MAC-T cells.

Key Word: Bovine mastitis, inflammation, *S. aureus*, NF- $\kappa$ B, tilimicosin, MAC-T cells.

<b>Índice</b>	
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mastitis bovina .....	<b>1</b>
1.2 Células epiteliales mamarias .....	<b>3</b>
1.3 Reconocimiento de patógenos .....	<b>4</b>
1.4 Vías de señalización de NF- $\kappa$ B .....	<b>8</b>
1.5 Regulación negativa de la vía canónica de NF- $\kappa$ B .....	<b>11</b>
1.6 Vía canónica de NF- $\kappa$ B y $\beta$ -catenina .....	<b>11</b>
1.7 Falta de activación de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> .....	<b>12</b>
1.8 Macrólidos y tilmicosina .....	<b>13</b>
1.9 Efectos inmunomoduladores de la tilmicosina .....	<b>15</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>17</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
4.1 General .....	<b>19</b>
4.2 Particulares .....	<b>19</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>6. LÍMITES Y ALCANCES DE LA TESIS</b> .....	<b>21</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
7.1 Bacterias competentes .....	<b>22</b>
7.2 Transformación bacteriana .....	<b>22</b>
7.3 Propagación de plásmido GFP-RelA .....	<b>23</b>
7.4 Extracción de plásmido .....	<b>24</b>

7.5 Cultivo celular -----	24
7.6 Generación del modelo de expresión del plásmido GFP-RelA -----	24
7.7 Enriquecimiento celular por citometría de flujo ( <i>sorting</i> ) para evaluar la eficiencia de transfección. -----	26
7.8 Crecimiento de la cepa bacteriana de <i>S. aureus</i> -----	27
7.9 Infección de células MAC-T con <i>S. aureus</i> -----	27
7.10 Pre-tratamiento y post-tratamiento con tilmicosina de células infectadas con <i>S. aureus</i> -----	28
7.11 Diseño del experimento -----	29
7.12 Análisis estadístico -----	29
<b>8. RESULTADOS -----</b>	<b>31</b>
8.1 Bacterias competentes <i>E. coli</i> Top10 y transformación bacteriana con plásmido GFP-RelA-----	31
8.2 Extracción del plásmido GFP-RelA -----	31
8.3 Estabilización del cultivo celular MAC-T -----	32
8.4 Generación del modelo de expresión de GFP-RelA -----	33
8.5 Enriquecimiento celular por citometría de flujo ( <i>sorting</i> ) -----	34
8.6 Crecimiento de la cepa de <i>S. aureus</i> ATTC 27543 -----	35
8.7 La infección de células MAC-T con <i>S. aureus</i> a diferentes MOI afecta la traslocación de NF- $\kappa$ B -----	37
8.8 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> a diferentes MOI -----	38
8.9 El pre-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> induce la traslocación de RelA -----	39
8.10 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T pre-tratadas 12h con TMS e infectadas con <i>S. aureus</i> -----	40
8.11 El post-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> aumenta la traslocación de RelA -----	41



8.12 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> y post-tratadas 2h con TMS -----	42
<b>9. DISCUSIÓN</b> -----	<b>43</b>
9.1 RelA se trasloca al núcleo con una baja carga bacteriana de <i>S. aureus</i> -----	43
9.2 Inhibición de la traslocación de RelA en infección con <i>S. aureus</i> a una MOI 50:1 y 100:1 -----	44
9.3 El Pre-tratamiento con TMS recupera la traslocación de NF- $\kappa$ B -----	48
9.4 El Post-tratamiento con TMS aumenta la traslocación de NF- $\kappa$ B -----	49
9.5 Señalización proinflamatoria en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> y tratadas con TMS-----	50
9.6 Posibles eventos moleculares regulados por la TMS en células MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> -----	51
<b>10. CONCLUSIONES</b> -----	<b>52</b>
<b>11. ABREVIATURAS</b> -----	<b>53</b>
<b>12. REFERENCIAS</b> -----	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b> -----	<b>63</b>

## Lista de cuadros

- TABLA 1. Familia de receptores tipo Toll

## Lista de figuras

- **Figura 1.** Frecuencia de microorganismos causantes de mastitis
- **Figura 2.** Morfología de células MAC-T
- **Figura 3.** Características de la inmortalización de las células MAC-T
- **Figura 4.** Estructura de los TLR
- **Figura 5.** Censado de patógeno por TLR y cascadas de señalización
- **Figura 6.** Núcleo de proteínas de señalización de NF- $\kappa$ B
- **Figura 7.** Vía canónica de NF- $\kappa$ B
- **Figura 8.** Estructura de la tilmicosina
- **Figura 9.** Posibles efectos de la tilmicosina sobre las vías de señalización de NF- $\kappa$ B
- **Figura 10.** Mapa del plásmido GFP-RelA
- **Figura 11.** Preparación de lipocomplejos para transfección
- **Figura 12.** Bacterias *E. coli* TOP-10 transformadas con plásmido GFP-RelA
- **Figura 13.** Electroforesis en agarosa de plásmido GFP-RelA purificado
- **Figura 14.** Células MAC-T en cultivo
- **Figura 15.** Generación del modelo de expresión de RelA-GFP en células MAC-T mediante lipofección
- **Figura 16.** Enriquecimiento celular por citometría de flujo (*sorting*) de células MAC-T GFP negativas y positivas
- **Figura 17.** *S. aureus* fermentador de manitol. Agar manitol-sal
- **Figura 18.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T infectadas con *S. aureus* a diferentes MOI

- **Figura 19.** Traslocación relativa de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con *S. aureus* a diferentes MOI
- **Figura 20.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T pre-tratadas con tilmicosina e infectadas con *S. aureus*
- **Figura 21.** Traslocación relativa de NF- $\kappa$ B en células MAC-T pre-tratadas con tilmicosina e infectadas con *S. aureus*
- **Figura 22.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T infectadas con *S. aureus* y post-tratadas con tilmicosina
- **Figura 23.** Traslocación relativa de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con *S. aureus* y post-tratadas con tilmicosina
- **Figura 24.** Respuestas moleculares desencadenadas por la infección de *S. aureus* en células MAC-T
- **Figura 25.** Diagrama de integración de los posibles efectos inmunomoduladores de la TMS en células MAC-T

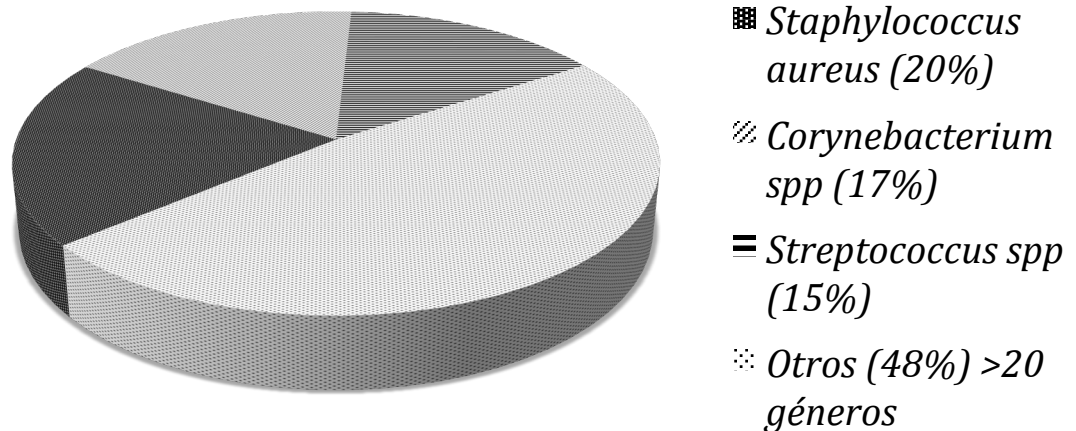
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina, es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria caracterizada por el incremento en el recuento de células somáticas (RCS) en la leche y por cambios patológicos en el tejido mamario (International Dairy Federation, 1987), es un problema significativo en la producción lechera con importantes repercusiones sanitarias y que resulta en un gran daño económico, el cual puede ser directo o indirecto debido a la baja productividad, deterioro en la calidad de la leche, reducción en el precio de venta y desecho de leche contaminada, costo de los antibióticos utilizados, por el sacrificio del animal, incremento en gastos por concepto de reemplazos, pérdidas en el potencial genético, y por los servicios veterinarios, provocando costos de producción más altos (Guirando 1997; Reshi 2015).

En la mastitis bovina contagiosa *S. aureus* es uno de los agentes etiológicos más comunes (Watts, 1988). Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, también la infección puede evolucionar hacia mastitis crónica y subclínica, sin alteración macroscópica de la leche pero con altos recuentos celulares y persistencia de las bacterias en la glándula mamaria. La mastitis subclínica estafilocócica representa el 20% de todos los casos de mastitis bovina (**Fig. 1**) (Halasa 2007; Castañeda 2013), lo que es un serio problema ya que requiere de tratamientos antibióticos prolongados.

## Principales microorganismos causantes de mastitis bovina

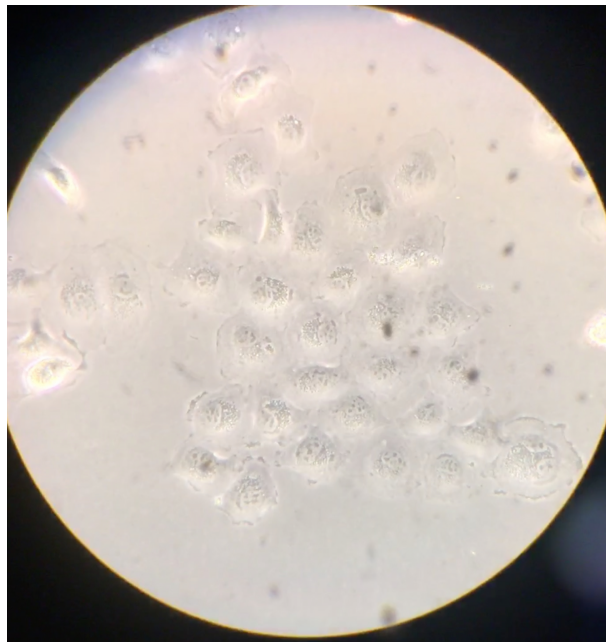


**Figura 1.** Frecuencia de aislamientos de microorganismos de muestras de leche positivas a prueba de california. Datos epidemiológicos del centro del país. Basado en (Castañeda 2013; Miranda-Morales 2008).

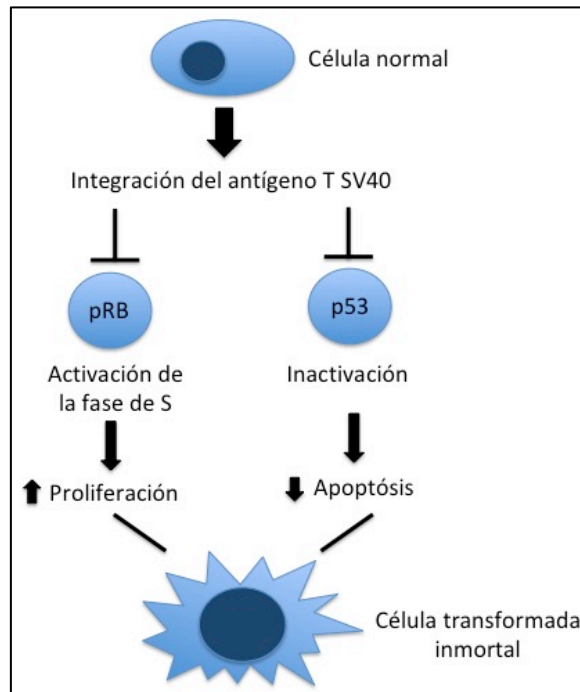
Las células epiteliales mamarias desempeñan un papel esencial en la vigilancia del tejido mamario durante la infección al ayudar al reclutamiento de células del sistema inmunológico y al reconocimiento bacteriano (Gilbert, 2013), por lo cual, además de ser esenciales para la producción de leche, también actúan como la primera línea de defensa contra los organismos patógenos (Bougarn, 2011). Se sabe que *S. aureus* penetra, sobrevive e incluso se multiplica dentro de una gran variedad de células eucariotas, como las células epiteliales de la glándula mamaria o las células inmunitarias (Almeida 1996; Kerro 2002). Esta supervivencia dentro del nicho intracelular protege a las bacterias de los antibióticos y les permite persistir en el hospedador durante mucho tiempo sin causar inflamación aparente (Boulanger 2003; Garzoni, 2009) lo que se asocia con infecciones crónicas y recurrentes (Bardiau 2014; Alva 2015).

## 1.2 Células epiteliales mamarias

Las células alveolares mamarias (MAC-T) son una línea celular clonal establecida a partir de células alveolares mamarias bovinas primarias que muestran la morfología característica de "piedra de río" cuando las células epiteliales se cultivan sobre sustrato plástico (**Fig. 2**). Las células MAC-T son producidas por una transfección estable con el gen del antígeno T grande del poliomavirus SV40 (SV40 LT), que es una oncoproteína hexamérica capaz de inducir la transformación maligna de una variedad de tipos celulares. La acción transformante se debe principalmente a la inactivación de proteínas supresoras de tumores como son las proteínas Retinoblastoma (pRb) (DeCaprio, 1988) y p53 (Ahuja, 2005), así como algunos coactivadores transcripcionales (Ali y DeCaprio, 2001) permitiendo que las células salgan de la fase G1 y entren en la fase S, promoviendo la replicación del ADN (**Fig. 3**). Las células MAC-T por lo tanto son una línea celular inmortal, que presentan una habilidad uniforme de diferenciación (Huynh, 1991).



**Figura 2.** Células MAC-T cultivadas con medio DMEM+10% de suero fetal bovino, en las cuales es posible observar su típica forma de piedra de río. (40x).



**Figura 3.** El antígeno T de SV40 presenta un motivo estructural que codifica un dominio de unión a pRb de alta afinidad (Figge, 1988) (Figge, 1993). Los residuos de TAg 103-109 forman una estructura de bucle extendida que se une fuertemente a un surco superficial de pRb. Además varios enlaces de hidrógeno también estabilizan en complejo TAg-pRb (Kim, 2001). Además el antígeno T se une e inactiva la proteína supresora de tumores p53. Modificado de Hudson (2016).

### 1.3 Reconocimiento de patógenos

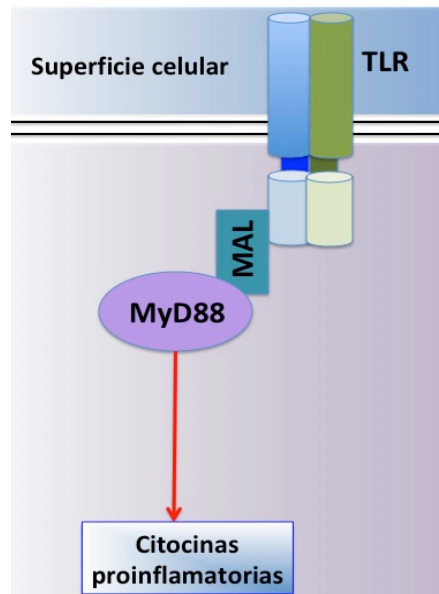
La respuesta inmune innata se basa en el reconocimiento de estructuras conservadas evolutivamente en patógenos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados por línea germinal, de los cuales la familia de receptores de tipo Toll (TLR) se ha estudiado más extensamente (**Tabla 1**) (Akira 2006; Medzhitov 2000).

Tabla 1. Reconocimiento de componentes microbianos por PRR.			
Receptor	Localización celular	Componente microbiano	Origen
TLR1/TLR2	Superficie celular	Triacil lipopéptidos	Bacteriano
TLR2/TLR6	Superficie celular	Diacil lipopéptidos Ácido lipoteicoico	Micoplasma Bacteria Gram positiva
TLR2	Superficie celular	Lipoproteínas Peptidoglicano Lipoarabinomanano Porinas Glicoproteínas de envoltura GPI-mucina Fosfolipomanano Zimosano $\beta$ -glicano	Diversos patógenos Bacterias Gram positivas y negativas Micobacterias <i>Neisseria</i> Virus Protozoarios <i>Candida</i> Hongos <i>Hongos</i>
TLR3	Superficie celular/endosomas	dsRNA (RNA de doble cadena)	Virus
TLR4	Superficie celular	LPS (lipopolisacárido) Glicoproteínas de envoltura Manano Glicoinositolfosfolípidos HSP-70 (proteína de choque térmico de 70 kDa)	Bacterias Gram negativas Virus <i>Candida</i> Protozoarios Hospedero
TLR5	Superficie celular	Flagelina	Bacterias flageladas
TLR7/TLR8	Endosoma	ssRNA (RNA de cadena sencilla)	Virus de RNA
TLR9	Endosoma	CpG DNA	Virus, Bacterias

Tomado de Mogensen, (2009).



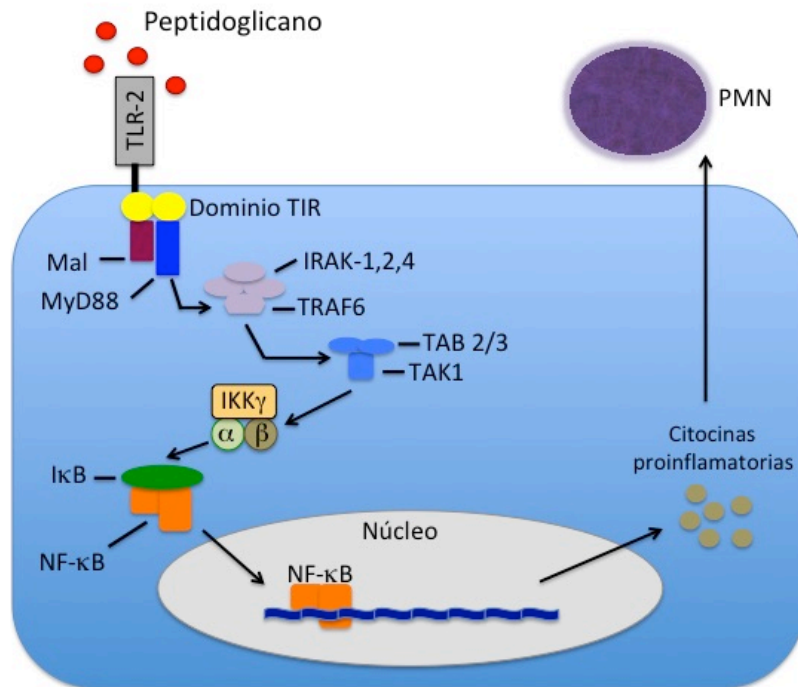
Tras el reconocimiento de PAMP, los PRR desencadenan respuestas que en muchos casos llevarán a la producción de citocinas proinflamatorias mediante la activación de múltiples vías de señalización intracelular, que incluyen moléculas adaptadoras, cinasas y factores de transcripción que inducirán, entre otros efectos el reclutamiento de polimorfonucleares (PMN) al sitio de infección (**Fig. 4**) (Akira, 2006).



