



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO
CONTRA *Staphylococcus aureus* DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMÁTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA Y
TEJIDO ADIPOSO FETAL BOVINO**

BERLY CAHUASCANCO QUISPE

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO
CONTRA *Staphylococcus aureus* DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMÁTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA Y
TEJIDO ADIPOSO FETAL BOVINO

BERLY CAHUASCANCO QUISPE

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PERALTA T.

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

BERLY CAHUASCANCO QUISPE

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 23 DE MAYO DE 2017

DIRECTOR DE TESIS

DR. OSCAR PERALTA T.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. DANIELA IRAGÜEN C.

DR. CRISTIAN TORRES M

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio Centralizado de Investigación (LACIV) , del Departamento de Fomento de la Producción Animal y en el Laboratorio de Cultivos Bacteriológicos del Departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y contó con financiamiento

Proyecto FONDEF ID 1510129

BIOGRAFÍA

Nacido un 25 de Julio de 1990 en el distrito de Checacupe, provincia Canchis, departamento Cusco, Perú. Terminé mi educación primaria en el Centro Educativo Primario N° 56006 Gaona Cisneros–Sicuani–Cusco en año 2001. Terminé mi educación Secundaria en el Colegio Gran Unidad Escolar Mateo Pumacahua–Sicuani–Cusco el año 2006. Ingresando a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Altiplano–Puno en el año 2007 y obteniendo el grado de Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia el año 2013 y el grado de Médico Veterinario y Zootecnista el año 2014. Ingresé al Programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias–Universidad de Chile el año 2015.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD DE CHILE**, y muy especialmente a la **FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**, por darme la oportunidad de realizar mi formación académica de postgrado en el programa de **MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS**.

A la Beca Presidente de la República del Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo del Ministerio de Educación del Perú, **PRONABEC**, por financiar mis estudios del magíster.

Al proyecto del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, **FONDEF IDeA: ID15I10129**. Perteneciente al Ministerio de Educación de Chile, por financiar la parte experimental del presente trabajo de investigación.

Al **Dr. Oscar Alejandro Peralta Troncoso**, Director del presente trabajo de investigación; por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento. Su siempre atenta y efectiva colaboración hizo que este trabajo se culminara satisfactoriamente.

A la **Dra. Javiera Bahamonde Azcuy**, por su dedicación y su esfuerzo, aportándome todo su conocimiento profesional constantemente para llegar a finalizar con éxito esta etapa de mi vida profesional.

Al **Dr. Patricio Retamal Merino**, por la ayuda recibida en el laboratorio de cultivo bacteriológico, en donde obtuve una rica información y una gran parte de la base de datos del presente trabajo de investigación.

A mis compañeros **Jaharia, Miguel, Olger y Moisés**, por los buenos momentos y la permanente colaboración recibida en la ejecución de la parte experimental.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. Introducción	19
2. Revisión bibliográfica	22
2.1. Células madre mesenquimáticas (MSCs)	22
2.2. Potencial antibacteriano de las MSCs.....	23
2.2.1. Péptido antimicrobiano defensina.....	24
2.2.2. Péptido antimicrobiano NK-lisina	25
2.2.3. Péptido antimicrobiano catelicidina.....	25
2.2.4. Péptido antimicrobiano hepcidina	26
2.2.5. Enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa	26
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> y mastitis bovina.....	27
2.4. Potencial utilización de MSCs para el tratamiento de la mastitis bovina.....	29
3. Hipótesis	32
4. Objetivo general.....	32
5. Objetivos Específicos.....	32
6. Materiales y Métodos.....	33
6.1. Aislamiento de MSCs desde la médula ósea y tejido adiposo fetal bovino	33
6.2. Obtención de medio condicionado	35
6.3. Ensayo de supervivencia y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del <i>Staphylococcus aureus</i>	35
6.4. Activación de MSCs mediante exposición a antígenos derivados de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
6.5. Cuantificación de niveles de mRNA de péptidos antimicrobianos en MSCs fetales bovinas mediante PCR cuantitativo (Q-PCR)	38
6.6. Cuantificación del péptido antimicrobiano bBD4A en medio condicionado mediante ELISA	40

6.7. Análisis de datos	40
7. Resultados.....	41
7.1. Supervivencia y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del <i>Staphylococcus aureus</i>	41
7.2. Niveles de mRNA de péptidos antimicrobianos en MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino.	47
7.3. Niveles de β -defensina bovina 4A (bBD4A) en medio condicionado de MSCs activadas mediante preexposición a <i>Staphylococcus aureus</i>	49
8. Discusión	53
9. Bibliografía.....	61

ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Caracterización de cepas de <i>S. aureus</i> SAU 1S y ATCC 25923 utilizadas para determinación del potencial antibacteriano de las MSCs fetales bovinas.....	36
TABLA 2. Secuencia de partidores utilizados para el análisis por Q-PCR.....	39
TABLA 3. Detección de mRNA para los péptidos antimicrobianos en MSCs y fibroblastos no activados y activados mediante exposición a <i>S. aureus</i>	47

FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Supervivencia de la cepa ATCC 25923 de <i>S. aureus</i> en medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos.....	41
Figura 2. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de <i>S. aureus</i> en medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos.....	42
Figura 3. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de <i>S. aureus</i> en medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos.....	43
Figura 4. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de <i>S. aureus</i> en medio condicionado activado de MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos.....	45
Figura 5. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de <i>S. aureus</i> en medio condicionado activado y concentrado de MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos.....	46
Figura 6. Niveles de mRNA para bBD4A en MSCs de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos.....	48
Figura 7. Niveles de mRNA de NK1 en MSCs de médula ósea, tejido adiposo y fibroblasto fetal bovino.....	49
Figura 8. Niveles de bBD4A en medios condicionados de fibroblastos y MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino.....	50
Figura 9. Niveles de bBD4A en medios condicionados activados de MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino y fibroblastos.....	51
Figura 10. Niveles de bBD4A en medios condicionados activados y concentrados de fibroblastos y MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino.....	52

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
Agar LB	Agar Luria bertani
Agr	Regulador global de virulencia agr
ATCC	American Type Culture Collection
bBD	Defensina beta bovina
bBD4A	β-defensina bovina 4A
BD	Defensina beta
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
Caldo LB	Caldo Luria bertani
CATHL	Catelucidina
CCL2	Precursor de la quimiocina 2 de motivo C-C
CD	Cluster de diferenciación
cDNA	DNA complementario
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Umbral de ciclo
CXCL8	Precursor de la quimiocina 8 de motivo C-X-C
DCA	Diseño completamente aleatorio
DEFA	Defensina alfa
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FB	Fibroblastos
FPN-1	Ferroportina
g	Gramo
G	Calibre de la aguja (diámetro)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
hBD	Beta defensina humana
HBSS	Solución salina buffer de Hank

HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenasa
IFN- γ	Interferón gamma
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleucina
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
kg	Kilogramos
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes
MSC MO	Células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea
MSC TA	Células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo
MSCs	Células madre mesenquimáticas
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de disodio
NF-K β	Factor nuclear dependiente-kappa B
NK1	NK-lisina bovino 1
NK	Natural killer
NMC	Nacional Mastitis Council
NO	Óxido nítrico
NyD88	Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
ODEPA	Oficina de Estudios y Políticas Agrarias
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salina fosfato

PGE-2	Prostaglandina E2
PVL	Leucocidina de Panton valentine
Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT	Transcriptasa reversa
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S. uberis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
sarA	Regulador global de virulencia sarA
SDF-1	Factor derivado de células estromales
SFB	Suero fetal bovino
TLR	Receptores tipo <i>toll</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSST	Toxina del síndrome del shock toxico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
US\$	Dólares americanos
VACCIVET	Laboratorio de Vacunas Veterinarias
x g	Unidades de revolución de fuerza centrífuga
β ACTIN	Beta actina
μ g	Microgramos

Resumen

La mastitis es la principal enfermedad que afecta a vacas productoras de leche a nivel mundial, con costos de tratamiento de hasta US\$ 200/vaca/año. Asimismo, las pérdidas en producción de leche fluctúan entre 1.335 y 1.539 kg/lactancia/vaca en casos de mastitis sub clínica y clínica respectivamente. En Chile, dentro de los principales patógenos causantes de esta enfermedad se encuentra el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) que es responsable del 22 al 68,6% de los cuadros sub clínicos. Recientemente, se ha reportado la existencia de un alto riesgo de resistencia bacteriana producto del uso inadecuado de antibacterianos para el tratamiento de mastitis causadas por *S. aureus*. Alternativamente en el último tiempo se ha establecido el uso de células madre mesenquimáticas (MSCs) para el tratamiento de múltiples enfermedades en medicina humana y veterinaria incluyendo infecciones bacterianas. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial antibacteriano *in vitro* contra *S. aureus* del medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino. Se utilizaron las cepas ATCC 25923 y SAU 1S de *S. aureus* con el fin de determinar su sobrevivencia en medio condicionado de MSCs no concentrado, concentrado, activado y activado concentrado mediante pre-exposición a *S. aureus*. En estos mismos cultivos de MSCs se cuantificaron los niveles de mRNA de los péptidos antimicrobianos β -defensina 4A (bBD4A), NK-lisina 1 (NK1), catelicidina 2 (CATHL2), hepcidina e indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) mediante Q-PCR y de bBD4A mediante ELISA. La sobrevivencia de la cepa ATCC 25923 no fue diferente ($P>0,05$) cuando fue tratada con medio condicionado no concentrado de MSCs en comparación con los controles de fibroblastos y DMEM. Sin embargo, el porcentaje de sobrevivencia de la cepa SAU 1S disminuyó ($P<0,05$) al ser tratada con medio condicionado no concentrado de MSCs en comparación con el control DMEM. Adicionalmente, el medio condicionado concentrado de MSCs indujo una disminución ($P<0,05$) en la supervivencia de la cepa SAU 1S con respecto a los medios condicionados concentrados control de fibroblastos y DMEM. El medio condicionado activado, así como el medio condicionado activado concentrado de MSCs disminuyeron ($P<0,05$) la supervivencia de la cepa SAU-1S con respecto a los medios controles de MSCs no activados, de

fibroblastos y DMEM. La activación indujo un aumento ($P < 0,01$) de 3,5 veces en los niveles de mRNA de bBD4A en las MSCs de tejido adiposo y de 1,17 veces en MSCs de médula ósea. Además, la activación aumentó ($P < 0,05$) en 1,66 y 1,37 veces el nivel de mRNA de NK1 en fibroblastos y MSCs de tejido adiposo, respectivamente. Los niveles de proteína bBD4A también aumentaron ($P < 0,05$) en los medios condicionados de MSCs y de fibroblastos por efecto de la concentración. La activación solo aumenta ($P < 0,05$) los niveles de bBD4A en los medios condicionados de MSCs derivadas de médula ósea. En conclusión, los medios condicionados de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino poseen efecto antibacteriano contra *S. aureus* en un sistema de cultivo *in vitro*. Este potencial antibacteriano se ve aumentado al concentrar por filtración y activar el medio condicionado mediante pre-exposición de MSCs a *S. aureus*. Estos resultados sugieren que el efecto antibacteriano de MSCs es mediado por la expresión de péptidos antimicrobianos NK1 y bBD4A.

Palabras clave: Mastitis bovina, *S. aureus*, MSCs, péptidos antimicrobianos.

Abstract

Mastitis is the main disease affecting dairy cows worldwide with treatment costs reaching up to US \$ 200/cow/year. Moreover, milk production losses fluctuate between 1,335 and 1,539 kg/lactation/cow in cases of clinical and clinical sub mastitis respectively. In Chile, one of the main pathogens causing mastitis *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which is responsible for 22 to 68.6% of subclinical cases. Recently a high risk of bacterial resistance has been reported due to inappropriate use of antibacterial agents in the treatment of mastitis caused by *S. aureus*. Alternatively, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been described for the treatment of multiple diseases in human and veterinary medicine including bacterial infections. Consequently, the aim of the present study was to evaluate the in vitro antibacterial potential against *S. aureus* of conditioned medium from MSCs derived from bone marrow and fetal bovine adipose tissue. *S. aureus* strains ATCC 25923 and SAU 1S were used in order to determine their survival in conditioned medium from non-concentrated, concentrated, activated and activated concentrated MSCs by exposure to *S. aureus*. mRNA levels from antibacterial peptides β -defensin 4A (bBD-4A), NK-lysine 1 (NK1), cathelicidin 2 (CATHL2), hepcidin and Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) were quantified by quantitative-PCR (Q-PCR) and bBD-4A by ELISA. The survival percentage of ATCC strain 25923 was not different ($P>0.05$) when it was treated with non-concentrated conditioned medium of MSCs compared to controls of fibroblasts and DMEM. In contrast, the survival percentage of SAU-1S strain decreased ($P<0.05$) when it was treated with nonconcentrated conditioned medium of MSCs compared to the DMEM control. Additionally, the concentrated conditioned medium of MSCs induced a decrease ($P<0.05$) in the survival percentage of the SAU 1S strain in comparison to the conditioned medium control fibroblasts and DMEM. The activated conditioned medium as well as the conditioned and activated conditioned medium of MSCs decreased ($P<0.05$) survival percentage of the SAU 1S strain with respect to non-activated MSCs control media, fibroblasts and DMEM. Activation induced a 3.5-fold increase ($P<0.01$) in bBD4A mRNA levels in adipose tissue MSCs and 1.17-fold in bone marrow MSCs. In addition, activation increased ($P<0.05$) 1.66 and 1.37-fold levels of NK1 mRNA in fibroblasts and adipose tissue MSCs,

respectively. Levels of bBD4A also increased ($P < 0,05$) in the conditioned media of MSCs and fibroblasts by concentration effect. Moreover, activation increased levels of bBD4A in conditioned media of MSCs derived from bone marrow. In conclusion, conditioned medium of MSCs possess antibacterial effect against *S. aureus* in an *in vitro* culture system. The antibacterial property is increased when conditioned medium is concentrated by filtration and activated by pre-exposition to *S. aureus*. The antibacterial potential of MSCs may be exerted by expression of antimicrobial peptides bBD4A and NK1.

