

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

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

Víctor Manuel del Villar Pérez*, Alberto Barreras Serrano*, Lourdes Carolina Pujol Manríquez*, Luis Tinoco Gracia*, Tonatiuh Melgarejo**, Alma Rossana Tamayo Sosa*[‡]

RESUMEN

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

ABSTRACT

Bovine mastitis is a worldwide disease that affects dairy cattle and is characterized by inflammation of mammary gland. Severity of inflammation depends of causative agent and host response to it. Antimicrobial peptides play an important role in innate immune defense mechanisms of mammary gland against mastitis causative microorganisms. By using qPCR on mammary gland tissues: cistern, parenchyma, Fűrstenberg' rosette, streak canal, and inguinal lymph node, with mastitis by *Staphylococcus aureus*, we found that β -defensins lingual antimicrobial peptide (LAP) and tracheal antimicrobial peptide (TAP) were mainly expressed in cisternal and parenchymal tissues. The S100A7 protein was highly expressed in streak canal, although some expression was detected in Fűrstenberg's rosette, cistern, inguinal lymph node, but no in parenchymal tissue. Therefore, these peptides could play a key role in the mammary gland with mastitis by *S. aureus*.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las enfermedades infecciosas que más afecta a las vacas lecheras y que causa grandes pérdidas económicas en la industria de los lácteos. Las bacterias son las principales causales de mastitis, siendo *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* dos de los patógenos más comunes. El desarrollo del proceso inflamatorio y la respuesta inmune en la ubre varía significativamente entre estos dos patógenos (Petzl *et al.*, 2008; Whelehan, Meade, Eckersall, Young & O'Farrelly, 2011); mientras que *E. coli* causa mastitis aguda con severas consecuencias clínicas; *S. aureus* provoca

Recibido: 10 de agosto de 2015

Aceptado: 29 de julio de 2016

Palabras clave:

Péptidos antimicrobianos; mastitis; qPCR.

Keywords:

Antimicrobial peptides; mastitis; qPCR.

Cómo citar:

Del Villar Pérez, V. M., Barreras Serrano, A., Pujol Manríquez, L. C., Tinoco Gracia, L., Melgarejo, T., & Tamayo Sosa, A. R. (2016). Expresión de las β -defensinas LAP (péptido antimicrobiano lingual) y TAP (péptido antimicrobiano traqueal), así como psoriasina (S100A7), en la glándula mamaria bovina con mastitis crónica por *Staphylococcus aureus*. *Acta Universitaria*, 26(4), 29-35. doi: 10.15174/au.2016.930

* Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Km 3.5 carretera a San Felipe, Fracc. Campestre s/n, Mexicali, Baja California, México, C.P. 21386. Tel.: (686) 56 36 906. Correo electrónico: almartamayo@hotmail.com

** Department of Human Nutrition, Kansas, State University.

[‡] Autor de correspondencia.

predominantemente mastitis subclínica, lo que resulta una infección crónica que puede persistir durante toda la vida del animal (Whelehan *et al.*, 2011).

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

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

Otro importante agente antimicrobiano presente en bovinos es la proteína de unión a calcio S100A7, también conocida como psoriasina (Tetens *et al.*, 2010). A la fecha se conoce poco acerca de su función fisiológica en bovinos, y particularmente en la glándula mamaria. En humanos se ha observado que protege la piel

de infecciones contra *E. coli*, aunque también se expresa en piel sana. En bovinos se ha demostrado que es altamente activa en contra de diferentes cepas de *E. coli* (Regenhard *et al.*, 2009), y su expresión es inducible por citocinas proinflamatorias y bacterias (Gläser *et al.*, 2005), sin embargo, su función fisiológica exacta aún no está bien descrita (Regenhard *et al.*, 2009). Regenhard, Petz, Zerbe & Sauerwein (2010) reportaron por primera vez que la proteína bovina psoriasina se expresa en glándula mamaria, y pudiera ser una proteína de defensa del huésped y parte de la inmunidad innata. De hecho, S100A7 se ha detectado en muestras de leche después de 24 h de la infección con *E. coli*, solo en los cuartos inoculados, mientras que Lutzow *et al.* (2008) encontraron niveles aumentados de otra proteína de unión a calcio, similar a psoriasina en leche de vacas inoculadas con *S. aureus*.

