

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



“EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE *Rana catesbeiana*, COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN BOVINOS CON MASTITIS CLÍNICA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA:

M.V.Z. EDUARDO GONZALEZ COVARRUBIAS

COMITÉ TUTORIAL

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ (DIRECTORA)
DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES
DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

ASESOR DE TESIS

DR. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO, SEPTIEMBRE DEL 2009



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA



DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito informar a Usted que en mi carácter de sinodal del jurado del examen de Maestría del MVZ: **EDUARDO GONZÁLEZ COVARRUBIAS**, quien defenderá la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE *Rana catesbeiana*, COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN BOVINOS CON MASTITIS CLÍNICA”**, leí y corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento, por lo que confirmo que este, cumple con los requisitos para optar por el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

Me despido de Usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 4 de Septiembre de 2009

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ
Profesor Investigador Titular “C”
Universidad de Guadalajara

POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS



**Universidad Autónoma
de Aguascalientes**



Universidad de Colima



Universidad de Guadalajara



**Universidad
de Guanajuato**

Universidad de Guanajuato



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Le informo a usted que he revisado la última versión de la tesis del **MVZ. EDUARDO GONZÁLEZ COVARRUBIAS** titulada **EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE *Rana catesbeiana* COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN BOVINOS CON MASTITIS CLÍNICA**, así como también corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento. Esta tesis se ha derivado de los estudios desarrollados bajo el tutelaje de la Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez, integrante del Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias.

Por lo anterior le manifiesto que no tengo objeción en extender mi **VOTO APROBATORIO** para que pueda optar por el grado de **Maestro en Ciencias Pecuarias** dentro del marco normativo de la Universidad de Guadalajara.

Me despido de usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE

Jesús María, Aguascalientes, a 11 de agosto de 2009

DR. ARTURO G. VALDIVIA FLORES
PROFESOR INVESTIGADOR

c.c.p. SUSTENTANTE.
c.c.p. TUTORA.
c.c.p. ARCHIVO.



DRA. ESTHER ALBARRÁN RODRÍGUEZ
COORDINADORA DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en mi carácter de sinodal del jurado del examen de Maestría del MVZ. EDUARDO GONZÁLEZ COVARRUBIAS quien defenderá la tesis titulada: "**EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE *Rana catesbeiana* COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN BOVINOS CON MASTITIS CLÍNICA**", leí y corroboré que el sustentante hizo los cambios sugeridos al documento, por lo que confirmo que este, cumple con los requisitos para optar por el grado de Maestría en Ciencias Pecuarias.

Me despido de usted con un cordial saludo y agradeciendo las atenciones que se sirva dar a la presente.

ATENTAMENTE
Guadalajara, Jalisco, a 5 de Agosto de 2009

Dr. J. Eleazar Barboza Corona
Profesor Titular
Universidad de Guanajuato

c.c.p. INTERESADO.-
c.c.p. ARCHIVO.-

INDICE GENERAL

	Pag
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	lii
Índice de tablas y figuras	iv
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Producción de leche	3
2.2. Mastitis	4
2.2.1. Diagnóstico de la mastitis	5
2.2.2. Tratamiento de la mastitis	6
2.3. Péptidos de defensa del hospedero (PDH)	7
2.3.1. Historia	8
2.3.2. Tipos de PDH	9
2.3.3. Clasificación de los PDH	13
2.3.3.1. Péptidos hélice- α	14
2.3.3.2. Péptidos ricos en cisteína	14
2.3.3.3. Péptidos de hoja- β	14
2.3.3.4. PAM con alto contenido de un aminoácido	14
2.3.3.5. PAM de origen microbiano	15
2.3.4. Mecanismo de acción	15
2.3.4.1. Actividad inmunoreguladora	16
2.3.5. Aplicaciones	17
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	20
5. Material y métodos	21

5.1. Obtención del extracto de piel de rana	21
5.2. Prueba antimicrobiana <i>in vitro</i>	22
5.3. Desafío <i>in situ</i> de <i>Escherichia coli</i> al extracto de la piel de rana (EPRC) en glándula mamaria	23
5.3.1. Estudio Histopatológico	23
5.4. Prueba preliminar <i>in vivo</i> de la aplicación terapéutica del extracto de piel de rana en vacas con mastitis clínica	24
5.4.1. Determinación de la dosis efectiva	24
5.4.2. Evaluación de la dosis efectiva en vacas con mastitis clínica	25
5.4.2.1. Análisis bacteriológico. Prueba BBL Crystal	25
6. Resultados y discusión	27
6.1. Prueba antimicrobiana <i>in vitro</i>	27
6.2. Desafío <i>in situ</i> de <i>E. coli</i> al extracto de la piel de rana (EPRC) en glándula mamaria	28
6.3. Prueba preliminar <i>in vivo</i> de la aplicación terapéutica del extracto de piel de rana en vacas con mastitis clínica	33
7. Conclusiones	43
8. Bibliografía	44

DEDICATORIAS

A Dios, por ser nuestro creador, amparo y fortaleza cuando más lo necesitamos, y por hacer palpable su amor a través de cada uno de nosotros.

A mi esposa, Josefina González y mis hijos, Abraham y Jesica Andrea, quienes con su paciencia y comprensión me permitieron concluir otra etapa de mis estudios, además de ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor.

A la memoria de mi Padre y en vida con mi Madre, cada uno en su momento, buscó lo mejor para mí y me hizo una persona con valores y principios para toda la vida.

A mis hermanos y hermana por creer y confiar siempre en mí, apoyándome en todas las decisiones que he tomado en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias, por su apoyo y facilidades para llevar a cabo mi programa de estudios de maestría.

A la Universidad de Guadalajara por la oportunidad de realizar estudios de investigación en sus laboratorios del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA).

Al Comité Tutorial integrado por la Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez, Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores y el Dr. José Eleazar Barboza Corona, por su buena disposición en la revisión de este trabajo que me ha permitido desarrollarme, tanto intelectual como personal en el trascurso de este estudio.

A la Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez, por su participación en la dirección y desarrollo y culminación de la investigación, por sus aportaciones en la revisión de la tesis y por brindarme su confianza y motivación constante para realizar esta etapa en mi formación académica.

Al Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez, por la oportunidad y apoyo que me ha brindado, así como sus conocimientos que compartió para realizar este proyecto, además de la disponibilidad de su laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA.

A la Dra. Esther Albarrán Rodríguez, por su valiosa colaboración en el desarrollo de la tesis y de su apoyo del laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria del CUCBA.

Al Dr. David Avila Figueroa, por su cooperación, disposición y conocimientos en el desarrollo del estudio, así como su apoyo moral que siempre me ha brindado.

A los amigos y profesores que siempre estuvieron atentos y expresando buenos deseos que fueron estímulos para llegar ha término esta etapa de estudios.

ABREVIATURAS

EPRC	Extracto de piel de <i>Rana Catesbeiana</i>
PDH	Péptidos de Defensa del Hospedero
LPS	Lipopolisacáridos
PMC	Prueba de Mastitis California
PNA	Péptidos Naturales Antimicrobianos
RII	Respuesta Inmune Innata
RIA	Respuesta Inmune Adquirida
ECN	Estafilococo Coagulasa Negativa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
FIRA	Fideicomiso Instituidos en Relación con la Agricultura
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
TMCA	Tasa Media de Crecimiento Anual
CCS	Conteo Celular Somático
RCS	Recuento de Células Somáticas
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
kDa	Kilodalton

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pag
Tabla 1 Péptidos antimicrobianos derivados de plantas, insectos, invertebrados marinos y vertebrados	11
Tabla 2 Codificación de las categorías de mastitis	24
Tabla 3 Principales hallazgos histopatológicos en el tejido glandular de los cuartos tratados y sin tratar con extracto de piel de <i>Rana catesbeiana</i>	31
Tabla 4 Grado de mastitis y principales bacterias aisladas antes y después del tratamiento con extracto de piel de <i>Rana catesbeiana</i>	35
Figura 1 Prueba antimicrobiana <i>in vitro</i> de extracto de piel de <i>Rana catesbeiana</i>	27
Figura 2 Fotomicrografía de tejido glandular del cuarto delantero izquierdo (control)	29
Figura 3 Fotomicrografía de tejido glandular del cuarto trasero derecho (<i>E. coli</i> + tratamiento con EPRC)	29
Figura 4 Fotomicrografía de una zona del cuarto trasero izquierdo (<i>E. coli</i> sin tratamiento)	30

Evaluación del extracto de piel de *Rana catesbeiana*, como tratamiento alternativo en bovinos con Mastitis Clínica

González Covarrubias Eduardo, Reyes Velázquez Waldina Patricia, Islas Rodríguez Alfonso Enrique, Valdivia Flores Arturo Gerardo y Barboza Corona José Eleazar.

RESUMEN

La mastitis es el principal problema económico reflejado en la producción y calidad de la leche de los bovinos. El tratamiento para la presentación clínica se realiza principalmente a base de fármacos los cuales se eliminan por la leche marcando así un periodo de retiro que con frecuencia no se respeta en los establos y esto ocasiona el consumo de leche con residuos antimicrobianos que representa un riesgo a la salud pública. Actualmente existen otras alternativas para reducir el uso de antibióticos como son los péptidos de defensa, presentes en el extracto de piel de *Rana catesbeiana* (EPRC), los cuales inician la respuesta inmune y han demostrado eficiencia en el tratamiento de otros trastornos como infecciones cutáneas, fibrosis cística y cáncer. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar el efecto antimicrobiano del EPRC, definir la dosis efectiva, analizar el efecto histopatológico en la glándula mamaria expuesta a *Escherichia coli* con/sin tratar con EPRC y efectuar un prueba *in vivo* del tratamiento en vacas con mastitis clínica. El estudio antimicrobiano *in vitro* permitió evaluar el crecimiento de *E. coli* a diferentes concentraciones del extracto, y posteriormente la bacteria se desafió *in situ* en la glándula mamaria con la dosis efectiva realizando un estudio histopatológico de los cuartos de la ubre tratados y sin tratar con el EPRC. La prueba *in vivo* realizada en vacas diagnosticadas mediante la prueba de Mastitis California (PMC), permitió evaluar la eficiencia del tratamiento intramamario con EPRC. Antes y después del tratamiento se realizó un análisis microbiológico (BBL Crystal) en la leche obtenida de los cuartos infectados. Los resultados de la prueba antimicrobiana *in vitro* mostraron ser contrastantes ya que la concentración menor (1.56%) y la mayor (100%) fueron similares estadísticamente, si bien se observó reducción de UFC en todas las concentraciones de EPRC. El estudio histopatológico en los cuartos de la ubre inoculados con *E. coli* mostraron alteraciones caracterizadas por fibrosis, infiltración linfocitaria y ligera necrosis, sin que el tratamiento con EPRC mostrara efecto regenerador en tejido glandular. La prueba *in vivo* desarrollada en vacas con mastitis clínica permitió observar reducción en el cuadro clínico. De las bacterias aisladas el 86.67% fueron ambientales y solamente el 13.33% fue *S. aureus*. Dentro de las bacterias ambientales destaca el aislamiento de *E. coli*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus uberis*. Como conclusión se puede establecer que el EPRC presentó eficiencia limitada como tratamiento antimicrobiano en la mastitis y será necesario el aislamiento y caracterización de los péptidos de defensa para conocer el efecto de cada uno de ellos.