Key words: Bovine mastitis, *S. aureus*, MSCs, antimicrobial peptides

1. Introducción

Las células madre mesenquimáticas (MSCs) son células adultas indiferenciadas con morfología fibroblastoide que se encuentran en varios tejidos incluyendo médula ósea y el tejido adiposo (Russell et al., 2016). La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido una serie de requisitos para definir una población de MSCs humanas que incluyen capacidad de adherencia al plástico, expresión de marcadores de superficie mesenquimáticos (CD73, CD90 y CD105), ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD11, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 y MHC II) y potencial de diferenciación hacia linajes celulares osteogénico, condrogénico y adipogénico (Dominici et al., 2006)

Otra característica de las MSCs, es la síntesis de vesículas extracelulares de comunicación autocrina y paracrina (Marote et al., 2016). Se ha reportado que las MSCs poseen receptores transmembrana tipo *toll*, presentes comúnmente sólo en las células del sistema inmune (Tomchuck et al., 2008) y cuya estimulación por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) induce la síntesis y secreción de vesículas extracelulares conteniendo factores bioactivos (Zeuner et al., 2016). Estos factores bioactivos poseen funciones inmunomoduladoras de la respuesta inmune, proregenerativos, proangiogénicos, antiapoptóticos (Marquez-Curtis y Janowska-Wieczorek, 2013) y antimicrobianas (Krasnodembskaya et al., 2010). La actividad antimicrobiana es mediada por la acción de una serie de péptidos catiónicos como β -defensina (BD), catelicidina (CATHL) y hepcidina (Devaney et al., 2015; Sung et al., 2016 y Alcayaga-Miranda et al., 2015). Estos péptidos catiónicos además pueden modular la inflamación local, estimular la angiogénesis y promover la eliminación de algunas células tumorales (Phan et al., 2016). Sus acciones antibacterianas se basan principalmente en la permeabilización de la membrana bacteriana aniónica, generando pérdida del potencial de membrana y promoviendo la salida de componentes citoplasmáticos que conducen a la destrucción de la bacteria (Xhindoli et al., 2016). Esta función antimicrobiana extiende el rol terapéutico que las MSCs pueden cumplir en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que se desarrolla como resultado de la interacción entre varios factores asociados al hospedero, patógenos específicos, medio ambiente y el manejo (Zhang et al., 2016). Las pérdidas productivas por casos de mastitis alcanzan los 1.335 kg/lactancia/vaca en casos de mastitis sub clínica y 1.539 kg/lactancia/vaca en casos de mastitis clínica en el sur de Chile (Bravo, 2009). Así mismo, estudios realizados en Argentina, indican que las pérdidas económicas asociadas a cuadros de mastitis clínica alcanzan los US\$ 200/vaca/año (Bogni et al., 2011). La disminución de la calidad de la leche a su vez, está determinada por la presencia de residuos antibióticos, células somáticas y células bacterianas que degradan las proteínas lácteas generando acidez y por lo tanto menor vida útil de la leche para consumo humano (Zhao y Lacasse, 2008; Casanova et al., 2016; Bogni et al., 2011 y Olsen et al., 2016). Se han descrito más de 135 patógenos causantes de mastitis, pero alrededor del 85 % de las infecciones intramamarias son causadas por un limitado grupo de patógenos contagiosos y ambientales, mientras que el restante de casos es consecuencia de infección por hongos, algas, entre otros. (Bogni et al., 2011).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es uno de los principales agentes contagiosos causante de la mastitis bovina en diversos países a nivel mundial, ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria lechera (Pereyra et al., 2014; Thomas et al., 2015 y Adkins et al., 2016). *S. aureus* posee una serie de factores de virulencia que se expresan de manera coordinada durante las distintas fases de la infección (Pereyra et al., 2014). Durante su fase de crecimiento exponencial que coincide con la fase de colonización, se sintetizan activamente proteínas con funciones adhesivas como proteína A, proteínas de unión a colágeno, fibrinógeno y fibronectina (Artursson et al., 2016). Posteriormente, durante la fase postexponencial se sintetizan activamente toxinas y enzimas extracelulares como la enterotoxina A, toxina 1 causante del síndrome del shock tóxico (TSST), α citotoxina y hemolisinas (α , β , γ y δ) que inducen la formación de poros en las membranas celulares (Artursson et al., 2016). Este patógeno es el agente contagioso más importante en las infecciones intramamarias sub clínicas y con frecuencia conduce a cuadros de mastitis crónica (Zhao y Lacasse, 2008).

La terapia de la mastitis se basa en la utilización de antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas. A pesar de que en Chile no existen estudios reportados sobre el número de vacas con mastitis que responden al tratamiento antibiótico, estudios realizados en Europa indican que el 36% de los animales con mastitis causada por *S. aureus* son resistentes al tratamiento con penicilina G (Thomas et al., 2015). Esto puede ser atribuido a una penetración incompleta del antibiótico a través de la glándula mamaria y a la potencial sobrevivencia de la bacteria dentro de las células del hospedero, lo que permitiría la recurrencia de la enfermedad (Kerr y Wellnitz, 2003). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de resistencia bacteriana frente a varios antibióticos que incluyen cefalosporinas, estreptomicinas y tetraciclinas, que son de amplia utilización en ganadería (Oliver y Murinda, 2012). En los últimos años también se han reportado varios casos de mastitis producido por el *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), lo cual obliga a generar nuevos programas de control y prevención para esta patología (Guimarães et al., 2017).

Considerando la capacidad terapéutica y especialmente el potencial antibacteriano que tienen las MSCs, el desarrollo de una terapia basada en MSCs bovinas podría tener un fuerte impacto en la terapia de la mastitis bovina. Sin embargo, previo a la aplicación *in vivo*, es relevante determinar las capacidades antibacterianas de las MSCs mediante estudios *in vitro*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Células madre mesenquimáticas (MSCs)

Las MSCs poseen potencial de diferenciación hacia tipos celulares derivados de la capa germinal mesodérmica que incluyen adipogénico, osteogénico y condrogénico (Pittenger et al., 1999 y Cortes et al., 2013). Recientemente se ha reportado que las MSCs poseen también potencial *in vitro* de diferenciación hacia linajes derivados de otras capas germinales como neurogénico (Boecker et al., 2016) y hepatogénico (Dueñas et al., 2014). Estos datos podrían indicar que el espectro de linajes de diferenciación de las MSCs es aún más amplio del previamente descrito.

Adicionalmente a su potencial de diferenciación multilinaje, recientemente ha cobrado importancia la capacidad de las MSCs para sintetizar vesículas extracelulares de comunicación autocrina y paracrina que poseen propiedades terapéuticas (Marote et al., 2016). Existen dos tipos de vesículas extracelulares que corresponden a las microvesículas y los exosomas. Las microvesículas se liberan al medio extracelular directamente por evaginación de la membrana plasmática (Yáñez-Mó et al., 2015). En comparación, los exosomas están contenidos en un compartimento endosomal dentro de cuerpos multivesiculares que al fusionarse con la membrana plasmática se liberan al espacio extracelular (Marote et al., 2016). Por medio de la comunicación celular autocrina y paracrina, se ha determinado que los contenidos de estas vesículas extracelulares corresponden principalmente a factores bioactivos como citoquinas, péptidos y factores de crecimiento que participan en procesos de inmunomodulación, migración, proliferación y diferenciación (Marquez-Curtis y Janowska-Wieczorek, 2013). En el último tiempo se ha descrito que estos factores bioactivos incluyen a péptidos antimicrobianos que tienen capacidad de inhibir directamente el crecimiento bacteriano y también a factores de inmunomodulación que inhiben indirectamente el crecimiento bacteriano a través del incremento de la capacidad bactericida y fagocítica de células inmunitarias como los macrófagos (Julianto y Rindastuti, 2016). Sin embargo, el tejido de origen de MSCs ya sea médula ósea o tejido adiposo condiciona esta capacidad inmunomoduladora, proliferativa, angiogénica, de diferenciación y antimicrobiana de las células (Strioga et al.,

2012; Sutton et al., 2016). Es así que se ha reportado que las MSCs de tejido adiposo poseen mejor capacidad de proliferación, potencial de inmunomodulación, de angiogénesis y de diferenciación en comparación a las MSCs de médula ósea (Strioga et al., 2012). Con respecto al potencial antibacteriano, actualmente se ha indicado que las MSCs de tejido adiposo humano tendrían mayor potencial antibacteriano contra la bacteria gram negativa *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) en comparación a las MSCs derivadas de médula ósea (Sutton et al., 2016). Así mismo, las MSCs de tejido adiposo tienen ventajas en la secreción de proteínas como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) (Li et al., 2015). En cambio, las MSCs de médula ósea tienen ventajas en la secreción de proteínas como el factor 1 derivado de células madre (SDF-1) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Li et al., 2015). Estas diferencias entre MSCs según el tejido de origen pueden influir en el potencial antibacteriano y su posterior aplicación terapéutica (Mo et al., 2016).

Actualmente, se ha descrito la utilización de MSCs para el tratamiento de diversas enfermedades de origen hematológico, renal, hepático, pulmonar, cardiovascular, óseo, neurológico y autoinmune (Squillaro et al., 2016). Así mismo, se sabe que los potenciales efectos regenerativos por parte de las MSCs endógenas del tejido dañado tendrían una capacidad limitada, por lo que se requeriría de fuentes externas de MSCs con fines de incrementar sus potenciales efectos terapéuticos (Julianto y Rindastuti, 2016).

2.2. Potencial antibacteriano de las MSCs

En casos de infecciones bacterianas, las células inmunocompetentes como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas responden prontamente, reconociendo los PAMPs, a través de receptores de reconocimiento de transmembrana tipo *toll* (TLRs), entre los que se han identificado 13 tipos en humanos (Abbas et al., 2012). En el caso de la especie bovina, se han caracterizado 10 TLRs (Pereyra et al., 2014), entre los cuales TLR-2 y TLR-4 son receptores ubicados en la membrana celular de MSCs y que reconocen principalmente el ácido lipoteicoico (LTA) presente en la pared celular de bacterias gram positivas y, al lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de

bacterias gram negativas respectivamente (Zeuner et al., 2016 y Sung et al., 2016). Además, estos receptores pueden reconocer varios PAMPs de diversos patógenos bacterianos y no bacterianos (Deng et al., 2016). Lo anterior es debido a que se pueden formar dímeros entre TLRs con similitudes estructurales y/o a que los PAMPs de algún patógeno específico puede diferir de los PAMPs típicamente conocidos (Pereyra et al., 2014).

Las interacciones entre PAMPs de bacterias y TLRs de células del sistema inmune (linfocitos y macrófagos) y de MSCs generan cambios en las funciones de las MSCs, que activan varias vías de transcripción de señales y factores de transcripción que inducen la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1, IL-6), quimiocinas (CCL2, CXCL8) y diversas moléculas involucradas en la activación del proceso inflamatorio (Abbas et al, 2012). Las MSCs también participan en el proceso inflamatorio mediante la activación de sus receptores TLR-2 y TLR-4, lo que conduce a la síntesis y secreción de diversas moléculas bioactivas con propiedades inmunomoduladoras y antibacterianas (Sung et al., 2016). Todas estas moléculas bioactivas y productos de secreción de las MSCs son eliminados al medio extracelular mediante vesículas extracelulares (Marote et al., 2016). Entre los péptidos antimicrobianos mas frecuentemente descritos en MSCs en distintas especies, se encuentran el péptido hBD secretado por MSCs derivadas de sangre del cordón umbilical humano (Sung et al., 2016), el péptido NK-Lisina secretado por linfocitos T citotóxicos y células NK en bovinos (Chen et al., 2015), el péptido catelicidina LL-37 secretado por MSCs derivadas de médula ósea humana (Devaney et al., 2015), el péptido hepcidina secretado por MSCs derivadas del fluido menstrual humano (Alcayaga-Miranda et al., 2015) y la enzimaIDO en MSCs derivadas de médula ósea humana (Meisel et al., 2011).

2.2.1. Péptido antimicrobiano defensina

Las defensinas son péptidos antimicrobianos catiónicos de bajo peso molecular que participan en la respuesta inmune innata de los vertebrados mediante la formación de poros en las membranas bacterianas (Hazlett y Wu, 2011). Estos péptidos se clasifican en tres grupos según la separación de sus residuos de cisteína: α -defensina (DEFA), β -defensina (BD) y θ -defensina (DEFT)

(Grudlewska et al., 2014 y Cheng et al., 2014). La DEFA y DEFT no se producen en los bovinos ya que en esta especie no se induce expresión génica para este tipo de defensinas, pero sí para BD bovina (bBD) (Aono et al., 2006). La expresión de este péptido es inducida por procesos infecciosos ya que posee actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas como *S. aureus* (Kościuczuk et al., 2014). La mayoría de las bBD están presente en fetos y terneros recién nacidos (Mirabzadeh-Ardakani et al., 2016), así mismo las células del epitelio mamario de los bovinos incrementan la expresión de varios tipos de bBD como: 3, 4, 6, 7, 10 y 13 en respuesta a presencia de antígenos bacterianos (Merriman et al., 2015).

2.2.2. Péptido antimicrobiano NK-lisina

El péptido NK-lisina tiene propiedades antimicrobianas y antitumorales y es una proteína efectora propia de los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (NK) (Chen et al., 2015). Se encuentra en los gránulos citolíticos de células CD2, CD3, CD4 y CD8, presentando una potente acción antimicrobiana contra *S. aureus* (Endsley et al., 2004). Luego de su activación, los linfocitos T citotóxicos y las células NK liberan éstos péptidos antimicrobianos, cuyo efecto induce discontinuidad de las membranas celulares y apoptosis bacteriana (Chen et al., 2016). Actualmente se sabe que en los bovinos se sintetizan cuatro tipos de NK-Lisina que incluyen NK-Lisina bovina 1 (NK1), NK-Lisina bovina 2A (NK2A), NK-Lisina bovina 2B (NK2B) y NK-Lisina bovina 2C (NK2C) (Chen et al., 2015).

2.2.3. Péptido antimicrobiano catelicidina

Las catelicidinas comprenden un grupo importante de péptidos de defensa inmunitaria, que en el humano es representado por el péptido catelicidina LL-37, mientras que en el bovino está representado por varias CATHLs (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) con propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas y antiparasitarias (Whelehan et al., 2014 y Piktel et al., 2016). Las CATHLs interactúan de forma electrostática con la membrana bacteriana aniónica, acumulándose e induciendo pérdida del potencial de membrana y salida de componentes citoplasmáticos que conducen a la destrucción bacteriana (Xhindoli et al., 2016). Por lo tanto, las CATHLs son pequeños péptidos catiónicos de amplio espectro que establecen

una defensa inmune innata temprana contra las infecciones en bovinos (Porcelli et al., 2008). Estructuralmente, las distintas CATHLs, presentan una secuencia N-terminal altamente conservada dentro de la especie bovina (Whelehan et al., 2014). La estructura α -hélice de la CATHL le confiere eficacia antimicrobiana contra bacterias gramnegativas y grampositivas (Xhindoli et al., 2016). Estas moléculas pueden tener un papel protector importante en el tratamiento de la mastitis, ya que en casos de mastitis bovinas experimentales se han extraído leucocitos desde muestras de leche que expresan genes que codifican para las CATHL1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 (Whelehan et al., 2014). Así mismo se sabe que la catelicidina se libera en la leche de vacas con mastitis (Addis et al., 2016).

2.2.4. Péptido antimicrobiano hepcidina

La hepcidina es un péptido de 25 aminoácidos ricos en cisteína que pertenece al grupo de las defensinas y que participa en la regulación del metabolismo del hierro (Lemos et al., 2010). Los procesos inflamatorios incrementan los niveles de hepcidina y bajo condiciones de hipoxia se reducen sus niveles circulantes (Ganz y Nemeth, 2015). Su mecanismo de acción es mediado por su interacción con la ferroportina 1 (FPN-1), lo que promueve la degradación de FPN-1 y limita la disponibilidad de hierro a nivel sérico (Lemos et al., 2010). Por lo tanto, su propiedad antibacteriana se basa en la restricción de hierro para los microorganismos invasores de ubicación extracelular (Shi y Camus, 2006). Se ha descrito un aumento en su actividad en ambientes con previa exposición bacteriana y elevadas concentraciones de hierro (saturación de la FPN-1) (Pigeon et al., 2001). Se ha reportado además que el análogo sintético de la hepcidina de búfalos *Bubalus bubalis* exhibe actividad antimicrobiana contra *S. aureus* mediante un mecanismo similar a la hBD, sin embargo, no demuestra acción antibacteriana en bacterias gramnegativas (Khangembam y Kumar, 2011).

