



*Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo*



Maestría Institucional en Ciencias Biológicas

Área Temática: Biotecnología Pecuaria

Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia

TESIS

*Participación del factor transcripcional NF- κ B en la endocitosis
de Staphylococcus aureus en células de epitelio mamario bovino
estimuladas por prolactina*

Presenta:

MVZ Leticia Lara Zárate

*Para obtener el Grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas*

Asesora:

Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa

Coasesor:

Dr. Joel Edmundo López Meza

Morelia, Mich., Junio del 2010

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco Teórico	5
3.1 Mastitis Bovina	5
3.2 La glándula mamaria bovina	6
3.3 Organismos patógenos asociados con la mastitis	7
3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
3.5 Interacción <i>Staphylococcus aureus</i> -hospedero en la mastitis bovina	8
3.6 Mecanismos de endocitosis de <i>S. aureus</i> por el epitelio mamario bovino	11
3.6.1 Integrinas	11
3.7 Prolactina	12
3.7.1 Gen de la PRL y su estructura primaria	13
3.7.2 Funciones de la PRL	14
3.7.3 Receptor de la PRL	15
3.8 Respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina	17
3.8.1 Receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos	19
3.9 Activación del factor transcripcional NF- κ B en células de epitelio mamario bovino	21
3.9.1 Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la activación del factor transcripcional NF- κ B	24
4. Antecedentes	26
5. Justificación	27

6. Hipótesis	28
7. Objetivo general	28
8. Objetivos particulares	28
9. Estrategia experimental	29
10. Materiales y Métodos	30
10.1 Ácido acetilsalicílico (AAS)	30
10.2 Prolactina	30
10.3 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
10.4 Cultivos primarios de CEMB	30
10.5 Efecto del AAS sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y la viabilidad de las CEMB	30
10.6 Ensayos de infección <i>S. aureus</i> - AAS -CEMB	31
10.7 Análisis de genes de la respuesta inflamatoria por retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	32
10.8 Cuantificación del óxido nítrico (NO) producido por las CEMB	33
10.9 Inmunoprecipitación y análisis de Western blot	34
10.10 Análisis estadístico	34
11. Resultados	36
11.1 Efecto del AAS sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i>	36
11.2 Efecto del AAS sobre la viabilidad de las CEMB	37
11.3 Endocitosis de <i>S. aureus</i> en las CEMB	38
11.4 Regulación del factor transcripcional NF- κ B en las CEMB en presencia <i>S. aureus</i> y bPRL	39
11.5 Expresión del mRNA para genes de citocinas y elementos de la respuesta inmune innata	41
11.5.1 Expresión del mRNA de TNF- α en las CEMB	41
11.5.2 Expresión del mRNA del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB	42

11.5.3 Expresión del mRNA de iNOS en las CEMB	44
11.5.4 Producción de NO por las CEMB	44
11.5.5 Expresión del mRNA de κ -caseína en CEMB	46
12. Discusión	48
13. Conclusión	54
14. Literatura citada	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la anatomía de la glándula mamaria bovina	6
Figura 2. Estructura de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Figura 3. Mecanismo de endocitosis de <i>Staphylococcus aureus</i> en las células del epitelio mamario	12
Figura 4. Esquema de la estructura de la prolactina	13
Figura 5. Representación de las isoformas del receptor de prolactina	15
Figura 6. Representación esquemática de la activación del RPRL	16
Figura 7. Mecanismos de producción de NO modulados por PRL	19
Figura 8. Receptores tipo Toll expresados en el epitelio mamario bovino	20
Figura 9. Modelo de la vía de activación de NF- κ B	23
Figura 10. Efecto del AAS sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> 27543	36
Figura 11. Viabilidad de las CEMB tratadas con el AAS	37
Figura 12. Endocitosis de <i>Staphylococcus aureus</i> en las CEMB tratadas con bPRL y AAS	39
Figura 13. Evaluación de la translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas	40
Figura 14. Expresión del mRNA de TNF- α en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas	42
Figura 15. Expresión del mRNA de TAP en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas	43
Figura 16. Expresión del mRNA de iNOS en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas	45
Figura 17. Producción de NO por las CEMB infectadas con <i>S. aureus</i> en presencia de bPRL y AAS	46
Figura 18. Expresión del mRNA de κ -caseína en las CEMB infectadas con <i>S. aureus</i> en presencia de bPRL y AAS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Elementos de la respuesta inflamatoria regulados principalmente por el factor transcripcional NF- κ B	22
Tabla 2. Oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo	33

1. Resumen

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades de mayor relevancia en la ganadería lechera a nivel mundial. Esta patología se caracteriza por una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria de origen multifactorial, ocasionada principalmente por infecciones bacterianas. *Staphylococcus aureus* es el patógeno prevalente que se aísla con mayor frecuencia en casos de mastitis (> 70%), éste posee la característica de ser un patógeno facultativo intracelular, invadiendo a las células epiteliales por un mecanismo de endocitosis. En un trabajo previo se demostró que la prolactina bovina (bPRL, 5 ng/ml) estimula la endocitosis de *S. aureus* (ATCC 27543) por células epiteliales mamarias bovinas (CEMB), y en conjunto con la infección, regula elementos de la respuesta inmune innata en las CEMB. La expresión de estos elementos depende de la activación del factor transcripcional NF- κ B, y recientemente se ha demostrado que la bPRL activa al factor NF- κ B en el epitelio mamario bovino regulando la expresión de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, se desconoce sí la activación de este factor de transcripción es regulado por la PRL durante el proceso infeccioso con *S. aureus*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la regulación de la vía de señalización de NF- κ B durante la endocitosis de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino estimuladas con bPRL. Los resultados mostraron que la bPRL induce la activación de NF- κ B en las CEMB. Mientras que *S. aureus* inhibe la translocación nuclear de este factor, aún en presencia de bPRL (5 ng/ml), lo cual favorece la endocitosis de la bacteria. Con respecto a la regulación de la expresión de elementos de la respuesta inmune innata, los datos mostraron que la bPRL (5 ng/ml) induce la expresión de los mRNA de TNF- α , TAP, iNOS, además de la producción de NO en las CEMB. Por otro lado, *S. aureus* disminuyó la expresión del mRNA de TAP, mientras que no modificó la expresión de TNF- α , iNOS y la producción de NO. Durante el proceso infeccioso con *S. aureus* en las CEMB estimuladas con bPRL, la expresión de los mRNA de TNF- α , TAP y NO, no se modificó. En conclusión los resultados obtenidos sugieren que la infección de las CEMB por *S. aureus* inhibe la

translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B, lo cual favorece la endocitosis de la bacteria, ésto aún en presencia de bPRL. Así mismo, la expresión de genes de la respuesta inmune innata en las CEMB es modulada diferencialmente por la bPRL y la infección.

2. Introducción

La mastitis bovina es considerada una de las enfermedades de mayor importancia en la ganadería lechera a nivel mundial. Su etiología es multifactorial y se caracteriza por una inflamación de la glándula mamaria, teniendo manifestaciones tanto clínicas como subclínicas, lo cual genera una disminución en la calidad y cantidad de leche producida, generando pérdidas económicas importantes a nivel mundial (Brouillette *et al*, 2003). *Staphylococcus aureus* es un patógeno contagioso intracelular importante, ya que causa una gran número de enfermedades en humanos y animales. En la mastitis bovina se le considera como el patógeno prevalente más importante, siendo este el microorganismo que se aísla con mayor frecuencia en casos de mastitis clínica y subclínica (>70%); además, es capaz de invadir a las células epiteliales por un mecanismo de endocitosis (Brouillette *et al*, 2003).

La mayor incidencia de la mastitis bovina se presenta durante el periodo seco y alrededor del parto, estos estadios se caracterizan por presentar importantes cambios fisiológicos, que incluyen un incremento en la concentración de hormonas lactogénicas (ej. prolactina) y de crecimiento (Hocket *et al*, 2000). La prolactina (PRL) modula los eventos de la lactancia, siendo el epitelio mamario bovino uno de sus principales tejidos blanco, en él regula el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria; además, estimula la síntesis de las proteínas de la leche (Hocket *et al*, 2000; Burton y Erskine, 2003). Estas funciones las realiza a través de la activación de un receptor de membrana (RPRL), lo cual conduce a la activación de la vía clásica JAK/Stat (Bole-Feysot *et al*, 1998). En un trabajo previo se demostró que la prolactina bovina (bPRL, 5 ng/ml) estimula la endocitosis de *S. aureus* por las células del epitelio mamario bovino (CEMB), y en conjunto con la infección, regula elementos de la respuesta inmune innata probablemente activando al factor NF- κ B, principal regulador del proceso inflamatorio (Gútierrez-Barroso *et al*, 2008).

Hasta el momento, se conoce que la bPRL estimula la endocitosis de *S. aureus* y que regula la expresión de genes de la respuesta inmune innata en las

células del epitelio mamario bovino; sin embargo, se desconoce si estos eventos están relacionados con la activación o inhibición del factor transcripcional NF- κ B. El objetivo del presente trabajo fue determinar la regulación de la vía de señalización de NF- κ B durante la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas con bPRL. Una de las estrategias empleadas en este trabajo fue utilizar el ácido acetilsalicílico (AAS) para determinar la participación de NF- κ B, puesto que se sabe que este antiinflamatorio no esterooidal inhibe la activación de NF- κ B a una concentración de 5 mM (Yin *et al*, 1998).

3. Marco Teórico

3.1 Mastitis Bovina

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial que provoca la inflamación de la glándula mamaria, puede tener manifestaciones tanto clínicas como subclínicas y es considerada como una de las enfermedades infecciosas más importantes del ganado lechero, ya que provoca pérdidas económicas considerables a nivel mundial, esto debido a la disminución tanto en la cantidad como en la calidad de la leche (Burvenich *et al*, 1999; Kerro-Dego *et al*, 2002). Estas pérdidas económicas se reflejan principalmente en la baja venta de la leche para consumo humano, en el tratamiento con antibióticos, la asistencia médica veterinaria y principalmente en los sacrificios tempranos de los animales con alta incidencia de mastitis (Rainard y Riollet, 2006). La incidencia de mastitis bovina, tanto clínica como subclínica, es elevada en los hatos de producción lechera a nivel mundial; esta incidencia se debe al mecanismo de invasión de organismos patógenos, principalmente de origen bacteriano, que pueden permanecer latentes en la glándula mamaria durante largos periodos de tiempo y manifestarse durante los distintos periodos de la lactancia, principalmente durante el periodo seco y durante el parto (Huszenicza *et al*, 2004).

Esta patología se caracteriza por una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria causada por dos etiologías, una infecciosa y otra no infecciosa. En esta respuesta inflamatoria influyen una gran variedad de factores como pueden ser: las características de la vaca, el mal manejo de las maquinas de ordeño (que pueden comprometer la integridad de la glándula mamaria del animal por daño mecánico), el medio ambiente en el que se encuentra la vaca y las técnicas de ordeño realizadas bajo condiciones higiénicas no aptas, las cuales favorecen la invasión de organismos patógenos principalmente de origen bacteriano; siendo estos últimos los principales causantes de la mastitis bovina (Bradley, 2002; Burvenich *et al*, 2003).

3.2 La glándula mamaria bovina

La glándula mamaria es órgano distintivo de los mamíferos, está especializada en la producción de la leche para la alimentación de las crías. La regulación hormonal llevada a cabo en los ovarios y la glándula pituitaria coordinan el desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad; sin embargo, es la prolactina (PRL) la hormona que juega el papel más importante en el establecimiento del parto y de la lactancia (Oakes *et al*, 2008).

La glándula mamaria bovina consiste en una red de lóbulos y ductos de células parenquimales (región secretora) y un estroma formado de fibras y tejido conectivo elástico (Figura 1).

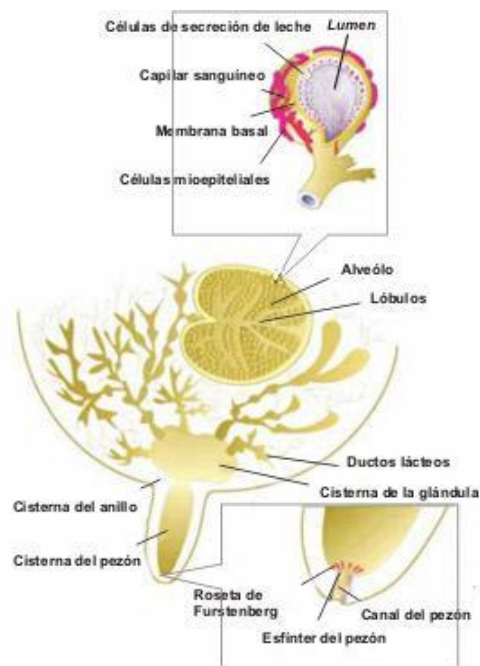


Figura 1. Representación esquemática de la anatomía de la glándula mamaria bovina (Frandsen y Spurgeon, 2002).

Este tejido conectivo está formado por adipocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos que se ramifican alrededor de todo el estroma. El epitelio

mamario está compuesto de tres principales tipos de célula: las células mioepiteliales contráctiles, las células del lumen alveolar y las de los ductos (Oakes *et al*, 2008). La leche secretada por el epitelio se drena desde el alvéolo hasta los espacios alveolares, los ductos intralobulares, los ductos colectores centrales, los ductos interlobulares y lactíferos, el seno lactífero, la cisterna, el canal del pezón y finalmente hasta el orificio del pezón (Kerro-Dego *et al*, 2002). La estructura anatómica de la glándula mamaria bovina, permite el almacenamiento del 80% de la leche producida en la cisterna de la glándula, hecho que puede ser utilizado por organismos patógenos como vía de entrada para viajar hasta los alvéolos y las células epiteliales que la conforman (Svennersten-Sjaunja y Olsson, 2005).

3.3 Organismos patógenos asociados con la mastitis

Los organismos patógenos que afectan al tejido de la glándula mamaria se dividen en contagiosos y ambientales. Los organismos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria del hospedero, causando infecciones crónicas y se diseminan a otros cuartos e incluso de animal a animal debido principalmente a procedimientos antihigiénicos durante el ordeño (Kerro-Dego *et al*, 2002). Los patógenos ambientales son organismos oportunistas que causan infecciones moderadas que normalmente son combatidas rápidamente por el sistema inmune del hospedero (Passey *et al*, 2008).

Dentro de los organismos contagiosos causales de la mastitis se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma spp* y *Corynebacterium spp*. Dentro de los patógenos ambientales se consideran a *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, y especies del género *Staphylococcus* con excepción de *S. aureus* (Almeida y Oliver, 2001). *S. aureus* es el patógeno de mayor importancia dentro de los casos de mastitis en los hatos lecheros, ya que es el que se aísla con mayor frecuencia (> 70%) en casos de mastitis tanto clínica como subclínica (Burton y Erskine, 2003).

3.4 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un patógeno oportunista importante que causa una gran variedad de infecciones en humanos y animales (Brouillette *et al*, 2003). Esta bacteria pertenece a la familia Micrococcaceae, es un microorganismo esférico Gram-positivo de aproximadamente 0.8 micrómetros de diámetro, inmóvil, no forma esporas, generalmente no capsulado aunque en ocasiones pueden aparecer aislamientos con cápsula. Es un microorganismo facultativo intracelular y se distingue de otras especies de *Staphylococcus* por la pigmentación color oro de sus colonias (Lowy, 1998).

3.5 Interacción *Staphylococcus aureus*-hospedero en la mastitis bovina

S. aureus se ha aislado de la mayoría de las superficies de los bovinos, incluyendo la cabeza, cuerpo, patas e incluso en ubres de vacas sanas (Sears y McCarthy, 2003). En la mastitis bovina se considera a *S. aureus* como un patógeno prevalente y su principal reservorio se localiza en los cuartos de las glándulas mamarias. Una vez que *S. aureus* ha dañado considerablemente al epitelio mamario la mastitis causada por este microorganismo puede complicarse con infecciones secundarias, principalmente de organismos patógenos ambientales como *E. coli* (Burvenich *et al*, 2003).