Palabras clave: Mastitis, *Rana catesbeiana*, péptidos de defensa

Evaluation of the extract of the skin of *Rana catesbeiana*. as an alternative treatment in bovines with Clinical Mastitis

Eduardo González Covarrubias, Waldina Patricia Reyes Velásquez, Alfonso Enrique Islas Rodríguez, Arturo Gerardo Valdivia Flores, and José Eleazar Barboza Corona

ABSTRACT

Mastitis is the principal economic problem reflected in the production and quality of the milk of bovines. The treatment for the clinical presentation is accomplished principally based on medications which are eliminated through the milk, marking this as a period of elimination that with frequency is not respected in the stables. This causes the consumption of milk with antimicrobial residues that represents a risk to public health. There actually exist other alternatives to reduce the use of antibiotics like the defensive peptides present in the extract of the skin of *Rana catesbeiana* (EPCR) which initiate the immune response and have demonstrated efficiency in the treatment of other illnesses like cutaneous infections, cystic fibrosis, and cancer. The objectives of the present study were to evaluate the antimicrobial effect of EPCR, to define the effective dosage, to analyze the histopathological effect on mammary glands exposed to *Escherichia coli* with or without treatment with EPCR, and to carry out tests *in vivo* of treatment in cows with clinical mastitis. The *in vitro* antimicrobial study was carried out with *E. coli* and different concentrations of the extract, and then later the bacteria was introduced *in situ* into the mammary gland with the effective dosage established in the histopathological study of the quarters of the udders treated or not treated with EPCR. The *in vivo* test carried out in cows diagnosed by means of the California Mastitis Test (CMT) permitted an evaluation of the efficacy of the intra-mammary treatment with EPCR. Before and after the treatment, a microbiological analysis (BBL Crystal) was made on the milk obtained from the infected quarters. The results of the *in vitro* antimicrobial test were shown to be contrasting, in that the lowest concentration (1.56%) and the highest (100%) were statistically similar. A reduction of CFUs (colony forming units) was also observed in all of the concentrations of EPCR. The histopathological study in the quarters of the udders inoculated with *E. coli* showed the characteristic alterations characterized by fibrosis, lymphatic filtration, and light necrosis. That without the treatment with EPCR showed the effect of regeneration of glandular tissue. The *in vivo* test conducted in cows with clinical mastitis permitted the observation of a reduction in the clinical quarter. Of the bacteria isolated 86.67% were ambient and only 13.33% were *S. aureus*. In the ambient bacteria isolated, *E. coli*, *Enterococcus faecium* and *Streptococcus uberis* were noted. In conclusion it can be established that EPCR presented limited efficacy as an antimicrobial treatment in mastitis and the isolation and characterization of the defensive peptides will be necessary to know the effects of each one of them.

Key words: Mastitis, *Rana catesbeiana*, defensive peptides

1. INTRODUCCIÓN

La producción de leche en México es una actividad económica importante de las explotaciones pecuarias y representa una fuente primaria de la alimentación nacional. En los establos lecheros existen números factores que pueden afectar la producción de leche, destacan los aspectos de alimentación, reproductivos, genéticos, inmunoprolácticos y de salud. Uno de los problemas de salud de mayor impacto económico es la mastitis, trastorno que puede ser debido a lesiones de tipo traumático, irritaciones químicas o de tipo infeccioso, además es influenciada por factores propios del animal y del ambiente (Saran y Chaffer, 2000).

Entre las medidas terapéuticas, los antibióticos siguen siendo la herramienta de primera elección y con su uso indiscriminado se está creando resistencia bacteriana. Además existen reportes de la eliminación de residuos de antimicrobianos en los productos de origen animal, lo que implica riesgos a la salud humana (Frazier y Westhoff, 1978). Por lo tanto, en la actualidad se pretende utilizar estrategias alternativas que permitan reducir el impacto a la salud tanto de humanos como animales.

Entre las nuevas alternativas conocidas también como tratamientos orgánicos, se encuentran los péptidos de defensa del hospedero (PDH), compuestos esenciales de la Respuesta Inmune Innata (RII) producidos por todos los organismos. Se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales regularmente expuestos al ataque microbiano como la piel, intestino y pulmones (Huang, 2000).

Los PDH, cuya acción protectora han usado plantas y animales por millones de años, llenan muchos requerimientos que demanda la industria farmacéutica, la agricultura, acuacultura y producción de alimentos en general. Ante esta perspectiva se abre un amplio campo de investigación para la Ciencia Básica así como en la Biotecnología y Bioingeniería de agentes terapéuticos alternativos. Aunque forman parte de un mecanismo de defensa ancestral, los PDH representan un futuro prometedor en la lucha contra microorganismos patógenos (Shai, 1998).

Existen numerosos estudios sobre la eficiencia de los PDH extraídos a partir de diversos organismos incluyendo humanos, plantas, invertebrados marinos, y anfibios entre otros (Broekaert *et al.*, 1995; Evans y Harmon, 1995; Boman, 1996; Gallo y Huttner, 1998). Las investigaciones en México son escasas, destacando las desarrolladas en el Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, en las cuales se estudia la piel de *Rana catesbeiana* para extraer los PDH y caracterizar las fracciones que los contenga con la finalidad de purificarlos y obtener un producto antimicrobiano.

El presente estudio permitirá contar con diversas bases científicas que nos permitan en un futuro determinar la eficiencia del extracto de piel de *Rana catesbeiana* en vacas con mastitis clínica.

2. ANTECEDENTES

2.1. Producción de leche

La leche es uno de los alimentos más completos para el ser humano, dadas las características de sus nutrimentos, como las proteínas que contienen gran cantidad de aminoácidos esenciales para la alimentación (Varnam y Sutherland, 1994). Por ello organismos internacionales como la FAO y la UNESCO la han recomendado como alimento indispensable para la nutrición humana, principalmente para los niños (SIAP, 2001).

Según datos de la FAO durante los años de 1992 a 2001, la producción mundial de leche de bovino fue cercana a 5 mil millones de toneladas, destacando la participación de la Unión Europea con el 26%, seguida de los Estados Unidos (15%), Rusia (8%), India (6%) y Brasil (4%), países que conjuntamente participaron con el 60 % de la producción total. (FIRA, 2001).

Durante la última década la Unión Europea ha sido la región con la mayor producción de leche a nivel mundial. Por ejemplo, Alemania produjo 283 millones de toneladas, Francia 251, Reino Unido 148, Italia 144 y Holanda 110 millones. Por otro lado, México ocupa el treceavo lugar, con un promedio de 8 millones de toneladas anuales (SIAP, 2001).

En México, la producción lechera se desarrolla en todo su territorio, en el año de 2008 la producción fue de 10,600,854 miles de litros, concentrándose en seis estados, los que contribuyen conjuntamente con el 62% de la producción nacional, destacan Jalisco, Coahuila, Durango, y Chihuahua quienes participan con el 49%. De la producción obtenida, el 81% es producida en 11 entidades federativas: Jalisco (17.0%), Coahuila (13.0%), Durango (10.0%) y Chihuahua (9.0%) que ocupan los cuatro primeros lugares en la producción. En el estado de Jalisco la producción del año 2008 fue de 1,855,362 miles de litros, 3.33% mayor que el año 2007 (SAGARPA, 2009).

Los sistemas de producción de leche pueden ser extensivos, sem-intensivos e intensivos, estos sistemas por lo general se clasifican por el modelo de alimentación, las diferencias principales son por el tipo de forraje y la forma en que éste se ofrece a los animales, siendo el precio de la leche un factor económico importante y que puede determinar el sistema más rentable (Gómez y Jahn, 1993).

En los sistemas extensivos no se necesitan grandes inversiones para el suministro de los alimentos, pero el balance de los nutrientes es más difícil de controlar. Mientras que en el sistema intensivo y sem-intensivo son dietas mezcladas usando por lo general ingredientes tipo ensilajes, así como concentrado, alimentos más costosos que los utilizados en el sistema extensivo (Valtora *et al.*, 1997).

La producción intensiva se caracteriza por establos de mejor infraestructura y manejo especializado, así como de mayor producción. Sin embargo, independientemente del tipo de explotación, uno de los problemas de mayor impacto en la producción láctea es la mastitis (Blowey y Edmondson, 1995).

2.2. Mastitis

De las enfermedades que afectan al hato lechero, las más común es la mastitis; la cual se caracteriza por una reacción inflamatoria de la glándula mamaria y por la alteración de las propiedades de la leche. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática o bien a la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre. Este trastorno es el resultado final de la interacción de varios factores, relacionados con el hombre, la vaca, el medio ambiente, los microorganismos y el manejo (Nelson y Nickerson, 1992; Saran y Chaffer, 2000).

La mastitis puede ser causada por más de 140 diferentes tipos de microorganismos; los cuales han sido agrupados en las categorías siguientes: contagiosos (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*), ambientales

(estreptococos y coliformes), y oportunistas (estafilococos coagulasa negativos) (Nelson y Nickerson, 1992; Blowey y Edmondson, 1995).

Durante la mastitis, la multiplicación bacteriana en los conductos galactóforos y en los alvéolos de la glándula mamaria produce procesos inflamatorios sucesivos que dan lugar a la sustitución del tejido secretor por tejido conjuntivo fibroso, pudiendo con el tiempo afectar de manera severa el tejido glandular y en consecuencia la pérdida de la función productiva (Saran *et al.*, 2000; Wolter *et al.*, 2004).

Por otra parte, la mastitis afecta la composición de la leche reduciendo la calidad nutricional, además de incrementar componentes indeseables como enzimas proteolíticas y sales, ocasionando rancidez a la leche. Entre los nutrientes que pueden deteriorarse destacan las proteínas, grasas y lactosa. Se reduce también la aptitud quesera y la estabilidad térmica (Nelson y Nickerson, 2000).

En la mastitis se distinguen dos tipos de presentaciones. La clínica, caracterizada por la inflamación del cuarto (s) infectado, con dolor al tacto, presencia de coágulos, descamaciones y en ocasiones sangre. En casos severos se presentan signos generalizados como fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito y reducción de la producción de leche. La mastitis subclínica, es más sutil y no puede detectarse por observación visual, sin embargo, puede identificarse mediante pruebas que detecten la presencia de microorganismos infecciosos o por el incremento de células somáticas resultantes de la inflamación. Por lo general no se aprecia la persistencia e importancia económica de la mastitis subclínica, porque la leche mantiene su apariencia normal (Nelson y Nickerson, 1992; Wolter *et al.*, 2004).

2.2.1. Diagnóstico de la Mastitis

La técnica de campo para el diagnóstico de mastitis más usada es la prueba de mastitis California (PMC) desarrollada por Noorlander y Schalm en California en la década de los 50's. Este método de detección de la mastitis aún tiene vigencia y puede ser de gran utilidad en la realización de un plan de control de mastitis.

Permite un diagnóstico rápido del animal, si bien la prueba es un tanto subjetiva, permite descartar o confirmar un conteo de células elevado y por ende una sospecha de mastitis (Nelson y Nickerson, 1992; Saran y Chaffer, 2000).

Otra prueba de diagnóstico para el conteo de células somáticas de muestras de leche obtenidas del tanque enfriador que nos dan un indicador del grado de mastitis en un hato lechero, es Fossomatic. Las células somáticas están constituidas por la asociación de leucocitos (neutrófilos, linfocitos y macrófagos) y células epiteliales. El recuento de células somáticas (RCS), se mide en miles de células por mL de leche. Para la cuantificación existen métodos ópticos y métodos electrónicos (Blowey y Edmondson, 1995).

2.2.2. Tratamiento de la Mastitis

La mastitis clínica puede variar su presentación desde leve hasta aguda. El 80% de los casos clínicos se presenta en los cuartos donde se albergaron las infecciones subclínicas anteriormente. Aproximadamente el 20% de todas las mastitis clínicas se presentan dentro de los 7 días siguientes al inicio de la lactancia; por esta razón es importante el manejo cuidadoso de las vacas durante este periodo crítico. Los casos clínicos se deben detectar precozmente para iniciar el tratamiento lo antes posible y así incrementar la probabilidades de curación del animal (Blowey y Edmondson, 1995).

Tradicionalmente la mastitis clínica se trata con antimicrobianos, destacando los betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y sulfas entre otros, los cuales se aplican en diversas concentraciones de acuerdo al patógeno específico (Nelson y Nickerson, 2000). De igual forma, para tratar la inflamación de la glándula mamaria se emplean fármacos de rutina que son una solución parcial, pues su amplio uso ha creado un potencial de residuos que originan problemas de salud al consumidor cuando no se consideran los tiempos de retiro del producto y es comercializado para el consumo humano (Pérez *et al.*, 1998).

Es común que el tratamiento falle por su tardanza en la administración o por fallas en las dosis suministradas; en algunos casos la no eficacia del tratamiento se

debe a la resistencia de los microorganismos. Estudios recientes indican que ciertos tipos de antibióticos reducen la capacidad de los leucocitos de destruir los microorganismos causantes de la mastitis, pudiendo propiciar el proceso de infección (Nelson y Nickerson, 2000).