**Figura 4.** Estructura de los TLR y moléculas accesorias. Modificado de Mogensen (2009).

Estructuralmente los TLR son glicoproteínas integrales caracterizadas por un dominio de unión al ligando extracelular o luminal que contiene motivos repetidos ricos en leucina y un dominio citoplásmico de señalización homólogo del receptor Toll / interleucina 1 (TIR). La unión del ligando a los TLR a través de la interacción PAMP-TLR induce la oligomerización del receptor, que posteriormente desencadena la transducción de la señal intracelular (O'Neill, 2007). La distinción adicional entre diferentes PAMP se logra a través de la formación de heterodímeros entre TLR2 y TLR1 o TLR6 (Ozinsky, 2000).

Por otra parte, existen familias de adaptadores que pueden ser utilizados como moléculas adaptadoras individuales o combinaciones de moléculas que puede explicar, hasta cierto punto, las respuestas diferenciales inducidas por diferentes TLR, tal es el caso de MyD88 que es utilizado por TLR2 (Ozinsky 2000; Schwandner 1999; Yoshimura 1999). De esta forma, la señalización inducida por TLR se puede dividir en gran parte en rutas dependientes de MyD88 e independientes de MyD88, que ambas son capaces de activar NF- $\kappa$ B, aunque cada una activa componentes de señalización adicionales (**Fig. 5**) (Mogensen, 2009).

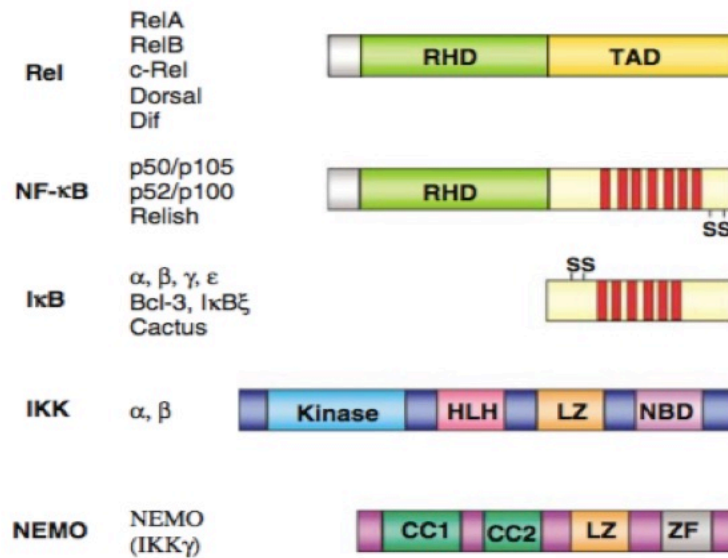


**Figura 5.** Los patógenos que ingresan a la glándula mamaria son reconocidos por receptores tipo Toll (TLRs) (Takeuchi, 2010), que reconocen los patrones moleculares microbianos desencadenando la inflamación (Akira, 2006). Las vías de señalización de TLR activan una serie de cascadas de señalización en sentido descendente. Además, estos receptores usan mecanismos de transducción de señales que incluyen la activación de I $\kappa$ B cinasa (IKK) y traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo (Ghosh, 2002). Modificado de Luke, (2013).

#### 1.4 Vía de señalización de NF- $\kappa$ B

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la activación coordinada de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores pro y antiinflamatorios en células de tejidos residentes y leucocitos reclutados en la sangre. NF- $\kappa$ B se ha considerado durante mucho tiempo una vía prototípica de señalización proinflamatoria, basada principalmente en la expresión de otros genes proinflamatorios que incluyen citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión. (Lawrence, 2009). Las estructuras generalizadas de las subfamilias del núcleo de señalización NF- $\kappa$ B se muestran en la **(Fig.6)**.

Las subfamilias Rel y NF- $\kappa$ B tienen un dominio de dimerización/unión a ADN conservado llamado dominio de homología Rel (RHD), que también tiene secuencias importantes para la localización nuclear y la unión del inhibidor de I $\kappa$ B. Las porciones C-terminales de las proteínas Rel tienen dominios de activación transcripcional (TAD). Por otra parte las porciones C-terminales de las proteínas de la subfamilia NF- $\kappa$ B tienen dominios inhibidores que contienen repeticiones de ankirina (barras rojas), que pueden eliminarse mediante proteólisis mediada por proteasoma. Al igual que con los dominios C-terminales de las proteínas de la subfamilia NF- $\kappa$ B, las proteínas de la subfamilia I $\kappa$ B independientes consisten principalmente en las repeticiones de ankirina (barras rojas), y varias de estas proteínas (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ ) presentan dos residuos serina N-terminal (S) que sirven como sitios de fosforilación IKK, que a su vez señalan a la proteína para su ubiquitinación y degradación. Las estructuras generalizadas de las proteínas de la subfamilia IKK: IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  presentan diversos dominios, entre ellos: el dominio cinasa, hélice-lazo-hélice (HLH), cremallera de leucina (LZ) y dominio de unión a NEMO (NBD). Por último la subfamilia NEMO presenta los siguientes dominios espiral en espiral (CC), cremallera de leucina (LZ) y el dominio (ZF) dedo de zinc (Gilmore, 2006).



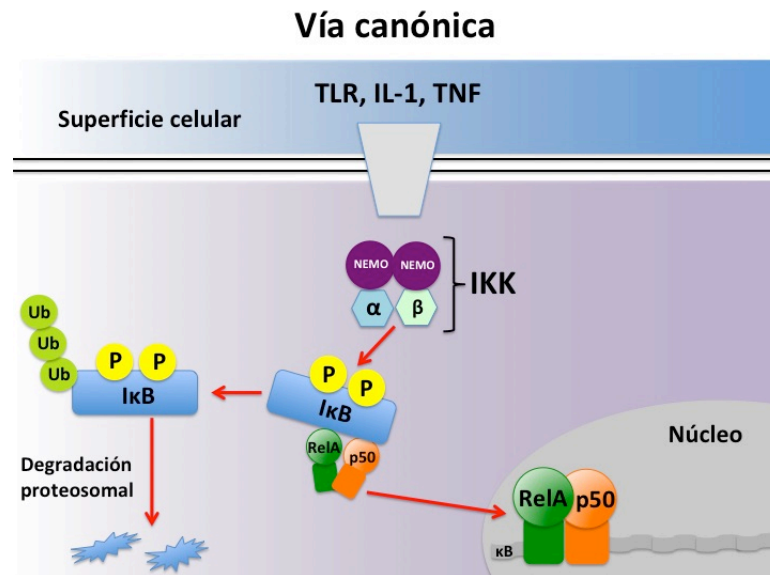
**Figura 6.** Núcleo de proteínas de señalización de NF-κB. Tomado de Gilmore, (2006).

En los últimos años ha quedado claro que existen al menos tres vías separadas para la activación de NF-κB: La vía canónica, la vía no canónica y la vía 3. La “vía canónica” es desencadenada por productos microbianos y citocinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α (TNFα) e interleucina 1 (IL-1), lo que generalmente conduce a la activación de complejos que contienen un miembro de la familia Rel (RelA o cRel) y un miembro de la familia de NF-κB (p50) (Karin y Ben-Neriah 2000). El complejo IKK consiste en dos subunidades de cinasas, IKKα (IKK1) e IKKβ (IKK2) y una subunidad reguladora IKKγ (NEMO). IKKβ regula la activación de la vía canónica a través de la fosforilación de IκB y requiere de la subunidad IKKγ pero no de IKKα (Zandi, 1997). En la vía no canónica se ocupa RelB como subunidad de NF-κB, mientras que en la vía 3 la señalización es independiente de los miembros Rel (Gilmore, 2006).

NF-κB (heterodímero RelA/p50) existe en el citoplasma en una forma inactiva asociada con proteínas reguladoras llamadas inhibidores de κB (IκB), de las cuales las más importantes pueden ser IκBα, IκBβ e IκBε, estas se unen a NF-κB

inactivándolo. La activación de IKK inicia la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en residuos específicos de serina NH2-terminales, de este modo, desencadena la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  dependiente de ubiquitina en el proteosoma 26S (Chen, 1995), liberando así a NF- $\kappa$ B del complejo citoplásmico unido a I $\kappa$ B, permitiendo la traslocación de NF- $\kappa$ B (miembros canónicos) al núcleo celular. Los cuales se unen a elementos potenciadores  $\kappa$ B de genes blanco, permitiendo la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas (Gilbert, 2013), tales como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que están asociadas con el desencadenamiento de la reacción inflamatoria (**Fig. 7**) (Neyrinck, 2013)

La activación de NF- $\kappa$ B también está ampliamente implicada en enfermedades inflamatorias (Tak, 2001) y se ha prestado mucha atención al desarrollo de fármacos antiinflamatorios dirigidos a NF- $\kappa$ B.



**Figura 7.** Vía canónica resumida de NF- $\kappa$ B. Modificado de Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009; 1 (6): a001651.

## 1.5 Regulación negativa de la vía canónica de NF- $\kappa$ B

La inflamación es un proceso biológico necesario para proteger al organismo de agentes dañinos de forma inmediata y mediante una respuesta a largo plazo para promover su resolución. Por lo cual, posterior al inicio de la activación de cascadas de señalización proinflamatorias mediadas por PRR, se llevan a cabo mecanismos de regulación negativa para disminuir o atenuar la inflamación evitando una respuesta exacerbada.

Los componentes celulares que regulan tanto la activación como la inhibición del proceso inflamatorio están interconectadas en complejas redes de señalización, coordinadas para llevar a cabo un balance en la respuesta inmune del hospedero. Muchos de estos efectores activadores involucran la vía de NF- $\kappa$ B y moléculas relacionadas como IKK, mientras que los mecanismos reguladores negativos son auto-generados a través de retroalimentaciones negativas, tales como I $\kappa$ B y A20, los cuales convergen en la inhibición de NF- $\kappa$ B. Además, esta señalización negativa involucra diferentes niveles de regulación, tanto a nivel post-transcripcional como post-traducciona, involucrando a componentes esenciales de las vías de señalización. Algunos de los reguladores negativos incluyen: microRNA, proteínas de unión a RNA, fosforilaciones de los componentes de la vía, proteínas ubiquitin-ligasas, NLR, *splicing* alternativo de genes, e interacciones proteína-proteína. (Rothschild, 2018).

## 1.6 Vía canónica de NF- $\kappa$ B y $\beta$ -catenina

La interacción de las vías de señalización, tiene como consecuencia una mayor capacidad regulatoria y funcional de las vías independientes; lo que ayuda a tener mayor especificidad frente a las señales que regulan las respuestas biológicas en tiempo y espacio.

Tal es el caso de  $\beta$ -catenina, la cual presenta entre sus funciones, el ser una molécula de adhesión asociada a la membrana plasmática que permanece gracias a la señalización de Wnt. En ausencia de la estimulación por Wnt,  $\beta$ -catenina se libera en el citosol para ser fosforilada por CKI y GSK3 lo cual induce su posterior marcaje por ubiquitina y degradación vía proteosomal. Por otra parte hay estudios en los cuales se ha reportado que existe una interacción entre  $\beta$ -catenina y NF- $\kappa$ B, disminuyendo la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, lo cual indica una función antiinflamatoria de  $\beta$ -catenina; además se sugiere que  $\beta$ -catenina pudiera estabilizar a I $\kappa$ B incrementando la retención citoplásmica de NF- $\kappa$ B (Ma, 2016).

### **1.7 Falta de activación de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con *S. aureus***

Las infecciones por *S. aureus* en la glándula mamaria bovina causan generalmente mastitis con presentaciones subclínicas y crónicas. Existen estudios que indican la activación de NF- $\kappa$ B en células fagocíticas profesionales y células epiteliales (RAW 264.7 y HEK 293, respectivamente) infectadas con *S. aureus*. Sin embargo, en células epiteliales mamarias bovinas NF- $\kappa$ B no se activa de forma significativa con *S. aureus* (Günther, 2016).

Así mismo se sabe que TLR2 soluble en leche materna puede inhibir la señalización mediada por TLR2 membranal. En este mismo sentido, en células mamarias bovinas infectadas por *S. aureus* se lleva a cabo la producción de TGF- $\beta$ , lo cual induce la ubiquitinación de MyD88 y su posterior degradación en el proteosoma, bloqueando las vías de TLR dependientes de este factor. (Yang, 2008).

Por otra parte, se ha reportado que en modelos de infección de glándula mamaria bovina con *S. aureus*, los perfiles de transcritos evidencian una respuesta que involucra principalmente la regulación de vías relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto permitiendo una rápida internalización en la barrera

epitelial. Por otra parte los reguladores principales de vías de señalización expresadas bajo la infección pertenecen a reguladores tales como TGFB1 y ESR1, conocidos por sus funciones inmunosupresoras; además de la producción del factor CTNRC1 estimulador de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina lo cual podría explicar la baja intensidad de la respuesta inmune de la glándula mamaria frente a *S. aureus*. (Günther, 2017).

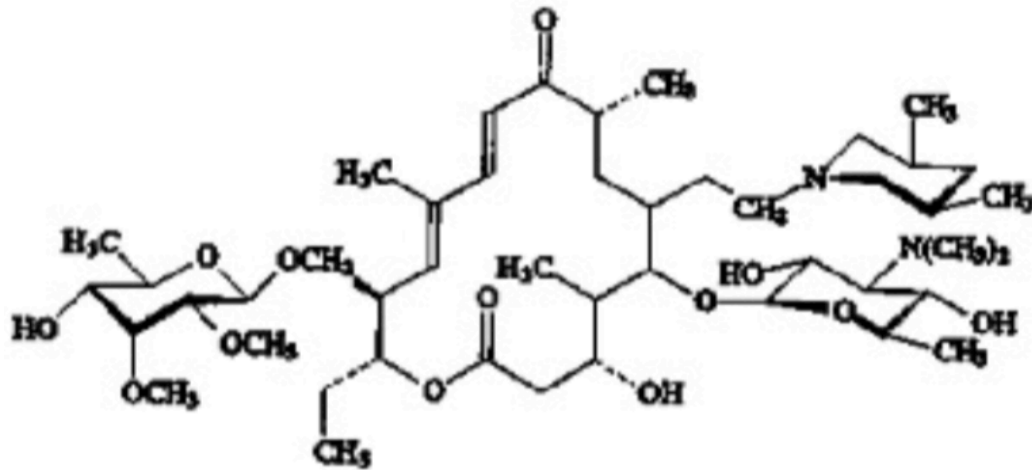
Experimentos en células endoteliales bovinas infectadas con *S. aureus*, demuestran que la activación de NF- $\kappa$ B se lleva a cabo solamente en etapas tempranas de infección (<40 min). Posterior a este tiempo, NF- $\kappa$ B es inhibido. Este *switch* molecular de pro-inflamación/anti-inflamación es regulado principalmente por la actividad de GSK3 $\alpha/\beta$  (ambas) que durante la infección con *S. aureus* en etapas tardías (>120min), es fosforilado a un estado inactivo (mediado por Akt), inhibiendo la actividad de NF- $\kappa$ B; disminuyendo los niveles de IL-8 e incrementando los niveles de IL-10, lo que conlleva a una supresión del sistema inmunológico y una respuesta tolerogénica frente al patógeno. (Silva-García, 2018).

### **1.8 Macrólidos y tilmicosina**

Los macrólidos son una familia bien establecida de antibióticos aislados de estreptomicetos. Su principal característica estructural es que consta de un anillo de lactona macrocíclica con uno o dos restos de azúcar. Entre sus características más importantes se encuentran: un espectro moderadamente amplio de actividad antibacteriana por administración oral y un índice terapéutico relativamente alto. Los macrólidos son más conocidos como antibióticos pero también ejercen otros efectos farmacológicos importantes, como la inmunosupresión y la inmunomodulación. La TMS es un antibiótico macrólido sintetizado a partir de la tilosina la cual es ampliamente utilizada en medicina veterinaria. Se puede afirmar



que es un antibiótico predominantemente no iónizado, altamente liposoluble y que se liga parcialmente a proteínas plasmáticas. Debido a que la TMS es una base orgánica débil, tiende a concentrarse en sitios ácidos. Estas características explican porque la TMS alcanza altas y persistentes concentraciones en los tejidos, que siempre tienen un pH algo inferior al del plasma, más aun en aquellos que se encuentran infectados. (Fig. 8).



**Figura 8.** Estructura química de la tilmicosina, nótese el anillo macrocíclico de lactona unido a diversos desoxiazúcares. Tomado de Mestorino, (2004).

Por otra parte, se sabe que los macrólidos, en particular la TMS tiene una fuerte interacción con las células epiteliales de la glándula mamaria, y presenta una localización intracelular y en un 70-80% se encuentra a nivel lisosomal. Estas características juegan un papel fundamental en la eficacia frente a microorganismos intracelulares.

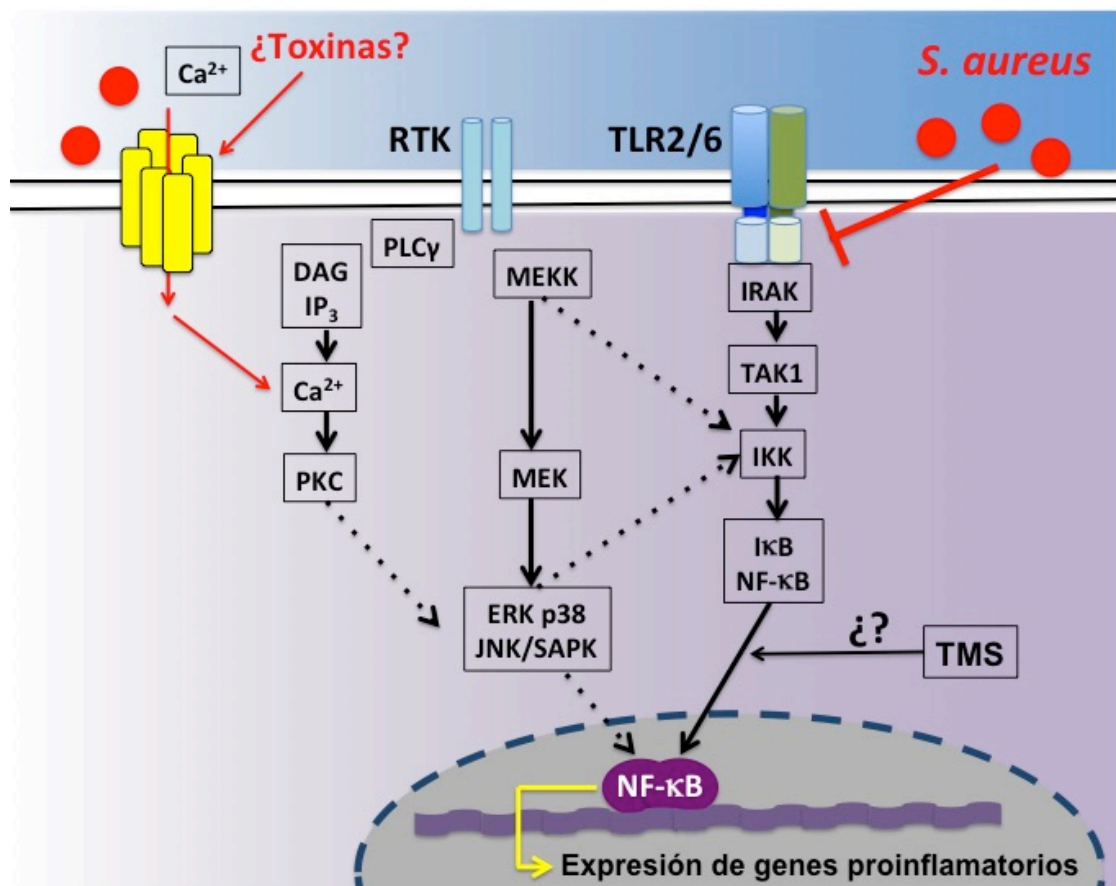
La TMS tiene amplio espectro, con actividad muy significativa frente a bacterias Gram positivas, siendo un antibiótico efectivo en casos de infección por *S. aureus* en donde se reporta una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.78 µg/ ml. (Ose 1987; Mestorino 2004).