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de tejido mamario

Se utilizaron dos vacas Holstein Friesian de condición corporal 3/5, de segundo parto, las cuales fueron diagnosticadas con mastitis crónica en la totalidad de los cuartos. La mastitis fue confirmada mediante la prueba de california (3+++) y el conteo de células somáticas (6 000 000 células) (Calvinho, 1998). La presencia de *S. aureus* se realizó mediante el análisis bacteriológico de muestras de leche, y confirmado con pruebas bioquímicas comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (API Staph, bioMérieux, USA). Las vacas fueron sacrificadas y se tomaron dos muestras de aproximadamente 1 cm³ de cada uno de los tejidos de la glándula mamaria de las siguientes regiones: cisterna, parénquima, Rosetta de Fürstenberg, esfínter y linfonódulo inguinal, en cada uno de los cuartos. Los tejidos fueron colocados en solución de RNAlater (Ambion, Austin, Texas) y mantenidos a -20 °C hasta la extracción de ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés).

Extracción de RNA y obtención de cDNA

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

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

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real cuantitativo (qPCR)

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

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

Los resultados de qPCR fueron reportados como la razón de la cantidad de ARN mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) de cada uno de los péptidos específicos sobre 1×10^6 copias del gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, por sus siglas en inglés).

RESULTADOS

Rendimiento de qPCR

El límite de detección para el qPCR fue de 100 copias de mRNA, de acuerdo con la última dilución de la curva estándar (1×10^2). En general, el análisis de las curvas de fusión para cada gen no mostró signos de productos inespecíficos de qPCR, indicando que los pares de cebadores fueron específicos. En la figura 1 se muestra la curva de fusión para el péptido LAP como ejemplo. Dado que el gen constitutivo (GADPH) en su valor de Ct estuvo por debajo de los ≤ 0.5 ciclos en sus medidas repetidas, se puede decir que dicho gen fue estable.

Expresión de los péptidos antimicrobianos en la glándula mamaria con mastitis

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

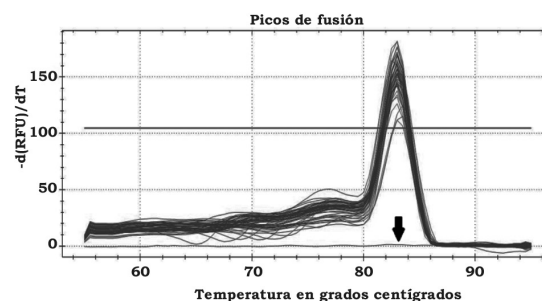


Figura 1. Curva de fusión del péptido antimicrobiano LAP. Nótese que los controles negativos (indicado en la imagen con una flecha) no amplificaron lo que indica, que los pares de cebadores fueron específicos; además, tanto las muestras como los controles positivos mostraron la misma temperatura de fusión.

Fuente: Imagen extraída de software CFX manager software (Bio-rad Laboratories, Inc.).