2.2.5. Enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa

IDO es un modulador intracelular con propiedades inmunosupresoras (Ling et al., 2014). Altos niveles de esta enzima son secretados por las MSCs en ambientes inflamatorios caracterizados por altas concentraciones de IFN- γ y TNF- α ó también mediante estímulos a nivel de los receptores TLR-3,

cumpliendo la función supresora de la proliferación de linfocitos T (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015). Bajos niveles de IDO son secretados en ausencia de un ambiente inflamatorio o mediante estímulos a nivel de los receptores TLR-4 (Bernardo y Fibbe, 2013). La activación del mecanismo inmunosupresor en las MSCs estaría mediado en parte por el contacto célula-célula a través de los receptores TLRs y sus respectivos ligandos que resulta en la liberación de IDO y otras moléculas inmunosupresoras como prostaglandina (PGE-2) y óxido nítrico (NO) (Gebler et al., 2012). Las bacterias como el *S. aureus* al entrar en contacto con las MSCs se adhieren a la membrana celular y activan la secreción de factores bioactivos, generando la internalización parcial de *S. aureus* hacia compartimentos endolisosómicos (Artursson et al., 2016). En estas condiciones las MSCs alteran sus capacidades proliferativas, migratorias y de diferenciación, incrementando la secreción de moléculas antibacterianas como la enzima IDO que cataboliza el triptófano en quinurenina impidiendo así el crecimiento bacteriano en cultivos *in vitro* (Mezey y Nemeth, 2015 y Credille et al., 2015).

2.3. *Staphylococcus aureus* y mastitis bovina

Se han descrito más de 135 patógenos causantes de mastitis, sin embargo, alrededor del 85 % de infecciones intramamarias son causadas por un limitado grupo de patógenos que incluyen agentes contagiosos (*S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma*) y ambientales (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Escherichia coli*) (Bogni et al., 2011 y Bitew et al., 2010). En el resto de casos los patógenos incluyen algunas bacterias (*Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), hongos (*Cándida* y *Nocardia*) y algas (*Prototheca*) (Bogni et al., 2011). El *S. aureus* es uno de los principales agentes contagiosos causante de mastitis bovina en diversos países a nivel mundial (Pereyra et al., 2014; Thomas et al., 2015 y Adkins et al., 2016).

El *S. aureus* es un microorganismo coco grampositivo que crece como células únicas, en pares, tétradas, en cadenas cortas o formando racimos. Es un agente aerobio, no motil, caracterizado por un color dorado en las colonias producido por pigmentos carotenoides que también pueden estar involucrados en la muerte de los granulocitos polimorfonucleares a través de su actividad antioxidante (Tang y Stratton, 2010). La patogenicidad del *S. aureus* es un proceso complejo

y multifactorial que resulta de la acción de más de 50 factores de virulencia expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación bacteriana) que le permiten adherirse a superficies, dañar o evitar el sistema inmunológico y producir efectos tóxicos (Pereyra et al., 2014). Durante la fase de crecimiento exponencial que coincide con la fase de colonización, se sintetizan de forma activa las proteínas de la pared celular bacteriana con funciones adhesivas como la proteína A y proteínas de unión a colágeno, fibrinógeno y fibronectina (Artursson et al., 2016). En tanto, en la fase de crecimiento postexponencial comienza la síntesis de toxinas y enzimas extracelulares como enterotoxina A, toxina 1 causante del síndrome del shock tóxico (TSST), α citotoxina y hemolisinas (α , β , γ y δ), que inducen la formación de poros en las membranas celulares principalmente de eritrocitos facilitando la evasión del sistema inmune, multiplicación y diseminación bacteriana (Veh et al., 2015). La expresión génica coordinada de los diferentes factores de virulencia y la transición de la fase exponencial a la fase postexponencial está mediada por dos reguladores globales *sarA* y *arg* (Cheung et al., 2004). Generalmente casi todos los factores de virulencia del *S. aureus* se encuentran en elementos móviles como plásmidos e islas de patogenicidad que contribuyen a la transferencia genética horizontal entre las distintas poblaciones y cepas de *S. aureus* (Akkou et al., 2015).

Los *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) están habitualmente asociados a la presencia del gen *mecA* y a la producción de la leucocidina de Pantone-valentine (PVL), una citotoxina formadora de poros que provoca necrosis tisular, destrucción de leucocitos e inflamación severa que a menudo son utilizados como marcadores de MRSA (Tkalec et al., 2015). Pueden ser hallados frecuentemente en infecciones nosocomiales y en algunas ocasiones causando mastitis bovina (Gopal y Divya, 2017). Sin embargo, en el último tiempo se han reportado brotes de MRSA en bovinos como agentes causales de mastitis (Basanisi et al., 2017). Los MRSA fueron aislados por primera vez en 1972 en 5,2 % de bovinos de Bélgica y actualmente existen reportes de infección en 12,2 % de bovinos de Brasil (Guimarães et al., 2017). Considerando que los MRSA son resistentes a los antibacterianos β -lactámicos y que además éstos

antibacterianos son frecuentemente utilizados para tratar la mastitis bovina, actualmente ha aumentado la importancia de este patógeno para la salud pública y animal (Basanisi et al., 2017).

2.4. Potencial utilización de MSCs para el tratamiento de la mastitis bovina

La mastitis es la principal enfermedad que afecta a las vacas productoras de leche y provoca cuantiosas pérdidas económicas para los sistemas lecheros contabilizados en US\$ 200/vaca/año para el costo de tratamiento en Argentina (Bogni et al., 2011). Así mismo, las pérdidas en producción de leche en el sur de Chile alcanzan los 1.335 kg/lactancia/vaca en casos de mastitis sub clínica y 1.539 kg/lactancia/vaca en caso de mastitis clínica (Bravo, 2009). Considerando que el precio promedio nacional de leche a marzo del 2017 es de 210,13 pesos/litro (ODEPA, 2017) se contabiliza una pérdida aproximada de 423 dólares/lactancia/vaca en caso de mastitis sub clínica y de 487,15 dólares/lactancia/vaca en caso de mastitis clínica.

Varios estudios realizados sobre mastitis bovina sub clínica y clínica en Chile muestran distintos grados de prevalencia. En los primeros estudios realizados en la región central del país se reportó una prevalencia de mastitis sub clínica de 88,49 %, de los cuales el 13,83 % de casos fueron causados por el *S. aureus* (Azocar, 2001). En este estudio, la incidencia de la mastitis clínica fue de 49 %, de los cuales el 10 % de casos fue producido por el *S. aureus*. En estudios posteriores, se han reportado prevalencias más bajas de mastitis sub clínica en las regiones de Valparaíso y Los lagos con valores de 46,6 % y 50,6 % respectivamente (San Martín et al., 2012). En este caso, los patógenos más frecuentes fueron *E. coli* en la región de Valparaíso y el *S. aureus* en la región de Los lagos ambas con prevalencias de 40,8 % y 55,5 % respectivamente. Actualmente, se han realizado estudios en la comuna de Purranque en la región de Los lagos, con una prevalencia de mastitis sub clínica e incidencia de mastitis clínica de 38,9 % y 3,7 %, respectivamente (Bravo, 2009). En este caso uno de los patógenos frecuentes fue *S. aureus* con valores de 68,6 % y 39,6 % para los casos de mastitis sub clínica y clínica respectivamente. Adicionalmente, se han reportado prevalencias de mastitis sub clínica de 25 % y 75 % en las regiones del centro y sur del país respectivamente (Reyes-jara et al., 2016). En este

estudio se menciona que los patógenos más frecuentes fueron la *E. coli* con 33 % y *S. aureus* con 22 % del total de casos en la región central y sur respectivamente. Así mismo, recientemente en las provincias de Bío-Bío y Ñuble de la región del Bio-Bio se realizó un estudio donde se logró identificar como agente causal de mastitis al *S. aureus* en el 55,6 % del total de las muestras de leche (Pacha, 2015). Estos trabajos indican que existe una mayor prevalencia de mastitis sub clínica en las regiones del sur comparado con el centro del país. También podemos mencionar que las prevalencias totales han ido disminuyendo con el tiempo, probablemente como consecuencia de la implementación de buenas prácticas de ordeña, de tratamiento, de prevención y en general de manejo ganadero de las lecherías. Sin embargo, contrariamente a esta disminución de la prevalencia de mastitis, los casos asociados a *S. aureus* se mantienen en un porcentaje promedio del 50 % en el sur de Chile, lo cual demuestra que este agente causal de mastitis bovina es de gran importancia en el país.

La terapia de la mastitis se basa principalmente en la utilización de antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas. A pesar de que en Chile no existen estudios recientes sobre el número de vacas con mastitis que responden al tratamiento antibiótico, en años anteriores se ha reportado que un 35,89 % de las cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis muestran resistencia a los β -lactámicos (penicilina G y ampicilina) siendo gran parte de estas cepas positivas a β -lactamasa (Betancourt et al., 2003). Actualmente, estudios realizados en Europa indican que el 36 % de los animales con mastitis causada por *S. aureus* son resistentes al tratamiento con penicilina G (Thomas et al., 2015). Por su parte, en estudios de susceptibilidad se ha determinado que el 34 % de los aislamientos bacterianos de casos de mastitis bovina son resistentes a uno o más antibióticos (Reyes-jara et al., 2016). Esto puede ser atribuido a una penetración incompleta del antibiótico a través de la glándula y al potencial aislamiento y sobrevida de la bacteria en las células del hospedero, lo que permitiría la recurrencia de la enfermedad (Kerr y Wellnitz, 2003). El uso inadecuado de éstos antibacterianos genera un potencial riesgo para la salud pública del consumidor debido al aumento en los niveles de resistencia bacteriana (Bitrus et al., 2014) y a la presencia de residuos antibacterianos en la

leche (Ruegg, 2005). Por otra parte, el uso de antibacterianos no aborda la regeneración del tejido glandular mamario, cuya integridad es fundamental en términos de la producción de leche. Considerando que el desarrollo de terapias alternativas o complementarias para el tratamiento de la mastitis bovina es imperativo, los recientes avances científicos en el área de la medicina regenerativa representan una potencial herramienta que merece ser evaluada.

La investigación en mastitis bovina durante los últimos 20 años ha sido intensa; sin embargo, el impacto que ésta ha tenido a nivel terapéutico ha sido limitado. La medicina regenerativa es un área creciente que utiliza poblaciones de células madres indiferenciadas como las MSCs para tratar una variedad de estados patológicos tanto en humanos como en animales (Squillaro et al., 2016). Esta potencial terapia se basa no solo en su habilidad de contribuir con células sanas e indiferenciadas al tejido comprometido, sino también en la producción de factores promotores de crecimiento y el reclutamiento de células reparativas adicionales. En consecuencia, las MSCs podrían tener un fuerte impacto en la terapia de mastitis bovina. La capacidad de migración al sitio de lesión de las MSCs, podría beneficiar el tratamiento de mastitis fortaleciendo la respuesta inmune, ejerciendo acción antimicrobiana y posteriormente fomentando la regeneración del tejido glandular dañado.

El objetivo general en el presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano contra *S. aureus* del medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino. Además, se pretende evaluar los niveles de expresión de péptidos bBD4A, NK1, CATHL2, hepcidina bovina y la enzimaIDO en MSCs activadas mediante co-cultivo con *S. aureus*.

3. Hipótesis

Las MSCs secretan al medio de cultivo factores bioactivos que poseen propiedades antibacterianas y que por lo tanto inhiben la proliferación de *S. aureus* bajo condiciones *in vitro*. La producción de estos factores es dependiente del tejido de origen por lo que el efecto antibacteriano es distinto entre MSCs derivadas de tejido adiposo y médula ósea

4. Objetivo general

Determinar el potencial efecto antibacteriano *in vitro* contra el *S. aureus* del medio condicionado de MSCs derivadas de la médula ósea y tejido adiposo fetal bovino.

5. Objetivos Específicos

- 1) Comparar el efecto antibacteriano contra el *S. aureus*, del medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino.
- 2) Comparar el efecto antibacteriano contra el *S. aureus*, del medio condicionado de MSCs activadas mediante pre-exposición a este agente patógeno.
- 3) Evaluar los niveles de mRNA de bBD4A, NK1, CATHL2,IDO y hepcidina bovina en MSCs activadas mediante pre-exposición a *S. aureus*.
- 4) Cuantificar los niveles de bBD4A en medio condicionado de MSCs activadas mediante pre-exposición a *S. aureus*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Aislamiento de MSCs desde la médula ósea y tejido adiposo fetal bovino

Los aspirados de médula ósea y tejido adiposo fueron obtenidos desde fetos bovinos (8 a 9 meses de gestación, n=9), provenientes de una planta faenadora local.

Un fémur de cada feto fue disecado y seccionado en la diáfisis utilizando una sierra. La médula ósea fue aspirada desde el espacio medular femoral mediante una bránula de 18 G conectada a una jeringa conteniendo 2 mL de medio de colección, el cual consistió en DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa (Mediatech Incorporated, Manassas, EEUU), suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. El volumen del aspirado de aproximadamente 4 mL fue centrifugado dos veces en solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Mediatech Incorporated) suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y dos veces en medio de colección sin heparina a 400 x g por 5 min. El sedimento fue resuspendido en medio de expansión, en cual consistió en DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa (Mediatech, Incorporated), suplementando con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Life Technologies, México), 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, luego traspasado a frascos de cultivo celular de 75 cm².

El tejido adiposo fue aislado desde el omento fetal mediante extracción quirúrgica utilizando bisturí y pinzas estériles, obteniéndose muestras de tejido entre 0,2 y 0,5 cm² de longitud. Luego el tejido adiposo fue lavado cuatro veces con solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Mediatech Incorporated). El tejido se fragmentó utilizando bisturí y luego se incubó en medio de digestión, el cual consistió en solución salina buffer de Hank, HBSS con 0,5 % de colagenasa suplementado con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, en agitación constante a 38 °C por 45 min. Posteriormente se agregó medio de expansión en una cantidad equivalente al medio de digestión para inactivar a la colagenasa. Luego el tejido fue filtrado utilizando poros de 40 µm y centrifugado dos veces a 400 x g por 5 min utilizando medio de lavado, el

cual consistió en DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa (Mediatech, Incorporated), suplementando con 100 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. El sedimento fue resuspendido en medio de expansión, luego traspasado a frascos de cultivo celular de 75 cm².

Los cultivos de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fueron incubados a 38 °C bajo una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Luego de 72 h, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante lavado con solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Mediatech, Incorporated) y cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90 % de confluencia, se realizaron pasajes de MSCs mediante remoción con tripsina/EDTA (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) suplementado con 250 µg/mL de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

Los fibroblastos fueron aislados desde piel fetal mediante extracción quirúrgica del tejido desde la zona de la nariz. El tejido fue posteriormente lavado cuatro veces con solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Mediatech, Incorporated). El tejido se fragmentó utilizando bisturí y luego se incubó en medio de digestión, en agitación constante a 38°C por 90 min. Posteriormente se agregó medio de expansión en una cantidad equivalente al medio de digestión para inactivar a la colagenasa. El tejido digerido fue posteriormente filtrado con poros de 40 µm y centrifugado dos veces con medio de lavado a 400 x g por 5 min. El sedimento fue resuspendido en medio de expansión y traspasado a frascos de cultivo celular de 75 cm².

