



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

**TNF- α E IL-1 β AUMENTAN LA FAGOCITOSIS Y
DISMINUYEN LA SUPERVIVENCIA INTRACELULAR
DE *Staphylococcus aureus* EN CÉLULAS
ENDOTELIALES DE BOVINO**

Tesis que presenta

M. C. JAVIER OVIEDO BOYSO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción en

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR AGROPECUARIA

Asesor

DR. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

Coasesor

DRA. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

Morelia, Michoacán, enero de 2009.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
SUMMARY	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Fagocitosis de bacterias mediada por receptores a Fc en macrófagos y neutrófilos	9
2.2 Moléculas involucradas en la adherencia y fagocitosis de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.3 Interacción entre <i>Staphylococcus aureus</i> y células endoteliales	15
2.4 Componentes de <i>Staphylococcus aureus</i> importantes en la respuesta inflamatoria	18
2.5 Factores que afectan la supervivencia intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Material biológico	25
7. RESULTADOS	27
7.1 Capítulo I	28
7.2 Capítulo II	37
7.3 Capítulo III	42
7.4 Capítulo IV	51
8. DISCUSIÓN GENERAL	59
9. PERSPECTIVAS	65
10. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	66
11. ANEXOS	74
11.1 Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis	75
11.2 Interferencia molecular en la ruta de transducción de NF- κ B por bacterias patógenas	87

11.3 TNF- α reduces the level of <i>Staphylococcus epidermidis</i> internalization by bovine endothelial cells	98
12. APÉNDICES	123
1. Buffer salino de fosfatos	123
2. Gel de poliacrilamida al 10 % (gel de separación de 1.5 mm)	123
3. Gel de poliacrilamida al 4 % (gel de condensación de 1.5 mm)	123
4. Acrilamida-bisacrilamida	123
5. Amortiguador para el gel (pH 8.9)	124
6. Amortiguador de corrida (2X)	124
7. Gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4 %	124
8. Preparación de TBE (5X)	124
9. Amortiguador de transferencia	125
10. Buffer salino a base de Tris (TBS)	125
11. Marcaje del oligonucleótido para realizar EMSA	125
12. Mezcla de reacción de unión para realizar EMSA	125
13. Glicerol (1 g/ml)	126
14. Amortiguador del cátodo	126
15. Amortiguador del ánodo	126

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: Albúmina sérica de bovino.

CEB: Células endoteliales de bovino.

EMSA: Ensayos de retardo en la movilidad electroforética.

ERK: Cinasa regulada por señal extracelular.

FAK: Cinasa de adhesión focal.

Fc γ R: Receptor Fc gama.

Fn: Fibronectina.

FnBP: Proteína de unión a fibronectina.

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

GM: Glándula mamaria.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1.

IgG: Inmunoglobulina G.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

iNOS: Oxido nitrico sintasa inducible.

ITAM: Motivos de activación con base en la tirosina del receptor.

ITIM: Motivos de inhibición con base en la tirosina del receptor.

JNK: Cinasa N-terminal de c-Jun.

LTA: Ácido lipoteicoico.

MCP-1 y 3: Proteína 1 y 3 quimioatrayente de macrófagos.

MSCRAMMs: Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz.

MyD88: Proteína adaptadora de la respuesta de diferenciación primaria mieloide 88.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

Nod: Proteína de unión a nucleótidos con dominios de oligomerización.

PGN: Peptidoglucano.

PI-3K: Fosfatidilinositol-3 cinasa.

PKC: Proteína cinasa C.

PLA2: Fosfolipasa A2.

PLC γ : Fosfolipasa C gama.

SpA: Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

TBS: Solución amortiguadora a base de Tris.

TTBS: Solución amortiguadora a base de Tris y Tween.

TLR2: Receptor tipo Toll 2.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa.

TRAF1: Factor 1 asociado al receptor de TNF- α .

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1.

RESUMEN

Las células endoteliales juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria. Estudios *in vitro* han demostrado que las células endoteliales pueden ser invadidas por diferentes microorganismos patógenos, entre ellos *Staphylococcus aureus*. La infección de la glándula mamaria bovina por esta bacteria, induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 beta (IL-1 β), por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de estas citocinas sobre la fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* (bacteria patógena) y *Staphylococcus epidermidis* (bacteria patógena oportunista) en células endoteliales de bovino (CEB). Las CEB fueron capaces de fagocitar tanto a *S. aureus* como a *S. epidermidis*, aunque con un patrón diferente. El tratamiento de las CEB con el TNF- α (2.5 ng/ml) o con la IL-1 β (20 ng/ml) indujo un incremento en la fagocitosis de *S. aureus* y una disminución en la fagocitosis de *S. epidermidis*. Estas citocinas activan vías de señalización que involucran al factor de transcripción NF- κ B, a la cinasa JNK y a la cinasa p38. Por lo tanto, se analizó la participación de cada una de estas moléculas en la fagocitosis de ambas bacterias. La fagocitosis de *S. aureus* está asociada con la activación de NF- κ B, mientras que la fagocitosis de *S. epidermidis* está asociada con la activación de JNK y de p38. De manera interesante, se encontró que *S. aureus* activa la translocación de NF- κ B al núcleo. Se sabe que la proteína A de *S. aureus* (SpA) se une al receptor 1 de TNF (TNFR1) y esto activa a NF- κ B en células epiteliales de pulmón. El tratamiento de las CEB con SpA disminuyó la capacidad fagocítica de las CEB, aunque de manera reversible, ya que después del tratamiento con SpA y después de un tiempo de incubación sin tratamiento adicional, la capacidad fagocítica de las CEB se recuperó. Esta recuperación fue más eficiente cuando las CEB se estimularon con TNF- α o IL-1 β después de un periodo de cultivo de 2 h. Por otra parte, se observó que las CEB fueron capaces de matar a los estafilococos intracelulares. *S. aureus* fue capaz de multiplicarse dentro de las CEB en las primeras 2 h post-infección, mientras que *S. epidermidis* no, sino que fue eliminada desde las primeras horas post-infección, incluso más eficientemente que *S. aureus*. La capacidad de las CEB para matar a los estafilococos intracelulares se incrementó por el tratamiento con TNF- α y con IL-1 β . En conjunto, todos estos resultados indican que las CEB podrían tener un papel importante en la fisiopatología de infecciones al endotelio causadas por estas bacterias y que citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α o la IL-1 β pueden servir como moduladoras en la interacción de las células endoteliales y estas bacterias.

SUMMARY

Endothelial cells have a key role in the inflammatory response. Different approaches *in vitro* have demonstrated that endothelial cells can be invaded by many microorganisms, such as *Staphylococcus aureus*. In this work we evaluated the effect of the pro-inflammatory cytokines TNF- α (2.5 ng/ml) and IL-1 β (20 ng/ml) on the *S. aureus* phagocytosis and intracellular survival in bovine endothelial cells (BEC). Simultaneously, we performed assays with *S. epidermidis* with the aim to compare the BEC response toward a pathogen bacterium versus an opportunistic-pathogen bacterium. BEC were able to phagocytize both *S. aureus* and *S. epidermidis*, although with a different pattern. The BEC treatment with TNF- α or IL-1 β increased *S. aureus* phagocytosis, but decreased that of *S. epidermidis*. These cytokines activate signaling pathways such as those that involve NF- κ B, JNK, and p38. Therefore the participation of each of these molecules in *S. aureus* and *S. epidermidis* phagocytosis was evaluated. *S. aureus* phagocytosis is associated with the activity state of NF- κ B whereas *S. epidermidis* phagocytosis is associated with the basal activity of JNK and p38. Interestingly, we found that *S. aureus* activated the nuclear translocation of NF- κ B. It is known that the protein A (SpA) of *S. aureus* binds to TNFR1 and activates NF- κ B in airway epithelial cells. The treatment of BEC with SpA decreased their phagocytic capacity, although this behavior was reversible because the phagocytic capacity of BEC was recovered when BEC were cultured for a period of 2 and 6 h without additional treatment. The recovery of the phagocytic capacity was improved by treatment of BEC with TNF- α or IL-1 β after a culture period of 2 h. BEC were also able to kill intracellular staphylococci. Although *S. aureus* was able to replicate into BEC at 2 h post-infection, *S. epidermidis* was unable to replicate into BEC, and was more efficiently killed at all times evaluated. TNF- α and IL-1 β increased the capacity of BEC to kill intracellular staphylococci. Altogether, these results suggest that BEC may play a key role in the pathophysiology of infections to the endothelium caused by these bacteria. Moreover, suggest that pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β modulate the endothelial cells with these bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más importantes del ganado bovino lechero es la inflamación de la glándula mamaria (mastitis). La mastitis reduce de manera significativa la cantidad y calidad de la leche, debido al daño causado al tejido de la glándula, lo que se refleja en pérdidas económicas para el productor. La mastitis es una enfermedad multifactorial, en la que microorganismos patógenos contagiosos y patógenos ambientales juegan un papel importante. Entre los microorganismos patógenos contagiosos más frecuentemente aislados de la glándula mamaria está *Staphylococcus aureus*, el cual es causante de mastitis clínica y subclínica. Aunque *S. aureus* induce la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos y la producción de citocinas, la inducción de dicha respuesta no es suficiente para controlar la mastitis causada por esta bacteria. Un aspecto que se ha relacionado con la dificultad en el control de la mastitis es que la producción de citocinas, como el TNF- α y la IL-1 β , principales efectoras de la respuesta inflamatoria, es transitoria, ya que la síntesis de estas no rebasa las 32 h postinfección. Aunado a esto, se sabe que *S. aureus* tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune y de invadir células epiteliales de la glándula mamaria, lo cual puede explicar, en parte, por qué la infección de la glándula mamaria por esta bacteria tiende a tornarse crónica.

La glándula mamaria es un órgano altamente vascularizado, se sabe que las células endoteliales se encuentran recubriendo el interior de los vasos sanguíneos. Por tanto, las células endoteliales pueden interactuar con cualquier microorganismo que haya entrado o intente entrar al torrente sanguíneo. Las células endoteliales tienen también una participación importante en la respuesta inflamatoria, producen quimiocinas, citocinas y adhesinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección. Entonces, resulta importante investigar la respuesta celular del endotelio a la infección por bacterias causantes de mastitis, particularmente *S. aureus*.

Se ha demostrado que *S. aureus* puede invadir células endoteliales de bovino, pero poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares involucrados en dicho proceso. Existen diferencias entre los reportes presentados en cuanto a las consecuencias de la entrada de *S. aureus* en este tipo de células. En algunas investigaciones se ha reportado que *S. aureus* causa apoptosis, mientras que en otras se reporta la producción de moléculas propias de la respuesta inflamatoria por parte de las células endoteliales. Por lo tanto, resulta necesario determinar los factores que intervienen en la entrada de *S. aureus* en las células endoteliales, además de establecer el destino intracelular de la bacteria.

Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β son las principales reguladoras de la actividad del endotelio, a través de la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), el cual es fundamental para una respuesta inflamatoria adecuada. En este trabajo se evaluó el efecto del TNF- α y la IL-1 β sobre la fagocitosis y supervivencia intracelular de *S. aureus* en células endoteliales de bovino. Asimismo, se determinó si el estado de activación del NF- κ B influye sobre el proceso de fagocitosis de las bacterias. Muchas bacterias son capaces de regular la activación de vías de señalización intracelulares con el fin de controlar la respuesta de la célula hospedera. En este sentido, se sabe que *S. aureus* posee una amplia gama de factores de virulencia y componentes estructurales, mediante los cuales puede modular la respuesta inflamatoria en macrófagos, a través de la activación de NF- κ B. Es por esto que se exploró la posible activación del NF- κ B por la misma bacteria en las células endoteliales de bovino. Además, con la finalidad de determinar qué componente de *S. aureus* podría estar influyendo de manera importante en el proceso de fagocitosis, se realizaron experimentos en los que se evaluó el efecto del tratamiento de las células endoteliales de bovino con proteína A de *S. aureus*.

En la infección de la glándula mamaria también participan otro tipo de *Staphylococcus*, como los *Staphylococcus* coagulasa negativos. *Staphylococcus epidermidis*, que pertenece a este grupo, es clasificada como un patógeno ambiental oportunista y que con frecuencia se encuentra asociada con los casos de mastitis causados por *S. aureus*. Existen algunos reportes en los que se encontró que *S. epidermidis* puede invadir células epiteliales de la glándula mamaria de bovino y células de hueso. En el segundo caso, se demostró que el mecanismo de invasión empleado por *S. epidermidis* es diferente al utilizado por *S. aureus*. De modo que en el proyecto se incluyó a *S. epidermidis* con la finalidad de analizar la respuesta de las células endoteliales a la infección por una bacteria representante del grupo de los coagulasa negativos, y comparar los resultados obtenidos sobre el efecto del TNF- α y la IL-1 β sobre la fagocitosis y supervivencia intracelular, con los obtenidos con *S. aureus*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fagocitosis de bacterias mediada por receptores a Fc en macrófagos y neutrófilos

Los neutrófilos y macrófagos representan la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, de ahí que se les considere como las principales células efectoras de la respuesta inmune innata (Keller *et al.*, 1992). Estas células juegan un papel importante en la respuesta inmune de la glándula mamaria de bovino, ya que se encargan de reconocer y fagocitar a las bacterias patógenas que potencialmente pueden causar mastitis (Paape *et al.*, 2003). La fagocitosis juega un papel importante en la respuesta inmune innata y esta se define como el proceso mediante el cual las células reconocen y engullen partículas relativamente grandes de un tamaño mayor a 0.5 μm (Caron y Hall, 1998; Fujiwara y Kobayashi, 2005). Los macrófagos y neutrófilos son reconocidos como células fagocíticas especializadas (fagocitos profesionales), aunque existen otros tipos celulares como las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y osteoblastos, que también son capaces de llevar a cabo esta función, por lo cual se les conoce como fagocitos no profesionales (Rabinovitch, 1995).

Para que ocurra la fagocitosis es necesario que la célula fagocítica reconozca al microorganismo. Actualmente, se sabe que los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) expresan una amplia variedad de receptores transmembranales que participan en el reconocimiento y fagocitosis de los microorganismos. Algunos de estos receptores permiten transmitir señales intracelulares que activan la fagocitosis y la síntesis de proteínas, mientras que otros participan principalmente en la unión y reconocimiento del microorganismo en la superficie celular (Underhill y Ozinski, 2002; Blasi *et al.*, 2005). Como consecuencia de la interacción microorganismo-célula fagocítica se desencadena una serie de eventos que van acompañados por señales intracelulares que activan procesos tan diversos como el rearrreglo del citoesqueleto, alteraciones en el tráfico membranal, activación de mecanismos antimicrobianos, producción de citocinas anti- y pro-inflamatorias, producción de quimiocinas, activación de la apoptosis y producción de moléculas requeridas para la presentación eficiente de antígenos (Underhill y Ozinsky, 2002).

El reconocimiento de los microorganismos por los fagocitos puede ser de forma directa o indirecta. Directa cuando la interacción se da entre un componente del microorganismo y un receptor presente en la superficie del fagocito e indirecta cuando los microorganismos necesitan ser opsonizados previamente por inmunoglobulinas (Ig) o moléculas del complemento. Aunque se sabe que, a diferencia de la fagocitosis mediada

por moléculas del complemento, la fagocitosis mediada por Ig si desencadena una respuesta inflamatoria (Caron y Hall, 1998). Cuando los microorganismos son opsonizados por Ig, su reconocimiento es mediado por los receptores Fc (FcR) presentes en la superficie membranal de los macrófagos. Fc γ R se une a la región Fc de la IgG, mientras que Fc ϵ R reconoce a IgE y Fc α R a IgA (Caron y Hall, 1998; Underhill y Ozinsky, 2002). Los Fc γ R han sido los más estudiados, de modo que a la fecha se han descubierto diferentes tipos de Fc γ R. Una forma práctica de clasificarlos es la que los divide en dos grupos: 1) Fc γ R que contienen motivos ITAM (motivos de activación en base a la tirosina del inmunoreceptor) en su dominio citoplásmico y que reclutan cinasas, por lo que activan cascadas de fosforilación, y 2) Fc γ R que contienen motivos ITIM (motivos de inhibición en base a la tirosina del inmunoreceptor) que reclutan fosfatasa e inhiben la señalización (Underhill y Ozinsky, 2002).

Cuando el microorganismo opsonizado por IgG se une a Fc γ R se induce la fosforilación de residuos de tirosina específicos de los ITAMs. La fosforilación de los ITAMs es realizada por cinasas de la familia Src, lo que hace que los motivos ITAM fosforilados expongan sitios de ensamble para la cinasa Syk (Fig. 1). El reclutamiento de Syk induce su fosforilación por parte de Src y por consecuencia su activación (García-García, 2005; Rosales, 2007). La fosforilación de Syk es necesaria para la activación de la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K), lo cual conduce a la activación de la subunidad catalítica p110 β de la PI-3K. La activación de PI-3K es importante pues se ha reportado que induce la formación de pseudópodos y la maduración del fagosoma (Swanson y Hoppe, 2004). Las moléculas de señalización que participan después de la activación de Syk no han sido determinadas en su totalidad. Sin embargo, los reportes muestran una variedad de elementos y moléculas que participan en el proceso de fagocitosis, entre las que se cuentan el calcio, la proteína cinasa C (PKC), la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfolipasa D, la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), la fosfolipasa C γ (PLC γ), y una guanosín-trifosfatasa (GTPasa) de la familia de las proteínas G monoméricas Rho (García-García y Rosales, 2002).

En una revisión reciente, se propone que la activación de Syk conduce la fosforilación y activación de un complejo de moléculas de señalización formado por la proteína de leucocitos de 76 kDa que contiene dominios SH2 (SLP76) y la proteína de unión para la activación de células T (LAT). Las cuales interactúan con una proteína adaptadora relacionada con Grb2 (Gads). La PLC γ es reclutada hacia el complejo, lo que

induce la producción de inositoltrifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros inducen la liberación de calcio y la activación de la PKC, respectivamente. La PKC induce la activación de ERK y p38. La activación de PI-3K, induce la activación de la GTPasa Rac, la que a su vez activa a NF-κB y a JNK, los cuales son importante para la regulación de la respuesta inflamatoria (Fig. 1)(Rosales, 2007). Es importante mencionar que la activación de NF-κB por esta vía parece no influir en el proceso de fagocitosis (García-García *et al.*, 2001; Reyes-Reyes *et al.*, 2002).

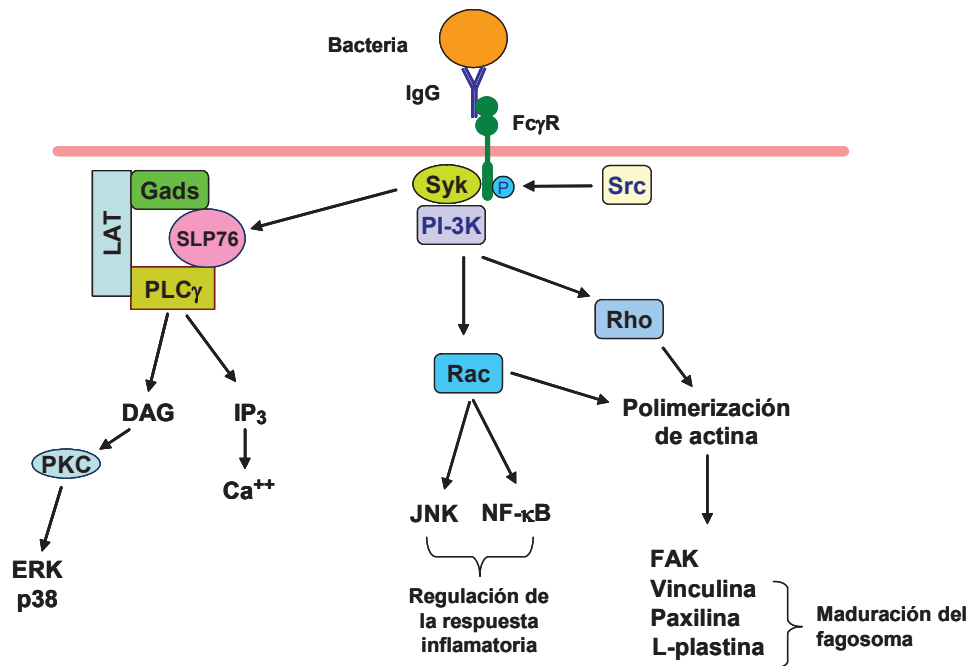


Figura 1. Moléculas involucradas en la fagocitosis mediada por receptores Fc γ (Fc γ R). Las bacterias opsonizadas por inmunoglobulina G (IgG) se unen al dominio extracelular de Fc γ R, esto favorece la fosforilación de los motivos ITAM del receptor por la proteína tirosina cinasa Src, con lo que se crea una plataforma de ensamble para la proteína cinasa Syk, la cual es fosforilada por Src. Syk fosforilada induce la activación de la cinasa fosfatidilinositol-3 (PI-3K). La activación de Syk conduce también a la formación del complejo formado por la proteína de leucocitos de 76 kDa que contiene dominios SH2 (SLP76), la proteína de unión para la activación de células T (LAT) y la proteína adaptadora relacionada con Grb2 (Gads). El reclutamiento de la fosfolipasa C γ (PLC γ) al complejo formado, favorece la producción de inositoltrifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Los cuales causan la liberación de calcio y la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente. La activación de la PKC conduce a la activación de la cinasa regulada por señal extracelular ERK y de la MAPK p38. Por su parte, PI-3K induce la activación de las GTPasas Rho y Rac, a las cuales se les ha asociado con la polimerización del citoesqueleto de actina y la maduración del fagosoma. En el caso de Rac, también se ha encontrado que puede inducir la activación de NF-κB y de JNK. Figura modificada de Rosales, 2007.

Un paso fundamental en la fagocitosis es el rearrreglo del citoesqueleto de actina, que da como resultado la extensión de la membrana plasmática del fagocito sobre el microorganismo que va a ser fagocitado. En este proceso participan GTPasas de la familia Rho (Rho, Rac, Cdc42). Rho media el ensamble de los filamentos contráctiles de actino-miosina, mientras que Rac y Cdc42 controlan la polimerización de actina (Caron y Hall,

1998). Además de las GTPasas, se han reportado otras moléculas como la cinasa de adhesión focal (FAK), L-plastina, cofilina, vinculina, α -actinina, talina, gelsolina, coronina y paxilina que se asocian a la actina y pueden localizarse alrededor del fagosoma (May y Machesky, 2001). El fagosoma es una vacuola intracelular derivada de la membrana plasmática en la que el microorganismo invasor es conducido al interior de la célula fagocítica. La membrana que limita al fagosoma recién formado se asemeja a la membrana plasmática del fagocito y su contenido es una muestra del medio extracelular, de modo que no tiene capacidad bactericida, por lo que es necesario sufra un proceso de maduración (Vieira *et al.*, 2002; Lorenz y Fink, 2002). Aunque la función de FAK, L-plastina, cofilina, vinculina, α -actinina, talina, gelsolina, coronina y paxilina se ha correlacionado con un incremento en el número y estabilización de los filamentos de actina (nucleación), su función en el proceso de fagocitosis es aún una controversia (Swanson y Hoppe, 2004).

2.2 Moléculas involucradas en la adherencia y fagocitosis de *Staphylococcus aureus*

Aunque por mucho tiempo a *S. aureus* se le consideró como un patógeno extracelular, se han obtenido a la fecha evidencias que demuestran que *S. aureus* es capaz de invadir una variedad de células fagocíticas no profesionales como células endoteliales de bovino y de humano (Hamill *et al.*, 1986; Menzies y Kourteva, 1998), células epiteliales de la glándula mamaria de bovino (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998), osteoblastos de ratón y de humano (Ellington *et al.*, 1999; Jevon *et al.*, 1999; Bost *et al.*, 1999) y osteoblastos de pollo (Reilly *et al.* 2000). Se considera que la adhesión de *S. aureus* a la superficie celular es el primer paso en el proceso de colonización e infección de la célula hospedera (Alexander y Hudson, 2001). Para lograr esto, *S. aureus* expresa un conjunto de adhesinas, denominadas componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs) que le confieren la capacidad de adherirse a la superficie celular. Entre estas adhesinas se encuentran las proteínas de unión a fibronectina (FnBPs), la proteína de unión a fibrinógeno, la adhesina de unión a elastina y la adhesina de unión a colágeno (Alexander y Hudson, 2001; Jonsson *et al.*, 1991; Sinha *et al.*, 2000).

Las FnBPs (FnBPA y FnBPB) juegan un papel central en la invasión de *S. aureus* a las células endoteliales de humano (Peacock *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999). Las FnBPs están conformadas por varios dominios: A, B, Du y D₁-D₄ (Fig. 2), y la actividad de unión a fibronectina (Fn) de estas proteínas ha sido localizada en el dominio D, que es una región repetida de aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, localizada en la región C-terminal de estas proteínas. Las FnBPs presentan cuatro regiones repetidas D₁-D₄ y una

quinta región repetida de aproximadamente 100 aminoácidos, Du, hacia el extremo N-terminal de D₁. En la región N-terminal de la proteína se encuentra la región A de aproximadamente 500 aminoácidos, al cual se le ha atribuido actividad de unión a fibrinógeno. FnBPA contiene una región B que está constituida por dos regiones repetidas de aproximadamente 30 aminoácidos localizados al final del extremo C-terminal de la región A (Wann *et al.*, 2000; Massey *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2001).

La región D de FnBP interactúa con las primeras cinco regiones repetidas de tipo I de la fibronectina (Fig. 2), los cuales tienen una longitud de 40 aminoácidos cada uno y están localizados muy cerca de la región N-terminal de la fibronectina (Sottile *et al.*, 1991; Pankov y Yamada, 2002). Asimismo, la fibronectina puede ser el ligando para receptores de la familia de las integrinas, por lo que la fibronectina, que es sintetizada de manera abundante por fibroblastos y células endoteliales (Hynes y Yamada, 1982), sirve como la molécula de unión entre la FnBP expresada por la bacteria y las integrinas de la célula hospedera (Peacock *et al.*, 1999; Agerer *et al.*, 2005). La unión de FnBP con la fibronectina forma multímeros que promueven la interacción con integrinas de la membrana celular. Estas integrinas son receptores heterodiméricos expresados sobre la superficie celular eucariota, compuestos de una subunidad α y una subunidad β unidas por interacción no covalente. Se han identificado 18 subunidades α y 8 subunidades β , las cuales forman 20 heterodímeros diferentes con actividad específica. Las integrinas están involucradas en la comunicación y adhesión entre las células y los componentes de la matriz extracelular, por lo que sirven como transductores capaces de transmitir eventos de adhesión extracelular, iniciando de esta manera cascadas de señalización intracelular (Miyamoto *et al.*, 2001; Fowler *et al.*, 2003; Que *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Sinha *et al.* (1999), se identificó que la integrina $\alpha_5\beta_1$ desarrolla una función importante en la invasión de las células epiteliales 293 de humano por *S. aureus*. Por otra parte, Massey *et al.* (2001), observaron una disminución de la invasión de las células endoteliales de humano por *S. aureus*, cuando fueron tratadas con anticuerpos anti-integrina $\alpha_5\beta_1$. Esta observación sugiere la participación de esta integrina en el proceso de invasión celular por *S. aureus*. La unión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ y la fibronectina sucede en un sitio que comprende las regiones repetidas tipo III8 al III10 de la fibronectina (Fig. 2). Pero las evidencias experimentales han determinado que el sitio de mayor importancia para dicha unión se encuentra en una secuencia de 3 aminoácidos, Arg-Gly-Asp (secuencia RGD) en la región repetida tipo III10 (Magnusson y Mosher, 1998).

Aunque se ha reportado que la integrina $\alpha_5\beta_1$ también puede interactuar con la región N-terminal de la fibronectina, los eventos de señalización inducidos en este caso aún no están bien definidos (Hocking *et al.*, 1998).

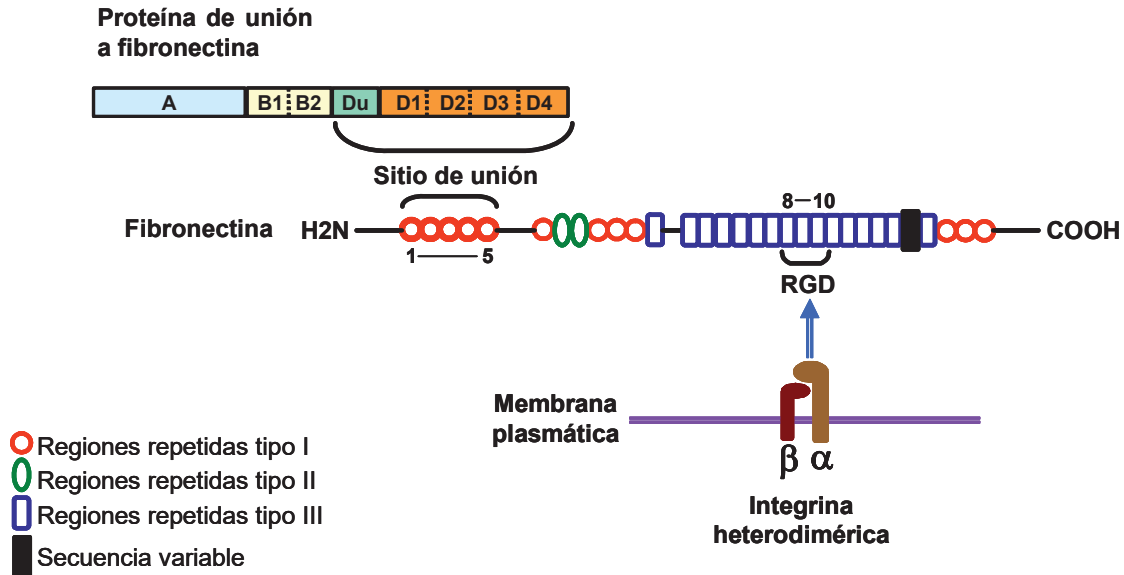


Figura 2. La unión de *Staphylococcus aureus* a las células endoteliales sucede a través de la integrina $\alpha_5\beta_1$. La proteína de unión a fibronectina de *S. aureus* se une mediante la región D a las primeras cinco regiones repetidas de tipo I de la fibronectina. La fibronectina a su vez se une con la integrina $\alpha_5\beta_1$ en una región que comprende las regiones repetidas 8-10 de tipo III. En la región repetida 10 de tipo III se encuentra la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) que se sabe es fundamental para esta interacción. Figura modificada de Miyamoto *et al.*, 2001; Pankov y Yamada, 2002.

Con la finalidad de estudiar los eventos celulares que suceden después de la interacción bacteria-célula vía FnBP-Fn-integrina se han realizado varios trabajos con diferentes tipos celulares como las células epiteliales de riñón de humano y fibroblastos (Agerer *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2003; Agerer *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos demuestran que durante la fase inicial de la interacción, el citoesqueleto de actina se polimeriza de manera transitoria. Esto favorece el reclutamiento, hacia el sitio de adhesión (FA), de moléculas como tensina, vinculina y cortactina. Este reclutamiento se acompaña de un aumento en la actividad de FAK y de cinasas de tirosina de la familia Src. La tensina es fosforilada por FAK, mientras que la vinculina y la cortactina es fosforilada por la cinasa Src (Fig. 3). En experimentos realizados con células deficientes en FAK y/o Src, se observó que la invasión por *S. aureus* disminuyó significativamente, lo que permite sugerir que la participación conjunta de estas cinasas es fundamental en el proceso de invasión mediada por integrina (Agerer *et al.*, 2005).

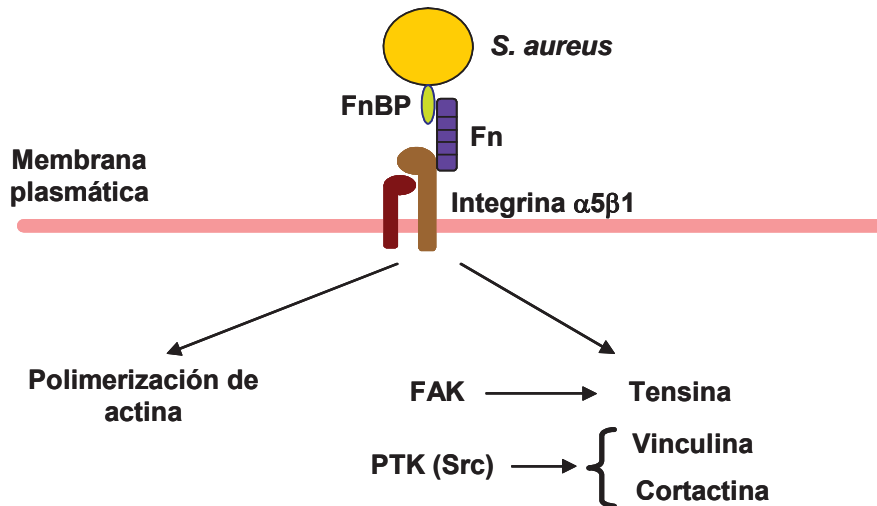


Figura 3. Eventos celulares activados por la unión de *Staphylococcus aureus* mediante integrinas. La unión de *S. aureus* a la integrina $\alpha_5\beta_1$ provoca la polimerización del citoesqueleto de actina. Al sitio de adhesión se reclutan la cinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa de tirosina (PTK) de la familia de las proteínas Src. Estas quinasas son las encargadas de fosforilar a la tensina, vinculina y cortactina, que son moléculas que también se asocian al sitio de adhesión.

En experimentos realizados con células epiteliales de la glándula mamaria de bovino infectadas con una cepa de *S. aureus* deficiente en FnBPs, se observó un retraso temporal en la internalización de la bacteria, lo cual confirma la importancia de estas proteínas (Brouillette *et al.*, 2003). La ausencia de FnBPs no inhibió totalmente la internalización de *S. aureus*, por lo que se sugiere la participación de otras moléculas en dicho proceso.

2.3 Interacción entre *Staphylococcus aureus* y células endoteliales

El endotelio es una monocapa continua que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos (Auerbach y Auerbach, 1994). De acuerdo con su organización celular y grado de unión, el endotelio se ha clasificado en: 1) **discontinuo**, con alta permeabilidad y se encuentra principalmente en hígado y bazo; 2) **fenestrado**, con una menor permeabilidad y se puede encontrar en los túbulos renales y glándula mamaria y 3) **continuo**, con una permeabilidad más baja que los anteriores y se encuentra en los capilares del cerebro (Rubin, 1992; Risau, 1995). Las células endoteliales desarrollan una variedad de funciones como son la regulación de la angiogénesis, de la homeostasis vascular, del intercambio de moléculas entre la sangre y los tejidos, del control del tono vascular y de manera importante de la respuesta inflamatoria (Michiels, 2003; Valbuena y Walker, 2006).

La participación de las células endoteliales en la respuesta inflamatoria es muy activa ya que coordinan el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de daño o infección y

ayudan en la activación de los mismos. Además, son las células blanco para moléculas derivadas de los macrófagos, lo que favorece su activación (Biedermann, 2001; Liu *et al.*, 2004; Valbuena y Walker, 2006). Los macrófagos residentes en los tejidos reconocen y fagocitan a los microorganismos patógenos invasores y secretan citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , las cuales inducen la activación de NF- κ B en las células endoteliales. Podría considerarse que la función principal del TNF- α en las células endoteliales es la activación de NF- κ B; sin embargo, se ha demostrado que el TNF- α también activa al factor de transcripción AP-1 y a las proteínas cinasas activadas por mitógeno JNK y p38, las cuales tienen también una función importante en la respuesta inflamatoria (Madge y Pober, 2001; Wajant *et al.*, 2003; Gustin *et al.*, 2004).

La activación de NF- κ B promueve en las células endoteliales la expresión de moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria, entre las cuales se encuentran las adhesinas E-selectina, molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), quimiocinas como IL-8, proteína quimioatrayente de macrófagos-1 y 3 (MCP-1 y MCP-3), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Biedermann, 2001; Pober, 2002; Gustin *et al.*, 2004; Kuldo *et al.*, 2005). Además, en otros trabajos realizados con células endoteliales de humano, se ha encontrado que TNF- α e IL-1 β activan la expresión de IL-6 y factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF) (Nilsen *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1999). Para una revisión más amplia de los factores que intervienen en la activación de NF- κ B ver Oviedo-Boyso *et al.* (2005, ANEXO 2).

Es evidente que las células endoteliales juegan un papel primordial como mediadoras de la respuesta inflamatoria porque debido a su disposición anatómica, pueden interactuar con cualquier microorganismo que intente pasar al torrente sanguíneo (Valbuena y Walker, 2006). Además de *S. aureus*, se ha reportado la infección de las células endoteliales de humano por diversos patógenos como *Chlamydia pneumoniae*, *Bartonella henselae*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* y *Rickettsia rickettsii*, los cuales emplean una amplia variedad de estrategias moleculares para invadir a las células endoteliales, como la activación de diferentes receptores, la liberación de toxinas o la replicación intracelular (Hippenstiel y Suttorp, 2003). En particular, la interacción entre *S. aureus* y las células endoteliales ha sido abordada desde diferentes enfoques, como su

capacidad de adherencia a la superficie celular (Ogawa *et al.*, 1985; Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000) y su capacidad para invadirla (Hamill *et al.*, 1986; Menzies y Kourteva, 1998).

Estudios realizados por Pöhlmann-Dietze *et al.* (2000), determinaron que *S. aureus* en la fase exponencial de crecimiento, a multiplicidades de infección altas, muestra una mayor capacidad de adhesión a células endoteliales de humano. Si se considera que la producción de factores de virulencia está asociada con la fase de crecimiento y la densidad bacteriana, se puede suponer entonces que las moléculas que favorecen la adhesión de *S. aureus* a las células endoteliales tienen su mayor expresión durante la fase exponencial. Cheung *et al.* (1991), encontraron que TNF- α aumentó la adherencia de *S. aureus* a las células endoteliales de humano; sin embargo, aunque se conocen las vías de señalización que TNF- α activa en las células endoteliales, estos investigadores no evaluaron la implicación de alguna de ellas en el efecto de adherencia observado. En otro reporte se encontró que la activación del complemento disminuye marcadamente la capacidad de *S. aureus* para adherirse a las células endoteliales (Cunnion y Frank, 2003). Estos resultados en conjunto destacan la importancia de la adherencia de la bacteria a la superficie celular, que como se sabe es el primer paso para la invasión de una célula; sin embargo, no explican los mecanismos involucrados en este proceso.