S. aureus puede invadir a sus células hospederas y sobrevivir intracelularmente por largos periodos de tiempo, esta propiedad contribuye potencialmente a su persistencia, protección a antibióticos y evasión de la respuesta inmune, este mecanismo de invasión lo realiza en células fagocíticas no profesionales como las células endoteliales, epiteliales y queratinocitos (Bayles *et al*, 1998). Los mecanismos que contribuyen a todo el proceso de endocitosis de *S. aureus*, han sido completamente explicados. Sin embargo, los procesos intracelulares modulados por *S. aureus* en células epiteliales se desconocen (Garzoni *et al*, 2007). La infección durante la mastitis se origina principalmente en las glándulas lesionadas por procesos de ordeño manuales o mecánicos que son un blanco para *S. aureus*, los cuales pueden ser transportados al interior del seno

lactífero del pezón. Una vez que *S. aureus* ha contaminado el orificio del pezón puede persistir y multiplicarse, y posteriormente entrar al canal del pezón. Por otro lado, esta bacteria a su vez produce hemolisinas que dañan el tejido permitiendo la colonización intracelular, ya sea por una colonización progresiva o por cambios en la presión intramamaria, particularmente al final del ordeño (Burton y Erskine, 2003). El contacto con la leche puede permitir la transferencia de *S. aureus* hacia el seno del pezón y su diseminación en la glándula mamaria por cambios en la presión en el interior de la misma (Kerro-Dego *et al*, 2002; Burton y Erskine, 2003).

Durante la mastitis, el principal mecanismo de defensa lo constituyen las células de defensa polimorfonucleares (macrofágos, monocitos y neutrófilos). Sin embargo, los mecanismos de defensa del hospedero no pueden prevenir por completo una infección intramamaria, debido a que *S. aureus* cuenta con una gran batería de factores que le permiten evadir estos mecanismos. Algunos factores que favorecen el establecimiento de la mastitis son los siguientes:

1. Factores de virulencia y mecanismos de *S. aureus* tales como la producción de factores antifagocíticos (proteína A y encapsulamiento), la adhesión a las células del epitelio mamario, la supervivencia intracelular en el epitelio y macrófagos, la producción de exotoxinas y proteasas.
2. Defectos de protección de la célula hospedera, como la reducción en la eficacia de los fagocitos debido a la fagocitosis de componentes de la leche, lo cual provoca una disminución de enzimas hidrolíticas en estas células.

Los factores de virulencia de *S. aureus* implican productos de secreción, componentes estructurales y mecanismos que contribuyen a la habilidad de la bacteria para sobrevivir en el hospedero y causar la mastitis (Kerro-Dego *et al*, 2002). Adicionalmente, *S. aureus* presenta una gran variedad de componentes y productos de secreción que contribuyen a la patogénesis de la infección (Figura

2), estos pueden tener funciones en conjunto con otros componentes o actuar individualmente, dentro de ellos se destacan:

1) Proteínas de superficie: que son expresadas durante la fase exponencial de crecimiento de *S. aureus* (Proteína A, proteínas de unión a elastina, colágena y fibronectina).

2) Proteínas de secreción: que se expresan durante la fase estacionaria de crecimiento (enterotoxina B, TSST-1 y α -toxina) (Lowy, 1998).

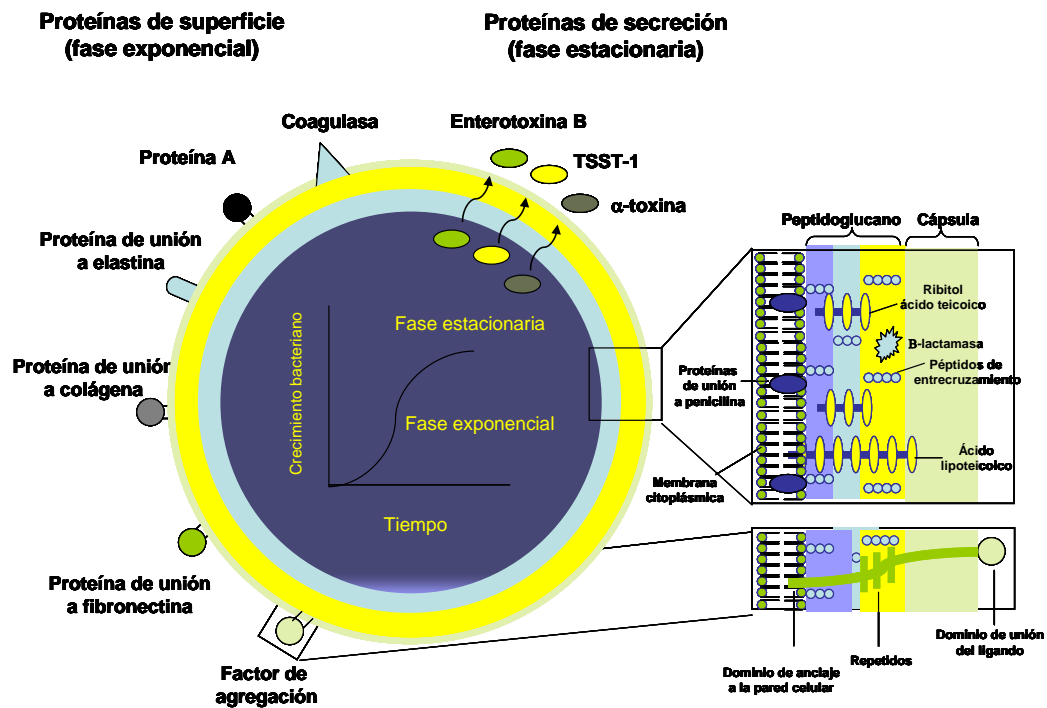


Figura 2. Estructura de *Staphylococcus aureus*. Se muestran las proteínas de superficie y secreción. La síntesis de la mayoría de estas proteínas es dependiente de la fase de crecimiento y son controladas por genes regulatorios como *agr* (Lowy, 1998).

3.6 Mecanismos de endocitosis de *S. aureus* por el epitelio mamario bovino

Algunos patógenos utilizan rutas endocíticas de su hospedero para mediar su internalización a las células blanco (Doherty y McMahon, 2009). La endocitosis de bacterias patógenas ocurre por dos tipos de internalización inducida. Uno de estos se refiere al mecanismo "zipper" y ocurre por el contacto directo de los ligandos y receptores que progresivamente invaginan al microorganismo (Almeida y Oliver, 2001).

La función fisiológica de la gran diversidad de los glicoconjugados de la membrana celular del epitelio mamario incluye la regulación de procesos celulares como la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, adhesión, motilidad, crecimiento y diferenciación. La interacción entre *S. aureus* y la glándula mamaria no solo se refiere a la interacción con los factores de la membrana celular, sino también con glicoproteínas extracelulares y otras sustancias asociadas con la membrana celular, como pueden ser los proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas (Kerro-Dego *et al*, 2002).

3.6.1 Integrinas

Las integrinas son los receptores más importantes para moléculas de la matriz extracelular de todos los vertebrados. Además de regular la adhesión celular y la migración, estas participan en complejos importantes de procesos de señalización que comprenden desde el crecimiento celular hasta la apoptosis (Yamada *et al*, 2003).

El receptor de integrina conecta la matriz extracelular con la red de filamentos de actina de las células epiteliales. Se sabe que el tráfico de integrinas desde pozos intracelulares hacia la membrana celular en células epiteliales está regulado por el estímulo de citocinas proinflamatorias, principalmente de TNF- α e IFN- γ (Clark *et al*, 2009). La integrina $\alpha 5\beta 1$ sirve como un receptor de membrana que interactúa con las proteínas de unión de *S. aureus*. Esta unión de la bacteria

con las integrinas produce una cascada de transducción de señales que resulta en la endocitosis de la bacteria por la célula hospedera mediante el mecanismo "zipper" (Figura 3) (Alberts *et al*, 2002).

La invasión de las células epiteliales por *S. aureus* (Figura 3) es un proceso de endocitosis específico que involucra la participación de los elementos del citoesqueleto (Kerro-Dego *et al*, 2002). Además, la capacidad de *S. aureus* de invadir a un gran número de células fagocíticas no profesionales *in vitro* se relaciona con la expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina de la bacteria, a la fibronectina soluble extracelular y a las integrinas del hospedero (Brouillette *et al*, 2003). Se ha reportado en varios aislamientos de *S. aureus* provenientes de infecciones intramamarias bovinas, su capacidad de unirse a fibronectina y colágena. La fibronectina sirve como un puente de comunicación que une a *S. aureus* con la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Yamada *et al*, 2003).

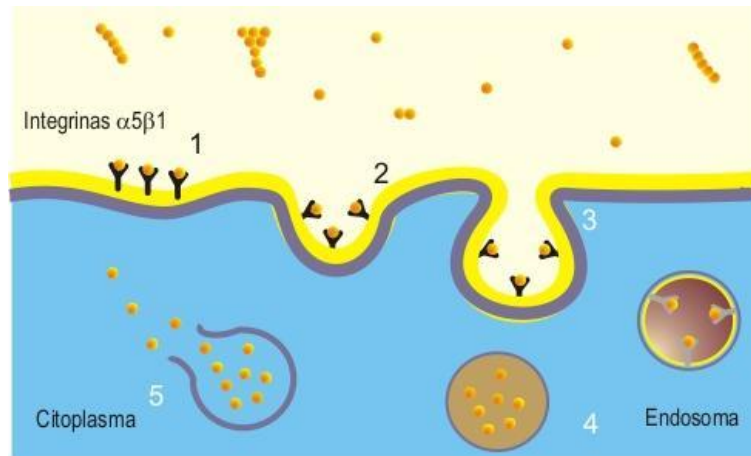


Figura 3. Mecanismo de endocitosis de *Staphylococcus aureus* en las células del epitelio mamario. 1. El receptor de integrina $\alpha 5\beta 1$ conecta la matriz extracelular con la red de filamentos de actina de las células epiteliales. 2. La adhesión de *S. aureus* estimula la polimerización de actina de la célula y se endocita por la formación de un endosoma (3) que es transportado al interior de la célula (4), así comienza la proliferación intracelular de *S. aureus* y la producción de hemolisinas que rompen el endosoma (5) liberando las bacterias que rompen la célula e invaden otros tejidos (Alberts *et al*, 2002).

3.7 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona proteica secretada principalmente por los lactotrofos localizados en la hipófisis anterior de los vertebrados, esta hormona actúa a través de un mecanismo endocrino clásico, puesto que es producida por una glándula y es transportada a través de la circulación para actuar sobre células blanco localizadas en tejidos periféricos (Bole-Feysot, 1999). Originalmente se identificó a la PRL por su capacidad de estimular el desarrollo de la glándula mamaria y la lactancia (Kelly *et al*, 2001). La secreción de PRL es regulada por acción del hipotálamo mediante factores inhibitorios y estimuladores. Los que predominan son los factores inhibitorios y éstos son mediados principalmente por dopamina; así como también por un número de agentes que actúan como factores liberadores de PRL, como la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), la oxitocina y la neurotensina. La PRL pertenece a una familia de hormonas que incluye al lactógeno placentario y a la hormona de crecimiento (GH). Se cree que estas hormonas provienen de un gen ancestral común ya que presentan una gran similitud en su estructura primaria y en su actividad biológica (Neville *et al*, 2002).

3.7.1 Gen de la PRL y su estructura primaria

El gen que codifica para la prolactina humana (hPRL) se localiza en el cromosoma 6, y está compuesto por 5 exones y 4 intrones con una longitud de aproximadamente 10 kb. El DNA complementario (cDNA) de la hPRL está compuesto por 914 nucleótidos y contiene un marco de lectura abierto que codifica para una prehormona de 227 aminoácidos (aa), incluyendo un péptido señal de 28 aa (Sodhi y Tripathi, 2008). La PRL está presente en todos los vertebrados, se han aislado y secuenciado los cDNA que codifican para la PRL de varias especies.

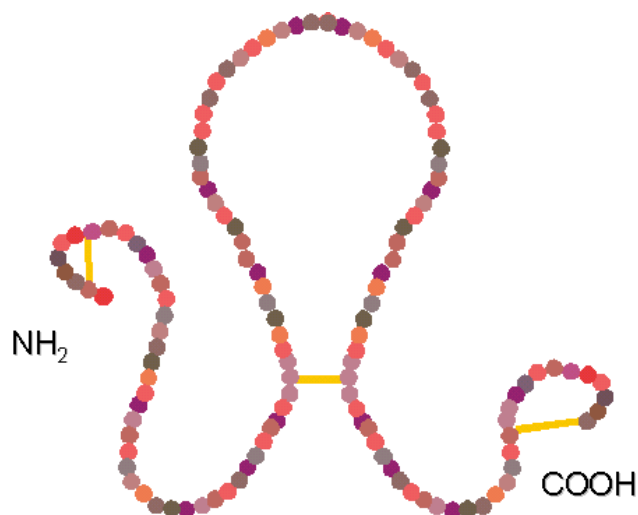


Figura 4. Esquema de la estructura de la prolactina. La prolactina humana y la prolactina bovina comparten el 74% de identidad de aminoácidos (Sinha, 1995).

A excepción de los peces, todas las PRLs que se han identificado contienen de 197 a 199 aa en su forma nativa, incluyendo 6 cisteínas que forman tres enlaces disulfuro intramoleculares que se generan entre seis residuos de cisteínas. El gen que codifica para la prolactina bovina se localiza en el cromosoma 23 (Hallerman *et al*, 1988). Está compuesto de 5 exones que codifican para una proteína madura de 199 aminoácidos (Camper *et al*, 1984) (Figura 4). La secuencia de aminoácidos alcanza el 97% de similitud entre primates y el 56% entre primates y roedores (Sinha, 1995; Bole-Feysot *et al*, 1998).

3.7.2 Funciones de la PRL

La PRL es una hormona que se ha asociado con más de 300 funciones diferentes que incluyen eventos reproductivos, inmunológicos, conductuales, osmoreguladores e incluso patológicos, por lo que se le ha reconsiderado como un factor de crecimiento, neurotransmisor e incluso una citocina. Dentro de las funciones reproductivas, la lactancia es quizá uno de los eventos asociados a la secreción de PRL que más ha sido estudiado. La PRL regula el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, la síntesis de la leche y el mantenimiento de la

secreción láctea. En este sentido la PRL en conjunto con otras hormonas es responsable del crecimiento de la glándula mamaria durante el embarazo. Así mismo regula las proteínas, azúcares y lípidos de la leche (Sodhi y Tripathi, 2008). Se ha demostrado también que la PRL es luteotrófica, ya que mantiene el cuerpo lúteo durante la preñez (Neville *et al*, 2002). Además de la producción de la PRL hipofisiaria, se ha encontrado que otros órganos y glándulas son capaces de expresar PRL como la piel, el cerebro, el miometrio, y las glándulas exocrinas como la glándula mamaria y las lagrimales, en estos casos la PRL actúa bajo un mecanismo autocrino o paracrino (Kelly *et al*, 2001).

El epitelio mamario es uno de los principales tejidos blanco de la PRL, ya que durante el establecimiento de la lactancia y el parto regula diversas funciones metabólicas en este tejido, estimulando principalmente la síntesis de las proteínas de la leche, y en conjunto con la hormona de crecimiento, regula la producción láctea (Hockett *et al*, 2000).

A pesar de la diversidad funcional de la PRL, su participación en el establecimiento de la infección y en la endocitosis de microorganismos patógenos por las células del hospedero ha sido poco estudiada. En este sentido, se ha descrito la participación de la bPRL en la modulación de la respuesta inmune innata en epitelio mamario bovino (Oakes *et al*, 2008).

3.7.3 Receptor de la PRL

La PRL ejerce un mayor número de funciones en comparación con las demás hormonas hipofisiarias juntas. El paso inicial para la acción de la PRL, como en todas las hormonas proteicas, es la unión a receptores de membrana específicos (Figura 5). El receptor de la PRL (RPRL) pertenece a la superfamilia de receptores para citocinas (Bole-Feysot *et al*, 1998).

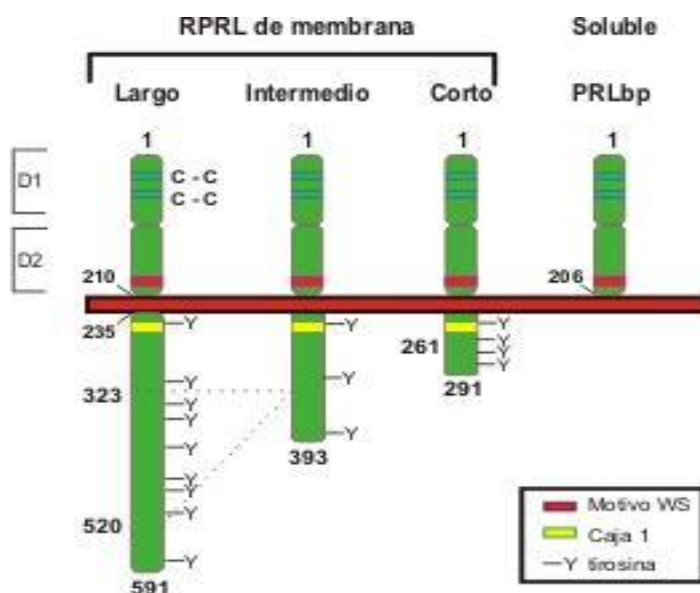


Figura 5. Representación de las isoformas del receptor de prolactina. Todas las isoformas presentan dominios extracelulares idénticos. El subdominio D1 presenta dos pares de enlaces disulfuro unidos a residuos de cisteína (C-C) y el subdominio D2 contiene el motivo WS. La variación de las distintas isoformas del receptor se presenta en el tamaño de la región citoplásmica, presentando características similares entre ellas, como la caja 1 que se encuentran en todas las isoformas y los residuos de tirosina indicados (Bole-Feysot *et al*, 1998).