En el uso de alternativas terapéuticas para el control de mastitis se han valorado productos homeopáticos (Cuesta *et al.*, 2002), así como también a base de aceites esenciales obtenidos de plantas, ácidos nucleicos y péptidos de defensa. Estos últimos han cobrado gran interés científico, principalmente por sus propiedades que permiten la eliminación de microorganismos patógenos, reparación del tejido y respuesta inmune (Jensen *et al.*, 2006).

2. 3. Péptidos de defensa del hospedero (PDH)

Los PDH previamente conocidos como péptidos naturales antimicrobianos (PNA) son parte esencial de la Respuesta Inmune Innata (RII) y representan un papel de primera línea de defensa como un escudo de moléculas que limita el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos infecciosos y no infecciosos que conviven diariamente con plantas, insectos, anfibios, reptiles, mamíferos y aves (Broekaert *et al.*, 1995).

En términos generales, los PDH son péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores de 10 kDa) codificados en el genoma, a diferencia de otros antimicrobianos producidos por acción enzimática, como la penicilina. Típicamente, son moléculas catiónicas debido a su alto contenido de lisina y arginina. Son anfipáticas, lo que les concede estabilidad en ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos. Pueden presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación, circularización, amidación de los extremos y modificación de aminoácidos, incluyendo a los D-aminoácidos (Boman, 1995; Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Las dos características comunes en la mayoría de los PDH, sin importar su estructura o tamaño, son la carga positiva debida a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos y segundo, aproximadamente el 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

Los PDH se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales regularmente expuestos al ataque microbiano como la piel, intestino y pulmones. Las células sanguíneas de defensa también son importantes productoras de PDH, donde constituyen parte de los mecanismos efectores no-oxidativo contra patógenos potenciales (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Se sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina y con menor costo metabólico, pueden almacenarse en altas concentraciones, estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan o producen cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Son un medio rápido, no específico para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios (Evans y Harmon, 1995).

2.3.1. Historia

Los indicios de que existían péptidos catiónicos con actividad microbicida se observaron en las plantas. Desde hace unos 50 años se sabe que las tioninas realizan una función antimicrobiana en las plantas e inhiben el crecimiento de bacterias y hongos *in vitro* (Stuart, 1942). En 1972 por primera vez se demostró que las tioninas inhiben el crecimiento de un número considerable de bacterias patógenas sugiriendo por lo tanto que este péptido juega un papel protector importante (Fernández y García, 1972). Los primeros trabajos que se realizaron en el campo de los PDH en animales fueron reportados a principios de los 80's en el laboratorio de Boman y colaboradores. En 1987 Michael Zasloff descubrió que la piel de la rana *Xenopus laevis* contenía glándulas ricas en péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana, mismos que denominó magaininas (Zasloff, 1987).

En la década de 1990, hubo una rápida expansión en el campo del conocimiento de los PDH. Actualmente, además de estar bien establecido que constituyen un elemento común en los Fila inferiores, se han reconocido diversos sitios de producción de estos péptidos en mamíferos (Gallo y Hunter, 1998).

2.3.2. Tipos de PDH

A la fecha se han descrito cerca de 800 PDH provenientes de diversos organismos incluyendo humanos, plantas, invertebrados marinos, anfibios, peces y microorganismos. A pesar de la diversidad de organismos de donde provienen los PDH comparten similitudes funcionales y estructurales que han permitido su clasificación (Tabla 1).

Los PDH son codificados por genes, los cuales después de un proceso de transcripción forman una pre-proteína de 62 a 170 aminoácidos (aa), la cual es procesada y forma un péptido maduro activo (Boman, 1995). La mayoría de las pre-proteínas de los PDH tienen secuencias señales muy conservadas (Boman, 1996). La evolución de los genes para estos péptidos, se ha transferido horizontalmente. Sin embargo, el número de exones e intrones se conserva entre las especies.

PDH de plantas. Al igual que los animales, las plantas producen sustancias que controlan el crecimiento e invasión de microorganismos. Se destacan la tioninas y las defensinas sintetizadas en plantas y flores con actividad contra hongos y bacterias (Broekaert *et al.*, 1995; Evans y Harmon, 1995). Aparentemente la función de los PDH es proteger las semillas durante la germinación, periodo en el que su concentración llega a ser hasta del 30% del total de proteínas liberadas.

PDH de insectos. Al igual que el resto de los invertebrados, los insectos son incapaces de producir anticuerpos específicos. En los insectos los PDH son producidos en el cuerpo graso (equivalente al hígado de vertebrados) y en los hemocitos (Bullet, 1999). Estos péptidos fueron descritos primero en insectos por Boman y Steiner (1981) y son los más estudiados y mejor caracterizados. Entre éstos se encuentran las cecropinas las cuales se caracterizan por tener un alto contenido de prolina y libres de cisteínas, fuertemente catiónicas y activas contra bacterias Gram negativas. Se encuentran ampliamente distribuidas y se han detectado además en varios insectos, vertebrados y en el intestino del puerco (Lee *et al.*, 1989). Las defensinas, también han sido descritas en insectos como péptidos catiónicos, con especificidad contra bacterias Gram positivas. Otros PDH

activos contra bacterias Gram negativas son las apidaecina, abaecina y royalisina de la abeja *Apis mellifera* o drosocina de *Drosophila* (Gillespie *et al.*, 1997).

Con relación a la lisozina, es importante comentar que durante mucho tiempo se pensó que era el principal factor antimicrobiano en los insectos. Aunque por su actividad y tamaño molecular, originalmente se incluyó dentro de los PDH, la lisozima es una enzima que rompe enlaces glicosídicos β -(1,4) de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana y su función puede ser digestiva y antimicrobiana (Hetru *et al.*, 1998). Por tratarse de una enzima con diferente estructura y mecanismo de acción, actualmente la lisozima no se considera dentro de los típicos PDH.

PDH de invertebrados marinos. Al igual que el resto de los invertebrados, los de origen marino carecen de sistema inmune adquirido, pero tienen varios mecanismos de defensa que responden a la presencia de microorganismos. Estos sistemas incluyen la coagulación de la hemolinfa, mecanización, aglutinación celular, fagocitosis, producción de oxígeno activo y liberación de PDH (Vargas y Yepiz, 1998). Actualmente se investigan los PDH en los invertebrados marinos de interés comercial, como crustáceos y moluscos. Diversos PDH se han detectado en las diferentes especies existentes de cangrejo cacerola, entre ellos están taquiplesinas, taquiticina, taquistatina y defensinas que cubren un amplio rango de actividad antimicrobiana (Nakamura *et al.*, 1988; Kawano *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1995; Armstrong *et al.*, 1996; Ehret-Sabatier *et al.*, 1996; Morvan *et al.*, 1997).

Tabla 1. Péptidos Antimicrobianos derivados de plantas, insectos, invertebrados marinos y vertebrados

Fuente	Tipo o composición	Actividad	Referencias
<u>Plantas</u>			
Thioninas	Defensina	Fungicida y bactericida	(Broekaert <i>et al.</i> , 1995)
Heveinas y Knottinas	Defensina	Fungicida y bactericida	
Circulinas A y B	Modificado	Antiviral	(Tam <i>et al.</i> , 1999)
<u>Insectos</u>			
Cecropinas	Hélice-alfa	Bactericida (Gram negativas)	(Boman, 1995)
Defensinas varias	Defensina	Bactericida (Gram positivas)	(Gillespie <i>et al.</i> , 1997)
Apidaecina	Alto contenido de prolina	Bactericida (Gram negativas)	(Hetru <i>et al.</i> , 1998)
Royalisina	Alto contenido de prolina	Bactericida (Gram negativas)	(Hetru <i>et al.</i> , 1998)
Atacinas	Alto contenido de glicina	Bactericida (Gram positivas y Gram negativas)	(Gillespie <i>et al.</i> , 1997; Hetru <i>et al.</i> , 1998)
Drosomicina	Defensina	Fungicida	(Gillespie <i>et al.</i> , 1997; Hetru <i>et al.</i> , 1998)
<u>Invertebrados marinos</u>			
Defensinas varias	Defensina	Bactericida (Gram positivas y Gram negativas)	(Saito <i>et al.</i> , 1995)
Penaeidinas	Defensina?	Bactericida (Gram negativas)	(Destoumieux <i>et al.</i> , 1997)
<u>Vertebrados</u>			
Magaininas	Hélice-alfa	Bactericida (Gram positivas y Gram negativas)	(Schröder, 1999)
α -defensinas	Defensina	Bactericida (Gram positivas y Gram negativas)	(Evans y Harmon, 1995)
β -defensinas	Defensina	Bactericida (Gram positivas y Gram negativas)	(Boman, 2000; Evans y Harmon, 1995)

PDH de vertebrados. Los estudios se iniciaron al observar que animales con heridas en la piel y viviendo en aguas estancadas no presentaban infecciones (Rao, 1995; Boman, 2000). Hoy en día se conocen varios PDH de la piel de diferentes especies de ranas, incluyendo las magaininas, xecropinas y bombininas (Schröder, 1999). Todas con amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos y protozoarios. La piel humana, además de actuar como barrera física protectora, produce una considerable cantidad de PDH, entre los que se encuentran los del tipo cathelicidinas y defensinas, con efectividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y la levadura *Candida albicans* (Gallo y Huttner, 1998; Schröder, 1999).

Otros epitelios que están constantemente en contacto con microorganismos, también expresan defensinas. En el intestino las células de Panneth poseen una flora microbiana específica que rara vez está fuera de control, en éstas se han identificado defensinas- β (de mayor tamaño que las defensinas- α) responsables del control de la flora entérica (Evans y Harmon, 1995; Rao, 1995; Boman, 2000). En los epitelios de la mucosa traqueal, lengua, pulmón, bronquios, colon y recto de bovinos se ha demostrado la presencia de defensinas que *in vitro* son efectivas contra *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *C. albicans* (Evans y Harmon, 1995; Rao, 1995).

Por otra parte, los gránulos de los leucocitos de vertebrados contienen altas concentraciones de defensinas- α capaces de combatir bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos filamentosos, virus y algunas especies de microbacterias. Su importancia se ha demostrado al observar que los pacientes cuyos neutrófilos no producen defensinas, sufren frecuentes infecciones y presentan una respuesta inflamatoria tardía (Evans y Harmon, 1995).

PDH de bacterias. La producción de PDH por bacterias se considera también un mecanismo de defensa, ya que así combaten a otros microorganismos que compiten por nutrientes. Los PDH de origen microbiano generalmente se conocen como bacteriocinas y en su mayoría presentan muchas modificaciones

postraduccionales entre las que se incluye circularización y aminoácidos inusuales como los D-aminoácidos y lantioninas (Ryan *et al.*, 1999).

Las bacterias Gram negativas producen dos tipos de PDH: a) bacteriocinas que pesan alrededor de 20 kDa, como las colicinas producidas por *E. coli*, y b) microcinas menores de 10 kDa, producidas por *Enterobacteriaceae*. Estas últimas son altamente modificadas y presentan tres diferentes mecanismos de acción: inhibición de enzimas metabólicas, inhibición de la replicación del DNA e interferencia en los procesos energéticos (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Ryan *et al.*, 1999).

Las bacterias Gram positivas producen bacteriocinas menores de 6 kDa, usualmente catiónicas, anfifílicas y permeables en membranas, como los PDH de eucariotes. Existen dos grupos de bacteriocinas de bacterias Gram positivas. El primero no presenta modificaciones postraduccionales (pediocina PA1, sakacina P, leucocina A y mesentericina Y105), mientras que el segundo grupo lo conforman bacteriocinas modificadas o lantibióticos. Estos últimos son péptidos menores de 4 kDa con extensas modificaciones postraduccionales incluyendo aminoácidos inusuales, conocidos como lantioninas (3-metilantionina, dehidroalanina y dehidrobutirina), derivados de serina y treonina. Los antibióticos mejor conocidos son nicina, subtilina y epidermina, los cuales presentan actividad contra bacterias Gram positivas, aparentemente a través de la formación de poros en la membrana y provocando la lisis celular (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Ryan *et al.*, 1999).