Los estudios relacionados con las consecuencias de la fagocitosis de *S. aureus* sobre la fisiología de las células endoteliales son diversos. Se ha reportado que la producción de α -toxina durante el proceso de fagocitosis de *S. aureus* tiene un efecto citotóxico sobre las células endoteliales de aorta de bovino cultivadas en monocapa (Vann y Proctor, 1987). Posteriormente, se publicó que este mismo efecto sucede en células endoteliales de cordón umbilical de humano (Menzies y Kourteva, 1998; Menzies y Kourteva, 2000). Sin embargo, otros trabajos difieren de los anteriores, ya que no reportan muerte celular y en cambio observan la síntesis de adhesinas como E-selectina e ICAM-1, por efecto de la infección con *S. aureus* (Strindhall *et al.*, 2002).

Aparte de la síntesis de adhesinas, se ha observado que la fagocitosis de *S. aureus* en células endoteliales de humano también induce la producción de IL-6, IL-1 β (Yao *et al.*, 1995) e IL-8 (Yao *et al.*, 1996); además, la respuesta celular parece estar determinada por el tipo de cepa de *S. aureus* que se utiliza, ya que cuando se utilizó una cepa de *S. aureus* productora de una lipoproteína que inhibe su capacidad de entrar a la célula pero no de adherirse, no se observó síntesis de citocinas. Esto sugiere que la adhesión no es suficiente para inducir la síntesis de citocinas sino que es necesaria la entrada de la bacteria (Yao *et*

al., 2000). En un reporte más reciente (Matussek *et al.*, 2005), se observó que la fagocitosis de *S. aureus* por células endoteliales de humano indujo la expresión de 156 genes, entre los cuales se encuentran genes que codifican para proteínas participantes en la respuesta inmune innata: adhesinas (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina), quimiocinas (IL-8) y moléculas de señalización (MyD88, TRAF1), demostrando que la interacción de *S. aureus* con la célula endotelial es considerablemente compleja.

2.4 Componentes de *Staphylococcus aureus* importantes en la respuesta inflamatoria

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, coagulasa positiva que forma parte de la flora normal de las vías respiratorias altas; sin embargo, es capaz de causar una variedad de enfermedades en humanos y en animales. En humanos puede causar infecciones de la piel, intoxicación por alimentos contaminados, artritis séptica, septicemia, choque tóxico, neumonía, osteomielitis y endocarditis; además, representa una de las principales causas de infecciones intrahospitalarias en pacientes que han sido sometidos a cirugía o cateterizados (Martins y Cunha, 2007). En los animales, las principales enfermedades que puede causar son infecciones del tracto urinario, artritis y mastitis. Probablemente, la mastitis sea la de mayor importancia debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona en las explotaciones lecheras (Bradley, 2002). Para una revisión más completa de los principales tipos de mastitis en el ganado bovino lechero ver Oviedo-Boyso *et al.* (2007) (ANEXO 1). En la mastitis bovina causada por *S. aureus*, la producción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β es transitoria, ya que su síntesis está limitada a las primeras 32 horas post-infección. De esta forma la infección de la GM por *S. aureus* tiende a ser una infección crónica, con una respuesta inmune innata limitada (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; ANEXO 1).

S. aureus es un patógeno que produce una amplia variedad de toxinas, exoenzimas, adhesinas y proteínas que modulan o evaden la respuesta inmune (Fedtke *et al.*, 2004; Foster, 2004). Además, presenta diferentes componentes que pueden interactuar con receptores presentes en las células del sistema inmune (Fig. 4) (Fournier y Philpott, 2005). De todos los componentes de *S. aureus* descritos a la fecha, los más estudiados son el ácido lipoteicoico (LTA) y la proteína A (SpA). El LTA se une al receptor tipo toll 2 (TLR2) en su dominio extracelular, lo que ocasiona el reclutamiento de proteínas en el dominio intracelular y que culmina en la activación de NF- κ B (Schröder *et al.*, 2003; Akira y Sato, 2003). SpA tiene un efecto antifagocítico debido a que se une a la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG) lo que impide que *S. aureus* sea opsonizado y, en consecuencia,

no fagocitado (Foster, 2004). Recientemente, se reportó que SpA se une al receptor 1 de TNF- α (TNFR1) en células epiteliales de pulmón de humano y que dicha unión activa una vía de señalización similar a la activada por TNF- α , que promueve la translocación de NF- κ B al núcleo (Gómez *et al.*, 2004).

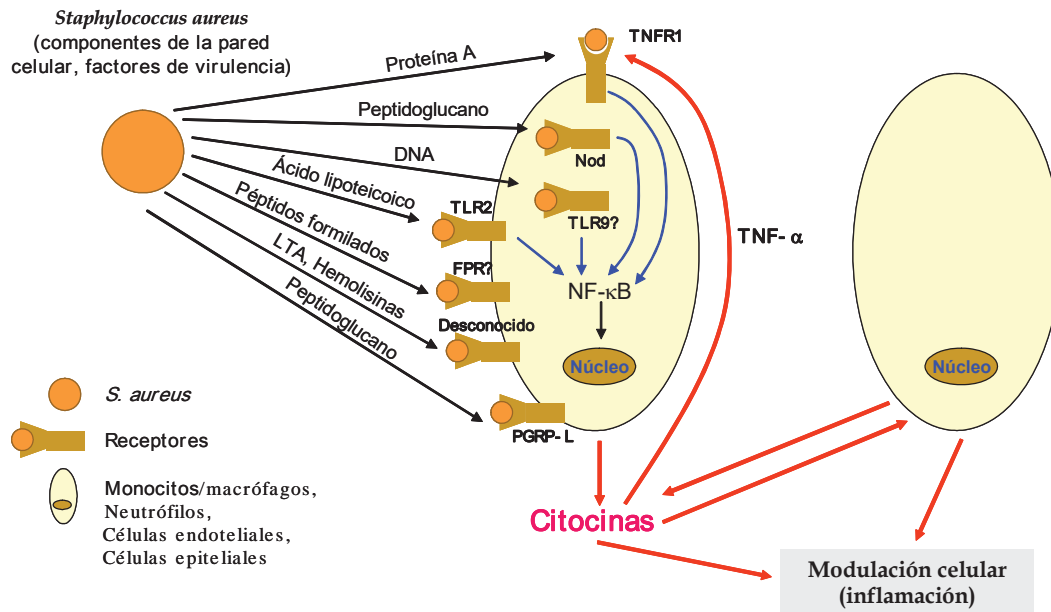


Figura 4. Componentes de *Staphylococcus aureus* que inducen una respuesta inflamatoria al unirse a sus receptores en células fagocíticas profesionales y no profesionales. La unión de los diferentes componentes de *S. aureus* a sus respectivos receptores induce la activación de NF- κ B, lo cual conduce a la producción de citocinas que pueden actuar de manera autócrina o parácrina para modular la respuesta celular. TNFR1, receptor 1 de TNF- α ; TLR2, receptor tipo Toll 2; FPR, receptor de péptidos formilados; PGRP-L, proteína L de reconocimiento de peptidoglucano; Nod, dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (Figura tomada de Fournier y Philpott, 2005).

Uno de los constituyentes altamente conservado entre las bacterias Gram positivas es el peptidoglucano (PGN), el cual se ha reportado induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 en monocitos y macrófagos (Moreillon y Majcherczyk, 2003; Fournier y Philpott, 2005). El reconocimiento de los diferentes componentes (p. ej. PGN, LTA, proteína A; Fig. 4) involucra receptores que presentan dominios extracelulares. Sin embargo, *S. aureus* también puede ser reconocido por receptores intracelulares. En un reporte reciente, Kapetanovic *et al.* (2007) demostraron que las proteínas Nod, proteínas que funcionan como dominios de oligomerización de unión a nucleótidos, se localizan en el citosol, reconocen motivos estructurales del PGN de *S. aureus* y son necesarias para la inducción de la respuesta inflamatoria iniciada por macrófagos. Además, se sabe que Nod induce la activación de NF- κ B a través de RIP2, lo cual es importante para la respuesta inflamatoria (Oviedo-

Boyso *et al.*, 2005; ANEXO 2). La participación de los factores de virulencia y componentes estructurales de *S. aureus* en la inducción de la respuesta inflamatoria y en el establecimiento de la enfermedad son campos muy estudiados en la actualidad; de estos trabajos se concluye que la respuesta celular depende, de manera importante, del tipo celular que se estudia.

2.5 Factores que afectan la supervivencia intracelular de *Staphylococcus aureus*

S. aureus tiene la capacidad de invadir una variedad de tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células epiteliales de la glándula mamaria y las células endoteliales de bovino. Asimismo, la presencia intracelular de *S. aureus* puede ser uno de los factores que influyen en la acción poco efectiva de la respuesta inmune y de los antibióticos utilizados en las infecciones subclínicas de la GM (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Anexo 1). Uno de los primeros eventos durante el proceso de fagocitosis es la formación del fagosoma, el cual es una vacuola derivada de la membrana plasmática, en la que el microorganismo fagocitado es “enclaustrado”. Posteriormente, el fagosoma se fusiona con el lisosoma, adquiriendo así la capacidad de matar al microorganismo que ha sido fagocitado, esto debido al pH bajo, enzimas hidrolíticas, defensinas, péptidos antimicrobianos y la capacidad de generar compuestos oxidantes tóxicos (Vieira *et al.*, 2002). Las investigaciones realizadas en células epiteliales de GM de bovino, con la finalidad de determinar el destino intracelular de *S. aureus*, muestran que después de ser fagocitado, *S. aureus* permanece temporalmente en el fagosoma, después se le observa libre en el citoplasma e induce apoptosis de las células (Bayles *et al.*, 1998). Un comportamiento similar fue observado en células epiteliales de pulmón de humano; en este caso se observó que *S. aureus* logra dividirse dentro de las células y causa su muerte. Además, no se observó fusión del fagosoma con el lisosoma (Kahl *et al.*, 2000). Las observaciones realizadas en ambas investigaciones sugieren que la supervivencia intracelular de *S. aureus* se ve favorecida al evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma; sin embargo, no se menciona el mecanismo utilizado para tal fin.

Recientemente, en células epiteliales de tráquea de humano se obtuvo evidencia de que *S. aureus* tiene la capacidad de degradar la membrana fagosomal (Jarry y Cheung, 2006). Posteriormente, se pudo determinar que la hemolisina alfa, una exoproteína de *S. aureus*, es la responsable de la lisis de la membrana endosomal, aunque no se descarta la posible participación de otros factores (Jarry *et al.*, 2008). Este mecanismo es similar al empleado por otras bacterias que también producen hemolisinas, como *Listeria*

monocytogenes que secreta listeriolisina O (LLO) que degrada la membrana del fagosoma para permitir la liberación de la bacteria hacia el citosol (Finlay y Falkow, 1997).

Aunque las evidencias experimentales demuestran que *S. aureus* puede sobrevivir en el interior de fagocitos no-profesionales, los mecanismos moleculares que favorecen su persistencia intracelular aún no han sido totalmente descritos. La comprensión detallada de los cambios que sufre *S. aureus* después de su entrada a la célula hospedera, podría ayudar a entender los mecanismos que favorecen las infecciones persistentes por *S. aureus*. En un modelo de infección *in vitro* de células epiteliales de pulmón se realizó un monitoreo de los genes que se expresan después de la entrada de *S. aureus* a la célula hospedera. Se encontró que inmediatamente después de la infección, algunas vías metabólicas incluyendo la división celular, el transporte de nutrientes y algunos procesos de regulación mostraron una actividad limitada, mientras que varios genes involucrados en la captura de hierro y producción de factores de virulencia aumentaron su expresión. Posteriormente, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en actividades metabólicas (Garzoni *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha determinado que el destino intracelular de *S. aureus* depende de la citotoxicidad de la bacteria, ya que se ha observado que cepas citotóxicas de *S. aureus* escapan del compartimento fagolisosomal y son capaces de sobrevivir intracelularmente; en tanto que las cepas no-citotóxicas entran a degradación lisosomal poco tiempo después de su entrada a la célula (Krut *et al.*, 2003). Se ha evaluado también la capacidad de algunos antibióticos para eliminar a *S. aureus* y evitar la muerte de la célula hospedera. La oxacilina fue uno de los antibióticos utilizados y se encontró que no logró matar a *S. aureus* intracelular (Krut *et al.*, 2004). Sin embargo, posteriormente se reportó que la eliminación de *S. aureus* por la oxacilina fue favorecida de manera indirecta por el TNF- α . Este efecto fue obtenido debido a que el TNF- α causó la apoptosis de las células endoteliales de humano, lo que provocó que la bacteria quedara expuesta a la acción de la oxacilina (Park *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus aureus causa una variedad de enfermedades en los humanos y en los animales. En el ganado bovino lechero, *S. aureus* es una de las principales bacterias causantes de mastitis. Una característica importante de la mastitis causada por esta bacteria es que generalmente tiende a ser subclínica y con el tiempo se torna crónica con una baja respuesta al tratamiento con antibióticos, lo cual ha sido atribuido a la localización intracelular de *S. aureus* en las células epiteliales (Deogo *et al.*, 2002). En la mastitis causada por *S. aureus* se ha observado un incremento transitorio en la concentración intramamaria de las citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β , lo cual sugiere que estas citocinas participan en la fisiopatología de la mastitis del ganado bovino lechero (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Durante la respuesta inflamatoria, las células endoteliales son la principal célula blanco del TNF- α y la IL-1 β . Una vez estimuladas por estas citocinas, las células endoteliales producen quimiocinas y moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, con la finalidad de eliminar al microorganismo invasor. Esto les confiere una función importante en la respuesta inflamatoria; sin embargo, debido a su disposición anatómica, las células endoteliales también pueden interactuar con cualquier bacteria patógena que intente o haya logrado ingresar al torrente sanguíneo. A pesar de su función tan importante en la defensa contra infecciones bacterianas, se conoce poco acerca del papel del endotelio bovino en la patogénesis de la sepsis causada por *S. aureus*.

Recientemente, se ha logrado obtener evidencia de que *S. aureus* puede ser fagocitado por varios tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células endoteliales de bovino. Aunque se ha reportado que el TNF- α promueve la adherencia de *S. aureus* en células endoteliales de la vena del cordón umbilical de humano (Cheung *et al.*, 1991), específicamente la participación del TNF- α y la IL-1 β en la regulación de los procesos de fagocitosis y supervivencia intracelular en endotelio de bovino no ha sido estudiada.

Se sabe que la unión de TNF- α e IL-1 β a sus correspondientes receptores estimula la activación de vías de señalización que determinan la respuesta celular. Una de las principales vías activada por estas citocinas y que tiene una función importante en la respuesta inflamatoria es la que involucra la activación del factor de transcripción NF- κ B. Se ha reportado un incremento en la actividad de NF- κ B en neutrófilos recuperados de la leche de vacas con mastitis causada por enterobacterias (Boulanger *et al.*, 2003). Esto

implicaría que la actividad de NF- κ B detectada en los neutrófilos de vacas que padecen mastitis se debe a una estimulación directa y/o indirecta de estas células por bacterias patogénicas. Sin embargo, en el estudio de Boulanger *et al.* (2003), no se descarta la posibilidad de que en las células epiteliales o endoteliales de la glándula mamaria se esté activando NF- κ B como respuesta a la infección por esta bacteria. Esto sugeriría que NF- κ B podría participar de manera importante en la fisiopatología de la mastitis, por lo que el estudio de este mecanismo es relevante para entender la reacción inflamatoria en la mastitis del ganado bovino lechero.

El estudio molecular de los mecanismos que permiten a *S. aureus* penetrar en las células endoteliales de bovino, dividirse en su interior y la manera en que probablemente ciertos factores de virulencia afectan la actividad de moléculas participantes en la expresión de genes mediada por la activación de NF- κ B y/o el metabolismo de la célula, permitirá en un futuro diseñar estrategias biotecnológicas para controlar la infección de la GM por esta bacteria.

4. HIPÓTESIS

Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β afectan la fagocitosis y la supervivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en células endoteliales de bovino.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la participación de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β en la fagocitosis y la supervivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en células endoteliales de bovino.

5.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de TNF- α e IL-1 β sobre los procesos de fagocitosis y supervivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en células endoteliales de bovino (CEB).
- Determinar la participación del factor de transcripción NF- κ B en el proceso de fagocitosis de *S. aureus* por las CEB.
- Determinar la participación de JNK y p38 en el proceso de fagocitosis de *S. aureus* por las CEB.
- Evaluar la translocación al núcleo de NF- κ B por *S. aureus* en las CEB.
- Evaluar el efecto de la proteína A de *S. aureus* sobre la fagocitosis de *S. aureus* en las CEB.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

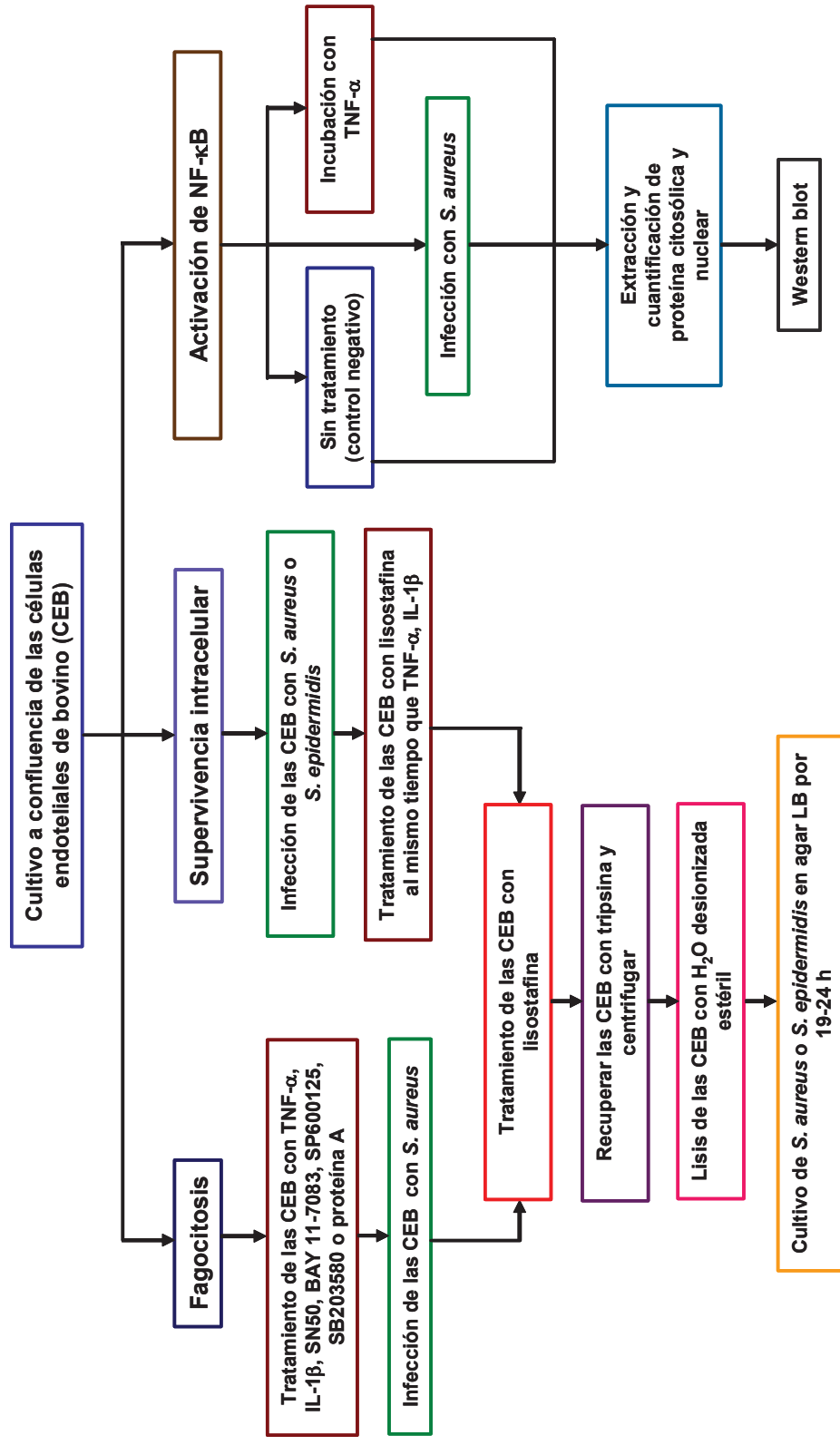
Células endoteliales. En todos los experimentos se utilizaron células endoteliales de la vena del cordón umbilical de bovino inmortalizadas por transfección con un vector de expresión que contiene los oncogenes E6-E7 del papilomavirus de humano 16. Estas células se denominaron BVE-E6E7 por Cajero-Juárez *et al.* (2002), y en este estudio fueron nombradas como CEB. Las CEB se seleccionaron como modelo para estudiar la interacción con *S. aureus* por presentar las ventajas siguientes:

- 1) No desarrollan células gigantes.
- 2) No requieren factores de crecimiento adicionales, cofactores o un sustrato especial.
- 3) Tienen un tiempo de duplicación de 20 h.
- 4) Conservan su identidad como endotelio.

Bacterias. Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27543) aislada de un caso de mastitis clínica de bovino y *Staphylococcus epidermidis* (SA-29) aislada de un caso de mastitis subclínica de bovino, proveniente del municipio de Tarímbaro, Michoacán (Anaya-López *et al.*, 2006).

A continuación se presenta un diagrama de flujo en el que se muestra la estrategia experimental para cada uno de los objetivos planteados (Fig. 5). Las particularidades de los tiempos y concentraciones de tratamiento respectivos son descritos en cada uno de los capítulos en la sección de resultados.

Figura 5. Estrategia experimental para evaluar los procesos de fagocitosis y supervivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* y activación de NF- κ B en las células endoteliales de bovino.



7. RESULTADOS

7.1 CAPÍTULO I

En los estudios de la interacción de las células endoteliales con *S. aureus* se ha logrado determinar la localización intracelular de la bacteria, aunque los mecanismos empleados para su entrada a la célula, aun no han sido esclarecidos por completo. Por otra parte, las infecciones ocasionadas por *S. aureus*, como es el caso de la mastitis bovina, generalmente se caracterizan por la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β , lo que sugiere que estas citocinas juegan un papel importante en la fisiopatología de dichas infecciones. Las células endoteliales son el principal blanco de TNF- α e IL-1 β , las cuales inducen a las células endoteliales a iniciar la respuesta inflamatoria mediante la activación de NF- κ B. A la fecha, no se había considerado que TNF- α o IL-1 β pudieran modular la fagocitosis de *S. aureus* por las células endoteliales de bovino (CEB). Los datos presentados en este apartado demuestran que TNF- α e IL-1 β incrementan la capacidad de las CEB para fagocitar a *S. aureus*. La unión de TNF- α e IL-1 β a sus respectivos receptores de membrana induce la activación de NF- κ B y en el caso de TNF- α , se sabe que también activa vías de señalización que involucran a las MAP cinasas, JNK y p38. Por lo que se investigó si NF- κ B, JNK o p38 estaban involucrados en el proceso de fagocitosis de *S. aureus* por las CEB. Los experimentos con inhibidores específicos demostraron que la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB está asociada a la activación de NF- κ B pero no de JNK y p38.

Internalization of *Staphylococcus aureus* by Bovine Endothelial Cells is Associated with the Activity State of NF- κ B and Modulated by the Pro-inflammatory Cytokines TNF- α and IL-1 β

J. Oviedo-Boyso*, J. G. Barriga-Rivera*, J. J. Valdez-Alarcón*, A. Bravo-Patiño*, A. Cárbaz-Trejo†, M. Cajero-Juárez* & V. M. Baizabal-Aguirre*

*Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México; and †Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

Received 12 September 2007; Accepted in revised form 27 October 2007

Correspondence to: V. M. Baizabal-Aguirre, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarímbaro, Mich. C.P. 58893, Apartado Postal 53. Administración Chapultepec, C.P. 58262, Morelia, Michoacán, México. E-mail: baizabal@zeus.umich.mx

Abstract

Bacterial internalization is an important process in the pathogenesis of infectious diseases in which nuclear factor kappaB (NF- κ B) plays a prominent role. We present pharmacological evidence indicating that in bovine endothelial cells (BEC) the internalization of *Staphylococcus aureus*, a pathogenic bacterium that causes mastitis in bovine cattle, was associated with the activation of NF- κ B. The internalization of *S. aureus* increased when BEC were stimulated with alpha-tumour necrosis factor (TNF- α) or beta-interleukin 1 (IL-1 β) which are known activators of NF- κ B. SN50 (an inhibitor peptide of NF- κ B nuclear translocation) and BAY 11-7083 (a chemical that inhibits the I κ B α phosphorylation) caused significant reduction in *S. aureus* intracellular number, indicating that its internalization was associated with the NF- κ B activity. Furthermore, specific inhibition of c-Jun N-terminal kinase with SP600125 (SP) or p-38 with SB203580 (SB) did not cause any change in the *S. aureus* intracellular number compared with the untreated control. Finally, TNF- α treatment of BEC after the addition of both SP and SB, induced a significant increase in *S. aureus* internalization above the control value. These data indicate that NF- κ B activity is associated with *S. aureus* internalization and suggest that this transcription factor may play a role in the pathophysiology of bovine mastitis caused by this bacterium.

Introduction

In dairy cows, the inflammation of the mammary gland (mastitis) is one of the most important diseases caused by pathogen micro-organisms [1]. *Staphylococcus aureus* is the prevailing contagious pathogen responsible for clinical and subclinical infections of the mammary gland (MG) of lactating cows [2]. Mastitis caused by this bacterium tends to become chronic, and has a low response to conventional antibiotic therapy due to its intracellular localization inside the MG [3]. Besides *S. aureus*, coagulase-negative staphylococci are also commonly isolated from milk of lactating cows [4] and milk tanks [5].

Evidence of *S. aureus* adherence and internalization in bovine epithelial cells [6], human endothelial cells [7], human osteoblasts [8, 9] and bovine aortic endothelial cells [10] has been reported. Of particular interest in the

context of chronic bovine mastitis is the propensity of *S. aureus* to invade the endovascular tissue because the endothelium plays a major role in the inflammatory reaction [11]. During the inflammatory process, the endothelium responds to pro-inflammatory cytokines, such as alpha-tumour necrosis factor (TNF- α) and beta-interleukin 1 (IL-1 β), by expressing adhesion molecules, cytokines and chemokines that promote the recruitment of neutrophils to the site of infection [12]. Increased concentrations of pro-inflammatory cytokines in milk from mastitis-affected cows have been reported [13], emphasizing the role of these peptides in the inflammation process of the MG. In particular, a significant increase in TNF- α during the first 24 h post-infection with a strong decrease 8 h later [14] that coincided with an increase in IL-1 β production [15] was found in milk samples of cows with clinical mastitis caused by *S. aureus*. *In vitro* studies

have shown that TNF- α promotes an increase in the adherence of *S. aureus* to human endothelial cells [16]. However, in that work the authors did not consider the possible response of endothelial cells to *S. aureus* interaction and the activity of the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) or other components of the signalling pathway activated by TNF- α such as the MAP kinases, c-Jun-N-terminal kinase (JNK) and p-38.

The interaction of TNF- α with its receptor 1 (TNFR1) leads to the nuclear translocation and activation of NF- κ B as well as the activation of JNK and p-38 [17]. In particular, NF- κ B can be activated by viruses, bacteria, pro-oxidants and pro-inflammatory cytokines (i.e. TNF- α and IL-1 β). It is composed of five structurally related DNA-binding proteins; the heterodimer formed by p50 and p65 is the most frequently found in different cells [18]. Activation of NF- κ B involves phosphorylation and rapid degradation of the inhibitory κ B (I κ B) proteins that anchored NF- κ B in the cytoplasm. This allows the nuclear translocation of NF- κ B and the transcriptional activation of NF- κ B-dependent genes [18]. The role of NF- κ B in bovine mastitis has recently been addressed by Boulanger *et al.* [19] who showed that NF- κ B activity increased in milk neutrophils. It is likely that NF- κ B plays a predominant role in bovine mastitis because most of the genes encoding inflammatory proteins contain κ B recognition sites for NF- κ B within their promoters [20]. For example, the promoter region of the lactoferrin gene contains several putative binding sites for transcription factors including NF- κ B, activator protein 1 and signal transducers and activators of transcription 3 and 5 (STAT3 and 5) which indicate that this promoter responds to infection via different transcription factors [21].

In this study, we report that stimulation of bovine endothelial cells (BEC) with TNF- α or IL-1 β increased the level of *S. aureus* internalization probably through NF- κ B activation. This affirmation is based on a pharmacological experimental design which included the inhibitory effects of the permeable peptide SN50 [22] (a blocker of the nuclear translocation of NF- κ B), the chemical compound BAY 11-7083 (BAY) [23] (an inhibitor of I κ B α phosphorylation) and the chemical-specific inhibitors of JNK (SP600125, SP) and p-38 (SB203580, SB). Our results indicate that internalization of *S. aureus* by BEC is associated with the activation of NF- κ B but not with the activation of JNK and p-38.

Materials and methods

Media and chemicals. F-12 Ham (HF-12) of Dulbecco's modified Eagle's medium, trypsin-EDTA, cytochalasin D and lysostaphin were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St Louis, MO, USA). Fetal calf serum (FCS) was acquired from Equitech-Bio, Inc. (Kerrville, TX, USA). SN50, BAY 11-7083 ((E)3-[4-*t*-butylphenyl]-sulfonyl)-

2-propenenitrile, SP600125 (inhibitor of JNK) and SB203580 (inhibitor of p-38) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Penicillin G and streptomycin were purchased from Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA). Recombinant human TNF- α and recombinant human IL-1 β were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Bacteria and culture preparation. For all experiments, we used *S. aureus* ssp. *aureus* ATCC (27543) isolated from a clinical case of bovine mastitis. Bacteria were grown in 2 ml Luria-Bertani (LB) at 37 °C for 24 h with continuous agitation. Then 400 μ l of this preculture was added to 250 ml of LB and grown at 37 °C until an optical density of 0.1 at 600 nm (bacteria in the initial log phase) measured with an Ultrospec-1000 spectrophotometer (Pharmacia-Biotech, Piscataway, NJ, USA). After centrifugation at 500 \times g for 8 min, the supernatant was eliminated and bacteria resuspended in HF-12 without FCS and antibiotics (HF-12i). Sterile glycerol was added to a final concentration of 10% (w/v) at room temperature and the culture was gently homogenized. Finally, the culture was separated in aliquots of 1 ml that contained 60–80 \times 10⁶ CFU and stored at –80 °C.

Culture of endothelial cells, infection assays and treatment with TNF- α and IL-1 β . Experiments were performed with bovine umbilical vein endothelial cells immortalized by transfection with an expression vector containing the E6E7 oncogenes of human papillomavirus 16 and named BVE-E6E7 by Cajero-Juárez *et al.* [24]. BVE-E6E7 cells (\sim 0.5 \times 10⁶ cells/ml) were cultured in 24-well plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) in a medium containing 2 ml of HF-12 supplemented with FCS, 100 U/ml penicillin G and 100 μ g/ml streptomycin, at 37 °C in 5% CO₂ up to a confluence of 90–100%. In all experiments, the viability of BVE-E6E7 cells, evaluated by the trypan blue technique, was \geq 95% at all times tested. For internalization assays, BVE-E6E7 cells were washed three times with HF-12i to remove FCS and antibiotics and infected for 20 min with 1 \times 10⁶ CFU/ml of *S. aureus* which gives a multiplicity of infection (MOI) of 2. To test the effect of TNF- α and IL-1 β on staphylococci internalization, BVE-E6E7 cells were first incubated for 4 h with various concentrations of these cytokines. Cells were washed three times with 1 ml of HF-12i, infected, incubated with 5 μ g/ml lysostaphin to kill the extracellular bacteria (lysostaphin-protection assay), washed three times with 1 ml HF-12i, lifted with 350 μ l of 0.25% trypsin-0.5 mM EDTA, and recovered by centrifugation at 500 \times g for 8 min. The supernatant was discarded and cells were lysed by hypotonic shock in 250 μ l of sterile deionized water (no difference was observed when 0.1% triton X-100 was added). Intracellular bacteria were cultured in LB agar (LBA) at 37 °C for 19–24 h and the number of *S. aureus* CFU/ml was calculated by the counting plate technique.

Electron microscopy. Cells grown at confluence over per-manox cover slips were infected with 1×10^6 CFU/ml of *S. aureus* in the conditions previously described. After infection, cells were fixed with 3% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, EMS, Fort Washington, PA, USA) in 0.1 M cacodylate buffer (EMS) pH 7.4 for 2 h at 4 °C. The cells were then washed overnight in 0.25 M sucrose prepared in the same buffer (washing-storage medium) and post-fixed with 2% osmium tetroxide (EMS) in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h at 4 °C and then washed overnight as before. Fixed cells were incubated for 30 min at room temperature with 1% low molecular weight tannic acid (Mallinckrodt, Hazelwood, MO, USA). After incubation, samples imbedded in resin blocks were washed for a total of 1 h with four changes of 0.25 M sucrose in 0.1 M HEPES (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) buffer pH 7.4. Samples were stained 'in block' in 1% uranyl acetate (Polysciences, Warrington, PA, USA) in aqueous 15% ethanol. Dehydration was performed at 4 °C with two changes each of 30%, 40%, 70% and 90% ethanol and two changes of absolute ethanol (30 min each, second change at room temperature), propylene oxide (2 × 30 min at room temperature) was used as the interface solvent. Infiltration was made in 1:1 propylene oxide:complete Spurr epoxy resin for 24 h. Samples were transferred into undiluted resin and agitated on a rotary shaker for 8 h. Tissue blocks were transferred to flat silicone rubber moulds (EMS) filled with Spurr epoxy resin for orientation and polymerized at 60 °C for 36 h. Thin sections were obtained in a Reichardt Ultracut ultramicrotome with diamond knife and contrasted with 1% aqueous uranyl acetate pH 4.5 and Reynolds alkaline lead citrate. Photographs were obtained at the Microscopy Unit, Instituto de Fisiología Celular of the Universidad Nacional Autónoma de México with a camera containing a 4489 film adapted to a microscope Jeol 1200EXII (JEOL USA, Peabody, MA, USA).

Treatment of BVE-E6E7 cells with the inhibitors SN50, BAY 11-7083, SP600125 and SB203580. BVE-E6E7 cells were incubated with SN50 or BAY for 1 h or with SP or SB for 0.5 h and then infected with *S. aureus*. TNF- α was added for 4 h after treating the cells with the inhibitors SP and SB. BVE-E6E7 cells were then washed three times with 1 ml of HF-12i, infected and incubated 20 min with 5 μ g/ml lysostaphin. The intracellular bacteria were recovered, cultured and counted according to the procedure described.

Statistical analysis. To normalize the data, the ratio of staphylococci CFU/ml to the number of BVE-E6E7 cells/ml was obtained for each condition tested. In each experiment, the ratio obtained for each condition was referenced to the control condition that was arbitrarily assigned a value of 100%, except for Fig. 1B in which the data are expressed as ratios. Data are representative of

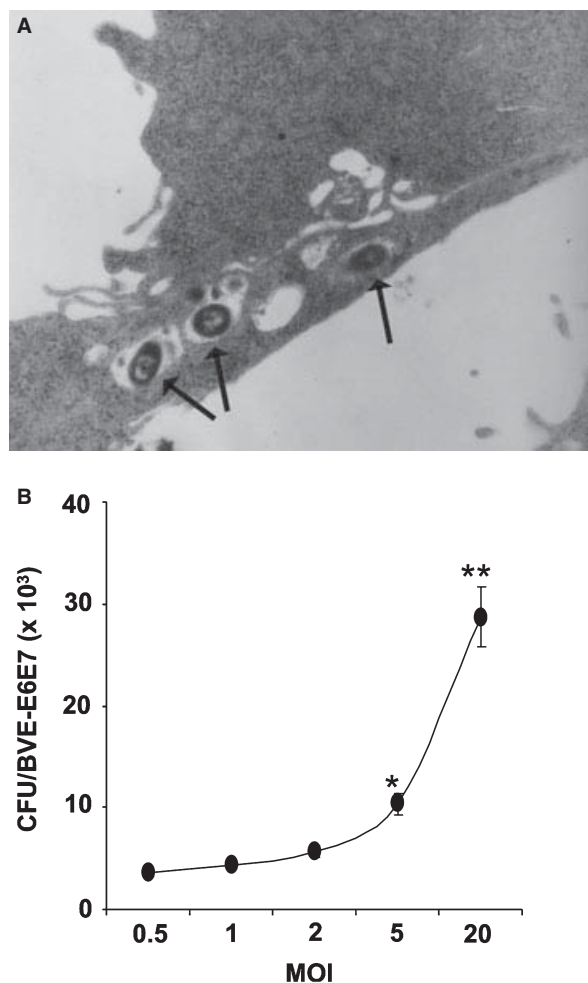


Figure 1 Effect of increasing multiplicity of infection (MOI) on *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells. Transmission electron micrograph of one BVE-E6E7 cell infected with *S. aureus* for 20 min. Arrows show several bacteria inside phagosome in the cytoplasm of a BVE-E6E7 cell; magnification 8000 \times (A). BVE-E6E7 cells were co-cultured with *S. aureus* at the indicated MOI for 20 min, washed and treated with lysostaphin as described in Materials and methods (B). Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C, and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ compared with the value at 0.5 MOI.

at least three independent experiments. For each condition, the error standard of the mean ($n = 3$ –4) was calculated. The statistical significance was evaluated with the *t*-test paired analysis by using the SIGMASTAT program version 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Bovine endothelial cells phagocytize *Staphylococcus aureus*

We first analysed the capacity of BVE-E6E7 cells (BEC) to phagocytize *S. aureus*. Qualitative evidence for the presence of bacteria inside BEC was obtained by transmission electron microscopy. After 20 min of infection,

at an MOI of four, *S. aureus* was observed inside phagosomes (Fig. 1A). With longer times of infections (2 h), some bacteria were located free in the cytoplasm and a septum structure was observed in a number of *S. aureus* which suggest that this bacterium had the ability to replicate inside BEC (data not shown). The phagocytic capacity of BEC was evaluated by increasing the MOI. The CFU/BVE-E6E7 ratios were determined at MOI 0.5, 1, 2, 5 and 20, taking 3.6 as the reference ratio value at 0.5 MOI. It was observed that the intracellular number of *S. aureus* increased slightly up to an MOI of two; however, a marked increase of threefold ($P < 0.001$) and more than sevenfold ($P < 0.001$) was observed at MOI 5 and 20, respectively (Fig. 1B). *Staphylococcus aureus* internalization depended on actin cytoskeletal re-arrangement because the capacity of BEC to phagocytose this bacterium was 90–95% inhibited by 10 $\mu\text{g/ml}$ of cytochalasin D (data not shown).