La activación del RPRL requiere de su homodimerización por efecto de la unión de la hormona; una molécula de PRL se une a dos moléculas del receptor, posteriormente se activa la vía de la cinasa Janus (JAK) y de los translocadores activados por la transducción de señales (Stat) (Figura 6). La expresión del receptor de PRL es ubicua, por lo que es difícil encontrar un tejido que no lo exprese; sin embargo, la proporción de las variantes del receptor expresadas pueden diferir de tejido a tejido, y dependen del estado fisiológico del individuo, como ocurre durante las distintas fases del ciclo estral, preñez o lactancia (Neville *et al*, 2002).

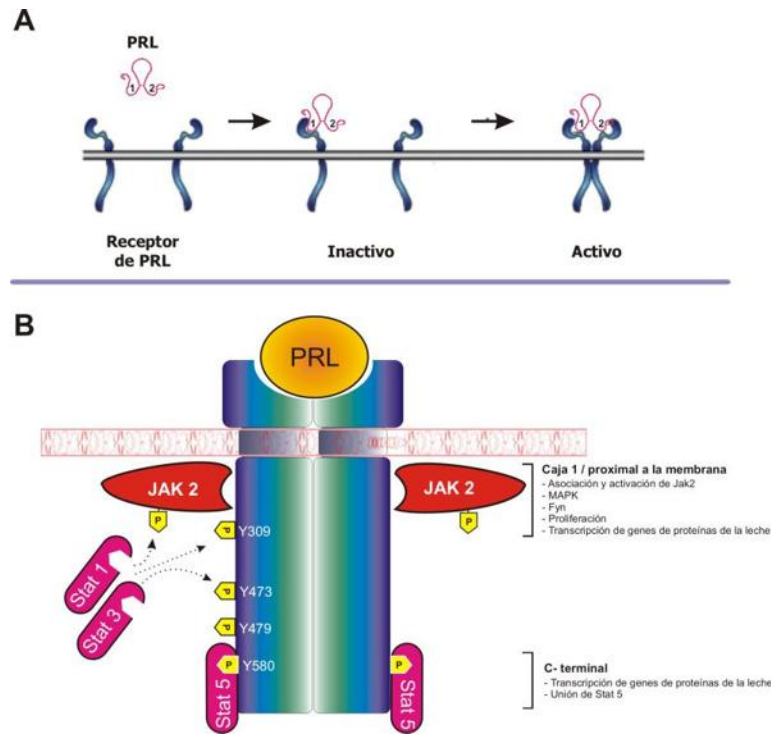


Figura 6. Representación esquemática de la activación del RPRL. **A.** La activación del RPRL por la PRL induce su dimerización. La unión de receptor–ligando ocurre de manera secuencial. Primero la hormona interactúa con el receptor en su sitio de unión 1, formando un complejo ligando-receptor inactivo. Posteriormente la hormona se une a un segundo receptor a través de su sitio 2, lo cual genera la dimerización y la generación de un complejo activo. **B.** Relación de estructura y función de la forma larga del RPRL (dominio citoplásmico). La caja 1 es necesaria para la unión de JAK2. Existen 6 tirosinas que pueden ser fosforiladas. El aminoácido Y580 en el extremo C-terminal, es el que activa a Stat5, y se supone que es el principal sitio de unión de esta proteína. Y479 y Y473 pueden activar también a Stat5. Stat 1 y 3 tienden a interactuar con residuos en regiones proximales a la membrana del receptor. Las regiones proximales del receptor, que es común en todas las isoformas del RPRL, son necesarias para la interacción y la activación de JAK2, Fyn y la vía de las MAP cinasas, así como también la activación de la proliferación celular y la transcripción de las proteínas de la leche (Bole-Feysot *et al*, 1998).

3.8 Respuesta inmune innata de la glándula mamaria bovina

En la glándula mamaria bovina se presentan distintas barreras de defensa, las cuales permiten prevenir y combatir enfermedades infecciosas. Una de las primeras barreras de defensa se presenta en el canal del pezón, evitando la entrada de organismos patógenos en la glándula mamaria. La segunda barrera de defensa implica una respuesta humoral, principalmente por la presencia del sistema de complemento, el cual regula el aumento de la permeabilidad de vasos sanguíneos y tejidos, permitiendo la llegada de componentes proinflamatorios del

complemento hasta el sitio de la infección. La tercera barrera de defensa implica la respuesta celular del tejido dañado o inmunidad innata (Sordillo *et al*, 1997). La respuesta inmune innata en mamíferos es uno de los mecanismos de defensa más importantes, el cual ayuda a contrarrestar enfermedades principalmente de etiología infecciosa, presentando la capacidad de responder a los signos tempranos de una infección y posee la característica de ser inespecífico (Rainard y Riollet, 2006; Lutzow *et al*, 2008).

Las principales células de la respuesta inmune innata comprenden: neutrófilos, macrófagos, células asesinas (natural killers) y células dendríticas. Los macrófagos son el principal tipo celular en la leche de las vacas sanas, en las secreciones de las glándulas en fase de involución y en el tejido glandular del epitelio mamario. Estos macrófagos son células fagocíticas que ingieren y eliminan a patógenos causantes de mastitis bovina (Atabai *et al*, 2002). Los neutrófilos son componentes celulares esenciales en la respuesta inmune, su acumulación y activación en el sitio de infección requiere la inducción local de moléculas y elementos de la respuesta inmune innata, incluyendo varias quimiocinas y citocinas (Lutzow *et al*, 2008).

Aún cuando no se ha comprobado la participación directa del epitelio mamario bovino en el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación, se ha demostrado que en presencia de una infección, éste es capaz de producir una gran variedad de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y metabolitos derivados del ácido araquidónico. Las citocinas son consideradas también como hormonas, ya que se producen de manera transitoria y actúan localmente con una actividad biológica muy potente, incluso con concentraciones muy bajas de las mismas (Sordillo *et al*, 1997).

Hasta la fecha se han identificado, purificado y caracterizado en el tejido epitelial >30 citocinas (Oakes *et al*, 2008). En este sentido se sabe que el epitelio mamario expresa de manera constitutiva citocinas como la IL-1 e IL-6, y de manera inducida expresa principalmente IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Connor *et al*, 2008). TNF- α actúa como un mediador central de las funciones

inflamatorias y juegan un papel importante durante la mastitis, puesto que su concentración en la leche aumenta considerablemente en presencia de una infección. El epitelio mamario es también capaz de producir componentes de defensa inducibles, por ejemplo la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), un elemento importante en la actividad antimicrobiana de macrófagos activos. Esta enzima cataliza la conversión de L-arginina a citrulina y óxido nítrico (NO), un radical altamente activo. Se ha demostrado que la PRL es un inmunomodulador potente que presenta efectos estimulantes en células del sistema inmune (Meli *et al*, 1997). Se ha descrito la participación del NO durante la diferenciación de la glándula mamaria bovina en los diferentes estadios de la lactancia regulando la presencia del RPRL en la membrana celular (Bolander, 2001).

La vía utilizada por la PRL para incrementar las concentraciones de NO es por la activación de iNOS vía la activación del RPRL (Figura 7) (Bolander, 2002). La activación de iNOS se presenta por la modulación de distintos factores; por un lado se da por el incremento en los niveles de calcio intracelular que puede ser directamente por la vía de calmodulinas o indirectamente por la estimulación de la fosfatasa 2B, la cual defosforila a la enzima en sitios inhibitorios (Bolander, 2005). Por otro lado, en la mayoría de los distintos tipos celulares la arginina, que es el sustrato de iNOS, está limitada por su concentración, al incrementarse estos niveles se puede activar a iNOS (Bolander, 2001).

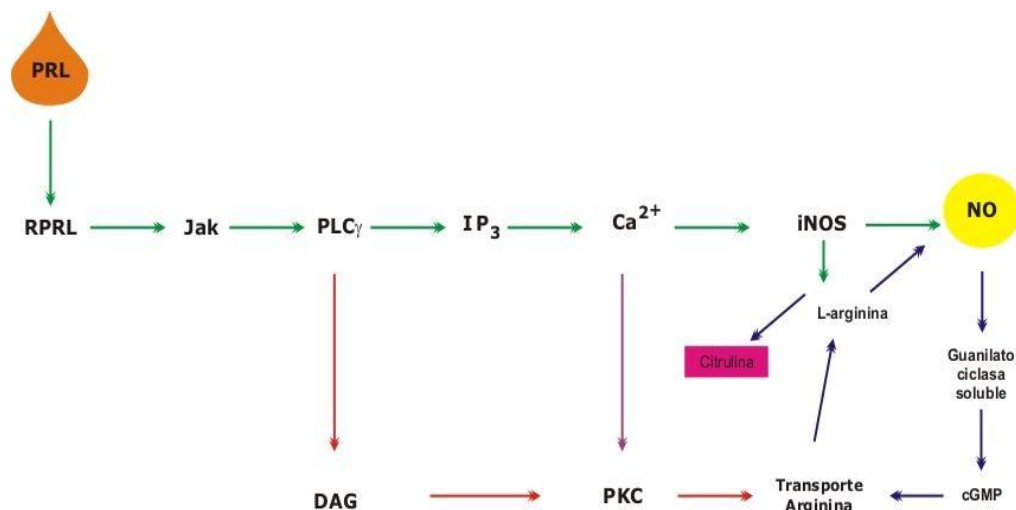


Figura 7. Mecanismos de producción de NO modulados por PRL. Vía activación de iNOS. Abreviaciones: DAG, diacilglicerol, IP₃, inositol trifosfato, NO, óxido nítrico, PLC γ , fosfolipasa C γ , PKC, proteína cinasa C (Bolander, 2002).

Todos estos mecanismos de activación de iNOS están regulados por PRL, esta hormona tiene la capacidad de elevar los niveles de calcio y estimular el transporte de arginina (Bolander, 2001).

3.8.1 Receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos

Para el establecimiento de una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria se requiere que la concentración del patógeno en la leche se eleve a un punto que provoque el reconocimiento del patógeno por el hospedero. Esto se ha demostrado en mastitis experimentales con *S. aureus* y *E. coli*. Este crecimiento bacteriano va acompañado por la liberación de componentes bacterianos que son reconocidos por el hospedero. Este evento es un paso crucial para el establecimiento de la respuesta inmune innata o celular (Huszenicza *et al*, 2004).

Durante las infecciones intramamarias los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que incluyen el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas y los ácidos lipoteicoicos (LTA) de gram-positivas combinados con peptidoglicanos (PTG), son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR) de membrana o citoplásmicos, los cuales son expresados por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales mamarias (Rainard y Riollet, 2006). El reconocimiento de estos PAMPs inicia la activación de vías de señalización que inducen la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la secreción de quimiocinas proinflamatorias, las cuales reclutan poblaciones de leucocitos del torrente sanguíneo al sitio de la infección (Mount *et al*, 2009). En la glándula mamaria bovina se han reportado dos receptores tipo Toll, el 2 y el 4, que reconocen componentes de bacterias gram-positivas y gram-negativas, respectivamente (Figura 8) (Rainard y Riollet, 2006). Los TLRs son conocidos principalmente por su participación en la fagocitosis de bacterias por células fagocíticas profesionales como macrófagos y

neutrófilos. Sin embargo, su participación en células fagocíticas no profesionales como el endotelio y el epitelio no ha sido completamente descrita (Burton y Erskine, 2003).

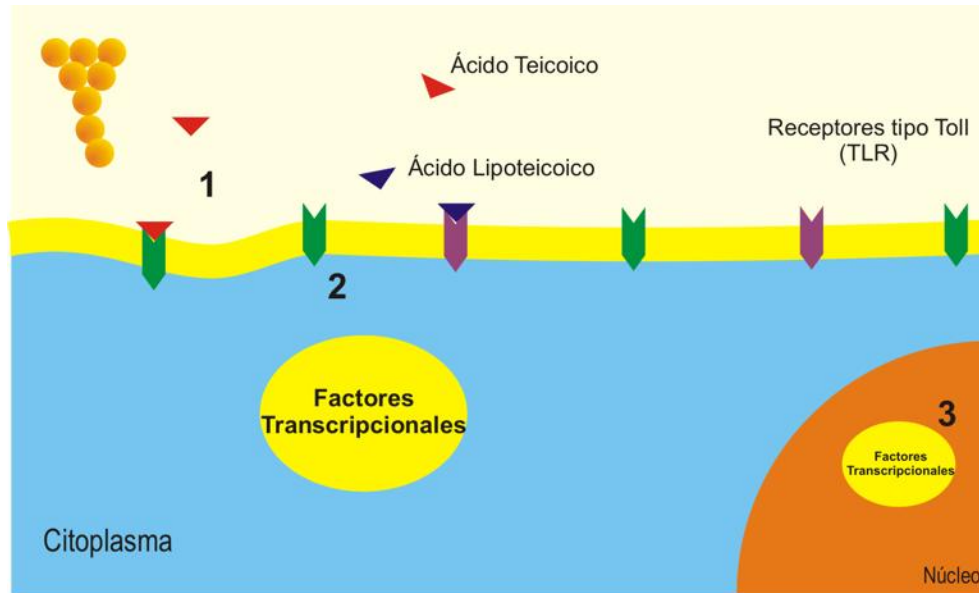


Figura 8. Receptores tipo Toll expresados en el epitelio mamario bovino. Los TLR son los principales receptores que reconocen estructuras bacterianas conservadas, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En la glándula mamaria bovina se han reportado distintos receptores. 1. TLR2 reconoce peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos de bacterias gram-positivas. 2. La activación del receptor activa factores transcripcionales que a su vez se translocan al núcleo (3) para regular la expresión de genes de la respuesta inflamatoria (Mount *et al*, 2009).

3.9 Activación del factor transcripcional NF- κ B en células de epitelio mamario bovino

La respuesta inflamatoria se caracteriza por una activación coordinada de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores tanto proinflamatorios como antiinflamatorios en las células afectadas y en las células de defensa reclutadas de la sangre (Lawrence, 2009).

La activación de la respuesta inmune innata en el epitelio mamario bovino, (ej. mediada por PRL) incluye la expresión de citocinas proinflamatorias,

quimiocinas y péptidos antimicrobianos, la mayoría de estos componentes del proceso inflamatorio dependen de la activación del factor transcripcional NF- κ B, y por la activación de la vía principal regulada por PRL, JAK/Stat (Geymayer y Doppler, 2000; Gútierrez-Barroso *et al*, 2008).

NF- κ B fue inicialmente identificado como un factor nuclear que se unía a los genes que codifican para la cadena ligera de las inmunoglobulinas en linfocitos B. Sin embargo, actualmente se sabe que está ampliamente distribuido en todos los tipos celulares (Yu-Lee, 2002). La familia de factores transcripcionales NF- κ B regulan distintas funciones celulares como la respuesta inmune, inflamación, crecimiento y desarrollo celular. Se ha reportado que están activos constitutivamente en una gran variedad de líneas celulares de carcinoma mamario (Geymayer y Doppler, 2000).

En un proceso infeccioso, un gran número de bacterias pueden activar directamente a NF- κ B en células epiteliales por la unión a TLRs. La activación de NF- κ B promueve la expresión de alrededor de 150 genes. La mayoría de las proteínas codificadas se relacionan con la respuesta inmune. Estos incluyen 27 citocinas y quimiocinas, receptores requeridos para el reconocimiento inmunológico y receptores requeridos para la adhesión de neutrófilos y trans migración por el torrente sanguíneo (Tabla 1) (Beinke y Ley, 2004; Pahl, 1999).

Tabla 1. Elementos de la respuesta inflamatoria regulados principalmente por el factor transcripcional NF- κ B en glándula mamaria bovina

Elemento	Factor regulado
Citocinas proinflamatorias	TNF- α (Tumor necrosis factor α) IL-1 (Interleukin 1) IL-6 (Interleukin 6)
Quimiocinas	MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 α) RANTES (Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted)
Moléculas de adhesión	E-selectina VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1)
Moléculas efectoras y enzimas	β -defensinas LAP (Lingual antimicrobial peptide) TAP (Tracheal antimicrobial peptide) iNOS (Inducible nitric oxide sintase)

(Beinke y Ley, 2004).