Los cultivos de fibroblastos fueron incubados a 38°C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de 72 h, las células no adherentes al plástico fueron removidas mediante lavado con solución tampón fosfato pH 7,4 (PBS; Mediatech, Incorporated) y cambio de medio de cultivo. Al alcanzar un 80 a 90% de confluencia, se realizaron pasajes de fibroblastos mediante remoción con tripsina/EDTA (Biological Industries).

6.2. Obtención de medio condicionado

Los medios condicionados fueron obtenidos desde cultivos de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino y desde cultivos de fibroblastos como control. Se sembraron células en una concentración de 6×10^3 células/cm² hasta alcanzar 70 a 80% de confluencia. Posteriormente, las MSCs y los fibroblastos fueron cultivados en medio DMEM con 4500 mg/L D-Glucosa (Mediatech, Incorporated) sin suero, antibiótico y antifúngico por 72 h a 38°C bajo una atmosfera húmeda con 5% de CO₂. A continuación, se recolectaron los medios condicionados para luego ser centrifugados a 400 x g por 5 min y posteriormente filtrados a través de poros de 0,22 µm y congelados a -20°C hasta su utilización. Para los experimentos con medio condicionado concentrado, el medio fue concentrado 10 veces su volumen inicial, mediante ultrafiltración utilizando filtros Amicon Ultra (Merck Millipore, Corporation, Cork, Irlanda) con una membrana NMWL de 3 kDa de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los medios concentrados luego fueron congelados a -20°C hasta su utilización.

6.3. Ensayo de supervivencia y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del *Staphylococcus aureus*

Para la evaluación del efecto antibacteriano del medio condicionado de MSCs, se utilizaron la cepa local SAU 1S y la cepa comercial ATCC 25923 de *S. aureus* (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EEUU) (Tabla 1). La cepa SAU 1S es una cepa aislada según las recomendaciones del Nacional Mastitis Council (NMC) desde un caso clínico de mastitis bovina de la zona sur de Chile. Ambas cepas fueron conservadas en el cepario del Laboratorio de Vacunas Veterinarias (VACCIVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Tabla 1. Caracterización de cepas de *S. aureus* SAU 1S y ATCC 25923 utilizadas para determinación del potencial antibacteriano de las MSCs fetales bovinas.

Cepa	SAU 1S	ATCC 25923 ¹
Propiedades bioquímicas	Catalasa y coagulasa positivo	Catalasa y coagulasa positivo
Fuente de obtención	Aislada según las recomendaciones del National Mastitis Council (NMC) desde una mastitis bovina de la zona sur de Chile	American Type Culture Collection
Sensibilidad hacia antibacterianos	Ampicilina, cefadroxilo, cefalotina, ceftiofur, eritromicina, gentamicina, meticilina, oxaciclina, penicilina, tetraciclina	Ampicilina, cefalexina, cefaloridina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, meticilina, novomicina, oxaciclina, penicilina, tetraciclina, vancomicina.
Factores de virulencia	Factor de adhesión A y B, proteína de unión a elastina, proteína de unión a sialoproteína ósea, proteína A, hemolisina y operon ica A y D, moderada capacidad de formar biofilm	Factor de aglutinación, hemolisina, enterotoxina A, enterotoxina G, enterotoxina I, leucocidina Pantone valentine, termonucleasa, toxina δ y DNAsa

¹ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EEUU

Cada cepa de *S. aureus* fue resuspendida en 2 mL de caldo Luria-Bertani, LB; el cual consistió en 10 g/L de Bacto-Triptona; 5 g/L de Extracto de Bacto-Levadura, 5 g/L de Cloruro de Sodio y agua destilada c.s.p. estéril ajustado a pH 7 (NaHPO₄/NaH₂PO₄ 25mM) e incubada a 38°C en agitación durante 24 h. Posteriormente la cepa fue sembrada en placa Petri con agar LB (caldo LB más 15 g/L de agar) e incubada a 38°C durante 24 h y luego almacenada en refrigeración a 4°C hasta su utilización (Retamal et al., 2010). Para la realización del ensayo, desde la placa Petri se resuspendió la colonia en caldo LB estéril, que luego fue incubado a 38°C en agitación durante 24 h. Posteriormente la colonia resuspendida fue lavada 3 veces con solución tampón fosfato pH 7,4 y posteriormente adicionada al medio condicionado de MSCs y fibroblastos a una dilución de 1:100. Las diluciones bacterianas fueron sembradas en placa Petri con agar LB e incubadas a 38°C durante 24 h.

La supervivencia bacteriana fue evaluada por recuento en placa de unidades formadoras de colonia UFC/mL a las 0, 1, 2 y 3 h post-inoculación. La supervivencia bacteriana fue expresada como el porcentaje respecto al número de UFC/mL en el momento de la inoculación (0 h) que es considerado como el 100 %. Para calcular el total de UFC/mL y el porcentaje de supervivencia se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{UFC/mL} = \left(\left(\frac{(R1+R2+R3)}{3} \right) \times (\text{Factor de dilución}) \right) \times 200$$

$$\% \text{ de supervivencia} = \frac{(T \text{ "n"} \times 100)}{T \text{ "0"}}$$

Donde:

R₁, R₂ y R₃: Repeticiones por dilución

Factor de dilución: Conteo realizado a dilución de 1:10000

T "n": Número de UFC/mL a las "n" horas post inicio del desafío.

T "0": Número de UFC/mL a la hora cero o inicio del desafío.

6.4. Activación de MSCs mediante pre-exposición a antígenos derivados de *Staphylococcus aureus*

Las MSCs fueron activadas mediante pre-exposición a antígenos de *S. aureus* con el objetivo de inducir o incrementar la producción de factores antimicrobianos. Las MSCs fueron cultivadas hasta alcanzar 80 a 90% de confluencia y posteriormente fueron lavadas con solución tampón fosfato pH 7,4 y cultivadas en medio DMEM sin suero, antibiótico y antifúngico. A cada cultivo de MSCs se le inocularon 300 UFC de *S. aureus* por 6 h a 38°C bajo una atmósfera humedecida con 5% de CO₂. A continuación, los medios condicionados activados fueron recolectados, centrifugados a 400 x g por 5 min y filtrados a través de poros de 0,22 µm para eliminar contaminación bacteriana residual y posteriormente fueron congelados a -20°C hasta su utilización. Para los ensayos con medio condicionado activado concentrado, el medio condicionado activado fue concentrado 10 veces su volumen inicial, mediante ultrafiltración utilizando filtros Amicon Ultra. Los medios condicionados activados concentrados luego fueron congelados a -20°C hasta su utilización. El ensayo de supervivencia y recuento de UFC/mL de *S. aureus* utilizando el medio condicionado activado de MSCs fue realizado como fue descrito anteriormente.

6.5. Cuantificación de niveles de mRNA de péptidos antimicrobianos en MSCs fetales bovinas mediante PCR cuantitativo (Q-PCR)

Se cuantificaron los niveles de mRNA de los péptidos antimicrobianos bBD4A, NK1, CATHL2, hepcidina y de la enzimaIDO en MSCs de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos no activadas, así como en activadas mediante pre-exposición a *S. aureus* (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de partidores utilizados para el análisis por Q-PCR

Gen	Secuencia de Primers 5' – 3'	Nº de acceso
Genes endógenos		
GAPDH	CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA	NM_001034034.2
	TGGAAGATGGTGATGGCCTTTCCATTG	
β ACTIN	CGCACCCTGGTATTGTCAT	NM_173979.3
	TCCAAGGCGACGTAGCAGAG	
Genes de péptidos antimicrobianos		
bBD4A	GCCAGCATGAGGCTCCATC	NM_174775.1
	GGCACAAGAACGGAATACAGA	
NK1	CCAGCAAGAATGTCATCATCC	NM_001046578.1
	GTCCTTAGAGATGCGATTGAGATAC	
CATHL2	GGATTGGTGGACGAAATCTG	NM_174826.3
	GAATGGGCTGGTGAAACAGT	
Hepcidina	GACAGACGGCACAATGGCAC	NM_001114508.2
	TGGAGGGCAGCAGGAATAAATA	
IDO	CGAATATACTTGTCTGGTTGG	NM_001101866.2
	GGAGAACATCAAAGCACTG	

El RNA total fue extraído de las células, utilizando un kit RNAeasy (Qiagen., CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado utilizando un kit Qubit RNA HS (Life Technologies., NY, EEUU). Para la remoción de DNA genómico se utilizó un kit DNase I (Thermo Scientific., MA, EEUU). Para la reacción de transcripción reversa (RT) se utilizó un kit Brilliant II SYBR Green RT-PCR (Agilent Technologies., CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de amplificación del cDNA se utilizó un kit Brilliant SYBR Green Q-PCR Master mix (Stratagene., CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada tubo de reacción contenía 5 μ L de Master mix, 1 μ L de partidore forward, 1 μ L de partidore reverse, 1 μ L de muestra de cDNA y 2 μ L H₂O libre de nucleasas para un volumen total de 10 μ L. El análisis de los ciclos y la temperatura consistió en 1 ciclo de aumento de la temperatura hasta 95 °C a una velocidad de 20 °C/s por 10 min para la activación de la polimerasa, luego 40 ciclos de: 95 °C por 30 s para la denaturación del cDNA y luego bajando

la temperatura a 60 °C a una velocidad de 20 °C/s por 1 min para la amplificación registrando la fluorescencia cada 0,1 °C. Para asegurar que los amplicones fueron generados a partir de mRNA y no de la amplificación de ADN genómico, se incluyeron controles sin transcriptasa reversa (NRT). Los datos de Q-PCR obtenidos se analizaron mediante el método quantity comparando el Ct, respecto del Ct de los genes endógenos GAPDH y β -ACTINA (Schmittgen y Livak, 2008).

6.6. Cuantificación del péptido antimicrobiano bBD4A en medio condicionado mediante ELISA

El péptido antimicrobiano de mayor expresión génica por Q-PCR (bBD4A) en las MSC de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos no activadas, así como en activadas, fue cuantificado en el medio condicionado, utilizando un kit de ELISA (Cloud-Clone Corp., Wuhan, China) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ELISA posee anticuerpos específicos contra bBD4A, fue realizado por triplicado para cada tipo de medio condicionado. La densidad óptica de cada muestra de medio condicionado se ha medido con un lector de microplacas múltiple Synergy HT (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EEUU) a una longitud de onda de 450 nm. El kit de ELISA utilizado posee alta sensibilidad y especificidad para bBD4A; la cantidad mínima detectable de bBD4A es de 5,7pg/mL y no produce reacciones cruzadas.

6.7. Análisis de datos

Los resultados obtenidos por el efecto de las variables independientes (tipo celular, tratamientos de activación y concentración) sobre las variables dependientes (porcentaje de supervivencia de *S. aureus*, expresión génica relativa y concentración de bBD4A) se analizaron en un diseño completamente aleatorizado (DCA), con cuatro tratamientos y nueve réplicas por tratamiento. En el procesamiento y análisis de datos se utilizó estadística descriptiva (promedios y desviación estándar) para las variables en estudio. Se utilizó análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0,05$) para determinar la diferencia entre medias. Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat versión 2014.

7. Resultados

7.1. Supervivencia y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) del *Staphylococcus aureus*

En un primer ensayo se evaluó el potencial antibacteriano de medios condicionados de MSCs de médula ósea y tejido adiposo, así como de fibroblastos en un sistema de cultivo *in vitro* utilizando la cepa comercial de *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 1). En este ensayo no se encontraron diferencias ($P>0,05$) entre los niveles de supervivencia de *S. aureus* (% UFC/mL en relación al tiempo 0 h) expuesta a medios condicionados derivados de MSCs, fibroblastos y medio DMEM como control. Así mismo, los porcentajes de supervivencia no fueron distintos ($P>0,05$) entre las horas de incubación.

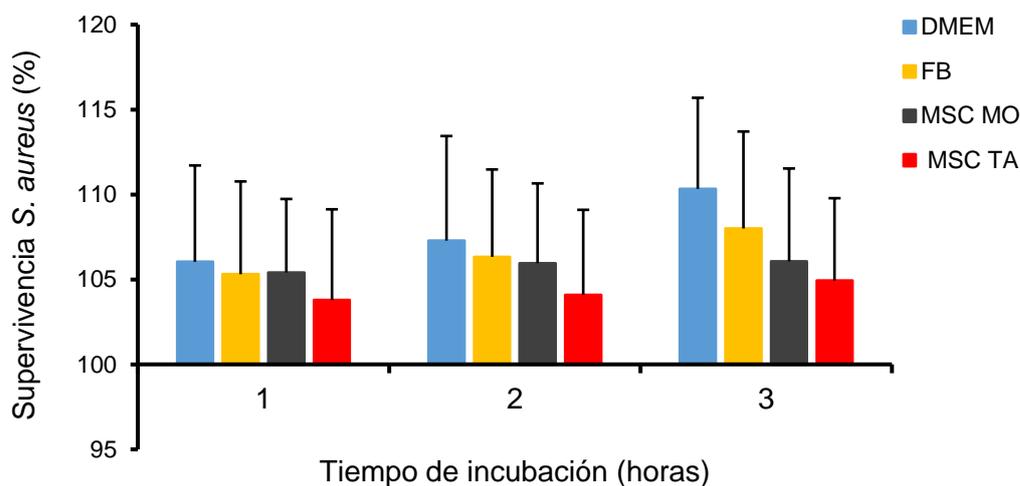


Figura 1. Supervivencia de la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* en medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos como control. No se detectaron diferencias ($P>0,05$) en los porcentajes de supervivencia de *S. aureus* entre líneas celulares ni tiempos de incubación. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo.

Considerando la importancia de determinar el efecto antibacteriano de MSCs contra una cepa de *S. aureus* obtenida de un caso de mastitis local, posteriormente se evaluó el potencial antibacteriano de medios condicionados

de MSCs de médula ósea y de tejido adiposo, así como de fibroblastos en un sistema de cultivo *in vitro* utilizando la cepa local SAU 1S de *S. aureus* (Figura 2). En este ensayo se detectó una disminución ($P < 0,05$) de la supervivencia de *S. aureus* a las 1, 2 y 3 horas de cultivo post-incubación bacteriana en los medios condicionados de MSCs de médula ósea (96,14; 95,44 y 94,92 %, respectivamente), tejido adiposo (94,38; 94,22 y 96,10 %, respectivamente) y de fibroblastos (96,35; 95,84 y 95,06 % respectivamente) en comparación al control DMEM (124,89; 124,96 y 126,20 % respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) en los niveles de supervivencia de *S. aureus* entre los medios condicionados de MSCs y fibroblastos. Así mismo, los porcentajes de supervivencia no fueron distintos ($P > 0,05$) entre las horas de incubación.