Staphylococcus aureus internalization by bovine endothelial cells is increased by TNF- α and IL-1 β

The interaction of TNF- α and IL-1 β with their plasma membrane receptors leads to the nuclear translocation and activation of NF- κB . To investigate if TNF- α and IL-1 β affected the capacity of BEC to phagocytize staphylococci, we evaluated the number of bacteria internalized by BEC pretreated with different concentrations of either cytokine. When BEC were incubated with 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 and 100 ng/ml TNF- α and then infected with *S. aureus*, the intracellular number of bacteria reached a maximum increase of $75 \pm 17\%$ ($P < 0.001$) at 2.5 ng/ml TNF- α compared with the untreated control. Higher concentrations of this cytokine up to 100 ng/ml maintained a similar level of intracellular *S. aureus* number compared with the value at 2.5 ng/ml TNF- α (Fig. 2A). With IL-1 β , a different pattern of *S. aureus* internalization was obtained; concentrations from 1 to 5 ng/ml of this cytokine did not cause a change in the number of intracellular bacteria, whereas concentrations of 10 and 20 ng/ml increased the internalization by $70 \pm 6\%$ ($P < 0.05$) and $131 \pm 4\%$ ($P < 0.001$) respectively (Fig. 2B). These data indicate that the capacity of BEC to phagocytize *S. aureus* is modulated by TNF- α and IL-1 β and suggest that NF- κB may be involved.

Staphylococcus aureus internalization by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κB

To test if NF- κB was involved in the *S. aureus* internalization process, we examined the effect of BAY, a chemical inhibitor that blocks the TNF- α -induced phosphorylation of I $\kappa\text{B}\alpha$. BEC incubated with 2.5 μM BAY showed a non-significant reduction in *S. aureus* internalization whereas 5 μM produced a significant $63 \pm 5\%$

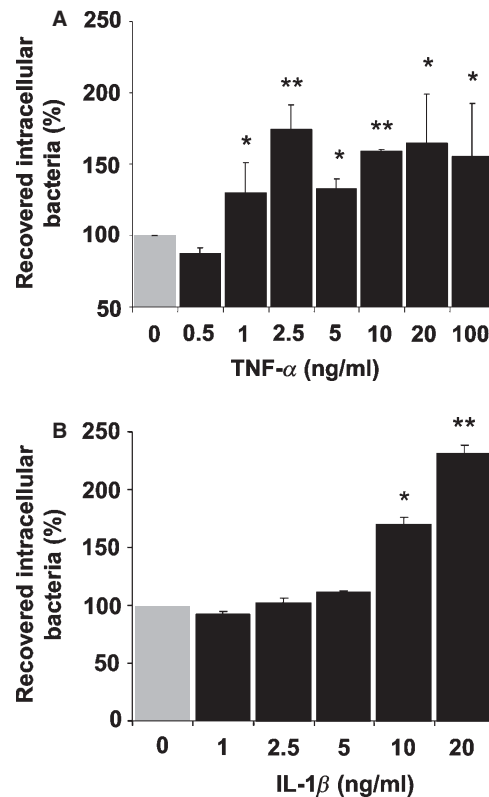


Figure 2 TNF- α and IL-1 β increase the level of *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells. BVE-E6E7 cells were treated with the indicated concentrations of TNF- α (A) or IL-1 β (B) and then incubated with *S. aureus*. Extracellular bacteria were eliminated by the addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C, and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ compared with the untreated control value.

($P < 0.05$) reduction (Fig. 3). Treatment of BEC with TNF- α or IL-1 β was included as controls and showed the same tendency (stimulation of *S. aureus* internalization) as previously described.

To obtain additional evidence that NF- κB was associated with the internalization of *S. aureus*, we used SN50, a peptide that specifically inhibits NF- κB nuclear translocation. Incubation of BEC with 50 μM SN50 caused a $50 \pm 2\%$ ($P < 0.001$) decrease in *S. aureus* internalization. Further addition of 2.5 ng/ml TNF- α increased the internalization by $20 \pm 1\%$ ($P < 0.05$) compared with the SN50 value alone (Fig. 4). The effect of SN50 on *S. aureus* internalization depended upon the inhibitor concentration because 100 μM of this peptide produced an inhibition of $97 \pm 0.3\%$ ($P < 0.001$) that was not partially recovered by TNF- α (Fig. 4). BEC treated with TNF- α followed by incubation with *S. aureus* was included as control and showed the tendency previously observed. These results suggest that pro-inflammatory cytokines and the activity state of NF- κB are important factors for the internalization of *S. aureus* by BEC.

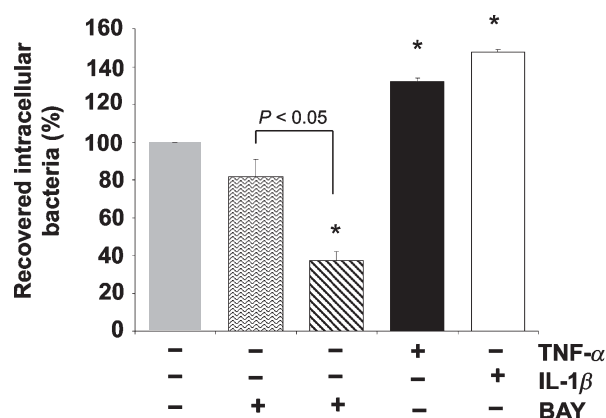


Figure 3 The specific NF-κB chemical inhibitor BAY 11-7083 reduces the level of *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells. BVE-E6E7 cells were treated with any of the following compounds: untreated control (grey column), 2.5 μM BAY 11-7083 (wave-dashed column), 5 μM BAY 11-7083 (diagonally dashed column), 2.5 ng/ml TNF-α (black column), 20 ng/ml IL-1β (white column) and then incubated with *S. aureus*. Extracellular bacteria were eliminated by the addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C, and counted. The data represent mean ± SEM (n = 4). *P < 0.05 compared with the untreated control value.

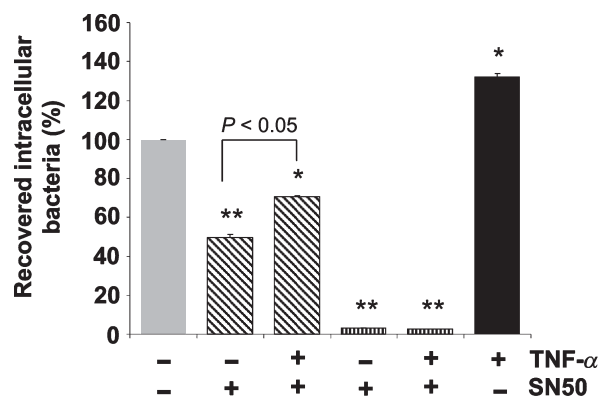


Figure 4 The specific NF-κB peptide inhibitor SN50 reduces the level of *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells. BVE-E6E7 cells were treated with any of the following peptides: untreated control (grey column), 50 μM SN50 and 50 μM SN50 followed by 2.5 ng/ml TNF-α (diagonally dashed columns), 100 μM SN50 and 100 μM SN50 followed by 2.5 ng/ml TNF-α (vertically dashed columns), 2.5 ng/ml TNF-α (black column), and then incubated with *S. aureus*. Extracellular bacteria were eliminated by the addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C, and counted. The data represent mean ± SEM (n = 3). *P < 0.05; **P < 0.001 compared with the untreated control value.

The activity of JNK and p-38 is not associated with *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells

The binding of TNF-α with TNFR1 promotes the translocation of NF-κB to the nucleus and also activates the

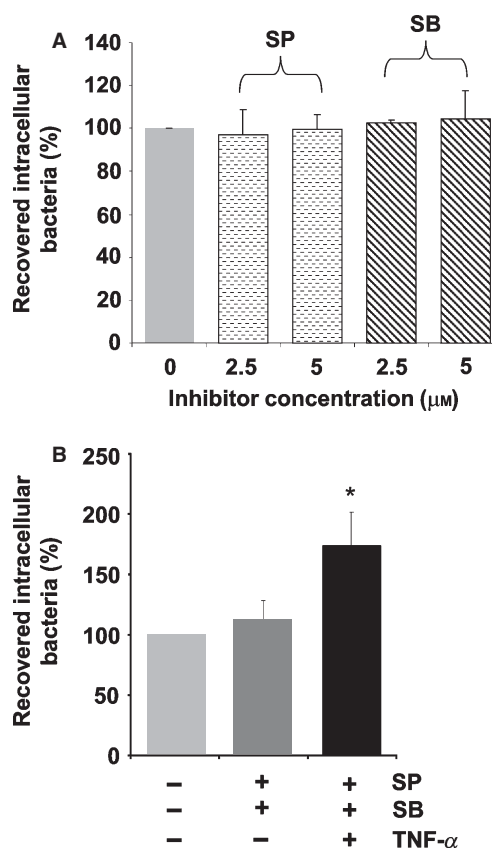


Figure 5 The specific JNK and p-38 inhibitors do not alter the level of *Staphylococcus aureus* internalization by bovine endothelial cells. In (A), BVE-E6E7 cells were left untreated (grey column), treated with 2.5 or 5 μM SP (inhibitor of JNK) (horizontally dashed column) or 2.5 or 5 μM SB (inhibitor of p-38) (diagonally dashed column). In (B), BVE-E6E7 cells were left untreated (grey column), treated with 5 μM SP and 5 μM SB (dark grey column) or with 5 μM SP and 5 μM SB followed by 2.5 ng/ml TNF-α (black column). In both cases, BVE-E6E7 cells were incubated with *S. aureus* after the treatments. Extracellular bacteria were eliminated by the addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C, and counted. The data represent mean ± SEM (n = 3). *P < 0.05 compared with the untreated control value.

MAP kinases JNK and p-38. To test if the activity of JNK or p-38 was involved in the internalization of *S. aureus*, we evaluated the intracellular level of bacteria in BEC pre-incubated with specific inhibitors of JNK and p-38. None of these inhibitors caused a change in the level of *S. aureus* internalization compared with the untreated control (Fig. 5A). A similar non-reduction internalization pattern was observed with the simultaneous addition of the MAP kinase inhibitors when compared with the control and that obtained when the inhibitors were added separately (Fig. 5B). To confirm that NF-κB activity was associated with the internalization of *S. aureus*, BEC were incubated with TNF-α after treatment with both inhibitors. In this case, we observed an increase of 74 ± 28% in *S. aureus* internalization

(Fig. 5B). These indicate that TNF- α increase in *S. aureus* internalization is associated with the activity of NF- κ B but not with the activity of JNK and p-38.

Discussion

Staphylococcus aureus is one of the most important contagious pathogenic bacterium that affects bovine MG in clinical and subclinical-chronic forms. The inflammatory reaction of the MG is characterized by the production of pro-inflammatory cytokines (i.e. TNF- α and IL-1 β), adhesion molecules and chemokines [14, 15]. Endothelial cells of the MG may play the same role as in other tissues because *S. aureus* infections stimulate neutrophil recruitment, lymphocyte activation and cytokine production [25]. In this study, we used immortalized BEC as a model to investigate the role of NF- κ B and the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in the internalization of *S. aureus*. Our results indicate that internalization of *S. aureus* is associated with the activity of NF- κ B but not with the activity of JNK and p-38. This affirmation is based on the following experimental results: (1) the level of *S. aureus* internalization was increased by TNF- α or IL-1 β ; (2) NF- κ B-specific inhibitors BAY and SN50 reduced the level of *S. aureus* internalization; (3) the effect of SN50 on staphylococci internalization was partially recovered by TNF- α and this effect depended upon the SN50 concentration; and (4) specific inhibition of JNK and p-38 did not affect the internalization of *S. aureus*.

Using the lysostaphin-protection assay and varying the number of bacterium per BEC, we demonstrated that *S. aureus* is phagocytized by these endothelial cells and remains inside phagosomes at early stages after phagocytosis (Fig. 1A). This phagocytic behaviour of BEC towards *S. aureus* is similar to that observed in human umbilical vein endothelial cells in which location and maturation of *S. aureus*-containing phagosomes to phagolysosomes has been demonstrated [26]. We also found that *S. aureus* did not invade BEC efficiently unless high MOI were assayed (Fig. 1B). The reduced *S. aureus* internalization at lower MOI may be explained according to recent evidence which indicates that *S. aureus* uses cell wall structural components to delay its own internalization through subversion of actin- and Rab5-mediated cytoskeleton reorganization during invasion [27]. Moreover, the intracellular CFU number obtained in our experimental conditions was not the result of intracellular killing or survival of bacteria because we have observed that in the presence or absence of lysostaphin the number of intracellular *S. aureus* decreased with longer incubation times (≥ 8 h) but not shorter (20 min), indicating a slow and intrinsic, lysostaphin-independent mechanism of BEC to eliminate staphylococci (J. Oviedo-Boyso and V. M. Baizabal-Aguirre, unpublished data). Thus, the

data presented in Fig. 1 indicate that BEC is capable of phagocitizing *S. aureus*.

TNF- α and IL-1 β are produced in the inflammatory reaction and play important roles in the immune response. Preliminary experiments with the unspecific NF- κ B inhibitors pyrrolidin dithiocarbamate [28] and MG-132 [29] resulted in a significant reduction in *S. aureus* intracellular number (data not shown). Because of these experiments and the fact that TNF- α and IL-1 β activate the nuclear translocation of NF- κ B, a process that induces the expression of specific response genes to extracellular stimuli, we speculated that activation of NF- κ B may be associated with the process of bacterial internalization. Interestingly, we found that TNF- α and IL-1 β significantly increased the level of *S. aureus* internalization (Fig. 2A and B). Several authors have demonstrated that TNF and IL-1 induce the activation of similar functions in endothelial cells such as the expression of adhesion molecules (i.e. ELAM-1 and ICAM-1), leukocyte adhesion and enhancement of *S. aureus* adherence [30]. It is likely that in our system, the effect of TNF- α could be mediated by IL-1 β and the effect of IL-1 β mediated by TNF- α because a previous study has shown that TNF can induce endothelial cells to secrete IL-1 and vice versa [31]. Molecular studies and enzyme-linked immunosorbent assay measurements to quantify these cytokines will be needed to clarify the importance of any autocrine effects of these cytokines in the interaction of *S. aureus* with BEC.

To explore further the possible association of NF- κ B with *S. aureus* internalization, we treated BEC with specific NF- κ B inhibitors such as SN50 and BAY. Both inhibitors produced a significant reduction in the amount of intracellular *S. aureus* (Figs. 3 and 4). Taking into account that SN50 inhibits the nuclear translocation of NF- κ B and that BAY blocks the TNF- α -induced I κ B α phosphorylation, the reduction in *S. aureus* internalization suggest that NF- κ B activity is associated with the internalization process. Addition of TNF- α , after treatment of BEC with SN50, allowed BEC to only partially recover their phagocytic capacity as that shown when treated with TNF- α alone. It is likely that a full recovery of BEC to phagocytize staphylococci was not possible because of the SN50 concentration used (50 μ M). This was confirmed in experiments with 100 μ M SN50 in which no recover of *S. aureus* intracellular number was obtained after the addition of TNF- α (Fig. 4).

An alternative explanation is that treatment of BEC with SN50 inhibited the nuclear translocation of all NF- κ B available in the cell. In this case, the partial recovery of *S. aureus* intracellular number after TNF- α addition could be due to the activation of molecules different from NF- κ B (i.e. JNK and p-38). It is well established that interaction of TNF- α with TNFR1 activates the nuclear translocation of NF- κ B and increases

the activity of JNK and p-38 [17]. In addition, these MAP kinases have an important role in the innate as well as in the adaptive immune response [32]. To test if the activity of JNK and p-38 was associated with *S. aureus* internalization, we performed internalization assays in which JNK and p-38 inhibitors were added to BEC cultures before *S. aureus* infection or TNF- α treatment (Fig. 5). Interestingly, none of these inhibitors added either separately or together caused a reduction in the internalization of bacteria. Furthermore, the addition of TNF- α after BEC incubation with both inhibitors induced a significant increase in *S. aureus* internalization (Fig. 5B). These results suggest that the basal activity of these kinases or perhaps their activation by *S. aureus* is not associated with the process of internalization of bacteria. It is noteworthy that a previous study in osteoblasts infected with *S. aureus* reported the activation of the MAP kinases ERK1/2 and SAPK but not p-38 [9]. It was also found that activation of p-38 in neutrophils infected with *S. aureus* lead to apoptosis [33]. These reports demonstrate that activation of MAP kinases is important in the interaction of *S. aureus* with eukaryotic cells. However, in our conditions, NF- κ B but not JNK and p-38 seems to have a relevant role in *S. aureus* internalization.

Acknowledgment

We thank Bachelor Irasema Díaz Pérez for experiments with pyrrolidin dithiocarbamate and MG-132, and Dr Alejandro Zentella Dehesa for critical comments. The inhibitors MG-132 and BAY 11-7083 were a kind donation of Dr Alejandro Zentella Dehesa from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F. This work was supported by Coordinación de Investigación Científica of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, grant 14.4, Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP)-Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica of the Secretaría de Educación Pública (SEP) México, grant PTC-7 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 55657-N to VMBA. JOB received a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

References

- 1 López-Meza JE, Higuera-Ramos JE, Ochoa-Zarzosa A *et al.* Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, Mexico. *Téc Pecu Méx* 2006;44:91–106.
- 2 Chaffer M, Leitner G, Winkler M *et al.* Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *J Vet Med B* 1999; 46:707–12.
- 3 DeGo OK, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart* 2002;24:181–98.

- 4 Honkaken-Buzalski T, Myllis V, Pyorala S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *Zentralbl Veterinarmed B* 1994;41:344–50.
- 5 Howard P. Mastitis pathogens present in bulk tank milk from seven dairy herds in the Waikato region, New Zealand. *N Z Vet J* 2006;54:41–3.
- 6 Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárbaz-Trejo A *et al.* Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2006;81:358–61.
- 7 Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 1998;66:5994–8.
- 8 Jevon M, Guo C, Ma B *et al.* Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 1999;67:2677–81.
- 9 Ellington JK, Elhofy A, Bost K, Hudson MC. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in *Staphylococcus aureus* invasion of normal osteoblasts. *Infect Immun* 2001;69:5235–42.
- 10 Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 1986;54:833–6.
- 11 Valbuena G, Walker DH. The endothelium as a target for infections. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006;1:171–98.
- 12 De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E83–8.
- 13 Riollot C, Rainard P, Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci* 2001;84:1077–84.
- 14 Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003;50:105–11.
- 15 Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:463–72.
- 16 Cheung AL, Koomey JM, Lee S, Jaffe EA, Fischetti VA. Recombinant human tumor necrosis factor alpha promotes adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *Infect Immun* 1991;59:3827–31.
- 17 Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372–7.
- 18 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225–60.
- 19 Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J, Lekeux P. Increased nuclear factor κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci* 2003;86:1259–67.
- 20 Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853–66.
- 21 Zheng J, Ather JL, Sonstegard TS, Kerr DE. Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. *Gene* 2005;353:107–17.
- 22 Yao-Zhong L, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995;270:14255–8.
- 23 Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G *et al.* Novel inhibitors of cytokine-induced κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *J Biol Chem* 1997;272:21096–103.
- 24 Cajero-Juárez M, Ávila B, Ochoa A *et al.* Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 2002;81:1–8.

- 25 Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M *et al.* Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 2007;54:399–409.
- 26 Schröder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol* 2006;195:185–94.
- 27 Schröder A, Schröder B, Roppenser B *et al.* *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:5198–210.
- 28 Schreck R, Beate M, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithioarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181–94.
- 29 Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB. Mediation by NF- κ B of cytokine induced expression cell line, a process blocked by proteasoma inhibitors. *Gut* 1998;42:779–87.
- 30 Pober JS, Gimbrone MA, Lapierre LA *et al.* Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986;137:1893–6.
- 31 Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990;4:2860–7.
- 32 Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55–72.
- 33 Lundqvist-Gustafsson H, Norrman S, Nilsson J, Wilson Å. Involvement of p38-mitogen-activated protein kinase in staphylococcus aureus-induced neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol* 2001;70:642–8.

7.2 CAPÍTULO II

En la sección anterior se presentó evidencia experimental de que TNF- α e IL-1 β incrementan la capacidad fagocítica de las CEB por *S. aureus*, y que esta capacidad está asociada con el estado de activación de NF- κ B. En esta sección se presentan los resultados de los ensayos de inmunodetección y de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) que demuestran que TNF- α y *S. aureus* activan la translocación al núcleo de NF- κ B en las CEB.

7.2.1 INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que *S. aureus* puede ser fagocitado por las CEB (Hamill *et al.*, 1986; Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) y además que es capaz de inducir la síntesis de proteínas propias de la respuesta inflamatoria (Yao *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1996; Strindhall *et al.*, 2002); sin embargo, en ninguno de estos trabajos se aborda la posibilidad de que en el proceso de fagocitosis o en la síntesis de estas proteínas esté involucrada la activación de NF- κ B. Resultados anteriores obtenidos por Oviedo-Boyso *et al.* (2008) con inhibidores específicos de NF- κ B, mostraron que la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB está asociada con el estado de actividad de este factor de transcripción. Por lo tanto, el interés de esta parte del trabajo se centró en investigar si *S. aureus* era capaz de activar al NF- κ B en las CEB.

7.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron células endoteliales de cordón umbilical de bovino inmortalizadas (CEB) y una cepa de *S. aureus* subsp. *aureus* de ATCC (27543). Por lo tanto, los medios para su cultivo y elaboración del inóculo fueron los reportados por Oviedo-Boyso *et al.* (2008).

Obtención de la proteína. Las CEB se cultivaron en cajas de 6 cm de diámetro (Corning Inc., Corning, NY, USA) hasta alcanzar una confluencia de 90-100% ($\sim 7 \times 10^6$ células/caja). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con HF-12i e infectaron con *S. aureus* a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 durante 20 min, 1 h y 2 h, y después se trataron con 5 μ g/ml de lisostafina durante 20 min. Por otra parte, las CEB se trataron con 3 ng/ml de TNF- α durante 20 min y 4 h. Después de estos tratamientos, las CEB se lavaron tres veces con PBS frío y se procedió a levantar la monocapa de células con una espátula de plástico. Las células se depositaron en un tubo de plástico con capacidad para 15 ml y se centrifugaron a 500 x g durante 8 min. El paquete celular se resuspendió en PBS, se colocó en un tubo de 1.5 ml y se centrifugó en las mismas condiciones. La extracción de la proteína se realizó con el kit comercial NucBuster Protein Extraction Kit (Novagen, EMD Biosciences, Inc., Darmstadt, Germany). Se guardaron alícuotas a -80°C hasta su uso.

Inmunodetección del dímero p65 de NF- κ B. La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Shagger y von Jaggow,

1987) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis a 250 mA durante 2 h, con agitación constante del amortiguador de transferencia. La membrana se lavó 3 veces (10 min/ lavado) con TBS, y se procedió a colocarla en solución bloqueadora, TBS con 5% de leche descremada (Bio-Rad, CA, USA) y 1% de albúmina sérica de bovino (BSA; Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, MO, USA) durante 45 min, con un cambio de esta solución por 45 min adicionales. La membrana se lavó 3 veces con 1% de leche descremada en TBS, se dejó en esta misma solución y se incubó con el anticuerpo anti-p65 (primer anticuerpo) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) a una dilución de 1:500 a 4°C, toda la noche. Posteriormente, la membrana se colocó a temperatura ambiente durante 1 h, se lavó 4 veces con TTBS y una vez con 1% de leche descremada en TBS. Se agregó el anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA); la membrana se dejó en agitación constante durante 30 min y 1 h más con agitación esporádica. Se lavó 3 veces con TTBS y una vez más con TBS. Se retiró la solución de lavado y la membrana se incubó con Luminol (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) durante 1 min. La membrana se colocó en contacto con una placa radiográfica (JUAMA, D.F., México) y se dejó un tiempo de exposición variable de 5 a 10 min, antes de revelar.

7.2.3 RESULTADOS

***S. aureus* induce la translocación de NF- κ B al núcleo.** Las CEB se infectaron con *S. aureus* por diferentes tiempos y la translocación al núcleo de NF- κ B se determinó por inmunodetección. En la Fig. 6 se observa que la abundancia relativa de p65 fue mayor en los extractos proteicos nucleares que en los citosólicos cuando las CEB se estimularon con TNF- α o se infectaron con *S. aureus*. En las CEB no tratadas (ctrl, Fig. 6) se observó una abundancia relativa mayor de p65 en el citoplasma.

7.2.4 DISCUSIÓN

Evidencias experimentales demuestran que *S. aureus* puede inducir la síntesis de proteínas propias de la respuesta inflamatoria en células endoteliales de humano (Yao *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1996; Strindhall *et al.*, 2002); sin embargo, no se había reportado que en la interacción de *S. aureus* con estas células esté involucrada la activación de NF- κ B. Debido a que en resultados anteriores observamos que la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB está asociada con el estado de actividad de este factor de

transcripción (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008), decidimos investigar si la interacción de *S. aureus* con las CEB induce la activación del NF- κ B. Encontramos que *S. aureus* induce la translocación al núcleo del NF- κ B, lo cual es un indicador de su activación. Se sabe que NF- κ B juega un papel importante en la respuesta inmune, por lo que este resultado permite suponer que la síntesis de proteínas propias de la respuesta inflamatoria previamente reportada (Yao *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1996; Strindhall *et al.*, 2002), podría deberse precisamente a la activación de este factor de transcripción. *S. aureus* induce la activación de NF- κ B en macrófagos y neutrófilos mediante diferentes componentes de su pared y factores de virulencia (Fournier y Philpott, 2005). Aunque determinamos la activación de NF- κ B en las CEB por *S. aureus*, no se sabemos mediante qué mecanismo lo esté haciendo. Por otra parte, la translocación al núcleo del NF- κ B inducida por el TNF- α que se observó en los dos tiempos evaluados, constatan que las CEB tienen un comportamiento típico de endotelio. Esto es importante al considerar a las CEB como un modelo de estudio en la interacción de estas células con *S. aureus*.

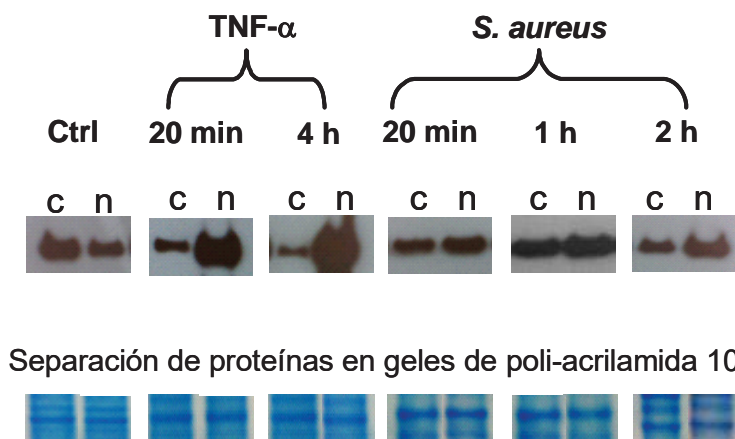


Figura 6. *Staphylococcus aureus* induce la translocación al núcleo de NF- κ B. Determinación mediante inmunodetección. Las CEB fueron sometidas a diferentes tratamientos: incubadas con 3 ng/ml de TNF- α durante 20 min y 4 h, o bien, infectadas con *S. aureus* (MOI 2) durante 20 min, 1 h y 2 h. Las proteínas de los extractos se separaron por electroforesis en geles de poli-acrilamida al 10%, y después se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La detección se realizó con anticuerpos policlonales anti-p65 (1:500). La comparación fue hecha entre las bandas que corresponden a la fracción citosólica (c) y nuclear (n) en cada tratamiento. Se presentan patrones de bandas cercanas a 65 kDa teñidas con azul de comassie para mostrar uniformidad de cargas.

7.2.5 CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos por inmunodetección y EMSA demuestran que *S. aureus* activa la translocación de NF- κ B al núcleo, lo cual es indicativo de su activación. Estos

resultados le dan sustento a la posible correlación que pudiera existir entre la activación de NF- κ B y el aumento de la fagocitosis de *S. aureus* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008).

BIBLIOGRAFÍA

- Hamill RJ, Vann JM and Proctor RA. 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 54:833-836.
- Oviedo-Boyso J, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cárabez-Trejo A, Cajero-Juárez M and Baizabal-Aguirre VM. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand J Immunol* 67:169-176.
- Schägger HG and von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Strindhall J, Lindaren PE, Löfgren S and Kihlström E. 2002. Variations among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to induce expression of E-selectin and ICAM-1 in human endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:227-235.
- Yao L, Lowy FD and Berman JW. 1996. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 64:3407-3409.
- Yao L, Bengualid V, Lowy FD, Gibbons JJ, Hatcher VB and Berman JW. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* 63:1835-1839.

7.3 CAPÍTULO III

La activación del NF- κ B juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de algunas enfermedades causadas por bacterias. La regulación de vías de señalización es una estrategia que algunas bacterias utilizan para controlar la respuesta celular, como por ejemplo *S. aureus* que activa la translocación de NF- κ B al núcleo mediante diferentes mecanismos. Recientemente, se reportó que la proteína A (SpA) de esta bacteria activa al NF- κ B al unirse al receptor del TNF- α , TNFR1, presente en células epiteliales de pulmón de humano. En nuestro trabajo encontramos que: 1) TNF- α incrementa la capacidad fagocítica de las CEB y 2) que *S. aureus* activa la translocación de NF- κ B al núcleo en células endoteliales de bovino. Por esto se decidió investigar si la SpA influye sobre la fagocitosis de *S. aureus*. Aunque la SpA se une al mismo receptor que el TNF- α , el tratamiento de las CEB con esta proteína produjo una disminución en el número de bacterias intracelulares recuperadas, lo que sugiere que la SpA disminuye la capacidad fagocítica de las CEB, aunque el mecanismo no está muy claro. Sin embargo, las CEB recuperaron su capacidad fagocítica de manera gradual respecto al tiempo, cuando se les permitió un periodo de cultivo en ausencia de SpA. Asimismo, TNF- α e IL-1 β indujeron una rápida recuperación de la capacidad fagocítica de las CEB, después del tratamiento con SpA.

7.3.1 INTRODUCCIÓN

Ante una infección, se activa la respuesta inmune innata en la que se activan vías de señalización, finamente reguladas, con el fin de eliminar al microorganismo invasor. Una de las estrategias que las bacterias patógenas utilizan para favorecer su supervivencia, multiplicación y diseminación exitosa, es la regulación de dichas vías de señalización en las células hospedera, mediante diferentes componentes estructurales y factores de virulencia, también llamados efectores (Bhavsar *et al.*, 2007). Algunas bacterias regulan su fagocitosis, mientras que otras controlan la fusión del fagosoma con el lisosoma, o bien, modulan la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual juega un papel importante en la respuesta inflamatoria (Fig 7) (Coombes *et al.*, 2004; Oviedo-Boyso *et al.*, 2005, anexo 2; Bhavsar *et al.*, 2007). En el caso particular de *S. aureus*, se ha reportado que presenta varios componentes de pared y factores de virulencia que inducen la activación del NF- κ B, por ejemplo, el ácido lipoteicoico que se une al TLR2 y el peptidoglucano que se une al receptor intracelular Nod (Fournier y Philpott, 2005). Recientemente, se reportó que la proteína A de *S. aureus* (SpA) se une al receptor 1 de TNF- α (TNFR1), lo cual causa la activación de varias vías de señalización, entre ellas la asociada con el NF- κ B (Gómez *et al.*, 2004). Inicialmente, la SpA fue identificada por su efecto antifagocítico debido a que presenta la capacidad de unirse a la región Fc de la inmunoglobulina G (IgG), impidiendo la opsonización adecuada de *S. aureus* y por consecuencia su fagocitosis (Uhlén *et al.*, 1984a). SpA es una proteína de superficie de 42 kDa que se encuentra unida en su región C-terminal de manera covalente al peptidoglucano de la pared celular (Löfdahl *et al.*, 1983; Navarre y Schneewind, 1999). SpA está conformada por dos regiones bien definidas, una localizada hacia el extremo N-terminal de la proteína que se divide en cinco regiones repetidas (E, D, A, B y C de ~58 aminoácidos cada uno). Cada uno de estas presenta sitios de unión a IgG mediante una secuencia de aminoácidos, Phe-Tyr-Glu. La segunda región denominada Xr, que es la responsable del anclaje a la pared celular, presenta un número variable de regiones repetidas cortas de 8 residuos (Uhlén *et al.*, 1984b; Moks *et al.*, 1986).

El efecto antifagocítico de SpA es ampliamente reconocido; sin embargo, poco se sabe de su papel en la patogénesis de infecciones causadas por *S. aureus*. Resultados obtenidos recientemente, muestran que SpA actúa como un efector inmunológico al

unirse a TNFR1 e inducir la activación de las vías de señalización como NF- κ B, JNK y p38, que dependen de este receptor (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006). Además, estos investigadores encontraron que SpA es esencial en la patogénesis de neumonía en ratones, en la que su interacción con TNFR1 es fundamental. Por otra parte, en resultados obtenidos en el laboratorio por Oviedo-Boyso *et al.* (2008), se demostró que la capacidad de las células endoteliales de bovino (CEB) para fagocitar a *S. aureus* aumentó por estimulación con TNF- α e IL-1 β y está asociada al estado de activación del factor de transcripción NF- κ B. Considerando que TNF- α aumenta la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB mediante la activación de TNFR1 y que SpA se une al mismo receptor que esta citocina, en este trabajo se investigó el efecto de SpA sobre la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB.

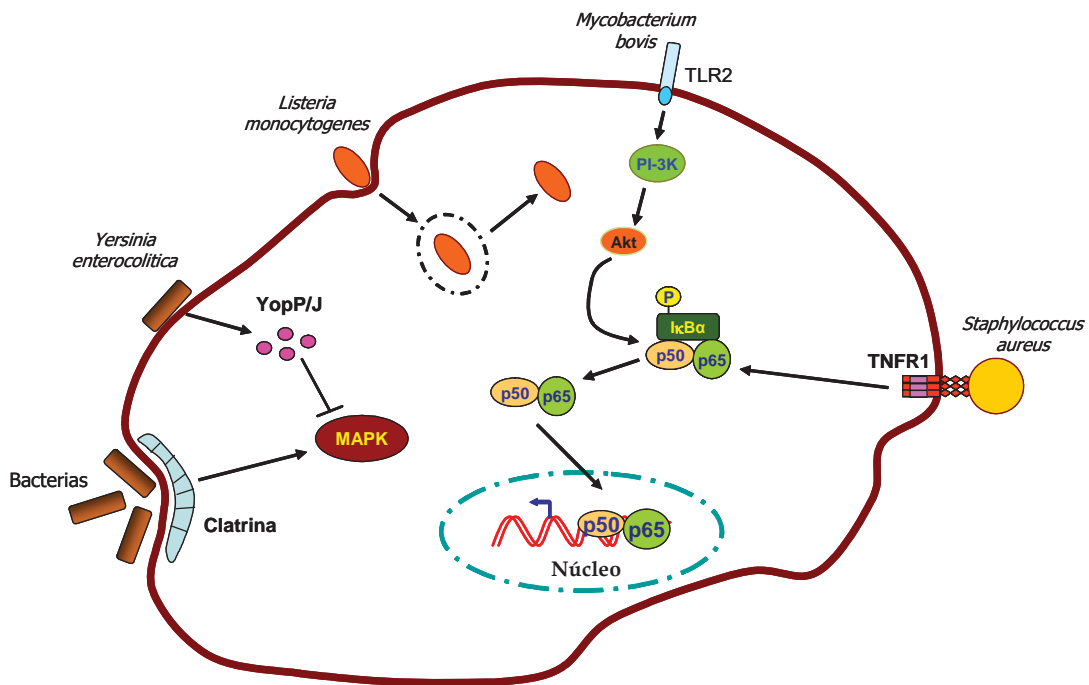


Figura 7. Mecanismos empleados por algunas bacterias para modular la respuesta de las células huésped. *Yersinia enterocolitica* produce las proteínas YopP y YopJ, las cuales introduce al citoplasma de la célula e interfieren con la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y en consecuencia evita su fagocitosis mediada por clatrina. Algunas bacterias, después de invadir a la célula huésped, pueden permanecer en la vacuola fagocítica, lo que les ayuda a evitar la detección por parte del sistema inmune y les proporciona un nicho de multiplicación. Otras bacterias, como *Listeria monocytogenes*, liberan sustancias con la capacidad de romper la membrana del fagosoma, lo que favorece su liberación al citoplasma. La translocación de NF- κ B al núcleo también es activada por una variedad de bacterias como por ejemplo, *Mycobacterium bovis* interactúa con el receptor tipo Toll 2 (TLR2) mediante el peptidoglicano de su pared, la activación de NF- κ B por esta bacteria involucra a PI-3K/Akt y las MAPK, JNK y p38. *Staphylococcus aureus* también activa a NF- κ B mediante diferentes mecanismos, uno de ellos es por la unión de la proteína A (SpA) al receptor 1 de TNF- α (TNFR1).