Para desencadenar la respuesta inflamatoria, el incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias producidas por las células epiteliales induce la activación de NF- κ B bajo un mecanismo autocrino o paracrino (Boutet *et al*, 2007).

Normalmente NF- κ B se encuentra en el citoplasma de las células animales de manera inactiva, formando un complejo con la proteína I κ B, ésto impide que NF- κ B se transloque al núcleo y que se transcriban genes relacionados con la respuesta inflamatoria (Figura 9) (Karin y Ben-Neriah, 2000; Beinke y Ley, 2004).

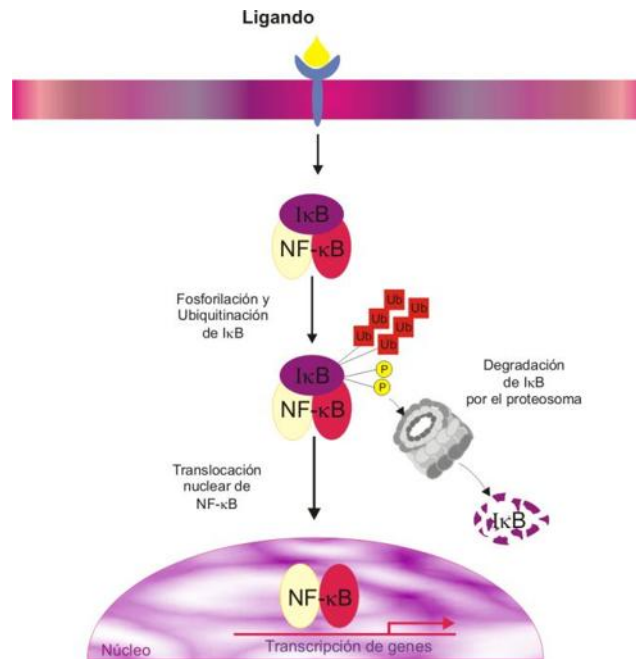


Figura 9. Modelo de la vía de activación de NF-κB. Se presentan varios estímulos que pueden inducir la fosforilación y poliubiquitinización de los complejos IκBs, los cuales son degradados en el proteosoma 26 S. Los dímeros de NF-κB asociados con este complejo son liberados y translocados al núcleo, en donde se unen a regiones promotoras de genes para modular su expresión (Beinke y Ley, 2004).

NF-κB está compuesto por homo o heterodímeros de polipéptidos pertenecientes a la familia Rel, los cuales se caracterizan por poseer un dominio en el extremo N-terminal, RDH (dominio homólogo de Rel) el cual modula la unión al DNA, la localización nuclear y la dimerización de las subunidades (Karin y Greten, 2005).

Los mamíferos expresan 5 monómeros de NF-κB: Rel A (P65), Rel B, c-Rel, P50 y P52. Estos dos últimos son sintetizados como precursores de 105 y 100 kDa respectivamente (Beinke y Ley, 2004). Las subunidades Rel A y c-Rel, tienen dominios transactivadores en el extremo C-terminal en los RDHs y pueden activar la transcripción de genes blanco. Rel B contiene también un dominio transactivador y puede funcionar como activador de NF-κB cuando forma heterodímeros con P50 y P52. Sin embargo, los complejos Rel B/ Rel A funcionan como inhibitorios, puesto que no se pueden unir al DNA (Karin y Greten, 2005).

El heterodímero más abundante de NF- κ B está compuesto por P50/P65 en la mayoría de las distintas líneas celulares, incluyendo el epitelio mamario bovino (Yu-Lee, 2002).

Las proteínas I κ B (que inhiben la translocación nuclear de NF- κ B) conforman una familia de moléculas estructural y funcionalmente relacionadas. Se han identificado siete isoformas de I κ B: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, P100 y P105. Todas las proteínas de I κ B contienen copias múltiples de secuencias de 30-33 aminoácidos llamados repetidos de ankirina; la interacción específica de estos repetidos y el RDH es la característica que define la interacción entre NF- κ B e I κ B (Ghosh *et al*, 1998).

3.9.1 Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la activación del factor transcripcional NF- κ B

Los tratamientos terapéuticos para procesos inflamatorios que se utilizan con mayor frecuencia para inhibir o disminuir la inflamación, consisten en la administración de compuestos antiinflamatorios como glucocorticoides y antiinflamatorios no esteroideos (AINES), estos últimos, inhiben la translocación al núcleo de NF- κ B lo que conduce a una inhibición o supresión de la expresión de citocinas proinflamatorias, dependiendo de la composición del AINE administrado (Pahl, 1998). En el caso específico del ácido acetilsalicílico (AAS, principal metabolito de la aspirina, perteneciente al grupo de AINES), se ha demostrado que inhibe la ruta del factor NF- κ B mediante la inactivación específica de la proteína cinasa IKK β (Riordan *et al*, 2007). Como ya se mencionó anteriormente, en una célula no estimulada la translocación nuclear del factor NF- κ B se encuentra inhibida por proteínas de la familia de proteínas inhibidoras B (I κ B). La activación del factor NF- κ B involucra que I κ B sea fosforilado por la cinasa IKK, la cual está constituida por las cinasas IKK α y IKK β . Una vez fosforilada, I κ B es ubiquitinizada para posteriormente ser degradada por el proteosoma 26S. El efecto del AAS y del salicilato es llevado a cabo por la unión

al complejo IKK β , que por competencia reducen la unión del ATP evitando que el factor NF- κ B sea translocado al núcleo, dando como resultado la inhibición de la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria (Yin *et al*, 1998).

4. Antecedentes

A pesar de que la PRL ejerce diversos efectos directamente en el epitelio mamario bovino, se conoce poco acerca de su participación en el establecimiento de la mastitis bovina y en la endocitosis de microorganismos patógenos como *S. aureus*, así como en la regulación de factores transcripcionales responsables de la respuesta inflamatoria. No obstante, existen evidencias que demuestran la participación de la PRL en la multiplicación intracelular de *Mycobacterium avium* en macrófagos bovinos, y en la proliferación intracelular de *Toxoplasma gondii* en células de la microglia murina (Feola *et al*, 1999; Benedetto *et al*, 2001).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró que la bPRL (5 ng/ml) estimula la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB. Así mismo, esta hormona en conjunto con la infección modula la expresión de elementos de la respuesta inmune innata en estas células, específicamente algunas citocinas proinflamatorias, defensinas, la sintasa de óxido nítrico y la producción de óxido nítrico (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008). Estos genes de la inmunidad innata se expresan a través de la activación del factor transcripcional NF- κ B; sin embargo, se desconoce si la participación de la bPRL en procesos inflamatorios causados por *S. aureus* favorece la activación o inhibición de este factor en las CEMB.

En este sentido, se ha demostrado también que la PRL activa al factor NF- κ B en el epitelio mamario bovino, regulando la expresión de citocinas proinflamatorias (Boutet *et al*, 2007). Con estos antecedentes, en este trabajo se evaluó la participación del factor transcripcional NF- κ B en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas con bPRL.

5. Justificación

La mastitis bovina es una patología que genera pérdidas económicas considerables en la ganadería lechera a nivel mundial. Las infecciones intramamarias toman relevancia debido a que causan el 80% de los casos de mastitis. *S. aureus* es el patógeno prevalente en esta enfermedad y su capacidad de ser endocitado por las células del epitelio mamario le confiere la propiedad de evadir a los tratamientos terapéuticos y al sistema inmune. Los tratamientos basados en antibióticos tienen una eficiencia del 40% en los casos de mastitis bovina, lo que provoca una elevada incidencia y cronicidad de la enfermedad (Sears y McCarthy, 2003). Dado lo anterior, es necesario evaluar los mecanismos y los procesos celulares implementados por *S. aureus* que desencadenan la mastitis, tanto en los procesos de endocitosis, así como también las vías de señalización moduladas por esta bacteria intracelularmente. Lo anterior puede contribuir al conocimiento de la interacción hospedero-patógeno en infecciones inflamatorias como la mastitis, con el fin de implementar estrategias terapéuticas eficientes para combatir la enfermedad y que hasta la fecha han sido poco estudiadas.

6. Hipótesis

La translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B regulada por bPRL en las células de epitelio mamario bovino se induce durante la endocitosis de *S. aureus*.

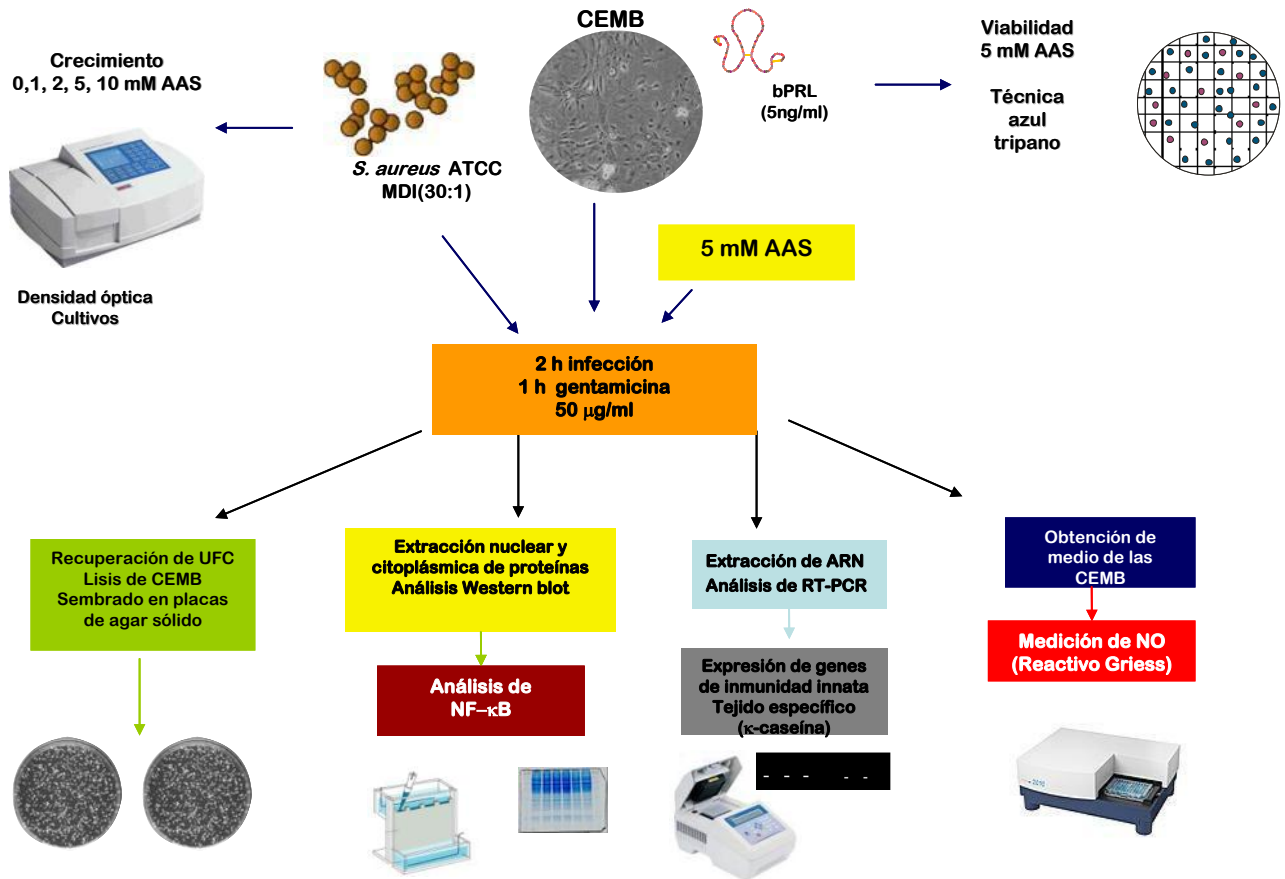
7. Objetivo general

Determinar la regulación de la vía de señalización de NF- κ B durante la endocitosis de *S. aureus* en células de epitelio mamario bovino estimuladas con bPRL.

8. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del ácido acetilsalicílico sobre la viabilidad de las CEMB y el crecimiento de *S. aureus*.
2. Analizar la regulación del factor NF- κ B en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas con *S. aureus*.
3. Evaluar la expresión de genes de la respuesta inmune innata (TNF- α , TAP, iNOS) en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas con *S. aureus*.
4. Determinar la producción de óxido nítrico (NO) en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas con *S. aureus*.

9. Estrategia experimental



10. Materiales y Métodos

10.1 Ácido acetilsalicílico (AAS)

Se utilizó el AAS de Sigma, el cual se disolvió en etanol, por lo que este se incluyó en una condición experimental como "vehículo".

10.2 Prolactina

Se utilizó el estándar de bPRL de los Institutos Nacionales de Salud (NIH), donado por la Dra. Carmen Clapp (Instituto de Neurobiología, UNAM).

10.3 Cultivo de *Staphylococcus aureus*

Se empleó la cepa patógena de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso de mastitis clínica y con capacidad de ser endocitada por las células epiteliales mamarias bovinas. La cepa se cultivó en medio Luria-Bertani (LB, Difco) a 37°C. El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de cultivos crecidos en agitación durante 16 h a 37°C.

10.4 Cultivos primarios de CEMB

Se utilizaron células de epitelio mamario bovino obtenidas de tejido alveolar de la ubre de vacas lactantes, las CEMB se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente (Anaya-López *et al*, 2006). Para su cultivo se empleó la mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (DMEM/F12, Sigma), suplementado con penicilina-estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), 10% de suero fetal bovino (Hyclone), insulina e hidrocortisona (Sigma, 10 µg/ml de cada una).

10.5 Efecto del AAS sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la viabilidad de las CEMB

Para evaluar el crecimiento de *S. aureus* en presencia del AAS, las bacterias fueron cultivadas en medio líquido LB suplementado con distintas

concentraciones de AAS (2, 3, 5, 10 y 20 mM) y se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 12 y 24 h). Se utilizó un inóculo de 9.2×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC/ml) (DO_{600} 0.2) tomado a partir de un cultivo crecido toda la noche. El tiempo 0 se consideró al momento de colocar el inóculo en los tubos con los tratamientos. Posteriormente se realizaron las lecturas a los distintos tiempos de exposición.

La viabilidad de las CEMB en presencia del AAS se analizó mediante la técnica de exclusión de azul de tripano y el conteo celular en un hemocitómetro. Para ello, las CEMB se incubaron con AAS (5 mM) y el vehículo a diferentes tiempos (2, 4, 6 y 8 h) en medio de cultivo libre de suero. Posteriormente, las CEMB se despegaron con tripsina-EDTA (0.025% tripsina, 0.5 mM EDTA, Sigma), se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, y el precipitado celular se resuspendió en una solución salina de fosfatos (PBS, pH 7.4), y se añadió azul de tripano (Sigma) para un porcentaje final de 0.5. Se contaron las células teñidas y las no teñidas para determinar el número de células no viables.

10.6 Ensayos de infección *S. aureus* - AAS -CEMB

Las CEMB se cultivaron a confluencia en placas de cultivo con colágena de cola de rata tipo I ($6-10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma) con el fin de polarizarlas. Los ensayos de invasión se llevaron a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar-Corning) con monocapas confluentes de CEMB (2×10^5 células) correspondientes a los pasajes 2-6. Las CEMB se crecieron e infectaron de acuerdo con las condiciones experimentales descritas en la estrategia experimental. Las CEMB se trataron previamente por 24 h con bPRL, esto se realizó en medio sin suero y sin antibióticos. Las CEMB se infectaron con un inóculo de 6×10^6 UFC/ml de *S. aureus* en medio DMEM/F12, sin suero y sin antibióticos, correspondiente a una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula epitelial. Se utilizaron distintas concentraciones de bPRL (0, 1, 5, 10 y 50 ng/ml). Durante los ensayos de invasión las células se trataron con AAS 5 mM, dado que se ha reportado que esta concentración inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo (Park *et al*, 2007).

Después de 2 h de infección, las CEMB se trataron con 50 µg/ml de gentamicina durante 1 h para eliminar las bacterias no endocitadas, posteriormente se despegaron del plato de cultivo con tripsina-EDTA (0.25%-0.5 mM, Sigma) y se lisaron con agua estéril. Se distribuyó una alícuota de 100 µl de una dilución 1:100 de los lisados en cajas con agar LB, por triplicado y se incubaron por 18 h a 37°C. El número de UFC recuperadas, correspondientes a las bacterias endocitadas, se determinó por conteo en placa y se expresó como el cociente UFC/CEMB.