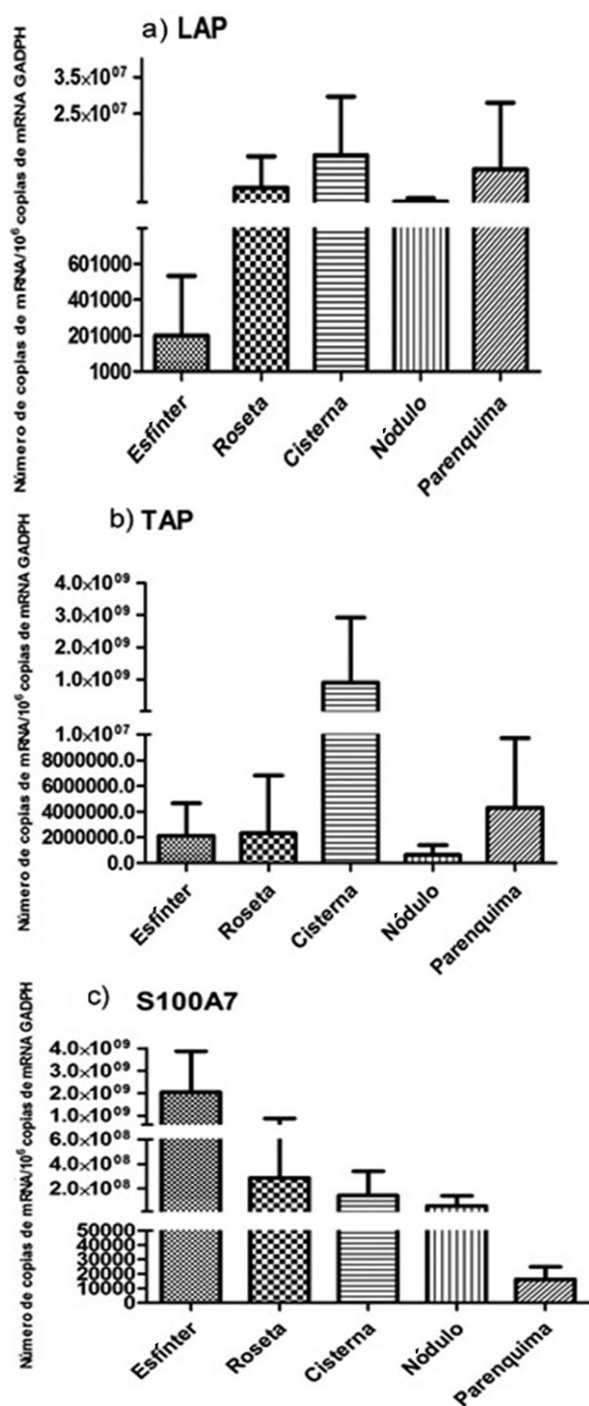


Figura 2. Se muestran los niveles de expresión de mRNA de los péptidos a) LAP, b) TAP y c) S100A7 en cinco diferentes regiones anatómicas de la glándula mamaria bovina. El número de copias de mRNA está normalizado contra la expresión de GADPH bovino. Las barras representan la desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

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

DISCUSIÓN

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

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

Con respecto al péptido TAP, que al igual que LAP tuvo un mayor nivel de expresión en cisterna y parénquima, estos resultados concuerdan con los de Whelehan *et al.* (2011), quienes demostraron la expresión de TAP en la región alveolar, ducto, cisterna y canal del pezón de la glándula mamaria bovina infectada con *S. aureus*. Además, Roosen *et al.* (2004) han reportado la expresión constitutiva del péptido TAP en tejido de ubres sanas de vacas en lactación, pero no en los tejidos infectados, mientras que Cormican *et al.* (2008) confirmaron la expresión de TAP tanto en epitelio mamario como en tejido mamario. De igual modo, estudios reportan que el péptido antimicrobiano TAP se expresa de manera constitutiva, pero también de manera inducible, y que los niveles de expresión en los tejidos mamarios aumentan en respuesta a la inflamación, tal sería el caso de tejidos con mastitis (Diamond, Jones & Bevins, 1993; Roosen *et al.*, 2004), esto debido a que el péptido TAP ha mostrado una alta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, principalmente en la fase aguda de la mastitis (Eckersall *et al.*, 2006). Kościuczuk *et al.* (2014) reportan que en el parénquima no hay expresión de este péptido, contrario a los resultados aquí mostrados, donde se detecta la expresión del péptido TAP en parénquima. Esto pudiera deberse a que el límite de detección del qPCR fue mucho menor, y con ello se pudo detectar una menor cantidad de este péptido.

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

Entre los mecanismos para disparar la expresión de los péptidos LAP y TAP se incluyen los lipopolisacáridos y algunas citosinas, que además de inducir a los receptores de manosa inducen la expresión de los receptores TLR1, TLR2, TLR3 y TLR4. Ello provoca el incremento subsecuente del mRNA de estos péptidos, motivo por el cual las concentraciones sobrepasan las basales cuando están presente los factores predisponentes (Zhao, Wang & Lehrer, 1996). Pero este aumento en la expresión de los péptidos se observa su pico máximo a las 16 h postestimulación, por lo que en un tiempo menor se puede obtener medidas basales de dichos péptidos (Mitchell, Al-Haddawi, Clark, Beveridge & Caswell, 2007).