7.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron células endoteliales de cordón umbilical de bovino inmortalizadas (Cajero-Juárez *et al.*, 2002) y una cepa de *S. aureus* subespecie *aureus* adquirida de ATCC (27543). Las citocinas TNF- α e IL-1 β se compraron de R&D Systems (Mineapolis, MN, USA); lisostafina y SpA se adquirieron de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Los medios y las condiciones para el cultivo de las células endoteliales y la preparación del inóculo de *S. aureus* están descritos en Oviedo-Boyso *et al.* (2008).

Tratamiento de las células endoteliales con proteína A. Las células endoteliales se trataron con concentraciones variables de proteína A de *Staphylococcus aureus* durante 4 h, o bien con 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 0 a 240 min. Después de lavar las células con PBS, se infectaron con 1×10^6 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml de *S. aureus* durante 20 min. Las bacterias extracelulares se eliminaron por tratamiento con 5 $\mu\text{g/ml}$ de lisostafina durante 20 min. La recuperación de la capacidad fagocítica de las CEB se evaluó incubando las células con 5 $\mu\text{g/ml}$ de SpA por 1 h, para después incubarlas a 37°C en 5% de CO₂ sin tratamiento adicional durante 0, 2 y 6 h. Posteriormente, las CEB fueron infectadas con 1×10^6 UFC/ml de *S. aureus* durante 20 min. Para observar si el TNF α o la IL-1 β inducían una recuperación de la capacidad fagocítica de las CEB, las células se trataron con 5 $\mu\text{g/ml}$ de SpA por 1 h. Después de un periodo de cultivo de 2 h sin tratamiento adicional, las CEB se incubaron con 3 ng/ml de TNF- α ó 20 ng/ml de IL-1 β durante 4 h y se infectaron en las condiciones antes mencionadas. En todos los casos, las bacterias intracelulares recuperadas se cultivaron y las UFC se contaron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por Oviedo-Boyso *et al.* (2008).

Análisis estadístico. Para normalizar los datos, el número de UFC/ml se dividió entre el número de CEB para cada condición. Al cociente obtenido en el control se le asignó de manera arbitraria un valor de 100%. Se calculó la media ($n = 3$) y el error estándar para cada condición. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante una prueba *t* de análisis pareado, usando el programa SigmaStat versión 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7.3.3 RESULTADOS

SpA reduce la capacidad de las CEB para fagocitar *S. aureus*. El tratamiento de las CEB con SpA durante 4 h causó una marcada disminución en el número de bacterias intracelulares recuperadas de *S. aureus* en comparación con las células control no tratadas (Fig. 8A). Aunque el efecto máximo de disminución fue de $58 \pm 2\%$ ($P < 0.001$) con $10 \mu\text{g/ml}$ de SpA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de SpA evaluadas (Fig. 8A). La máxima reducción de $62 \pm 4\%$ ($P < 0.001$) en el número de bacterias intracelulares recuperadas de *S. aureus* se obtuvo con un tiempo de tratamiento de las CEB con SpA de 15 min (Fig. 8B). Con tiempos más prolongados de tratamiento no se obtuvo una reducción mayor. Estos datos permitieron seleccionar una concentración de SpA de $5 \mu\text{g/ml}$ y un tiempo de incubación de 1 h para los experimentos siguientes.

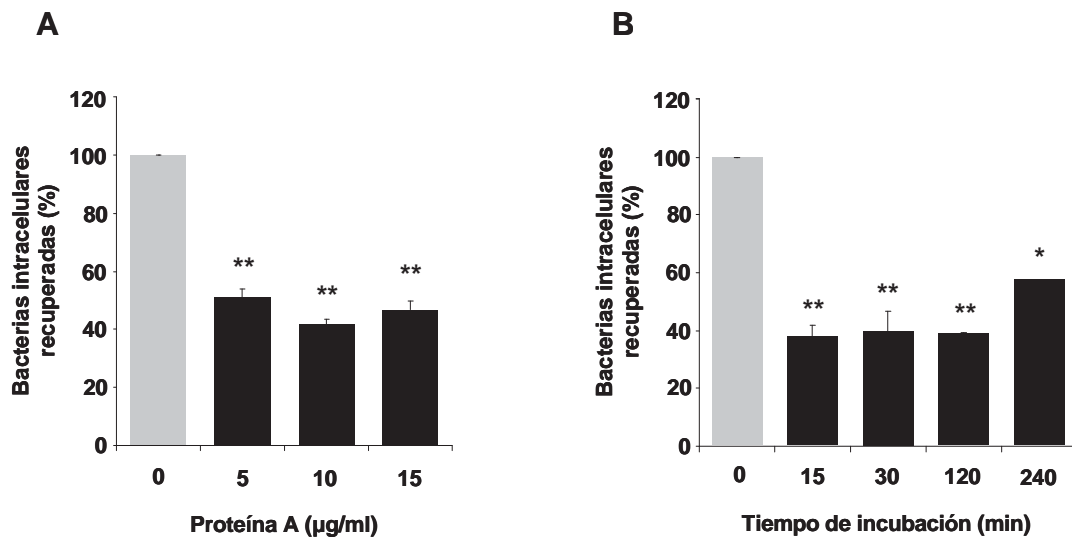


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de SpA sobre la fagocitosis de *S. aureus* en CEB y curso temporal de fagocitosis de *S. aureus* en CEB pre-incubadas con SpA. A) Las células endoteliales se incubaron durante 4 h con las concentraciones indicadas de SpA y después se infectaron con 1×10^6 UFC/ml de *S. aureus*. B) Las células endoteliales se incubaron con $5 \mu\text{g/ml}$ de SpA durante los tiempos indicados y después se infectaron. Se presenta la media \pm el error estándar ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, comparado con el control no tratado (A) o el tiempo cero de incubación (B).

Recuperación de la capacidad de las CEB para fagocitar *S. aureus* después del tratamiento con SpA. Después de que las CEB se lavaron con PBS para eliminar la SpA del medio, se colocaron las células durante un periodo de cultivo de 2 h sin

tratamiento y se infectaron, la disminución en el número de bacterias intracelulares recuperadas de *S. aureus* fue de $33 \pm 2\%$ ($P < 0.05$), la cual fue menor comparada con la reducción del $58 \pm 1.9\%$ cuando se trataron las CEB con la SpA e inmediatamente después se infectaron (Fig. 9A). Cuando el periodo de cultivo sin tratamiento fue igual a 6 h, el número de *S. aureus* intracelular fue similar al del control (Fig. 9A). En un trabajo previo demostramos que el TNF- α y la IL-1 β causan un incremento en la capacidad fagocítica de las CEB por *S. aureus* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). Con el fin de observar si el TNF- α o la IL-1 β inducían una pronta recuperación de las CEB para fagocitar *S. aureus*, las CEB se incubaron primero con la SpA y después se dejaron un periodo de cultivo de 2 h sin tratamiento; posteriormente, se trataron con el TNF- α y la IL-1 β , seguido de la infección con *S. aureus*. En estas condiciones se observó que los valores de *S. aureus* intracelular obtenidos después del tratamiento con las citocinas fueron más altos que el tratamiento con la SpA (Fig. 9B). Tomando como referencia el tratamiento con la SpA, el TNF- α produjo un aumento del $34 \pm 1\%$ ($P < 0.05$), mientras que IL-1 β causó un incremento del $72 \pm 6\%$, siendo incluso mayor que el control no tratado ($P < 0.05$) (Fig. 9B).

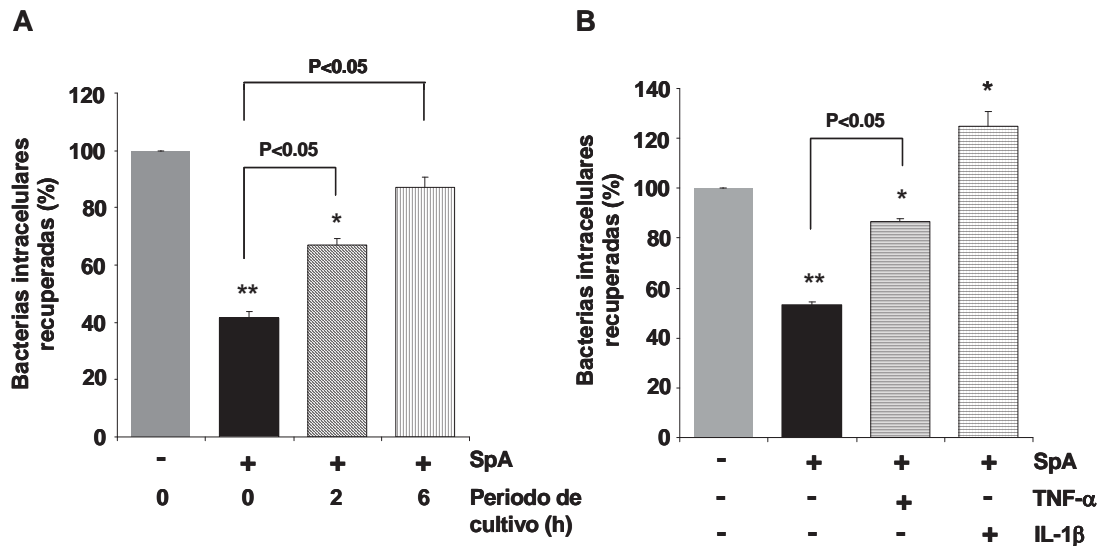


Figura 9. Recuperación de la capacidad fagocítica de las CEB por *S. aureus*. A) Las células endoteliales se incubaron durante 1 h con 5 $\mu\text{g/ml}$ de SpA; después de retirar SpA del medio se dejaron sin tratamiento (periodo de cultivo) durante 2 h (columna con líneas diagonales) y 6 h (columna con líneas verticales). Posteriormente, se infectaron con 1×10^6 UFC/ml *S. aureus*. B) Las células endoteliales se incubaron durante 1 h con 5 $\mu\text{g/ml}$ de SpA (columna negra); después de retirar SpA del medio, las células se dejaron durante 2 h sin tratamiento; posteriormente, se trataron con 3.0 ng/ml de TNF- α (columna con líneas horizontales) o 20 ng/ml de IL-1 β (columna a cuadros) durante 4 h y se infectaron con *S. aureus*. Se presenta la media \pm el error estándar ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ en comparación con el control (columna gris en A y en B).

DISCUSIÓN

Los resultados previos obtenidos en el laboratorio indican que el TNF- α aumenta la capacidad fagocítica de *S. aureus* por las CEB, por medio de la activación del NF- κ B (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). En este trabajo se demuestra que la adición de SpA, componente estructural de *S. aureus*, a las CEB produjo una marcada disminución ($62 \pm 4\%$) del número de *S. aureus* intracelulares. Se sabe que el mecanismo de activación del NF- κ B involucra la interacción del TNF- α con su receptor TNFR1 (Wajant *et al.*, 2003). En un estudio reciente se demostró que la unión de la SpA con el TNFR1, localizado en la membrana plasmática de células epiteliales de pulmón, activa la translocación del NF- κ B al núcleo (Gómez *et al.*, 2004). Aunque estos autores evaluaron la activación del NF- κ B, no aportaron información sobre la modulación del proceso de fagocitosis de *S. aureus*. Considerando que tanto el TNF- α como la SpA interactúan con el TNFR1 y activan al NF- κ B, es interesante que las CEB respondan a una citocina pro-inflamatoria (TNF- α) y a un componente de la pared de *S. aureus* (SpA) de una forma tan contrastante, en relación con el proceso de fagocitosis de *S. aureus*, lo cual podría deberse a que estos estímulos inducen la expresión diferencial de genes regulados por el NF- κ B.

La capacidad de las CEB para fagocitar a *S. aureus* se recuperó cuando las CEB fueron sometidas a un periodo de cultivo de 2 a 6 h sin tratamiento adicional, posterior al tratamiento con la SpA. Este resultado sugiere que las CEB restablecen el estado basal inicial que las prepara para responder a la interacción con *S. aureus* y fagocitarlo. Algunas alternativas no excluyentes que podrían explicar la recuperación de las CEB son: 1) TNFR1 es desensibilizado por la SpA, de tal forma que las CEB requieren de un periodo de síntesis *de novo* del receptor y/o 2) la SpA causa una intensa movilización al núcleo del NF- κ B, de tal manera que las reservas citosólicas de este factor de transcripción se agotan y las CEB deben entrar en un periodo de síntesis activa del NF- κ B. Las evidencias que apoyan estas posibles interpretaciones se sustentan en que la exposición de células epiteliales a la SpA causa que el dominio extracelular del TNFR1 se desprenda de la membrana (Gómez *et al.*, 2004), provocando que las células se desensibilicen y conduciéndolas a un periodo refractario a los estímulos que dependen del TNFR1. En cuanto a la segunda alternativa, hemos observado que el tratamiento de las CEB con el TNF- α , después de un periodo de cultivo de 2 h posterior al tratamiento con la SpA, causa la recuperación de la capacidad fagocítica de las células. La

recuperación fue aún mayor cuando las CEB se trataron con IL-1 β , citocina que se une a su propio receptor de membrana (IL-1R). Estos resultados indican que posiblemente la abundancia relativa del TNFR1 en la membrana plasmática de las CEB no se había recuperado. Se ha iniciado en el laboratorio la evaluación molecular de estas alternativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhavsar AP, Guttman JA and Finlay B. 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* 449:827-834.
- Cajero-Juárez M, Ávila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G and Clapp C. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 81:1-8.
- Coombes BK, Valdez Y and Finlay B. 2004. Evasive maneuvers by secreted bacterial proteins to avoid innate immune responses. *Curr Biol* 14:R856-R867.
- Fournier B and Philpott D. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 18(3):521-540.
- Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A and Prince S. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 10:824-848.
- Gómez MI, O'Seaghda M, Magargee M, Foster TJ and Prince AS. 2006. *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem* 29:20190-20196.
- Löfdahl S, Guss B, Uhlén M, Philipson L and Lindberg M. 1983. Gene for staphylococcal protein A. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:697-701.
- Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J and Uhlén M. 1986. Staphylococcal protein A consist of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156:637-643.
- Navarre WW and Schneewind O. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:174-229.
- Oviedo-Boyso J, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ y Baizabal-Aguirre VM. 2005. Interferencia molecular en la ruta de transducción de NF- κ B por bacterias patógenas. *Revista de Educación Bioquímica* 24:12-20.

- Oviedo-Boyso J, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cáramez-Trejo A, Cajero-Juárez M and Baizabal-Aguirre VM. 2008. Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand J Immunol* 67:169-176.
- Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Götz F and Lindberg M. 1984a. Expression of the gene encoding protein A in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Bacteriol* 159:713-719.
- Uhlén M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L and Lindberg M. 1984b. Complete sequence of staphylococcal gene encoding protein A. *J Biol Chem* 259:1695-1702.
- Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.

7.4 CAPÍTULO IV

Algunos reportes han demostrado que *S. aureus* tiene la capacidad de invadir diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran células epiteliales de la glándula mamaria de bovino, células endoteliales de aorta de bovino y células endoteliales de cordón umbilical de humano. En el caso de las células epiteliales, se ha encontrado que *S. aureus* induce la muerte de las células; mientras que en el caso de las células endoteliales, la entrada de *S. aureus* a las células activa la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, en estos reportes no se ha analizado el comportamiento intracelular de *S. aureus*. Nosotros encontramos que las células endoteliales de bovino (CEB) pueden fagocitar a *S. aureus*, y que la fagocitosis de esta bacteria se incrementa por las citocinas pro-inflamatorias, TNF- α e IL-1 β . Por lo tanto, decidimos investigar qué sucede con *S. aureus* después de ser fagocitado y cómo afectan el TNF- α y la IL-1 β el comportamiento intracelular de la bacteria. En estos experimentos, además de *S. aureus* también se utilizó *S. epidermidis*, la cual es una bacteria coagulasa negativa, asociada con los casos de mastitis causados por *S. aureus* y que observamos también es fagocitada por las CEB (ver ANEXO 3). Al evaluar la supervivencia intracelular de *S. aureus* en las CEB, se observó que esta bacteria fue capaz de multiplicarse dentro de las células endoteliales en las primeras 2 h después de la infección. Sin embargo, después de este tiempo, el número de bacterias intracelulares recuperadas disminuyó significativamente, lo cual sugiere la eliminación intracelular de *S. aureus* por parte de las CEB. En el caso de *S. epidermidis*, el número de bacterias intracelulares recuperadas siempre disminuyó con respecto al tiempo postinfección. Esto sugiere que los mecanismos empleados por las CEB para matar a los estafilococos intracelulares, son más eficientes contra *S. epidermidis*. De manera interesante, TNF- α e IL-1 β incrementaron la capacidad de las CEB para matar tanto a *S. aureus* como a *S. epidermidis*.

The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β

Javier Oviedo-Boyso, Bernardo I. Cardoso-Correa, Marcos Cajero-Juárez, Alejandro Bravo-Patiño, Juan J. Valdez-Alarcón & Víctor M. Baizabal-Aguirre

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

Correspondence: Víctor M. Baizabal-Aguirre, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarímbaro, Michoacán, C.P. 58893, Apartado Postal 53, Administración Chapultepec, C.P. 58262, Morelia, Michoacán, México. Tel./fax: +52 443 295 80 29; e-mail: baizabal@zeus.umich.mx

Received 14 March 2008; revised 26 May 2008; accepted 2 June 2008.

First published online 9 July 2008.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2008.00447.x

Editor: Willem van Eden

Keywords

Staphylococcus; intracellular survival; endothelial cells; TNF- α .

Introduction

The Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* causes a wide variety of human diseases and it is one of the most important contagious pathogens of mastitis in dairy cows (Tollersrud *et al.*, 2000). Studies *in vitro* have shown that *S. aureus* is able to internalize in different bovine tissues such as epithelial cells (Bayles *et al.*, 1998; Anaya-López *et al.*, 2006), and the endothelial cells from the aorta (Hamill *et al.*, 1986; Vann & Proctor, 1987) and umbilical vein (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). From these studies, it was proposed that internalization of *S. aureus* by epithelial (Dego *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2003) and endothelial cells of the mammary gland (MG) may be one of the factors responsible for the lack of an effective immune response and antibiotic action in cases of subclinical bovine mastitis (Oviedo-Boyso *et al.*,

Abstract

Staphylococcus aureus is a pathogenic bacterium causing clinical and subclinical bovine mastitis. Infections of the udder by *S. aureus* are frequently associated with the presence of *Staphylococcus epidermidis*, an opportunistic pathogen. We reported previously that the capacity of bovine endothelial cells (BEC) to endocytize *S. aureus* is associated with the activation of NF- κ B and modulated by the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . In this work, we explore the ability of BEC to eliminate intracellular *S. aureus* and *S. epidermidis* and their response to these cytokines. Time-kinetics survival experiments indicated that BEC eliminate intracellular *S. epidermidis* more efficiently. Replication of *S. aureus*, but not *S. epidermidis*, inside BEC was evident by an increase in intracellular bacteria recovered at 2 h postinfection. Afterwards, the intracellular number of staphylococci decreased gradually, reaching the lowest value at 24 h. Treatment of BEC with TNF- α or IL-1 β potentiated the capacity of BEC to eliminate both *Staphylococcus* species at the times tested. These results indicate that activation of the intrinsic antistaphylococcal response in BEC, enhanced by TNF- α and IL-1 β , is effective to eliminate *S. aureus* and *S. epidermidis* and suggest that endothelial cells may play a prominent role in the defense against infections caused by these bacteria.

2007). Moreover, it has frequently been observed that clinical infections of the MG caused by *S. aureus* are associated with the presence of *Staphylococcus epidermidis*, which is an environmental opportunistic pathogen (Honkanen-Buzalski *et al.*, 1994). Reports on the internalization of *S. epidermidis* in bone cells (Khalil *et al.*, 2007) and bovine mammary epithelial cells (Almeida & Oliver, 2001; Anaya-López *et al.*, 2006) have emphasized the importance of this bacterium as a disease agent.

The activation of the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) by α tumor necrosis factor (TNF- α) and β interleukin 1 (IL-1 β) (Baud & Karin, 2001) is important because several bacterial infectious diseases evolve through the activation or inhibition of NF- κ B, emphasizing the importance of this transcription factor in the immune response (Rosenberger & Finlay, 2003; Bonizzi & Karin,

2004). In this regard, we have shown previously that TNF- α and IL-1 β increase the capacity of bovine umbilical vein endothelial cells to endocytize *S. aureus*, a process associated with the activity state of NF- κ B (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). Recently, Park *et al.* (2008) analyzed the effect of TNF- α and the antibiotic oxacillin on the intracellular survival of *S. aureus* in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). These authors concluded that oxacillin eliminates intracellular *S. aureus* because TNF- α triggers HUVEC, infected with this bacterium, to enter the apoptotic pathway.

Several studies have demonstrated that the endothelial cells are an important and active defensive barrier against pathogenic microorganisms (Valbuena & Walker, 2006). Infections of the MG caused by *S. aureus* course with an inflammatory response, which is characterized by the production of TNF- α and IL-1 β (Alluwaimi *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2004). One of the main targets of these cytokines is the endothelium, where they induce the expression of acute phase protein synthesis and adhesion molecules that mediate neutrophils recruitment through the nuclear translocation of NF- κ B (Kempe *et al.*, 2005).

Owing to its function as a milk producer, the MG is abundant in vessels, giving rise to a high density of endothelial tissue. Although the quarters of the MG are interconnected by capillaries they are anatomically and physiologically independent for milk synthesis. This independence in function may explain why bacterial infections are frequently circumscribed to only one quarter without affecting the others. Our interest to study the internalization (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) and survival of staphylococci in bovine endothelial cells (BEC) is because these cells may represent the last functional active defense barrier against bacteria invasion of uninfected quarters. Moreover, the effects of TNF- α and IL-1 β on bacterial endocytosis by BEC (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) and the fact that NF- κ B induces the expression of genes that are important in the defense against bacterial infections prompted us to test whether these cytokines also affect the survival of staphylococci in the cytoplasm of BEC. Our data show that BEC has the capacity to eliminate intracellular *S. epidermidis* more efficiently than *S. aureus* and that this property was increased by TNF- α and IL-1 β . Based on these findings, we suggest that the endothelial tissue acts as an active defensive barrier against pathogenic and opportunistic-pathogenic bacteria associated with bovine mastitis.

Materials and methods

Media and reagents

The nutrient mixture F-12 Ham of Dulbecco's modified Eagle's medium, trypsin-EDTA and lysostaphin were purchased from Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, MO). Fetal calf

serum (FCS) was acquired from Equitech-Bio Inc. (Kerrville, TX). Penicillin G and Streptomycin were purchased from Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Recombinant human TNF- α and recombinant human IL-1 β were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

Preparation of bacteria

The bacteria species used were *S. aureus* ssp. *aureus* (ATCC 27543) and *S. epidermidis* strain SA-29 from Michoacán, Mexico (Anaya-López *et al.*, 2006). These *Staphylococcus* species were isolated from clinic and subclinical cases of bovine mastitis, respectively. Preparation of bacteria cultures was performed essentially as reported previously by Oviedo-Boyso *et al.* (2008). In brief, bacteria were cultured in 2 mL of Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C overnight with constant agitation. Then, 400 μ L of this culture was added to 250 mL of LB medium and incubated with constant agitation until OD_{600nm} was 0.1 (initial log phase), measured using an Ultrospec-1000 spectrophotometer (Pharmacia-Biotech, Piscataway, NJ). The culture was centrifuged at 500 g for 8 min and the supernatant was eliminated; bacteria were resuspended in 250 mL of HF-12 medium without FCS and antibiotic. Then, sterile glycerol was added to a final concentration of 10% (v/v) at room temperature and the culture was vortex homogenized. Finally, the culture was separated in 1-mL aliquots and stored at -80 °C.

Culture of endothelial cells

Experiments were performed with bovine umbilical vein endothelial cells immortalized by transfection with an expression vector containing the E6E7 oncogenes of human papillomavirus 16, named BVE-E6E7 by Cajero-Juárez *et al.* (2002) and BEC in this study. For each experiment, 0.5×10^6 cells per well were seeded in 24-well plates (Corning-Costar Inc.), with 2 mL of the nutrient mixture F-12 Ham (HF-12) medium supplemented with 10% calf serum, 100 U mL⁻¹ penicillin G and 100 μ g mL⁻¹ streptomycin (Gibco-BRL) in 5% CO₂/95% air at 37 °C up to a confluence of 90–100%.

Intracellular survival of *S. aureus* and *S. epidermidis*

Confluent BEC were infected with 1×10^7 CFU mL⁻¹ (MOI = 20:1) of *S. aureus* or *S. epidermidis* for 20 min. Later, endothelial cells were treated with 5 μ g mL⁻¹ lysostaphin to kill extracellular staphylococci (lysostaphin-protection assay) and incubated from 0 to 24 h in 5% CO₂ at 37 °C. The procedure to recover and count staphylococci was the same as reported previously by Oviedo-Boyso *et al.* (2008). In brief, BEC lifted with 350 μ L of 0.25% trypsin–0.5 mM

EDTA were recovered by centrifugation at 500 g for 8 min. The supernatant was discarded and cells were lysed by hypotonic shock in 250 μL sterile deionized water. Intracellular bacteria were cultured in LB agar (LBA) at 37 °C for 19–24 h and the number of staphylococci CFU mL⁻¹ was calculated by the counting plate technique.

Effect of TNF- α and IL-1 β on intracellular survival of *S. aureus* and *S. epidermidis*

After BEC were infected with 1×10^7 CFU mL⁻¹ of *S. aureus* or *S. epidermidis* for 20 min. TNF- α (20 ng mL⁻¹) was added for 20 min simultaneously with 5 μg mL⁻¹ lysostaphin. Then, BEC were incubated in 5% CO₂ at 37 °C for 2 and 8 h. IL-1 β (20 ng mL⁻¹) and 5 μg mL⁻¹ lysostaphin were added for 4 h. At the end of this incubation, IL-1 β and lysostaphin were washed off and another 5 μg mL⁻¹ of lysostaphin was added back to the medium. BEC were incubated for 4 h to complete 8 h. Finally, BEC were lysed and staphylococci were cultured as described previously.

Electron microscopy

BEC were infected with 1×10^7 CFU mL⁻¹ of *S. aureus* or *S. epidermidis* for 20 min, treated with 5 μg mL⁻¹ lysostaphin, and incubated 2 h in 5% CO₂ at 37 °C. Fixation of BEC and transmission electron microscopy (TEM) photographs were carried out as reported by Oviedo-Boyso *et al.* (2008).

Statistical analysis

To normalize the data, the ratio of staphylococci CFU mL⁻¹ to the number of BEC was obtained for each condition tested. In each experiment, the ratio obtained for the control was referenced to the time zero condition that was arbitrarily assigned a value of 100%. Time zero was defined as the time immediately after infection (20 min) and lysostaphin treatment (20 min). Data are representative of at least three independent experiments. For the control and different assays, the error standard of the mean ($n = 3$) was calculated. The statistical significance was evaluated with the *t*-test paired analysis using the SIGMASTAT program version 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results and discussion

Intracellular survival of *S. aureus* and *S. epidermidis* in BEC

We have found that *S. aureus* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) and *S. epidermidis* (J. Oviedo-Boyso & V.M. Baizabal-Aguirre, unpublished results) are able to internalize in BEC. In order to investigate their intracellular behavior, BEC infected with these staphylococci were incubated for different time periods and then cytoplasmic bacteria were recov-

ered and counted. Time-kinetics survival experiments indicated that *S. aureus* was able to replicate inside BEC, because the number of intracellular bacteria recovered at 2 h postinfection increased by $45 \pm 10\%$ compared with the value obtained at time zero (Fig. 1). However, after this initial replication, the intracellular number of *S. aureus* decreased, reaching the highest reduction value of $60 \pm 7\%$ at 24 h. On the other hand, *S. epidermidis* showed a different intracellular survival pattern. In this case, we observed that the intracellular number of *S. epidermidis* was lower at all postinfection times tested than that obtained at time zero (Fig. 2). The intracellular number of *S. epidermidis* decreased by $95 \pm 3\%$ at 24 h, which is a greater reduction value than the one obtained for *S. aureus*.

Qualitative evidence of the intracellular behavior for both *Staphylococcus* species was obtained using TEM (Fig. 3). It

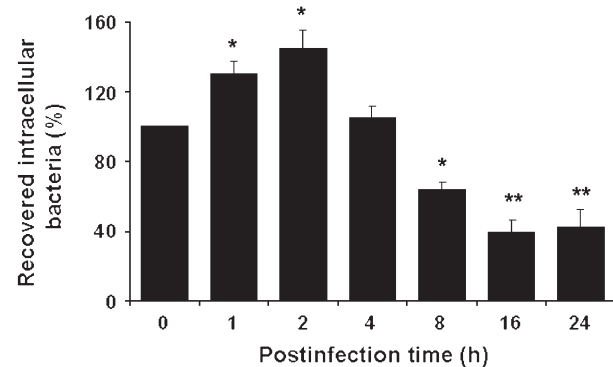


Fig. 1. Time-kinetics of *Staphylococcus aureus* intracellular survival in BEC. Time zero corresponds to 20-min infection of BEC with *S. aureus* plus a 20-min treatment with lysostaphin to kill extracellular bacteria. For each time, bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, compared with time zero.

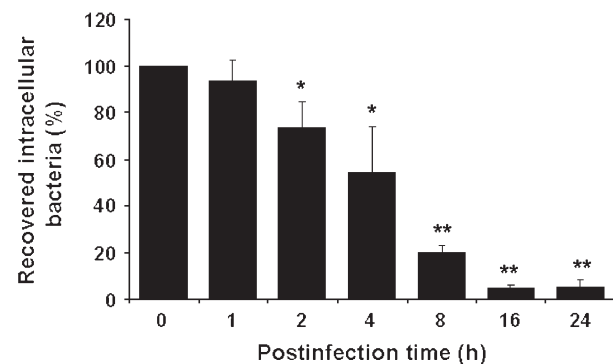


Fig. 2. Time-kinetics of *Staphylococcus epidermidis* intracellular survival in BEC. Time zero corresponds to 20-min infection of BEC with *S. epidermidis* plus a 20-min treatment with lysostaphin to kill extracellular bacteria. For each time, bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, compared with time zero.

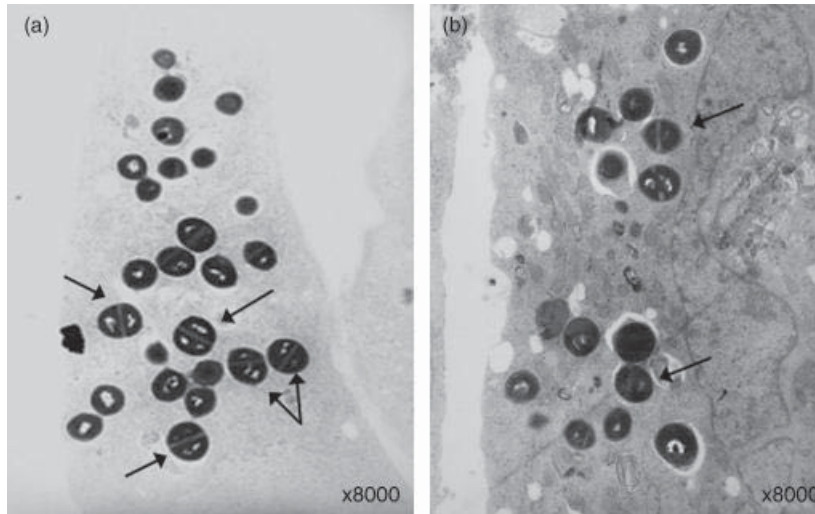


Fig. 3. TEMs of BEC infected with staphylococci. BEC were infected with 1×10^7 CFU mL⁻¹ of *Staphylococcus aureus* (a) or *Staphylococcus epidermidis* (b) for 20 min, treated with lysostaphin and cultured for 2 h. Arrows show several dividing bacteria with a clear septum; magnification $\times 8000$.

was observed that 2 h after infection, the proportion of cytoplasmic *S. aureus* with well-defined cell walls and the relative number of dividing bacteria were higher than those corresponding to *S. epidermidis* (Fig. 3a and b). Electron microscopy observations between intracellular staphylococci confirmed that *S. epidermidis* was more sensitive than *S. aureus* to the BEC antibacterial mechanism because of the highest proportion of unhealthy cells for *S. epidermidis* at 8 h postinfection (data not shown). These qualitative and quantitative results indicate that BEC are able to kill intracellular *S. aureus* and *S. epidermidis*, although *S. aureus* avoids the elimination mechanism during the first 2 h postinfection. To confirm that staphylococci were killed inside BEC, we cultured aliquots of the HF-12 medium in which endothelial cells were cultured and tested them for the presence of bacteria. Under these conditions, bacterial growth was not observed (data not shown). Furthermore, in order to rule out that BEC died during the course of the experiment we measured their viability using the trypan blue technique. With this technique we obtained a cell viability of more than 95% at all times tested, indicating that BEC remained viable during the course of the experiments (data not shown). Viability of BEC was an important parameter to evaluate because it was recently observed that long-term presence of intracellular *S. aureus* caused apoptosis in endothelial cells (Park *et al.*, 2008) and epithelial cells (Bayles *et al.*, 1998).

Interestingly, the survival pattern of the pathogenic bacterium *S. aureus* was different from that of the opportunistic pathogen *S. epidermidis*. Although the molecular mechanism behind this difference is not yet clear, these results demonstrate that BEC develop a specific response that counteracts the invasion of the infectious bacteria. In this regard, it is noteworthy that cytotoxic strains of *S. aureus* escape lysosomal degradation whereas noncyto-

toxic strains enter the lysosomal degradation pathway (Krut *et al.*, 2003). Moreover, a recent study with tracheal epithelial cells showed that viable *S. aureus* was able to replicate and escape from the phagosome; however, heat-killed *S. aureus* was eliminated by epithelial cells with high efficiency (Jarry & Cheung, 2006). Based on these findings, we suggest that metabolically active *S. aureus* evade temporarily the BEC killing response, allowing it to replicate in the cytoplasm whereas *S. epidermidis* is more susceptible to the antibacterial mechanism of BEC.

TNF- α and IL-1 β reduce the intracellular survival of *S. aureus* and *S. epidermidis* in BEC

We observed previously that TNF- α and IL-1 β increase the endocytic capacity of BEC for *S. aureus* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). Therefore, we investigated whether these cytokines also affected the staphylococci intracellular survival. To accomplish this goal, the concentrations of the proinflammatory cytokines used were those that promoted a significant increase in the internalization of *S. aureus* by BEC (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008). Also, an important point is that our experiments were designed to test different incubation times for TNF- α and IL-1 β because it has been demonstrated that the expression of NF- κ B-dependent genes is oscillatory (Nelson *et al.*, 2004). This means that nuclear translocation of NF- κ B is a dynamic process in which nuclear–cytoplasmic localization of this transcription factor is repetitive when cells are exposed to TNF- α for long periods. Interestingly, peaks of maximum phosphorylation levels of RelA were observed at 10–15 and 240–270 min (Nelson *et al.*, 2004). Therefore, we aimed to test whether a short pulse of proinflammatory cytokines (20 min) or a long one (4 h) produced the same effect in *S. aureus* intracellular survival reduction. Preliminary experiments showed that

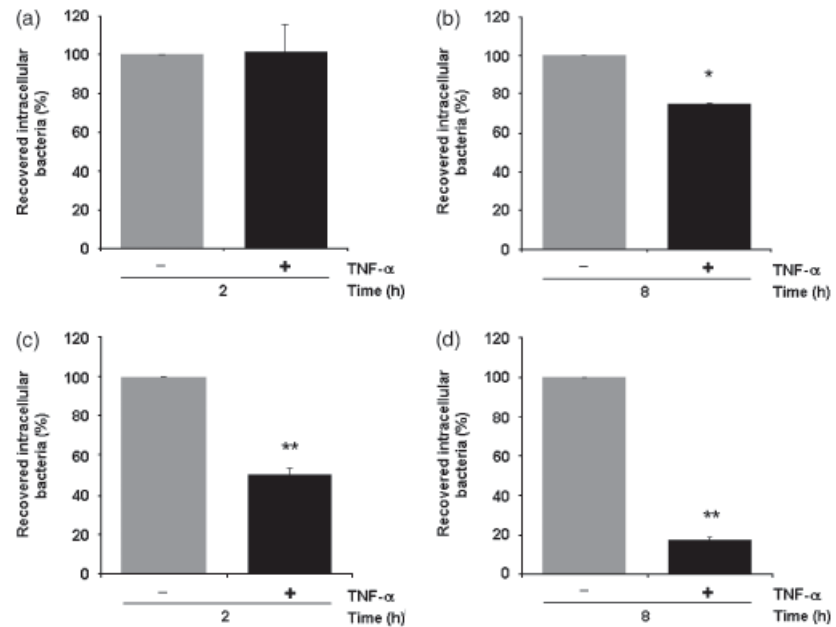


Fig. 4. TNF- α increases the capacity of BEC to eliminate intracellular staphylococci. BEC were infected with *Staphylococcus aureus* (a and b) or *Staphylococcus epidermidis* (c and d) for 20 min, incubated with lysostaphin and treated with 20 ng mL⁻¹ TNF- α for 20 min. Then, infected BEC were incubated for 2 and 8 h in the presence of lysostaphin and bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

incubation of BEC with TNF- α for 4 h markedly decreased the survival of *S. aureus* and *S. epidermidis* (data not shown). Because we did not observe a difference in survival reduction when BEC were incubated with TNF- α for 20 min or 4 h, we only present the survival response of staphylococci after a 20-min treatment of BEC with TNF- α and a 4-h treatment with IL-1 β .