10.7 Análisis de genes de la respuesta inflamatoria por retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se utilizó Trizol (Invitrogen) para extraer el RNA total de las células tratadas en los ensayos de infección, el cual se usó para sintetizar el DNA complementario (cDNA). La eliminación del DNA genómico se realizó con DNAsa grado amplificación (Invitrogen). La retrotranscripción se realizó en un volumen de 20 µl, conteniendo 25 µg/ml de Oligo d(T) y 500 nM de dNTPs (Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min e inmediatamente fue transferida a hielo. Se añadió First Strand Buffer 1X (Invitrogen), dithiothreitol 10 mM e inhibidor de RNAsa 2 U/µl (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 2 min. Finalmente se agregó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/µl, Invitrogen) y se incubó a 37°C por 50 min, seguido de 15 min a 70°C. Este cDNA se utilizó para establecer los niveles de expresión de genes de citocinas, péptidos antimicrobianos, enzimas proinflamatorias, proteínas de la leche (utilizada como control), mediante reacciones de PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para TNF- α , iNOS, péptido antimicrobiano traqueal (TAP) y κ -caseína bovinos (Tabla 2). Además, se amplificó β -actina para verificar la integridad del RNA y la eficiencia del RT-PCR. Los productos de DNA amplificados se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los niveles de expresión de los productos de PCR se cuantificaron por análisis densitométrico utilizando como

control la expresión de β -actina. El análisis de los productos de PCR se realizó utilizando el software ImageJ Launcher (v.1.43.67).

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos utilizados en este trabajo

Especificidad	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de alineamiento (°C) y número de ciclos
TNF- α bovino	Sentido Reverso	5'CTGGTTCAGACACTCAGGTCCT3' 5'GAGGTAAAGCCCGTCAGCA3'	183	60/35
iNOS bovina	Sentido Reverso	5'GGAAGCAGTAACAAAGGAGATAG3' 5'CATAGCGGATGAGCTGGGCG3'	282	60/40
κ -caseína bovina	Sentido Reverso	5'AGCAAGAGCTGACGGTCACAA3' 5'TGGCAGGCACAGTATTTGACA3'	350	58/40
β -actina	Sentido Reverso	5'ATGGTGGGCATGGGTCAGAA3' 5'TCATACTCCTGCTTGCTGAT3'	900	55/25
TAP	Sentido Reverso	5'GCCAGCATGAGGCTCCAT-3' 5'AACAGGTGCCAATCTGT-3'	166	50/35

(Ryan *et al*, 1998; Tortonese *et al*, 1998; Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008).

10.8 Cuantificación del óxido nítrico (NO) producido por las CEMB

Como parte de la respuesta inmune innata se cuantificó la producción de NO en las CEMB tratadas con las condiciones antes descritas. El NO producido se determinó en el medio condicionado que se obtuvo reemplazando el medio normal de cultivo por medio DMEM/F12 sin suero y sin antibióticos, en este medio las células se cultivaron durante 24 h. El NO secretado se evaluó en las mismas condiciones que las células de las que se obtuvo el RNA. La concentración de NO se determinó cuantificando los nitritos (NO_2^-) en el medio condicionado libre de células y empleando la reacción de Greiss. El reactivo de Greiss se preparó mezclando volúmenes iguales de la solución stock A (10% de sulfanilamida, 40 % de ácido fosfórico, Sigma) y la solución stock B [1%N-(1-naftil) etilenediamina diclorhidrato (Sigma)] antes de medir la concentración de nitritos. Una parte de la mezcla de reactivos se transfirió a 7 partes de medio condicionado y la absorbancia se determinó a 550 nm en un espectrofotómetro

(DAS). La concentración de nitrito se calculó a partir de una curva estándar de NaNO₂ (Sigma) en PBS (pH 7.4).

10.9 Inmunoprecipitación y análisis de Western blot

Se extrajo la proteína nuclear y citoplásmica de las condiciones experimentales descritas mediante el empleo del kit Proteojet (Fermentas). Se evaluó la presencia del factor NF- κ B tanto en el extracto nuclear como en el citoplásmico utilizando el anticuerpo anti-p65 (Zymed). Los extractos se inmunoprecipitaron empleando columnas con Proteína-A Sefarosa (Sigma). Posteriormente, se centrifugaron por 1 min a 10,000 x g a 4°C. El sobrenadante se colocó en hielo y se incubó con 2 μ g de anti-p65 y 50 μ l de Proteína-A Sefarosa por 24 h a 4°C. El inmunoprecipitado se centrifugó por 1 min a 10,000 x g a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se cuantificaron por el método de Bradford y se analizaron por SDS-PAGE en geles al 12% de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Las bandas resultantes se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon con leche descremada y se hibridaron con 2 μ g del anticuerpo correspondiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed). La membrana se reveló con el sustrato para fosfatasa alcalina BCIP/NBT (Zymed). Para determinar la translocación nuclear del factor NF- κ B se realizó una cuantificación con respecto a su presencia en el extracto citoplásmico.

10.10 Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de invasión, de viabilidad de las CEMB, de crecimiento de *S. aureus*, los análisis densitométricos y la producción de óxido nítrico, se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado; el análisis de Western blot se realizó en dos experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Los datos se reportan como los promedios de cada experimento y se normalizaron

con respecto a su control. Los valores de P se consideraron significativos cuando ≤ 0.05 .

11. Resultados

11.1 Efecto del AAS sobre el crecimiento de *S. aureus*

Para evaluar el crecimiento de *S. aureus* en presencia del AAS y determinar si existía un efecto bacteriostático o bactericida del fármaco, la bacteria se cultivó con distintas concentraciones del AAS (2, 3, 5, 10 y 20 mM). En la Figura 10 se muestra la curva de crecimiento de *S. aureus* a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24 h) en los diferentes tratamientos con el AAS. Se determinó que no existe un efecto del AAS sobre el crecimiento de la bacteria, ya que no disminuyó éste en presencia de las distintas concentraciones del AAS con respecto a las bacterias control (sin tratamiento del fármaco). El mismo comportamiento se observó para el caso de *S. aureus* cultivado con el vehículo de disolución del AAS (etanol). Estos resultados demuestran que tanto el AAS como el vehículo no afectaron el crecimiento de *S. aureus* 27543. Con estos resultados, se procedió a utilizar la concentración de 5 mM del AAS (que inhibe la translocación de NF- κ B) en los experimentos de invasión posteriores.

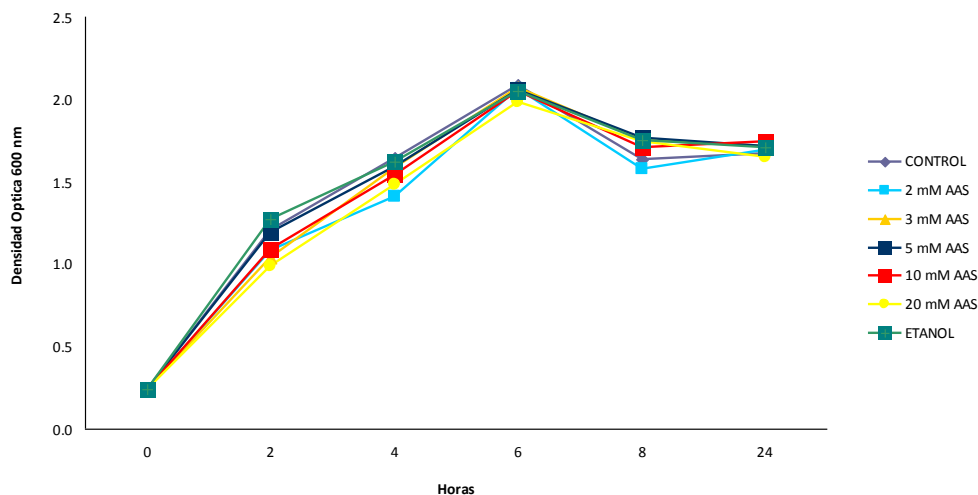


Figura 10. Efecto del AAS sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* 27543. La cepa de *S. aureus* se cultivó en medio LB líquido por 12 h a 37 °C en presencia del AAS a distintas concentraciones (0, 2, 3, 5, 10 y 20 mM). Se utilizó etanol como vehículo para disolver el AAS. El crecimiento de la bacteria se cuantificó por densidad óptica de los cultivos a 600 nm a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24 h). Los valores obtenidos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado * = $P \leq 0.05$.

11.2 Efecto del AAS sobre la viabilidad de las CEMB

Para descartar un efecto citotóxico del AAS sobre las CEMB, éstas se trataron con AAS (5 mM) y con el vehículo a distintos tiempos. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos de estas evaluaciones. No se observaron diferencias significativas de las CEMB tratadas con el AAS ($P \leq 0.05$) con respecto al control (sin tratamiento del fármaco), aunque se observó una disminución del 10% de la viabilidad de las CEMB a las 2 h de exposición con el compuesto. Sin embargo, estos valores permanecieron constantes hasta las 8 h de exposición con AAS. De igual forma, se observó que el vehículo (etanol) no afectó la viabilidad de las CEMB, ya que los valores fueron similares al control en todos los tiempos evaluados. Estos resultados indican que el AAS no presenta efectos de citotoxicidad que provoquen una disminución en la viabilidad de las CEMB a una concentración de 5 mM.

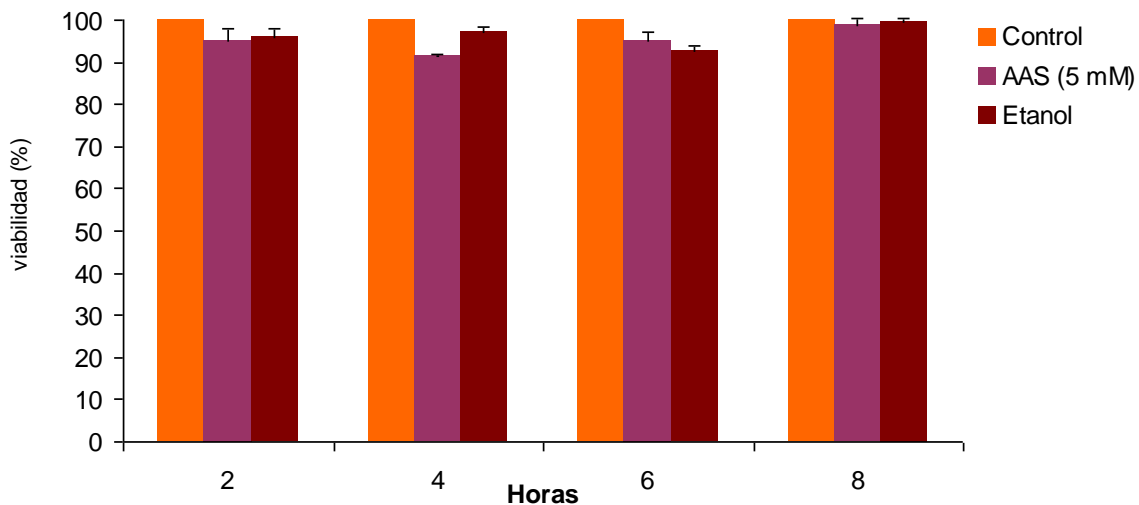


Figura 11. Viabilidad de las CEMB tratadas con el AAS. Las células se trataron con 5 mM de AAS a distintos tiempos (2, 4, 6 y 8 h). La viabilidad se evaluó utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano. Los datos obtenidos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, los valores se normalizaron considerando el tratamiento control como 100% de viabilidad. Se muestran sus respectivos errores estándar. * = $P \leq 0.05$.

11.3 Endocitosis de *S. aureus* en las CEMB

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar la participación del factor transcripcional NF- κ B durante la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas por bPRL. Para ello, se realizaron ensayos de infección en las CEMB tratadas con bPRL (1, 5, 10 y 50 ng/ml) durante 24 h, a las cuales en el momento de la infección con *S. aureus* se les añadió el AAS (5 mM).

En la Figura 12 se muestran los resultados de la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB mediada por bPRL en presencia del AAS. Se observó que en presencia de bPRL la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB se incrementó ~ 2 veces a una concentración de 5 ng/ml de la hormona. Así mismo, se observó un efecto de campana ya que, a concentraciones mayores de la hormona, la endocitosis no se estimuló, estos resultados coinciden con los datos previos del laboratorio (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008).

Por otro lado, se observó también que en las CEMB control (sin tratamiento de bPRL) se incrementó ~ 1.5 veces la endocitosis de *S. aureus* cuando las CEMB fueron tratadas con el AAS, sugiriendo que la endocitosis de *S. aureus* depende de la participación de NF- κ B. Sin embargo, esta inducción de la endocitosis de *S. aureus* disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) en presencia de concentraciones crecientes de bPRL pero no se abatió completamente (Figura 12); lo cual sugiere que la bPRL en conjunto con la infección pueden estar modulando otros factores en las CEMB que tengan alguna participación en la endocitosis de *S. aureus*, y que este mecanismo es independiente de NF- κ B.

Considerando que el mayor efecto sobre la endocitosis de *S. aureus* se presentó cuando las CEMB se trataron con bPRL (5 ng/ml) y que este efecto fue inhibido en un 50% cuando se adicionó el AAS (5 mM), se decidió evaluar únicamente esta concentración de la hormona para los experimentos posteriores; sin embargo, se llevaron a cabo de manera paralela experimentos con otras concentraciones de bPRL (1, 10 y 50 ng/ml; datos no mostrados).

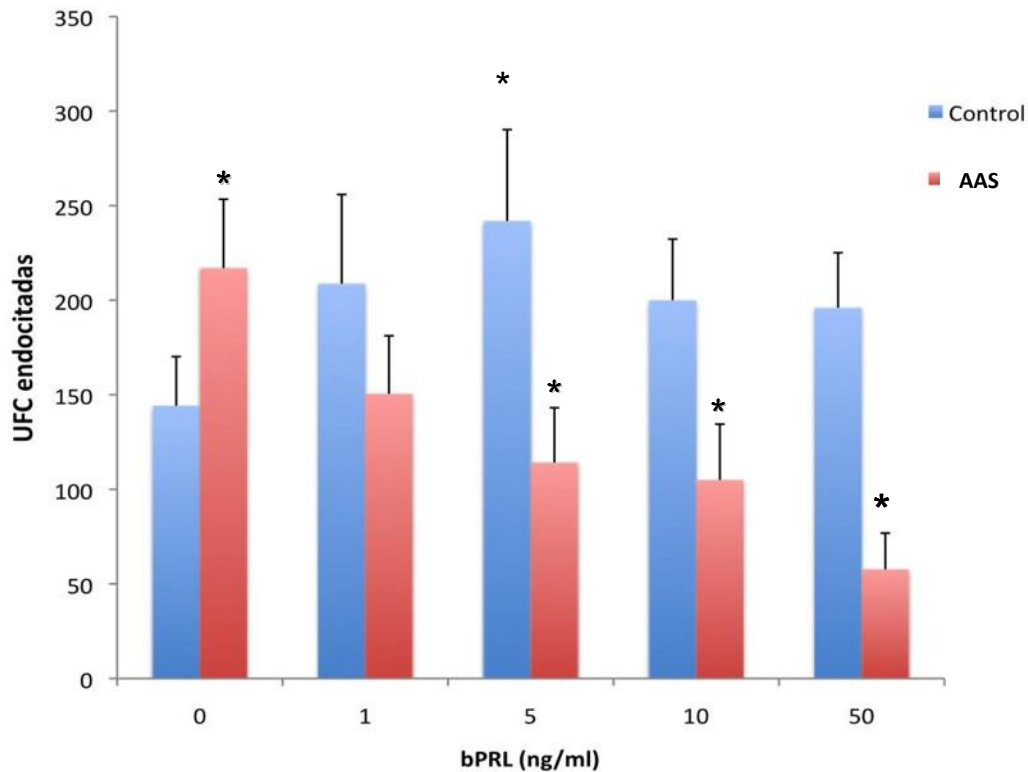


Figura 12. Endocitosis de *Staphylococcus aureus* en las CEMB tratadas con bPRL y AAS. Las CEMB se trataron con bPRL (0, 1, 5, 10 y 50 ng/ml) 24 h previas a los ensayos de infección, y al momento de la misma se añadió el AAS (5 mM). Se determinó el número de UFC endocitadas utilizando una MDI de 30:1. Los datos obtenidos corresponden al promedio de los porcentajes de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. El símbolo “*” indica valores significativos ($P \leq 0.05$) con respecto al control.