2.3.3. Clasificación de los PDH

Pese a la diversidad de origen y las modificaciones evolutivas, los PDH han podido ser clasificados basándose en su secuencia y estructura (Hwang, 1990; Boman, 1995). En la actualidad se conocen 5 grupos de PDH que característicamente tienen: 1) hélice- α , 2) alto contenido de cisteína, 3) hojas- β , 4) alto contenido de un aminoácido y 5) aminoácidos modificados. Estos últimos se han descrito en bacterias y hongos.

2.3.3.1. Péptidos hélice- α . A este grupo pertenecen las cecropinas y las magaininas, entre otros. Estos PDH no contienen cisteína, en sistemas acuosos son lineares, pero adoptan una conformación de hélice- α en solventes orgánicos como trifluoroetanol (reproduce las condiciones hidrofóbicas de membrana), lo cual explica su acción a nivel de membrana. La hélice presenta una superficie hidrofóbica y otra altamente positiva que les permite interactuar con los lípidos de las membranas (Hwang, 1990; Boman, 1995; Matsuzaki, 1998).

2.3.3.2. Péptidos ricos en cisteína. A este grupo pertenecen las defensinas, las cuales van de 3 a 5 kDa y se agrupan en varias clases según la localización de los pares de cisteína, estructura tridimensional y similitud de secuencias. Se incluyen las defensinas- α y β de vertebrados y las defensinas de plantas e insectos. Estas últimas son las de mayor tamaño y tienen una estructura hélice- α que no presentan las defensinas de vertebrados. Las defensinas- α fueron detectadas primero en los gránulos de leucocitos y posteriormente en células de Panneth del intestino delgado. Las defensinas- β se expresan en células epiteliales y en leucocitos de algunas especies. En su conjunto, las defensinas son activas contra muchas bacterias, hongos, levaduras y virus envueltos. Se ha demostrado que algunas defensinas también presentan actividad quimotáctica, mitogénica, corticostática y citotóxica (Evans y Harmon, 1995; Yang *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000).

2.3.3.3. Péptidos de hoja- β . Se caracterizan por tener aproximadamente 20 residuos y uno o dos enlaces disulfuro que estabilizan su estructura de hojas- β antiparalelas. A este grupo pertenecen polyphemusina II, y lactoferricina B (Hwang, 1990).

2.3.3.4. PAM con alto contenido de un aminoácido. Tienen una alta concentración relativa de un mismo aminoácido, el cual puede ser triptofano, prolina o histidina como es el caso de las apidaecinas, abaecina, drosocina, protegrinas y cathelicidinas. Su estructura presenta diferentes patrones en soluciones acuosas, pero se vuelven estables en presencia de fosfolípidos (Hwang, 1990; Boman, 1995; Evans y Harmon, 1995).

2.3.3.5. PAM de origen microbiano. Como su nombre lo indica, a este grupo pertenecen los PDH producidos por bacterias y hongos, los cuales característicamente tienen aminoácidos modificados, como se describió anteriormente.

2.3.4. Mecanismo de acción

Los PDH actúan estequiométricamente con actividad fungicida y bactericida (Gram positivas y Gram negativas), pueden eliminar dos o más "intrusos" al mismo tiempo. De manera inducible responden en horas y antes que la respuesta inmune adquirida (RIA) se haya movilizad. No son específicos, ni tienen memoria, no son catalíticos y otorgan economía a la célula al ser moléculas efectoras pequeñas, ya que la mayoría tienen un peso molecular menor a 10 kDa. Los péptidos líticos tienen estructura de hélice y en hoja beta, son anfipáticos, esto es, un lado de la molécula es hidrofílico, mientras que el otro es hidrofóbico; un diseño que implica una interacción específica con la membrana (Boman, 1996 y 2000).

Para llevar a cabo su función microbicida, los PDH utilizan uno de los siguientes mecanismos: a) actuar directamente a nivel de la membrana celular ya sea alterando la permeabilidad o lisándola mediante la formación de canales o poros, como en el caso de los péptidos hélice- α o; b) interferir en la síntesis de enzimas metabólicas ó del DNA, como en el caso de algunos PDH de origen microbiano, cuyo proceso aún no es bien conocido (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

Aunque se desconocen muchos detalles sobre los mecanismos de acción de los PDH hélice- α , como las magaininas, se considera que actúan directamente en la membrana celular y que su secuencia de aminoácidos es importante (Matsuzaki, 1998), ya que si se sustituyen aminoácidos que alteren la polaridad del péptido, su actividad disminuye. Aparentemente no requieren receptores específicos, como se ha demostrado al sustituir aminoácidos por sus correspondientes D-enantiómeros sin alterar su actividad. Esto ha sido reforzado al demostrar, por resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular, que el mecanismo de daño se

inicia por una interacción electrostática. Este comportamiento molecular y su carácter catiónico hacen que los PDH presenten una mayor afinidad por los fosfolípidos ácidos de las bacterias Gram negativas y polisacáridos de las bacterias Gram positivas, que por los fosfolípidos anfipáticos de las membranas de células de mamíferos. Lo anterior permite explicar la falta de citotoxicidad para las células animales y permite proponer a los PDH como agentes terapéuticos altamente específicos (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Matsuzaki, 1998; Shai, 1998).

En general, se ha propuesto que el mecanismo de acción de los PDH está dado por los siguientes pasos:

- 1) La reacción inicia con la unión del PDH y los fosfolípidos ácidos de las membranas microbianas mediante fuerzas electrostáticas. Los monómeros de los péptidos anfipáticos se acomodan en la superficie de la membrana de manera que la carga positiva de los aminoácidos básicos concuerden con las cabezas de fosfolípidos con carga negativa. Cuando la concentración relativa entre el péptido y el lípido localmente es baja el péptido tiende a orientarse paralelamente en la membrana y es inactivo.
- 2) Cuando la concentración local relativa del PDH se incrementa, el péptido tiende a tomar una posición perpendicular a la membrana y se inserta, orientando los residuos hidrofóbicos hacia la región hidrofóbica de la membrana. La capacidad de "aceptación" de la membrana por una mayor cantidad de péptido dependerá de la composición lipídica y propiedades fisicoquímicas de la misma. Esto explica los diferentes grados de susceptibilidad de una célula por un determinado PDH y la especificidad hacia ciertas bacterias.
- 3) Finalmente, la inserción de los péptidos en la bicapa lipídica alteran la permeabilidad de la membrana o bien ocurre la lisis celular por la presencia de los poros (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Matsuzaki, 1998; Shai, 1998; Huang, 2000).

2.3.4.1. Actividad inmunoreguladora

Dentro de las actividades inmunoreguladoras de los PDH, destacan las defensinas, las cuales atraen células inflamatorias como los neutrófilos, linfocitos B y los macrófagos, además de que activan a estas células y a otras como las

células epiteliales. Estas células liberan mediadores de la inflamación como IL-8, IFN- γ , IL-6, IL-10 y LTB4. Además pueden presentar actividad antiinflamatoria por la inducción de IL-10 o SLPI, facilitando y amplificando la subsecuente respuesta inmune.

El reclutamiento de células dendríticas inmaduras por defensinas puede iniciar y facilitar la respuesta de la inmunidad adaptativa, ya que se ha demostrado que las defensinas tienen poder quimiotáctico (Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

2.3.5. Aplicaciones

Por sus características estructurales y funcionales, así como por su baja toxicidad para células eucarióticas, los PDH están siendo evaluados como agentes terapéuticos y profilácticos. Por ejemplo, las magaininas, dermaseptinas y otros PDH aislados de la piel de ranas se están probando como agentes antimicrobianos y aceleradores de la cicatrización debido a que algunos PDH como las β -defensinas estimulan la producción de las células epiteliales (Gallo *et al.*, 1998; Schröder, 1999; Rivas-Santiago *et al.*, 2006). Por otro lado, se han observado que células cancerígenas presentan alteraciones en la composición lipídica de la membrana haciéndola más ácida que las de células normales. Bajo este principio, los PDH también se están evaluando como agentes anticancerígenos (Shai, 1998).

Aunado a lo anterior, se ha detectado que los PDH como las retrociclinas (un tipo de β -defensinas) se unen a las proteínas gp120, CD4, CXCR4 y CCR5, para bloquear la entrada del virus VIH-1 a la célula y lo eliminan (Jenssen *et al.*, 2006). Sin embargo, todavía falta aclarar si esto ocurre *in vivo*, y de ser así que elementos permiten que se lleve a cabo la infección pues podría ser que algunos individuos resistentes a la infección tengan todo este mecanismo antiretroviral bien montado, a diferencia de los más susceptibles (Rivas-Santiago *et al.*, 2006).

Debido al potencial que los PDH tienen como agentes terapéuticos, se están diseñando péptidos de *novo* basados en las características de los péptidos naturales, tales como su estructura tridimensional, su tendencia anfipática y carácter catiónico. Aunque la técnica de producción de péptidos es aún nueva,

promete importantes logros en un futuro cercano en el diseño de péptidos más eficientes o que sean estables en diferentes ambientes. Tal es el caso de las defensinas circulares, las cuales son más estables a los cambios de salinidad, y se ha propuesto su aplicación en pacientes con fibrosis cística (Yu *et al.*, 2000). Por otra parte el antibiótico Nisina, péptido producido por varias cepas de lactococos (*Lactococcus lactis*) ha demostrado eficiencia como conservador de alimentos en la industria láctea (Rao, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Otros estudios han permitido evaluar este producto como tratamiento para mastitis subclínica en vacas en lactancia, dosis de 2,500 U.I. aplicada durante tres días vía intramamaria. Los resultados mostraron reducción en la cuenta microbiana del 90.1% para *Streptococcus agalactiae*, 50% *Staphylococcus aureus* y 58.8% *Staphylococcus coagulasa negativa* (Wu *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista bioquímico, los PDH son interesantes modelos para el estudio del mecanismo de incorporación de D-aminoácidos y la modificación post-traducciona l de los aminoácidos (Ryan *et al.*, 1999). Para la Biotecnología Vegetal se abre la posibilidad de diseñar plantas transgénicas resistentes a enfermedades y a plagas a través de la introducción de genes de PDH (Broekaert *et al.*, 1995). Esto mismo crea expectativas para introducir genes de defensa a organismos cultivables, incluyendo a los invertebrados marinos de interés comercial, principalmente moluscos y crustáceos (Bachere *et al.*, 1995). Por último, estudios comparativos sobre la actividad de los PDH en varias especies podrían ayudar a comprender por qué algunos organismos que son comensales en una especie pueden ser patógenos para otra.

Los estudios sobre los constituyentes y los mecanismos de este ancestral sistema de defensa han ayudado a comprender las estrategias de sobrevivida ante microorganismos y han abierto perspectivas en la concepción de tratamientos terapéuticos contra infecciones. Debido a la aparición de cepas resistentes, muchos antibióticos comerciales ya no son efectivos. Por ello, una solución prometedora es la producción de nuevos antibióticos lo más diferentes posibles a aquellos que han perdido efectividad y cuya resistencia no parece ser fácil de alcanzar, ya que no solamente depende de la neutralización de un agente químico, sino de la alteración de la membrana celular.

3. HIPÓTESIS

Los péptidos de defensa del hospedero contenidos en el extracto de la piel de *Rana catesbeiana*, son capaces de aminorar la mastitis clínica en bovinos mediante la reducción de la cuenta microbiana y la reparación del daño tisular alveolar.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el extracto de piel de *Rana catesbeiana*, como tratamiento alternativo en bovinos con mastitis clínica.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar la acción antimicrobiana del extracto de piel de *Rana catesbeiana* contra *Escherichia coli* (prueba *in vitro*).
2. Estudiar el efecto histopatológico *in situ* que ocasiona *Escherichia coli* en la glándula mamaria cuando actúa solo o en presencia de extracto de piel de *Rana catesbeiana*.
3. Evaluar la aplicación terapéutica del extracto de piel de rana en vacas con mastitis clínica (prueba *in vivo*).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara. La prueba de campo se desarrolló en el rancho "Dos Pivotes", localizado en el Km 7 camino Mezquitera a Atequizayan, dentro del municipio de Ciudad Guzmán y en el Rancho "Los Eucaliptos" en el Km. 10 carretera Acatlán de Juárez, Jalisco.