### 1.9 Efectos inmunomoduladores de la tilmicosina.

Se ha reportado que diversos macrólidos pueden tener propiedades anti-inflamatorias mediante diversos mecanismos, uno de ellos es reduciendo la acumulación de células inflamatorias tales como PMN, leucocitos mononucleares y linfocitos en sitios de infección (Kanoh, 2010). Otros estudios recientes sugieren que la capacidad anti-inflamatoria de la TMS se da mediante la inducción de apoptosis de los neutrófilos en bovinos; esto, a su vez, evita la liberación de contenido pro-inflamatorio *in situ* por las células en desgranulación y, por lo tanto, contribuye significativamente a la resolución de la inflamación. Finalmente, la apoptosis inducida por tilmicosina en PMN bovinos se asocia con un aumento en la translocación de fosfatidilserina de la cara interna del PMN a la cara externa; lo que resulta en una mayor fagocitosis de PMN por parte de los macrófagos, además de la inhibición de producción de leucotrieno B4 (LTB4) molécula que aumenta la permeabilidad vascular, generando edema en los procesos inflamatorios crónicos.

Un punto importante a destacar es que se ha demostrado que diversos macrólidos (además de los efectos anti-inflamatorios que se mencionaron anteriormente) ejercen funciones inmunomoduladoras a través de la regulación de vías de señalización involucradas en la activación de NF- $\kappa$ B en distintos linajes celulares (Aoki 1999; Desaki 2000; Desaki 2004; Ichiyama 2001; Yosuke 1999), sin embargo, se desconocen las proteínas específicas o receptores dirigidos por los macrólidos que afectan la vía de NF- $\kappa$ B (**Fig. 9**) (Kanoh, 2010).

Por otro lado, en estudios de toxicidad por TMS, se ha reportado su capacidad de aumentar los niveles hepáticos del mRNA de las proteínas HSP70 y NF- $\kappa$ B, además de disminuir la capacidad total antioxidante hepática; lo cual podría contraponerse a su efecto anti-inflamatorio que es observado en otras células; indicando que el efecto de la TMS podría depender del tipo celular involucrado (Farag, 2019).



**Figura 9.** Posibles efectos de la tilmicosina (TMS) sobre las vías de señalización de NF-κB. Modificado de Kanoh, (2010).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que las respuestas celulares a *S. aureus* difiere según los tipos celulares implicados. En el caso de células MAC-T, la falta de activación de NF- $\kappa$ B por este patógeno desencadena un ambiente anti-inflamatorio en células epiteliales mamarias bovinas. Por otra parte la respuesta inflamatoria puede ser regulada por la aplicación de ciertos antibióticos como los macrólidos (usados en medicina veterinaria y humana), que se sabe tienen efectos inmunomoduladores. Tal es el caso de la TMS, macrólido que ha demostrado tener buenos efectos antibióticos e inmunomoduladores en medicina veterinaria principalmente en problemas de mastitis en ganado bovino (Culic, 2001), sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales se puede modular la respuesta inmune en células epiteliales mamarias bovinas.

Datos recientes de un trabajo realizado en células MAC-T infectadas con *S. aureus* que fueron pretratadas con tilmicosina (12 horas antes de la infección) demostraron que hubo una disminución en la producción IL-1 $\beta$  e IL-6. Así mismo en células MAC-T infectadas con *S. aureus*, pre-tratadas con tilmicosina (12 horas de la infección) y tratadas post-infección (2 horas después), hubo una disminución sustancial en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por otra parte se observó con el pre-tratamiento con TMS un aumento en la fosforilación de ERK y disminución en p-p38. (Martínez-Cortés, 2019).

Considerando estos datos, la actividad de NF- $\kappa$ B pudiera ser regulada por el uso de TMS modulando la respuesta proinflamatoria en células MAC-T.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los macrólidos, en particular la TMS tiene una fuerte interacción con las células epiteliales de la glándula mamaria. Por otra parte su concentración intracelular se manifiesta en un 70-80% a nivel lisosomal, lo que permite la eficacia frente a microorganismos intracelulares. La TMS tiene amplio espectro, con gran efectividad frente a bacterias Gram positivas, siendo un antibiótico efectivo en casos de infección por *S. aureus* (Ose, 1987; Mestorino, 2004). Además se sabe que diversos macrólidos ejercen funciones inmunomoduladoras a través de la modificación de vías de señalización que involucran a NF- $\kappa$ B en distintos linajes celulares (Aoki, 1999; Desaki, 2000; Desaki, 2004; Ichiyama, 2001; Yosuke, 1999); sin embargo, se desconoce si la TMS regula la vía de NF- $\kappa$ B en células MAC-T (Kano, 2010).

Se sabe así mismo que en la infección con *S. aureus* se activan proteínas tirosina cinasas (PTK) que inhiben la función de NF- $\kappa$ B, y que algunos macrólidos como eritromicina y azitromicina pueden inhibir las PTK, por lo que la TMS pudiera regular la función de NF- $\kappa$ B en células MAC-T.

Por lo cual estudiar la función de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con *S. aureus* y tratadas con TMS, nos permitirá conocer más acerca de los detalles moleculares que regulan la respuesta inflamatoria en células MAC-T y de qué forma puede ser modulada esta respuesta mediante la administración de fármacos prometedores como la TMS, para poder tratar de forma más eficiente las infecciones frente a *S. aureus* y evitar así la pérdida del potencial productivo en ganado bovino lechero.

## 4. OBJETIVOS

- **General**

Determinar si la exposición a TMS modifica la localización subcelular de NF- $\kappa$ B en células MAC-T infectadas con *S. aureus*, mediante el tratamiento de células MAC-T con TMS en un modelo de infección con *S. aureus*, para determinar si el mecanismo de acción de la TMS como inmunomodulador es a través de la regulación de NF- $\kappa$ B.

- **Particulares**

1. Generar un modelo para identificar la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B transfectando células MAC-T con el plásmido GFP-RelA mediante lipofección.
2. Evaluar que efecto tienen las diferentes dosis de *S. aureus* en la traslocación de NF- $\kappa$ B.
3. Evaluar el efecto del pre y post-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus* sobre la traslocación de NF- $\kappa$ B, mediante el conteo de núcleos RelA positivos.

## 5. HIPÓTESIS

La exposición a la TMS recupera la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo en células MAC-T infectadas con *S. aureus*.

## 6. LÍMITES Y ALCANCES DE LA TESIS

El presente trabajo, tiene como uno de sus principales objetivos el estudiar un modelo de infección de células MAC-T con *S. aureus*, bajo el tratamiento con TMS. En este linaje celular, no se ha reportado la influencia de la TMS sobre NF- $\kappa$ B, lo cual permitirá complementar la información obtenida por nuestro grupo de trabajo (Martínez-Cortés, 2019) y aportará en el ámbito microbiológico información relacionada con la infección por *S. aureus*. Así mismo en disciplinas como la farmacología se reportará información nueva de la TMS como inmunomodulador y de forma muy significativa en la rama de la inmunología se reportará información nueva en relación a la regulación del proceso inflamatorio por las células MAC-T. Y por último y no menos importante, se incluirá la relevancia clínica en el uso de la TMS. Si bien es factible que estos resultados se reflejen *in vivo*, la limitante principal de este trabajo es que se está trabajando con un modelo reduccionista que no incluye todas las condiciones que concurren en un animal infectado.



## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Bacterias competentes

Se utilizaron bacterias competentes TOP10 proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Maravillas de la RAI-INCMNSZ-UNAM.

### 7.2 Transformación bacteriana

Para la transformación bacteriana se le agregó a las células competentes *E. coli* Top10  $\beta$ -mercaptoetanol (al 1.8% v/v preparado con agua estéril) 1/10, se añadió el plásmido GFP-RelA de addgene<sup>®</sup> No. De catálogo 23255 (**Fig. 10**) a una concentración de 10-15 ng/ $\mu$ l, se mantuvo durante 30 minutos en hielo, posteriormente se colocó durante 1 minuto en baño maría a 42 °C, inmediatamente se pasaron a hielo durante 1 min, se añadió 1 ml de medio LB, se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C en agitación, se retiró la mayor parte del medio por decantación dejando aproximadamente 50  $\mu$ l de medio, en el cual se resuspendieron las células y se plaquearon en agar LB con kanamicina a una concentración de 30  $\mu$ g/ml para seleccionar las bacterias transformadas, se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

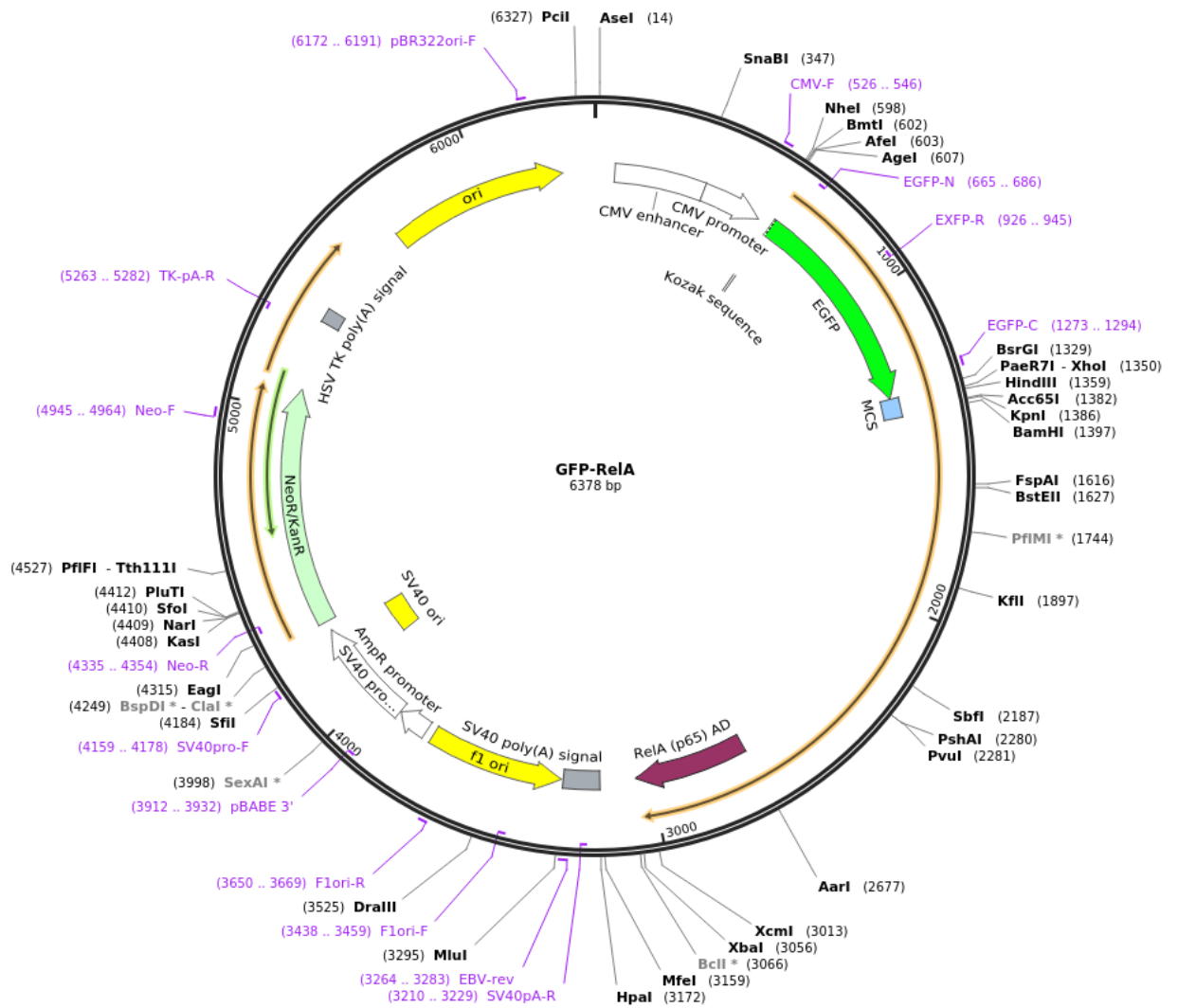


Figura 10. Mapa del plásmido GFP-RelA

### 7.3 Propagación de plásmido GFP-RelA

Posteriormente, de las bacterias que crecieron en el agar LB, se seleccionó una colonia y con ella se inocularon 10ml de medio LB con kanamicina a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , se incubó a 24 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$  en agitación (230 rpm) y una vez observado el crecimiento (turbidez del medio) se tomaron 2 ml para

inocular 300 ml de medio LB con kanamicina a una concentración de 30 µg/ml para la obtención de mayor cantidad de bacterias transformadas para la extracción del plásmido.

#### **7.4 Extracción de plásmido**

Se llevó a cabo mediante el kit: PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit de Invitrogen®. No. De catálogo K210004.

#### **7.5 Cultivo celular**

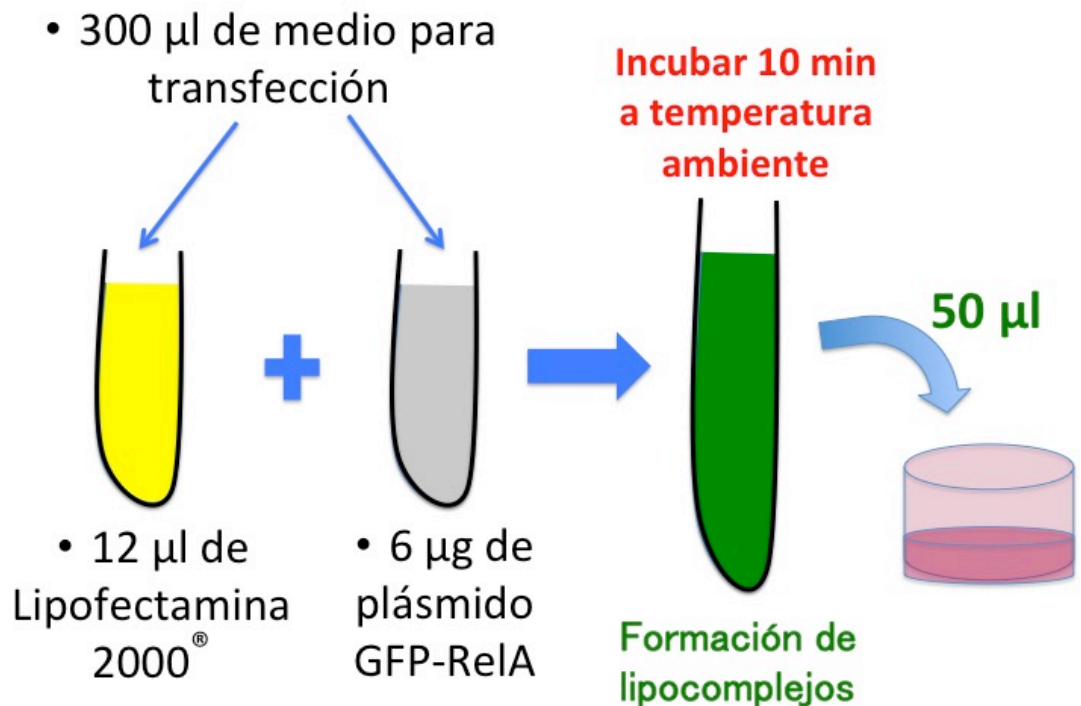
Las células MAC-T fueron cultivadas en medio DMEM (ThermoFisher SCIENTIFIC®) adicionado con suero fetal bovino descomplementado al 10%, glutamina al 2%, 100UI de antibiótico (penicilina y estreptomicina) y 0.25 µg/ml antimicótico (anfotericina) CAISSON® No. De catálogo ABL02. Las células fueron incubadas a 37 °C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Se cultivaron hasta una monocapa confluyente de aproximadamente el 80% en cajas p25. Para la expansión del cultivo se retiró el medio, seguido de 2 lavados con PBS estéril, una vez retirado el PBS, para despegar las células se agregó 2 ml de tripsina-EDTA al 0.025% en incubación por 1.5 min. Posteriormente fueron lavadas con PBS estéril en centrifugación a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el *pellet* celular fué resuspendido en 1ml de medio para cuantificar las células en cámara de Neubauer y ser sembradas en cantidad de 100,000 células por caja en 4-5 ml de medio DMEM nuevo.

#### **7.6 Generación del modelo de expresión del plásmido GFP-RelA**

Cultivos de la línea celular MAC-T sembradas en placa de 24 pozos al 70% de confluencia ( $2 \times 10^4$  células aprox.) se les retiró el medio, seguido de un lavado con PBS. Se llevó a cabo una curva de volumen de lipofectamina sin modificar la concentración de plásmido: utilizando 1, 1.5, 2, 2.5 y 4 µl de lipofectamina en tubos individuales diluida en 50 µl de medio para transfección cada volumen; por

otra parte se preparó una solución master mix de plásmido (5 µg) diluido en 250 µl de medio para transfección. Se mezclaron 50 µl del master mix de plásmido con cada uno de los volúmenes diferentes de lipofectamina y se incubó cada mezcla para formar los lipocomplejos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Cada reacción mezclada fue calculada para ensayos por duplicado en placas de 24 pozos para transfectar 10 pozos en total bajo este protocolo. Posteriormente se agregó 250 µl de medio para transfección (DMEM base + glutamina al 2%) y 50 µl de lipocomplejos a cada pozo y se incubaron las células.