Comparing the values of recovered *S. aureus* from untreated BEC with the values of *S. aureus* recovered from BEC incubated with TNF- α , no reduction in the intracellular number was observed at 2 h postinfection (Fig. 4a) whereas a reduction of 25 \pm 0.5% was obtained at 8 h (Fig. 4b). By making a similar comparison, we observed that the intracellular survival of *S. epidermidis* was more sensitive to TNF- α with reduction values of 50 \pm 3% at 2 h (Fig. 4c) and 82 \pm 0.9% at 8 h (Fig. 4d). Treatment of BEC with IL-1 β for 4 h also reduced the intracellular survival of *S. aureus* by 60 \pm 0.5% (Fig. 5a) and *S. epidermidis* by 41 \pm 4% (Fig. 5b) at 8 h postinfection. These results show that TNF- α and IL-1 β enhanced the ability of BEC to eliminate intracellular *S. aureus* and *S. epidermidis*.

TNF- α and IL-1 β are cytokines produced in inflammatory reactions and binding of these cytokines to their corresponding plasma membrane receptors activates the nuclear translocation of NF- κ B (Baud & Karin, 2001). This transcription factor plays a central role in the regulation of immune response, inflammation, differentiation, proliferation, apoptosis and cancer (Karin & Greten, 2005). Its regulated activation leads to the synthesis of cytokines, chemokines, adhesion molecules and inducible nitric oxide (NO) synthase (Li & Verma, 2002). In endothelial cells, TNF- α induces the expression of adhesion molecules

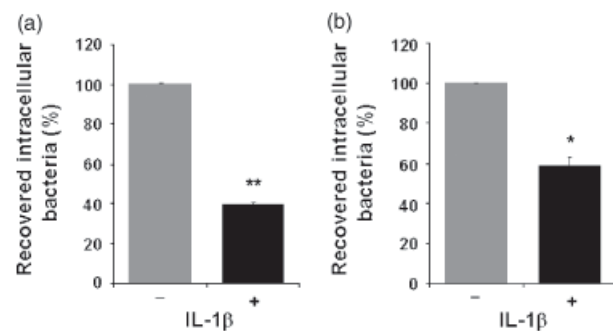


Fig. 5. IL-1 β increases the capacity of BEC to eliminate intracellular staphylococci. BEC were infected with *Staphylococcus aureus* (a) or *Staphylococcus epidermidis* (b) for 20 min, incubated with lysostaphin and treated with 20 ng mL⁻¹ IL-1 β for 4 h. Then, infected BVE-E6E7 were incubated for an additional 4 h to complete 8 h postinfection in the presence of lysostaphin and bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37 °C and counted. The data represent mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

through NF- κ B activation (Kempe *et al.*, 2005) and there is a correlation between NF- κ B activation and survival of HUVEC infected with *Rickettsia rickettsii* whereas the inhibition of this transcription factor leads to HUVEC death (Clifton *et al.*, 1998). It was recently found that TNF- α helped oxacillin, an antistaphylococcal antibiotic, to eliminate intracellular *S. aureus* from HUVEC (Park *et al.*, 2008). These authors concluded that elimination of intracellular *S. aureus* was in part the result of HUVEC apoptosis induced by TNF- α . However, in that work the experimental design included prolonged incubation with TNF- α (12–48 h). In contrast, a short treatment with TNF- α for only 20 min after infection of BEC with *S. aureus* or *S. epidermidis* was enough

to increase the capacity of endothelial cells to effectively eliminate intracellular bacteria without inducing apoptosis (this study). It is likely that prolonged TNF- α interaction with HUVEC and the lack of data on *S. aureus* survival between 0 and 12 h [the first time point evaluated by Park *et al.* (2008) was 12 h] may be the reason for these differences. Apart from TNF- α , we also demonstrated that incubation of BEC with IL-1 β , another proinflammatory cytokine, decreased the intracellular survival of *S. aureus* and *S. epidermidis*. Although activation of NF- κ B may explain the effects of TNF- α and IL-1 β on staphylococci intracellular survival, we must not rule out the possibility that another factor is involved. In this regard, it has been observed that these cytokines induce the activation of AP-1 (Wajant *et al.*, 2003) as well as phosphorylation of Akt in endothelial cells (Madge & Pober, 2000). Furthermore, TNF- α induced NO production in endothelial cells through Akt activation (Barsacchi *et al.*, 2003; De Palma *et al.*, 2006). This suggests that killing of staphylococci may take place through the NO mechanism; however, more experiments are needed to explain the antistaphylococcal mechanism of BEC.

We propose that endothelial cells obtained from bovine umbilical vein may represent a good model to study the interaction of not only staphylococci but also other pathogenic bacteria affecting cattle. The presence of the oncogenes E6E7 in BEC does not affect their identity as endothelial cells because immortalized BEC retained several properties of endothelium such as the expression of the von Willebrand protein, the binding of specific lectins, the proliferative responses to the vascular endothelial growth factor and the expression of prolactin mRNA. The clone used in this study also showed little signs of genetic instability as evaluated as centrosome and chromosome number analysis (Cajero-Juárez *et al.*, 2002). Furthermore, we have recently obtained evidence of NF- κ B nuclear translocation by stimulation of BEC with TNF- α (J. Oviedo-Boyso & V.M. Baizabal-Aguirre, unpublished results). Altogether, these data indicate that BEC has endothelial cell characteristics so that the results obtained with this cell line may be extrapolated to the responses of endothelial cells from the microvasculature present in the MG.

In conclusion, we found that the intracellular behavior of *S. aureus* (a pathogen) and *S. epidermidis* (an opportunistic pathogen) inside BEC during the initial 2 h postinfection was different. *Staphylococcus aureus* was able to replicate in the cytoplasm whereas *S. epidermidis* was more sensitive to the elimination mechanism by BEC. Furthermore, TNF- α and IL-1 β increased this capacity.

Acknowledgements

We thank the Microscopy Unit, Instituto de Fisiología Celular of the Universidad Nacional Autónoma de México,

for the transmission electron microscopy photographs. This study was supported by grants number 55657 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, and 14.4 from Coordinación de Investigación Científica of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to V.M.B.A. J.O.B. received a doctoral scholarship from CONACYT, México.

References

- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL & Cullor JS (2003) The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B* **50**: 105–111.
- Almeida RR & Oliver SP (2001) Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* **31**: 205–212.
- Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ & Ochoa-Zarzosa A (2006) Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* **81**: 358–361.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC & Rainard P (2004) *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 463–472.
- Barsacchi R, Perrota C, Bulotta S, Moncada S, Borgese N & Clementi E (2003) Activation of endothelial nitric-oxide by tumor necrosis factor- α : a novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, phosphatidylinositol-3 kinase, and Akt. *Mol Pharm* **63**: 886–895.
- Baud V & Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**: 372–377.
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA & Trumble WR (1998) Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* **66**: 336–342.
- Bonizzi G & Karin M (2004) The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**: 280–288.
- Cajero-Juárez M, Avila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G & Clapp C (2002) Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* **81**: 1–8.
- Clifton DR, Goss RA, Sahni SK, van Antwerp D, Baggs RB, Marder VJ, Silverman DJ & Sporn LA (1998) NF κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4646–4651.
- Dego OK, van Dijk JE & Nederbragt H (2002) Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Q* **24**: 181–198.

- De Palma C, Meacci E, Perrota C, Bruni P & Clementi E (2006) Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor α through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase1, and sphingosine 1 phosphate receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 99–105.
- Hamill RJ, Vann JM & Proctor RA (1986) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* **54**: 833–836.
- Honkanen-Buzalski T, Myllis V & Pyorala S (1994) Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *Zentralbl Vetrinarmed B* **41**: 344–350.
- Jarry TM & Cheung AL (2006) *Staphylococcus aureus* escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun* **74**: 2568–2577.
- Karin M & Greten FR (2005) NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**: 749–759.
- Kempe S, Kestler H, Lasar A & Wirth T (2005) NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res* **33**: 5308–5319.
- Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S & Nair SP (2007) Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect* **9**: 460–465.
- Krut O, Utermöhlen O, Schlossherr X & Krönke M (2003) Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun* **5**: 2716–2723.
- Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, Perl S & Saran A (2003) Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B* **50**: 45–52.
- Li Q & Verma IM (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**: 725–734.
- Madge LA & Pober JS (2000) A phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukine-1 inhibits apoptosis but does not activate NF- κ B in human endothelial cells. *J Biol Chem* **275**: 15458–15465.
- Nelson DE, Ihekwaba AEC, Elliot M *et al.* (2004) Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306**: 704–708.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A & Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* **54**: 399–409.
- Oviedo-Boyso J, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cárabez-Trejo A, Cajero-Juárez M & Baizabal-Aguirre VM (2008) Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand J Immunol* **67**: 169–176.
- Park WB, Lee JH, Jeon JH, Lee SJ, Kim SH, Kim NJ, Kim HB, Oh M & Choe KW (2008) Effect of tumor necrosis factor- α on intracellular *Staphylococcus aureus* in vascular endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 247–252.
- Rosenberger CM & Finlay BB (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens. *Nature Rev Mol Cell Biol* **4**: 385–396.
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ Jr & Lee JC (2000) Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* **38**: 2998–3003.
- Valbuena G & Walker DH (2006) The endothelium as a target for infections. *Annu Rev Pathol* **1**: 171–198.
- Vann JM & Proctor RA (1987) Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect Immun* **55**: 2155–2163.
- Wajant H, Pfizenmaier K & Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**: 45–65.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La infección de la glándula mamaria por *S. aureus* es uno de los padecimientos más importantes del ganado bovino lechero, debido a que con frecuencia se torna crónica. Varios factores han sido involucrados en esta característica, entre ellos están los factores intrínsecos de la bacteria que le confieren la capacidad de evadir la respuesta inmune. Otro factor es la capacidad que tiene para invadir células epiteliales de la glándula mamaria, con lo cual logra obtener un ambiente rico en nutrientes y protegerse de ciertos antibióticos. La glándula mamaria es un órgano con abundancia en vasos sanguíneos y se sabe que las células endoteliales desarrollan una función importante en la respuesta inflamatoria inducida por la invasión de microorganismos patógenos. Por lo tanto, resulta importante analizar el comportamiento de las células endoteliales cuando establecen interacción con dichos microorganismos. Un dato importante obtenido en este trabajo fue que las CEB pueden fagocitar también *S. epidermidis*, la cual es considerada una bacteria patógena-oportunista. El comportamiento fagocítico diferencial de las CEB por estas bacterias (comparar los datos de las Figs. 1 en Oviedo-Boyso *et al.*, 2008a [capítulo I] y Oviedo-Boyso *et al.*, 2008b [anexo 3]) muestra la capacidad de las CEB para diferenciar entre una bacteria y otra, y sugiere la presencia de componentes bacterianos distintos que participan en la entrada de la bacteria a la célula.

El TNF- α y la IL-1 β son las principales citocinas producidas en la respuesta inflamatoria y activadoras de las células endoteliales, por lo que se consideró que podrían influir en el proceso de fagocitosis de *S. aureus* y *S. epidermidis*. El tratamiento de las CEB con el TNF- α y la IL-1 β indujo un incremento en el número de *S. aureus* intracelular (Fig. 2, capítulo I), mientras que el mismo tratamiento redujo el número de *S. epidermidis* intracelular (Fig. 2, anexo 3). El presente, es el primer trabajo que propone y analiza la participación de estas citocinas pro-inflamatorias en la fagocitosis de *S. aureus* y *S. epidermidis* por células endoteliales de bovino. En un trabajo previo se observó que el TNF- α incrementa la adhesión de *S. aureus* a la superficie de células endoteliales de humano, pero no tiene efecto sobre la adhesión de *S. epidermidis*. Es importante notar que el efecto del TNF- α sobre la adhesión de *S. aureus* fue observado únicamente cuando las células se pre-trataron con plasmas (Cheung *et al.*, 1991). Como es sabido, el plasma es una fuente importante de fibronectina, la cual como se ha reportado participa en la adhesión de *S. aureus* a las células endoteliales (Hynes y

Yanada, 1982; Agerer *et al.*, 2005), por lo que el efecto del TNF- α sobre la adhesión de *S. aureus* a las células endoteliales, no queda totalmente claro. Sin embargo, el hecho de no observar efecto sobre la adhesión de *S. epidermidis*, confirma la idea de que la interacción entre esta bacteria y las células endoteliales es mediante un mecanismo diferente al empleado por *S. aureus* (Arrecubieta *et al.*, 2007).

Debido a que el TNF- α y la IL-1 β inducen la activación del NF- κ B, el efecto observado sobre la fagocitosis de ambas bacterias podría ser mediado por la activación de este factor. Para confirmar esta idea se desarrollaron experimentos en los que las CEB fueron tratadas con inhibidores inespecíficos (pirrolidin ditiocarbamato y MG-132) y específicos (BAY 11-7083 y SN50) de la activación del NF- κ B. En todos los casos, estos inhibidores causaron una reducción marcada en el número de bacterias intracelulares recuperadas de *S. aureus* ($48 \pm 8\%$, $46 \pm 7\%$, $63 \pm 5\%$, $50 \pm 2\%$, respectivamente en comparación con el control no tratado, Figs. 3 y 4, capítulo I), a diferencia de *S. epidermidis*, con el cual no se observó diferencia respecto al control. Estos resultados permitieron sugerir que la activación del NF- κ B está asociada al proceso de fagocitosis de *S. aureus*. En un trabajo realizado con neutrófilos de humano, se reportó la asociación entre la fagocitosis de *S. aureus* con la activación de NF- κ B (Vollebregt *et al.*, 1998). Aunque estos investigadores demostraron la activación de NF- κ B, debido a que en su diseño experimental no consideraron inhibir la activación de NF- κ B previo a la infección con *S. aureus*, sus resultados no permiten establecer si la fagocitosis pudiera estar siendo modulada por este factor de transcripción; lo cual si es posible con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

La inhibición de NF- κ B no modificó el número de *S. epidermidis* intracelulares, por lo que se supone que la activación de este factor no está asociada a la fagocitosis de dicha bacteria. Sin embargo, los resultados obtenidos con el TNF- α y la IL-1 β indican que la activación del NF- κ B modula su fagocitosis. El TNF- α no sólo induce la activación de NF- κ B, sino que también activa MAP cinasas tipo JNK y p38, las cuales participan de manera importante en la respuesta inmune innata y adquirida (Madge y Pober, 2001). La inhibición de ambas proteína cinasas no modificó la fagocitosis de *S. aureus*, aunque sí disminuyó la fagocitosis de *S. epidermidis*. Este dato sugiere que la fagocitosis de *S. aureus* y *S. epidermidis* se lleva a cabo mediante mecanismos distintos.

Se ha reportado que la entrada de *S. aureus* al citoplasma de células endoteliales de humano es a través de las integrinas $\alpha_5\beta_1$ (Massey *et al.*, 2001). En el caso de

monocitos de humano, se encontró que la activación de PI-3K a través de β_1 induce la activación de ERK, la cual a su vez induce la activación del NF- κ B (García-García *et al.*, 2001; Reyes-Reyes *et al.*, 2002; Rosales, 2007); aunque en este caso sólo se relacionó al NF- κ B en la síntesis de citocinas y no directamente con en el proceso de fagocitosis. Nuestros resultados indican una asociación entre la fagocitosis de *S. aureus* y la actividad basal del NF- κ B, por lo cual fue importante comenzar a explorar si la bacteria *per se* induce la activación del NF- κ B (ver Capítulo II). Los ensayos de inmunodetección con extractos proteicos obtenidos de CEB infectadas con *S. aureus* indicaron la activación del NF- κ B. Estos datos ayudan a entender los resultados obtenidos con los inhibidores del NF- κ B, pues posiblemente los inhibidores estén impidiendo no solamente la activación basal del NF- κ B, sino también la inducida por *S. aureus*. Además, permiten suponer que la expresión de genes propios de la respuesta inmune innata, que previamente se observó en células endoteliales de humano infectadas con *S. aureus* (Matussek *et al.*, 2005), puede ser debido a la activación de NF- κ B, ya que se sabe dependen de este factor de transcripción para su expresión (López-Bojorquez, 2004).

En un intento por entender qué componentes de *S. aureus* influyen en el proceso de fagocitosis, las CEB fueron tratadas con la SpA y después infectadas. Se eligió a la SpA debido a que se une al TNFR1 e induce la activación del NF- κ B (Gómez *et al.*, 2004). La SpA causó una marcada reducción en la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB (Fig. 8, capítulo III). Este efecto fue reversible, ya que cuando se retiró a la SpA del medio de cultivo y se dejó a las CEB sin tratamiento adicional durante 2 h y 6 h, la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB fue recuperada (Fig. 9A, capítulo III). Debido a que el TNF- α y la IL-1 β incrementan la capacidad fagocítica de las CEB, se consideró que podrían contribuir a la recuperación de dicha capacidad. El TNF- α y la IL-1 β aumentaron la fagocitosis de *S. aureus* (Fig. 9B, capítulo III). Resulta interesante que la SpA, la cual es conocida por su efecto antifagocítico en macrófagos (Uhlén *et al.*, 1984a), también disminuya la fagocitosis de *S. aureus* en las CEB, efecto que no había sido reportado previamente. Además, el efecto de la SpA es contrastante con el efecto de TNF- α , ya que a pesar de unirse al mismo receptor e inducir la activación de NF- κ B (Gómez *et al.*, 2004), provocan efectos contrarios. Lo anterior podría deberse a que los diferentes estímulos, la SpA por un lado y el TNF- α por otro, inducen la expresión de diferentes genes. Pues se sabe que la expresión específica de determinados genes

depende del estímulo que esté induciendo la activación de NF- κ B (Bonizzi y Karin, 2004). Aunque es necesaria mayor investigación para determinar qué genes se expresan de manera diferencial ante un estímulo y otro, además de poder relacionarlos de manera directa con el proceso de fagocitosis.

Las consecuencias de la entrada de *S. aureus* al interior de células eucariotas son diversas, en algunos trabajos se ha reportado que causa la muerte de las células (Menzies y Kourteva, 2000), mientras que en otros se ha reportado la síntesis de proteínas propias de la respuesta inflamatoria (Matussek *et al.*, 2005). Es por esto que se investigó el comportamiento intracelular de *S. aureus* en las CEB. No se observó muerte de las CEB, sino que por el contrario, se observó que las CEB fueron capaces de matar a los estafilococos intracelulares. Sin embargo, *S. aureus* logró dividirse durante las primeras 2 h post-infección, mientras que a tiempos mayores su supervivencia intracelular disminuyó gradualmente (Fig. 1, capítulo IV). El hecho de que *S. aureus* pueda dividirse en el interior de las CEB sugiere que la bacteria se encuentra metabólicamente activa, y que es capaz de proveerse de un nicho intracelular en el que puede evadir, al menos temporalmente, los mecanismos de eliminación implementados por las CEB.

No se conoce el mecanismo mediante el cuál *S. aureus* pudiera estar evitando, aunque temporalmente, su eliminación por las CEB; sin embargo, se ha reportado que la citotoxicidad de la bacteria influye de manera importante en este hecho. Lo que se ha reportado es que cepas citotóxicas de *S. aureus* escapan de la degradación lisosomal, al evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma, en cambio, las cepas no citotóxicas entran a la vía de degradación lisosomal en fibroblastos de humano (Krut *et al.*, 2003). En otro trabajo se encontró que la síntesis de la α -tóxina por parte de *S. aureus*, favorece su supervivencia intracelular en macrófagos de humano (Kubica *et al.*, 2008). Dado que las CEB disminuyeron de manera significativa la supervivencia intracelular de *S. aureus*, sería importante determinar por un lado, si la cepa de *S. aureus* que se utilizó sintetiza α -tóxina y si interfiere con la formación del fagoliosoma. Por otro lado, suponiendo que nuestra cepa de *S. aureus* presentara las características antes mencionadas (Krut *et al.*, 2003; Kubica *et al.*, 2008), resultaría interesante poder determinar qué mecanismo emplean las CEB que le permiten bloquear el ataque bacteriano.

La microscopía electrónica muestra que *S. epidermidis* también se dividió en el interior de las CEB (Fig. 3b, capítulo IV), aunque no tan activamente como *S. aureus*

para causar un incremento en el número de bacterias intracelulares recuperadas; por el contrario, la supervivencia de esta bacteria disminuyó progresivamente a partir de la primera hora postinfección hasta las 24 h (Fig. 2, capítulo IV). Aunque las CEB fueron capaces de matar ambas bacterias, su eficiencia fue mayor contra *S. epidermidis*, puesto que el número de bacterias intracelulares recuperadas a las 24 h fue significativamente menor para esta bacteria comparado con el número de *S. aureus*. Debido a que TNF- α e IL-1 β modulan la fagocitosis de *S. aureus* y de *S. epidermidis* en las CEB, se investigó si también tienen efecto sobre la supervivencia intracelular de estas dos bacterias. El TNF- α disminuyó la supervivencia intracelular de *S. aureus* únicamente a las 8 h postinfección, no así a las 2 h postinfección (Figs 4a y 4b, capítulo IV), que de manera interesante coincide con el tiempo en el que la bacteria presenta una alta tasa de división. En el caso de *S. epidermidis* la disminución se observó tanto a las 2 h como a las 8 h postinfección (Figs. 4c y 4d, capítulo IV). De la misma forma que TNF- α , IL-1 β causó una disminución en el número de bacterias intracelulares recuperadas a las 8 h post-infección en ambos estafilococos (Fig. 5, capítulo IV).

Se desconoce el mecanismo mediante el cual las CEB matan a los estafilococos intracelulares. Los resultados obtenidos sugieren que este proceso puede estar mediado por la activación de NF- κ B. Sin embargo, no debe descartarse la participación de algún otro mecanismo, ya que se ha reportado que TNF- α induce la producción de óxido nítrico a través de la activación de Akt (De Palma *et al.*, 2006). Se sabe que la producción de óxido nítrico es una estrategia que utilizan los macrófagos para eliminar a los microorganismos intracelulares (Burgner *et al.*, 1999). En experimentos realizados con ratones se demostró que la producción de óxido nítrico inducida por *S. aureus* participa de manera importante en la protección de los ratones del efecto letal de la infección (Sasaki *et al.*, 1998).

En la presente investigación observamos que las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β aumentan de manera importante la fagocitosis de *S. aureus* por las CEB y además, disminuyen la supervivencia intracelular de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Si consideramos que las células endoteliales representan la última barrera para las bacterias que intentan llegar al torrente sanguíneo, esto podría representar un mecanismo de control de la diseminación de la bacteria. Es decir, que resultaría más conveniente que *S. aureus* sea fagocitado por la célula endotelial, donde potencialmente puede ser eliminado, que permanecer libre en el medio extracelular. Sin embargo, la

situación es más compleja de lo que aquí se presenta, por lo que lo anterior solo podría ser demostrado en modelos animales *in vivo*, donde la participación de otras células, macrófagos o neutrófilos por ejemplo, pudiera ser evaluada.

Se sabe que en las infecciones de la GM las células epiteliales son las primeras que entran en contacto con las bacterias invasoras, incluso se ha demostrado que *S. aureus* puede invadirlas (Deogo *et al.*, 2002; Lutzow *et al.*, 2008). En este escenario, las células endoteliales tendrían una participación fundamental en la inflamación de la glándula mamaria, puesto que funcionarían no sólo como una barrera física, sino también desarrollando una respuesta inmunitaria que impediría la diseminación de *S. aureus* al cuarto de la ubre no infectado y/o al torrente sanguíneo. La identificación de los procesos moleculares que se desarrollan durante la infección de la glándula mamaria por estafilococos, contribuiría a desarrollar mejores estrategias de tratamiento y control.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación aportan información que ayuda a entender la interacción entre *Staphylococcus* y las CEB. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder, como por ejemplo:

1. ¿Qué proteínas dependientes de la activación del NF- κ B se expresan durante la fagocitosis de *S. aureus* y *S. epidermidis*?
2. ¿Induce *S. epidermidis* la activación del NF- κ B, JNK y/o p38?
3. ¿Se une la SpA al TNRF1 y en consecuencia activa al NF- κ B en las CEB?
4. ¿Qué relación existe entre la activación del NF- κ B y la fagocitosis mediada por integrinas, previamente reportada en células endoteliales?
5. ¿Qué mecanismos utilizan las CEB para eliminar a *S. aureus* y *S. epidermidis*?

10. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Agerer F, Michel A, Ohlsen K and Hauck CR. 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278(43):42524-42531.
- Agerer F, Lux S, Michel A, Rohde M, Ohlsen K and Hauck CR. 2005. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. *J Cell Sci* 118:2189-2000.
- Akira S and Sato S. 2003. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35:555-562.
- Alexander EH and Hudson MC. 2001. Factors influencing internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:361-366.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ and Oliver SP. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 79:1021-1026.
- Anaya-López JL, Contreras-Gúzman OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ and Ochoa-Zarzosa A. 2006. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* 81:358-361.
- Arrecubieta C, Lee MH, Macey A, Foster TJ and Lowy FD. 2007. SdrF, a *Staphylococcus epidermidis* surface protein, binds type I collagen. *J Biol Chem* 282(26):18767-18776.
- Auerbach W and Auerbach R. 1994. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Therapeutic* 63:265-311.
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA and Trumble WR. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 66(1):336-342.
- Biedermann BC. 2001. Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. *News Physiol Sci* 16:84-88.
- Blasi F, Tarsia P and Aliberti S. 2005. Strategic targets of essential host-pathogen interactions. *Respiration* 72:9-25.
- Bonizzi G and Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280.

- Bost KL, Ramp WK, Nicholson NC, Bento JL, Marriott I and Hudson MC. 1999. *Staphylococcus aureus* infection of mouse or human osteoblasts induces high levels of interleukin-6 and interleukin-12 production. *J Infect Dis* 180:1912–1920.
- Boulanger D, Bureau F, Mélote D, Mainil J and Lekeux P. 2003. Increased nuclear factor κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci* 86:1259-1267.
- Bradley AJ. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 164:116-128.
- Brouillete E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P and Talbot BG. 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog* 35:159-168.
- Burgner D, Rockett K and Kwiatkowski D. 1999. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81:185-188.
- Caron E and Hall A. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282:1717-1721
- Cheung AL, Koomey JM, Lee S, Jaffe EA and Fischetti VA. (1991). Recombinant human tumor necrosis factor alpha promotes adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cell. *Infect Immun* 59(10):3827-3831.
- Clark EC, Patel SD, Chadwick PR, Warhurst G, Curry A and Carlson GL. (2003). Glutamine deprivation facilitates tumor necrosis factor induced bacterial translocation in Caco-2 cells by depletion of enterocyte fuel substrate. *Epith Cell Biol* 52:224-230.
- Cunliffe KM and Frank MM. 2003. Complement activation influences *Staphylococcus aureus* adherence to endothelial cells. *Infect Immun* 71(3):1321-1327.
- Dego OK, van Dijk JE and Nederbragt H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart* 24:181-198.
- De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P and Clementi E. 2006. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor α through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:99-105.
- Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF and Hudson MC. 1999. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 26:317–323.

- Fedtke I, Götz F and Peschel A. 2004. Bacterial evasion of innate host defenses- the *Staphylococcus aureus* lesson. Internat J Med Microbiol 294:189-194.
- Finlay BB and Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol 61:136-169.
- Foster TJ. 2004. The *Staphylococcus aureus* superbug. J Clin Invest 12:1693-1696.
- Fournier B and Philpott D. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. Clin Microbiol Rev 18(3):521-540.
- Fowler T, Johansson S, Wary KK and Höök M. 2003. Src kinase has a central role in *in vitro* cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. Cell Microbiol 5(6):417-426.
- Fujiwara N and Kobayashi K. 2005. Macrophages in inflammation. Inflamm Allergy 4:281-286.
- García-García E. 2005. Diversity in phagocytic signaling: a story of greed, sharing, and exploitation. Mol Mechan Phagocyt. Chapter one.
- García-García E and Rosales C. 2002. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. J Leucok Biol 72:1092-1108.
- García-García E, Sánchez-Mejorada G and Rosales C. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF- κ B activation but not for phagocytosis. J Leucok Biol 70:649-658.
- Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, Kelley WL and Schrenzel J. 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. BMC Genomics 8:171.
- Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A and Prince A. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med (10)8:842-848.
- Gustin JA, Pincheira R, Mayo LD, Ozes ON, Kessler KM, Baerwald MR, Korgaonkar CK and Donner DB. 2004. Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 286:C547-C555.
- Hamill RJ, Vann JM and Proctor RA. 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. Infect Immun 54(3):833-836.

- Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erickson EA and Wells CL. 2003. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J Surg Res* 114:42-49.
- Hippenstiel S and Suttorp N. 2003. Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* 89:18-24.
- Hocking DC, Sottile J and McKeown-Longo PJ. 1998. Activation of distinct $\alpha_5\beta_1$ -mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol* 141(1):241-253.
- Hynes RO and Yamada KM. 1982. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 95:369-377.
- Jarry TM and Cheung AL. 2006. *Staphylococcus aureus* escapes more efficiently from the phagosome of cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun* 74(5):2568-2577.
- Jarry TM, Memmi G and Cheung AL. 2008. The expression of alpha-haemolysin is required for *Staphylococcus aureus* phagosomal escape after internalization in CFT-1 cells. *Cell Microbiol* 10(9):1801-1814.
- Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair SP, Harris M, Henderson B, Bentley G and Meghji S. 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 67:2677-2681.
- Jonsson K, Signäs C, Müller HP and Lindberg M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 202:1041-1048.
- Kahl BC, Goulian M, Wamel WV, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, Peters G and Cheung AL. 2000. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun* 68(9):5385-5392.
- Kapetanovic R, Nahori MA, Balloy V, Fitting C, Philpott DJ, Cavaillon JM and Adib-Conquy M. 2007. Contribution of phagocytosis and intracellular sensing for cytokine production by *Staphylococcus aureus*-activated macrophages. *Infect Immun* 75(2):830-837.
- Keller R, Fischer W, Keist R and Bassetti S. 1992. Macrophages response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 60(9):3664-3672.
- Ko Y, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A and Vetter H. 1999. Cytokine-inducible growth factor gene expression in human umbilical endothelial cells. *Mol Cell Prob* 13:203-211.

- Krut O, Utermöhlen O, Schlossherr X and Krönke M. 2003. Strain-specific association of cytotoxic and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun* 71(5):2716-2723.
- Krut O, Sommer H and Krönke M. 2004. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemoth* 53:167-173.
- Kuldo JM, Ogawara KI, Werner N, Ásgeirsdóttir SA, Kamps JAAM, Kok RJ and Molema G. 2005. Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases. *Curr Vas Pharmacol* 3:11-39.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T and Potempa J. (2008) A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: The silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 3(1): e1409. doi:10.1371/journal.pone.0001409
- Liu Y, Shaw SK, Ma S, Yang L, Luscinskas FW, and Parkos CA. 2004. Regulation of Leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. *J Immunol* 8-13.
- López-Bojorquez LN. 2004. La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de Investigación Clínica* 56(1):83-92.
- Lorenz MC and Fink GR. 2002. Life and death in a macrophage: role of the Glyoxylate cycle in virulence. *Euk Cell* 1(5):657-662.
- Lutzow YCS, Donaldson L, Gray CP, Vuocolo T, Pearson RD, Reverter A, Byrne KA, Seehy PA, Windon R and Tellam RL. 2008. Identification of immune genes and proteins involved in the response of bovine mammary tissue to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Vet Res* 4:18-43
- Madge LA and Pober JS. 2001. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 70:317-325.
- Magnusson MK and Mosher DF. 1998. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1363-1370.
- Martins A and Cunha MLRS. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol* 51(9):787-795.

- Massey RC, Kantzanou MN, Fowler T, Day NPJ, Schofield K, Wann ER, Berendt AR, Höök M and Peacock SJ. 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol* 3(12):839-851.
- Matussek A, Strindhäll J, Stark L, Rohde M, Geffers R, Buer J, Kihlström E, Lindgren PE and Löfgren S. 2005. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces transcription of genes encoding and innate immunity response. *Scand J Immunol* 61:536-544.
- May RC and Machesky LM. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114:1061-1077.
- Menzies BE and Kourteva I. 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* 66(12):5994-5998.
- Menzies BE and Kourteva I. 2000. *Staphylococcus aureus* α -toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29 :39-45.
- Michiels C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196:430-443.
- Miyamoto YJ, Wann ER, Fowler T, Duffield E, Höök M and McIntyre BW. 2001. Fibronectin binding protein A of *Staphylococcus aureus* can mediate human T lymphocytes adhesion and coactivation. *J Immunol* 166:5129-5138.
- Moreillon P and Majcherczyk PA. 2003. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis* 35(9):632-641.
- Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, Lundin KEA, Scholz T, Brandtzaeg P and Haraldsen G. 1998. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 42:635-642.
- Ogawa SK, Yurberg ER, Hatcher CB, Levitt MA and Lowy FD. 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect Immun* 50(1):218-224.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X and Lee JW. 2003. The bovine neutrophils: structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34:597-627.
- Pankov R and Yamada KM. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115:3861-3863
- Park WB, Lee JH, Jeon JH, Lee SJ, Kim SH, Kim NJ, Kim HB, Oh Md and Choe KW. 2008. Effect of tumor necrosis factor- α on intracellular *Staphylococcus aureus* in vascular endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:247-252.
- Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ and Berendt AR. 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of

- Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiol* 145:3477-3486.
- Pober JS. 2002. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 4(3):S109-S116.
- Pöhlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Döring G, Lee JC, Fournier JM, Botzenhart K and Wolz C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influences of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. *Infect Immun* 68(9):4865-4871.
- Que YA, Haefliger JA, Piroth L, Francois P, Widmer E, Entenza JM, Sinha B, Herrmann M, Francioli P, Vaudaux P and Moreillon P. 2005. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Experiment Med* 201(10):1627-1635.
- Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5(3):85-87.
- Reilly SS, Hudson MC, Kellam JF and Ramp WK. 2000. *In vivo* internalization of *Staphylococcus aureus* by embryonic chick osteoblasts. *Bone* 26:63-70
- Reyes-Reyes M, Mora N, González G and Rosales C. 2002. β 1 and β 2 integrins activate different signaling pathways in monocytes. *Biochem J* 363:273-280.
- Risau W. 1995. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9:926-933.
- Rosales C. 2007. Fc receptor and integrin signaling in phagocytes. *Sign Transd* 7:386-401.
- Rubin LL. 1992. Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Curr Op Cell Biol* 4:830-833.
- Sasaki S, Miura T, Nishikawa S, Yamada K, Hirasue M and Nakane A. 1998. Protective role of nitric oxide in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun* 66(3):1017-1022.
- Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR and Schumann RR. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278(18):15587-15594.
- Sinha B, Francois PP, Nübe O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M and Krause KH. 1999. Fibronectin-binding protein acts as

- Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha_5\beta_1$. *Cell Microbiol* 1(2):101-117.
- Sinha B, Francois PP, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G and Herrmann M. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68(12):6871-6878.
- Sottile J, Schwarzbauer J, Selegue J and Mosher DF. 1991. Five type I modules of fibronectin form a functional unit that binds to fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 266(20):12840-12843.
- Stindhall J, Lindgren PE, Löfgren S and Kihlström E. 2002. Variations among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to induce expression of E-selectin and ICAM-1 in human endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:27-235.
- Swanson JA and Hoppe AD. 2004. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated Phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76:1093-1103.
- Underhill DM and Ozinski A. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-852.
- Valbuena G and Walker DH. 2006. The endothelium as a target for infections. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:171-198.
- Vann JM and Proctor RA. 1987. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect Immun* 55:2155-2163.
- Vollebregt M, Hampton MB and Winterbourn CC. 1998. Activation of NF- κ B in human neutrophils during Phagocytosis of bacteria independently of oxidant generation. *FEBS Letters* 432:40-44.
- Vieira OV, Botelho RJ and Grinstein S. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J* 366:689-704.
- Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
- Wann ER, Gurusiddappa S. and Höök M. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275(18):13863-13871.
- Yao L, Bengualid V, Lowy FD, Gibbons JJ, Hatcher VB and Berman JW. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* 63(5):1835-1839.

Yao L, Lowy FD and Berman JW. 1996. Interleukin-8 gene expression in *Staphylococcus aureus*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 64(8):3407-3409.

Yao L, Bengualid V, Berman JW and Lowy FD. 2000. Prevention of endothelial cell cytokine induction by a *Staphylococcus aureus* lipoprotein. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28:301-305.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1



ELSEVIER



www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis

Javier Oviedo-Boyso, Juan J. Valdez-Alarcón, Marcos Cajero-Juárez, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. López-Meza, Alejandro Bravo-Patiño, Víctor M. Baizabal-Aguirre*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apdo. Postal 53, Administración Chapultepec, C.P. 58262 Morelia, Michoacán, México

Accepted 15 June 2006
Available online 1 August 2006

KEYWORDS

Innate immunity;
Bovine;
Mammary gland;
Mastitis;
Pathogenic bacteria

Summary Mastitis (mammary gland inflammation) is one of the most important bovine diseases causing economic losses to dairy producers. Mammary gland inflammation is a consequence of the activity of a number of cell and soluble factors that function together to eliminate invading microorganisms. The factors involved in this inflammatory response differ depending on the infectious agent. This review analyzes the factors involved in the immunologic mechanisms against the main pathogenic bacteria causing mastitis, and emphasizes the innate immune response of the mammary gland. Knowledge, at the molecular level, of the mammary gland immune response during infection by pathogenic bacteria is fundamental to the design of effective therapies to control and eradicate bovine mastitis.

© 2006 The British Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Bovine mastitis is an important disease because of the economic losses to dairy producers. This disease is characterized by a mammary gland (MG) inflammatory response caused by metabolic and physiologic changes, trauma or, more frequently, contagious or environmental pathogenic microorganisms. In the inflammatory response, the MG

immune system is activated to eliminate the pathogen. This defense mechanism includes anatomical, cellular, and soluble factors that act in coordination and are crucial to the modulation of MG resistance and susceptibility to infection. During mastitis, it is common to observe an increased number of somatic cells (neutrophils) in milk. Neutrophil migration from the bloodstream to MG tissue occurs as a response to pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1 beta (IL-1 β). Several cytokines might also increase phagocytic (macrophages and neutrophils) bactericidal activity. Furthermore, some bacteria are able to modulate cytokine

* Corresponding author. Tel./fax: +52 443 295 8029.
E-mail address: baizabal@zeus.umich.mx (V.M. Baizabal-Aguirre).

production in the MG immune system cells, which modifies the host innate immune response. The interaction between pathogenic bacteria and epithelium, endothelium, and MG immune system cells is complex. For this reason, the study and complete characterization of the MG innate and acquired immune response to different etiological agents are necessary to understand in detail the pathophysiology of mastitis, and also to design efficient approaches to the diagnosis, treatment, and control of this disease.