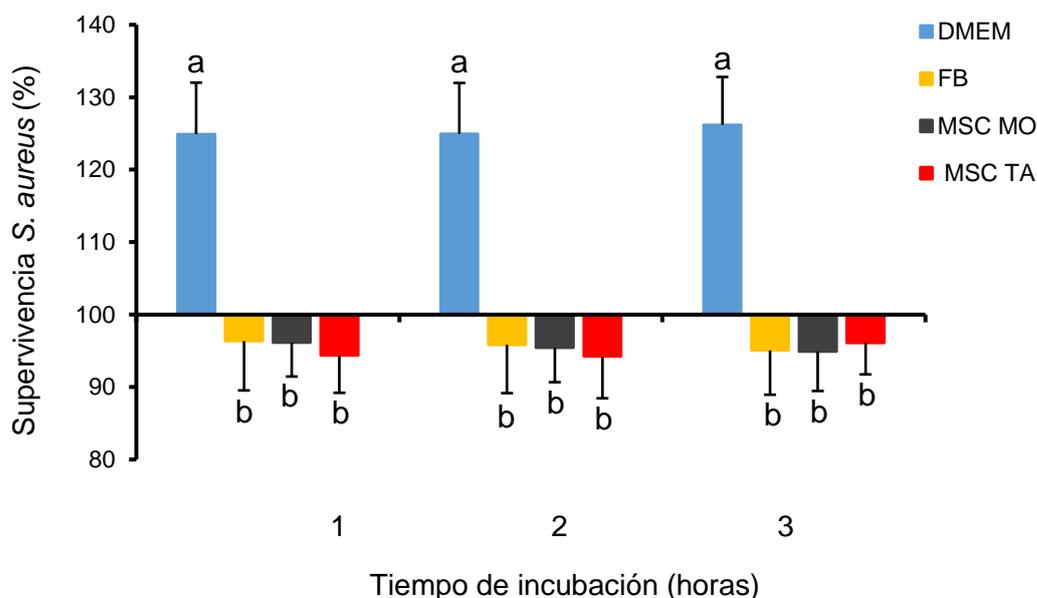


Figura 2. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* en medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos como control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los porcentajes de supervivencia de *S. aureus* expuesta a medios condicionados de MSCs y fibroblastos en comparación al control DMEM. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre líneas celulares ni tiempos de incubación. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo.

Posteriormente, se evaluó el potencial antibacteriano de medios condicionados de MSCs de médula ósea y tejido adiposo, así como de fibroblastos que fueron concentrados (10 veces) en un sistema de cultivo *in vitro* utilizando la cepa local SAU 1S de *S. aureus* (Figura 3). En este ensayo se detectó una disminución ($P < 0,05$) en la supervivencia de *S. aureus* a las 1, 2 y 3 horas de cultivo post-incubación bacteriana en los medios condicionados concentrados de MSCs de médula ósea (84,86; 82,30 y 80,96 %, respectivamente) y tejido adiposo (88,23; 79,79 y 78,78 %, respectivamente) en comparación a los medios control DMEM (101,68; 105,36 y 113,96 %, respectivamente) y medio condicionado concentrado de fibroblastos (106,13; 108,55 y 111,53 %, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) en los niveles de supervivencia de *S. aureus* entre los medios condicionados concentrados de MSCs. Así mismo, los porcentajes de supervivencia no fueron distintos ($P > 0,05$) entre las horas de incubación.

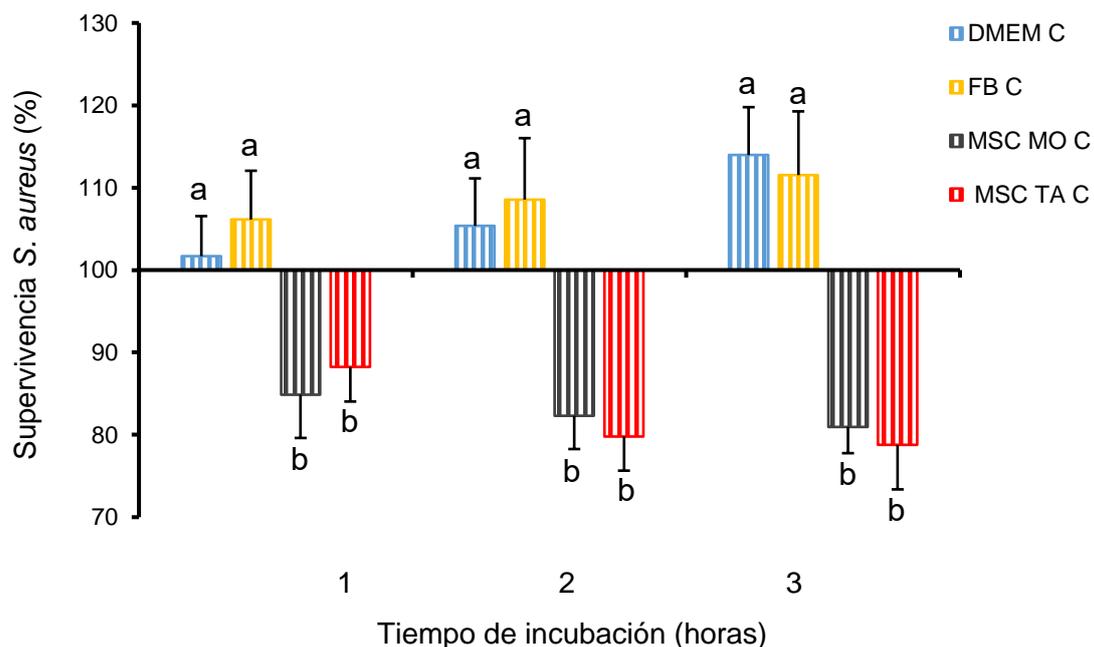


Figura 3. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* en medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos como control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los porcentajes de supervivencia de *S. aureus* expuesta a medios condicionados concentrados de MSCs en comparación a los medios controles concentrados de fibroblastos y DMEM. Sin embargo, no se encontraron

diferencias entre líneas celulares ni tiempos de incubación. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; C, concentrado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Posteriormente se evaluó el potencial antibacteriano del medio condicionado activado que fue obtenido desde cultivos de MSCs de médula ósea y de tejido adiposo, así como de fibroblastos que fueron expuestos previamente a 300 UFC de la cepa local SAU-1S de *S. aureus* por un periodo de 6 h (Figura 4). En este ensayo se detectó una disminución ($P < 0,05$) en la supervivencia de *S. aureus* a las 1, 2 y 3 horas de cultivo post-inoculación bacteriana en los medios condicionados activados de médula ósea (81,95; 72,86 y 79,85 %, respectivamente) y de tejido adiposo (83,92; 77,48 y 71,62 %, respectivamente) en comparación al medio control DMEM (124,89; 124,96 y 126,20 %, respectivamente). Así mismo, estos valores de supervivencia de *S. aureus* fueron menores ($P < 0,05$) en comparación a los medios condicionados no activados de MSCs de médula ósea (96,14; 95,44 y 94,92 %, respectivamente), de MSCs de tejido adiposo (94,38; 94,22 y 96,10 %, respectivamente), de fibroblastos activados (94,14; 93,62 y 92,64 %, respectivamente) y de fibroblastos no activados (96,35; 95,84 y 95,06 %, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) en los niveles de supervivencia de *S. aureus* entre los medios condicionados activados de MSCs. Así mismo, los porcentajes de supervivencia no fueron distintos entre las horas de incubación.

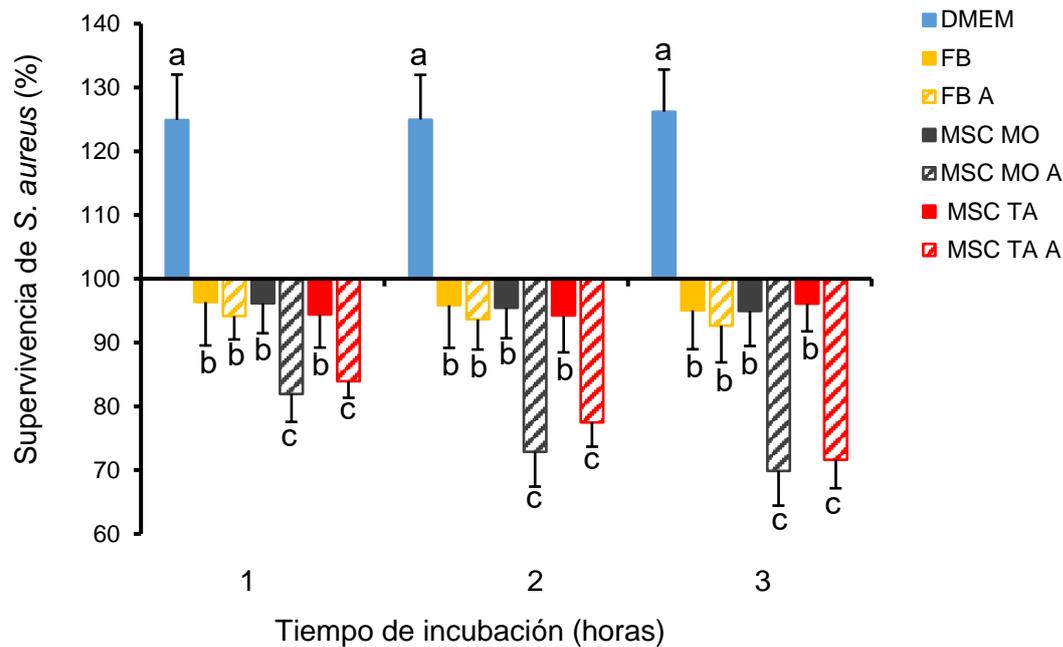


Figura 4. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* en medio condicionado activado de MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo y de fibroblastos fetales bovinos como control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los porcentajes de supervivencia de *S. aureus* expuesta a medio condicionado activado de MSCs en comparación a los controles no activados, fibroblastos y DMEM. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre líneas celulares ni tiempos de incubación. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea; MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo y A, activado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Adicionalmente, Se evaluó el potencial antibacteriano del medio condicionado activado y concentrado que fue obtenido desde cultivos de MSCs de médula ósea y de tejido adiposo, así como de fibroblastos que fueron expuestos previamente a 300 UFC de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* por un periodo de 6 h y que fue posteriormente concentrado (10 veces) (Figura 5). En este ensayo se detectó una disminución ($P < 0,05$) en la supervivencia de *S. aureus* a las 1, 2 y 3 horas de cultivo post inoculación bacteriana en los medios condicionados activados y concentrados de MSCs de médula ósea (82,01; 79,28 y 70,86 %, respectivamente) y de tejido adiposo (86,21; 79,31 y 69,27 %, respectivamente) en comparación al medio control DMEM (103,06; 105,97 y 107,71 %, respectivamente).

respectivamente). Así mismo, estos valores de supervivencia de *S. aureus* fueron menores ($P < 0,05$) en comparación a los medios condicionados no activados concentrados de MSCs de médula ósea (95,70; 93,11 y 93,23 %, respectivamente), de tejido adiposo (94,07; 91,03 y 89,86 %, respectivamente), de fibroblastos activados (95,72; 95,05 y 97,31 %, respectivamente) y de fibroblastos no activados (102,41; 102,40 y 105,70 %, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) en los niveles de supervivencia de *S. aureus* entre los medios condicionados activados y concentrados de MSCs. Así mismo, los porcentajes de supervivencia no fueron distintos entre las horas de incubación.

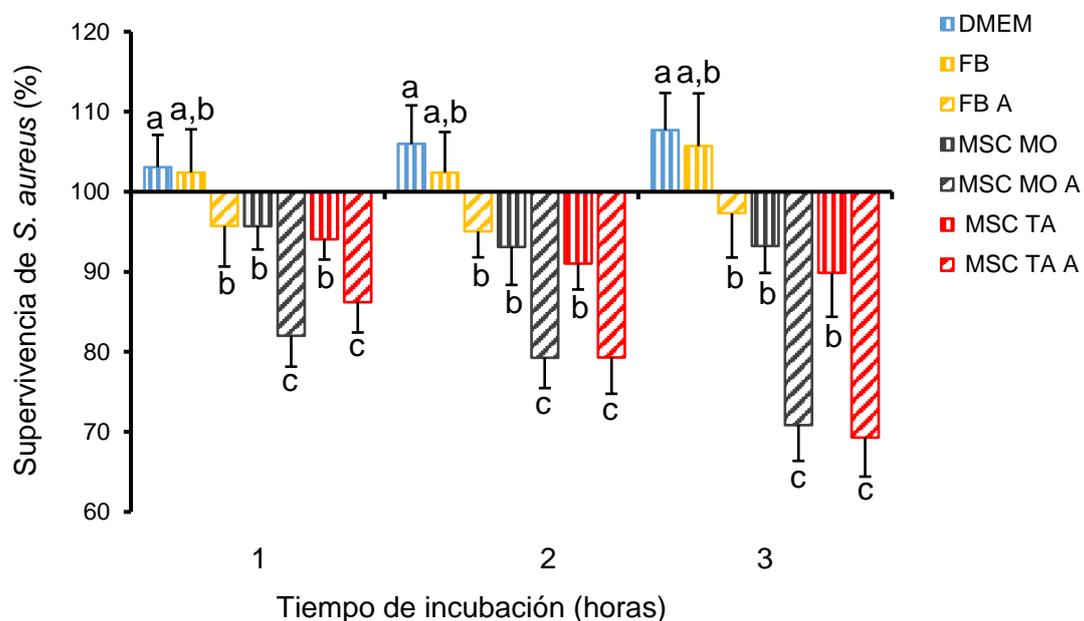


Figura 5. Supervivencia de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* en medio condicionado activado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos como control. Se detectó una disminución ($P < 0,05$) en los porcentajes de supervivencia de *S. aureus* expuesta a medio condicionado activado y concentrado de MSCs en comparación a los controles no activados, fibroblastos y DMEM. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre líneas celulares ni tiempos de incubación. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea; MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; A, activado y C, concentrado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

7.2. Niveles de mRNA de péptidos antimicrobianos en MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo fetal bovino.

Los niveles de mRNA de los péptidos bBD4A, NK1, CATHL2, Hepsidina y de la enzima IDO fueron analizados en MSCs y fibroblastos no activados y activados (Tabla 3). La expresión de CATHL2, Hepsidina e IDO no fue detectada en las MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y en fibroblastos de fetos bovino tanto en activadas como en no activadas (Tabla 3).

Tabla 3. Detección de mRNA para los péptidos antimicrobianos en MSCs y fibroblastos no activados y activados mediante pre-exposición a *S. aureus*

mRNA	Condición
β -defensina bovina 4A (bBD4A)	Detectado
NK-Lisina bovina 1 (NK1)	Detectado
Catelicidina bovina 2 (CATHL2)	No detectado
Hepsidina	No detectado
Indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO)	No detectado

El análisis de Q-PCR detectó niveles de expresión de mRNA para bBD4A en MSCs y en fibroblastos fetales no activados y activados (Figura 6). La estimulación bacteriana indujo un aumento ($P < 0,05$) de 1,17 veces en el nivel de expresión de bBD4A en MSCs derivadas de médula ósea. Así mismo, la estimulación bacteriana indujo un aumento ($P < 0,01$) de 3,5 veces en el nivel de expresión de bBD4A en MSCs derivadas de tejido adiposo. En fibroblastos, la estimulación bacteriana no indujo aumento ($P > 0,05$) en el nivel de expresión de bBD4A.