En los ensayos finales se utilizó 1 µl de lipofectamina + 500ng de plásmido por pozo (**Fig.11**).



**Figura 11.** Protocolo de preparación de lipocomplejos para transfección con lipofectamina. Volúmenes calculados para 12 pozos en placa de 24.

Tres horas post-transfección se agregaron 300 µl más de medio para transfección y se volvió a incubar. A las 6 horas post-transfección se retiró el medio con lipocomplejos y se lavaron las células con PBS, se agregó medio DMEM complementado y se incubaron las células, 24 horas post-transfección se evaluaron las células en microscopio fotónico, y de fluorescencia para ver la expresión del vector.

### **7.7 Enriquecimiento celular por citometría de flujo (*sorting*) para evaluar la eficiencia de transfección**

Una vez transfectadas las células, se despegaron con tripsina-EDTA al 0.25 %, posteriormente se lavaron con PBS estéril y fueron resuspendidas en medio DMEM con antibiótico y EDTA al 0.025% (para evitar la agregación celular), dicho medio no contenía SFB (para evitar la formación de burbujas en el citómetro), se resuspendieron las células en razón de  $1 \times 10^6$  / ml de medio para poder llevarse a cabo el *sorting* por fluorescencia en el citómetro de flujo BD FACSAria II™, utilizando un laser de 488 nm para su excitación y registrando la emisión en el detector con filtro band pass de 530/30. Se recuperaron las células GFP+ en un tubo de poliestireno que contenía medio DMEM adicionado con suero fetal bovino descomplementado al 10%, glutamina al 2%, 100UI de antibiótico (penicilina y estreptomicina) y 0.25 µg/ml antimicótico (anfotericina) CAISSON® No. De catálogo ABL02

Con los datos almacenados en el citómetro, se determinó la eficiencia de transfección al determinar el porcentaje de células GFP+ respecto al total de eventos compatibles con células de acuerdo a los patrones de difracción de tamaños(FSc) vs granularidad (SSC) mediante el programa FlowJo en PC con Windows de 64 bits.

## **7.8 Crecimiento de la cepa bacteriana de *S. aureus***

Para la infección celular se utilizó una cepa de *S. aureus* ATTC 27543. La cepa fue crecida en el agar selectivo y diferencial manitol-sal para confirmar la cepa y posteriormente se tomó de 1-2 colonias aisladas de la bacteria que creció en el agar y con ellas se inocularon 30 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC), el cual se dejó en incubación a 37°C con agitación a 250 rpm por 12 horas, logrando una concentración bacteriana de 0.4 a una absorbancia de 620 nm equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Terminado el tiempo de la incubación, se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 1 ml de solución salina para realizar los ensayos de infección.

## **7.9 Infección de células MAC-T con *S. aureus***

Para la infección se utilizaron 20,000 células/pozo en una placa de 24 pozos, se incubaron a 37 °C más 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr la confluencia de 80% para ser transfectadas por lipofección, 24 horas post-transfección se realizó la infección utilizando MOI de 10, 50 y 100 ( 200,000, 1,000,000 y 2,000,000 de bacterias respectivamente por pozo) por 2 horas. Después de las dos horas se realizaron dos lavados con PBS y se les adicionó 1 ml de medio DMEM sin antibiótico. Se cuantificaron 100 células por cada condición experimental y se obtuvo el porcentaje de traslocación de RelA. Se tomaron como células positivas para RelA las que presentaron la señal de GFP nuclear.

### **7.10 Pre-tratamiento y post-tratamiento con tilmicosina de células infectadas con *S. aureus***

Para la infección y pre-tratamiento con TMS se utilizaron 20,000 células/pozo en una placa de 24 pozos, se incubaron a 37 °C más 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr la confluencia de 90% para ser transfectadas por lipofección. 6 horas post-transfección se retiraron los lipocomplejos, se lavaron las células con PBS y se adicionó medio (DMEM base + glutamina 2% + 10% SFB + 10 µl de tilmicosina de un stock preparado a 10mg/ml logrando una concentración final de 10 µg/ml de tilmicosina en el medio). A las 12 horas post-transfección se realizó la infección de células MAC-T utilizando una MOI de 100 (2, 000, 000 de bacterias/pozo) por 2 horas. Después de las dos horas se realizaron dos lavados con PBS y se les adicionó 1 ml de medio DMEM sin antibiótico para ser evaluadas por microscopía de fluorescencia.

Para el post-tratamiento con TMS se utilizaron 20,000 células/pozo en una placa de 24 pozos, se incubaron a 37 °C más 5% de CO<sub>2</sub> hasta lograr la confluencia de 90% para ser transfectadas por lipofección. 6 horas post-transfección se retiraron los lipocomplejos, se lavaron las células con PBS y se adicionó medio (DMEM base + glutamina 2% + 10% SFB), 24 horas post-transfección se realizó la infección de células MAC-T con *S. aureus* utilizando una MOI de 100:1 (2, 000, 000 de bacterias/pozo) por 2 horas, posteriormente se retiró el medio y se lavaron las células 2 veces con PBS. Se agregó medio con tilmicosina a una concentración de 10 µg/ml por 2 horas y posterior a las dos horas se retiró el medio, se lavaron las células con PBS, se agregó medio DMEM sin antibiótico y se evaluaron por microscopía de fluorescencia. Se obtuvo el porcentaje de traslocación de RelA, tomando como células positivas para RelA las que presentaron la señal de GFP nuclear.

### 7.11 El diseño del experimento correspondió a:

- 1) Células MAC-T sin infección como control negativo.
- 2) Células MAC-T pretratadas 12 horas con TMS (10 µg/ml) más una infección posterior con *S. aureus* (MOI 100:1)
- 3) Células MAC-T infectadas con *S. aureus* (MOI 100:1) y tratadas 2 horas post-infección con TMS (10 µg/ml)
- 4) Células MAC-T infectadas con *S. aureus* (MOI 100:1) como control positivo de infección.

Los experimentos de cada grupo se realizaron por triplicado.

### 7.12 Análisis estadístico:

**7.12.1 Cálculo de tamaño de muestra.** Para los experimentos de tratamientos con TMS e infección con *S. aureus* se consideró para el tamaño de muestra con un 95% de confianza, un tamaño de muestra de **100** células.

**7.12.2 Prueba de normalidad.** Para los experimentos de infección con *S. aureus* a diferentes MOI, así como las infecciones con *S. aureus* y tratamientos con TMS, se llevó a cabo una prueba de normalidad de Shapiro Wilk con JMP 8-SAS, rechazando la hipótesis nula que plantea que los datos siguen una distribución normal si la  $p < W$ .

**7.12.3 Homogeneidad de varianzas.** Para conocer si las varianzas obtenidas de cada condición experimental por triplicado fueron iguales, se llevó a cabo una prueba de Levene con el programa JMP 8-SAS, considerando el supuesto que establece dicha prueba; que la homogeneidad de varianzas entre diferentes muestras son iguales, rechazando la hipótesis nula de igualdad si  $p < 0.05$ .



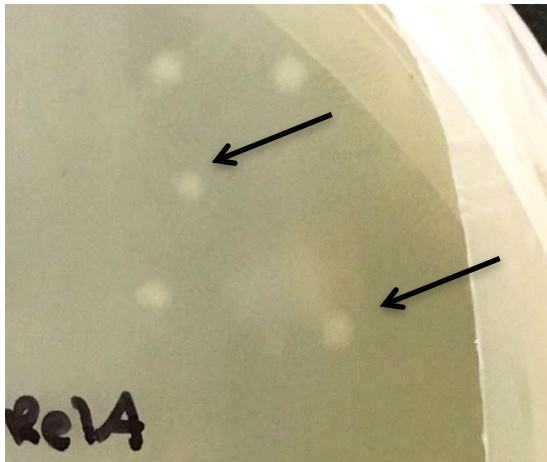
**7.12.4 Análisis de varianza (ANOVA).** Asimismo para conocer si existe diferencia entre las medias de los diferentes grupos experimentales, se llevó a cabo una prueba de ANOVA; mediante la comparación de las varianzas de los diferentes tratamientos o condiciones experimentales, se considera que existe diferencia entre las medias si  $p < 0.05$ . Se llevo a cabo en el programa GrapPad Prism 8.

**7.12.5 Prueba post hoc.** Para conocer entre que grupos experimentales existe diferencia estadística significativa se llevó a cabo una prueba post hoc de Dunnett y *T de Student* (según correspondiera) en el programa GrapPad Prism 8, considerando diferencia estadísticamente significativa entre grupos si el valor de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Bacterias competentes *E. coli* Top10 y transformación bacteriana

Se obtuvo el crecimiento de bacterias *E. coli* TOP10 transformadas con el plásmido GFP-RelA, las cuales fueron seleccionadas positivamente por crecimiento en agar LB con kanamicina (30 µg/ml), lo cual es indicativo de adquisición del plásmido. Una de estas colonias se propagó en medio LB con kanamicina (30 µg/ml) para obtener mayor biomasa de bacterias transformadas y poder propagar el plásmido (**Fig. 12**).

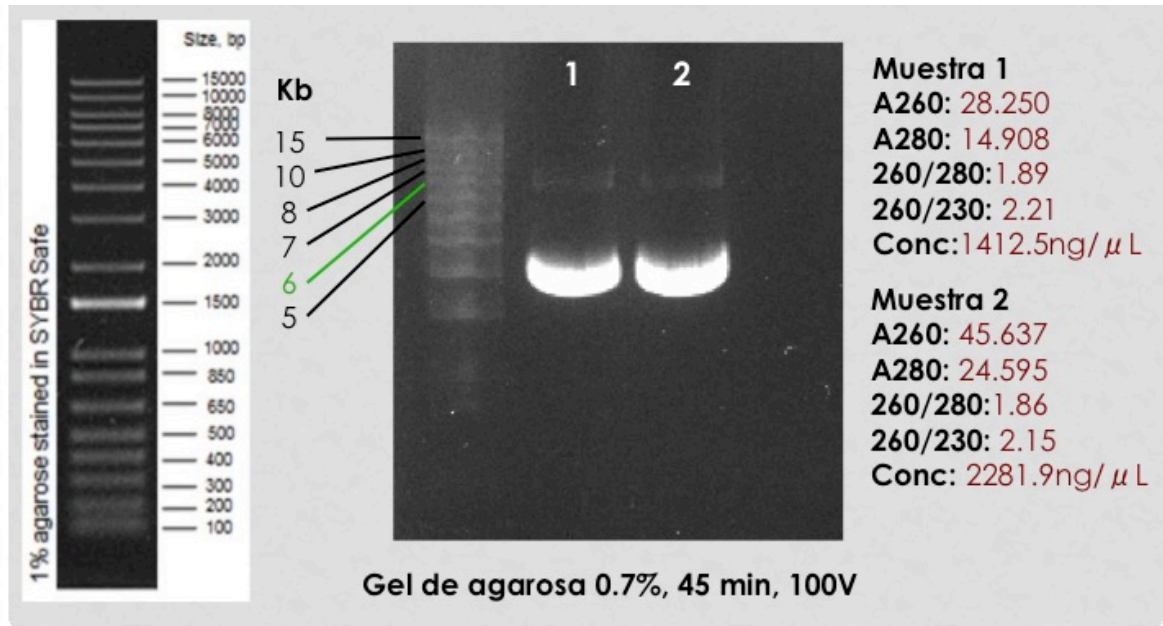


**Figura 12.** Presencia de bacterias *E. coli* Top10 transformadas (flechas) con el plásmido GFP-RelA que expresan el *cassette* de resistencia a kanamicina. RAI-INCMNSZ.

### 8.2 Extracción del plásmido

En esta imagen podemos observar una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% del plásmido GFP-RelA (carril 2 y 3) en donde son notorias las conformaciones lineal de longitud completa (bandas claras de arriba) a la altura de las bandas de 6 y 7Kb y superenrollado (bandas inferiores) con una mayor distancia de migración. Se muestra la pureza del ADN plásmídico de cada muestra: en el índice 260/280:

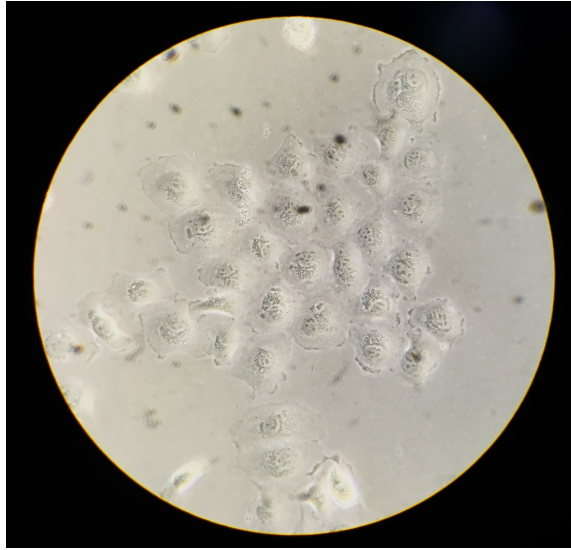
un valor entre 1.8 y 2 indica un DNA libre de ARN y proteínas, mientras que en el índice 260/230 un valor entre 1.5-2.2 indica una muestra libre de sales y fenoles. Así mismo se observa la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de cada muestra (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con dos muestras (3 $\mu\text{l}$  / carril) de plásmido GFP-RelA de 6378 pb. Chemidoc-RAI-INCMNSZ.

### 8.3 Estabilización del cultivo celular MAC-T

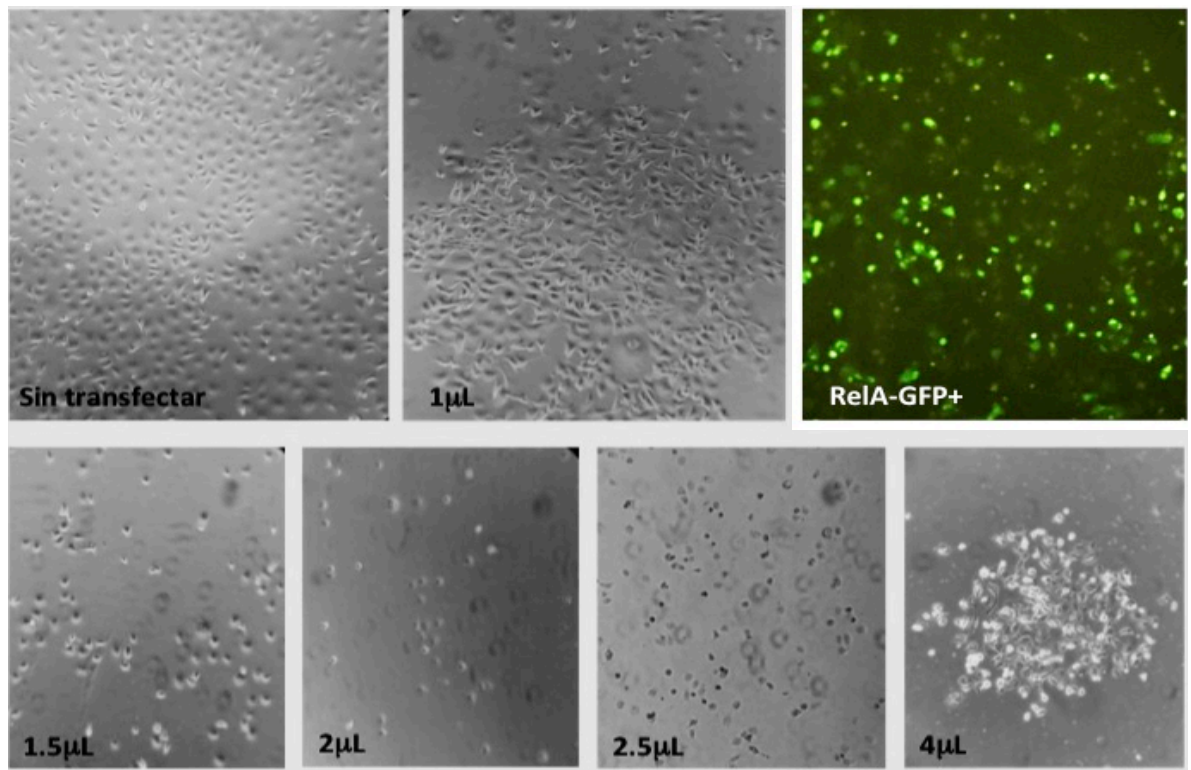
En esta imagen se muestra un grupo de células MAC-T en proliferación las cuales presentan gránulos intracitoplásmicos, crecimiento en monocapa y una morfología típica conocida como “piedra de río” (**Fig. 14**).



**Figura 14.** Células MAC-T, 40X. RAI-INCMNSZ.

#### **8.4 Generación del modelo de expresión de GFP-RelA**

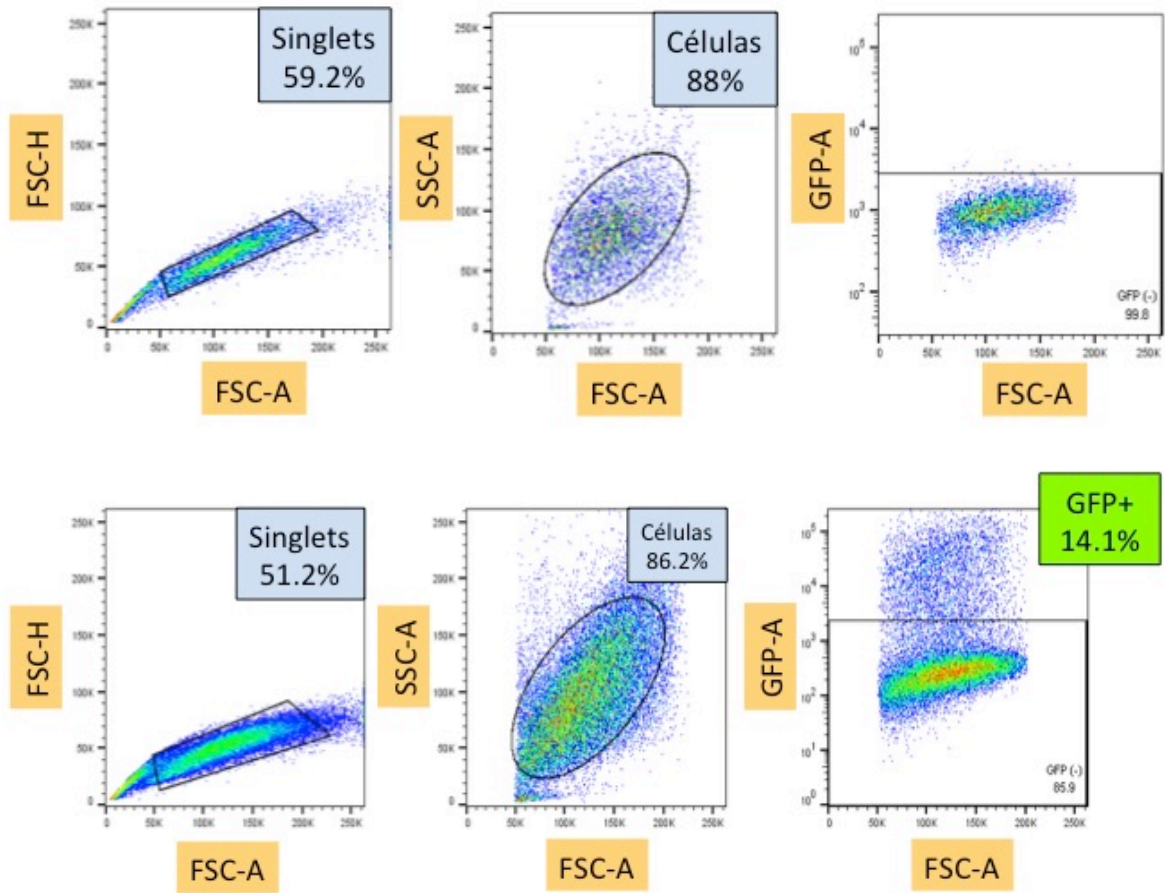
Como podemos observar en esta imagen, la lipofectamina afecta la adherencia e integridad celular, ya que partir de 1.5  $\mu$ L de lipofectamina las células comienzan a despegarse y presentan cambios morfológicos por el daño a la membrana celular (citotoxicidad) así como refringencia indicativo de muerte celular. Mientras que con 1  $\mu$ L de lipofectamina + 500 ng de plásmido las células mantienen su morfología típica y adherencia, con una buena señal de fluorescencia (**Fig. 15**).