The aim of this review is to integrate information about the MG innate immunity needed to eliminate bacterial pathogens. In the first part, we discuss the importance of mastitis as an inflammatory disease as well as the different MG cells and cytokines involved. The second part comprises several examples of the MG immune response against different bacteria. The last part analyses the immune response to *Staphylococcus aureus*, which is one of the main pathogens causing clinical and chronic mastitis.

Bovine mastitis

Bovine mastitis is a disease with high incidence worldwide, even in herds with mastitis control programs. It causes considerable economic losses due to decreases in the quality and quantity of milk production, increases in the cost of treatment and veterinary services, and animal waste.^{1,2} Mastitis is inflammation of the MG that develops as a response to pathogenic microorganisms entering through the teat canal and multiplying inside the gland.^{2,3} The risk of acquiring the disease may be increased by chemical, physical, or traumatic factors. For this reason, mastitis can be considered as a multifactor disease² that includes: 1) the bovine as host; 2) the microorganisms as causal agents; and 3) the environment, which affects both the cow and the causal microorganism.⁴

In a dairy herd, it is possible to find healthy cows, cows with one affected MG quarter, and cows with four quarters affected.⁵ This variability suggests that the incidence and prevalence of mastitis depends on differences in the bovine MG susceptibility to intramammary infection (IMI). Among factors that influence bovine IMI susceptibility are: parity, nutrition, stage of lactation, milk production, and breed.^{6–8} For example, cows with the highest productive capacity during partum and early lactation are the most sensitive to infection by environmental pathogens.^{9,10} It is possible that during the peripartum period, cows experience certain alterations in defense mechanisms associated with either changes in hormonal profile or metabolic and physiologic stresses.¹¹

There are many different contagious and environmental bacteria that cause mastitis.¹² Contagious pathogenic bacteria live and multiply in infected MG and can be spread from cow to cow or among MG quarters in the same animal. This group of bacteria includes *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and several mycoplasma and *Arcanobacterium* spp.^{2,8,13,14} Environmental pathogenic bacteria are present in the animal's environment and their presence in MG mainly occurs by teat contamination. This group includes *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Bacillus* spp.^{2,12}

These different bacteria might cause different clinical forms of mastitis, such as subacute clinical with minor

clinical signs, acute clinical characterized by inflammation, and subclinical, which is the asymptomatic form of the disease. Although subclinical mastitis causes an important decrease in milk production, at present there are no therapeutic control measures. Furthermore, this form of the disease can become chronic, which is characterized by an extended duration of MG infection. Interestingly, chronic mastitis may remain indefinitely in a subclinical phase, or alternate between clinical and subclinical forms. In general, mastitis caused by microorganisms is characterized by three stages: pathogen invasion, infection, and inflammation. In the invasion stage, microorganisms move through the teat canal. In the infection stage, bacteria establish inside the gland cistern, where they multiply and spread through all of the MG tissue, depending on the susceptibility of the animal. In the final stage, the inflammatory process gives rise to a considerable increase in somatic cell count (SCC, attributable mostly to neutrophils), and the corresponding clinical signs begin to be apparent.^{1,12} The study of mastitis is complex because several factors of the MG are involved in its pathophysiology.

Mammary gland immunology

In general, the immune system is characterized by its capacity to recognize and discriminate between foreign invading agents and molecules produced by the organism.¹⁵ The MG performs a variety of immunological functions conferring protection; even pre-partum, antibodies secreted in colostrum are produced to protect the newborn against infectious agents.¹⁶ The MG tissue is protected by two forms of immune defense mechanisms: innate immunity and acquired immunity. The innate and acquired immune systems interact closely in an attempt to provide protection against mastitis microorganisms.^{10,16,17} First, the innate immune response stimulates the acquired immune response and influences its nature. Second, the acquired immune response uses many innate immune effector mechanisms to eliminate microorganisms, and its action frequently increases innate immune response antimicrobial activity. The efficiency of these responses determines MG susceptibility or resistance to infection.

Innate immunity predominates in the early stage of infection and is mediated by macrophages, neutrophils, natural killer cells (NK) and cytokines. It recognizes and responds to different pathogens, even if they are invading the MG for the first time. In particular, bacteria have different cell wall structures that are recognized by specific plasma membrane receptors. These structures are lipopolysaccharide (LPS), peptidoglycan (PGN), and lipoteichoic acid (LTA), which constitute the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).^{3,18} These PAMPs are recognized by Toll-like receptors (TLRs), which are located on the cell and endosomal membranes.¹⁹ Interaction between the PAMPs and TLRs of immune cells induces production of cytokines and other endogenous mediators that are essential in protection against pathogenic microorganisms.²⁰ It is now known that TLR4 recognizes the LPS of Gram-negative bacteria (e.g. *E. coli*) and molecules such as fibrinogen, heat shock proteins, and polypeptides,^{21,22} whereas TLR2 is implicated in recognition of LTA and PGN from Gram-positive bacteria

(e.g. *S. aureus*).²¹ TLR9 has been characterized as an endosome-associated receptor able to recognize bacterial DNA and RNA during intracellular infection. TLR5 recognizes flagellin, while TLR3 detects double-stranded RNA.^{19,23} Apart from TLRs, recognition of *S. aureus* chemical structures can be mediated through formylated peptide receptors, mannose-binding lectins (MBL), ficolins, and complement molecules. PGN and LTA recognition by MBL and ficolins involves the production of the chemoattractant C5a and deposition of C3b on the surface of *S. aureus*, which facilitates its ingestion and death.^{19,24–26} Also, the interaction of *S. aureus* protein-A with TNF- α receptor 1 located in human lung epithelial cells induces an inflammatory response through nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and IL-8 production.²⁷

To gain a better understanding of the MG immune response, the following sections discuss the anatomical, cellular, and soluble factors involved in mastitis (see Fig. 1).²⁸

Anatomical factors

The teat canal is the first line of defense, because bacteria must penetrate through it to cause an IMI (Fig. 1A). The

function of the teat sphincter muscle is to keep the orifice closed and thereby isolate the interior of the MG. This means that any damage of this structure is related to an increase in the incidence of mastitis.²⁹ The teat canal is lined with keratin, which provides an additional physical barrier, preventing bacterial migration towards the MG cistern.^{28,30} Esterified and non-esterified fatty acids (myristic, palmitoleic, and linoleic) function as bacteriostatics and are associated with keratin. Moreover, certain cationic proteins associated with keratin can bind to pathogenic mastitis microorganisms, increasing their susceptibility to osmolarity changes.^{31,32} For this reason, the teat canal is considered to be an important barrier against IMI.

Cellular factors

When bacteria penetrate the teat sphincter and the teat canal, the second line of defense consists of neutrophils, macrophages, and lymphocytes. These cells regulate both innate and acquired immune responses.^{16,28,33} In MG defense against bacterial infection, tissue or milk macrophages recognize the invading pathogen and initiate the

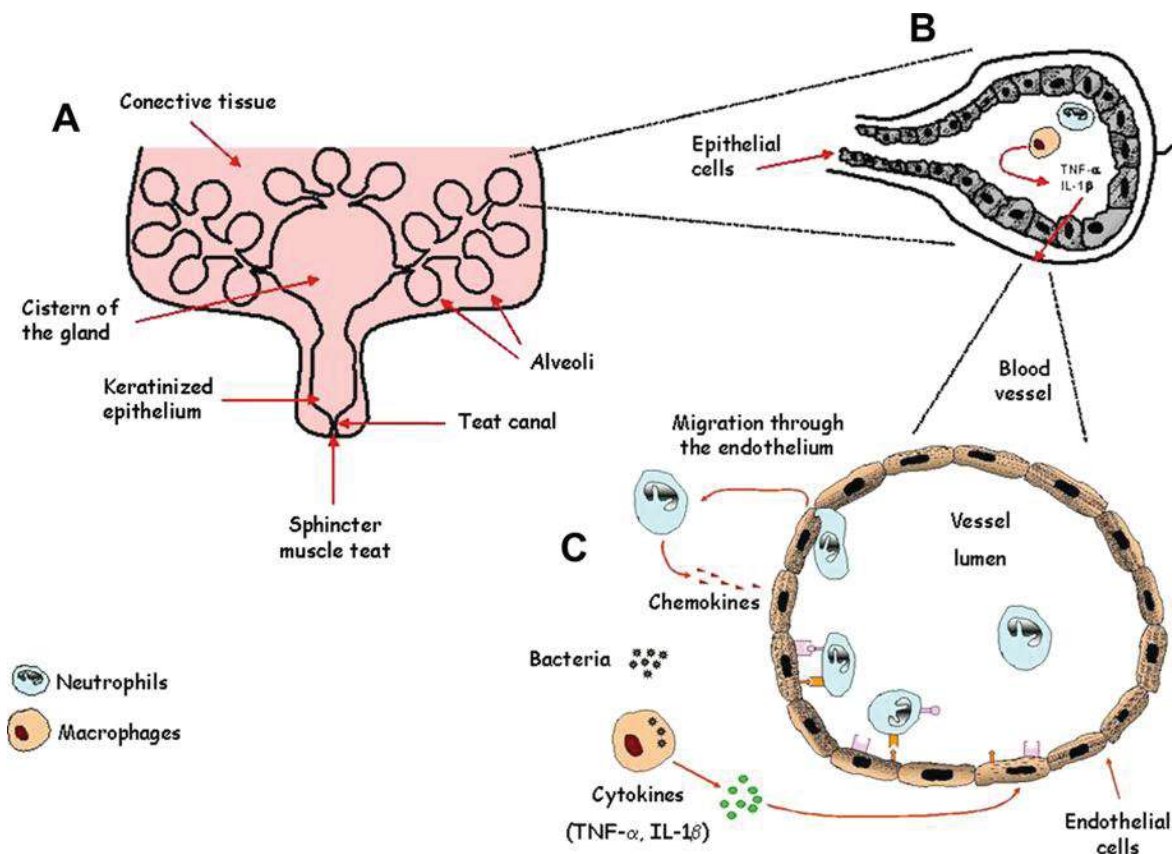


Figure 1 A. Schematic diagram of the bovine mammary gland showing the most important anatomic factors that act as defense barriers. The teat sphincter muscle represents the first line of defense, whereas the keratinized epithelium of the teat cistern is considered the second line. B. Cellular and soluble factors that participate in the innate immune response of the mammary gland. Macrophages located in the alveoli phagocytize bacteria that enter the mammary gland cistern. Activated macrophages release cytokines such as TNF- α and IL-1 β . C. Endothelial cells from blood vessels adjacent to alveoli express adhesion molecules in response to pro-inflammatory cytokines; this, in turn, facilitates neutrophil recruitment from the bloodstream to the site of infection in order to eliminate the invading bacteria.

inflammatory response. In this response, pro-inflammatory cytokines induce neutrophil recruitment to the MG (Figs. 1B,C).^{34,35} Healthy MG tissue and milk contain mainly macrophages, whereas infected tissue and secretions contain mainly neutrophils. When macrophages recognize bacteria, they release pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β , stimulating the bactericidal activity of neutrophils and also producing prostaglandins and leukotrienes, which increase the local inflammatory reaction.^{3,36,37} It is proposed that the MG epithelial cells play an important role in neutrophil recruitment to the infection site. Adhesion of bacteria to epithelial cells as well as the interaction of bacterial toxins with them induces the synthesis of TNF- α , IL-6, and the chemokine IL-8.³⁸

Pro-inflammatory cytokines and chemokines secreted by macrophages or epithelial cells activate in turn the expression of cellular adhesion molecules (E-selectin), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cellular adhesion molecule 1 by endothelial cells. This causes binding of blood neutrophils to the endothelium, their migration through the epithelial and subepithelial matrix, and their further localization at the infection site or in milk. For neutrophil recruitment, participation of chemoattractive molecules such as complement components (C5a and C3a), cytokines (IL-8, IL-12) and even LPS is required.^{34,39–41} The increase in SCC ($>2 \times 10^5$ cell/ml milk)² observed during mastitis has its origin in this trans-endothelial migration and accounts for the importance of endothelial cells in the pathophysiology of mastitis.

Neutrophils recruited to the site of infection phagocytize bacteria and produce reactive oxygen species, low molecular weight antibacterial peptides, and defensins, which eliminate a wide variety of pathogens that cause mastitis.^{28,42,43} During the period following parturition, the decrease in neutrophil activity is associated with a higher incidence of mastitis.⁴⁸ If the invading bacteria survive, neutrophil infiltration is replaced after a short period with T and B lymphocytes and monocytes; however, neutrophils remain as the most important type of cell found in chronic mastitis.³⁸ Lymphocytes can recognize a variety of antigenic structures through membrane receptors that define the specificity, diversity, and the immune system memory characteristics. T lymphocytes are classified in two main groups: T $\alpha\beta$ includes CD4⁺ (helpers), CD8⁺ (suppressors) and T $\gamma\delta$. In healthy MG, CD8⁺ lymphocytes are the prevailing type, whereas in mastitis CD4⁺ lymphocytes are predominantly activated by molecular complex recognition. This molecular complex is formed between the antigen and major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules or by antigen-presenting cells, B lymphocytes, and macrophages.^{44,45} CD8⁺ lymphocytes act by eliminating the host cell or by controlling the immune response during bacterial infection. Furthermore, these lymphocytes have been considered as 'scavengers' because they eliminate old or damaged cells and their secretions, leading to an increase in MG susceptibility to bacterial infection.^{28,46,47} Although T $\gamma\delta$ lymphocytes have not been well characterized, they are tightly associated with the epithelial surface, where they destroy damaged epithelial cells.⁴⁸ The main function of B lymphocytes is to produce antibodies against invading pathogens. In contrast to macrophages and neutrophils, B lymphocytes use their membrane receptors to

recognize specific pathogens and in the same way as dendritic cells and macrophages, they function as antigen-presenting cells, internalizing, processing and presenting the antigen to CD4⁺ lymphocytes. Finally, NK cells can destroy both Gram-positive and Gram-negative bacteria; for this reason, they are fundamental to the prevention of MG infections.²⁸

Soluble factors

The activity of immune system cells in the pathophysiology of bovine mastitis is regulated by pro-inflammatory cytokines that increase macrophage and neutrophil bactericidal capacity, promote the recruitment of neutrophils towards the site of infection (Fig. 1C), induce the maturation of dendritic cells, and control the acquired immune response.^{49–51} At present, a variety of cytokines, such as interleukins (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), colony-stimulating factors (CSF), interferon gamma (IFN- γ), and TNF- α have been found in healthy and infected MG (Table 1).^{28,52}

TNF- α is produced by macrophages, neutrophils, and epithelial cells. This cytokine participates in neutrophil chemotactic activity, because it induces the expression of adhesion molecules by endothelial cells. TNF- α is the main cytokine produced during the early stage of infection and is responsible for endotoxic shock in acute mastitis caused by *E. coli*.^{53–55}

IFN- γ is produced by CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes and NK cells as a response to mitogenic and antigenic stimuli. It activates the acquired immune response, T lymphocytes and IL-12 production. This cytokine also increases the phagocytic capacity of neutrophils recruited to the MG. Moreover, it is important in viral infections.^{56,57}

IL-1 β is produced by monocytes/macrophages and epithelial cells. During the inflammatory response, IL-1 β regulates the expression of adhesins by endothelial cells and neutrophil chemotaxis in infections caused by *E. coli*. The role of IL-1 β in infections caused by *S. aureus* is important only in the early stages.^{34,58}

IL-2 is produced by CD4⁺ lymphocytes and was initially described as T cell growth factor. This cytokine regulates the acquired immune response, because it stimulates growth and differentiation of B lymphocytes, increases thymocyte proliferation, activates NK cells, and induces T lymphocyte activation. Alterations in IL-2 production cause a decrease in the MG immune response capacity, which contributes to bacterial diseases such as mastitis.^{28,50}

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine produced by macrophages; it is involved in acute septic shock during mastitis caused by coliforms or *S. aureus*. This cytokine facilitates the exchange of neutrophils for monocytes in the MG, which is necessary for reduction of the deleterious effects of neutrophils. Also, IL-6 is one of the main regulatory cytokines of acute phase protein synthesis in hepatocytes.^{54,59}

IL-8 is a chemokine produced by monocytes, T lymphocytes, and macrophages, as well as epithelial and endothelial cells. It is actively produced in mastitis caused by *E. coli*, whereas in mastitis caused by *S. aureus* it is present in low concentrations.^{52,55}

IL-12 is a mediator between innate and acquired immunity; it regulates differentiation of T lymphocytes.⁵¹

Table 1 Cytokines associated to the immune response of bovine mammary gland infected with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus*

Cytokine	Source	Function	Type of mastitis and pathogen bacterium
IL-1 β	Macrophages and epithelial cells	Neutrophil recruitment to the mammary gland	Clinical by <i>E. coli</i> Subclinical by <i>S. aureus</i>
IL-2	CD4 ⁺ lymphocytes	Induce growing and differentiation of B lymphocytes Activates NK cells Activates CD8 ⁺ lymphocytes	ND
IL-6	Macrophages	Regulates acute phase protein synthesis Favors the influx of monocytes to the mammary gland	Clinical by <i>E. coli</i>
IL-8	Monocytes, T lymphocytes, macrophages, epithelial and endothelial cells	Chemokine important in neutrophil recruitment to the mammary gland	Clinical by <i>E. coli</i> Subclinical by <i>S. aureus</i>
IL-12	Dendritic cells and T lymphocytes	Regulates differentiation of T lymphocytes	ND
IFN- γ	CD4 ⁺ and CD8 ⁺ lymphocytes, and NK cells	Activates T lymphocytes Induces production of IL-12 Mediates activation of neutrophils	ND
TNF- α	Macrophages, neutrophils, and epithelial cells	Induces expression of adhesion molecules in endothelial cells	Clinical by <i>E. coli</i>

Interleukin (IL; IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12); Interferon gamma (IFN- γ); Tumor necrosis factor alpha (TNF- α). ND, not determined.

The innate immune response is crucial to the control of microorganism proliferation and to the eradication of pathogens that invade the MG; it is tightly interrelated with the acquired immune response, which is fundamental to establishing a characteristic memory component. MG also contains non-specific bacteriostatic factors that may act independently or in association with immunoglobulin (Ig). One of these factors is the protein lactoferrin, which is produced by epithelial cells, macrophages, and neutrophils; it binds free iron ions present in milk, making them unavailable to bacteria that need this metal as a growth factor or an iron source (e.g. *E. coli*, *K. pneumoniae*). However, there are other bacteria that use lactoferrin as an iron source (e.g. *S. agalactiae*).²⁸ The main function of lactoferrin is to protect the MG against infection by coliforms, especially in the involution stage, due to the activation of phagocytosis and the complement system.^{28,60,61}

The bovine complement system is present in serum and milk, and has an important part in the defense mechanisms of the MG against mastitis. Complement proteins are predominantly produced by hepatocytes, though they are also produced by some monocytes and macrophages in different tissues. Complement molecules are not only needed to recruit neutrophils to the MG, but also to opsonize and kill bacteria. Gram-negative bacteria (e.g. *E. coli*) are sensitive to complement lytic action, while Gram-positive bacteria (e.g. *S. aureus*) are resistant; however, all bacteria are susceptible to the opsonizing action of C3b and C3bi. The bactericidal and hemolytic activities of complement are increased in inflamed MG quarters, and

the intensity of these activities is related to the inflammatory response. It is known that hemolytic activity and C3 concentration in milk are higher in MG with mastitis than in healthy MG.^{35,62–64}

Mammary gland immune response to pathogenic bacteria

The clinical manifestations of mastitis are probably due to the immune response induced by different microorganisms that infect the MG. One of the most important environmental bacteria that causes bovine mastitis is *E. coli*. Mastitis caused by *E. coli* can be resolved in a few days and it is characterized by pain, inflammation of one or all MG quarters, fever, and milk with clots and an abnormal appearance. Apparently, the severity of mastitis depends on the bacterial strain that infects the MG, and the speed with which neutrophils move from the bloodstream to the MG depends on the severity of mastitis. Neutrophil recruitment to an MG infected with *E. coli* occurs with a delay of 16 h post-infection (hpi).⁶⁵ Nevertheless, in recent studies faster neutrophil recruitment was observed that led to a significant increase in SCC (Table 2) in the first 6 hpi, with a peak at 12 hpi⁶⁶ and a decrease in bloodstream neutrophils.⁶⁷ Some authors have observed a faster increase in SCC in cows with moderate mastitis, compared with values found in cows with acute mastitis (maximum values at 6 hpi vs 18–24 hpi, respectively).⁶⁸ Furthermore, neutrophil

Table 2 Immune response of bovine mammary gland to different bacteria

Bacterium	Type of mastitis	Innate immune response
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clinic or Subclinic/chronic	Increase in SCC Transit increase in TNF- α , IL-1 β , and C5a concentration Increase in IL-12 concentration Increase in CD8 ⁺ lymphocytes recruitment Increase in IgG ₂ concentration
<i>Escherichia coli</i>	Clinic	Increase in SCC Increase in TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN- γ , and C5a concentration Increase in LBP, BSA, and sCD14 concentration
<i>Streptococcus uberis</i>	Clinic	Increase in SCC Increase in TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN- γ , pmCD14, and LBP concentration
<i>Serratia marcescens</i>	Clinic	Low concentrations of IL-12, IFN- γ , pmCD14, and LBP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinic	Increase in SCC Increase in TNF- α , IL-1 β , and IL-12 concentration Increase in IL-8, C5a, LBP, and pmCD14 concentration
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinic	Increase in TNF- α , IL-8, IL-12, IL-10, C5a, and LBP concentration

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α); interleukin (IL; IL-1 β , IL-12, IL-8); interferon gamma (IFN- γ); lipopolysaccharide binding protein (LBP); bovine serum albumin (BSA); complement 5a (C5a); plasma membrane receptor (pmCD14); soluble receptor that recognizes the molecular complex LPS-LBP (sCD14); immunoglobulin G₂ (IgG₂); somatic cell count (SCC).

recruitment in acute mastitis lasts longer than in moderate mastitis. Taken together, these results show that neutrophils are important to the control of mastitis.

Neutrophil recruitment from the bloodstream to the infected MG is stimulated by the action of pro-inflammatory cytokines. MG infection by *E. coli* induces an increase in the concentration of TNF- α , IL-1 β , IL-8, and C5a. TNF- α concentration reaches its maximum between 14 and 18 hpi, while IL-8 and C5a reach their peak concentrations between 10 and 16 hpi, remaining high during the next 48 h. Although IL-1 β concentration is variable, it usually increases after TNF- α has reached its maximum. Comparing the levels of these cytokines before infection, the concentrations of TNF- α and IL-1 β are different at 40 hpi and the increases of both cytokines coincide with neutrophil recruitment.^{3,69} IL-12 and IFN- γ activities have also been determined in mastitis caused by *E. coli*. Higher levels of IL-12 have been observed at 24 hpi, whereas IFN- γ shows a marked increase at 120 hpi, followed by a decrease to basal levels.^{3,70}

In acute mastitis caused by coliforms, recognition of LPS is fundamental to the MG immune response. LPS and other cell wall structural components are recognized by plasma membrane CD14 receptors (pmCD14) present in macrophages and neutrophils.⁷¹ Recent research aiming to determine how pmCD14 interacts with LPS and to evaluate its effect on the MG response showed that TNF- α and IL-8 concentrations in milk were lower in MG infected with *E. coli* and treated with recombinant bovine pmCD14 (rbopmCD14) than in MG treated with saline solution. Furthermore, simultaneous administration of rbopmCD14 and *E. coli* favored elimination of the bacterium, which suggests a potential role for pmCD14 as an MG immune response mediator in

E. coli infection.⁷² The interaction of LPS with pmCD14 is facilitated by lipopolysaccharide-binding protein (LBP). Epithelial and endothelial cells, without pmCD14, can recognize the molecular complex formed between LPS and LBP when soluble CD14 (sCD14) produced by macrophages and neutrophils is bound to it. Intramammary infusion of LPS causes an increase in LBP and sCD14 milk concentrations. Furthermore, increases in bovine serum albumin (BSA) and IL-8 lead to changes in vascular permeability at the beginning of the MG inflammatory response.⁷³

The MG immune response has also been studied in cases of mastitis caused by other environmental bacteria such as *S. uberis*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* (Table 2). *S. uberis* is a Gram-positive bacterium whose capacity to induce the bovine MG inflammatory response is not well known, except for an increase in SCC at 18–120 hpi, as well as an increase in TNF- α , IL-1 β , and IL-8 concentrations in milk at 66 hpi.⁷⁴ In the case of TNF- α and IL-8, the maximum concentrations observed were at 120 hpi and, even though the IL-1 β concentration fluctuated from 66 to 144 hpi, it was maintained at high levels, reaching its maximal concentration at 90 hpi. An increase in IFN- γ concentration at 18 h (maximum observed at 168 hpi) after *S. uberis* IMI preceded an increase in IL-12 concentration.⁷⁵ This finding is logical because IFN- γ induces production of IL-12. Also, levels of sCD14 were similar to the levels of LBP and remained high, with a maximum at 72 hpi.⁷⁵ When the MG response to *S. uberis* infection was compared with the response induced by *S. marcescens*, it was found that mastitis caused by the latter induced lower concentrations of IL-12, IFN- γ , sCD14, and LBP, which resulted in a less intense inflammatory response.

An important Gram-negative bacterium, considered an environmental pathogen causing bovine MG, is *K. pneumoniae*. Infection with this bacterium is often severe, causing a significant decrease in milk production and an increase in SCC in the first 16 hpi that continues up to 96 hpi. This increase can be related to an increase in the concentrations of IL-8 and C5a detected during the first 16 hpi. The initial increase in TNF- α in milk was evident at 12 hpi, together with a rise in the concentrations of LBP and sCD14. The increase in IL-1 β was significant at 20 hpi, while IL-12 was found in high amounts at 16 hpi, reaching its maximal concentration at 32 hpi.⁷⁶ Another Gram-negative bacterium, *P. aeruginosa*, can cause clinical mastitis and an innate immune response characterized by LBP activation and production of TNF- α , IL-8, IL-12, IL-10, and C5a, which cause a considerable increase in the SCC.⁷⁷

Mammary gland immune response to *Staphylococcus aureus* infection

One of the most contagious pathogenic bacteria causing bovine mastitis is *S. aureus*.¹³ This bacterium is difficult to control and can quickly invade all types of cells in the MG. Mastitis caused by *S. aureus* tends to become subclinical and chronic, and has a low response to conventional antibiotic therapy due to its intracellular localization in MG epithelial cells.^{2,78,79} This persistent infection has been related to an absence of the immune response in which various host and bacterial factors are involved.^{80,81}

S. aureus contains a variety of surface proteins that promote adherence to damaged tissues, binding proteins that help to avoid the immune response and promote iron uptake, and enzymes such as coagulase and collagenase. This bacterium produces toxins that damage host cell membranes, and molecules that act as superantigens.^{2,81,82} Structural components are also important in the pathophysiology of diseases caused by *S. aureus*. The best characterized structures are located in the cell wall and include PGN, intracellular adhesion polysaccharide, protein A, and LTA.^{2,83}

In the pathogenesis of diseases caused by *S. aureus*, three steps are fundamental: adhesion, survival, and division of the bacterium.^{84,85} Adhesion of *S. aureus* to host cell membranes is mediated by a group of adhesins known as 'microbial surface components that recognize adhesive matrix molecules'. This bacterium produces an important number of proteins that bind to: fibronectin (FnBP), fibrinogen, collagen, vitronectin, and elastin. Furthermore, *S. aureus* produces four extracellular proteins with fibrinogen-binding capacity: coagulase, extracellular fibrinogen protein (Efb), extracellular adherence protein (Eap), which binds to either fibrinogen or prothrombin, and extracellular matrix-binding protein.^{86–91} Lack of FnBP causes a delay in the internalization of the bacterium in mouse MG epithelial cells compared with the wild-type strain.⁹² Efb facilitates persistent infection caused by this bacterium, because it inhibits complement activation by blocking C3 deposition on the surface of *S. aureus*.⁹³ Eap binds to ICAM-1 located at the surface of endothelial cells and blocks neutrophil binding to these cells.⁹⁴

The ability of *S. aureus* to escape from the immune response and survive inside different cells is fundamental

for this bacterium to persist for longer periods. *S. aureus* secretes a number of proteins that inhibit or delay the effects of the innate immune system.²⁵ For example, staphylokinase (SAK) binds to α -defensins and inhibits their bactericidal activity.⁹⁵ Also, SAK transforms plasminogen to plasmin, which binds to IgG and C3b, leading to an anti-opsonic function.⁹⁶ *S. aureus* produces other proteins, such as aureolysin, V8 proteinase (integral membrane protein that possibly acts as an anti-defensin), and enterotoxins (ETs) that function as superantigens (stimulate T lymphocytes and macrophages).²⁵ These superantigens bind to MHCII molecules and stimulate production of inflammatory mediators.^{97,98} ETC is the most commonly secreted toxin of *S. aureus* strains causing bovine mastitis.^{99,100} Interestingly, the severity of acute mastitis has been related to an increase in ETC production.⁹⁸

MG infection with *S. aureus* is characterized by neutrophil recruitment, lymphocyte activation, and cytokine production (Table 2). Therefore, to evaluate the MG immune response induced by *S. aureus*, different inflammatory markers such as BSA, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IFN- γ and C5a have been used.^{3,69,101} In clinical mastitis, for example, an important increase in milk BSA (used to determine changes in vascular permeability) was observed at 24 hpi.³ In contrast, in subclinical mastitis a significant increase in the level of BSA has not been detected after infection of the MG with *S. aureus*.⁶⁹ These opposing results demonstrate that the type of mastitis depends, in part, on the MG immune response to *S. aureus* infection.

During the chronic phase of mastitis caused by *S. aureus*, there is an increase in the SCC (neutrophils) from 3–22% (not infected MG) to 55–96% (infected MG).⁸⁰ This increase originates in the acute phase of the infection (24 hpi), and coincides with the increase in vascular permeability.³ The rise in neutrophil numbers during subclinical chronic mastitis caused by *S. aureus* coincides with an increase in IgG₂ concentration that promotes more effective phagocytosis of bacteria.¹⁰² Neutrophil recruitment to the infected MG is promoted by IL-8; however, in subclinical infection of the MG by *S. aureus*, IL-8 was not detected in milk and the C5a factor showed only a transient increase at 32 hpi.^{3,69} These findings suggest that neutrophil recruitment to the MG does not depend on the activity of chemotactic molecules.

The exchange of lymphocyte subpopulations during acute and chronic phases is not completely understood in mastitis caused by *S. aureus*. CD4⁺ lymphocytes are found in higher numbers in uninfected MG (45.3 \pm 4% of CD4⁺ vs 37.7 \pm 3.8% of CD8⁺). However, during MG infection caused by *S. aureus* there is an increase in both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. When the infection is established, recruitment of CD8⁺ lymphocytes predominates, which suggests that these lymphocytes have an important function in chronic mastitis caused by *S. aureus*.^{80,103,104}

Pro-inflammatory cytokines play an important role in the MG immune response against *S. aureus* infection. TNF- α and IL-1 β are the most important cytokines produced in inflammatory reactions such as mastitis caused by *S. aureus*. mRNA transcripts for these cytokines have been detected in milk from cows with mastitis; however, the corresponding peptides have not been reported.^{69,80} A significant increase in transcription of TNF- α was found in clinical

mastitis caused by *S. aureus* at 24 hpi, with a strong decrease 8 h later.¹⁰¹ The decrease in the TNF- α transcript concentration coincided with an increase in IL-1 β production; this cytokine was high for 8 h and then decreased to undetectable levels.³ These results suggest that both cytokines play an important role in the early stages of mastitis, and might explain the inefficiency of the MG immune response in eliminating *S. aureus* for longer periods; this probably favors the chronic form of the disease.

In acute mastitis caused by *S. aureus*, an increase in IL-12 production is detectable at 32 hpi. During this period, the IFN- γ concentration increases significantly, remaining at high levels for a long period of time (>168 hpi); this finding suggests that IFN- γ influences the production of IL-12.³ Interestingly, IFN- γ has also been associated with low levels of IL-10.³

***In vitro* evaluation of the interaction of *Staphylococcus aureus* with different cells**

To study the interaction between *S. aureus* and different cells, *in vitro* systems have been used. In these systems, *S. aureus* can internalize in bovine MG epithelial cells^{84,105,106} and bovine aorta endothelial cells.^{107,108} Recently, it was demonstrated that bovine MG epithelial cells, stimulated with LPS but not with LTA for 24 h, produce IL-1 β , IL-8, TNF- α , and β -defensins. However, when stimulation was performed with LPS or LTA for only 2–4 h, a rapid increase in the relative abundance of the mRNAs was observed.¹⁰⁹ These results support the hypothesis proposed to explain why IMI caused by Gram-positive bacteria (*S. aureus*) becomes chronic.

Studies of human umbilical vein endothelial cells demonstrate that they can secrete IL-1 β , IL-6, and IL-8 after *in vitro* infection with *S. aureus*.^{41,110} In the innate immune response, endothelial cells not only respond to many cytokines but also produce some of them. In the authors' laboratory, data have been obtained indicating that endocytosis of *S. aureus* by bovine endothelial cells is modulated by TNF- α and IL-1 β (Oviedo-Boyso and Baizabal-Aguirre, unpublished results). It is likely that activation of NF- κ B by these cytokines induces the expression of genes that participate in the adhesion and endocytosis of *S. aureus* by bovine endothelial cells. This supposition is based on results in which translocation of NF- κ B to the nucleus was detected in neutrophils recovered from the milk of cows suffering mastitis.³⁶ Due to the important role that NF- κ B plays in the expression of cytokines, chemokines, and adhesion molecules, it is possible that this transcription factor also participates in the pathophysiology of mastitis caused by *S. aureus* and other bacteria.

Final considerations

Knowledge of the innate and acquired MG immune response has significantly advanced in recent years. Nevertheless, bovine mastitis still has a high prevalence and limited response to antibiotic therapy. This lack of response to antibiotics has stimulated the search for alternative treatments and control strategies. One such

therapeutic approach is to enhance the response of the MG immune system through the administration of cytokines.¹⁶ For example, intramammary infusion of IL-2 resulted in a cure rate of approximately 60% of MG infections with *S. aureus* at the end of the lactating period; however, during the dry period the incidence of IMI was affected by treatment with this cytokine.¹¹¹ In another study, it was demonstrated that intramammary infusion with recombinant bovine granulocyte macrophage colony-stimulating factor (rboGM-CSF) significantly reduced *S. aureus* colony-forming units (CFU) in the initial stage of subclinical mastitis.¹¹² However, 7 days after rboGM-CSF infusion, *S. aureus* CFU returned to the levels observed before infusion. Similar behavior was observed when subclinical mastitis caused by *S. aureus* was treated by injecting recombinant bovine IL-8 into the MG. Infusion of this cytokine in the early infection stage greatly reduced the level of *S. aureus* CFU recovered from milk.¹¹³ Although these results show a potential use of cytokines as therapeutic agents in the treatment of bovine mastitis, their effects on different cells of the MG have not been evaluated in detail. Deep understanding, at the cellular and molecular levels, of the mechanisms activated by cytokines could be a strategy not only for elucidating the pathophysiology of mastitis, but developing an effective control therapy.

The MG immune response is complex because mastitis is a disease caused by a wide number of infectious agents, each one with particular and different pathogenic mechanisms. The challenge in the coming years is to obtain a complete picture of the factors affecting the interaction between the different ethiological agents and the cells of the MG. Also, detailed study of how cytokines modulate this interaction will be a valuable tool in designing biotechnological approaches to the prevention of this disease.

Acknowledgments

To Coordinación de la Investigación Científica of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo for financial support through project 14.4 granted to Victor M. Baizabal-Aguirre. To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México for the PhD scholarship to Javier Oviedo-Boyso.

References

1. Crist WL, Harmon RJ, O'Leary J, McAllister AJ. *Mastitis and its control*. University of Kentucky Cooperative Extension Service; 1997.
2. Dego OK, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Quart* 2002;24:181–98.
3. Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:463–72.
4. Schroeder JW. Bovine mastitis and milking management, *Mastitis control programs*. National Mastitis Council; April 1997.

5. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJM, Galligan DT, Beiboer ML, Brand A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. *J Dairy Sci* 1997;**80**:1592–9.
6. Smith KL, Hogan JS, Weiss WP. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *J Anim Sci* 1997;**75**:1659–65.
7. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJM, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. Management practices associated with the incidence rate. *J Dairy Sci* 1999;**82**:1643–54.
8. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT, et al. Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* 2001;**84**:2649–63.
9. Wagter LC, Mallard BA, Wilkie BN, Leslie KE, Boettcher PJ, Dekkers JCM. A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence. *J Dairy Sci* 2000;**83**:488–98.
10. Durvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;**34**:521–64.
11. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci* 1998;**81**:585–95.
12. Hogan JS, Smith KL. A practical look at environmental mastitis. *Current concepts of bovine mastitis*. National Mastitis Council; August 1998.
13. Tollersrud T, Kenny K, Reitz Jr AJ, Lee JC. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:2998–3003.
14. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 2002;**164**:116–28.
15. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:197–216.
16. Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997;**80**:1851–65.
17. Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Coksaygan T, Lein DH. Identification of subpopulation of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. *Can J Vet Res* 2002;**66**:165–72.
18. Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm Moon H. Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2003;**71**:5541–8.
19. Rosenberger CM, Finlay BB. Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:385–96.
20. Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ, Mitolo V, Jirillo E, Wagner H, et al. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun* 2003;**71**:6058–62.
21. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000;**165**:5392–6.
22. Beutler B. Interferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004;**430**:257–63.
23. Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2004;**25**:381–6.
24. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;**40**:38105–8.
25. Rooijackers SHM, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 2005;**13**:596–601. doi:10.1016/j.tim.2005.10.002.
26. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 2005;**3**:521–40.
27. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 2004;**8**:842–8.
28. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;**7**:135–46.
29. Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. *J Dairy Sci* 1994;**77**:446–52.
30. Capuco AV, Mein GA, Nickerson SC, Jack LJW, Wood DL, Bright SA, et al. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J Dairy Sci* 1994;**77**:64–74.
31. Miller RH, Bitman J, Bright SA, Wood DL, Capuco AV. Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin. *J Dairy Sci* 1992;**75**:1436–42.
32. Paulrud CO. Basic concepts of the bovine teat canal. *Vet Res Commun* 2005;**29**:215–45.
33. Soltys J, Quinn MT. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect Immun* 1999;**67**:6293–302.
34. Zhang H, Issekutz AC. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 2002;**160**:2219–30.
35. Rainard P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res* 2003;**34**:647–70.
36. Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J, Lekeux P. Increased nuclear factor κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci* 2003;**86**:1259–67.
37. Stein BN, Gamble JR, Pitson SM, Vadas MA, Khew-Goodall Y. Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil transmigration: potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation. *J Immunol* 2003;**171**:6097–104.
38. Rainard P, Riollot C. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod Nutr Dev* 2003;**43**:436–57.
39. Nishimura T. Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. *Vet Res* 2003;**34**:3–10.
40. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Cellular and molecular immunology*. WB Saunders; 2003. p. 243–74.
41. Strindhall J, Lingren PE, Löfgren S, Kihlström E. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* vary in ability to stimulate cytokine expression in human. *Scand J Immunol* 2005;**67**:57–62.
42. Mehrzad J, Duchateau L, Pyörälä S, Burvenich C. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactating period. *J Dairy Sci* 2002;**85**:3268–76.
43. Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003;**34**:597–627.
44. Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, et al. Characterization of lymphocytes subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci* 2004;**5**:29–39.
45. Ohtsuka H, Koiwa M, Fukuda S, Satoh Y, Hayashi T, Hoshi F, et al. Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving. *J Vet Med Sci* 2004;**66**:905–9.

46. Dosogne H, Vangroenweghe F, Burvenich C. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe coliform mastitis. *Vet Res* 2002;**33**:1–12.
47. Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, et al. Distinct effects of STAT5 on CD4⁺ and CD8⁺ T cell homeostasis: development of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells versus CD8⁺ memory T cells. *J Immunol* 2003;**171**:5853–64.
48. Yamaguchi T, Hiratsuka M, Asai K, Kai K, Kumagai K. Differential distribution of T lymphocytes subpopulations in the bovine mammary gland during lactating period. *J Dairy Sci* 1999;**82**:1459–64.
49. Alluwaimi AM, Cullor JS. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during middle and late stages of lactating period. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002;**49**:105–10.
50. Sordillo LM, Snider M, Hughes H, Afseth G, Campos M, Babiuk LA. Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2. *J Dairy Sci* 1991;**74**:4164–74.
51. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptative immune responses. *Nat Immunol* 2002;**3**:1033–40.
52. Alluwaimi AM. The cytokine of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res Vet Sci* 2004;**77**:211–22. doi:10.1016/j.rvsc.2004.04.006.
53. Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol* 1989;**143**:2894–9.
54. Slebodzinski AB, Malinowski E, Lipczak W. Concentrations of triiodothyronine (T₃), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows. *Res Vet Sci* 2002;**72**:17–21.
55. Persson Waller K, Colditz IG, Lun S, Östensson K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2003;**74**:31–6.
56. Strichman R, Samuel CE. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* 2001;**4**:251–9.
57. Nonnecke BJ, Kimura K, Goff JP, Kehrl Jr ME. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *J Dairy Sci* 2003;**86**:2359–68.
58. Yamanaka H, Hisaeda K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H. ELISA for bovine interleukin-1 receptor antagonist and its application to mastitic sera and whey. *J Vet Med Sci* 2000;**62**:661–4.
59. Ohtsuka H, Kudo K, Mori K, Nagai F, Hatsugaya A, Tajima M, et al. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci* 2001;**63**:675–8.
60. Lee NY, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *J Vet Med Sci* 2004;**66**:1267–9.
61. Kai K, Komine Y, Komine K, Asai K, Kuroishi T, Kozutsumi T, et al. Effects of bovine lactoferrin by the intramammary infusion in cows with staphylococcal mastitis during the early non-lactating period. *J Vet Med Sci* 2002;**64**:873–8.
62. Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr Supply* 2000;**84**:S75–80.
63. Rainard P, Poutrel B. Generation of complement fragment C5a in milk is variable among cows. *J Dairy Sci* 2000;**83**:945–51.
64. Barrio MB, Rainard P, Poutrel B. Milk complement and the opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates by bovine neutrophils. *Microb Pathog* 2003;**34**:1–9.
65. Shuster DE, Kehrl Jr ME, Rainard P, Paape M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997;**65**:3286–92.
66. Vangroenweghe F, Duchateau L, Burvenich C. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *J Dairy Sci* 2004;**87**:886–95.
67. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. *J Dairy Sci* 2004;**87**:4150–62.
68. Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res* 2005;**36**:101–16.
69. Riollot C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;**7**:161–7.
70. Hisaeda K, Hagiwara K, Eguchi J, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α levels in sera and whey of cattle with naturally occurring mastitis. *J Vet Med Sci* 2001;**63**:1009–11.
71. Lee JW, Paape MJ, Elsasser TH, Zhao X. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 2003;**86**:2382–9.
72. Lee JW, Paape MJ, Elsasser TH, Zhao X. Recombinant soluble CD14 reduce severity of intramammary infection by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2003;**71**:4034–9.
73. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Sohn EJ. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci* 2003;**86**:3128–37.
74. Rambeaud M, Almeida RA, Pghetti GM, Oliver SP. Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;**96**:193–205. doi:10.1016/j.vetimm.2003.08.008.
75. Bannerman DD, Paape MJ, Goff JP, Kimura K, Lippolis JD, Hope JC. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet Res* 2004;**35**:681–700.
76. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Hope JC. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Dairy Sci* 2004;**87**:2420–32.
77. Bannerman DD, Chockalingam A, Paape MJ, Hope JC. The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;**107**:201–15. doi:10.1016/j.vetimm.2005.04.012.
78. Erskine RJ, Walker RD, Bolin CA, Bartlett PC, White DG. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J Dairy Sci* 2002;**85**:1111–8.
79. Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, Perl S, Saran A. Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003;**50**:45–52.
80. Riollot C, Rainard P, Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci* 2001;**84**:1077–84.
81. Zecconi A, Binda E, Borromeo V, Piccinini R. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates somatic cell counts. *J Dairy Res* 2005;**72**:203–8.
82. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* superbug. *J Clin Invest* 2004;**12**:1693–6.
83. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;**43**:1367–78.
84. Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1996;**79**:1021–6.
85. Hensen SM, Pavicic MJAMP, Lohuis JACM, Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strain. *J Dairy Sci* 2000;**83**:418–29.
86. Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin binding protein and cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 1999;**67**:4673–8.

87. Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, Berendt AR. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting endothelial cells. *Microbiology* 1999;145:3477–86.
88. Massey RC, Kantzanou MN, Fowler T, Day NPJ, Schofield K, Wann ER, et al. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol* 2001;3:839–51.
89. Alexander EH, Hudson MC. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:361–6.
90. Haggar A, Hussain M, Lönnies H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 2003;5:2310–7.
91. Harraghy N, Hussain M, Haggar A, et al. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 2003;149:2701–7.
92. Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog* 2003;35:159–68.
93. Lee LYL, Höök M, Haviland D, Wetsel RA, Yonter EO, Syribeys P, et al. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J Infect Dis* 2004;190:571–9.
94. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 2002;7:687–93.
95. Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchel J, Higgins J, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* 2004;172:1169–76.
96. Rooijackers HMS, van Wamel WJB, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microb Infect* 2005;7:476–84.
97. Ferens WA, Davis WC, Hamilton MY, Park YH, Deobald CF, Fox L, et al. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect Immun* 1998;66:573–80.
98. Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, et al. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine glands secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J Vet Med Sci* 2003;65:899–906.
99. Ebling TL, Fox LK, Bayles KW, Bohach GA, Byrne KM, Davis WC, et al. Bovine mammary immune response to an experimental intramammary infection with a *Staphylococcus aureus* strain containing a gene from staphylococcal enterotoxin C1. *J Dairy Sci* 2001;84:2044–50.
100. Orwin PM, Fitzgerald JR, Leung DYM, Gutiérrez JA, Bohach GA, Schlievert PM. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. *Infect Immun* 2003;71:2916–9.
101. Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003;50:105–11.
102. Leitner G, Yadlin B, Glickman A, Chaffer M, Saran A. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Res Vet Sci* 2000;69:181–4.
103. Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Lein DH. Blood and milk cellular immune responses of mastitic non-periparturient cows inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res* 2002;66:125–31.
104. Grönlund U, Johannisson A, Persson Waller K. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2006;80:147–54.
105. Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* 1998;66:336–42.
106. Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-Meza JE, Valdez-Alarcón JJ, et al. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* 2006. doi:10.1016/j.rvsc.2006.02.002.
107. Hamill RJ, Vann JM, Proctor RA. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* 1986;54:833–6.
108. Vann JM, Proctor RA. Ingestion of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells results in time and inoculum-dependent damage to endothelial cell monolayers. *Infect Immun* 1987;55:2155–63.
109. Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in ovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 2005;31:72–86. doi:10.1016/j.cyto.2005.02.010.
110. Yao L, Benguadil V, Lowy FD, Gibbons JJ, Hatcher VB, Berman JW. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun* 1995;63:1835–9.
111. Erskine RJ, Bartlett PC, Tavernier SR, Fowler LH, Walker RD, Seguin JH, et al. Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation. *J Dairy Sci* 1998;81:107–15.
112. Takahashi H, Odai M, Mitani K, Inumaru S, Arai S, Horino R, et al. Effect of intramammary injection of rboGM-CSF on milk levels of chemiluminescence activity, somatic cell count, and *Staphylococcus aureus* count in Holstein cows with *S. aureus* subclinical mastitis. *Can J Vet Res* 2004;68:182–7.
113. Takahashi H, Komatsu T, Hodate K, Horino R, Yokomiso Y. Effect of intramammary injection of rboIL-8 on milk levels of somatic cell count, chemiluminescence activity and shedding patterns of total bacteria and *S. aureus* in Holstein cows with naturally infected-subclinical mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005;52:32–7.

11.2 ANEXO 2

INTERFERENCIA MOLECULAR EN LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE NF- κ B POR BACTERIAS PATÓGENAS*

JAVIER OVIEDO BOYSO, ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA,
JOEL E. LÓPEZ MEZA, JUAN J. VALDEZ ALARCÓN
Y VÍCTOR M. BAIZABAL AGUIRRE[†]

RESUMEN

La interacción entre bacterias patógenas y las células de mamífero (huésped) puede resultar en una infección, seguida de la inflamación del tejido y el establecimiento de una enfermedad. NF- κ B es un factor de transcripción pleiotrópico que desempeña una función central en la respuesta inmune innata y en la adquirida induciendo la expresión de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y reguladores de la apoptosis. La activación de NF- κ B ocurre en respuesta a patógenos virales y bacterianos, lo cual se asocia al desarrollo de la inmunidad protectora. Sin embargo, algunas bacterias pueden modular esta respuesta inmune al interferir con la regulación de NF- κ B, a nivel de su interacción con: la proteína inhibidora B (IB), co-activadores transcripcionales, el DNA o el complejo basal de transcripción.

PALABRAS CLAVE: Bacterias patógenas, NF- κ B, interferencia molecular, transducción de señales

ABSTRACT

The interaction between pathogenic bacteria and mammalian cells (host) may result in infection followed by tissue inflammation and disease development. NF- κ B is a pleiotropic transcription factor which function is crucial in the innate and adaptive immunity by inducing the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and apoptosis regulators. NF- κ B activation occurs in response to viral and bacterial pathogens and it is associated with the development of protective immunity. However, some bacteria can modulate this immune response by interfering with the NF- κ B regulation at the level of its interaction with: the inhibitor protein B (IB), transcriptional co-activators, the DNA, and the basal transcriptional complex.

KEY WORDS: Pathogenic bacteria, NF- κ B, molecular interference, signal transduction

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata de los mamíferos [primera respuesta contra patógenos] es fundamental durante la etapa inicial de la defensa del huésped contra la infección por bacterias o virus, antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida antígeno-específica. Para sobrevivir dentro del ambiente hostil del huésped, las bacterias patógenas utilizan un conjunto de proteínas capaces de interferir con las rutas de transducción de señales, cuyo objetivo final es eliminar a los microorganismos.

Se han estudiado los mecanismos que emplean las bacterias patógenas para sobrevivir dentro del huésped y evitar que la respuesta inmune innata

y/o la adquirida las elimine. El balance entre la capacidad de los macrófagos para reconocer a los patógenos bacterianos y la habilidad del patógeno para modular las rutas de transducción de estas células determina con frecuencia el resultado final de una infección. Una de las rutas de transducción de señales más importantes en las respuestas inmunes innata y adquirida es la mediada por la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B). La actividad de NF- κ B da como resultado la transcripción de genes que codifican citocinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, inmuno-receptores, otros factores de transcripción, moléculas de adhesión celular, proteínas virales y regulado-

res de la apoptosis. Durante el curso de una infección causada por bacterias patógenas, la inhibición o activación de NF- κ B bloquea o induce, respectivamente, la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, las cuales tienen como función principal reclutar macrófagos y polimorfonucleares al sitio del daño tisular, para eliminar al invasor por fagocitosis.

Esta revisión integra el conocimiento sobre la importancia de NF- κ B en la respuesta inmune de mamíferos y la modulación de su actividad transcripcional por diferentes bacterias patógenas. La primera parte se centra en la descripción de las moléculas que participan en la activación de NF- κ B, las rutas de transducción que

* Recibido: 29 de septiembre 2004 Aceptado: 17 febrero 2005 (*Este número se ha impreso extemporáneamente*)

[†]Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Apartado Postal 53, Administración Chapultepec, CP 58262, Morelia, Mich., México. Tel/Fax: (443) 295-80-29. Correo E: baizabal@zeus.umich.mx.

conducen a su activación y algunos aspectos de su regulación citoplásmica y nuclear; la segunda parte está dedicada a analizar los mecanismos moleculares que emplean ciertas bacterias para inhibir y otras para activar a NF-κB.

PROTEÍNAS PARTICIPANTES EN LA ACTIVACIÓN DE NF-κB

Se ha demostrado en mamíferos la presencia de cinco genes NF-κB/Rel denominados *NFκB1*, *NFκB2*, *RelA*, *RelB* y *c-Rel*, los cuales dan lugar a siete proteínas diferentes, NF-κB1 (p50 y su precursor p105), NF-κB2 (p52 y su precursor p100), RelA (p65), RelB y c-Rel. Estas proteínas contienen una secuencia de 300 aminoácidos en la región amino-terminal llamada dominio homólogo a Rel (RHD). Se ha identificado también una secuencia de localización nuclear (NLS) en el RHD que les permite a estas proteínas translocarse y permanecer en el núcleo. RHD, además, es responsable de la unión específica al DNA, de la formación de homo-κ o heterodímeros y de la interacción con las proteínas inhibidoras B (IκB) de NF-κB/Rel. A diferencia de NF-κB1 y NF-κB2, las proteínas RelA, RelB y c-Rel contienen un dominio de activación de la transcripción (TAD) localizado en la región carboxilo-terminal. Las proteínas p105 y p100 contienen repetidos de ankirina, así como también regiones ricas en glicina (GRR). Los repetidos de ankirina son secuencias de 33 aminoácidos que actúan como sitios de interacción proteína-proteína, mientras que las GRR son importantes para el procesamiento postranscripcional de p105 a p50 y postraduccional de p100 a p52 (1). El heterodímero que con mayor frecuencia se detecta en una amplia variedad de tipos celulares y el más estudiado hasta ahora es el formado por p50 y RelA o p65. La expresión de RelB está restringida a regiones específicas del timo, de los nódulos linfáticos y de las placas de Peyer, mientras que c-Rel

sólo se ha detectado en células hematopoyéticas y linfocitos. Por lo tanto, de aquí en adelante, cuando se mencione a NF-κB nos estaremos refiriendo al heterodímero p50/p65.

En una célula no estimulada, la translocación al núcleo de NF-κB se encuentra inhibida por proteínas de la familia IκB. Las IκB están estructural y funcionalmente relacionadas entre sí y hasta ahora se han identificado cinco: IκBα, IβBκ, IγBκ, IεB3, y Bcl-3. Una característica muy importante de estas proteínas es que presentan de 6 a 7 repetidos de ankirina, que funcionan como regiones de interacción específica con los RHD de las proteínas Rel e interfieren con la función del NLS. Las proteínas p105 y p100, precursoras de p50 y p52, respectivamente, también contienen repetidos de ankirina, por lo que funcionan en ciertos casos como IκBs, reteniendo a las proteínas Rel en el citoplasma. Al contrario de la función

de las IκBs, la función de Bcl-3 es diferente porque su interacción con homodímeros de p50 o p52 induce la expresión de genes regulados por NF-κB (2).

RUTAS DE TRANSDUCCIÓN QUE ACTIVAN A NF-κB

Se han identificado principalmente tres rutas de transducción, dependientes de la activación de proteínas receptoras, que promueven la translocación de NF-κB del citoplasma al núcleo.

ACTIVACIÓN DE NF-κB DEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T

La primer ruta que activa a NF-κB, por medio del complejo IKK, está localizada exclusivamente en los linfocitos Te involucra al receptor de células T (TCR), a la proteína cinasa C (PKC) y a otras proteínas todavía no bien definidas como la guanilato

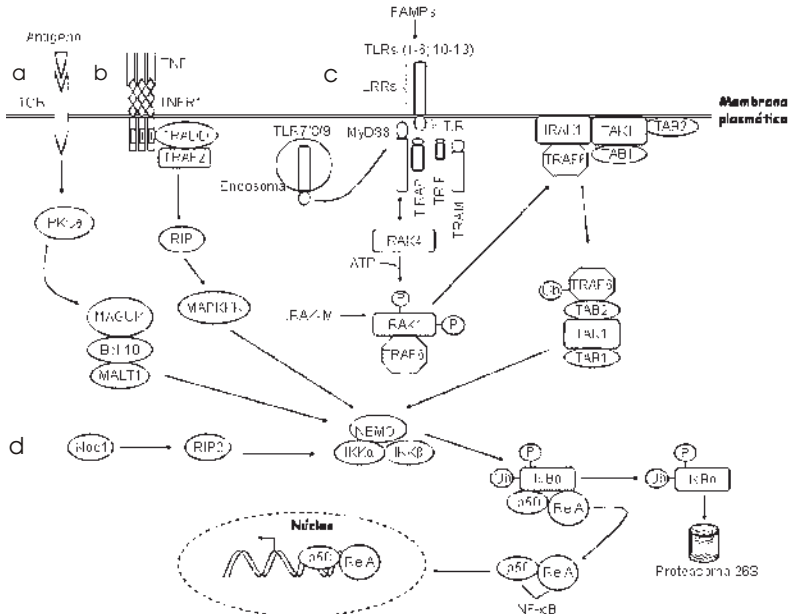


FIGURA 1. Rutas de transducción que activan a NF-κB en mamíferos. a) En la activación de NF-κB, que involucra a TCR, participan PKC y el complejo formado por MAGUK, Bcl-10 y MALT1. b) TNFR1 se trimeriza después de interactuar con TNFα y recluta a TRADD y TRAF2. La proteína RIP y una MAPKKK tienen una función importante en la activación de NF-κB por TNFα. c) La activación de los TLRs por PAMPs causa el reclutamiento de MyD88 hacia el dominio TIR, promoviendo su interacción con IRAK4 que fosforila a IRAK1. IRAK1 entonces interactúa con TRAF6 y se forma un complejo con TAK1, TAB1 y TAB2 que se transloca a la membrana plasmática. En el citoplasma, TRAF6 se ubiquitina y se activa TAK1. d) Nod1 interactúa con RIP2, lo que se forma el complejo RIP2-NEMO. Las tres rutas convergen en la fosforilación de IκB, lo que favorece su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S. Este proceso deja libre a NF-κB que se transloca al núcleo, donde activa la transcripción (Figura modificada de Ref. 5).

cinasa asociada a la membrana (MAGUK) y la proteína Bcl-10 asociada a la mucosa del tejido linfoide-1 (MALT-1) (Figura 1a).

ACTIVACIÓN DE NF- κ B DEPENDIENTE DEL RECEPTOR A TNF

En diversos tipos celulares, como los macrófagos, la segunda de estas rutas se activa por la interacción de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) y la interleucina-1 (IL-1), con proteínas pertenecientes a la superfamilia de los receptores de $\text{TNF}\alpha$ (TNFR) (Figura 1b). Cuando $\text{TNF}\alpha$ se une a su receptor, causa su trimerización y el reclutamiento de la proteína asociada a TNFR vía el dominio de muerte (TRADD) que interactúa con la región citoplásmica de TNFR. Entonces TRADD interactúa con el factor 2 asociado al receptor de $\text{TNF}\alpha$ (TRAF2). Las otras proteínas importantes en esta ruta, y que probablemente tienen un papel fundamental en la activación de NF- κ B, son la proteína cinasa cinasa cinasa activada por mitógeno 3 (MAPKKK3) y la proteína cinasa de serina/treonina asociada al receptor (RIP). Esto causa la activación de una cinasa específica de IB (IKK), la cual forma parte de un complejo formado por tres proteínas, $\text{IKK}\alpha$, $\text{IKK}\beta$ e $\text{IKK}\gamma$ [también llamada modulador esencial de NF-B (NEMO)] con peso molecular de 700 a 900 kilodaltones. $\text{IKK}\alpha$ e $\text{IKK}\beta$ catalizan la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}$, mientras que NEMO sólo regula esta actividad y no tiene actividad intrínseca de cinasa (3).

ACTIVACIÓN DE NF- κ B DEPENDIENTE DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL

La tercer ruta de transducción se activa cuando las proteínas de las superfamilias de receptores tipo Toll (TLR)/IL-1R reconocen diferentes patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) (Figura 1c). Los receptores involucrados en la detec-

ción de estos PAMPs son los TLRs localizados tanto en la membrana celular como en la membrana endosomal y las proteínas citoplásmicas denominadas dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (Nod). Una amplia variedad de PAMPs son reconocidos por los TLRs; estas estructuras incluyen moléculas como flagelina, peptidoglucano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, lipoarabinomano, lipopolisacárido (LPS), motivos no metilados CpG en el DNA bacteriano y RNA de cadena sencilla y doble. Los TLRs intracelulares y las proteínas Nod son capaces de interactuar principalmente con el peptidoglucano de microorganismos que han penetrado a la célula (4).

Los TLRs de mamíferos son proteínas homólogas al receptor Toll de *Drosophila melanogaster*, el cual participa en la diferenciación dorsoventral y en la defensa contra infecciones por hongos en el insecto. Los TLRs forman una familia de trece miembros en mamíferos, aunque sólo del TLR1 al TLR10 se han identificado en los humanos (el TLR11 no está presente en humanos y el TLR10 no se encuentra en ratones). Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1, en cuyo dominio extracelular se localizan de 19 a 25 copias de motivos ricos en leucina (LRR) y una región citoplásmica que contiene el dominio conservado del gen *Toll/IL-1R* (TIR). Dentro del dominio TIR hay tres regiones conservadas con homología considerable entre los TLRs y cuya función es muy importante para la señalización. Los TLRs localizados en la superficie celular e involucrados en el reconocimiento de los productos microbianos son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11. Los TLR7, TLR8 y TLR9 se han detectado en el interior de la célula (endosoma) y sus ligandos son el RNA de cadena sencilla rico en G+U (TLR7 y TLR8) y el DNA bacteriano (TLR9). Aunque la localización celular del TLR3 se desconoce, se ha confirmado que su ligando natural es el RNA de doble

cadena.

En la ruta de transducción iniciada por la interacción de TLRs con los PAMPs participan la proteína adaptadora de la respuesta de diferenciación primaria mieloide (MyD88), las cinasas asociadas a IL-1R (IRAKs), la cinasa activada 1 (TAK1) del factor de crecimiento transformante ($\text{TGF-}\beta$), las proteínas adaptadoras de unión 1 (TAB1) a TAK1, TAB2, TAB3 y el TRAF6 (Figura 1c). Cuando el receptor TLR/IL-1R ha sido estimulado, el primer paso en la ruta de transducción consiste en reclutar a MyD88 hacia el dominio TIR; esto promueve la interacción de IRAK4 con MyD88 y facilita la fosforilación de IRAK1, mediada por IRAK4, lo cual a su vez induce la actividad de cinasa de IRAK1. En esta etapa, IRAK1 se autofosforila, generando sitios de interacción para TRAF6. El dímero formado por IRAK1-TRAF6 (complejo I) se desliga del receptor y se desplaza a la membrana plasmática donde interactúa con el complejo II formado por TAK1-TAB1-TAB2 o TAB3. La interacción de los complejos I y II causa la fosforilación de TAB2/TAB3 y TAK1, que se translocan junto con TRAF6 y TAB1 al citoplasma. Este paso es importante porque da como resultado la activación de TAK1 (una MAPKKK) que ahora es capaz de fosforilar y activar a las IKKs. Se han identificado moléculas adicionales como la IRAK-M, que regula la actividad de IRAK cuando la ruta de NF- κ B es estimulada por la interacción de LPS con TLR4. Otra molécula que funciona en coordinación con MyD88 es la proteína adaptadora con dominio Toll/IL-1R (TIRAP) que es específica para mediar las respuestas iniciadas por la activación de TLR2 y TLR4. Además, existen rutas iniciadas por TLRs en las que MyD88 es reemplazada por proteínas como el factor Toll/IL-1R (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) que en conjunto actúan como co-adaptadores en la respuesta a TLR4 (5).

Los PAMPs también pueden ser

reconocidos en el citoplasma por Nod1 o Nod2; estas proteínas tienen una estructura que consta de un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y varios LRRs. Están muy relacionadas con los productos de genes R de plantas pertenecientes a la clase NBS-LRR. Cuando el péptidoglucano de bacterias es reconocido en el citoplasma por los LRRs de Nod1 o Nod2, estas moléculas interactúan con RIP2, mediante la región amino-terminal denominada dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), que entonces es capaz de interactuar con NEMO. La formación del complejo entre RIP2 y NEMO resulta en la activación de las cinasas IKKs y la fosforilación de IκBα, que es ubiquitinada y degradada en el proteasoma 26S. El resultado final es la liberación de NF-κB y su translocación al núcleo (Figura 1d) (4, 6).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-κB EN EL CITOPLASMA

NF-κB puede ser activado por diversos factores como citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, radiación ultravioleta (UV) y otros agentes que dañan al DNA, virus y bacterias. En la ruta clásica, la activación de NF-κB involucra algún tipo de receptor (excepto por la radiación UV y el peróxido de hidrógeno) y puede ocurrir por fosforilación en sitios específicos de la región amino-terminal de IκB por la IKKβ, previamente activada por IKKα (Figura 2a). Una vez fosforilada, IκB se ubiquitina para posteriormente ser degradada por el proteasoma 26S (Figura 1). Este proceso causa que NF-κB se libere y pueda translocarse al núcleo, debido a que el motivo NLS de RelA queda expuesto. En la ruta considerada no-clásica, la activación se produce por la interacción de la linfotoxina beta (LTβ), el factor activador de células B (BAFF) y CD40 con los receptores a TNFα (Figura 2b). Estas moléculas activan selectivamente a la cinasa inductora

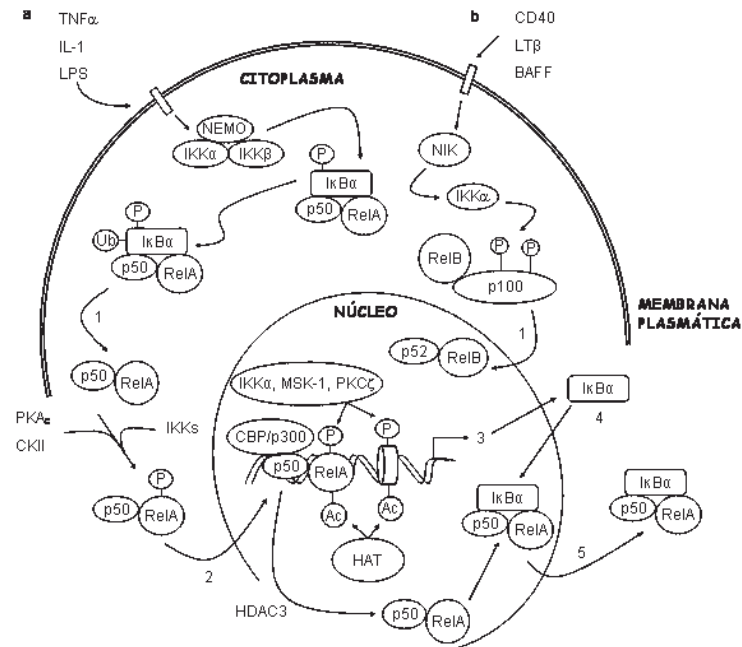


FIGURA 2. Regulación citoplásmica y nuclear de la actividad de NF-κB. a) La activación de NF-κB por TNFα, IL-1 o LPS, activa a las cinasas de IB (IKKα, IKKβ) que fosforilan a IB. IB se ubiquitina y es degradada por el proteasoma 26S (1). Después de que algunas cinasas fosforilan a RelA, NF-κB se transloca al núcleo (2) para activar la expresión de genes. Uno de estos genes codifica a IB (3), la cual puede regresar al núcleo (4), asociarse con NF-κB desacetilado por la HDAC3 y llevarlo de regreso al citoplasma (5), con lo que la transcripción termina. b) LTβ, BAFF y CD40 interactúan con los receptores de TNFα, activando a NIK e IKK, dando lugar a la fosforilación de p100, su ubiquitinación y degradación parcial por el proteasoma 26S para producir p52/RelB. Dentro del núcleo, NF-κB puede ser fosforilado por distintas cinasas como IKK, MSK-1 y PKC y acetilado por las HAT. La actividad transcripcional de NF-κB puede incrementarse por la asociación con co-activadores (CBP/p300) y por cambios epigenéticos en la cromatina (Figura modificada de Ref. 7).

de NF-κB (NIK) y al dímero IKKα/IKKα, lo cual resulta en la fosforilación de NF-κB2 (p100); esto promueve la ubiquitinación y proteólisis parcial de p100 por el proteasoma 26S para producir p52. En esta ruta, el heterodímero formado que se transloca al núcleo es p52/RelB (2).

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF-κB EN EL NÚCLEO

La primera etapa en la activación de NF-κB se desarrolla en el citoplasma y termina con su translocación al núcleo. Sin embargo, para adquirir su capacidad máxima como factor transcripcional, la subunidad RelA de NF-κB debe ser fosforilada y acetilada (Figura 2). Tanto la región RHD como el TAD de RelA son sujetos de

fosforilación en el citoplasma por una amplia variedad de proteínas cinasas, como la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA), activada por LPS, que fosforila a la serina 276 (S276) de RHD. Cuando la célula es estimulada por IL-1 o TNFα, se activan dos cinasas: la caseína cinasa II (CKII) y las IKKs que fosforilan las S529 y S536 de la región TAD. El RelA puede también ser fosforilado por la cinasa de la glucógeno sintasa-3β (gsk-3), la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI-3Kβ), la cinasa Akt y la cinasa activadora de NF-κB (NAK). Por otro lado, las cinasas activadas por mitógeno y estrés-1 (MSK-1) y la PKCζ, las cuales son activadas por TNFα, fosforilan en el núcleo a S276 y S311 de RHD, respectivamente. Se ha demostrado que la fosforilación de

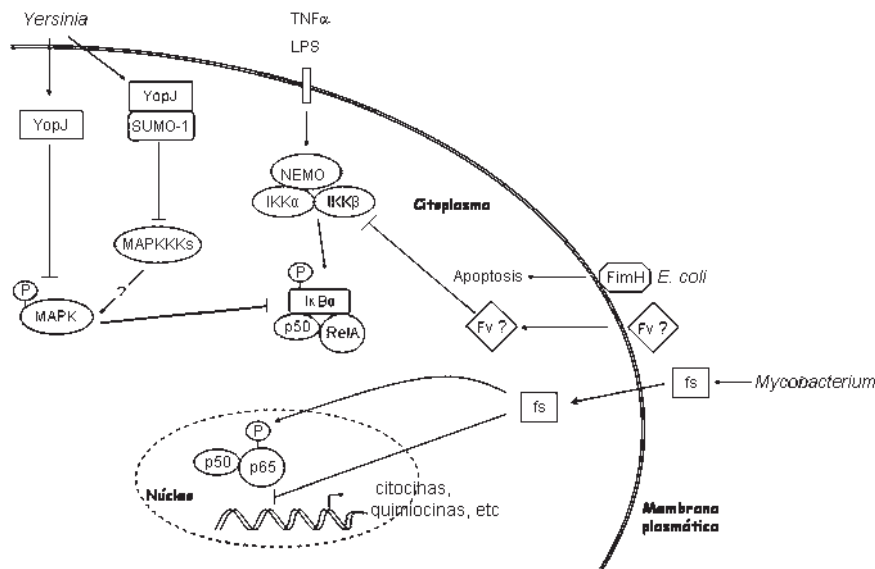


FIGURA 3. Factores bacterianos que inhiben a NF- κ B. *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yersinia*) produce YopJ, la cual inactiva a una MAPK, bloqueando de esta manera la activación de IB. La interacción de YopJ de *Y. pestis* con SUMO-1 bloquea probablemente su conjugación con MAPKKKs. *Escherichia coli* (*E. coli*) produce la adhesina FimH que induce apoptosis y un factor de virulencia no identificado (Fv) que bloquea la translocación de NF- κ B al núcleo, inhibiendo la transcripción inducida por TNF α o LPS. *Mycobacterium ulcerans* (*Mycobacterium*) produce un factor soluble (fs) que bloquea la unión de NF- κ B al DNA y altera su fosforilación.

RelA, catalizada por cualquiera de estas cinasas, aumenta la respuesta transcripcional. Por lo tanto, resulta evidente que la fosforilación de RelA debe estar estrictamente regulada, porque varios sitios localizados en estos dos dominios son blancos de cinasas distintas que pueden ser activadas por estímulos diferentes (7).

La acetilación de RelA en las lisinas 218, 221 y 310 (K218, K221 y K310) es catalizada por las histona acetiltransferasas (HAT). La acetilación de K221 incrementa la capacidad de RelA para unirse al DNA, mientras que la modificación de K310 se requiere para una máxima capacidad transcripcional. La interacción de RelA con I κ B α es muy importante puesto que regula la duración de la respuesta transcripcional. Cuando RelA se encuentra acetilada en K218 y K221 su interacción con I κ B α disminuye notablemente. Por consiguiente, RelA debe ser desacetilada por la histona desacetilasa 3

(HDAC3) para recuperar su afinidad por I κ B α . Por otro lado, es importante mencionar que el I κ B α recién sintetizado, por la acción transcripcional de NF- κ B, puede transitar del citoplasma al núcleo. En el núcleo, este I κ B α puede ahora interactuar con NF- κ B desacetilado y restaurar sus niveles en el citoplasma, con lo que el sistema interrumpe la respuesta transcripcional y se prepara para un nuevo evento de estimulación. En resumen, la acetilación reversible de RelA es trascendental para modular la fuerza y duración de la respuesta mediada por NF- κ B. Algunos cambios epigenéticos en la cromatina también parecen modular la respuesta mediada por NF- κ B (Figura 2) (7).

A continuación se describen algunos de los mecanismos que emplean ciertas bacterias patógenas para modular la transcripción de genes regulados por NF- κ B. Las bacterias que activan a NF- κ B citadas

en esta revisión se seleccionaron porque su mecanismo se ha estudiado con más detalle, aunque se ha demostrado que las especies siguientes: *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bordetella pertussis*, *Bartonella henselae* y *Rickettsia rickettsii*, también causan activación de NF- κ B.

BACTERIAS QUE INHIBEN A NF- κ B

Yersinia. Este género incluye tres especies patógenas para roedores y humanos, *Y. pestis* que es el agente etiológico de la peste y *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* que causan síndromes gastrointestinales, linfadenitis y septicemia. Las tres especies contienen un plásmido de 70 kilobases (kb) con secuencias codificantes para un sistema de secreción tipo III y producen las proteínas Yop que penetran en la célula e interfieren con una variedad de rutas de transducción de señales. Por ejemplo, se ha demostrado que YopE destruye la estructura de los microfilamentos de actina y, junto con YopH (una proteína fosfatasa de tirosina) inhibe la fagocitosis y suprime el estrés oxidativo en macrófagos. YopJ de *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis* inhibe la activación por fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), las cuales son clave para activar I κ B. Además, YopJ puede interactuar con la molécula pequeña modificadora tipo ubiquitina-1 (SUMO-1) y bloquear su conjugación con MAPKKKs. Aunque no se tiene evidencia de que SUMO-1 modifique a las MAPKKKs, la conjugación de SUMO-1 podría desempeñar alguna función en la ruta de señalización mediada por MAPKs (Figura 3, *Yersinia*) (8).