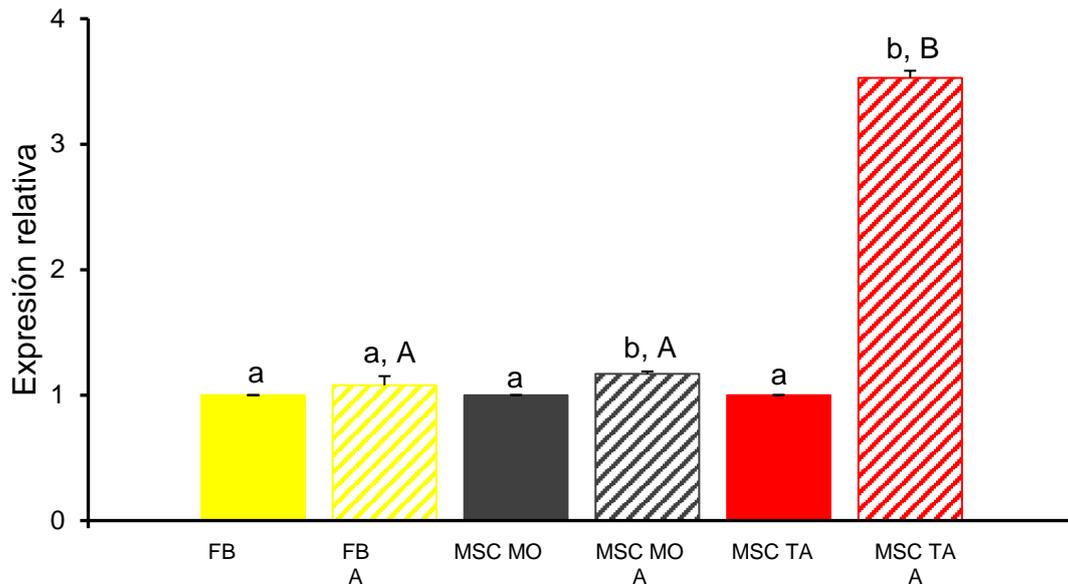


Figura 6. Niveles de mRNA para bBD4A en MSCs de médula ósea, tejido adiposo y fibroblastos fetales bovinos. La activación mediante pre-exposición a *S. aureus* indujo un aumento en el nivel de mRNA de bBD4A de 1,17 y 3,5 veces en MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo, respectivamente. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; A, activado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b) o entre líneas celulares (A,B).

De forma similar, la estimulación bacteriana indujo un aumento significativo en el nivel de mRNA para NK1 en fibroblastos ($P < 0,05$) de 1,66 veces comparado con los fibroblastos no activados. Así mismo, se determinó un aumento en el nivel de expresión de mRNA para NK1 en MSCs derivadas de tejido adiposo activadas ($P < 0,05$) de 1,37 veces comparado con las MSCs derivadas de tejido adiposo no activadas. Sin embargo, en las MSCs de médula ósea no se detectó aumento en el nivel de mRNA para NK1 (Figura 7).

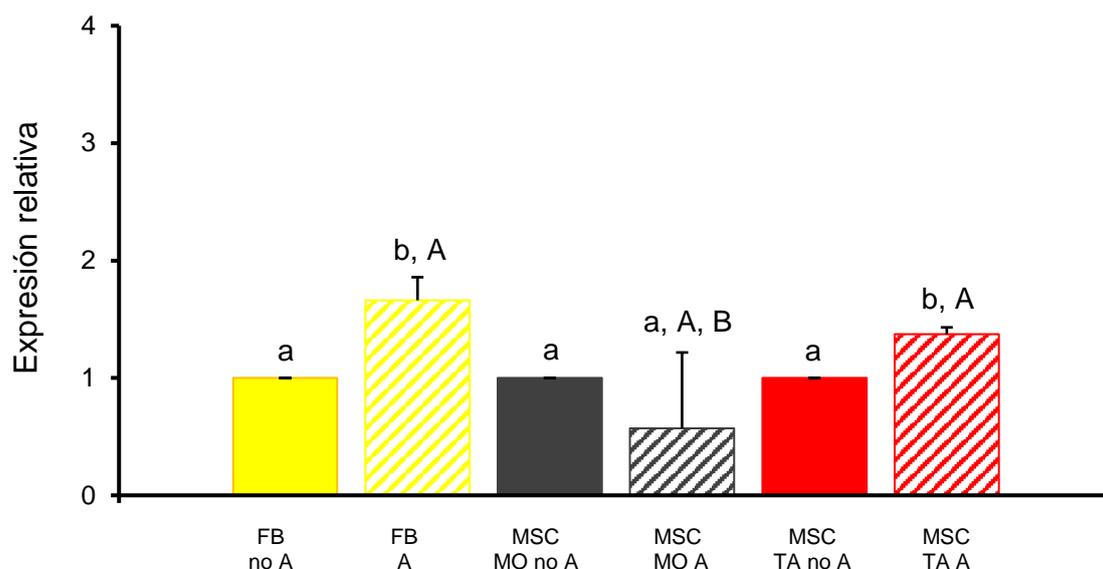


Figura 7. Niveles de mRNA de NK1 en MSCs de médula ósea, tejido adiposo y fibroblasto fetal bovino. La activación mediante pre-exposición a *S. aureus* indujo un aumento en el nivel de expresión de mRNA para NK1 ($P < 0,05$) de 1,66 y 1,37 veces en fibroblastos y MSCs de tejido adiposo, respectivamente. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea y MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; A, activado. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b) o entre líneas celulares (A,B).

7.3. Niveles de β -defensina bovina 4A (bBD4A) en medio condicionado de MSCs activadas mediante pre-exposición a *Staphylococcus aureus*.

Los niveles del péptido bBD4A fueron analizados en los medios condicionados de MSCs y de fibroblastos. La concentración del medio condicionado indujo un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A en fibroblastos y en MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo.

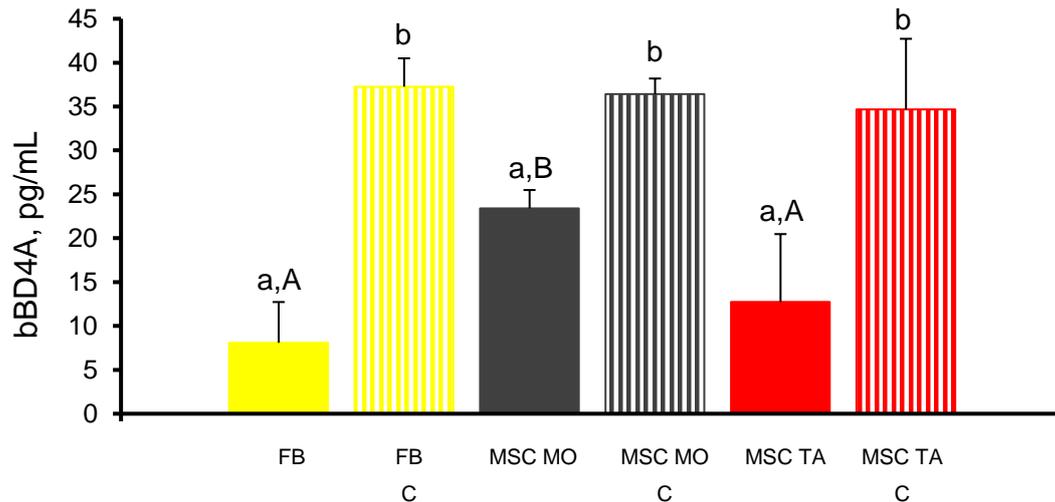


Figura 8. Niveles de bBD4A en medios condicionados de fibroblastos y MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino. La concentración del medio indujo un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A de 8,08 hasta 37,26 pg/mL; de 23,40 hasta 36,41 pg/mL y de 12,72 hasta 34,67 pg/mL en medios condicionados de fibroblastos, de MSCs derivadas de médula ósea y de MSCs derivadas de tejido adiposo, respectivamente. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea; MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; C, concentrado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b) o entre líneas celulares (A,B).

Así mismo, se evaluó los niveles de bBD4A en los medios condicionados de fibroblastos y MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo que fueron previamente expuestas a 300 UFC de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* (Figura 9). En este ensayo se detectó un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A de un 15,95 hasta 29,37 pg/mL en el medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea por efecto de la activación bacteriana. Sin embargo, no hubo diferencias ($P > 0,05$) en la cantidad de bBD4A en los medios condicionados activados de MSCs derivadas de tejido adiposo y de fibroblastos con respecto a los medios condicionados no activados.

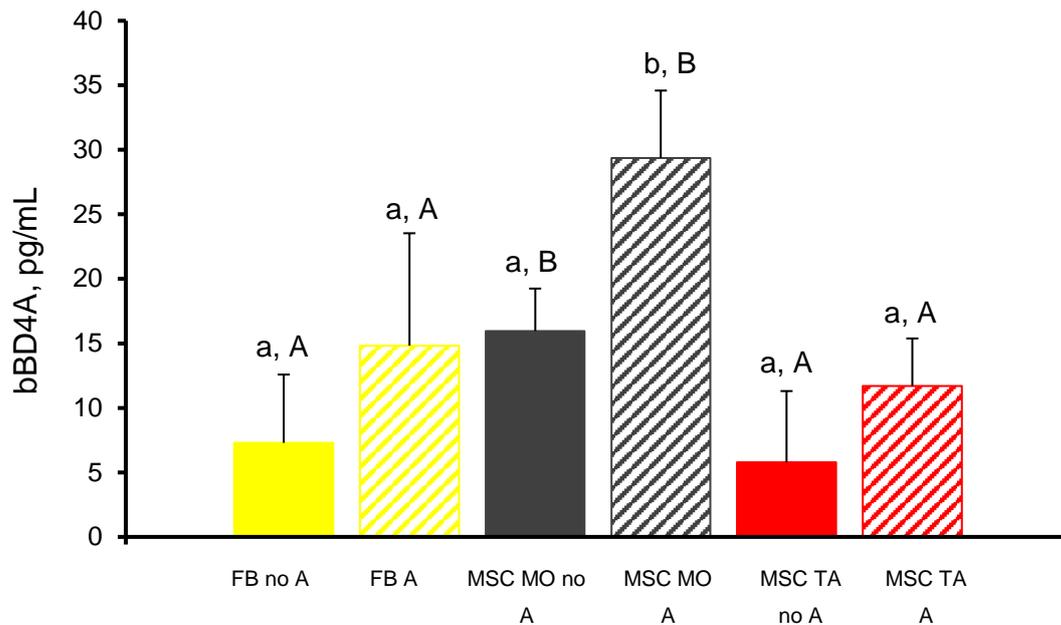


Figura 9. Niveles de bBD4A en medios condicionados activados de MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino y fibroblastos. La estimulación bacteriana indujo un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A desde un 15,95 hasta 29,37 pg/mL en el medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea; MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; A, activado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b) o entre líneas celulares (A,B).

Adicionalmente, se evaluó los niveles de bBD4A en los medios condicionados concentrados de MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo y fibroblastos que fueron expuestos previamente a 300 UFC de la cepa local SAU 1S de *S. aureus* (Figura 10). En este ensayo se detectó un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A de un 28,06 hasta 39,58 pg/mL en el medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea. Sin embargo, no hubo diferencias ($P > 0,05$) en la cantidad de bBD4A en los medios condicionados concentrados y activados de MSCs derivadas de tejido adiposo y de fibroblastos con respecto a los medios condicionados concentrados no activados.

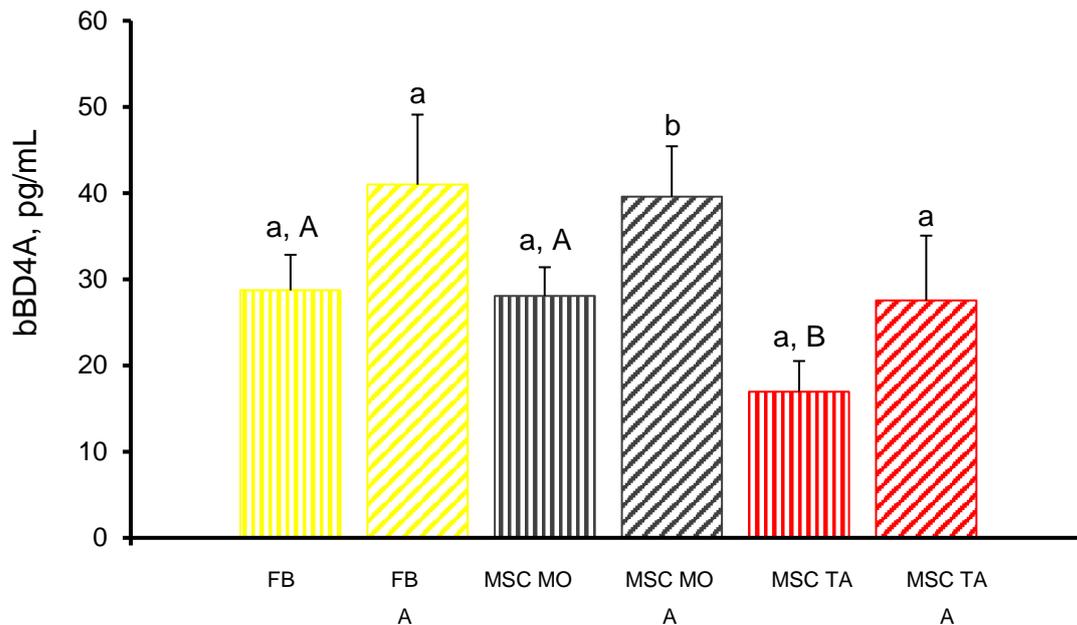


Figura 10. Niveles de bBD4A en medios condicionados concentrados activados de fibroblastos y MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino. La estimulación bacteriana indujo un aumento ($P < 0,05$) en la cantidad de bBD4A desde un 28,06 hasta 37,58 pg/mL en el medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea. Abreviaciones: FB, Fibroblastos; MSC MO, células madre mesenquimáticas derivadas de médula ósea; MSC TA, células madre mesenquimáticas derivadas de tejido adiposo; C, concentrado; A, activado. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (a,b) o entre líneas celulares (A,B).

8. Discusión

En un ensayo preliminar realizado en el presente estudio, se utilizaron medios condicionados de MSCs y de fibroblastos fetales como control, para evaluar su efecto antibacteriano contra la cepa ATCC 25923 de *S. aureus*. En estos experimentos no se detectaron diferencias de supervivencia de esta cepa expuesta a los medios condicionados pertinentes y DMEM y tampoco en relación al tiempo de incubación.