**Figura 15.** Curva de volumen de lipofectamina 2000®.

### 8.5 Enriquecimiento celular por citometría de flujo (*sorting*)

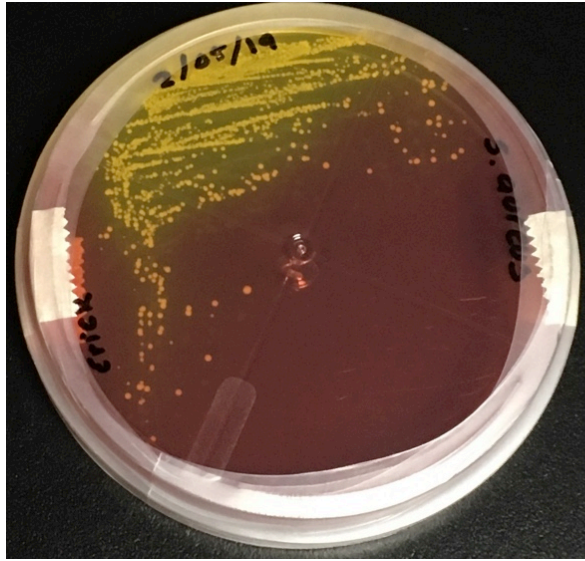
Como se muestra a continuación, se utilizó la estrategia de selección, primeramente por tamaño (FSC-H x FSC-A) con un 59.2 % de eventos simples, seguido de una selección por complejidad (SSC-A x FSC-A) con un 88% de células MAC-T y por último se observó el límite de autofluorescencia en células MAC-T sin transfectar (FSC-A x GFP-A) (**Fig. 16** panel superior). Utilizando la misma estrategia de selección, observamos en células MAC-T transfectadas un 51.2 % de eventos simples (FSC-H x FSC-A), un 86.2 % de células MAC-T (SSC-A x FSC-A) y por último un 14.1 % de células GFP+ (FSC-A x GFP-A) (**Fig. 16** panel inferior).



**Figura 16.** Enriquecimiento celular por citometría de flujo. Sorter FACS Ariallu, (Laboratorio Centro de Instrumentos-Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Siglo XXI).

### 8.6 Crecimiento de la cepa de *S. aureus* ATTC 27543

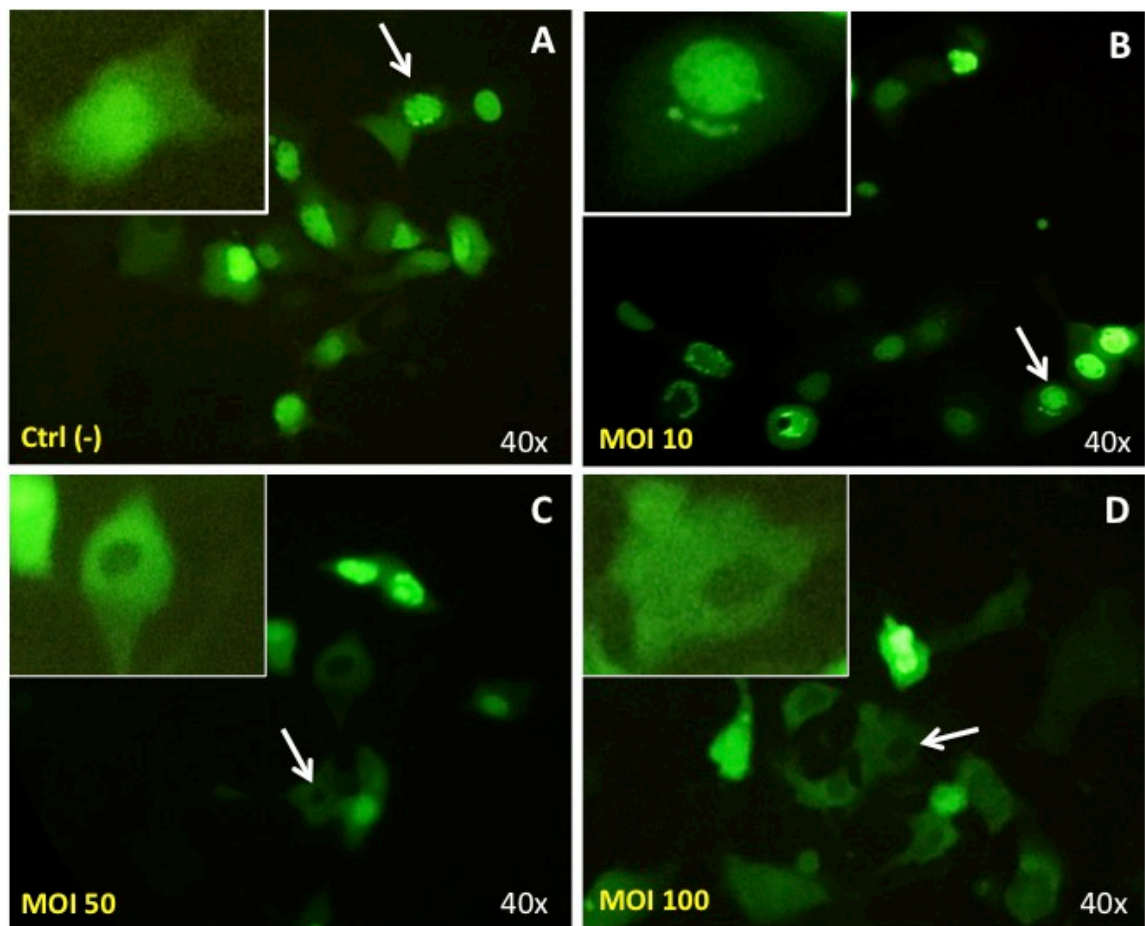
Como se muestra en la imagen de abajo, *S. aureus* cultivado en agar manitol-sal presenta fermentación del manitol (medio tornado a amarillo), además de que solo *S. aureus* presenta la característica de crecer en este medio selectivo y diferencial por su gran tolerancia a altas concentraciones de sal (14%) (**Fig. 17**).



**Figura 17.** Crecimiento de *S. aureus* fermentador de manitol. Agar manitol-sal incubado durante 24 horas a 37 °C.

### 8.7 La infección de células MAC-T con *S. aureus* a diferentes MOI afecta la traslocación de NF- $\kappa$ B

Micrografías de fluorescencia de células MAC-T sin infección (A), infectadas a una MOI de 10:1 (B), 50:1 (C) y 100:1 (D) con *S. aureus*. Tomadas dos horas después de la infección, en donde se observa la presencia de RelA en el núcleo de los grupos control sin infección y e infectado a una MOI de 10:1, mientras que en los grupos con MOI de 50:1 y 100:1 no se observa la señal nuclear de RelA (Fig. 18).

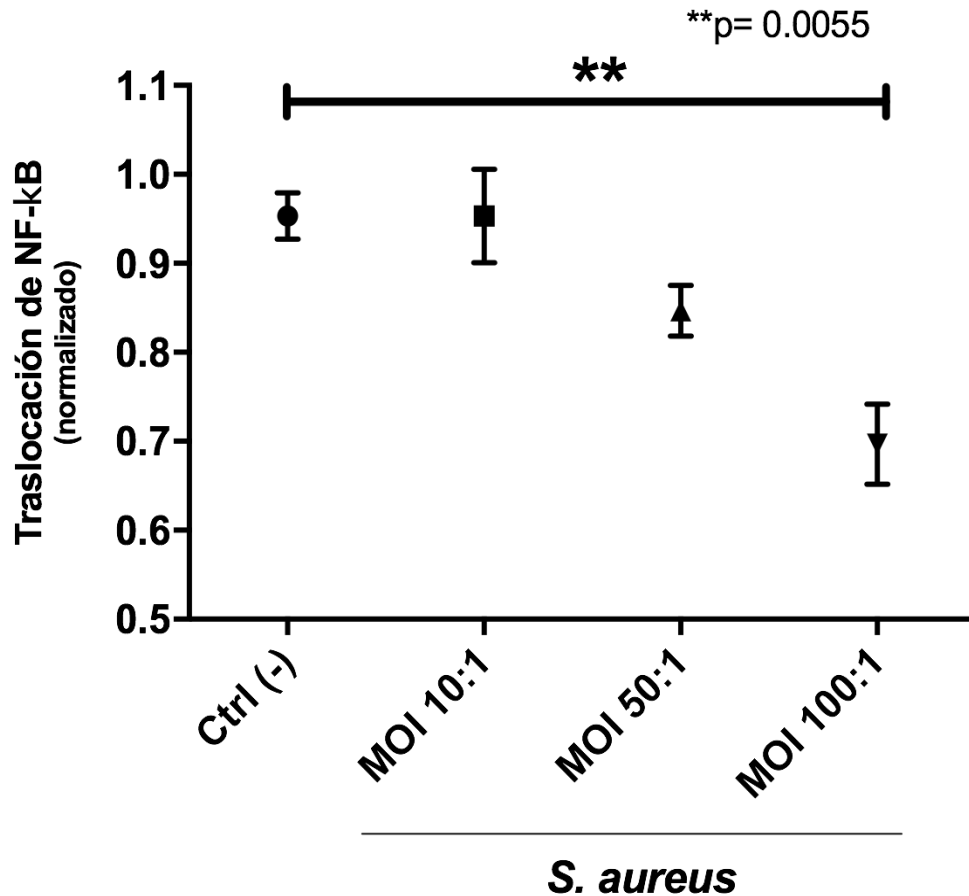


**Figura 18.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T infectadas con *S. aureus* a diferentes MOI. Flechas blancas indican núcleos. RAI-INCMNSZ.



### 8.8 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T infectadas con *S. aureus* a diferentes MOI

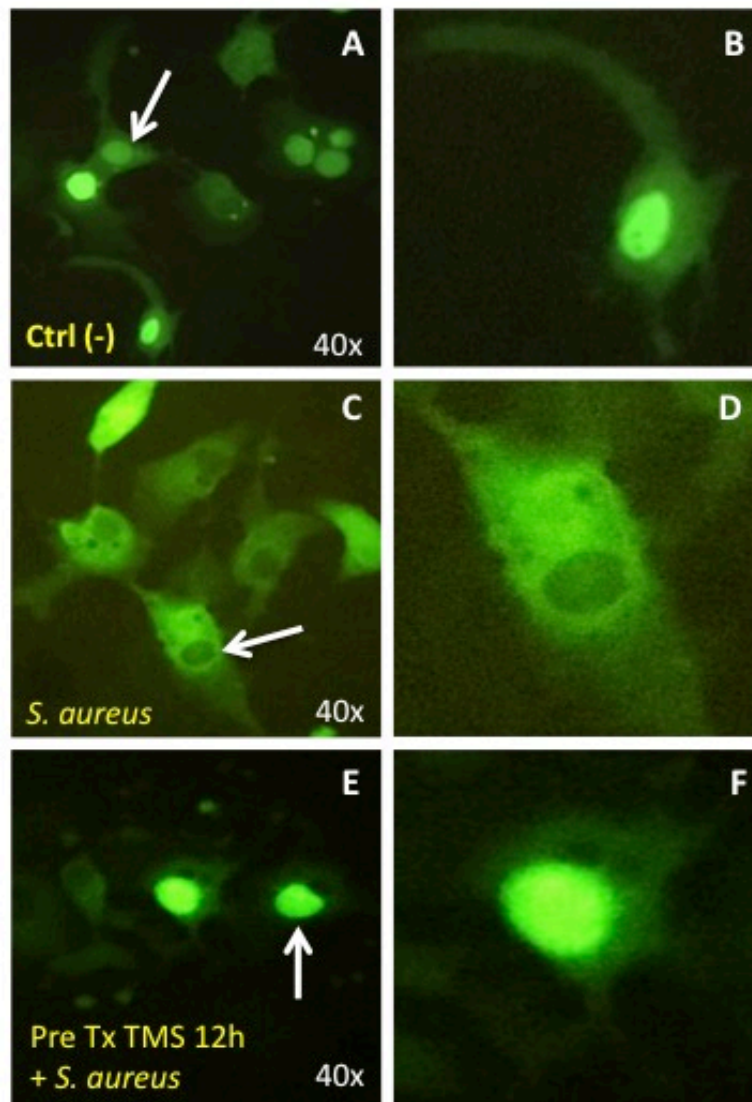
En esta gráfica se muestra la traslocación relativa de RelA (normalizado con respecto al grupo sin infección) en las diferentes condiciones experimentales, en donde se observa una tendencia a la inhibición de la traslocación conforme aumenta la MOI bacteriana. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo infectado con MOI 100:1 comparado con el grupo sin infección ( $p < 0.005$ ) (Fig. 19).



**Figura 19.** Traslocación de RelA en células MAC-T infectadas con *S. aureus* a diferentes MOI.  $**p < 0.005$  GraphPad Prism 8.

### 8.9 El pre-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus* induce la traslocación de NF- $\kappa$ B

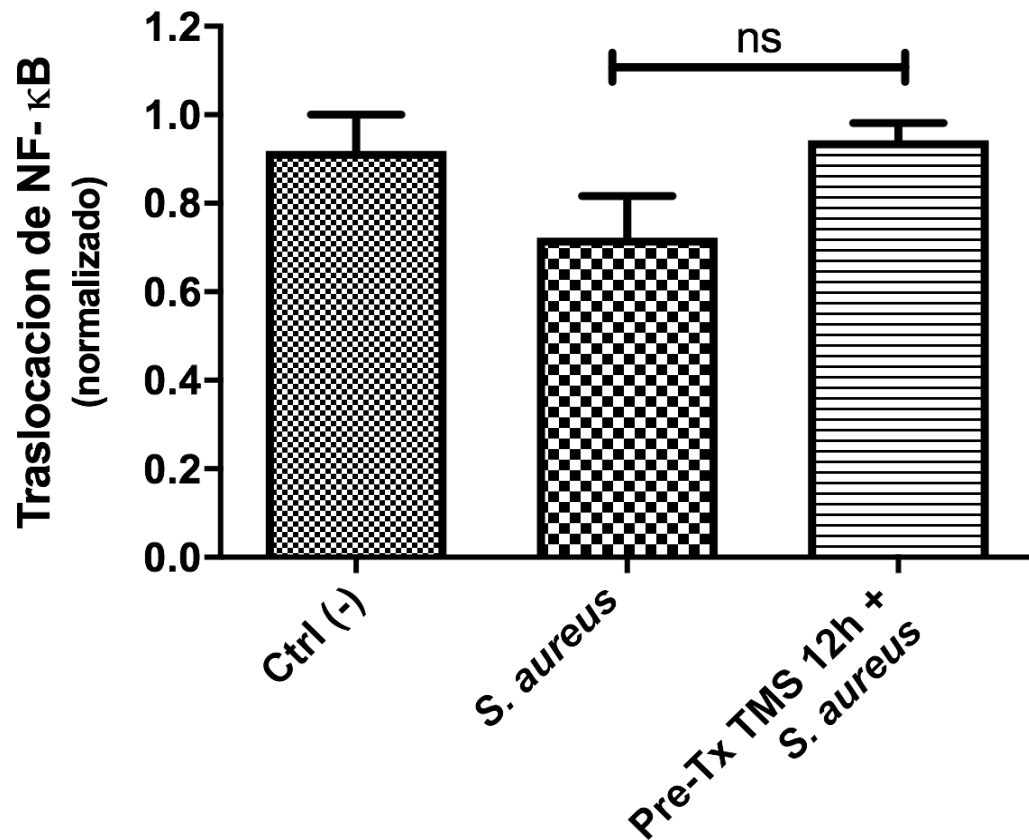
Como se observa a continuación, RelA esta presente en el núcleo de células sin infección (A y B), mientras que con la infección de *S. aureus* a una MOI 100:1 se inhibe la traslocación de RelA (C y D). Por otra parte, en el pre-tratamiento con TMS + *S. aureus* se induce la traslocación de RelA (E y F) (**Fig. 20**).