5.1. Obtención del extracto de piel de rana

Se obtuvieron pieles de *Rana catesbeiana* suficientes para realizar las tres etapas del estudio. El procedimiento de extracción se describe a partir de dos pieles de *Rana catesbeiana* registrando el peso. Se realizaron cortes pequeños de 1 cm por lado, se colocaron en mortero, se agregó nitrógeno líquido hasta endurecer el tejido. Se introdujo en la licuadora especial con aspas de acero inoxidable y se trituró para obtener un polvo de toda la piel de la rana.

Para el proceso de lisis celular, se pesaron 40 g de piel y se agregaron 400 mL de acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua bidestilada a una relación de 60:1:39 respectivamente. Una vez homogenizado en licuadora se colocó en matraz Erlenmeyer y se mantuvo toda la noche a 4°C en un agitador magnético. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm manteniéndose a 4°C durante 30 minutos, y el sobrenadante fue liofilizado.

Se resuspendió el liofilizado en solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.2 estéril, esta solución se preparó de la siguiente manera: 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl) y 1.44 g de fosfato de potasio (KH₂PO₄) fueron disueltos en 800 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.2 con Tris 1M y se aforó a un litro. A su vez la solución Tris 1M se preparó disolviendo 6.057 g en 50 mL, y se llevó a pH 8 con ácido clorhídrico (HCl) al 1N.

Posteriormente se tomaron 16 g del liofilizado y se llevaron a un litro del PBS pH 7.2 estéril, se agregó 1% de la mezcla de Sorbato de potasio y Benzoato de sodio (0.5% cada uno) como conservadores, se mezcló y homogenizó, posteriormente se esterilizó todo con un filtro de 0.22 μ m, en el tanque de acero inoxidable de 5.0 L (Millipore) con presión positiva. Se prepararon jeringas estériles las cuales fueron llenadas con el extracto de piel de rana en la campana de flujo laminar para las pruebas *in situ* e *in vivo*.

5.2. Prueba antimicrobiana *in vitro*

A partir de un cultivo bacteriológico de *Escherichia coli* se preparó el inóculo para la prueba. Se obtuvo una porción de bacterias mediante asa bacteriológica y se colocó en un tubo de precipitado conteniendo caldo de soya para dejar incubar durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se procedió a realizar una dilución 1/10 (4.5 mL de caldo de soya con 0.5 mL del cultivo previamente incubado). De la dilución se transfirió 1 mL a tubos eppendorf para leer la absorbancia en un Espectrofotómetro (Marca Jenway 6305).

Una vez determinada la absorbancia del cultivo, se procedió a calcular la concentración de bacterias por mL, utilizando un valor de referencia para *E. coli* de 4,422 millones de UFC, constante que aplica por cada 0.5 de absorbancia. Posteriormente mediante diluciones se obtuvo un inóculo de 1×10^6 , para proceder a incubar el cultivo bacteriano con el extracto de piel de rana a diferentes concentraciones (0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100%) en pocillos de cultivos celulares durante 2 horas a 37°C, posteriormente mediante plaqueo se transfirieron 100 microlitros (0.1 mL) de dichos pocillos al medio de agar Muller Hinton con 10 μ L del inóculo de *E. coli*. y nuevamente fueron incubados por 2 horas de 37°C y se dejaron 12 horas a temperatura ambiente para proceder a la lectura del número de unidades formadoras de colonias (UFC), se realizaron dos repeticiones por dilución.

5.3. Desafío *in situ* de *Escherichia coli* al extracto de la piel de rana (EPRC) en glándula mamaria

Se seleccionó una vaca Holstein de desecho (6 años de edad) sin que mostrara alteraciones patológicas en glándula mamaria, lo cual fue confirmado por la prueba de prueba de mastitis California (PMC). Dos cuartos de la glándula mamaria fueron expuesto a un inóculo bacteriano de *Escherichia coli* (400 UFC), dejando un cuarto como control (delantero izquierdo) y otro cuarto para aplicar el extracto de la piel de rana, considerado testigo del tratamiento (cuarto delantero derecho). Doce horas pos-inoculación de la bacteria se inspeccionaron los cuartos y se apreció el cuadro de mastitis clínica, confirmándose mediante la prueba PMC. Posteriormente se hicieron las aplicaciones del extracto de piel de rana a la concentración de 0.8 mg en PBS (10 ml) en uno de los cuartos inoculados con *E. coli* (cuarto trasero derecho), repitiendo las aplicaciones cada 12 horas por 5 días. Se dejó el segundo cuarto afectado sin tratar (cuarto trasero izquierdo). De la misma manera en que se aplicó el EPRC en el cuarto con mastitis clínica se procedió con el cuarto testigo. Al término de la prueba se sacrificó la vaca y se diseccionó la glándula mamaria para trasladarla en formol al 10% para el estudio histopatológico.

5.3.1. Estudio Histopatológico

La evaluación histológica se realizó en el Laboratorio de Morfofisiología del Departamento de Medicina Veterinaria, CUCBA. Para analizar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el tejido glandular, se tomaron muestras representativas por triplicado de aproximadamente 1 cm³ de cada uno de los cuartos de la glándula mamaria que se fijaron por inmersión en formalina estabilizada (AFIP, 1995). Los segmentos se procesaron mediante la técnica histológica de rutina: deshidratación en series crecientes de etanol 70, 80, 90, 96 y 100%, alcohol absoluto-xilol, xilol, infiltración en parafina, inclusión en parafina (Procesador de tejidos Microm STP 120). Se obtuvieron cortes (micrótomos Reichert) con un espesor de 3-5 µm que se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (AFIP, 1995). La evaluación histopatológica se realizó

en tres cortes por laminilla y por muestra. Los tejidos se analizaron con un microscopio de luz (Leica) con los objetivos 10X y 40X.

5.4. Prueba preliminar *in vivo* de la aplicación terapéutica del extracto de piel de rana en vacas con mastitis clínica.

5.4.1. Determinación de la dosis efectiva

Se seleccionaron vacas de la raza Holstein de segundo parto y de mediana producción de leche, (16-24 L) procedentes de los establos "Dos pivotes" de Ciudad Guzmán y "Los Eucaliptos" de Acatlán de Juárez, municipios del estado de Jalisco. Las vacas fueron evaluadas mediante la prueba PMC para ser categorizadas de acuerdo al grado de mastitis que presentaron (Tabla 2).

La nomenclatura que se designa a los diferentes grados de mastitis calificados por medio de la prueba de PMC, se describe como: N0 se considera negativa (código 1), si fuera positiva a mastitis subclínica, corresponden a las denominaciones N1, N2 y N3 sucesivamente (códigos 2, 3 y 4), lo cual corresponde al nivel de aglutinación. Al presentarse mastitis de tipo clínica, se subdividen en leve (L), moderada (M) y severa (S) que corresponde a los códigos 5, 6 y 7 respectivamente.

Tabla 2. Codificación de las categorías de Mastitis

Diagnóstico de Mastitis		Codificación
N0	Ausencia de mastitis	1
N1	Subclínica tipo 1	2
N2	Subclínica tipo 2	3
N3	Subclínica tipo 3	4
L	Clínica leve	5
M	Clínica moderada	6
S	Clínica severa	7

Las vacas clasificadas dentro del grado clínico leve, moderado y severo fueron separadas para aplicar vía intramamaria el extracto de piel de *Rana catesbeiana* a diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/10 mL) durante cinco días consecutivos. Por cada concentración se tuvieron tres repeticiones. Previo a la aplicación se procedió a realizar un cultivo bacteriológico del o de los cuartos dañados, así como posterior al tratamiento.

5.4.2. Evaluación de la dosis efectiva en vacas con mastitis clínica

Se seleccionaron 15 vacas con mastitis clínica (2: leve, 10: moderada y 3: severa). Una vez identificados los cuartos de la ubre afectados se procedió a obtener muestra de leche para realizar el análisis bacteriológico de género y especie bajo la técnica BBL Crystal.

Una vez categorizadas las vacas de acuerdo al tipo de mastitis clínica, se les aplicó vía intramamaria el extracto de piel de rana en la dosis efectiva previamente seleccionada (0.8 mg/10 mL). Para este propósito se utilizó como vehículo 10 mL de solución PBS a pH 7.2 y se realizaron 10 aplicaciones cada 12 horas (5 días consecutivos). Para determinar la efectividad del tratamiento a las 24 horas posteriores a la última aplicación se realizó nuevamente la prueba de PMC y el análisis bacteriológico de la leche.

5.4.2.1. Análisis bacteriológico. Prueba BBL Crystal

Se inoculó la muestra problema en una caja de Petri con agar sangre, utilizando un hisopo de algodón estéril mediante estrías para obtener las colonias bacterianas. Se procedió a incubar a 35°C de 24 a 48 horas, posteriormente se realizó un frotis del microorganismo aislado y se hizo una tinción de Gram. La presencia de bacterias Gram positivas fue identificada utilizando el equipo BBL Cristal (RGP ID) y para las bacterias Gram negativas se realizó las pruebas de indol y oxidasa a partir de placas de aislamiento no selectivo de no más de 24 horas. Se utilizó el equipo BBL Crystal E/NF entéricos no fermentadores.

A partir de la suspensión de colonias del tubo de fluido obtenido del inóculo previamente agitado en un Vortex durante 10 segundos, se colocó el contenido en la base con pocillos rotulada con el número de la muestra, la cual balanceándola suavemente permitió el llenado de los pocillos. Se ajustó la tapa y se llevó a la incubadora sin CO₂ con 40-60% de humedad relativa, dejando en incubación durante 18 a 20 horas a 35-37°C. Después de dicho periodo se procedió a la lectura e interpretación de los resultados, en base a los patrones de la reacción bioquímica y enzimática de los diferentes substratos para una amplia variedad de microorganismos almacenados en una base de datos.

Prueba de inóculo puro: Para determinar la pureza del inóculo, se extrae una pequeña gota del tubo de fluido de inóculo con un alambre estéril, antes o después de inocular la base, y se inócula un tubo de agar inclinado o una placa (cualquier medio de cultivo apropiado). Se desecha el tubo del fluido de inóculo con su tapón en el recipiente para desechos biopeligrosos. Se incuba el tubo de agar inclinado o placa durante 24-48 horas a una temperatura de 35-37 °C bajo condiciones adecuadas. Este cultivo también puede utilizarse para cualquier prueba suplementaria o en serología, si fuese necesario.

Financiamiento del estudio

El presente trabajo fue financiado por el proyecto "Última ronda de prototipos y pruebas finales para la producción de Péptidos Naturales Antimicrobianos de la piel de *Rana catesbeiana*, para su aplicación como nuevos antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas y micóticas" "Clave C2005 86 de CONACYT, responsable Técnico del Proyecto el Dr. Alfonso Islas Rodríguez.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Prueba antimicrobiana *in vitro*

Para analizar los resultados de la prueba antimicrobiana fue necesario aplicar la prueba de t Student para comparar de manera independiente cada tratamiento con el grupo control y entre los diferentes tratamientos (1.56%, 3.12%, 6.25%, 12.50%, 25%, 50%, 100%), ya que se observó un comportamiento irregular.