Considerando en el largo plazo el potencial desarrollo de una terapia para casos de mastitis a nivel nacional, es que para los siguientes ensayos se utilizó la cepa local SAU 1S de *S. aureus* obtenida de un caso de mastitis del sur de Chile. La exposición de esta cepa a los medios condicionados de MSCs y fibroblastos fetales resultó en una disminución de su supervivencia en comparación al medio control DMEM. Sin embargo, no se detectaron diferencias de supervivencia de la cepa SAU 1S entre los medios condicionados de MSCs y tampoco en relación al medio control de fibroblastos. Las dos cepas de *S. aureus* (ATCC 25923 y SAU 1S) demuestran un comportamiento similar en respuesta a los medios condicionados de MSCs y fibroblastos ya que no hubo diferencias significativas entre líneas celulares y tampoco en relación a los tiempos de incubación dentro de cada cepa. La mayor susceptibilidad relativa de la cepa local SAU 1S se podría deber a sus propiedades intrínsecas relacionadas a la permeabilidad de su superficie celular a los medios condicionados de MSCs y fibroblastos (Khan et al., 2009). Algunas bacterias gram positivas y negativas también podrían resultar ser más resistentes en relación a otras por la reducción de su potencial de membrana (Lofton et al., 2013). Esta reducción en el potencial de membrana disminuiría la unión de los péptidos antimicrobianos a la superficie bacteriana.

La dilución de los péptidos antimicrobianos en el medio condicionado puede ser un factor determinante en su actividad contra *S. aureus*, por lo que la concentración del medio condicionado podría permitir aumentar su acción antibacteriana. Varios estudios mencionan el uso de métodos para concentrar y aislar factores secretados por las MSCs. La concentración por centrifugación del medio condicionado ha permitido obtener una mayor cantidad de exosomas y así aumentar el efecto terapéutico que éstos poseen (Brandi et al., 2016 y

Alcayaga-Miranda et al., 2015). Estos estudios sugieren que la concentración del medio condicionado es necesaria para obtener niveles significativos de péptidos en el medio condicionado.

Con el objetivo de concentrar el medio condicionado de MSCs hasta 10 veces su volumen inicial, se utilizaron filtros con capacidad de retener moléculas ≥ 3 KDa de peso molecular. Utilizando el medio condicionado concentrado se detectó una disminución en el nivel de supervivencia de la cepa SAU 1S de *S. aureus* en los medios de MSCs de médula ósea y tejido adiposo. Así mismo, la concentración aumentó significativamente los niveles de bBD4A en los medios condicionados de MSCs y fibroblastos, esto en relación a los medios condicionados no concentrados en cada línea celular. Estos resultados concuerdan con reportes anteriores, donde se determinó que el medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea y del fluido menstrual humano ejercen una marcada disminución en el nivel de supervivencia de una mezcla bacteriana aislada del intestino murino con respecto al medio condicionado concentrado de fibroblastos (Alcayaga-Miranda et al., 2015). Esta disminución en el nivel de supervivencia se debería al aumento en la secreción y concentración de hepcidina en los medios condicionados. De igual manera también se han indicado que el medio condicionado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo de humanos ejercen una disminución en la supervivencia bacteriana de agentes patógenos como *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Sutton et al., 2016). Este efecto antibacteriano del medio condicionado concentrado estaría dado por un aumento en la concentración del péptido catelicidina LL-37 humana. En una revisión realizada recientemente, se menciona que la administración *in vivo* del medio condicionado concentrado de MSC de médula ósea de humanos y murinos inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas y gram positivas a diferencia del medio condicionado concentrado de fibroblastos (Archontogeorgis et al., 2015). Por lo tanto, la concentración del medio condicionado tiene el potencial de aumentar su efecto antibacteriano y por lo tanto de disminuir la sobrevivencia de *S. aureus*.

La exposición previa de las MSCs a bacterias grampositivas como el *S. aureus* puede estimular la expresión de péptidos antimicrobianos en un mecanismo iniciado por la interacción del TLR-2 de las MSCs y el antígeno LTA del *S. aureus* y mediado por la vía MyD88/NF-Kb (Abbas et al, 2012; Sung et al., 2016 y Maiti y Jiranek, 2014). Así mismo, el co-cultivo de MSCs derivadas de médula ósea humana y *S. aureus* induce un aumento en el nivel de transcripción de péptidos antimicrobianos y enzimas como catelicidina LL-37 eIDO (Krasnodembskaya et al., 2010 y Auletta et al., 2012). Estos resultados sugieren que las MSCs reconocen las señales infecciosas y/o antígenos bacterianos del entorno a través de los TLRs, generando así un aumento en la transcripción de péptidos antimicrobianos como respuesta a las señales infecciosas con la finalidad de restaurar la homeostasis del ambiente.

En el presente trabajo se procedió a activar ambas líneas de MSCs y los fibroblastos mediante pre-exposición por 6 hrs con 300 UFC de la cepa local SAU 1S de *S. aureus*. Los medios condicionados de MSCs activadas disminuyeron el nivel de supervivencia de *S. aureus* SAU 1S en comparación a medios condicionados de MSCs no activadas. Así mismo, las MSCs derivadas de tejido adiposo activadas aumentan los niveles de mRNA para bBD4A y NK1, mientras que las MSCs derivadas de médula ósea activadas aumentan los niveles de mRNA solo para bBD4A. Adicionalmente, se determinó que el medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea activadas muestran una mayor concentración de bBD4A en relación al medio condicionado no activado. Anteriores estudios demuestran que las MSCs derivadas de la sangre del cordón umbilical humano y co-cultivadas con *E. coli* expresan y secretan una mayor cantidad de β defensiva humana (Sung et al., 2016). Esto se debería a que la interacción del TLR-4 de las MSCs y el antígeno bacteriano LPS de *E. coli* activa la vía de señalización MyD88/NF-Kb y esto induce un incremento en los niveles de mRNA para β -defensiva humana. El medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea humana activadas con *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* posee una significativa capacidad antibacteriana contra estos agentes patógenos (Krasnodembskaya et al., 2010). Este efecto se debe a que las MSCs expresan y secretan el péptido antimicrobiano catelicidina humana LL-37 cuya expresión y secreción aumenta significativamente por efecto de la estimulación previa con

S. aureus, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, otros estudios demuestran que las MSCs derivadas de médula ósea estimuladas con citoquinas proinflamatorias (IFN- γ) disminuyen el crecimiento de *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli* y *S. epidermidis* (Auletta et al., 2012). Este efecto antibacteriano estaría mediado en parte por la enzima catabólica del triptófanoIDO. Así mismo, anteriores estudios reportan una disminución *in vivo* de la sepsis en ratones por efecto de la inoculación de MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo humano y murino (Al-Anazi y Al-Jasser, 2015; Lee et al., 2011 y Mei et al., 2010). Lo anterior debido a que las MSCs secretan factores bioactivos como la catelicidina humana LL-37 y también debido a que incrementan la capacidad fagocitaria de los macrófagos. Algunos ensayos demuestran que el medio condicionado de MSCs preactivadas con LPS adicionalmente a su efecto antibacteriano directo, también mejoran la función antimicrobiana y fagocítica de los polimorfonucleares (Brandau et al., 2014).

Las MSCs podrían estar respondiendo de distinta forma a la estimulación con los PAMPs, de acuerdo al tipo de TLRs que se esté activando y de acuerdo al tipo de tejido de origen de las MSCs (Auletta et al., 2012). Las MSCs en un ambiente inflamatorio y estimuladas con ligandos de TLR-3 producen IDO y PGE2, y las MSCs estimuladas con ligandos de TLR-4 producen IL-6, IL-8 y TGF- β 1. Así mismo, las MSCs derivadas de médula ósea humana pueden tener mejores efectos proinflamatorios que las MSCs derivadas de otros tejidos por efecto de la activación del TLR, sin embargo, aún no se conoce si las MSCs derivadas de tejido adiposo humano responden positivamente a los estímulos vía TLR. En nuestros resultados el *S. aureus* SAU 1S podría estar limitando el aumento de la secreción de bBD4A en las MSCs derivadas de tejido adiposo y en fibroblastos. Esto debido a que los *S. aureus* que causan mastitis tendrían la capacidad de evadir la respuesta inmune y favorecer la infección intramamaria persistente sin causar un estado de infección y/o inflamación aparente (Dallard y Galvinho, 2010). Adicionalmente, se sabe que el LTA del *S. aureus* induce una respuesta pro-inflamatoria reducida (Bannerman et al., 2004), generando una baja producción de citoquinas como IL-8 y TNF- α . Se menciona que el *S. aureus* genera un 5 % menos de éstas citoquinas a comparación de *E. coli* (Yang et al., 2008). Esto se debería probablemente a la regulación negativa en la activación

de la vía NF-Kb, lo cual estaría explicando, en nuestros resultados, la falta de incremento en la producción de bBD4A en las MSCs derivadas de tejido adiposo y fibroblastos por efecto de la activación bacteriana.

Basándonos en lo mencionado por varios autores y también en los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos observar que tanto el efecto de la concentración del medio y de la activación con *S. aureus*, incrementan la capacidad antibacteriana del medio condicionado de MSCs. La activación incrementó los niveles de mRNA para bBD4A en MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo y para NK1 en fibroblastos y MSCs derivadas de tejido adiposo. Así mismo, la concentración incrementó la cantidad de bBD4A en el medio condicionado de MSCs derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y en fibroblastos. Por lo tanto, con el objetivo de combinar ambos efectos se procedió a utilizar el medio condicionado concentrado (10 veces) de MSCs activadas mediante co-cultivo con la cepa local SAU 1S de *S. aureus*. En los ensayos con medio condicionado concentrado de MSCs activadas se determinó una disminución en el nivel de supervivencia de *S. aureus* SAU 1S en los medios condicionados activados concentrados de MSCs de médula ósea y tejido adiposo comparado con los medios condicionados concentrados no activados de MSCs. La capacidad antibacteriana fue similar entre los medios condicionados activados concentrados de ambas fuentes de MSCs, sin embargo, la secreción de bBD4A solamente incrementó significativamente en el medio condicionado activado concentrado de MSCs derivadas de médula ósea. Los resultados de este ensayo son similares a los reportados previamente donde se indica que los medios condicionados concentrados de MSCs derivadas de médula ósea y fluido menstrual humano, previamente estimuladas mediante co-cultivo con una mezcla bacteriana del intestino murino, exhiben una significativa capacidad antibacteriana contra ésta mezcla bacteriana (Alcayaga-Miranda et al., 2015). En este trabajo se menciona que la concentración y la activación también aumentan la expresión y la concentración del péptido hepcidina comparado con los medios condicionados concentrados de MSCs no estimuladas.

Los niveles de expresión para CATHL2, Hecpídina e IDO no fueron detectados en las MSCs activadas derivadas de médula ósea, de tejido adiposo y en fibroblastos de fetos bovinos. Esto se podría deber a que el tejido de origen de las MSCs podría influir en el perfil de expresión de péptidos antibacterianos. Las MSCs aisladas del fluido menstrual humano expresan el péptido hecpídina que es un péptido hepático (Alcayaga-Miranda et al., 2015). En ensayos realizados previamente y en forma preliminar en nuestro laboratorio, se ha reportado que un ambiente inflamatorio caracterizado por altos niveles de IFN- γ y TNF- α y/o estímulos a nivel del TLR-3 inducen la expresión de la enzima IDO (Castro-Manrreza y Montesinos, 2015). Así mismo, basándonos en anteriores investigaciones que mencionan que el TLR-2 ubicado en la membrana de las MSCs reconoce principalmente el antígeno LTA en la pared celular de las bacterias gram positivas como el *S. aureus* y el *S. epidermidis* (Abbas et al., 2012; Lai et al., 2010 y Sung et al., 2016), podemos mencionar que en el presente estudio el co-cultivo con *S. aureus* estaría generando estímulos a nivel del TLR-2 de las MSCs, por lo tanto no se podría detectar la expresión de la enzima IDO ya que ésta requeriría estímulos a nivel del TLR-3. Se ha reportado que las MSCs derivadas de médula ósea humana estimuladas con *S. aureus* y *E. coli* incrementan significativamente los niveles de expresión del péptido antimicrobiano catelicidina LL-37 humana (Krasnodembskaya et al., 2010). Así mismo, en un análisis de expresión de factores solubles con capacidad antibacteriana en las MSCs derivadas de médula ósea humana, se ha indicado que el péptido antimicrobiano catelicidina LL-37 es uno de los factores responsables de inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas (Archontogeorgis et al., 2015). Sin embargo, en nuestros ensayos utilizando MSCs derivadas de médula ósea y de tejido adiposo fetal bovino no activadas y activadas con *S. aureus* no se detectaron niveles de expresión para el péptido CATHL2 correspondiente a la especie bovina.

A pesar de que en nuestro estudio se determinó que los medios condicionados de fibroblastos no poseen capacidad antibacteriana, los cultivos de fibroblastos si expresaron mRNA de bBD4A y NK1 y secretaron bajos niveles de bBD4A. Anteriores investigaciones demuestran que los fibroblastos pulmonares humanos expresan y producen el péptido catelicidina LL-37 pero en un bajo nivel en comparación a las MSCs de médula ósea. (Krasnodembskaya et al., 2010). Los fibroblastos también participan en el proceso inflamatorio inducido por la infección bacteriana aumentando su capacidad migratoria, y su capacidad de síntesis y secreción de mediadores inflamatorios. (Zhang et al., 2016).

En conclusión, los medios condicionados de MSCs poseen efecto antibacteriano en contra de la cepa local SAU 1S de *S. aureus*. La concentración de los medios condicionados de MSCs aumentó los niveles de bBD4A y su capacidad antibacteriana. Adicionalmente, la activación de MSCs mediante pre-exposición a *S. aureus* aumentó el efecto antibacteriano del medio condicionado contra este patógeno en un proceso que probablemente estuvo mediado por el aumento de la expresión de bBD4A y NK1 en MSCs derivadas de tejido adiposo y médula ósea.