**Figura 20.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T tomadas después de la infección. Flechas blancas indican núcleos. RAI-INCMNSZ

### 8.10 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T pre-tratadas 12h con TMS e infectadas con *S. aureus*

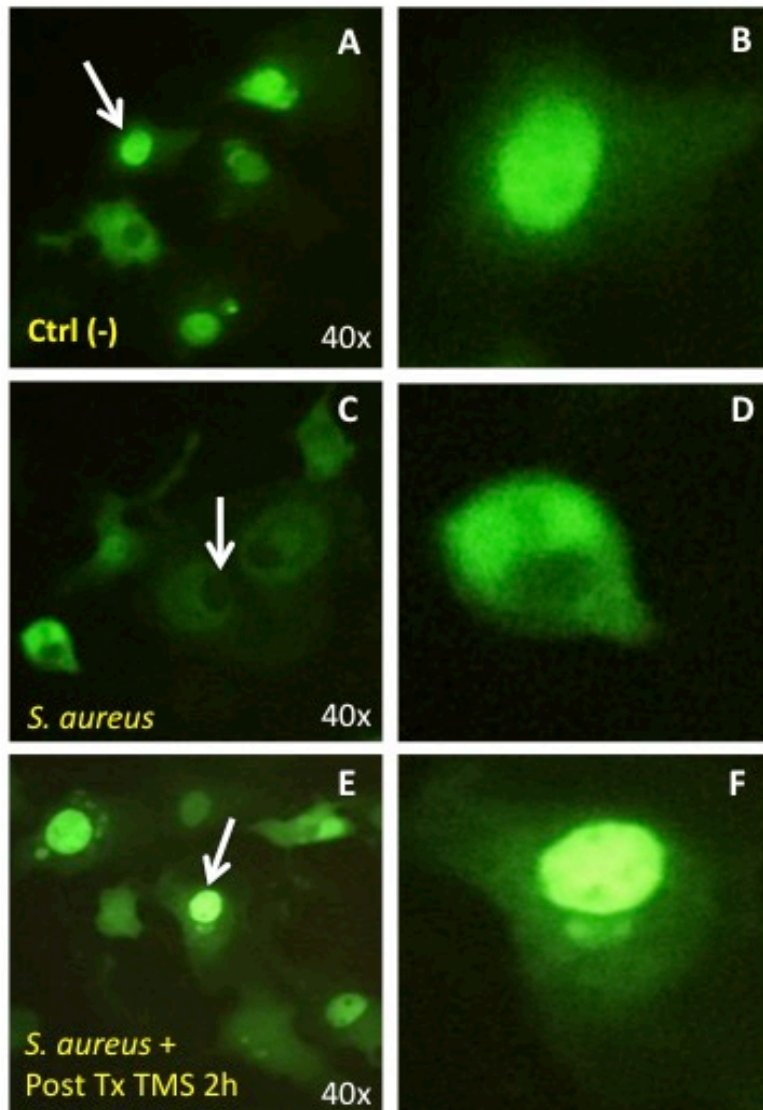
En la siguiente gráfica se muestra la traslocación relativa de RelA (normalizado con respecto al grupo sin infección) bajo las diferentes condiciones. Se observan los niveles basales de traslocación (Ctrl-), así mismo se observó con la infección de *S. aureus* una disminución en el porcentaje de traslocación de RelA, mientras que el pre-tratamiento con TMS + *S. aureus* incrementa la traslocación de RelA comparado con el grupo infectado con *S. aureus* solamente (no significativo) (Fig. 21).



**Figura 21.** Pre-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus*. GraphPad Prism 8.

### 8.11 El post-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus* aumenta la traslocación de RelA

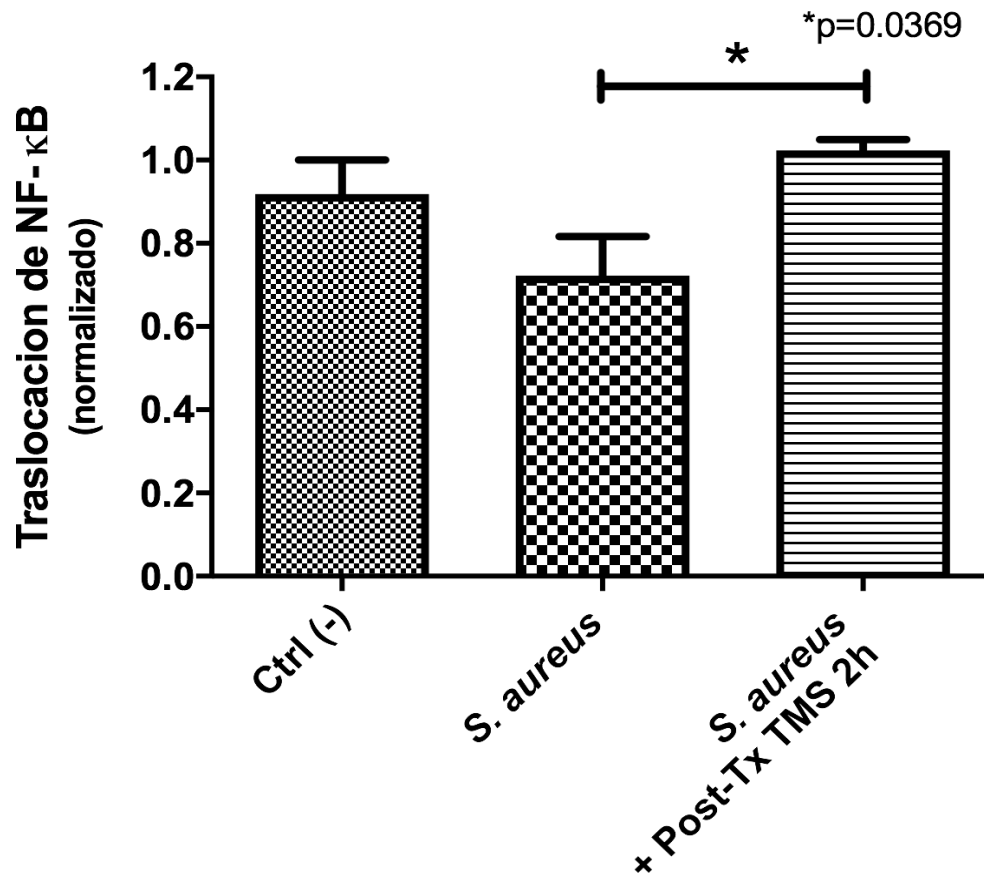
Como se observa a continuación, en las células sin infección (A y B) RelA esta presente en el núcleo de forma normal, bajo el estímulo de infección con *S. aureus* a una MOI 100:1 se inhibe la traslocación de RelA (C y D). Por otra parte, la traslocación de RelA se ve favorecida en la infección con *S. aureus* + post-tratamiento con TMS (E y F) (Fig. 22).



**Figura 22.** Micrografías de fluorescencia de células MAC-T tomadas después del tratamiento. Flechas blancas indican núcleos. RAI-INCMNSZ.

### 8.12 Traslocación relativa de RelA en células MAC-T infectadas con *S. aureus* y post-tratadas 2h con TMS

En la siguiente gráfica se muestra la traslocación relativa de RelA (normalizado con respecto al grupo sin infección) en las diferentes condiciones. Se observan los niveles de traslocación en el grupo sin infección (Ctrl-), con la infección de *S. aureus* existe una disminución en la traslocación de RelA, mientras que en la infección con *S. aureus* + post-tratamiento con TMS se incrementa significativamente la traslocación de RelA comparado con el grupo infectado con *S. aureus* sin tratamiento ( $p < 0.05$ ) (Fig. 23).



**Figura 23.** Post-tratamiento con TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus*. GraphPad Prism 8. \* $p < 0.05$ . GraphPad Prism 8.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 NF- $\kappa$ B se trasloca al núcleo con una baja carga bacteriana de *S. aureus*

En el presente trabajo se decidió conocer qué efecto tenían las diferentes cargas bacterianas de *S. aureus* (MOI 10:1, 50:1, 100:1) sobre la traslocación de NF- $\kappa$ B en células MAC-T. Y a pesar de que existen reportes en donde mencionan que cargas bacterianas de *S. aureus* a una MOI de 10:1 no activan a NF- $\kappa$ B (Günther, 2016), se observó que a una MOI de 10:1 disminuye la señal citoplásmica de RelA, aumentando la señal RelA en el núcleo (Fig. 18); lo cual nos indica que a una MOI baja, se podría favorecer la traslocación de NF- $\kappa$ B, una posible explicación es que el daño físico a la membrana celular en un etapa inicial de infección, provocaría la liberación de la proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60) que a su vez actúa como receptor de la proteína de unión a fibronectina (FnBP) de *S. aureus*, con lo cual Hsp60 en su forma soluble actuaría como patrón molecular asociado a daño (DAMP) para estimular a TLR4 y activar a NF- $\kappa$ B (Kim, 2009).

Así mismo, es probable que debido al bajo número de bacterias en la infección, no se contrarreste la activación de TLR4 y NF- $\kappa$ B, ya que los mecanismos de *S. aureus* iniciados por la  $\alpha$ -toxina ó FnBP, no son suficientes para estimular de forma significativa la respuesta inicial de endocitosis mediada por Akt, lo cual es un punto clave en la inhibición de NF- $\kappa$ B (Josse, 2017).

## 9.2 Inhibición de la traslocación de NF- $\kappa$ B en infección con *S. aureus* a una MOI 50:1 y 100:1

En la infección con MOI 50:1 se observó una tendencia ( $p > 0.05$ ) a la inhibición de la traslocación de NF- $\kappa$ B (Fig. 19), lo cual cabe destacar no es una falta de activación de NF- $\kappa$ B (ya que la traslocación relativa sería igual al grupo sin infección), sino una regulación negativa de esta vía, debido a que el mecanismo de exportación de NF- $\kappa$ B al citoplasma (O'Dea, 2007) sería el responsable de una menor traslocación de RelA (comparado con el grupo sin infección), lo cual es observado por primera vez en nuestro grupo de trabajo. Esto se desarrolla más adelante en la (fig. 24).

Interesantemente, a una MOI 100:1 se inhibe de forma significativa ( $p < 0.0055$ ) la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B, lo que podría indicar que conforme más bacterias hay en el medio (MOI 100:1) mayor es la inhibición de NF- $\kappa$ B, sin embargo, esto no se pudo corroborar con otros estudios debido a que no existen reportes en donde utilicen estas cargas bacterianas para evaluar a NF- $\kappa$ B, aunque si se ha reportado que a una MOI de 100:1 se favorece la internalización de *S. aureus* (Bouchard, 2013; Günther, 2017; Josse, 2017) (**Fig. 19**). Esta inhibición favorecería la colonización bacteriana en el tejido mamario, ya que al no permitirse la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, NF- $\kappa$ B es incapaz de unirse a la proteína de unión a CREB (CBP) para controlar la expresión de genes proinflamatorios. Por lo tanto se favorece la interacción de CBP con el elemento de respuesta de unión a AMPc (CREB) y el desencadenamiento de una respuesta antiinflamatoria mediada por la síntesis de IL-10, lo cual es clave en la persistencia y patogenia de *S. aureus*. (Silva-García, 2018).

Cabe mencionar que en este trabajo se utilizó la bacteria en fase post-logarítmica, fase en la cual se expresan preferentemente las toxinas, entre ellas la  $\alpha$ -toxina que en presencia de SFB (componente del medio de cultivo celular) se

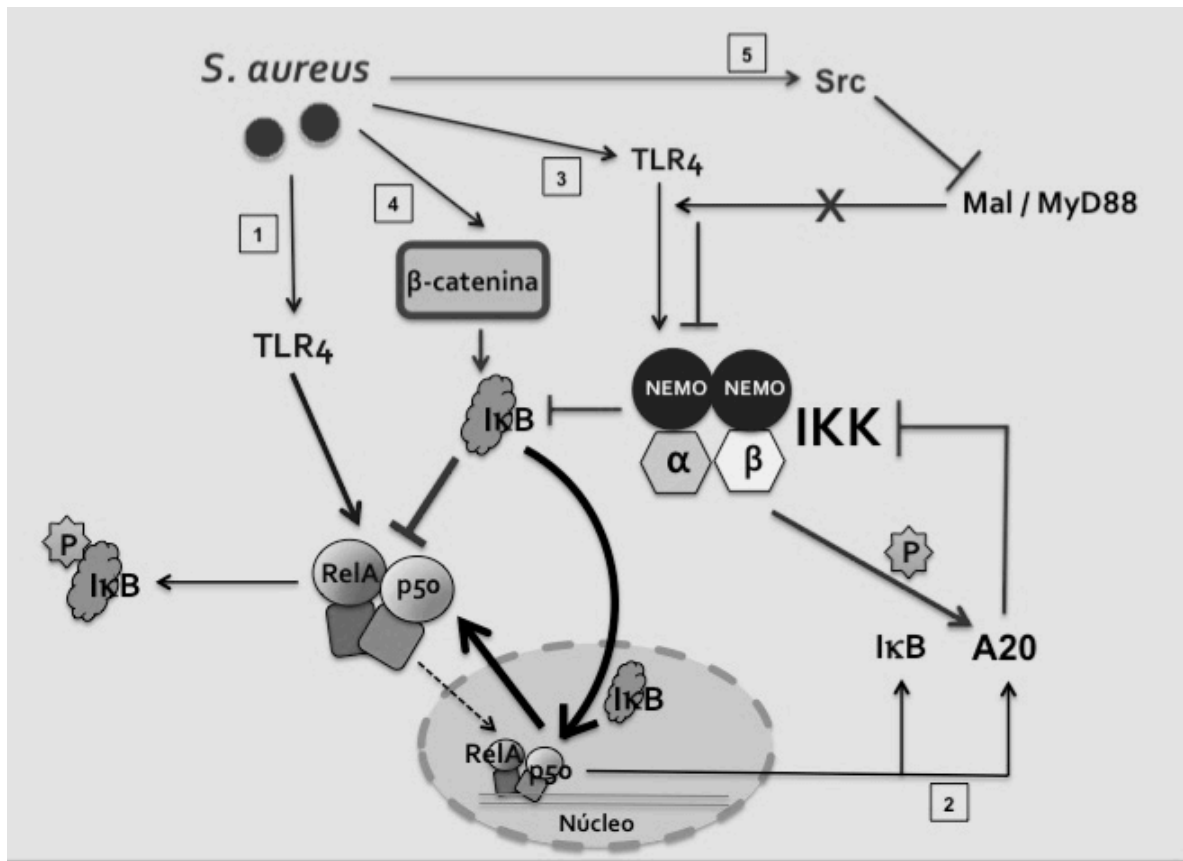
favorece su producción (Oogai, 2011), la cual forma poros en la membrana de la célula hospedera ocasionando la entrada y salida de iones tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , respectivamente (Fraunholz, 2012), por una parte se sabe que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol puede activar a NF- $\kappa$ B (Pahl, 1996), sin embargo no hay estudios concluyentes al respecto en este linaje celular. Así mismo cabe mencionar que el medio de cultivo utilizado para este trabajo (DMEM) contiene  $\text{Ca}^{2+}$  (1.8mM) de forma normal (sin adicionar), desafortunadamente no se conoce si a mayores dosis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio se pudiera favorecer la traslocación de NF- $\kappa$ B bajo la infección de *S. aureus* (MOI 100:1), lo cual en el ganado bovino lechero sería un factor importante ya que la alta exigencia de este mineral a nivel mamario para la producción láctea, podría conjuntamente contribuir a la defensa inmunológica.

Por otra parte, existen respuestas proinflamatorias independientes de NF- $\kappa$ B que pudiera inducir *S. aureus* a través del efecto de la  $\alpha$ -toxina. Por una parte, la salida de potasio de la célula y la activación de NLRP3 activarían el inflamasoma permitiendo la maduración de la pro-IL1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  (Petrilli, 2017) sin embargo esta respuesta dependería de la síntesis de pro-IL1 $\beta$  producto de la traslocación de RelA. Un punto importante a destacar, es que la  $\alpha$ -toxina ocupa como receptor a ADAM10 para su oligomerización en la membrana de distintas células, sin embargo, aún no hay reportes en las bases de datos acerca de la expresión del transcrito o de la proteína ADAM10 en células mamarias de bovinos. Sin embargo, con base en nuestros resultados podemos pensar que ADAM10 sí se expresa en células mamarias bovinas, ya que la inhibición de NF- $\kappa$ B depende de la activación de Akt la cual es inducida por el efecto de la  $\alpha$ -toxina y su unión con su receptor. (Hua, 2019; Josse, 2017; Ma, 2016; Silva-García, 2018).

Así mismo no se descarta que NF- $\kappa$ B pudiera ser activado también con altas cargas bacterianas, pero solo en etapas tempranas de infección (<2h); lo cual suponemos que pudiera estar mediado (al igual que con MOI bajas ej. 10:1) por la liberación de Hsp60 de las células infectadas, uniéndose a TLR4 y



desencadenando la activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B con la subsiguiente traslocación de RelA al núcleo. Lo que promovería de forma inicial la síntesis de sus genes blanco, entre ellos citocinas proinflamatorias, el inhibidor I $\kappa$ B y la proteína A20. De esta forma, en el transcurso de la infección se mantendría el estímulo de la vía canónica de NF- $\kappa$ B, permitiendo la activación constante de IKK $\beta$  desencadenando la fosforilación de A20, la cual inhibiría al complejo NEMO/IKK $\alpha\beta$  regulando negativamente la vía de NF- $\kappa$ B (Hutti, 2007). Por lo que se propone un nuevo mecanismo inmunosupresor mediado por *S. aureus* y  $\alpha$ -toxina, la cual se sabe induce la expresión de integrina  $\beta$ 1 en la superficie de las células MAC-T para promover su interacción con FnBP, que interesantemente pudo haberse sobreexpresado por efecto de IL-1 $\beta$  en etapas iniciales de infección (Kanangat, 2007), esto activaría una respuesta a través de vías de señalización que involucran a proteínas asociadas al citoesqueleto como FAK, Src, cortactina, PI3K y Akt (Josse, 2017), esta última es la que se encarga de fosforilar a GSK3 y promover su inactivación, permitiendo la estabilidad de  $\beta$ -catenina lo que resulta en la inactivación de NF- $\kappa$ B por interacción y el incremento de la estabilidad de I $\kappa$ B (por un mecanismo no bien descrito hasta el momento), ayudando no solo a la retención citoplásmica de NF- $\kappa$ B, sino participando activamente en la exportación nuclear de NF- $\kappa$ B (O'Dea, 2007). Así mismo de forma muy interesante, se sabe que la activación de Src, inhibe la asociación de Mal/MyD88 con TLR4 inactivando río abajo la vía canónica de NF- $\kappa$ B (Mitchell, 2018). Esto explicaría algunos de los mecanismos utilizados por *S. aureus* para inhibir la traslocación de RelA al núcleo (Fig. 24).



**Figura 24.** Respuestas moleculares desencadenadas por la infección de *S. aureus* en células MAC-T. **1.** Daño a la célula por *S. aureus* y liberación de Hsp60 para activar TLR4 y NF- $\kappa$ B (etapa temprana de infección). **2.** Expresión de los genes blanco regulados por NF- $\kappa$ B. **3.** La activación prolongada de la vía de NF- $\kappa$ B induce la fosforilación de A20, inhibiendo por retroalimentación negativa a IKK lo que evita la fosforilación de I $\kappa$ B, inactivando por interacción a NF- $\kappa$ B. **4.** La activación de la vía Src/PI3K/Akt/GSK3 permite que  $\beta$ -catenina estabilice a I $\kappa$ B (sin fosforilar) para retener a NF- $\kappa$ B en el citoplasma. Así mismo I $\kappa$ B libre se trasloca al núcleo para promover la exportación de NF- $\kappa$ B (RelA/p50) al citoplasma. **5.** La activación de Src inhibe el ensamblaje de Mal/MyD88 a TLR4, inhibiendo la señalización proinflamatoria.