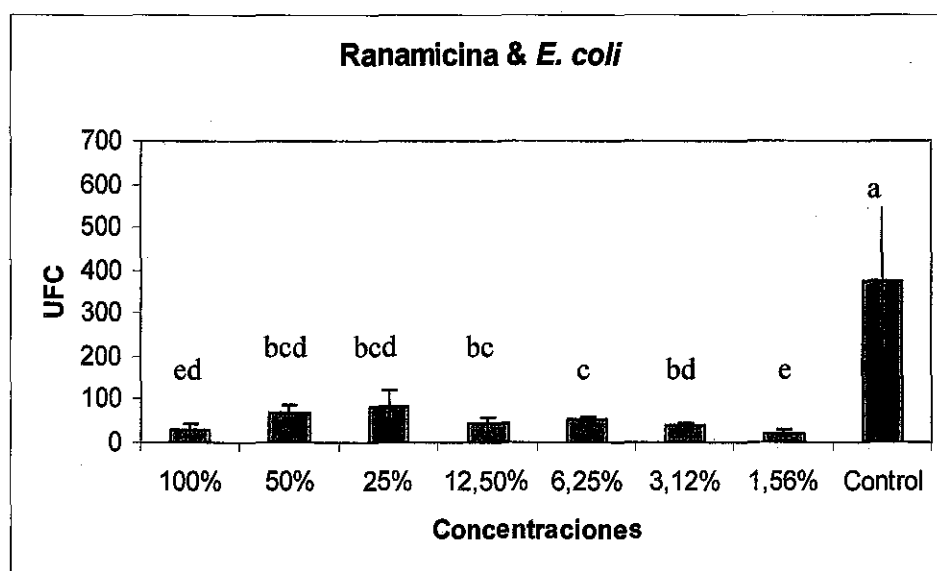


Figura 1. Prueba antimicrobiana *in vitro* de extracto de piel de *Rana catesbeiana*

Los resultados observados durante la prueba antimicrobiana mostraron una reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) en todos los tratamientos respecto al control, lo cual indicó un efecto inhibitorio de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento de la bacteria *E. coli*, sin embargo el comportamiento de los tratamientos mostró inconsistencia difícil de explicar, ya que la cuenta de UFC fue similar estadísticamente entre la menor y mayor concentración del extracto de la piel de rana, mientras que entre los tratamientos que presentaron las concentraciones de 3.12% y 6.25% fueron similares a los tratamientos con mayor nivel del extracto 25% y 50%. Por lo tanto se recomienda realizar la purificación y caracterización del extracto de la piel de rana y que dichas fracciones sean evaluadas de manera independiente, ya que la presencia

de otros compuestos como el colágeno pudieron influir en la respuesta antimicrobiana. El colágeno parece ser el principal determinante de las acciones biomecánicas de la piel de la rana, y juntos con la elastina, representan los principales componentes de la piel. La epidermis consta de 6 a 7 capas celulares, responsables de la producción de queratina y de mucosidades, ambos presentes a su vez en el extracto de la piel de la rana (Parakkal y Matoltsy, 1964; Schwinger *et al.*, 2001). Puesto que la prueba antimicrobiana se realizó con extracto de la piel de rana sin purificar, es posible que el comportamiento irregular de las concentraciones sobre *E. coli* se deba a la presencia de los componentes de la piel, particularmente colágeno y elastina, los cuales son proteínas fibrosas consideradas estructuras de resistencia. El colágeno esta formado por aminoácidos, principalmente glicina, prolina e hidroxiprolina poco frecuentes en otra proteína. La elastina contrario al colágeno esta compuesta por aminoácidos hidropónicos no polares y es la única que contiene desmosina e isodesmosina que actúan como enlaces cruzados, demás de ser rica en prolina y glicina (Mithieux y Weiss, 2005). Es difícil hasta el momento predecir cual o cuales componentes pudieron interferir durante la prueba antimicrobiana, la cual deberá aclararse en futuras investigaciones.

6.2. Desafío *in situ* de *E.coli* al extracto de la piel de rana (EPRC) en glándula mamaria

Se ha documentado ampliamente que la citoarquitectura de la glándula mamaria esta conformada por dos estructuras principales, que son, el parénquima y el estroma. El parénquima consiste en tejido secretorio y está constituido por tejido epitelial túbulo-alveolar, mientras que el estroma está compuesto por otros tejidos complementarios como los sistemas vasculares sanguíneos y linfáticos, y los tejidos adiposo, conjuntivo y nervioso, los cuales bajo condiciones normales mantienen una distribución uniforme, además de contener el número de células secretorias con capacidad para la producción de leche (Lévesque, 2004).

Durante la prueba del desafío de la glándula mamaria con *E. coli*, se observaron diversos grados de lesiones en las zonas evaluadas, para los tejidos procedentes del cuarto delantero izquierdo, los principales daños fueron necrosis e infiltración

discreta y fibrosis incipiente (Figura 2, tabla 3). Al analizar el tejido del cuarto trasero derecho, se encontraron necrosis y fibrosis discreto (Figura 3).



Figura 2. Fotomicrografía de tejido glandular del cuarto delantero izquierdo (control). Se identifican alvéolos amorfos y distendidos (a), necrosis (n) y presencia de cuerpos amiláceos (ca). Objetivo 10 X. Tinción HE.



Figura 3. Tejido de cuarto trasero derecho (*E. coli* + tratamiento con EPCR). Alvéolos (a) menos distendidos, fibrosis moderada (f) e infiltración linfocitaria y necrosis (n). Objetivo 10X. Tinción HE.

Al analizar la laminilla que se obtuvo del cuarto trasero izquierdo (inoculado con *E.coli* sin tratar), se observaron alteraciones importantes. Los alvéolos se encontraron contraídos, rodeados de tejido fibrótico y con necrosis moderada e infiltración linfocitaria severa (Figura 4).



Figura 4 Fotomicrografía de una zona del cuarto trasero izquierdo (*E. coli* sin tratamiento). Se identifican fibrosis severa (f), alvéolos comprimidos (a) y presencia de corpora amilacea (ca). Hematoxilina y Eosina. Objetivo 10X.

Tabla 3. Resumen de los principales hallazgos histopatológicos en el tejido glandular expuesto a *E. coli* tratado y sin tratar con extracto de piel de *Rana catesbeiana* (EPRC)

Muestra	n	Aspecto de lobulillos	Fibrosis	Infiltración células inflamatorias	Necrosis	Corpora amilácea en espacio alveolar	Hiperplasia de epitelio alveolar
Cuarto delantero izquierdo (control)	6	Amorfos, distendidos	1	2	2	2	1
Cuarto delantero derecho (testigo tratamiento)	6	Amorfos, distendidos	1	3	3	1	1
Cuarto trasero izquierdo (E. coli sin tratamiento)	6	Circulares u ovals contraídos	3	4	3	1	1
Cuarto trasero Derecho (E.coli + tratamiento con EPRC)	6	Circulares u ovals contraídos	2	4	2	2	2

Escala: 1 incipiente, 2 discreto, 3 moderado, 4 severo.

Las alteraciones observadas en los cuartos traseros (inoculados con *E coli*), permiten suponer que el tratamiento aplicado no pudo revertir los cambios ocasionados por la bacteria *E. coli*, si bien la prueba de PMC permitió observar la reducción de los niveles de mastitis en el cuarto tratado con el extracto de piel de *Rana catesbeiana*, todos los cuartos mostraron necrosis en grado leve, lo cual puede ser atribuido a la edad del animal (6 años) y por el número de lactancia (cuarta).

Se ha reportado que durante el periodo productivo de vacas lecheras pueden presentarse variaciones en la lactación que modifican la citoarquitectura de los tejidos de la glándula mamaria (Holmes y Wilson, 1989). Dichas variaciones pueden ser atribuidas al ciclo de producción de leche, ya que la vaca puede llevar a cabo de 6 a 7 años ciclos considerados redituables. Cada ciclo productivo a su vez se subdivide, primero en la producción de calostro, ascendencia gradual de la producción de leche con duración aproximada de 8 semanas hasta llegar al pico de producción y mantenerse de 3 a 6 meses previos al secado de la vaca que dura 2 meses previo al parto. El período de reposo (secado) de la ubre debe ser realizado apropiadamente para reducir los efectos que pudieran afectar el siguiente ciclo productivo (Robinson, 1987).

Por otra parte, existen patologías que transcurren durante la vida productiva de la vaca, como la mastitis, padecimiento que se presenta con alta incidencia en los establos lecheros (Nelson y Nickerson, 2000), este trastorno se caracteriza por la proliferación de microorganismos contagiosos como *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, así como por otras bacterias ambientales (estreptococos y coliformes) y oportunistas (Phillips, 1998). La inflamación aguda en los conductos galactóferos y en los alvéolos de la glándula mamaria por efecto de la infección bacteriana puede ocasionar el desarrollo de fibrosis, tejido que puede progresar según las presentaciones consecutivas de las mastitis clínica o subclínica a lo largo de su vida productiva dejando tejido cicatrizal, o bien por el manejo inapropiado durante la ordeña (Blowey y Edmondson, 1995). Se debe destacar las lesiones en la ubre ocasionadas en el manejo, entre estas, fricciones en los corrales así como por fallas del equipo de ordeño (Nelson y Nickerson, 1992).

6.3. Prueba preliminar *in vivo* de la aplicación terapéutica del extracto de piel de rana en vacas con mastitis clínica

La presencia de la mastitis clínica en sus diferentes presentaciones de leve, moderada y severa se definieron por la manifestación clínica al inicio y término del tratamiento y su valoración fue de igual forma mediante la prueba de mastitis California (PMC) de acuerdo a la presencia del nivel de infección de la glándula mamaria y por el número de células somáticas. La determinación de la dosis efectiva del extracto de piel de rana realizado en vacas con mastitis leve, moderada y severa durante la prueba preliminar permitió identificar a la concentración 0.8 mg por 10 mL de PBS como la dosis efectiva que permitió la recuperación del cuarto clínico en menor tiempo, y con el menor grado de la prueba de PMC.

La tabla 4 permite observar la evaluación de la dosis efectiva realizada en vacas seleccionadas con mastitis clínica (leve, moderada y severa), encontrándose eficiencia estadísticamente significativa por efecto del tratamiento con extracto de piel de rana ($p < 0.05$) particularmente en vacas que mostraron un cuadro clínico moderado y severo destacando una disminución hasta de 6 niveles en la clasificación del tipo de mastitis, sin embargo, el mayor número de observaciones correspondió a vacas con mastitis tipo moderada y la reducción fluctuó de 2 a 5 niveles en el código descrito. Es importante mencionar que el número reducido de observaciones por tipo de mastitis pudiera influir en las interpretaciones, por lo tanto en futuras investigaciones se recomienda tener un mayor número de vacas con los diferentes tipos de mastitis y ser clasificadas previamente por el tipo de microorganismo aislado.

Respecto a los hallazgos bacterianos antes y después del tratamiento con el extracto de piel de rana se observó crecimiento predominante antes del tratamiento de especies como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis*, particularmente en vacas con mastitis de tipo moderado y en menor proporción *Serratia marcescens*, *S. haemoliticus*, *Enterococcus faecium*. Mientras que en las vacas con mastitis de tipo severo se presentaron las especies

Citrobacter koseri, *Brevibacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, en tanto que en vacas con mastitis leve se encontraron *Streptococcus milleri* y *Streptococcus anginosus*.

Posterior al tratamiento con extracto de piel de *Rana catesbeina* se observó crecimiento bacteriano de otras especies, tales como *Brevibacillus brevis*, *Gemella morbillorum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Lactococcus lactis*, *Kytococcus sedentario* y *Kokuria kristinae*. Se debe destacar que en el 50% de las vacas con mastitis de tipo moderado con infección bacteriana, después de aplicar el extracto de piel de rana (EPRC) no presentaron crecimiento bacteriano.

Las bacterias aisladas pertenecen al grupo de ambientales, excepto por *Staphylococcus aureus*, por lo que es común su presentación ya que son microorganismos presentes en los alimentos, agua, personas y animales (Davis Bernard *et al.*, 1978) Los microorganismos causantes de mastitis de tipo ambiental pueden agruparse en dos grandes categorías: los estreptococos, a excepción de *Streptococcus agalactiae* y las bacterias gram-negativas, principalmente coliformes (Phillips, 1998).

Respecto a la presentación de bacterias ambientales destaca el aislamiento de *Escherichia coli* en el 20% de las vacas que presentaron mastitis clínica moderada (código 6), observándose reducción en el nivel de mastitis al término del tratamiento, pasando en 2 casos al grado de mastitis subclínica y en todas las vacas ya no fue aislada *E. coli*. Posterior al tratamiento con EPRC no se observó crecimiento bacteriano en 2 casos y en una vaca fue aislada *Gemella morbillorum*, bacteria tipo ambiental, la cual es un coco gram positivo, aislado con frecuencia de la cavidad orofaríngea, tubo digestivo, tracto genitourinario y ocasionalmente responsable de infecciones en tejidos blandos (Pérez *et al.*, 2004).