En cuanto al péptido S100A7, este mostró un patrón y nivel de expresión opuesto a LAP y TAP, preva-

leciendo su expresión en esfínter, Roseta Fürstenberg, cisterna y nódulo inguinal, en orden de mayor a menor número de copias de mRNA; mientras que en el parénquima el nivel de expresión fue muy escaso.

El esfínter fue el tejido donde hubo la mayor expresión de S100A7, lo que concuerda con lo publicado por Regenhard *et al.* (2010), quienes reportan una abundante expresión de este péptido en esta región. Asimismo, concuerda con su expresión constitutiva en vacas sanas (Tetens *et al.*, 2010), lo cual pudiera sugerir que también es inducible. De acuerdo con el patrón de infección galactogénico, el epitelio del pezón es el primer tejido expuesto a microorganismos patógenos y, por tanto, la primera línea de defensa, de ahí su mayor expresión tanto en vacas sanas como en vacas con mastitis.

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

En estudios en la lengua humana se ha observado que la expresión de psoriasina es mucho mayor en la parte anterior de la lengua comparada con la parte posterior, debido a que esta zona es la que tiene el primer contacto con microbios y es más vulnerable a traumas en la superficie, por lo que requiere protección adicional, con alta expresión de proteínas antimicrobianas (Meyer *et al.*, 2008), situación muy similar a lo que sucede en el pezón, el cual está más expuesto a traumas y colonización bacteriana, mientras que el tejido del parénquima se encuentra en una ubicación más distal.

CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra por primera vez el patrón y nivel de expresión de los péptidos antimicrobianos LAP, TAP y S100A7 en diferentes regiones de la glándula mamaria con mastitis clínica crónica por *S. aureus*. La mayor expresión de LAP y TAP se limitó a las regiones de la cisterna y el parénquima, lo cual podría sugerir que su expresión se ve aumentada una vez que el patógeno se establece en esta región de la glándula mamaria, lo que podría sugerir un papel quimiotáctico y, por tanto, la inflamación crónica de la glándula mamaria sin eliminación del patógeno *S. aureus*. Mientras que S100A7 mostró una mayor expresión en los tejidos que están en contacto constante e inmediato con el patógeno como el esfínter y Roseta de Fürstenberg, sugiriendo que este péptido pudiera tener un papel fundamental en la disminución en el número de colonias en la glándula mamaria por *S. aureus* en las etapas iniciales de la infección.