### 9.3 El Pre-tratamiento con TMS recupera la traslocación de NF- $\kappa$ B

Una vez observado, que en células MAC-T infectadas con *S. aureus* a una MOI de 100:1 se inhibía significativamente la traslocación de RelA, se llevó a cabo el pre-tratamiento con TMS más una infección con *S. aureus*; en donde se observó un incremento en los niveles de RelA nuclear comparado con el grupo infectado con *S. aureus* únicamente (**Fig. 21**). Aunque el aumento de la traslocación no fue significativo ( $p > 0.05$ ) se observa una tendencia a mayor activación de NF- $\kappa$ B por el efecto del pre-tratamiento con TMS. En este sentido, podemos mencionar que los niveles de NF- $\kappa$ B nuclear en el grupo pre-tratado con TMS fueron “recuperados” y son muy parecidos a los niveles del grupo sin infección (Ctrl-), lo cual sugiere que la tilmicosina tiene una función “protectora” al aumentar los niveles de NF- $\kappa$ B disminuidos por *S. aureus* (no significativo).

Es interesante el hecho de que los niveles de NF- $\kappa$ B nuclear no excedieran los niveles basales (que podría ayudar a mantener la integridad del tejido mamario), lo cual *in vivo* podría contribuir a favorecer respuestas inmunológicas innatas o adaptativas, mediadas por el incremento de NF- $\kappa$ B nuclear.

Un mecanismo probable por el cual la TMS no indujo de forma significativamente la traslocación de NF- $\kappa$ B pudo ser debido a que el pretratamiento con TMS durante 12 horas favoreció su acumulación en los lisosomas (Mestorino, 2004), de esa forma no fue accesible la TMS a las proteínas citosólicas de señalización que involucra la regulación de NF- $\kappa$ B.

#### 9.4 El Post-tratamiento con TMS aumenta la traslocación de NF- $\kappa$ B

Interesantemente en este experimento, se observó que el post-tratamiento con TMS incrementa la traslocación de RelA que previamente había sido disminuido por la infección con *S. aureus* ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 23**), lo cual indica una respuesta celular dirigida hacia la proinflamación mediada por NF- $\kappa$ B. Así mismo se observa en el post-tratamiento con TMS un ligero aumento del porcentaje de traslocación de RelA comparado con el grupo control sin infección (dato no significativo).

Cabe destacar que en el post-tratamiento con TMS por 2h, se pudo haber favorecido la interacción de la TMS libre (antes de que se acumulara en los lisosomas) con las proteínas que involucran la regulación de la vía de NF- $\kappa$ B favoreciendo su activación.

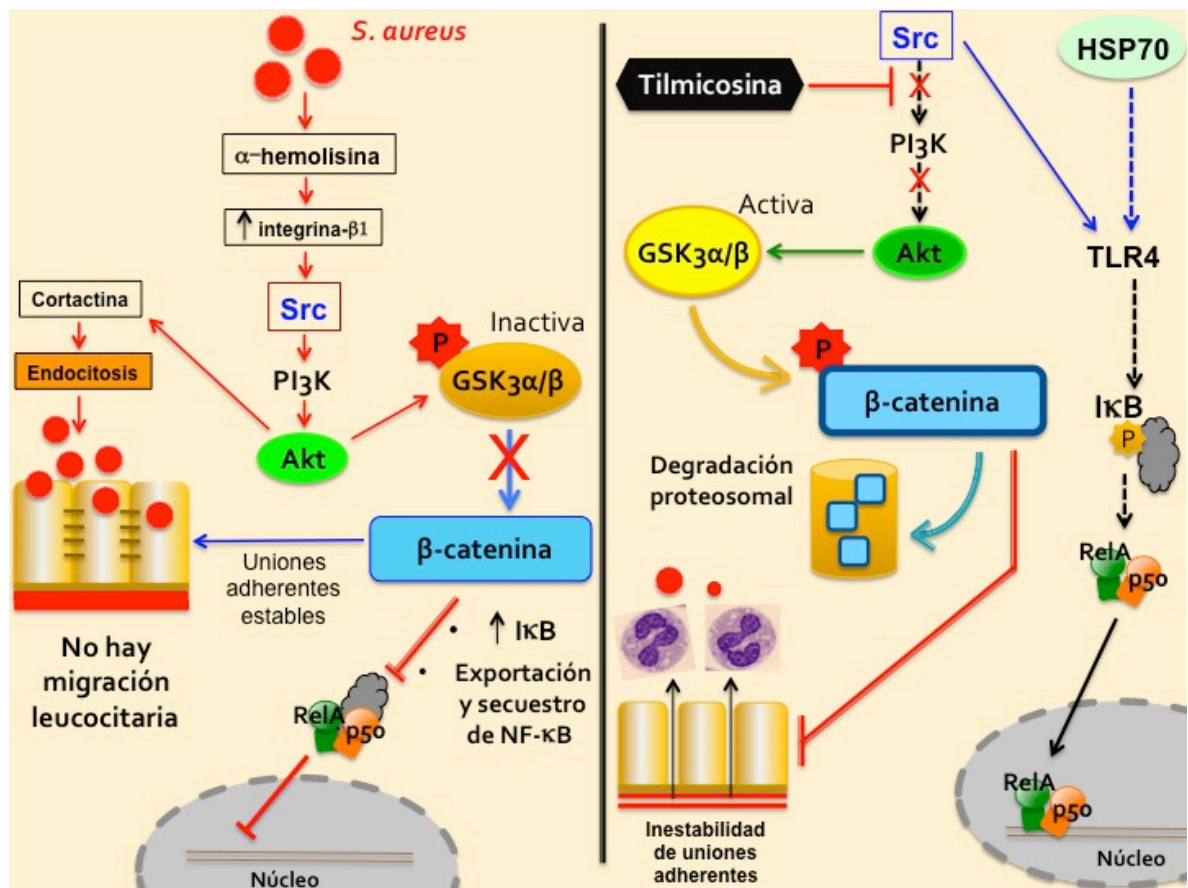
Este hallazgo podría tener importancia a nivel de campo, ya que el tratamiento con TMS en etapa de secado (periodo entre lactaciones), favorece el proceso inflamatorio mediado por NF- $\kappa$ B en infecciones con altas cargas bacterianas de *S. aureus*. Así mismo se debe considerar que al ser favorecida la inflamación ligeramente por encima de los niveles basales (aunque en nuestro modelo no fue significativo), de suceder también *in vivo* esta tendencia podría repercutir en un mayor daño tisular comparado con el pre-tratamiento. Sin embargo, en un primer paso la traslocación de NF- $\kappa$ B evitaría una infección intracelular persistente y no dejaría paso al establecimiento del proceso crónico típico de las mastitis subclínicas mediado por IL-10, con lo cual la TMS contrarrestaría la respuesta inmunosupresora provocada por *S. aureus*.

### **9.5 Señalización proinflamatoria en células MAC-T infectadas con *S. aureus* y tratadas con TMS.**

Por lo tanto, considerando que es necesaria la activación de proteínas tirosina cinasa (PTK) como Src en las células hospederas (Dziewanowska, 1999) para promover eficientemente la internalización de *S. aureus* en la célula epitelial y evitar la traslocación de RelA al núcleo, el bloqueo de la vía PI3K (río abajo de Src) podría resultar efectivo frente a la infección. De forma muy interesante se sabe que los inhibidores de PI3K bloquean la formación de los complejos de  $\beta$ -catenina/NF- $\kappa$ B (Ma, 2016) y que los macrólidos eritromicina y azitromicina pueden inhibir la función de algunos receptores tirosina cinasa (TRK) en neutrófilos (Masataka, 2012), por lo que se sugiere que uno de los mecanismos inmunomoduladores de la TMS sería a través del bloqueo de la función tirosina cinasa de Src, inhibiendo a su vez la fosforilación de Akt lo que permitiría a GSK3 permanecer activa (sin fosforilar) para degradar a  $\beta$ -catenina y permitir la traslocación de NF- $\kappa$ B (RelA/p50) al núcleo. Así mismo el incremento de la expresión de Hsp70 por la TMS pudiera colaborar en la activación conjunta de NF- $\kappa$ B a través de TLR4.

## 9.6 Posibles eventos moleculares regulados por la TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus*

Estos datos nos permiten proponer un modelo de regulación inmune mediado por la TMS en células MAC-T infectadas con *S. aureus*, para ayudar a un mejor tratamiento de la mastitis bovina y aportar algunas pistas en cuanto la respuesta inmune y molecular provocada por este macrólido de nueva generación (**Fig. 25**).



**Figura 25.** Diagrama de integración de los posibles efectos inmunomoduladores de la TMS en células MAC-T. Elaboración propia.

## 10. CONCLUSIONES

1. *S. aureus* inhibe la traslocación de NF- $\kappa$ B en células MAC-T a una MOI bacteriana de 100:1 con 2h de infección ( $p < 0.05$ ), lo cual nos sugiere una inhibición de la señalización de TLR por la activación de Src que induciría la endocitosis de *S. aureus*, además de una probable estabilización de  $\beta$ -catenina que inactivaría a NF- $\kappa$ B y promovería su exportación nuclear.
2. El post-tratamiento por 2h con TMS después de una infección con *S. aureus* a una MOI de 100:1 durante 2h incrementa la traslocación de NF- $\kappa$ B en células MAC-T ( $p < 0.05$ ), probablemente sin que se lleve a cabo una acumulación lisosomal de TMS se favorecería la inhibición de Src, permitiendo la degradación  $\beta$ -catenina, la activación de la vía de TLR y con ello la traslocación de NF- $\kappa$ B.
3. Un posible mecanismo inmunomodulador de la TMS es a través de la inhibición de la función de Src y la vía de Akt/GSK3/ $\beta$ -catenina.

## 11. ABREVIATURAS

<b>(Akt)</b>	Proteína cinasa B
<b>(AMPc)</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>(ANOVA)</b>	Análisis de varianza
<b>(CBP)</b>	Proteína de unión a CREB
<b>(CICC)</b>	Caldo Infusión Cerebro Corazón
<b>(CKI)</b>	Caseína cinasa
<b>(CREB)</b>	Elemento de respuesta de unión a AMP cíclico
<b>(CTHRC1)</b>	Repetición de triple hélice de colágeno que contiene 1
<b>(DAMP)</b>	Patrón molecular asociado a daño
<b>(DMEM)</b>	Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Médium
<b>(EDTA)</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>(ESR1)</b>	Receptor de estrógenos 1
<b>(ERK)</b>	Cinasa regulada por señal extracelular
<b>(GFP)</b>	Proteína verde fluorescente
<b>(GSK3)</b>	Glucógeno sintasa cinasa 3
<b>(HSP70)</b>	Proteína de choque térmico de 70kDa
<b>(HEK 293)</b>	Células embrionarias de riñón humano
<b>(IκB)</b>	Inhibidor de kappa B
<b>(IKK)</b>	Cinasa de IκB
<b>(IL-1β)</b>	Interleucina 1 beta
<b>(IL-6)</b>	Interleucina 6
<b>(IL-8)</b>	Interleucina 8
<b>(IL-10)</b>	Interleucina 10
<b>(LB)</b>	Caldo de lisogenia
<b>(MAC-T)</b>	Mammary alveolar cells
<b>(MEC)</b>	Mammary epithelial cells
<b>(MIC)</b>	Concentración mínima inhibitoria



<b>(MOI)</b>	Multiplicity of infection
<b>(MyD88)</b>	Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
<b>(NF-<math>\kappa</math>B)</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas
<b>(NLR)</b>	Receptor tipo Nod
<b>(p38)</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>(PAMP)</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>(PI3K)</b>	Fosfoinositol 3 cinasa
<b>(PMN)</b>	Polimorfonucleares
<b>(PRR)</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>(PTK)</b>	Proteínas tirosina cinasa
<b>(RAW 264.7)</b>	Monocito macrófago de leucemia de ratón
<b>(RelA)</b>	Factor de transcripción p65
<b>(ROS)</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>(SFB)</b>	Suero fetal bovino
<b>(TGF-<math>\beta</math>)</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>(TFGB1)</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>(TLR)</b>	Receptor tipo Toll
<b>(TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Factor de necrosis tumoral alfa

## 12. REFERENCIAS

1. Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM (2005). "SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation". *Oncogene*. 24: 7729–45
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801
3. Aoki, Y., and P. N. Kao. (1999). Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF- $\kappa$ B, but not NFAT, through calcineurin-independent signalling in T-cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2678-2684
4. Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 169:74–79.
5. Bouchard, D. S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., & Even, S. (2013). Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Applied and environmental microbiology*, 79(3), 877–885. <https://doi.org/10.1128/AEM.03323-12>
6. Castañeda Vázquez, H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda Vazquez, M.A., & El-Sayed, A. (2013). Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(2), 377-382.
7. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., & Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & development*, 9(13), 1586-1597.
8. Culić O, Eraković V, Parnham MJ. (2001). Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol.* Oct 19;429(1-3):209-29.
9. Desaki, M., H. Okazaki, T. Sunazuka, S. Omura, K. Yamamoto, and H. Takizawa. (2004). Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: possible role in the

- signaling pathway that regulates nuclear factor-kappaB activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1581-1585.
10. Desaki, M., H. Takizawa, T. Ohtoshi, T. Kasama, K. Kobayashi, T. Sunazuka, S. Omura, K. Yamamoto, and K. Ito. (2000). Erythromycin suppresses nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:124-128
  11. Dziewanowska, K., Patti, J. M., Deobald, C. F., Bayles, K. W., Trumble, W. R., & Bohach, G. A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and immunity*, 67(9), 4673–4678.
  12. Farag, Mayada Ragab, et al. (2019). Astragalus polysaccharides alleviate tilmicosin-induced toxicity in rats by inhibiting oxidative damage and modulating the expressions of HSP70, NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 pathway. *Research in veterinary science*, , vol. 124, p. 137-148.
  13. Figge J, Smith TF (1988). "Cell division sequence motif". *Nature*. 334(6178): 109
  14. Figge J, Breese K, Vajda S, Zhu QL, Eisele L, Andersen TT, MacColl R, Friedrich T, Smith TF. (1993). "The binding domain structure of retinoblastoma-binding proteins". *Protein Science*. 2 (2): 155–64
  15. Fraunholz, M., & Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 43. doi:10.3389/fcimb.2012.00043
  16. Ghosh S, Karin M (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81–96
  17. Gilbert, P.C., Jensen, K., Glass, E., Foucras, G., Granié, R., Rupp, R., and Rainard, P. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research*, 44.
  18. Gilmore TD. (2006). Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.

19. Günther, J., Koy, M., Berthold, A., Schuberth, H. J., & Seyfert, H. M. (2016). Comparison of the pathogen species-specific immune response in udder derived cell types and their models. *Veterinary research*, 47(1), 22.
20. Günther, Juliane, et al. Günther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H. J., ... & Seyfert, H. M. (2017). Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Scientific reports*, 7(1), 4811.
21. Hua Wu, Xing-Xing Lu, Jing-Ru Wang, Tian-Yu Yang, Xiu-Ming Li, Xiao-Shun He, Yi Li, Wen-Long Ye, Yong Wu, Wen-Juan Gan, Peng-Da Guo & Jian-Ming Li (2019) TRAF6 inhibits colorectal cancer metastasis through regulating selective autophagic CTNNB1/ $\beta$ -catenin degradation and is targeted for GSK3B/GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation, *Autophagy*, 15:9, 1506-1522
22. Hutti, J. E., Turk, B. E., Asara, J. M., Ma, A., Cantley, L. C., & Abbott, D. W. (2007). I $\kappa$ B kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular and cellular biology*, 27(21), 7451–7461. doi:10.1128/MCB.01101-07
23. Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. (1991) Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res*.197(2):191-9.
24. Ichiyama, T., M. Nishikawa, T. Yoshitomi, S. Hasegawa, T. Matsubara, T. Hayashi, and S. Furukawa. (2001). Clarithromycin inhibits NF- $\kappa$ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:44-47.
25. International Dairy Federation. (1987). Bovine mastitis. Definitions and guidelines for diagnosis. *Bull Int Dairy Federation*, 211: -8.
26. Josse, Jérôme; Laurent, Frédéric; Diot, Alan. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 2433.

27. Kanangat S, Postlethwaite A, Cholera S, Williams L, Schaberg D (2007) Modulation of gene expression in *Staphylococcus aureus* by interleukin-1beta: novel implications in bacterial pathogenesis. *Microbes and Infection* 9: 408-415.
28. Kanoh y Rubin. (2010). Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications. *Clin Microbiol Rev.* Jul; 23(3): 590–615.
29. Karin M, Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol* 18:621–663
30. Kerro Dego O, J.E. van Dijk, 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 pp. 181-198
31. Kim HY, Ahn BY, Cho Y (2001). "Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen". *The EMBO Journal*. 20 (1–2): 295–304
32. Kim, S. C., Stice, J. P., Chen, L., Jung, J. S., Gupta, S., Wang, Y., ... Knowlton, A. A. (2009). Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circulation research*, 105(12), 1186–1195. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209643
33. Lawrence Toby. (2009). The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*;1:a001651.
34. Ma, Bin; Hottiger, Michael O. (2016). Crosstalk between Wnt/β-catenin and NF-κB signaling pathway during inflammation. *Frontiers in immunology*, vol. 7, p. 378.
35. Martínez-Cortés, I., Acevedo-Domínguez, N. A., Olguin-Alor, R., Cortés-Hernández, A., Álvarez-Jiménez, V., Campillo-Navarro, M., ... & Loor, J. J. (2018). Tilmicosin modulates the innate immune response and preserves casein production in bovine mammary alveolar cells during *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of animal science*, 97(2), 644-656.

36. Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Keiko Kobayashi and Jun Sakurai (September 6th 2012). Role of Tyrosine Kinase A Receptor (TrkA) on Pathogenicity of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin, Protein Phosphorylation in Human Health, Cai Huang, IntechOpen, DOI: 10.5772/48515
37. Mestorino, N., Errecalde JO. (2004). Tilmicosina: un nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Veterinaria* 24 (2): 21-28
38. Miranda-Morales, r.e.; Rojas-Trejo, v.; Segura-Candelas, r. Et al. (2008). Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1149, p.300-302.
39. Mitchell, J., Kim, S. J., Seelmann, A., Veit, B., Shepard, B., Im, E., & Rhee, S. H. (2018). Src family kinase tyrosine phosphorylates Toll-like receptor 4 to dissociate MyD88 and Mal/Tirap, suppressing LPS-induced inflammatory responses. *Biochemical pharmacology*, 147, 119–127. doi:10.1016/j.bcp.2017.11.015
40. Mogensen Trine H, (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses, *Clinical Microbiology Reviews*. Apr. P. 240-273.
41. Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. (2013). Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. *Br. J. Nutr.* 109: 802-809.
42. O'Dea, E. L., Barken, D., Peralta, R. Q., Tran, K. T., Werner, S. L., Kearns, J. D., ... Hoffmann, A. (2007). A homeostatic model of I $\kappa$ B metabolism to control constitutive NF- $\kappa$ B activity. *Molecular systems biology*, 3, 111. doi:10.1038/msb4100148
43. O'Neill, L. A., and A. G. Bowie. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7:353–364.

44. Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., & Komatsuzawa, H. (2011). Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 8097–8105. doi:10.1128/AEM.05316-11
45. Ose EE. (1987) In vitro antibacterial properties EL-870, a new semisynthetic macrolide antibiotic. *Journal of Antibiotics*.; 40: 190-194.
46. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13766– 13771.
47. Pahl, Heike L. and Baeuerle, Patrick A.( 1996), Activation of NF- $\kappa$ B by ER stress requires both  $Ca^{2+}$  and reactive oxygen intermediates as messengers, *FEBS Letters*, 392, doi: 10.1016/0014-5793(96)00800-9
48. Pétrilli V., Papin S., Dostert C., Mayor A., Martinon F. and Tschopp J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14, 1583-1589. 10.1038/sj.cdd.4402195
49. Reshi , I Husain , S Bhat , MU Rehman , R Razak , S Bilal & MR Mir. (2015) . Bovine mastitis as an evolving disease and its impact on the dairy industry. *International Journal of Current Research and Review* 7 48–55
50. Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel-Scaia, V. M., & Allen, I. C. (2018). Modulating inflammation through the negative regulation of NF- $\kappa$ B signaling. *Journal of leukocyte biology*, 103(6), 1131-1150.
51. Sakurai, Jun., Oda, Masataka (2011). Effect of Macrolide Antibiotics on Biological Activities Induced by *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. DOI 10.5772/22404
52. Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Chem Biol.*Jan;2(1):13-22.

53. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* Aug;10(8):2247-58.
54. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274:17406–17409.
55. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001a). Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$  B signaling pathway. *Science*293:1495–149.
56. Senftleben U, Li ZW, Baud V, Karin M (2001b). IKK $\beta$  is essential for protecting T cells from TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Immunity* 14:217–230
57. Silva-García, Octavio, et al. (2018). Glycogen Synthase Kinase 3 $\alpha$  Is the Main Isoform That Regulates the Transcription Factors Nuclear Factor-Kappa B and cAMP Response Element Binding in Bovine Endothelial Cells Infected with *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in immunology*, vol. 9, p. 92.
58. Tak PP, Firestein GS. (2001). NF-kB: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7–11.
59. Takeuchi O, Akira S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
60. Watts J.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis *Vet. Microbiol.*, 16, pp. 41-66
61. Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R. M., Günther, J., Draing, C., ... & Seyfert, H. M. (2008). Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF $\alpha$  and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Molecular immunology*, 45(5), 1385-1397.
62. Yosuke Aoki\* and Peter N. Kao. (1999). Erythromycin Inhibits Transcriptional Activation of NF-kB, but not NFAT, through Calcineurin-



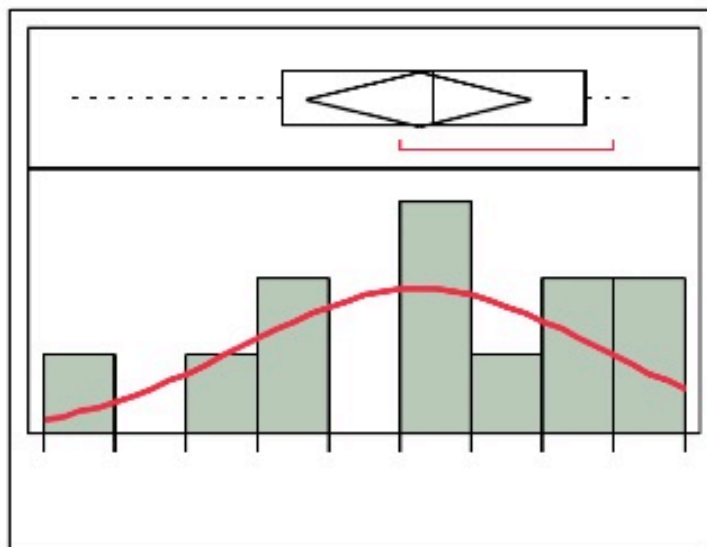
Independent Signaling in T Cells. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov; 43(11): 2678–2684

63. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. (1997). The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91:243–252.

## ANEXOS

### Curva de infección con *S. aureus*

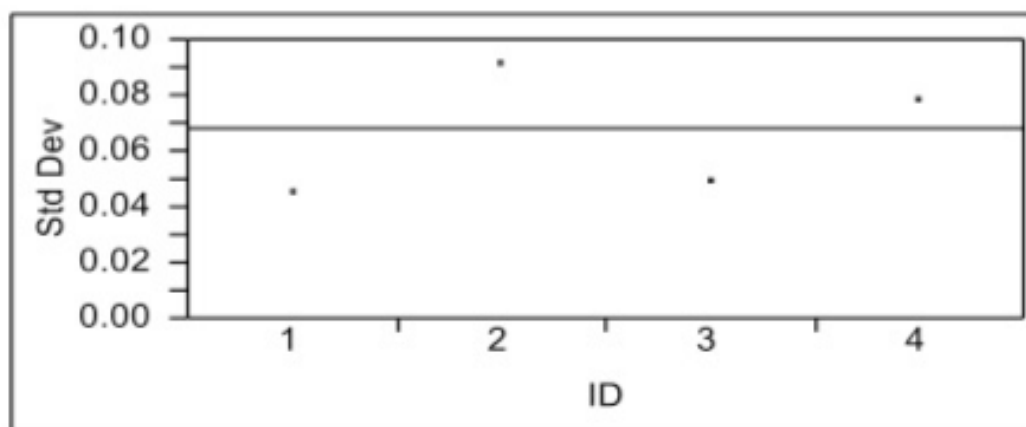
- Prueba de normalidad



**Goodness-of-Fit Test**  
Shapiro-Wilk W Test

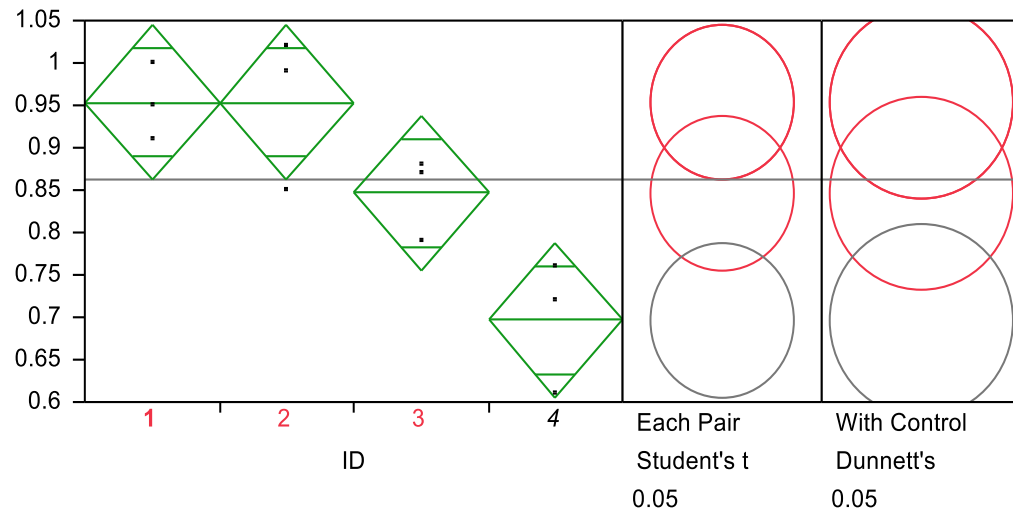
W	Prob < W
0.953043	0.6818

- Homogeneidad de varianzas



Test	Prob > F
Levene	0.3641

- Análisis de varianza (ANOVA) y Post hoc



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
ID	3	0.13275833	0.044253	9.4490	0.0052*
Error	8	0.03746667	0.004683		
C. Total	11	0.17022500			

### Comparisons with a control using Dunnett's Method

Control Group = 1

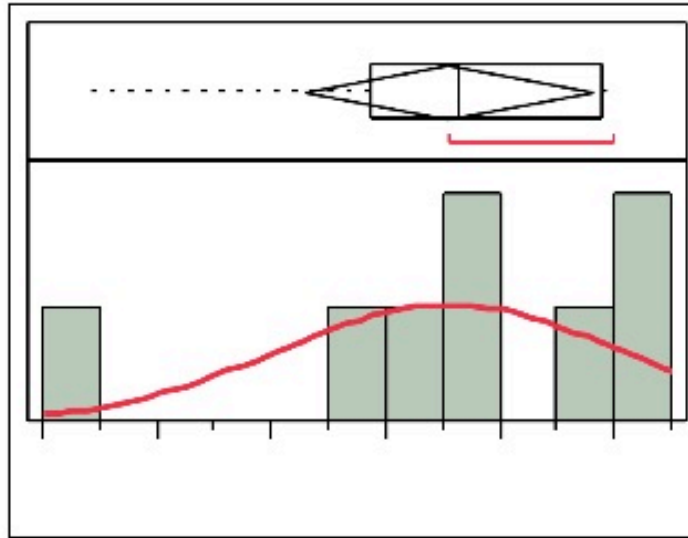
Alpha
0.05

Level	Abs(Dif)-LSD	p-Value
1	-0.16	1.0000
2	-0.16	1.0000
3	-0.05	0.2082
4	0.096	0.0046*

Positive values show pairs of means that are significantly different.

### Pre-tratamiento con TMS

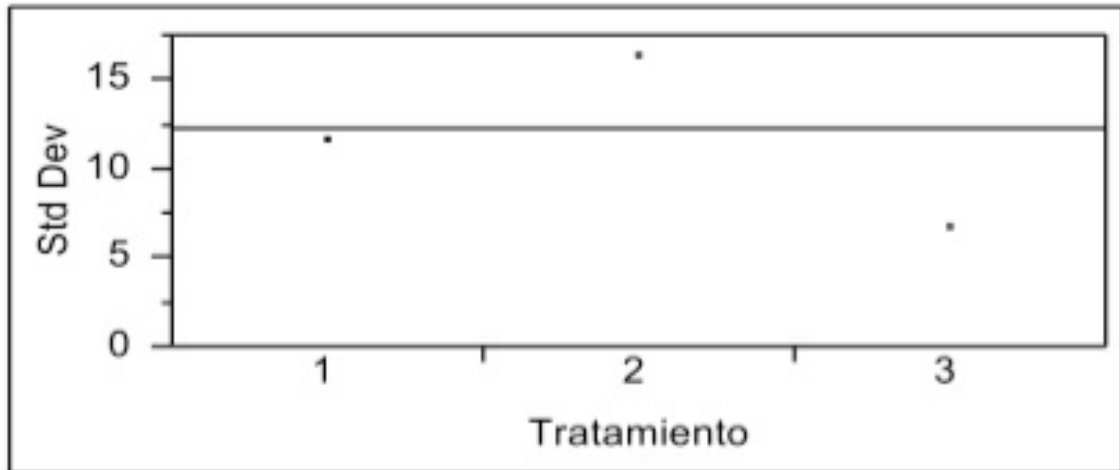
- Prueba de normalidad



**Goodness-of-Fit Test**  
Shapiro-Wilk W Test

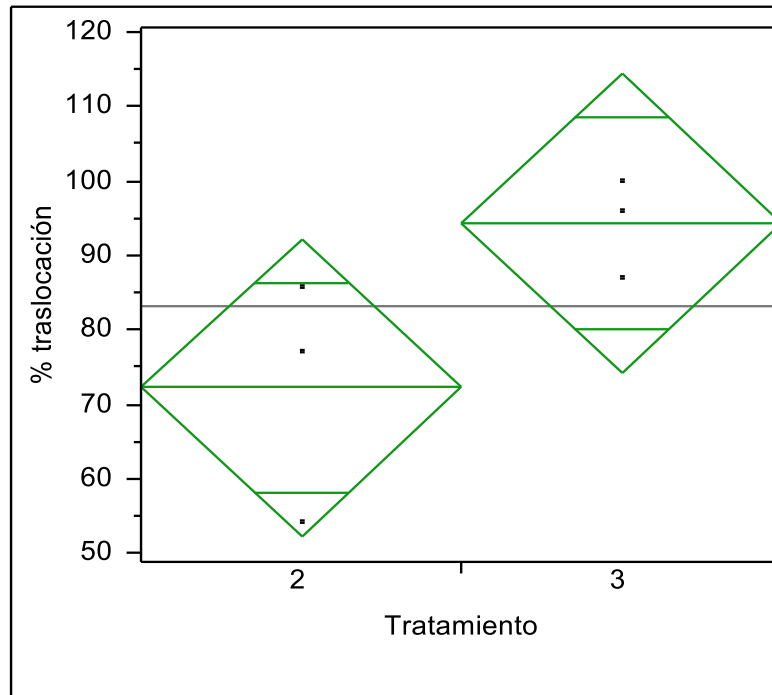
<b>W</b>	<b>Prob &lt; W</b>
0.870854	0.1573

- Homogeneidad de varianzas



<b>Test</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Levene	0.2585

- Análisis de varianza (ANOVA)

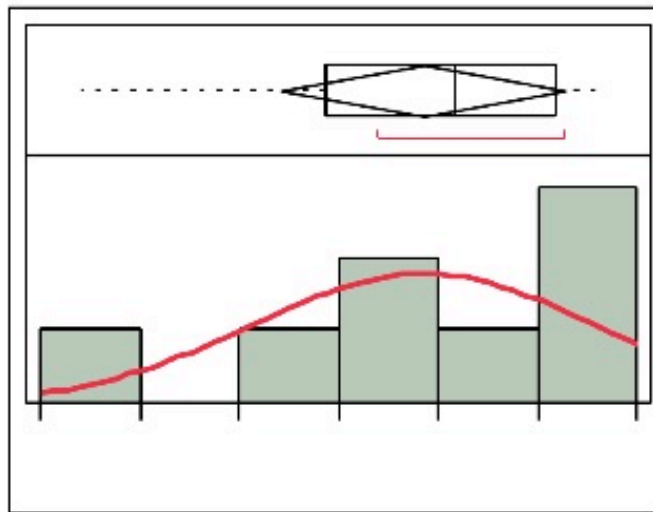


### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Tratamiento	1	730.4067	730.407	4.6975	0.0961
Error	4	621.9507	155.488		
C. Total	5	1352.3573			

### Post-tratamiento con TMS

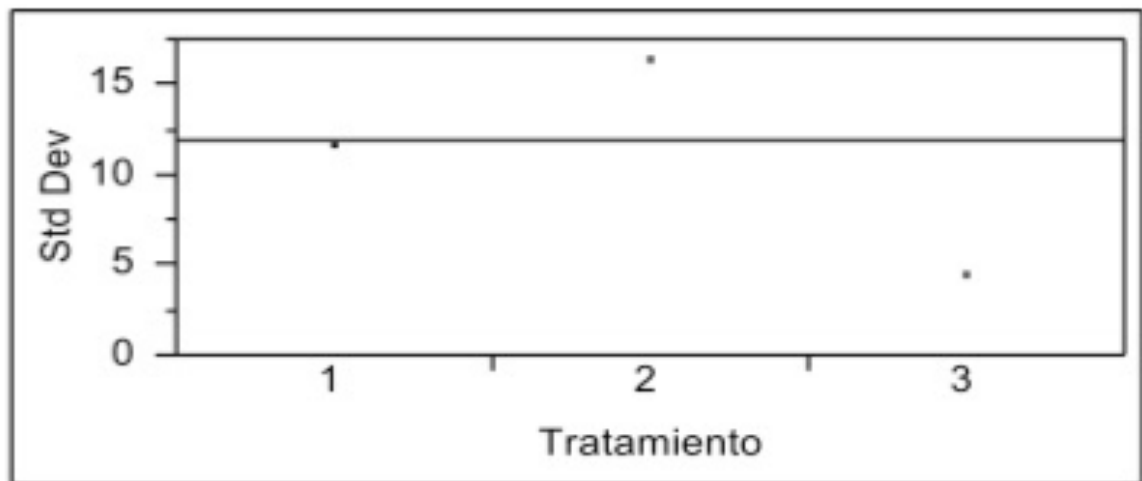
- Prueba de normalidad



**Goodness-of-Fit Test**  
Shapiro-Wilk W Test

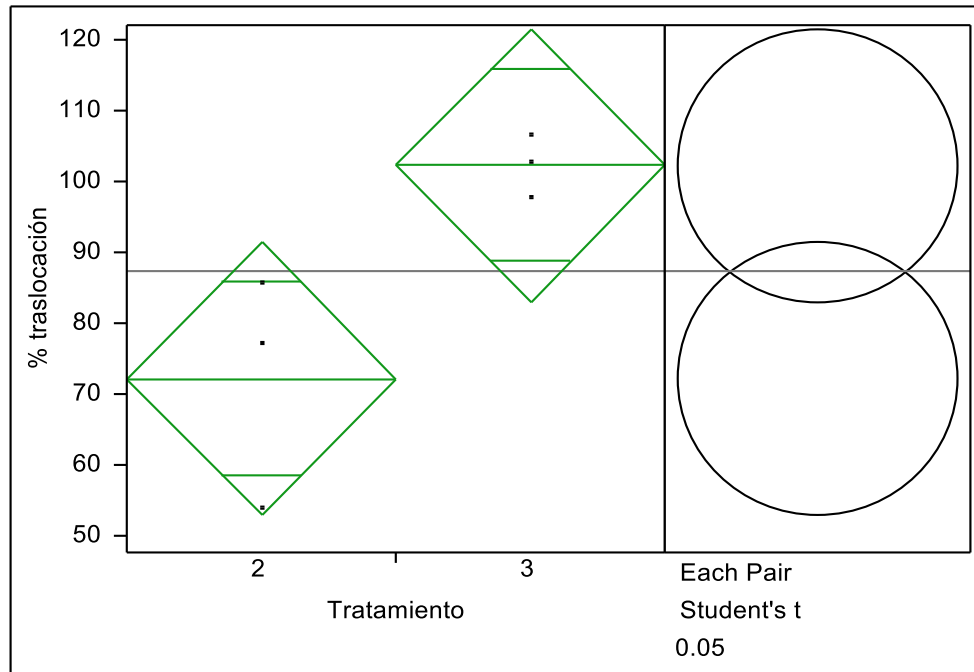
<b>W</b>	<b>Prob &lt; W</b>
0.899940	0.2886

- Homogeneidad de varianzas



<b>Test</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Levene	0.1402

- Análisis de varianza (ANOVA) y Post hoc



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Tratamiento	1	1355.1048	1355.10	9.4750	0.0370*
Error	4	572.0777	143.02		
C. Total	5	1927.1825			

### Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
2.77645	0.05

Abs(Dif)-LSD	3	2
3	-27.1107	2.945952
2	2.945952	-27.1107

Positive values show pairs of means that are significantly different.