Tabla 4. Grado de Mastitis y principales bacterias aisladas antes y después del tratamiento con extracto de piel de *Rana catesbeiana*

No. de vaca	Establo	Código (mastitis)	Bacteria Aislada	Código (mastitis)	Bacteria aislada
589	2	6	<i>Streptococcus uberis</i>	3	Sin crecimiento
563	2	6	<i>Streptococcus uberis</i>	5	<i>Brevibacillus brevis</i>
611	2	6	<i>Serratia marcescens</i>	3	Sin crecimiento
561	2	6	<i>Escherichia coli</i>	2	Sin crecimiento
572	2	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	<i>Gemella morbillorum</i>
175	2	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	Sin crecimiento
1274	1	7	<i>Citrobacter koseri</i>	1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
1358	1	5	<i>Streptococcus anginosus</i>	5	<i>Lactococcus lactis</i>
41	1	7	<i>Brevibacillus brevis</i>	2	<i>Kytococcus sedentarius</i>
1370	1	7	<i>Lactococcus lactis</i>	4	<i>Streptococcus milleri group</i>
962	1	5	<i>Streptococcus milleri group</i>	3	<i>Lactococcus lactis</i>
789	1	6	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	Sin crecimiento
1296	1	6	<i>Escherichia coli</i>	3	<i>Gemella morbillorum</i>
985	1	6	<i>Enterococcus faecium</i>	5	<i>Kocuria kristinae</i>
1049	1	6	<i>Escherichia coli</i>	5	Sin Crecimiento

E. coli es quizás el microorganismo procariote más estudiado, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en el intestino de animales y por ende en aguas negras. Alimentos asociados con esta bacteria son carne, leche, lechuga, jugos y todo aquel que se encuentre contaminado con materia fecal (Robinson, 1987). *E. coli* como causante de mastitis, es una bacteria que produce toxinas que se liberan cuando la bacteria muere, causando un movimiento rápido de células somáticas hacia la leche. Una de las razones de la mayor incidencia de mastitis tipo coliforme severa al principio de la lactación, puede ser por la baja tasa con que los neutrófilos ingresan a la ubre en ese momento, cuando la glándula mamaria está inmunológicamente comprometida por el estrés propio del parto (Varman y Sutherland, 1994; Nelson y Nickerson, 2000).

Durante la prueba *in vivo* *Staphylococcus aureus*, se presentó en 13.3% de las vacas con mastitis clínica moderada (código 6) y se observó reducción en el nivel de mastitis al término del tratamiento en dichos animales, pasando al grado de mastitis subclínica, reportándose sin crecimiento en uno de los casos y en otro el aislamiento de la bacteria *Gemella morbillorum*, bacteria ambiental y oportunista. *S. aureus* es considerada una bacteria contagiosa patógena, ya que libera toxinas que afectan los tejidos que recubren las cisternas del pezón y de la glándula, luego migra al sistema de conductos y forman nichos en los tejidos secretores. Este proceso es seguido por formación de abscesos y tejido cicatrizal que envuelve a las bacterias como mecanismo de defensa del organismo para mantenerlas aisladas, por otro lado, la formación de tejido cicatrizal tiene como consecuencia una baja respuesta a los antibióticos (Holmes y Wilson, 1989).

Durante una afección crónica con *Staphylococcus aureus*, el daño provocado al tejido puede ser muy variable e involucrar solo pequeñas áreas de la glándula, pero estas células se vuelven improductivas o bien producen cantidades mínimas de leche. Las células secretoras de leche se degeneran y junto con los leucocitos ocluyen los conductos galactóferos que tienen la función de drenar la glándula, lo que conduce a una involución de los alvéolos que aún siguen siendo funcionales y a la formación de tejido cicatrizal. A medida que los nichos de infección aumentan en tamaño y número, más tejido secretor es reemplazado por tejido cicatrizal perdiendo su funcionalidad. (Nelson y Nickerson, 2000). La presencia de esta

bacteria en animales tiene como consecuencia la contaminación de los alimentos, principalmente de leche obtenida de animales con mastitis. La toxina que produce es resistente a la temperatura y puede estar asociada a otros alimentos como carnes, huevo y derivados (Frazier *et al.*, 1978).

Streptococcus uberis se encontró en el 13.3% de las vacas evaluadas con mastitis clínica moderada y redujó esta presentación después del tratamiento sin que se aislara otra bacteria, en uno de los casos observados. En otro caso donde fue aislado *S. uberis* previo al tratamiento con el EPRC, la reducción del cuadro clínico solo disminuyó al nivel 5 (mastitis clínica leve), posteriormente fue aislada la bacteria *Brevibacillus brevis*. *S. uberis* es considerado un patógeno ambiental que se encuentra en las camas de los echaderos, corrales cerrados o abiertos, en lugares donde hay agua estancada y tierra. Puede encontrarse también en la piel de la vaca (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores. Esta bacteria es transferida desde el medio ambiente al pezón entre los ordeños, pero algunas transferencias pueden tener lugar durante el ordeño. Es una bacteria que no puede ser eliminada del hato debido a que son parte normal del medio ambiente. Además es responsable de la mayoría de las mastitis que se presentan al comienzo o al final del periodo seco (Robinson, 1987). Por otra parte *B. brevis* es una bacteria cuyo hábitat es el suelo y se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente pudiendo llegar a la leche y productos lácteos por vías como el aire, agua, forraje, y alimento. Dentro de los bacilos, este microorganismo es de los más frecuentes en la leche, provocando viscosidad por lo que se le ha considerado como responsable de la coagulación "en dulce" de la leche. Además este bacilo es común en las mastitis y se ha encontrado en heridas y abscesos, sin embargo puede ocasionar mastitis cuando se utilizan cánulas o reflujos durante el ordeño para ingresar a la ubre (Nelson y Nickerson, 2000).

Serratia marcescens se presentó en un solo caso de mastitis clínica moderada (6.67%) durante la prueba *in vivo*, después del tratamiento se observó mastitis subclínica sin crecimiento bacteriano. *S. marcescens* es un bacilo gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, que causa mastitis tanto en vacas secas como lactantes, es de origen ambiental y se le ha aislado del suelo, agua, forrajes y pasto. Las infecciones pueden volverse crónicas y persisten por varias lactancias,

no responden bien a los tratamientos con antibióticos y las infecciones son más comunes durante el periodo de secado que durante la lactancia (Lévesque, 2004; Nelson y Nickerson, 2000). *S. marcescens* también se encuentra en alimentos y muestras clínicas, es un patógeno oportunista que causa importantes infecciones de origen nosocomial, es decir infecciones adquiridas dentro de los hospitales y representa un problema de salud pública (Joklik, *et al.*, 1980).

Otras bacterias aisladas previo al tratamiento con extracto de piel de rana y que se encontraron solo en una vaca fueron *Citrobacter koseri*, *Streptococcus anginosus*, *Brevibacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus milleri group*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Enterococcus faecium*.

Citrobacter koseri se destaca por que puede ser aislada en aguas residuales, suelos y alimentos, así como de las heces del hombre y otros animales, donde pueden ser flora normal. Es un patógeno oportunista en organismos inmunocomprometidos y encontrarse en la orina, esputo y otras muestras clínicas. Es un microorganismo ambiental que se encuentra ampliamente difundido en el entorno a la vaca (Blowey y Edmondson, 1995). Este microorganismo fue aislado de una vaca que presentó el nivel de mastitis clínica severa y redujo a nivel de mastitis subclínica, sin embargo, solo fue observado en un solo animal de manera similar que en otros casos. Posteriormente fue aislada la bacteria *Staphylococcus saprophyticus*, bacteria coagulasa negativa (ECN), coco gram positivo, anaerobio facultativo, y que coloniza la piel del perineo y el recto y que posiblemente contaminó la muestra de leche en el cuarto evaluado.

Streptococcus anginosus es un microorganismo que forma parte de la flora residente de la oronasofaringe, surcos gingivales y tracto gastrointestinal, donde pueden migrar y causar diferentes infecciones piógenas, caracterizadas por ser invasivas. En casos de mastitis pueden ocasionar infecciones piógenas (Cárdenas, 2008). Durante la prueba *in vivo* la vaca donde fue aislada esta bacteria se presentó previo al tratamiento mastitis clínica leve, quedando con el mismo nivel y con el aislamiento posterior de *Lactococcus lactis*, bacteria no esporulante gram positiva utilizada extensamente en la industria láctea, en especial para la elaboración de quesos por su producción de bacteriocinas.

Además se considera como una bacteria termodúrica, por lo que se puede transmitir a vacas en equipos mal lavados, donde la bacteria espera una oportunidad o errores en la rutina de ordeño para ser introducida a la glándula (Robinson, 1987).

Brevibacillus brevis, bacteria que se aisló en una vaca con mastitis clínica severa en la prueba *in vivo*, al final del tratamiento pasó a mastitis subclínica y con crecimiento bacteriano de *Kytococcus sedentario*, esta bacteria es de la familia *dermatophilaceae*, presenta infección superficial que puede ser crónica asintomática (Robinson, 1987).

Lactococcus lactis, fue aislada en un caso con mastitis clínica severa en la prueba *in vivo*, al final del tratamiento pasó a mastitis subclínica con crecimiento bacteriano de *Streptococcus milleri group*, que también es conocido este grupo como *Streptococcus* del grupo *anginosus*, a su vez considerado parte de *Streptococcus* grupo *viridans* pero a diferencia de los otros miembros de este grupo, los cuales generalmente presentan una reacción hemolítica a las especies dentro del grupo *anginosus* pueden presentar hemólisis β , hemólisis α , o ser no hemolíticos. A pesar de los esfuerzos de varios investigadores en obtener una clasificación que esté de acuerdo a los últimos hallazgos genéticos, este grupo de microorganismos sigue en constante cambio en cuanto a nomenclatura (Palavecino, 2004). Los *Streptococcus* incluidos en el grupo *milleri* (SGM) son agentes etiológicos de infecciones purulentas graves con tendencia a formar abscesos, además de ser parte de la flora normal de la orofaringe, nasofaringe, tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital (Zurita, *et al.*, 2008). Por ser un estreptococo ambiental la proliferación es más común en el entorno de la vaca seca, causando infección, siendo la tasa más alta en este periodo que en lactancia, no desconociendo el riesgo posparto a la infección (Nelson y Nickerson, 2000).

Streptococcus milleri group se considera causante de mastitis clínica leve, fue observada en una vaca durante la prueba *in vivo* y pasó a mastitis subclínica con aislamiento bacteriano de *Lactococcus lactis*, posterior al tratamiento con el extracto de piel de rana.

Staphylococcus haemolyticus, se observó durante la prueba *in vivo* en una vaca con mastitis clínica moderada y después del tratamiento redujo a mastitis subclínica sin crecimiento bacteriano. *S. haemolyticus* pertenece al grupo de bacterias de estafilococos coagulasa negativa (ECN), que son microorganismos oportunistas. Este tipo de bacterias son de especial interés, porque son los microorganismos más frecuentemente aislados en todo el mundo, si bien las infecciones suelen ser leves. *Staphylococcus* normalmente se encuentra en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador, de manera que ocupa una posición oportuna para colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores. La incidencia de nuevas infecciones es máxima durante el periodo de secado, por lo tanto el porcentaje de cuartos infectados es alto en el momento del parto y la prevalencia decrece a medida que la lactancia avanza (Nelson y Nickerson, 2000; Lévesque, 2004).

Enterococcus faecium, fue aislado en una vaca con mastitis clínica moderada previo al tratamiento, es una bacteria ambiental y su principal reservorio es el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Las infecciones por *E. faecium* afectan sobre todo a pacientes con inmunodeficiencias. Esta bacteria puede habitar en las vacas y causar cuadros de mastitis subclínicos y clínicos, desde leves hasta agudos, tanto en vacas en lactancia como secas, pero la infección es más frecuentemente en el periodo de secado. (Blowey y Edmondson, 1995). Los enterococos constituyen uno de los grupos de bacterias más utilizados como indicadores de los alimentos, correlacionándose su presencia con las condiciones sanitarias durante el procesado y/o el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Representan un porcentaje muy elevado de bacterias aisladas en alimentos y dentro de este grupo, *E. faecium* es el microorganismo que se encuentra con mayor frecuencia. Después del tratamiento se observó mastitis clínica leve, aislándose la bacteria *Kokuria kristinae*, bacteria previamente clasificada en el género de *Micrococcus*, común en la piel de humanos y otros mamíferos, la mayoría de las cepas no son patógenas, de hecho se llegó a considerar como un microorganismo inocuo por lo que las infecciones relacionadas con *Micrococcus spp.* son poco frecuentes (Edmond *et al.*, 2005).