11.4 Regulación del factor transcripcional NF- κ B en las CEMB en presencia *S. aureus* y bPRL

Con el fin de evaluar la participación de NF- κ B durante la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas con bPRL, se decidió evaluar la translocación nuclear de este factor por análisis de Western blot utilizando el anticuerpo anti-p65. En la Figura 13A se muestran los resultados de la translocación nuclear de NF- κ B en las CEMB expresados como la relación nuclear/citoplásmica de este factor. Se observó que *S. aureus* inhibió significativamente la translocación nuclear de NF- κ B en las células control, este efecto inhibitorio se observó aún

en presencia de bPRL (5 ng/ml). Así mismo, se observó que el AAS no modificó la translocación nuclear de NF- κ B en las células control; sin embargo, cuando las CEMB fueron tratadas con bPRL, el AAS sí presentó efectos inhibitorios sobre la translocación de NF- κ B. Se observó también una inhibición significativa de la translocación en las CEMB estimuladas con bPRL en presencia de *S. aureus* y AAS, sugiriendo que la bacteria y el fármaco actúan de manera conjunta en la inhibición de la translocación de NF- κ B.

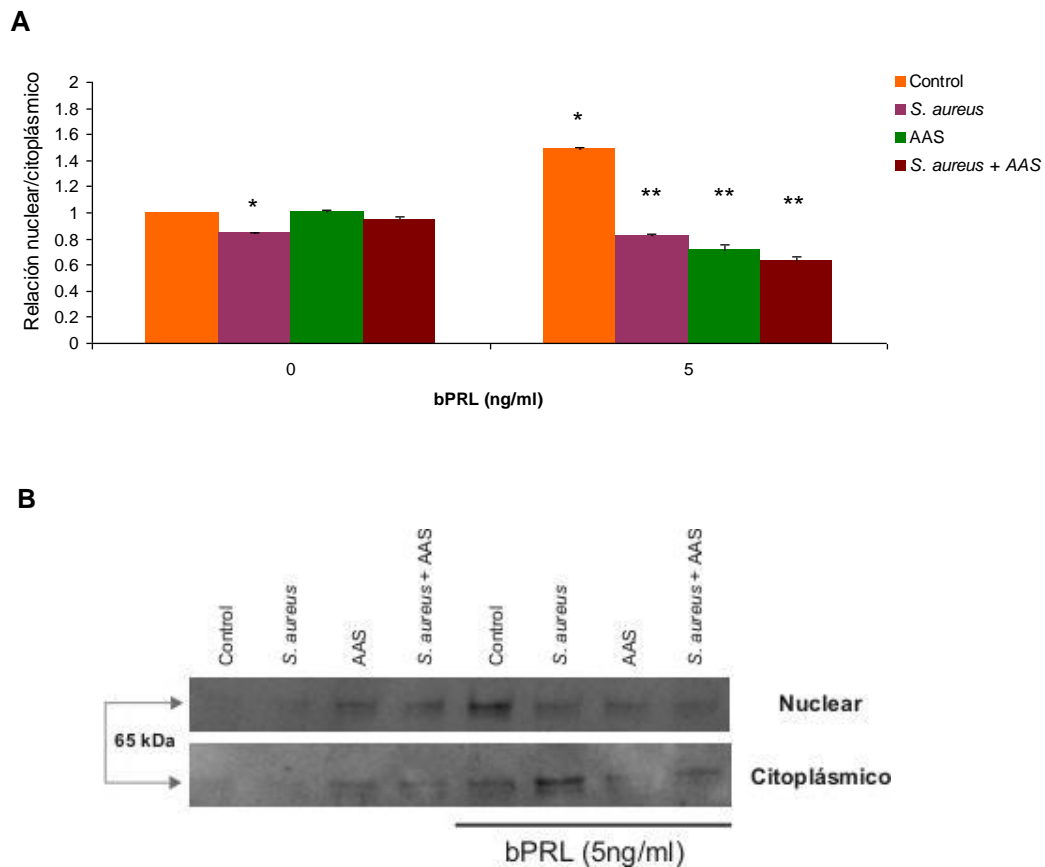


Figura 13. Evaluación de la translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas. Las CEMB se trataron con bPRL (5 ng/ml) y AAS (5 mM) y se infectaron por 2 h. Posteriormente se obtuvieron los extractos proteicos citoplásmicos y nucleares de cada condición. Estos extractos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-p65 y las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles al 12% de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hibridaron con el anticuerpo anti-p65. **A)** La gráfica muestra la relación de los valores de NF- κ B de los extractos nucleares y citoplásmicos. Los datos se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL. **B)** Análisis de Western blot de NF- κ B en los extractos nucleares y citoplásmicos de las CEMB. Las flechas indican a NF- κ B a 65 kDa

El mayor efecto sobre la translocación nuclear de NF- κ B se observó en las CEMB tratadas únicamente con bPRL (5 ng/ml), aumentando \sim 1.4 veces, datos que ya se habían reportado anteriormente. Estos resultados demuestran que *S. aureus* inhibe la activación de NF- κ B en las CEMB con o sin tratamiento de bPRL.

11.5 Expresión del mRNA para genes de citocinas y elementos de la respuesta inmune innata

Para evaluar si la translocación nuclear de NF- κ B se correlacionaba con la expresión de genes de elementos de la respuesta inmune innata en las CEMB infectadas con *S. aureus* en presencia de bPRL (5 ng/ml), se evaluaron genes representativos de esta respuesta.

11.5.1 Expresión del mRNA de TNF- α en las CEMB

En la Figura 14 se muestra el análisis de la expresión del mRNA que codifica para TNF- α en las CEMB, los resultados se presentan en relación a la expresión de β -actina. Se observó que *S. aureus* no modificó significativamente la expresión del mRNA de TNF- α en las células control. Sin embargo, en presencia de bPRL (5 ng/ml) la bacteria sí ejerció un efecto inhibitorio significativo con respecto a su control. Estos datos coinciden con la disminución de la translocación nuclear de NF- κ B (Figura 13A). Se observó también una mayor expresión (\sim 1.4 veces) del mRNA de TNF- α en las CEMB tratadas con bPRL (5 ng/ml), lo cual también coincide con los datos de translocación del factor NF- κ B. Por otro lado, tal como se esperaba, el AAS presentó efectos inhibitorios en la expresión del mRNA de TNF- α , ésto debido al efecto inhibitorio que se ha reportado sobre NF- κ B. Estos datos sugieren que *S. aureus* inhibe la expresión del mRNA de TNF- α aún en presencia de bPRL, y que esta expresión depende principalmente de la activación de NF- κ B.

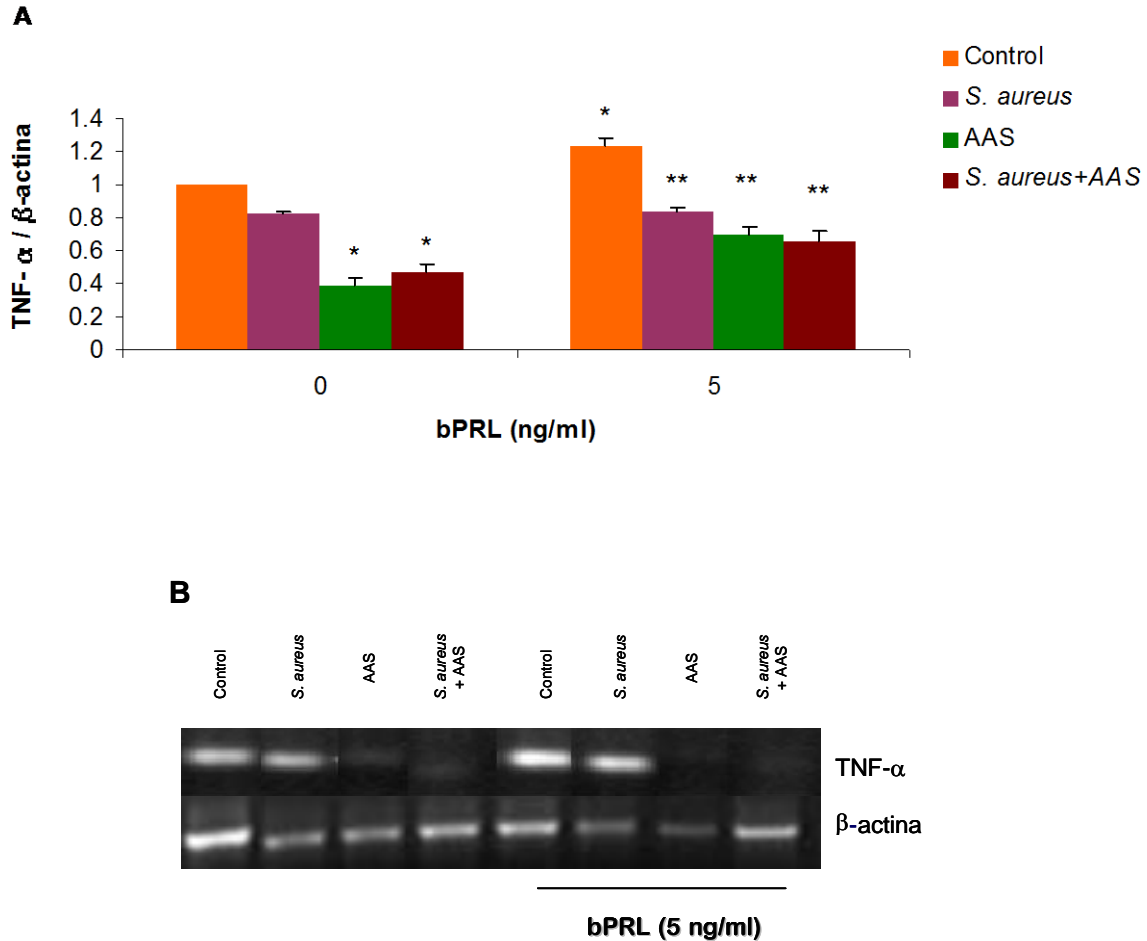


Figura 14. Expresión del mRNA de TNF- α en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas. Se realizaron ensayos de infección con *S. aureus* en las CEMB tratadas con bPRL (5 ng/ml) y AAS (5 mM). Se extrajo el RNA total para la realización de los ensayos de RT-PCR. **A.** La gráfica muestra los valores de densidad óptica de las amplificaciones del mensajero de TNF- α con respecto a β -actina (utilizado como control). Se presenta el promedio de 3 experimentos independientes, con sus respectivos errores estándar. Los valores se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL. **B.** Productos de PCR representativos de las amplificaciones del cDNA de TNF- α visualizados en geles de agarosa al 2%, las bandas corresponden al tamaño del fragmento (183 bp).

11.5.2 Expresión del mRNA del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en las CEMB

En la Figura 15 se muestra el análisis densitométrico de la expresión del mRNA que codifica para TAP con respecto a la expresión de β -actina en las CEMB. Se observó que *S. aureus* inhibe significativamente la expresión del mRNA de TAP en las células control, las cuales muestran una expresión basal del

mRNA, esta inhibición por parte de *S. aureus* se observó también en las CEMB con tratamiento de bPRL, lo cual sugiere que *S. aureus* en las CMEB inhibe la expresión del mRNA de este péptido antimicrobiano. Sin embargo, se observó una inducción sobre la expresión del mRNA de este péptido cuando las CEMB fueron estimuladas con bPRL (5 ng/ml), lo cual indica que la expresión es inducida en presencia de la hormona y que esta expresión depende principalmente de la activación de NF- κ B, puesto que al ser inhibido por efecto del AAS, disminuyó significativamente la expresión.

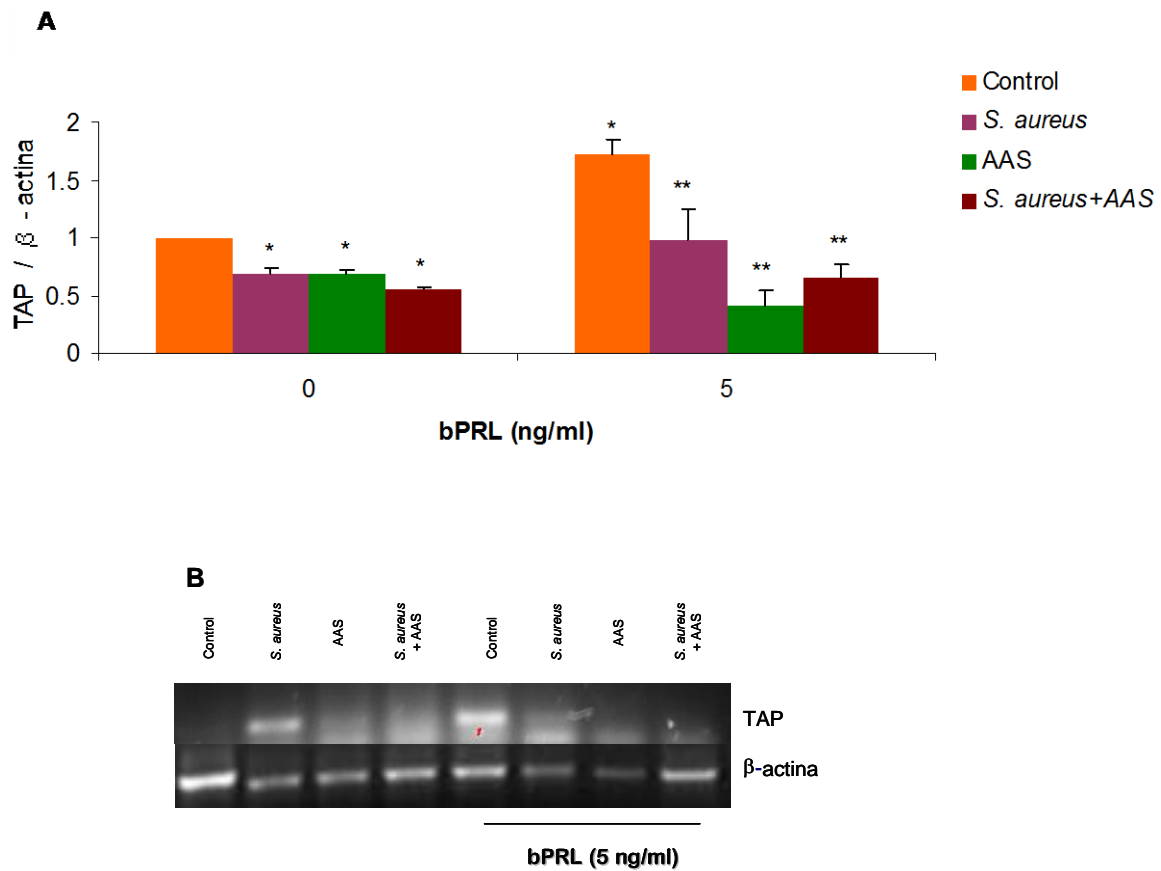


Figura 15. Expresión del mRNA de TAP en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas. Se realizaron ensayos de infección con *S. aureus* en las CEMB, con 5 ng/ml de bPRL y 5 mM de AAS. Se extrajo el RNA total para la realización de los ensayos de RT-PCR. **A.** La gráfica muestra los valores de densidad óptica de las amplificaciones en relación a la expresión de β -actina. Se presenta el promedio de 3 experimentos independientes, con sus respectivos errores estándar. Los valores se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL. **B.** Productos de PCR representativos de las amplificaciones del cDNA de TAP

visualizados en geles de agarosa al 2%, las bandas corresponden al tamaño del fragmento (166 bp).

11.5.3 Expresión del mRNA de iNOS en las CEMB

La Figura 16 muestra el análisis densitométrico de la expresión del mRNA que codifica para la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), con respecto a la expresión de β -actina en las CEMB. Se observó que aún cuando existe una expresión basal del mRNA de iNOS en las células control, esta no se ve inhibida por efecto de *S. aureus*, lo mismo ocurre con las CEMB con tratamiento de bPRL, lo cual sugiere que *S. aureus* no modifica la expresión del mRNA de iNOS en las CEMB. Sin embargo, se observó una inducción del mensajero de iNOS (~1.5 veces) en las CEMB con tratamiento de bPRL, este mismo efecto se presentó en la modulación de la expresión de los mRNAs de TNF- α y TAP. Sin embargo, en presencia de bPRL, el tratamiento de las CEMB con AAS o con AAS y la bacteria provocó una reducción significativa de la expresión de este mensajero.

11.5.4 Producción de NO por las CEMB

Para evaluar la producción de NO se obtuvo el medio de cultivo de las CEMB infectadas tratadas con bPRL y AAS (Figura 17). Se observó una producción basal de NO en las células control (sin tratamientos), y esta producción no se vió modificada por la infección con *S. aureus* o el tratamiento con AAS.