9. Bibliografía

- Abbas, A K. Litchman, A H. y Pillai, S. (2012). Inmunología celular y molecular. (7º, Ed.) (*Edit Elsev*).
- Addis, M. F., Tedde, V., Dore, S., Pisanu, S., Puggioni, G. M. G., Roggio, A. M., y Uzzau, S. (2016). Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *J Dairy Sci*, 99(8), 6446–6456.
- Adkins, P. R. F., Middleton, J. R., y Fox, L. K. (2016). Comparison of virulence gene identification, ribosomal spacer PCR, and pulsed field gel electrophoresis for strain-typing *Staphylococcus aureus* isolated from cases of subclinical bovine mastitis in the USA. *J Clin Microbiol*, 54(5), 1–24.
- Akkou, M., Antri, K., Bachtarzi, M.-A., Bes, M., Tristan, A., Dauwalder, O., y Ramdani-bougoussa, N. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. *Pakistan Vet J*, 8318(1), 2074–7764.
- Al-Anazi y Al-Jasser. (2015). World's largest science , technology and medicine open access book publisher mesenchymal stem cells-their antimicrobial effects and their promising future role as novel therapies of infectious complications in high risk patients. *INTECH*, (9), 115–197.
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F. E., y Khoury, M. (2015). Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell*, 6(1), 199–212.
- Aono, S., Li, C., Zhang, G., Kemppainen, R. J., Gard, J., Lu, W., y Shi, J. (2006). Molecular and functional characterization of bovine beta-defensin-1. *Vet Immunol Immunop*, 113(1–2), 181–90.
- Archontogeorgis, K., Kouliatsis, G., y Pneumatikos, L. (2015). Mesenchymal stem cells in the treatment of acute respiratory distress syndrome. *PNEUMON*, 28(1), 70–79.
- Artursson, K., Söderlund, R., Liu, L., Monecke, S., y Schelin, J. (2016). Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol*, 193(1), 156–161.
- Auletta, J. J., Deans, R. J., y Bartholomew, A. M. (2012). Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood*, 119(8), 1–4.
- Azocar J. (2001). Prevalencia, incidencia y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero, comuna de Maria Pinto, región metropolitana. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- Bannerman, D. D., Paape, M. J., Lee, J., Zhao, X., Hope, J. C., y Rainard, P. (2004). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *ASM*, 11(3), 463–472.
- Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., y La Salandra, G. (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in south Italy. *Food Microbiol*, 62(1), 141–146.
- Bernardo, M. E., y Fibbe, W. E. (2013). Review mesenchymal stromal cells : sensors and switchers of inflammation. *Stem Cell*, 13(4), 392–402.
- Betancourt, O., Scarpa, C., y Villagrán, K. (2003). Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina

- frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile. *REV. Cient. FCV-LUZ*, XIII(5), 413–417.
- Bitew, M., Tafere, A., y Tolosa, T. (2010). Study on bovine mastitis in dairy farms of bahir dar and its environs. *Medwell Journals*, 9(23), 2912–2917.
- Bitrus, A. A., Zunita Zakaria, S. K. B., y Othman, S. (2014). Persistence of antibacterial resistance and virulence gene profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) isolated from humans and animals. *Pakistan Vet J*, 36(1), 77–82.
- Boecker, A. H., van Neerven, S. G. A., Scheffel, J., Tank, J., Altinova, H., Seidensticker, K., y Bozkurt, A. (2016). Pre-differentiation of mesenchymal stromal cells in combination with a microstructured nerve guide supports peripheral nerve regeneration in the rat sciatic nerve model. *Eur J Neurosci*, 43(3), 404–416.
- Bogni, C., Odierno, L., Raspanti, C., Giraudo, J., y Larriestra, A. (2011). War against mastitis : Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 1(1), 483–494.
- Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., y Ja, M. (2014). Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS ONE*, 9(9).
- Brandi, J., Dalla, E., Dando, I., Biondani, G., Robotti, E., Jenkins, R., y Cecconi, D. (2016). Secretome protein signature of human pancreatic cancer stem-like cells. *J Proteomics*, 136, 1–12.
- Bravo U., K. (2009). Estudio de incidencia y prevalencia de mastitis y su impacto económico en lecherías de la X región. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- Casanova, V. P., Appio, J., Kohl, E., Michaelsen, T. R., Paim, D. S., Brunetto, T. R., y Girardini, L. K. (2016). Bovine mastitis: prevalence and antimicrobial susceptibility profile and detection of genes associated with biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Rev SEMINA Ciencias Agr*, 37(3), 1369–1378.
- Castro-Manrreza, M. E., y Montesinos, J. J. (2015). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*, 2015(5), 1–20.
- Chen, J., Huddleston, J., Buckley, R. M., Malig, M., Lawhon, S. D., Skow, L. C., y Womack, J. E. (2015). Bovine NK-lysin: copy number variation and functional diversification. *PNAS PLUS*, 5(1), 7223–7229.
- Chen, Q., He, G., Wenyao, Z., Xu, T., Qi, H., Li, J., y Zhang, Y. (2016). Stromal fibroblasts derived from mammary gland of bovine with mastitis display inflammation-specific changes. *Nature*, 1–13.
- Cheng, D.-Q., Li, Y., y Huang, J.-F. (2014). Molecular evolution of the primate α - θ -defensin multigene family. *PLoS ONE*, 9(5), e97425.
- Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H., y Xiong, Y. Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immun*, 40(1), 1–9.
- Cortes, Y., Ojeda, M., Araya, D., Dueñas, F., Fernández, M., Peralta, O., y Goodell, M. (2013). Isolation and multilineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res*, 9(1), 133–147.
- Credille, B. C., Woolums, A. R., Overton, M. W., Hurley, D. J., y Giguère, S.

- (2015). Expression of inflammation-associated genes in circulating leukocytes and activity of indoleamine-2,3-dioxygenase in dairy cattle with acute puerperal metritis and bacteremia. *Res in Vet Sci*, 101(1), 6–10.
- Dallard, B. E., y Calvinho, L. F. (2010). Revisión: receptores tipo “*tol*” en la inmunidad innata y su rol durante la infección intramamaria por *Staphylococcus aureus*. *FAVE*, 9(2).
- Deng, Z., Shahid, M., y Zhang, L. (2016). An investigation of the innate immune response in bovine mammary epithelial cells challenged by prototheca zopfii. *Mycropatología*, 181(1), 823–832.
- Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., Brien, T. O., y Laffey, J. G. (2015). Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by *E. coli* in the rat. *Thorax*, 67(1), 625–635.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., y Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.
- Dueñas, F., Becerra, V., Cortes, Y., Vidal, S., Sáenz, L., y Palomino, J. (2014). Hepatogenic and neurogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. *BMC Vet Res*, 10(154), 1–13.
- Endsley, J. J., Furrer, J. L., Endsley, M. a, McIntosh, M. a, Maue, A. C., Waters, W. R., y Estes, D. M. (2004). Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin. *J Immunol*, 173(4), 2607–2614.
- Ganz, T., y Nemeth, E. (2015). Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 500–10.
- Gebler, A., Zabel, O., y Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*, 18(2), 128–134.
- Gopal, S., y Divya, K. C. (2017). Can methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence from dairy cows in india act as potential risk for community-associated infections?. *Vet World*, 10(3), 311–318.
- Grudlewska, K., Sysakiewicz, M., Buda, K., Sobocka, M., Alska, E., y Ciesielska, N. (2014). Possibility of using defensins in medicine. *J Health Sci*, 4(7), 11–17.
- Guimarães, F. F., Manzi, M. P., Joaquim, S. F., y Langoni, H. (2017). Short communication : outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. *J Dairy Sci*, 100(1), 726–730.
- Hazlett, L., y Wu, M. (2011). Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*, 343(1), 175–188.
- Julianto, I., y Rindastuti, Y. (2016). Topical delivery of mesenchymal stem cells “secretomes” in wound repair. *Indonesian J Int Med*, 48(3), 217–220.
- Kerr, D. E. y Wellnitz, O. (2003). Mammary expression of new genes to combat mastitis. *J Anim Sci*, 81(3), 38–47.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A., Ali, S. M., y Khan, A. U. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(2), 586–597.
- Khangembam, V. C., y Kumar, A. (2011). Buffalo hepcidin: characterization of cDNA and study of antimicrobial property. *Vet Res Commun*, 35(2), 79–87.
- Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., y

- Bagnicka, E. (2014). Expression patterns of β -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Vet Res*, 10(1), 246–260.
- Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fanga, X., Gupta, N., Serikovd, V., Lee, J.-W., y Matthay, M. A. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*, 28(12), 2229–2238.
- Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. a, Park, H. J., Daniel, T., Leichtle, A., y Gallo, R. L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol*, 130(9), 2211–2221.
- Lee, J., Fang, X., Krasnodembskaya, A., Howard, J., y Matthay, M. (2011). Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells*, 29(6), 913–919.
- Lemos, A. D. R., Ismael, L. A. S., Boato, C. C. M., Borges, M. T. F., y Rondó, P. H. D. C. (2010). Hepcidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. *Rev Assoc Med Bras*, 56(5), 596–599.
- Li, C., Wu, X., Tong, J., Yang, X., Zhao, J., Zheng, Q., y Ma, Z. (2015). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell*, 6(1), 55.
- Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., y Shi, Y. (2014). Mesenchymal stem cells use ido to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res*, 74(5), 1576–1587.
- Lofton, H., Pránting, M., Thulin, E., y Andersson, D. I. (2013). Mechanisms and fitness costs of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100HL and wheat germ histones. *PLoS ONE*, 8(7).
- Maiti, A., y Jiranek, W. a. (2014). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced cytokines mRNA production in human bone marrow derived mesenchymal stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *BMC Cell Biol*, 15(1), 11.
- Marote, A., Teixeira, F. G., Mendes-pinheiro, B., y Tan, A. (2016). MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential. *Front Farmacol*, 7(8), 1–8.
- Marquez-Curtis, L. A., y Janowska-Wieczorek, A. (2013). Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *BioMed Res Int*, 2013.
- Mei, S. H. J., Haitzma, J. J., Dos Santos, C. C., Deng, Y., Lai, P. F. H., Slutsky, A. S., y Stewart, D. J. (2010). Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(8), 1047–1057.
- Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bülle, H., Woite, C., y Däubener, W. (2011). Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*, 25(4), 648–54.
- Merriman, K. E., Kweh, M. F., Powell, J. L., Lippolis, J. D., y Nelson, C. D. (2015). Multiple β -defensin genes are upregulated by the vitamin D pathway in cattle. *JSBMB*, 154, 120–129.
- Mezey, É., y Nemeth, K. (2015). Mesenchymal stem cells and infectious

- diseases: smarter than drugs. *Inmunol Letters*, 168(1), 208–214.
- Mirabzadeh-Ardakani, A., Solie, J., Gonzalez-Cano, P., Schmutz, S. M., y Griebel, P. J. (2016). Tissue-and age-dependent expression of the bovine DEFB103 gene and protein. *Cell Tissue Res*, 363(2), 479–490.
- Mo, M., Wang, S., Zhou, Y., Li, H., y Wu, Y. (2016). Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci*, 73(17), 3311–3321.
- ODEPA. (2017). Boletín de la leche: producción, recepción, precios y comercio exterior. Retrieved from <http://www.odepa.cl/boletin/boletin-de-la-leche-5/>
- Oliver, S. P., y Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin Food Anim*, 28(2), 165–185.
- Olsen, H. G., Knutsen, T. M., Sabat, A. M. L., Grove, H., Nome, T., Svendsen, M., y Lien, S. (2016). Fine mapping of a QTL on bovine chromosome 6 using imputed full sequence data suggests a key role for the group - specific component (GC) gene in clinical mastitis and milk production. *Genet Sel Evol*, 1–16.
- Pacha B., P. A. (2015). Evaluación de la diversidad genética de *staphylococcus aureus* aislados desde leche de estanque de rebaños lecheros de las provincias de BioBío y Ñuble, región del BioBío. Memoria para optar el grado de magíster en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción.
- Pereyra, E. A. L., Dallard, B. E., y Calvino, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Rev Argent Microbiol*, 46(4), 363–375.
- Phan, T. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Hinds, M. G., Kvensakul, M., y Hulett, M. D. (2016). Human β -defensin 3 contains an oncolytic motif that binds PI(4,5)P2 to mediate tumour cell permeabilisation. *Oncotarget*, 7(2), 2054–2069.
- Pigeon, C., Ilyin, G., Courselaud, B., Leroyer, P., Turlin, B., Brissot, P., y Loréal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *JBC*, 276(11), 7811–7819.
- Piktel, E., Niemirowicz, K., Wnorowska, U., Wątek, M., Wollny, T., Głuszek, K., y Bucki, R. (2016). The role of cathelicidin LL-37 in cancer development. *Arch Immunol Ther Exp*, 64(1), 33–46.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., y Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem. *Science*, 284(5411), 143–147.
- Porcelli, F., Verardi, R., Shi, L., Henzler-Wildman, K. A., Ramamoorthy, A., y Veglia, G. (2008). NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry*, 47(20), 5565–5572.
- Retamal, P., Castillo-Ruiz, M., Villagra, N. A., Morgado, J., y Mora, G. C. (2010). Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella typhi* expressing *S. typhimurium* SPI-3 sequences. *PLoS ONE*, 5(2), 1–7.
- Reyes-jara, A., Cordero, N., Aguirre, J., Troncoso, M., y Figueroa, G. (2016). Antibacterial effect of copper on microorganisms isolated from bovine mastitis. *Front Microbiol*, 7(April), 1–10.
- Ruegg, P. L. (2005). Relationship between bulk tank milk somatic cell count. *NMC*, 28–35.

- Russell, K. A., Chow, N. H. C., Dukoff, D., Gibson, T. W. G., Lamarre, J., Betts, D. H., y Koch, T. G. (2016). Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18.
- San Martín, B., Kruze, J., Morales, M. A., Agüero, H., Leon, B., Espinoza, S., y Borie, C. (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, región metropolitana y X región, Chile. *Arch Med Vet*, 34(2), 221–234.
- Shi, J., y Camus, A. C. (2006). Hecidins in amphibians and fishes: antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *DCI*, 30(9), 746–755.
- Squillaro, T., Peluso, G., y Galderisi, U. (2016). Review clinical trials with mesenchymal stem cells : an update. *Cell Transplant*, 25(1), 829–848.
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinskas, A., Slaby, O., y Michalek, J. (2012). Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells*, 21(14), 2724–2752.
- Sung, D. K., Chang, Y. S., Sung, S. I., Yoo, H. S., Ahn, S. Y., y Park, W. S. (2016). Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via *toll*-like receptor 4 signalling. *Cell Microbiol*, 18(3), 424–436.
- Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., Heeckeren, R. Van, Kaur, S., y Bonfield, T. L. (2016). Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment. *Stem Cells Int.*, 2016(1), 12p.
- Tang, Y. W., y Stratton, C. W. (2010). *Staphylococcus aureus*: an old pathogen with new weapons. *Clin Lab Med*, 30(1), 179–208.
- Thomas, V., De Jong, A., Moyaert, H., Simjee, S., El Garch, F., Morrissey, I., y Vall??, M. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Ag*, 46(1), 13–20.
- Tkalec, V. J., Habrun, B., y Zadavec, M. (2015). Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* kod krava s mastitisom, prisutnost *mecA* gena i gena za virulenciju. *Mljekarstvo*, 65(4), 259–268.
- Tomchuck, S. L., J., Z. K., Coffelt, S. B., Waterman, R. S., Danka, E. S., y Scandurro, A. B. (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cell*, 26(1), 99–107.
- Veh, K. a. a, Klein, R. C. C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., y Malouin, F. (2015). Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J Dairy Sci*, 98(1), 155–168.
- Whelehan, C. J., Barry-Reidy, A., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Chapwanya, A., Narciandi, F., y O'Farrelly, C. (2014). Characterisation and expression profile of the bovine cathelicidin gene repertoire in mammary tissue. *BMC Genomics*, 15(1), 128–141.
- Xhindoli, D., Pacor, S., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., y Tossi, A. (2016). The human cathelicidin LL-37 - A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *BBA*, 1858(3), 546–566.
- Yang, W., Zerbe, H., Petzl, W., Brunner, R. M., Günther, J., Draing, C., y 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-κB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF-alfa and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol*, 45(5), 1385–1397.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., y De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *JEV*, 4, 27066.
- Zeuner, M.-T., Patel, K., Denecke, B., Giebel, B., y Widera, D. (2016). Paracrine effects of TLR4-polarised mesenchymal stromal cells are mediated by extracellular vesicles. *J Transl Med*, 14(1), 34–38.
- Zhang, Z., Li, X. P., Yang, F., Luo, J. Y., Wang, X. R., Liu, L. H., y Li, H. S. (2016). Influences of season , parity , lactation , udder area , milk yield , and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *J Dairy Sci*, 25(1), 6484–6493.
- Zhao, X., y Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci*, 86(13 Suppl), 57–65.