Las bacterias pertenecientes a los estreptococos y coliformes, son los responsables de la mayor parte de la mastitis de tipo ambiental y causan las mayores pérdidas económicas. Como su nombre lo indica, estos organismos se originan en el ambiente y no es posible erradicarlos de ningún hato lechero. A comparación con los organismos contagiosos, los ambientales son de menor duración, más propensos a causar mastitis clínica, y menos propensos a causar problemas al hato en relación a mastitis subclínica y altos conteos celular somáticos ya que la leche de dichas vacas es desviada de la producción general (Nelson y Nickerson 2000). Este tipo de infección aumenta en un ambiente sucio, generalmente las bacterias se pasan del ambiente al pezón, principalmente entre ordeños, la infección también puede ocurrir durante la inserción no higiénica de la cánula, así como también, las bacterias que ya estaban en el pezón o en el canal del pezón antes del ordeño, pueden penetrar a la ubre durante el ordeño. Las infecciones nuevas son frecuentes alrededor del momento del secado y al parto y menores durante el final de la lactancia. Al mantener controles en mastitis contagiosa y la tendencia hacia al incremento en el uso de instalaciones de confinamiento, preocupa el aumento de casos de mastitis por patógenos del ambiente (Lévesque, 2004).

Como puede apreciarse los resultados de la prueba *in vivo* permiten detectar eficiencia en el tratamiento de vacas con mastitis clínica reduciendo en la mayoría de los casos al nivel subclínico. Destaca el crecimiento de bacterias ambientales en el 86.67% de las vacas previo al tratamiento con el extracto de piel de *Rana catesbeiana*, encontrándose *S. aureus* en 13.33%, y si bien se aislaron bacterias después del tratamiento el 60% correspondió a bacterias oportunistas con efectos limitados sobre la glándula mamaria.

Finalmente es importante resaltar que hasta la fecha los tratamientos de la mastitis clínica pueden en muchos casos ser engañosos, ya que la mayoría parecen responder al tratamiento, pero la realidad es que solo desaparecen los síntomas clínicos y el caso regresa al nivel subclínico a partir del cual volverá a irrumpir en un momento futuro si las condiciones lo favorecen.

Si bien, reducir el problema de mastitis es una meta difícil de alcanzar, es necesario establecer estrategias de prevención en todos los establos lecheros que reduzcan las infecciones del periodo de secas, que permitan que el tejido dañado se regenere, reducir la mastitis clínica al inicio de lactancia y evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos que contaminan la leche destinada al consumo humano.

Aplicar las estrategias de manejo en los establos, mejorar las instalaciones de las salas de ordeño y utilizar tratamientos alternativos, permitirá reducir en gran medida las pérdidas económicas ocasionadas por las mastitis en las explotaciones pecuarias, además de incrementar la calidad de la leche.

7. CONCLUSIONES

- El extracto de piel de *Rana catesbeiana* redujo el número de UFC de *Escherichia coli* respecto al grupo control, sin embargo, la respuesta antimicrobiana de las diferentes concentraciones evaluadas es inconsistente.
- No se encontraron hallazgos histopatológicos durante la prueba de desafío del extracto de piel de rana en cuartos de la glándula mamaria inoculados con *E. coli*, que permitan atribuir un efecto regenerativo en el tejido glandular.
- La aplicación del extracto de piel de *Rana catesbeiana* en vacas con mastitis de tipo clínico en sus tres presentaciones (leve, moderado y severo) permitió apreciar reducción en el grado de mastitis, principalmente en el grado moderado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong P. B., Melchior R., Quigley J.P. 1996. Humoral immunity in long-lived arthropods. *J. Insect Physiol.* 42: 53-64.
- Bachère E., Mialhe E., Noel D., Boulo V., Morvan A. y Rodriguez J. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132: 17-32.
- Blowey R. y Edmondson P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Ed. Acribia, España. p 1-35.
- Boman H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
- Boman H. G. 1996. Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity. *Scand. J. Immunol.* 43: 475-482.
- Boman H. G. 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunological.* 173: 5-16.
- Boman H. G. y Steiner H. 1981. Humoral immunity in *Cecropia pupae*. *Current Topics in Microbiological Immunology.* 173: 94-95: 75-91.
- Broekaert W. F., Terras F. R. G., Cammue B. P. A. y Osborn R. W. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.
- Bullet P., Hetru C., Dimarcq J-L. y Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Devel. Comp. Immunol.* 23: 329-344.
- Cárdenas S. P., Justiniano J. C., Cárdenas C. y Dib. M. 2008. Sepsis por *Streptococcus anginosus* originada en cáncer de colon abscedado. *Rev. Chilena de Cirugía.* 60 (4): 348-351.
- Cuesta M. M., Valera M. R., Linares P. F. y Fragoso B. 2002. Nosodes. Terapia homeopática de la mastitis clínica. XVIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba.
- Davis B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H. y Wood W. 1978. Tratado de microbiología. Ed. Salvat. p 729, 777.
- Destoumieux D., Bullet P., Strub J. M., Van D. y Bachère E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European J. Biochem.* 266: 335-346.

- Destoumieux D., Muñoz M., Cosseau C., Rodríguez J., Bullet P., Comps M. y Bachère E. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* 113: 461-469.
- Edmond S. K., Chri L. P., Wong, Kristi T. W., Edmon CH. W. C Yam. y Angus C.W. 2005. *Kocuria kristinae* infección asociada a la colecistitis aguda. *BMC Infectium Diseases.* 5: 60-60.
- Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffmann J., Vandorselaer A. y Bullet P. 1996. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 271: 29537-29544.
- Evans E. W. y Harmon B. G. 1995. A review of antimicrobial peptides: defensins and related cationic peptides. *Veterinary Clin. Pathol.* 24: 109-116.
- Fernández C. G. P. y García O. 1972. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Appl Microbiol.* 23:998-1000.
- FIRA. 2001. Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. Boletín informativo Núm. 317. Septiembre.
- Frazier W. C. y Westhoff D. C. 1978. Food microbiology. Mc graw-hill book company. USA. p 419.
- Gallo R. L., Huttner K. M. 1998. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *J. Investigative Dermatol.* 111: 739-743.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
- Gómez O, P. y Jahn, B. 1993. Opportunities and cons traints for production of marketable products from temperate grassland systems with minimal financial inputs. Proceeding of the XVII International Grassland Congress. 13 - 21 February. Palmerston North, Hamilton, Lincoln, New Zealand. p 1487-1491.
- Holmes C. W. y Wilson G. F. 1989. Producción de leche en praderas. Ed. Acribia, España. p 222-258.
- Huang H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 1-6.
- Hwang H. J. 1990. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76: 235-246.

- Jenssen H., Hamill P. y Hancock R. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Canada. 19(3) 491-511.
- Joklik K., Willett H. y Amos B. 1980. *Zinsser microbiology*. Appleton Century Crofts. New York. p 532-726.
- Kawano K., Yoneya T., Miyata T., Yoshikawa K., Tokunaga F., Terada Y. y Iwanaga S. 1990. Antimicrobial peptide, Tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) - NMR determination of the beta sheet structure. *J. Biol. Chem.* 265: 15365-15367.
- Lee J. Y., Boman A., Sun C., Anderson M., Jörnvail H., Mutt V. y Boman H. G. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9159-9162.
- Lévesque P. 2004. Menos mastitis, mejor leche. *Manual Hoards Dairyman*. p 16-20.
- Matsuzaki K. 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim y Biophys. Acta* 1376: 391-400.
- Mithieux S. y Weiss A. 2005. Elastina. *Advances in protein chemistry*. 70: 437-61.
- Morvan A., Iwanaga S., Comps M. y Bachere E. 1997. *In vitro* activity of the limulus antimicrobial peptide tachyplesin on marine bivalve pathogens. *J. Invertebrate Pathol.* 69: 177-182.
- Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. y Shimonishi Y. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). *J. Biol. Chem.* 263: 16709-16713.
- Nelson P. y Nickerson C. 1992. Mastitis el contra ataque. Publicado por Babson Bros. Co. USA p 1-3, 25.
- Nelson P. y Nickerson C. 2000. Ganando la lucha contra la mastitis. *Wesfalia Surge Inc.* p 16-119.
- Nissen-Meyer J. y Nes IF. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167: 67-77.
- Palavecino R. 2004. *Streptococcus anginosus* group: Is its identification clinically relevant. *Rev Chil Infect.* 21 (3): 261-267.
- Parakkal F. y Matoltsy G. 1964. A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *The Journal of Cell. Biology.* 20: 85-91.

- Pérez A., Díaz L., Montes S. y Fernández M. 2004. *Gemella morbillorum*: un patógeno poco frecuente. Reuniones ordinarias Baiona 2004. España. <http://www.meiga.info/meiga.asp?cap=1&mat0=8&mat1=414&mat=416&id=985>
- Pérez A., Martín L. y Camacho M. 1998. Evaluación preliminar de un bioterápico en el tratamiento de mastitis subclínica en bovinos de leche. XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 9-13 noviembre. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia.
- Phillips C. J. C. 1998. Avances de la ciencia de la producción lechera. Ed. Acribia, España. p 175.
- Rao A. G. 1995. Antimicrobial Peptides. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 6-13.
- Rivas-Santiago B., Sada E., Hernández-Panda R. y Tsutsumi V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud pública Mex.* 48: 62-71.
- Robinson R. K. 1987. *Microbiología lactológica Volumen 1 Microbiología de la leche*. Ed. Acribia, España. p 21-174.
- Ryan M. P., Jack R. W., Josten M., Sahl H. G., Jung G., Ross R. P. y Hill C. 1999. Extensive post-translational modification, including serine to D-alanine conversion, in the two component lantibiotic, lactacin 3147. *J. Biol. Chem.* 274: 37544-37550.
- SAGARPA. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de ganado bovino en México 1990-2000. Centro de Estadística Agropecuaria.
- Saito T., Kawabata S., Shigenaga T., Takayenoki Y., Cho J. K., Nakajima H., Hirata M. y Iwanaga S. 1995. A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes - isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J. Biochem.* 117: 1131-1137.
- Saran A. y Chaffer M. 2000. *Mastitis y calidad de la leche*. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. p 11-23.
- Schröder J. M. 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57: 121-134.
- Schwinger G., Zanger K. y Greven H. 2001. Structural and mechanical aspects of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). 33 (5): 541-547.

- Shai Y. 1998. Mode of action of antibacterial peptides. In Hultmark PTBaD (ed), Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Chapman & Hall. London. p 111-131.
- SIAP. 2001. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Boletín de leche. Noviembre-diciembre.
- Stuart H. 1942. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. Cereal Chem. 19:288-300.
- Valtora S. E., Leva P. E. y Gallardo M. R. 1997. Evaluation of different shades to improve dairy cattle well-being in Argentina. Int. J. Biometeor. 41:65-67.
- Vargas A. y Yepiz P. 1998. Shrimp Immunity. Res. Trends Comp. Biochem. Physiol. 5: 195-210.
- Varnam H. y P. Sutherland. 1994. Leche y productos lácteos, tecnología, química y microbiología. Ed. Acribia, España p 36,37.
- Wolter W., Castañeda H., Kloppert B. y Zschock M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Ed. Universitaria. México. p 40-62.
- Wu J., Hu S. y Cao L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclínica mastitis in lactating cows. Antimicrobial agents and chemotherapy. USA. p 3131-3135.
- Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N., Chen Q., Buffo M. J., Shogan J., Anderson M., Schröder J. M., Wang J. M., Howard OMZ. y Oppenheim J. J. 1999. B-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science 286: 525-527.
- Yu Q., Lehrer R. I. y Tam J. P. 2000. Engineered salt-insensitive α -defensins with end-to-end circularized structures. J. Biol. Chem. 275: 3943-3949.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. Proc Natl Acad Sci. 84:5449-5453.
- Zurita S., Arias V., Vargas R., Espinosa C., Guerrero J. y Naranjo E. 2008. *Streptococcus melleri* group's species: clinical features, microbiological and susceptibility patterns. Rev Ecuat Pediat. 9 (1): 13-19.