Por otro lado, se observó un incremento en la concentración de NO en las células tratadas únicamente con bPRL, aumentando ~2.5 veces con respecto a las células sin bPRL. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la concentración de NO en las CEMB infectadas, tratadas con AAS o ambos, sugiriendo que la producción de NO en CEMB es inducida por efecto de la hormona y este efecto es inhibido por *S. aureus* o el AAS.

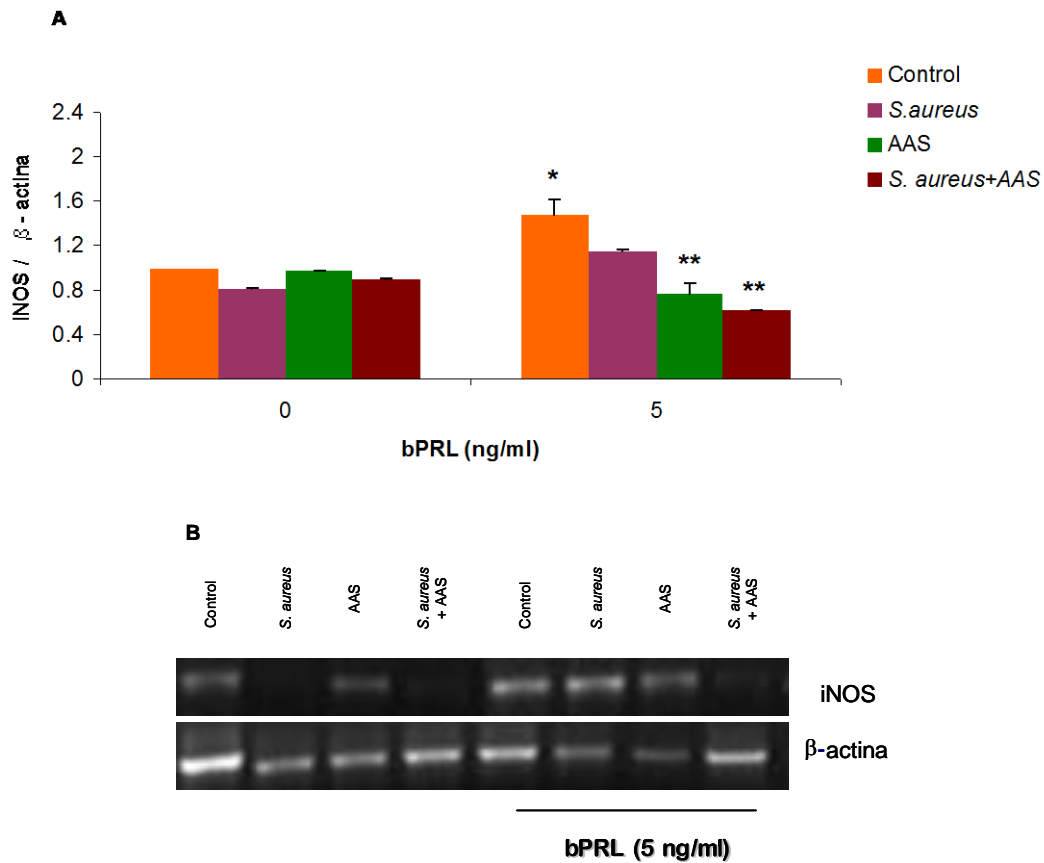


Figura 16. Expresión del mRNA de iNOS en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas. Se realizaron ensayos de infección con *S. aureus* en las CEMB, con 5 ng/ml de bPRL y 5 mM de AAS. Se extrajo el RNA total para la realización de los ensayos de RT-PCR. **A.** La gráfica muestra los valores de densidad óptica de las amplificaciones en relación a la expresión de β -actina. Se presenta el promedio de 3 experimentos independientes, con sus respectivos errores estándar. Los valores se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL. **B.** Productos de PCR representativos de las amplificaciones del cDNA de iNOS visualizados en geles de agarosa al 2%, las bandas corresponden al tamaño del fragmento (282 bp).

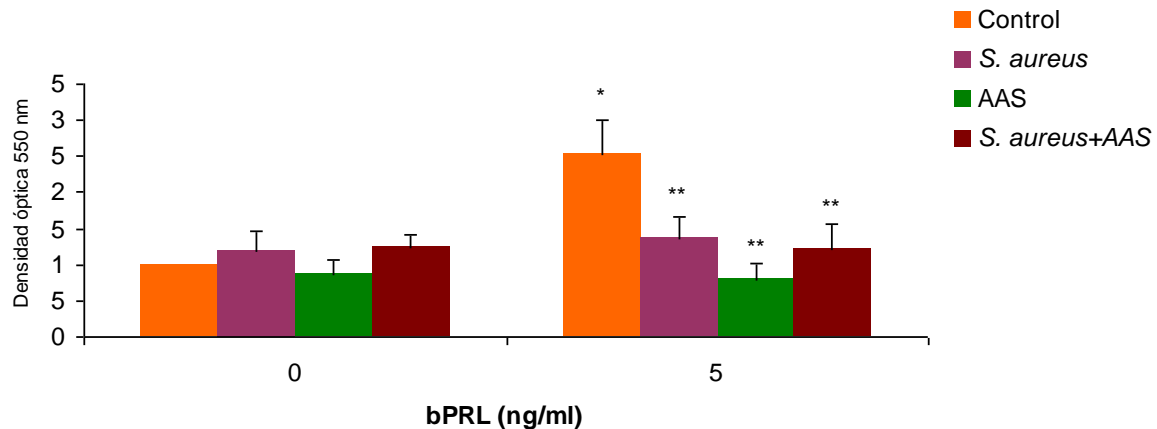


Figura 17. Producción de NO por las CEMB infectadas con *S. aureus* en presencia de bPRL y AAS. Se realizaron los ensayos de infección con bPRL (5 ng/ml) y AAS (5 mM) y se recuperó el medio de las células. La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes realizados por triplicado, con sus respectivos errores estándar. Los valores se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL.

11.5.5 Expresión del mRNA de κ -caseína en CEMB

Con el fin de comprobar si las CEMB utilizadas en estos experimentos, respondían de manera adecuada al estímulo de la bPRL en los procesos infecciosos con *S. aureus*, se decidió evaluar la expresión del mRNA de κ -caseína, el cual es un gen específico del epitelio mamario bovino y que es modulado por efecto de bPRL.

La Figura 18 muestra el análisis densitométrico de la expresión del mRNA de κ -caseína, con respecto a la expresión de β -actina. Se observó una expresión basal del mRNA de κ -caseína en las células control, esta expresión fue inhibida por efecto de *S. aureus*, esta inhibición se observó también en las CEMB con tratamiento de bPRL, lo cual sugiere que *S. aureus* inhibe la activación de otros factores transcripcionales en las CEMB como puede ser STAT5, que es el factor regulador de la expresión de la síntesis de proteínas de la leche. Se observó también que la bPRL (5 ng/ml) induce ~ 1.5 veces la expresión del mRNA de κ -caseína con respecto a las células control, lo cual concuerda con datos reportados. Se observó también que el AAS no modifica la expresión de este mensajero. Estos resultados sugieren que las CEMB con tratamiento de bPRL

responden adecuadamente al estímulo de la hormona y que la expresión del mRNA de κ -caseína es inhibida por efecto de *S. aureus*.

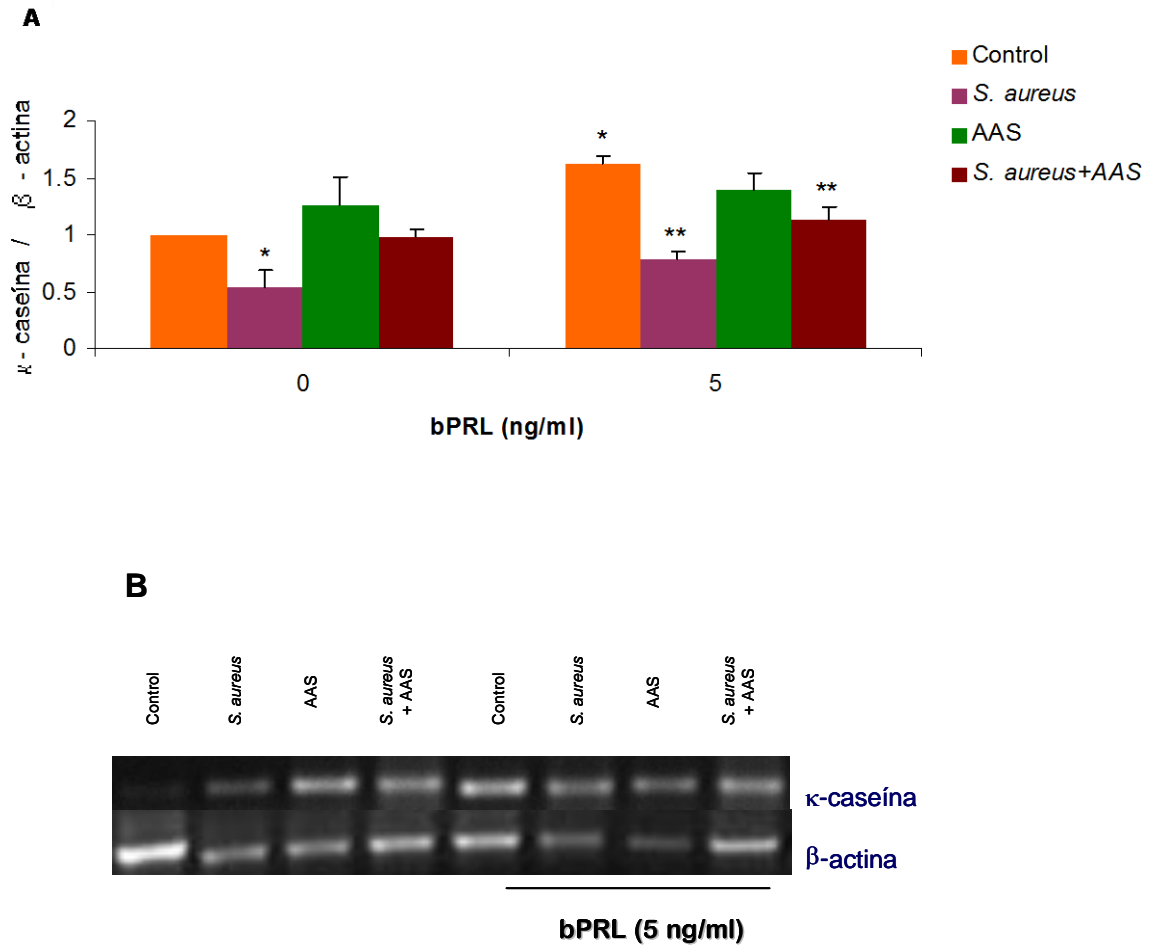


Figura 18. Expresión del mRNA de κ -caseína en las CEMB infectadas con *S. aureus* en presencia de bPRL y AAS. Se realizaron ensayos de infección con *S. aureus* en las CEMB, con 5 ng/ml de bPRL y 5 mM del AAS. Se extrajo el RNA total para la realización de los ensayos de RT-PCR. **A.** La gráfica muestra los valores de densidad óptica de las amplificaciones. Se utilizó como control interno la expresión de β -actina. Se presenta el promedio de 4 experimentos independientes, con sus respectivos errores estándar. Los valores se normalizaron con respecto al tratamiento control (células sin tratamiento). * = $P \leq 0.05$ con respecto al control ** = $P \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con bPRL. **B.** Productos de PCR representativos de las amplificaciones del cDNA de κ -caseína visualizados en gels de agarosa al 2%, las bandas corresponden al tamaño del fragmento (350 bp).

12. Discusión

La mastitis bovina es considerada como una enfermedad multifactorial de gran importancia en la ganadería lechera, ya que causa pérdidas económicas considerables a nivel mundial (Brouillette *et al*, 2003). Dentro de los factores que influyen mayormente en la incidencia de la mastitis se encuentran los organismos patógenos, principalmente de origen bacteriano, destacando *Staphylococcus aureus* que tiene la capacidad de invadir las células del epitelio mamario bovino (CEMB) (Huszenicza *et al*, 2004). En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró que las CEMB tratadas con bPRL (5 ng/ml) incrementan su capacidad de endocitar a *S. aureus*, además de que la acción conjunta de estos dos factores modula la expresión de genes de la respuesta inflamatoria, principalmente de algunas citocinas proinflamatorias (Gutiérrez-Barroso *et al*, 2008).

La expresión de citocinas proinflamatorias está mediada principalmente por NF- κ B (Gosh *et al*, 1998). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado la participación de NF- κ B en el proceso de endocitosis de *S. aureus* en las CEMB mediado por bPRL. En este sentido, solo se ha descrito la participación de la bPRL en la activación de NF- κ B en casos de mastitis crónica en células epiteliales MAC-T (Boutet *et al*, 2007). Sin embargo, en ese trabajo no se evaluó la activación de este factor durante procesos infecciosos con *S. aureus*. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la activación de NF- κ B durante el proceso de endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas con bPRL.

La estrategia utilizada para evaluar la participación del factor NF- κ B en el proceso de endocitosis de *S. aureus* en las CEMB fue inhibir la translocación nuclear de NF- κ B mediante el uso del ácido acetilsalicílico (AAS, 5 mM). El AAS, es el principal antiinflamatorio no esteroideo (AINE) utilizado como agente de control de la inflamación y se ha demostrado su capacidad para impedir la translocación de NF- κ B ya que compite por el sitio de unión del ATP en el complejo IKK β (Yin *et al*, 1998). Sin embargo, se conoce que el ácido salicílico disminuye la virulencia de *S. aureus*, así como también su adhesión e invasión *in*

vitro en células endoteliales humanas (Kupferwasser *et al*, 2003; Park *et al*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado que el AAS posee actividad bacteriostática y bactericida a una concentración de 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Park *et al*, 2006). Por lo que primero se analizó el efecto del AAS sobre el crecimiento de *S. aureus* y la viabilidad de las CEMB. La evaluación se llevó a cabo con la cepa *S. aureus* ATCC 27543, proveniente de un caso de mastitis clínica, ésta se cultivó con distintas concentraciones del AAS durante 2, 4, 6, 24 y 48 h. Los resultados mostraron que el AAS no afectó el crecimiento de *S. aureus* aún a concentraciones de 20 mM de AAS (Figura 10).

En el mismo sentido, para descartar un efecto citotóxico del AAS sobre las CEMB, se evaluó la viabilidad de estas células con la concentración de AAS seleccionada para llevar a cabo los experimentos (5 mM). Se evaluaron distintos tiempos de incubación (0 - 24 h), y la viabilidad se determinó utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano, la cual se basa en la incorporación del colorante por las células no viables como consecuencia de cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Freshney, 1987). De acuerdo a los resultados la viabilidad de las CEMB no se afectó por la presencia del AAS (Figura 11) en todos los tiempos de incubación, lo cual coincide con lo reportado en estudios previos, en donde el ácido salicílico no disminuye la viabilidad de células endoteliales vasculares humanas (Park *et al*, 2007). Tomando en cuenta los resultados del efecto del AAS sobre la viabilidad de las CEMB y el crecimiento de *S. aureus*, se decidió utilizar el AAS a una concentración de 5 mM en los ensayos de infección, ya que esta es la concentración reportada como inhibitoria de la translocación de NF- κ B (Yin *et al*, 1998).

El objetivo de este trabajo fue determinar la participación del factor transcripcional NF- κ B en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB estimuladas por bPRL. Se demostró que la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB es estimulada por concentraciones de bPRL de 1-5 ng/ml, observándose la mayor inducción con 5 ng/ml (Figura 12); no obstante, a concentraciones mayores la endocitosis disminuyó, lo cual coincide con reportes previos del laboratorio (Gutiérrez-

Barroso *et al*, 2008). Se observó también que las CEMB control, sin tratamiento de bPRL, incrementan la endocitosis de *S. aureus* (~1.5 veces) cuando el factor NF- κ B se encuentra inhibido por efecto de AAS (Figura 12), sugiriendo que al inhibirse la ruta de NF- κ B disminuye también la expresión de elementos de la respuesta inmune innata, las cuales son los encargados de contrarrestar y eliminar inicialmente a los patógenos, favoreciendo la endocitosis de *S. aureus* (Yu-Lee, 2002). La inhibición de la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB en presencia de concentraciones crecientes de bPRL sugiere que la hormona en conjunto con la infección puede estar modulando otros factores transcripcionales que participen en la endocitosis de *S. aureus*, y que este mecanismo es independiente de NF- κ B. Sin embargo, para corroborar esto es necesario evaluar otros factores de transcripción relacionados con el epitelio mamario bovino y regulados por bPRL como puede ser Stat5.