AGRADECIMIENTO

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

REFERENCIAS

- Calvinho, L. F. (1998). Diagnóstico bacteriológico de mastitis. En *Primer Seminario Internacional Capacitagro* (pp. 115-118). Buenos Aires: Pergamino.
- Cormican, P., Meade, K. G., Cahalane, S., Narciandi, F., Chapwanya, A., Lloyd, A., & O'Farrelly, C. (2008). La evolución, la expresión y la eficacia en un grupo de nuevas especies bovina beta-defensinas. *Inmunogenética*, 60(3-4), 147-156.
- Das, H., Ahmed, S. U., Shukla, S. K., Shukla, S., Latif, A., & Sharma, D. (2010). Two β defensin cationic peptides from mastitic milk of *Bubalus bubalis*. *Asian Journal of Animal Sciences*, 4(1), 1-12.
- Diamond, G., Jones, D. E., & Bevins, C. L. (1993). Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4596-4600.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., & Bevins, C. L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3952-3956.
- Eckersall, P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Knight, C. H., McComb, C., Waterston, M. M., Hogarth, C. J., Scott, E. M., & Fitzpatrick, J. X. (2006). Acute proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1488-1501.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J. M. (2005). Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nature Immunology*, 6(1), 57-64.
- Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Kata, S. R., & Seyfert, H. M. (2004). Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 174-185.
- Infante, E., Aguilar, L. D., Gicquel, B., & Pando, R. H. (2005). Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clinical and Experimental Immunology*, 141(1), 21-28.
- Isobe, N., Hosoda, K., & Yoshimura, Y. (2009a). Immunolocalization of lingual antimicrobial peptide (LAP) in the bovine mammary gland. *Animal Science Journal*, 80(4), 446-450.
- Isobe, N., Morimoto, K., Nakamura, J., Yamasaki, A., & Yoshimura, Y. (2009b). Intramammary challenge of lipopolysaccharide stimulates secretion of lingual antimicrobial peptide into milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6046-6051.
- Isobe, N., Sugino, T., Taniguchi, K., Moriya, N., Hosoda, K., & Yoshimura, Y. (2011). Differential localization of lingual antimicrobial peptide in the digestive tract mucosal epithelium of calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(1-2), 87-94.
- Kościuczuk, E. M., Lisowski, P., Jarczak, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L., & Bagnicka, E. (2014). Expression patterns of β -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Veterinary Research*, 6(10), 246-259.
- Lutzow, Y. C., Donaldson, L., Gray, C. P., Vuocolo, T., Pearson, R. D., Reverter, A., Byrne, K. A., Sheehy, P. A., Windon, R., & Tellam, R. L. (2008). Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, 4, 18. doi: 10.1186/1746-6148-4-18
- Meyer, J. E., Harder, J., Sipos, B., Maune, S., Klöppel, G., Bartels, J., Schröder, J. M., & Gläser, R. (2008). Psoriasin (S100A7) is a principal antimicrobial peptide of the human tongue. *Mucosal Immunology*, 1(3), 239-243.
- Mitchell, G. B., Al-Haddawi, M. H., Clark, M. E., Beveridge, J. D., & Caswell, J. L. (2007). Effect of Corticosteroids and Neuropeptides on the Expression of Defensins in Bovine Tracheal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 75(3), 1325-1333.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H. M., Nürnberg, G., & Schuberth, H. J. (2008). *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research*, 39(2), 18.
- Regenhard, P., Leippe, M., Schubert, S., Podschun, R., Kalm, E., Grötzinger, J., & Looft, C. (2009). Antimicrobial activity of bovine psoriasin. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 335-40.
- Regenhard, P., Petzl, W., Zerbe, H., & Sauerwein, H. (2010). The antibacterial psoriasin is induced by *E. coli* infection in the bovine udder. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), 293-298.

- Roosen, S., Exner, K., Paul, S., Schröder, J. M., Kalm, E., & Looft, C. (2004). Bovine beta-defensins: Identification and characterization of novel bovine beta-defensin genes and their expression in mammary gland tissue. *Mammalian Genome*, 15(10), 834-842.
- Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D., & Zasloff, M. A. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science*, 267(5204), 1645-1648.
- Selsted, M. E., Tang, Y., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H., & Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structure, and antibacterial activities of 13-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6641-6648.
- Singh, V. K., More, T., & Kumar, S. (2004). Separation of cationic proteins and antibiotic peptides from buffalo polymorphonuclear cells. *Buffalo Journal*, 2, 173-182.
- Swanson, K., Gorodetsky, S., Good, L., Davis, S., Musgrave, D., Stelwagen, K., Farr, V., & Molenaar, A. (2004). Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infection and Immunity*, 72(12), 7311-7314.
- Tarver, A. P., Clark, D. P., Diamond, G., Russell, J. P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cohen, K. S., Jones, D. E., Sweeney, R. W., Wines, M., Hwang, S., & Bevins, C. L. (1998). Enteric beta-defensin: Molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*, 66(3), 1045-1056.
- Tetens, J., Friedrich, J. J., Hartmann, A., Schwerin, M., Kalm, E., & Thaller, G. (2010). The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 775-783.
- Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Mazzilli, M., D'Este, F., Tossi, A., & Zanetti, M. (2010). Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Infection and Immunity*, 78(4), 1781-1788.
- Whelehan, C. J., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Young, F. J., & O'Farrelly, C. (2011). Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140(3-4), 181-189.
- Zhao C., Wang, I., & Lehrer, R. I. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters*, 396(2-3), 319-22.