El análisis realizado para evaluar la participación del factor NF- κ B en el proceso de endocitosis de *S. aureus* en las CEMB se realizó de manera indirecta a través de la inhibición del factor con el AAS. Para establecer de manera precisa el estado de activación del factor NF- κ B se decidió evaluar la translocación nuclear de este factor en las CEMB estimuladas con bPRL y sometidas a la infección con *S. aureus* mediante ensayos de Western blot. Se observó un incremento en la translocación al núcleo del factor NF- κ B en presencia de bPRL (Figura 13A); este resultado coincide con el trabajo de Boutet *et al* (2007), quienes reportan una activación de NF- κ B dependiente de PRL en casos de mastitis bovina crónica. De manera interesante, cuando las CEMB se infectaron con *S. aureus* se observó una inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B, esta inhibición también se observó en las células tratadas con bPRL (5 ng/ml). Estos datos no coinciden con el hecho de que factores solubles de bacterias gram positivas (LTA) o de gram negativas (LPS) inducen la activación de factores transcripcionales y la expresión de citocinas proinflamatorias en tejidos de la glándula mamaria bovina (Sordillo *et al*, 1997). Así mismo, en otros tipos celulares (células fagocíticas profesionales como macrófagos, neutrófilos y

monocitos) se ha reportado que *S. aureus* activa a NF- κ B (Sodhi y Tripathi, 2008; Mount *et al*, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que *S. aureus* no es capaz de inducir una respuesta inflamatoria o signos clínicos de una inflamación en glándula mamaria bovina, y tampoco modifica la expresión de TNF- α e IL-8, mientras que en células epiteliales mamarias *S. aureus* y LTA no modifican la activación de NF- κ B (Yang *et al*, 2008). Los resultados de nuestro trabajo sugieren que *S. aureus* pueda estar expresando otros factores que inhiban la activación del factor NF- κ B; en este sentido, se ha demostrado que esta bacteria es capaz de expresar otras proteínas solubles como la staphopaina (A y B) y la aureolisina que son proteasas que interrumpen la actividad del sistema inmune (Potempa y Pike, 2009). Por lo que se puede concluir que *S. aureus* puede implementar estrategias invasivas, inhibiendo la activación de NF- κ B en células fagocíticas no profesionales como el epitelio mamario bovino.

Para analizar si la inhibición de la translocación nuclear del factor NF- κ B por *S. aureus* en las CEMB se correlacionaba con la modulación de genes de la respuesta inmune innata, se decidió evaluar la expresión del mRNA de algunos genes representativos que se sabe dependen principalmente de la activación de NF- κ B. Se demostró que las CEMB tiene una expresión basal de todos los mRNAs evaluados; sin embargo, se observó que *S. aureus* genera una disminución de la expresión del mRNA de TAP, mientras que no modifica la expresión del mRNA de TNF- α e iNOS en las CEMB. Por otro lado, cuando las CEMB fueron tratadas con bPRL (5 ng/ml), *S. aureus* genera un efecto inhibitorio en la expresión de TNF- α y TAP (Figura 14A y 15A), lo cual coincide con los datos de inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B (Figura 13A), sugiriendo que *S. aureus* al modificar la activación de NF- κ B provoca una disminución de la expresión de los mRNAs de ciertas citocinas proinflamatorias. Esta inhibición de la expresión del mRNA de TAP por *S. aureus* se había reportado previamente en las CEMB tratadas con PRL y AAS (López-Meza *et al*, 2009).

Bajo un proceso infeccioso, causante de inflamación, las células epiteliales bovinas son capaces de producir NO. En las células epiteliales mamarias, la producción de NO depende principalmente de la activación de la enzima inducible iNOS (Bolander, 2002). En este trabajo no se observó una modificación en la expresión del mRNA de iNOS por efecto de la bacteria y la inhibición de la translocación nuclear del factor NF- κ B en las CEMB (Figura 16A); en este sentido se ha reportado que la expresión del mRNA de iNOS puede ser activada por otros factores transcripcionales como el factor IRF-1 (Interferon regulatory factor) en casos en el que NF- κ B se encuentra inhibido (Corbacho *et al*, 2003). Sin embargo, en presencia de bPRL se observó un incremento en la expresión del mRNA de iNOS la cual fue inhibida cuando las CEMB fueron infectadas y tratadas con AAS. Esta inducción del mRNA de iNOS por efecto de la bPRL coincide con reportes donde se establece que la PRL es capaz de regular la activación de iNOS, lo cual da como resultado el incremento de calcio intracelular (Figura 7) tras la activación de la fosfolipasa C y la liberación de calcio mediada por el inositol trifosfato, producto de la activación del RPRL por la hormona (Boulanger *et al*, 2001; Bolander, 2002). Esta activación de iNOS da como resultado la producción de NO en epitelio mamario bovino. En apoyo a estos datos se ha reportado que la PRL modula e incrementa la producción de NO en el epitelio de la glándula mamaria de ratón vía la activación de iNOS (Bolander, 2002). Cuando se cuantificó el NO producido por las CEMB, se observó un incremento en las células con tratamiento de bPRL (Figura 17), sugiriendo que este efecto depende de bPRL, lo cual coincide también con los datos de expresión del mRNA de iNOS. Por otro lado, se demostró que *S. aureus* no afecta la producción de NO en las CEMB, mientras que en las CEMB tratadas con bPRL e infectadas la producción de NO disminuye.

Con el propósito de determinar si las CEMB utilizadas en estos experimentos eran capaces de emitir una respuesta ante la presencia de bPRL y evaluar las propiedades características de este tejido ante un proceso infeccioso por *S. aureus*, se decidió evaluar un gen específico de epitelio mamario, en este

caso la expresión del mRNA de κ -caseína que se sabe depende del estímulo de bPRL. Los resultados (Figura 18A) demostraron que la expresión del mRNA de κ -caseína en las CEMB se induce en presencia de bPRL, como se ha reportado anteriormente (Hovey *et al*, 2002). Interesantemente, se observó que la expresión del mRNA de κ -caseína disminuye en presencia de *S. aureus*, hecho que puede ser congruente con los procesos fisiológicos normales de un organismo, y que bajo un proceso nocivo deja de realizar sus funciones y al contrario combate al agente agresor (Hocket *et al*, 2000). Con base en la expresión de κ -caseína, se sugiere que la bPRL sí modula la activación de factores específicos del epitelio mamario bovino como Stat5 en las CEMB, modulando la expresión de los mRNA de las proteínas de la leche, mientras que *S. aureus* inhibe esta expresión.

Con base a los resultados que se obtuvieron en este trabajo se puede concluir que la translocación nuclear de NF- κ B en las CEMB es inhibida por efecto de *S. aureus* aún en presencia de bPRL y que éstos a su vez inhiben la expresión de TNF- α , TAP y la producción de NO, pero no modifican la expresión de iNOS.

13. Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que la infección por *S. aureus* en las CEMB inhibe la translocación nuclear del factor transcripcional NF- κ B, lo cual favorece la endocitosis de la bacteria. Por otro lado, la bPRL regula esta endocitosis a través de la participación de otra vía de señalización independiente de NF- κ B. Finalmente, la bPRL modula positivamente la expresión de elementos de la respuesta inmune innata en las CEMB; sin embargo, estos efectos se ven disminuidos por efecto de la infección estos datos se correlacionan con la inhibición de NF- κ B bajo estas condiciones.

14. Literatura citada

- Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. 4 ed. Garland Science. 742-751
- Almeida, R.A. y Oliver, S.P. 2001. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. 31: 205-212
- Anaya-López, J.L., Contreras-Guzmán, O.E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E., Valdéz-Alarcón, J.J. Ochoa-Zarzosa, A. 2006. Differences in invasion ability of bacterial isolates associated to mastitis into bovine mammary epithelial cells. Res. Vet. Sci. 81:358-361
- Atabai, K. Sheppard, D. Werb, Z. 2002. Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling involution. J. Mam. Gla. Bio. Neo. 12(1):3745
- Bayles, K.W. Wesson, C.A. Liou, L.E. Fox, L.K. Bohach, G.A. Trumble, W.R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect. Immun. 66: 336-342
- Beinke, S. y Ley, S.C. 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. Biochem. J. 382:393-409
- Benedetto, N., Folgore, A., Romano-Caratelli, C. Galdiero, F. 2001. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. Eur. Cyt. Net. 12:348-358.
- Bolander, F.F. 2001. The role of nitric oxide in the biological activity of prolactin in the mouse mammary gland. Mol. Cell. Endocrinol. 174:91-98
- Bolander, F.F. 2002. Prolactin activation of mammary nitric oxide synthase: molecular mechanisms. J. Mol. Endocrinol. 28:45-51
- Bolander, F.F. 2005. The compartmentalization of prolactin signaling in the mouse mammary gland. Mol. Cell. Endocrinol. 245:105-110
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., N. Binart, N. Kelly, P. A. 1998. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrinology 19:225-268

- Boulanger, V. Bouchard, L. Zhao, X. Lacasse, P. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J. Dairy Sci.* 84:1430-1437
- Boutet, P., Sulon J., Closset R., Detilleux J., Beckers J.F., Bureau F. Lekeux P. 2007. Prolactin induced activation of nuclear factor κ B in bovine mammary epithelial cells: role in chronic mastitis. *J. Dairy Sci.* 90: 155-164
- Bradley, AJ. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164: 116-128
- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P. Talbot, B.G. 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathogen.* 35:159-168
- Burton, J.L. y Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Vet. Clin. Food. Anim.* 19:1-45.
- Burvenich, C. Paape, M.J. Hoeben, D. Dosogne, H. Massart-Leën, A.M. Blum, J. 1999. Modulation of the inflammatory and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17: 149-159
- Burvenich, C. Van merris, V. Mehrzad, J. Diez-Fraile, A. Duchateau, L. 2003. Severity of *E. coli* is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521-564
- Camper, S. Luck, DN. Yao, Y. Woychik, RP. Goodwin, RG. Lyons, RH Jr. Rottman, FM. 1984, Characterization of the bovine prolactin gene. *DNA.* 3:237-249
- Clark, R.T. Hope, A. Lopez-Fraga, M. Schiller, N. Lo, D.D. 2009. Bacterial particle endocytosis by epithelial cells is selective and enhanced by tumor necrosis factor receptor ligands. *Clinical and Vaccine Immunology.* 16 (3): 397-407
- Connor, EE. Siferd, S. Elsasser, TH. Evock-Clover, CM. Van Tassel, CP. Sonstegard, TS. Fernandes, VM. Capuco, AV. 2008. Effects on increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC genomics* 9:362

- Corbacho, AM. Macotela, Y. Nava, G. Eiserich, JP. Cross, CE. Martínez de la Escalera, G. Clapp, C. 2003. Cytokine induction of prolactin receptor mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett.* 544: 171-175
- Doherty, GJ. y McMahon, HT. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78:857–902
- Feola, R.P., Collins, M.T. Czuprynski, C.J. 1999. Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. Paratuberculosis in bovine peripheral blood monocytes. *Microb. Pathogen.* 26:1-11
- Frandsen, R.D. y Spurgeon, T.L. 1992. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 5 ed. McGraw-Hill. 549-553.
- Freshney, R. 1987. Culture of animal cells: A manual of basic technique. P. 117. Alan R. Liss, Inc., New York
- Garzoni, C. Francois, P. Huyghe, A. Couzinet, S. Tapparel, C. Charbonnier, Y. Renzoni, A. Lucchini, S. Leu, DP. Vaudaux, P. Kelley, W. Schrenzel, J. 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics.* 8:171
- Geymayer, S. y Doppler, W. 2000. Activation of NF- κ B p50/p65 is regulated in the developing mammary gland and inhibits STAT5-mediated β -casein gene expression. *FASEB J.* 14: 1159-1170
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B. 1998. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225–60.
- Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J.L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P.D., López-Meza J.E. Ochoa-Zarzosa A. 2008. Prolactin modulates the expression of inflammatory response genes and stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121:113-122

- Hallerman, EM. Theilmann, JL. Beckmann, JS. Soller, M. Womack, JE. 1988. Mapping of bovine prolactin and rodhopsing genes in hybrid somatic cells. Anim. Genet. 19:123-131
- Hocket, M.E., Hopkins, F.M., Lewis, M.J., Saxton, A.M., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. Schirck, F.N. 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. Anim. Reprod. Sci. 58:241-251
- Hovey, R.C. Trott, J.F. Vonderhaar, B.K. 2002. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. J. Mam. Gla. Bio. Neo. 7:17-38
- Huszenicza, G. Jánosi, S. Gáspárdy, A. Kulcsár, M. 2004. Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 83-83: 389-400
- Karin, M. y Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. Ann. Rev. Immunol. 18: 621-663
- Karin, M. y Greten, F.R. 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat. Rev. Immunol. 5: 749-759
- Kelly, P.A. Binart, N. Freemark, M. Lucas, B. Goffin, V. Bouchard, B. 2001. Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. Biochem. Soc. Trans. 29: 48-52
- Kerro-Dego, O., van Dijk, J.E. Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. Vet. Q. 24:181-198
- Kupferwasser, L.R., Yeaman, M.R., Nast, C.C., Kupferwasser, D., Xiong, Y.Q., Palma, M., Cheung, A.L. Bayer, A.S. 2003. Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 112: 222-233

- López-Meza, J.E. Gutiérrez-Barroso, A. Ochoa-Zarzosa, A. 2009. Expression of tracheal antimicrobial peptide in bovine mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* 89:59-63
- Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J.* 16: 520-530
- Lutzow, Y.C.S. Donaldson, L. Gray, C.P. Vuoloco, T. Pearson, R.D. Reverter, A. Byrne, K.A. Sheehy, P.A. Windon, R. Tellam, R.L. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet. Res.* 4:18
- Meli, R. Raso, GM. Gualillo, O. Pacilio, M. DiCarlo, R. 1997. Prolactin modulation of nitric oxide and TNF- α production by peripheral neutrophils in rats. *Life Sciences.* (61)14:1395-1403
- Mount, J.A. Karrow, N.A. Caswell, J.L. Boermans, H.J. Leslie, K.E. 2009. Assessment of bovine mammary chemokine gene expression in response to lipopolysaccharide, lipoteichoic acid + peptidoglycan, and CpG oligodeoxynucleotide 2135. *J. Can. J. Vet. Res.* 73: 49-57
- Neville, M.C. Mcfadden, T.B. Forsyth, I. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mam. Gla. Bio. Neo.* 7:49-66
- Oakes, SR. Rogers, RL. Naylor, MJ. Ormandy, CJ. 2008. Prolactin regulation of mammary gland development. *J. Mam. Gla. Bio. Neo.*
- Pahl, H.L. 1998. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogen.* 18: 6853-6866
- Park, W.B. Kim, S.H. Cho, J.H. Bang, J.H. Kim, H.B. Kim, N.J. Oh, M.O. Choe. K.W. 2007. Effect of salicylic acid on invasion of human vascular endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 56-61

- Passey, S. Bradley, A. Mellor, H. 2008. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Vet. Microbiol.* 130: 151-164
- Potempa, J. y Pike, R.N. 2009. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 1(2): 70-87
- Rainard, P. y Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369-400
- Riordan, J.T. Muthaiyan, A. Van Voorhies, W. Price, C.T. Graham, J.E. Wilkinson, B.J. Gustafson, J.E. 2007. Response of *Staphylococcus aureus* to salicylate challenge. *J. Bacteriol.* 189 (1): 220-227
- Ryan, L.K. Rhodes, J. Bhat, M. Diamond, G. 1998. Expression of beta-defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 66:878-881
- Sears, P.M. y McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* 19:171-185
- Sodhi, A. y Tripathi, A. 2008. Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages *in vitro*: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF- κ B. *Cytokine.* 41: 162-173
- Sordillo, LM. Shafer-Weaver, K. DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865
- Svennersten-Sjaunja, K. y Olsson, K. 2005. Endocrinology of milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 10: 145-147
- Tortonese, D. Brooks, J. Ingleton, P.M. Mcneilly, A.S. 1998. Detection of prolactin receptor gene expression in the sheep pituitary gland and visualization of the specific translation of the signal in gonadotrophs. *Endocrinology.* 139: 5215-5223
- Yamada, K.M., Pankov, R. Cukierman, E. 2003. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:959-966

- Yang, W. Zerbe, H. Petzl, W. Brunner, R.M. Günther, J. Draing, C. von Aulock, S. Schuberth, HS. Seyfert, HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transducer signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. Mol. Immunol. 45:1385-1397
- Yin, M. Yamamoto, Y. Gaynor, R.B. 1998. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . Nature. 396:77-80
- Yu-Lee, L. 2002. Prolactin modulation of immune and inflammatory response. Endocrinol. Soc. 54: 435-455