Escherichia coli. La mayoría de las infecciones del tracto urinario (ITU) se deben a infecciones ascendentes de la vejiga (cistitis) ocasionadas por cepas de *E. coli* uropatógena (ECUP) que expresan estructuras fibrosas (pili tipo 1) capaces de unirse

a proteínas manosiladas de la célula hospedera. En las ITUs se produce una excreción significativa de células uroteliales superficiales, dependiente de la expresión de pili 1 que contienen adhesina FimH intacta en la ECUP. Se ha reportado que algunas cepas de ECUP, carentes de pili 1 sobre la superficie, inhiben la respuesta inflamatoria urotelial al bloquear la translocación de NF- κ B al núcleo e inhibir la transcripción inducida por LPS o TNF α . Por otro lado, se ha demostrado que la apoptosis de células uroteliales depende estrictamente de la interacción de pili 1 con la membrana de la célula hospedera y se propone que FimH es el mediador principal de esta respuesta. Con base en estas observaciones, el modelo actual para explicar la patogénesis de las ITUs es que la ECUP induce una respuesta apoptótica en las células uroteliales mediante el componente FimH de pili 1. Esta respuesta es más intensa debido a un factor de virulencia no identificado que inhibe la actividad de NF- κ B. El bloqueo de NF- κ B, ocasiona que la ECUP altere la expresión de citocinas proinflamatorias, lo que reduce la infiltración de neutrófilos y la fagocitosis del patógeno (Figura 3, *E. coli*) (10).

Mycobacterium ulcerans. Esta bacteria es el agente etiológico de la úlcera de Buruli, que representa la tercera infección micobacteriana más común, después de la tuberculosis y la lepra. A diferencia de otras micobacterias, *M. ulcerans* es una bacteria extracelular productora de un factor soluble (fs) que destruye los tejidos e induce supresión del sistema inmune al inhibir diversas actividades en monocitos y linfocitos T. Esta inmunosupresión aparentemente es la responsable de la persistencia de la bacteria en el sitio de la infección. Se ha demostrado que fs es un inhibidor potente de la producción de TNF α e IL-10 en monocitos activados con LPS. Además, fs inhibe la activación de NF- κ B inducida por TNF α , pero no tiene efecto sobre la degradación

de I κ B α . Sin embargo, fs bloquea la unión de NF- κ B al DNA y posiblemente altera su fosforilación en el núcleo, lo cual sugiere la existencia de otras moléculas que controlan la función de este factor de transcripción (Figura 3, *Mycobacterium*) (9).

BACTERIAS QUE ACTIVAN A NF- κ B

Listeria monocytogenes. Es una bacteria intracelular responsable de causar abortos, así como de padecimientos severos en humanos como meningitis, septicemia y peritonitis. Es capaz de invadir y sobrevivir en la mayoría de las células del huésped, incluyendo células epiteliales, endoteliales, hepatocitos, fibroblastos y macrófagos. El primer paso para la internalización de *L. monocytogenes* es su adhesión a la membrana celular. Una vez que la bacteria se ha internalizado, libera sustancias capaces de romper la membrana del fagosoma y queda libre en el citoplasma. A partir de este momento, el daño que provoca la bacteria depende del tipo de factor de virulencia que produce. Se han identificado varios factores de virulencia de naturaleza proteica secretados por *L. monocytogenes*, denominados listeriolisina O (LLO), internalina A (InlA) e internalina B (InlB). La evidencia indica que LLO actúa como un potente estímulo inflamatorio en células endoteliales durante el proceso de infección. Además, LLO induce la expresión de adhesinas (i.e. ICAM-1, E-selectina), quimiocinas (IL-8) y la activación de NF- κ B dependiente de la presencia del receptor I a IL-1 (IL-1RI), pero no dependiente de la cisteinil-aspartil proteasa 1 (caspasa-1), ni de la participación directa de IL-1 α o IL-1 β . Aunque se requiere un IL-1RI íntegro, la activación de NF- κ B por LLO no requiere de la intervención de MyD88 o IRAK. Estos datos indican que LLO no interfiere con la ruta de transducción clásica activada por IL-1; no obstante, la actividad de LLO necesita estrictamente la degradación

de I κ B α (Figura 4, *Listeria*) (11).

InlB activa a NF- κ B mediante un mecanismo diferente a LLO. Se ha demostrado que InlB es importante en la interacción de *L. monocytogenes* con la membrana celular. Además, aparentemente utiliza la proteína G monomérica Ras para activar a PI-3K y ésta a su vez a la proteína cinasa Akt, las cuales inducen la activación de NF- κ B. PI-3K es importante en el proceso de internalización de la bacteria, el cual probablemente también depende de la intervención de Ras. La evidencia reciente indica que Akt fosforila y activa IKK α , la cual a su vez fosforila I κ B α , lo que resulta en la translocación de NF- κ B al núcleo. InlB promueve también una respuesta anti-apoptótica mediada por Akt que inactiva proteínas proapoptóticas del tipo Bad y procaspasas (Figura 4, *Listeria*). Al parecer esta acción de InlB es necesaria para la sobrevivencia intracelular de la bacteria (12).

Mycobacterium bovis. La ruta de transducción principal que da lugar a la activación de NF- κ B por micobacterias involucra la interacción de lipoproteínas, lipoarabinomano y peptidoglucano con TLR2 y la participación secuencial de MyD88, IRAK, TRAF6 y NIK. La activación de IKK α e IKK β por NIK resulta en la fosforilación de I κ Bs, su ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S, lo que libera a NF- κ B para translocarse al núcleo e iniciar el proceso de transcripción. En particular, la activación de NF- κ B por *M. bovis* involucra la participación de PI-3K/Akt y las MAPKs JNK y p38. El efecto de estas cinasas aparentemente está mediado por el reclutamiento de CBP/p300, que funciona como coactivador esencial de NF- κ B (Figura 4, *M. bovis*) (13).

Neisseria gonorrhoeae. La gonorrea es una infección de transmisión sexual de importancia mundial que no suele causar síntomas; se localiza generalmente en el tracto genital inferior, donde en la mayoría

de los casos se manifiesta como uretritis en el hombre y cervicitis en la mujer. En las etapas iniciales, *N. gonorrhoeae* interactúa con células epiteliales de la mucosa e induce la liberación de citocinas y quimiocinas inflamatorias como IL-6 e IL-8. Esto causa que las células fagocíticas, como los polimorfonucleares y los macrófagos, migren al sitio de la infección para eliminar al patógeno. En un reporte reciente se demostró que una lipoproteína de la membrana externa de *N. gonorrhoeae*, denominada Lip, estimula la producción de IL-6 e IL-8, dependiente de la activación de NF- κ B en células epiteliales endocervicales de humano. Además, se tiene evidencia de que Lip triacilado en la región amino-terminal interactúa con TLR1 y TLR2 (Figura 4, *Neisseria*) (14).

Shigella flexneri. La mayoría de los individuos infectados con esta bacteria desarrollan una sintomatología que consiste en diarrea sanguinolenta, fiebre y problemas estomacales severos 1 ó 2 días después de su exposición al microorganismo. La shigelosis se puede tratar con antibióticos, por lo que el paciente se recupera en un lapso de 5 a 7 días. Un porcentaje muy bajo de individuos, genéticamente predispuestos (-3%) que han sufrido la infección con *S. flexneri* desarrollan el síndrome de Reiter que incluye artralgias, irritación ocular y dolor localizado al orinar. Es interesante señalar que las células epiteliales son refractarias a LPS, por lo que sólo las cepas de *S. flexneri*, capaces de penetrar al citoplasma de estas células inducen la activación de NF- κ B y un incremento en la actividad de JNK. Esto significa que el LPS de la cepa de *S. flexneri* invasiva debe ser reconocido por una molécula receptora intracelular independiente de TLR/IL-1. Este receptor intracelular es Nod1, el cual se oligomeriza al interactuar su dominio LRR con el LPS liberado por *S. flexneri* y activa, por medio de su dominio CARD, tanto a NF- κ B como a JNK. El Nod1 multimérico ahora es

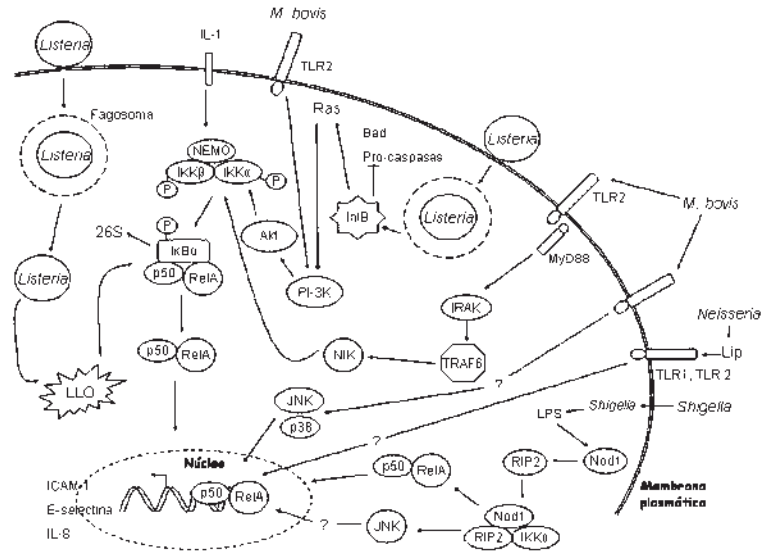


FIGURA 4. Factores bacterianos que activan a NF- κ B. *Listeria monocytogenes* (*Listeria*) libera listeriolisina O (LLO) la cual induce NF- κ B después de la degradación de I κ B, activando la expresión de adhesinas (ICAM-1, E-selectina) y quimiocinas (IL-8). *Listeria* produce también internalina B (InIB) que activa, mediante la proteína Ras, a PI-3K y a la proteína cinasa Akt. Ésta última fosforila y activa a IKK, la cual a su vez fosforila a I κ B, dando como resultado la translocación de NF- κ B al núcleo. *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) interactúa con TLR2, lo que recluta a MyD88, IRAK y TRAF6. NIK activa a las IKKs, lo que resulta en la fosforilación de I κ B promoviendo su degradación por el proteasoma 26S. *M. bovis* también puede activar a PI-3K y a Akt que activa a JNK y p38. *Neisseria gonorrhoeae* (*Neisseria*) produce la lipoproteína Lip que interactúa con TLR1 y TLR2 para estimular la producción de IL-6 e IL-8, dependiente de NF- κ B. *Shigella flexneri* (*Shigella*) invasiva libera en el citoplasma LPS, el cual es reconocido por Nod1, con lo que se forma el complejo Nod1-RIP2-*IKK*, activándose la translocación de NF- κ B al núcleo y la ruta de transducción mediada por JNK.

capaz de interactuar con RIP2, que a su vez recluta a IKK α . Con lo que se forma el complejo Nod1-RIP2-*IKK*, activando la translocación de NF- κ B al núcleo y la ruta de transducción mediada por JNK (Figura 4, *Shigella*) (15).

CONSIDERACIONES FINALES

Las rutas de transducción de señales que convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B son importantes porque permiten a las células de los mamíferos desarrollar las respuestas inmunes innata y adquirida contra microorganismos patógenos. NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma asociado a I κ B; cuando algún estímulo induce la fosforilación de I κ B, esta proteína se ubiquitina y finalmente se procesa en el proteasoma 26S. Este mecanismo libera y expone los motivos NLS de

NF- κ B, el cual se transloca al núcleo para unirse a secuencias consenso κ B presentes en el DNA e iniciar la transcripción con la ayuda de co-activadores como CBP/p300. Algunas estructuras de la pared y/o ciertos factores de virulencia solubles de bacterias patógenas pueden activar o inhibir una reacción inflamatoria, debido a su potencialidad para activar o bloquear a NF- κ B, respectivamente. Es interesante que el número de bacterias que activan a NF- κ B y promueven una reacción inflamatoria sea mayor al de bacterias que lo inhiben. Es probable que las bacterias patógenas equipadas para sobrevivir dentro de los macrófagos u otro tipo de células como las epiteliales o endoteliales sean capaces de exacerbar la respuesta inflamatoria y reclutar más células hospedadoras potenciales al sitio de infección. La activación de NF- κ B por estas bacterias induce

también un mecanismo anti-apoptótico que prolonga la vida de la célula, representando esto una ventaja para su sobrevivencia intracelular y su posible diseminación, dentro de los macrófagos, a otros lugares del organismo. En contraste, la inhibición de NF- κ B da lugar a una liberación reducida de citocinas pro-inflamatorias, como el TNF α y, en algunos casos, a un aumento en la apoptosis de la célula huésped; ambos fenómenos podrían ser de utilidad a la bacteria para evitar la respuesta inmune, aunque la desventaja sería que este mecanismo no les permitiría

colonizar otros tejidos del organismo. La participación de los factores de transcripción NF- κ B/Rel en la inflamación y en enfermedades en el humano, los coloca como moléculas importantes para el diseño de fármacos que modifiquen su actividad transcripcional. El conocimiento de las bases moleculares de la respuesta al ataque de los microorganismos, de los procesos de inflamación y de la sepsis son los desafíos más trascendentales que probablemente serán resueltos con los avances en el estudio a nivel molecular de la inmunidad innata. Los resultados que se obten-

gan, seguramente tendrán como consecuencia una mejoría en el estado de salud del ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Carlos Cervantes Vega por sus comentarios. A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH por el apoyo para realizar este trabajo mediante el proyecto 14.4-2004. JOB recibe beca para estudios de doctorado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

REFERENCIAS

1. Ghosh S, May M J y Kopp E B (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
2. Karin M y Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-663.
3. Bonizzi G y Karin M (2004) The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25: 280-288.
4. Athman R y Philpott D (2004) Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr Op Microbiol* 7: 25-32
5. Akira S y Takeda K (2004) Toll-like receptor signaling. *Nature Rev Immunol* 4: 499-511.
6. Rosenberger C M y Finlay B B (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophages signalling by bacterial pathogens. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 385-396.
7. Chen L F y Greene W C (2004) Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 392-401.
8. Orth K, Palmer L E, Bao Z Q, Stewart S, Rudolph A E, Bliska J B y Dixon J E (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-1597.
9. Pahlevan A A, Wright D J M, Andrews C, George K M, Small P L C y Foxwell B M (1999) The inhibitory action of *Mycobacterium ulcerans* soluble factor on monocyte/T cell cytokine production and NF- κ B function. *J Immunol* 163: 3928-3935.
10. Klumpp D J, Weiser A C, Sengupta S, Forrestal S G, Batler R A, y Schaeffer A J (2001) Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF- κ B. *Infect Immun* 69: 6689-6695.
11. Kayal S, Lilienbaum A, Join-Lambert O, Li X, Israël A y Berche P (2002) Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* induces NF- κ B signalling by activating the IB kinase complex. *Mol Microbiol* 44: 1407-1419.
12. Mansell A, Khelef N, Cossart P, y O'Neill L A J (2001) Internalin B activates nuclear factor- κ B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol Chem* 276: 43597-43603.
13. Darieva Z, Lasunskaja E B, Campos M N N, Kipnis T L y da Silva W D (2004) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and c-Jun-N-terminal kinase cascades enhances NF- κ B-dependent gene transcription in BCG-stimulated macrophages through promotion of p65/p300 binding. *J Leukoc Biol* 75: 689-697.
14. Fiset P L, Ram S, Andersen J M, Guo W e

Ingalls R R (2003) The Lip lipoprotein from *Neisseria gonorrhoeae* stimulates cytokine release and NF- κ B activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2-dependent manner. *J Biol Chem* 278: 46252-46260.

15. Girardin S E, Tournebise R, Mavris M, Page A L, Li X, Stark G R, Bertin J, DiStefano P S, Yaniv M, Sansonetti P J y Philpott D J (2001) CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2: 736-742.

11.3 ANEXO 3

Staphylococcus epidermidis es una bacteria que con frecuencia se encuentra asociada con las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus*. Dentro de los agentes etiológicos de la mastitis bovina, *S. epidermidis* se clasifica como una bacteria ambiental patógena oportunista. Los experimentos que en esta sección se presentan con *S. epidermidis* se realizaron con la finalidad de evaluar la respuesta diferencial de las CEB a ambas bacterias. Al igual que para *S. aureus*, se evaluó el efecto de TNF- α sobre la fagocitosis de *S. epidermidis* por las CEB, así como la participación de NF- κ B, JNK y p38 en dicho proceso. De manera contrastante, la fagocitosis de *S. epidermidis* no estuvo asociada con la actividad basal de NF- κ B. Sin embargo, el tratamiento de las CEB con TNF- α , la cual activa a NF- κ B, causó una disminución significativa en el número de bacterias intracelulares recuperadas, lo que sugiere la participación de este factor en la fagocitosis de *S. epidermidis* en CEB estimuladas. La inhibición de la actividad basal de las MAP cinasas JNK y p38 provocó una disminución en el número de bacterias intracelulares recuperadas, por lo cual sugiere que participan en la fagocitosis de *S. epidermidis* por las CEB.

Los resultados obtenidos fueron organizados como se presentan a continuación y enviados a la revista FEMS Microbiology Letters. Se anexa la carta de aceptación del editor Prof. Mark Enright, fechada el 5 de diciembre del año en curso.

Decision Letter (FEMSLE-08-07-0669.R1)

From: m.c.enright@imperial.ac.uk
To: baizabal@zeus.umich.mx
Cc: femsle@fems-microbiology.org
Subject: FEMSLE-08-07-0669.R1 / Accepted for publication
Body: 05-Dec-2008

Manuscript ID: FEMSLE-08-07-0669.R1
Title: TNF- α reduces the level of Staphylococcus epidermidis internalization by bovine endothelial cells
Authors: Boyso, Javier; Patiño, Alejandro; Juárez, Marcos; Alarcón, Juan José; Baizabal Aguirre, Victor Manuel
Submitted to: FEMS Microbiology Letters
Submitted date: 13-Jul-2008
Revised date: 05-Nov-2008
Accepted date: 05-Dec-2008

Dear Prof. Victor Manuel Baizabal Aguirre,

I am pleased to be able to tell you that your manuscript, detailed above, has now been accepted for publication in our journal. Thank you for taking so much care with the revision. I hope you will agree that it has improved substantially.

We will now need to receive either a Copyright Assignment Form or, if you wish to make use of funding for the article to be made freely accessible online, an Online Open Form.

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley-Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Wiley Interscience website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Wiley Interscience service. Please see <http://www.blackwellpublishing.com/femsle> > Author Guidelines for more details on this option.

You can obtain the Copyright Assignment Form from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/FEMSLE_CAF.pdf; you can obtain the Online Open Form from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/FEMSLE_OOF.pdf. Both forms are available via the 'Instructions and Forms' button at the

top right of all Manuscript Central pages. Please ensure that you have ticked box A, B or C on the relevant page.

Please note that, in the case of a multi-authored article, by signing the Copyright Assignment Form or Online Open Form, you warrant that you have obtained, in writing, authorization to enter into this agreement on behalf of all the co-authors.

The original signed form may be scanned and then emailed to admin.journals@fems-microbiology.org or faxed to 00 31 15 269 3921 or sent to the following address:

FEMS Microbiology Letters
FEMS Central Office
Keverling Buismanweg 4
2628 CL Delft
The Netherlands

On receipt of the signed form, your manuscript will be forwarded to the publisher.

Wiley-Blackwell Publishing will carry out any copy-editing that might be required and will send you proofs and an offprint order form within ten to fourteen days of receipt. In principle, the electronic files will be used for producing the final publication, but the publisher might request a set of high-quality print-outs of your figures for production purposes. Please have these available in case they are required.

You will be able to track the progress of your article via the publisher's Author Services site. Once your paper is with the Production Editors, you will receive an email with a unique code that automatically adds your article to the system. With Author Services you can check the status of your article online and choose to receive automated emails at key stages of production.

Best wishes,

Dr. Mark Enright
Editor FEMS Microbiology Letters

P.S.

The formal corresponding author will receive a free PDF file of the published paper.

Date Sent: 05-Dec-2008

1 **TNF- α reduces the level of *Staphylococcus epidermidis***
2 **internalization by bovine endothelial cells**

3
4
5 Javier Oviedo-Boyso, Alejandro Bravo-Patiño, Marcos Cajero-Juárez, Juan J. Valdez-
6 Alarcón & Víctor M. Baizabal-Aguirre¹

7
8
9 Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y
10 Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

11
12
13
14 **Running title:** TNF- α decreases *Staphylococcus epidermidis* internalization

15
16
17
18 **Keywords:** *Staphylococcus*, mastitis, endothelial cells, TNF- α , NF- κ B, JNK, p38

19
20
21
22
23 ¹ Corresponding author:

24 Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad
25 Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, Morelia, Michoacán.
26 C.P. 58893, México. Phone and Fax: +52 (443) 295 80 29; e-mail: baizabal@zeus.umich.mx

27

1 **Abstract**

2 *S. epidermidis* is an environmental opportunistic-pathogen associated with bovine
3 intramammary infections. In bacterial infections the endothelial tissue plays an important
4 role during inflammation and it is the target of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α .
5 Therefore, this work was designed to explore the effect of TNF- α on the interaction of *S.*
6 *epidermidis* with bovine endothelial cells (BEC). We show that cell signaling activated by
7 TNF- α caused a marked reduction in the number of intracellular *S. epidermidis*, suggesting
8 that molecules participating in this pathway were involved in the internalization of this
9 bacterium. We also found that *S. epidermidis* internalization was not associated with basal
10 levels of NF- κ B activity because intracellular number of bacteria recovered after treating
11 BEC with the NF- κ B inhibitors, SN50 or BAY 11-7083, was similar to that of the untreated
12 control. Interestingly, inhibition of the basal activity of JNK with SP600125 and p38 with
13 SB203580 caused a decrease in the number of intracellular *S. epidermidis*. These results
14 suggest that activation of the signaling pathway initiated by TNF- α could have an
15 important role in the phagocytosis of this bacterium. However, the basal activity of NF- κ B
16 was shown not to be important for the internalization process of *S. epidermidis*.

1 **Introduction**

2 In dairy industry, the inflammation of the mammary gland (MG) is one of the most
3 important diseases because of reduction of milk quality (Deogo *et al.*, 2002). It is accepted
4 that CNS such as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, and *Staphylococcus*
5 *chromogenes* invade and infect the MG from an environmental source and may be the
6 etiological agents for both clinical and subclinical disease (Nunes *et al.*, 2007). Infection of
7 the udder by *S. epidermidis* as well as by the others CNS is important before (dry period)
8 and after (early lactation episodes) parturition when the MG is highly susceptible to
9 contagious pathogenic microorganisms (Aarestrup & Jensen, 1997; Rajala-Schultz *et al.*,
10 2004). In particular, and more important is the fact that *S. epidermidis* can be endocytized
11 by bone cells (Khalil *et al.*, 2007) and bovine mammary epithelial cells (Anaya-López *et*
12 *al.*, 2006) suggesting that cell invasion could be a factor of pathogenicity.

13 The endothelium plays an important role in the inflammatory reaction by expressing
14 adhesion molecules, cytokines, and chemokines that promote the recruitment of neutrophils
15 to the site of infection in response to pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis
16 factor- α (TNF- α) (De Martin *et al.*, 2000). Moreover, due to its anatomical position, the
17 endothelial cells are able to interact with any microorganism that tries to reach the blood
18 stream (Valbuena & Walker, 2006) or in the particular case of the MG, tries to disseminate
19 to an uninfected quarter. The binding of TNF- α to their corresponding plasma membrane
20 receptors and the interaction of viruses, bacteria, and pro-oxidants to different eukaryotic
21 cells promotes the translocation and activation of the transcription factor nuclear factor
22 kappa B (NF- κ B) to the nucleus (Ghosh *et al.*, 1998). Boulanger *et al.* (2003) have reported

1 that NF- κ B activity is enhanced in neutrophils recovered from udders with mastitis,
2 pointing out that NF- κ B plays a role in bovine mastitis.

3 In a previous study we reported that *S. aureus* internalization by bovine endothelial
4 cells (BEC) was increased by TNF- α or IL-1 β and that the activation state of NF- κ B was
5 important in this process (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008a). Since *S. epidermidis* is an important
6 CNS environmental pathogen often associated with *S. aureus* intramammary infections, we
7 have analyzed the effect of TNF- α on *S. epidermidis* internalization by BEC. Our results
8 indicate that stimulation of BEC with TNF- α causes a marked reduction on the
9 internalization of *S. epidermidis*. Interestingly, inhibition of JNK and p38 but not NF- κ B
10 basal activity resulted in a reduction of intracellular bacteria, implicating the activity of
11 these kinases in the internalization process of *S. epidermidis*.

12

13 **Materials and methods**

14 **Media and chemicals**

15 F-12 Ham (HF-12) of Dulbecco's modified Eagle's medium, trypsin-EDTA, bovine serum
16 albumin (BSA), and lysostaphin were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).
17 Non-fat dry milk was acquired from Bio-Rad (CA, USA). Fetal calf serum was acquired
18 from Equitech-Bio, Inc. (Kerrville, TX). SN50, BAY 11-7083, SP600125 (SP, inhibitor of
19 JNK) and SB203580 (SB, inhibitor of p38) were from Calbiochem (San Diego, CA). The
20 structure and mechanism of action of these inhibitors is presented in Table 1. Penicillin G
21 and streptomycin were purchased from Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Recombinant
22 human TNF- α was obtained from R & D Systems (Minneapolis, MN). Polyclonal

1 antibodies directed against the NF- κ B p65 protein and the Luminol reagent were purchased
2 from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA).

3

4 **Preparation of bacteria**

5 For all the experiments we used the *Staphylococcus epidermidis* strain SA-29 from
6 Michoacán, México (Anaya-López *et al.*, 2006), isolated from a subclinical case of bovine
7 mastitis. The preparation of bacteria culture was performed as reported previously by
8 Oviedo-Boyso *et al.* (2008a). Briefly, bacteria were grown in 2 ml of Luria-Bertani (LB) at
9 37°C overnight with continuous agitation. Then 400 μ l of this preculture were added to 250
10 ml of LB and grown at 37°C until an optical density of 0.1 at 600nm (initial log phase)
11 measured with an Ultrospec-1000 spectrophotometer (Pharmacia-Biotech, Piscataway, NJ).
12 After centrifugation at 500 g for 8 min the supernatant was eliminated and bacteria
13 resuspended in HF-12 without calf serum and antibiotics (HF-12i). Sterile glycerol was
14 added to a final concentration of 10% (w/v) at room temperature and the culture was gently
15 homogenized. Finally, the culture was separated in aliquots of 1 ml and stored at -80°C.

16

17 **Culture of bovine endothelial cells**

18 For the infection experiments we used bovine umbilical vein endothelial cells immortalized
19 by transfection with an expression vector containing the E6E7 oncogenes of human
20 papillomavirus 16. These cells named BVE-E6E7 by Cajero-Juárez *et al.* (2002) and BEC in
21 this study were seeded ($\sim 0.5 \times 10^6$ cells/ml) in 24-well plates (Corning Inc., Corning, NY)
22 and cultured in 2 ml of HF-12 supplemented with 10% calf serum, 100 U/ml penicillin G
23 and 100 μ g/ml streptomycin, at 37°C in 5% CO₂/95% air up to a confluence of 90-100%. In

1 all experiments the BEC viability was greater than 98%, evaluated by the trypan blue
2 technique.

3

4 **Infection assays and treatment with TNF- α**

5 For internalization assays BEC were washed three times with HF-12i to remove calf serum
6 and antibiotics. To test the effect of TNF- α on staphylococci internalization, BEC were first
7 incubated for 4 h with 2.5 ng/ml TNF- α . Then, the cells were washed three times with 1 ml
8 HF-12i and infected with 1×10^6 colony-forming units (CFU)/ml of *S. epidermidis* (MOI of
9 2) for 20 min. When the internalization was evaluated with respect to the MOI, the value of
10 MOI was varied from 0.5 to 20. After infection, BEC were incubated with 5 μ g/ml
11 lysostaphin for 20 min to kill the extracellular bacteria (the sensitivity of *S. epidermidis* to
12 lysostaphin was similar to that of *S. aureus*, data not shown), washed three times with 1 ml
13 HF-12i, lifted with 350 μ l of 0.25% trypsin-0.5 mM EDTA, and recovered by
14 centrifugation at 500 g for 8 min. The supernatant was discarded and BEC were lysed by
15 hypotonic shock in 250 μ l sterile deionized water (no difference was observed when 0.1%
16 triton X-100 was added). Intracellular bacteria were cultured in LB agar (LBA) at 37°C for
17 19-24 h and the number of staphylococci CFU/ml was calculated by the counting plate
18 technique.

19

20 **Protein extraction and detection of the NF- κ B p65 protein by Western** 21 **blot**

22 Nuclear and cytosolic protein from BEC ($\sim 2 \times 10^7$ cells) treated for 20 min and 4 h with 3
23 ng/ml of TNF- α and untreated were extracted with NucBuster Protein Extraction kit

1 (Novagen, EMD Biosciences, Inc., Darmstadt, Germany). Protein concentration was
2 measured by the method of Stoscheck (1990) using BSA as standard. Nuclear and cytosolic
3 protein was separated by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels according to
4 Schagger & von Jagow (1987). Proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane at 250
5 mA for 2.5 h in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, 0.1% SDS. Polyclonal
6 antibodies directed against the NF- κ B p65 protein were added to the membrane at 1:500 in
7 10 ml of TBS (50 mM Tris and 150 mM NaCl) supplemented with 5% non-fat dry milk and
8 1% BSA and incubated overnight at 4°C. The secondary antibody used was conjugated
9 with horseradish peroxidase and detection of p65 was performed by adding luminol reagent
10 following the manufacturer instructions. Finally, the membrane was exposed to an X-ray
11 film (Kodak) with two intensifying screens (DuPont) for 5-10 min at room temperature
12 (~23°C).

13

14 **Electron microscopy**

15 BEC grown at 90-100% confluence in 5% CO₂ at 37°C over permanox cover slips were
16 infected with 1 x 10⁶ CFU/ml of *S. epidermidis* for 20 min and treated with 5 µg/ml
17 lysostaphin for 20 min. Fixation of BEC for transmission electron microscopy (TEM) and
18 the photographs obtained were performed as reported by Oviedo-Boyso et al. (2008a).

19

20 **Treatment of bovine endothelial cells with inhibitors**

21 BEC grown at 90-100% confluence in 5% CO₂ at 37°C were incubated with SN50 or BAY
22 for 1 h or with SP or SB for 0.5 h. After washing the cells with HF-12i, TNF- α was added
23 for 4 h as indicated. BEC were then washed three times with HF-12i and infected 20 min

1 with 1×10^6 CFU/ml of *S. epidermidis* (MOI 2). To eliminate extracellular staphylococci
2 BEC were incubated with 5 μ g/ml lysostaphin for 20 min. The internalized bacteria were
3 recovered, cultured, and counted according to the procedure described above.

4

5 Statistical analysis

6 To normalize the data, the ratio of staphylococci CFU/ml to the number of BEC/ml was
7 obtained for each condition tested. In each experiment, the ratio obtained for each condition
8 was referenced to the control condition that was arbitrarily assigned a value of 100%,
9 except for Fig. 1B in which the data are expressed as ratios. Data are representative of at
10 least three independent experiments. For each condition the error standard of the mean ($n =$
11 3) was calculated. The statistical significance was evaluated with the *t* test paired analysis
12 by using the SigmaStat program version 3.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL).

13

14 Results

15 Internalization of *Staphylococcus epidermidis* by bovine endothelial cells

16 Qualitative evidence for the presence of *S. epidermidis* inside BEC was obtained by TEM
17 (Fig. 1A) whereas the capacity of BEC to endocytize *S. epidermidis* was evaluated by
18 increasing the MOI (Fig. 1B). Taking 2.8 as the reference value of the ratio obtained at an
19 MOI of 0.5, it was observed that the level of intracellular bacteria increased linearly up to
20 an MOI of 2 reaching a 4-fold maximum increase (Fig. 1B). Higher MOIs of 5 and 20 did
21 not result in any further increase in the amount of intracellular *S. epidermidis* (Fig. 1B).

22

23

1 ***Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells is**
2 **decreased by TNF- α**

3 In a previous report we found that TNF- α enhances the *S. aureus* internalization by BEC
4 (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008a). Therefore, we decided to investigate if this cytokine also
5 affects the capacity of BEC to endocytize *S. epidermidis* because of its association with
6 bovine mastitis. When BEC were incubated with 2.5 ng/ml TNF- α and then infected with
7 *S. epidermidis* at MOIs 1 and 2 the level of internalization was reduced by 38% \pm 5.9% (P
8 < 0.05) and 68% \pm 6% ($P < 0.001$), respectively (Fig. 2A). As previously reported by
9 Oviedo-Boyso *et al.* (2008a) TNF- α produced a significant 57% \pm 9.5% ($P < 0.001$)
10 increase in *S. aureus* internalization by BEC (Fig. 2A). These data indicate that the capacity
11 of BEC to endocytize *S. epidermidis* is diminished when the signaling pathway initiated by
12 TNF- α is activated. To test if TNF- α caused the NF- κ B nuclear translocation BEC were
13 incubated with this pro-inflammatory cytokine for 20 min and 4 h and the relative amount
14 of p65 in cytosol (c) and nucleus (n) was detected by immunoblotting (Fig. 2B). The
15 amount of p65 was higher in n compared with the amount in c indicating that TNF- α
16 activated the translocation of NF- κ B to the nucleus of BEC (Fig. 2A). From data in Figure
17 1B and 2A we selected an MOI of 2 for several reasons: 1) this is the minimum MOI that
18 gives a maximum level of intracellular bacteria; 2) the number of UFC recovered was
19 appropriate to do statistical analysis and 3) TNF- α caused a higher reduction of *S.*
20 *epidermidis* internalization compared with the reduction value obtained at MOI of 1 (Fig.
21 2A).

1 ***Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells is**
2 **not associated with the basal activity of NF- κ B**

3 To test if the basal activity of NF- κ B was associated with the internalization of *S.*
4 *epidermidis* we first used BAY, a chemical NF- κ B inhibitor (Table 1). When BEC were
5 treated with 5 μ M BAY and then infected with *S. epidermidis* no difference in the
6 intracellular number of bacteria was observed compared with the untreated control (Fig.
7 3A). Addition of TNF- α after BAY did not modify the magnitude of *S. epidermidis*
8 internalization compared with the values obtained with BAY or left untreated (Fig. 3A).
9 Treatment of BEC with TNF- α was included as control and showed the same inhibitory
10 tendency as previously described (Fig. 2A). Interestingly, treatment of the macrophage cell
11 line RAW264.7 with 5 μ M BAY caused no effect on *S. epidermidis* internalization whereas
12 the internalization of *S. aureus* was decreased by 47% \pm 6.8% ($P < 0.001$) (data not shown).

13 Next we evaluated the effect of SN50, a peptide that blocks the NF- κ B nuclear
14 translocation (Table 1) on the *S. epidermidis* internalization process. The treatment of BEC
15 with SN50 caused no reduction of *S. epidermidis* intracellular number (Fig. 3B).
16 Interestingly, incubation of BEC with TNF- α after treatment with 50 μ M SN50 caused a
17 partial decrease of 41% \pm 11% ($P < 0.05$) in the number of intracellular *S. epidermidis*
18 compared with the number of bacteria obtained with SN50 (Fig. 3B). BEC treated with
19 TNF- α followed by incubation with *S. epidermidis* was included as control and showed the
20 tendency previously observed (Fig. 2A).

21

22

23

1 **The basal activity of JNK and p38 is associated with *Staphylococcus***
2 ***epidermidis* internalization by bovine endothelial cells**

3 Besides NF- κ B nuclear translocation, TNF- α also activates JNK and p38. Therefore, to
4 determine if the basal activity of these kinases was involved in the internalization of *S.*
5 *epidermidis*, we treated BEC with specific inhibitors of JNK and p38 (see Table 1) and
6 evaluated the number of intracellular bacteria. When BEC were incubated with 5 μ M SP,
7 the *S. epidermidis* internalization was reduced by 33% \pm 7.5% compared with the untreated
8 control (Fig. 4A). With 5 μ M SB, a reduction of 37% \pm 13% *S. epidermidis* internalization
9 was observed (Fig. 4A). The simultaneous addition of both inhibitors caused a reduction of
10 42% \pm 6.9% whereas incubation with TNF- α after simultaneous addition of both inhibitors
11 reduced the intracellular number of *S. epidermidis* by 51% \pm 1.5% compared with the
12 untreated control (Fig 4B).

13

14 **Discussion**

15 The inflammatory reaction of the MG to bacterial infection is characterized by the
16 production of pro-inflammatory cytokines (i.e. TNF- α), adhesion molecules, and
17 chemokines (Alluwaimi *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2004). Endothelial cells of the MG
18 play the same role as in other tissues and are important to neutrophil recruitment,
19 lymphocyte activation, and cytokine production (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). To investigate
20 the role of the pro-inflammatory cytokine, TNF- α , on the internalization of *S. epidermidis*,
21 we used immortalized BEC as a model. Our results indicate that internalization of *S.*
22 *epidermidis* was not associated with the basal activity of NF- κ B because the intracellular
23 number of *S. epidermidis* was not altered by treatment with BAY or SN50. However, when

1 BEC were stimulated with TNF- α the *S. epidermidis* internalization was markedly
2 diminished.

3 The pattern of *S. epidermidis* internalization with respect to the MOI clearly showed
4 a linear tendency to increase up to an MOI of 2 (Fig. 1B). This behavior is different from
5 the pattern of *S. aureus* internalization previously demonstrated in which a low level of
6 internalization was obtained at MOIs from 0.5-2 with an increase at MOIs of 5 and 20
7 (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008a). These contrasting behaviors between these two
8 staphylococcal species indicate the presence of cell-wall components that may partially
9 contribute to their different internalization patterns. Another possibility is that *S.*
10 *epidermidis* activates more efficiently the signal transduction mechanism requiring the
11 interaction between cell-wall components and the host cell (Sinha *et al.*, 2000). Recent
12 evidence indicates that *S. epidermidis* uses cell-wall structural components to “trigger” its
13 own internalization by bovine mammary epithelial cells through the activation of signal
14 transduction pathways (Almeida & Oliver, 2001). Experimental evidence has also indicated
15 that *S. epidermidis* does not internalize through $\alpha 5\beta 1$ in human bone cells which indicates
16 that it employs a different molecular mechanism for invasion (Khalil *et al.*, 2007).
17 Moreover, the intracellular CFU number obtained in our experimental conditions is not due
18 to intracellular killing or survival of bacteria because we have observed that in the presence
19 or absence of lysostaphin the number of intracellular *S. epidermidis* decreased with
20 incubation times greater than 1 h but not shorter (20 min), indicating a slow and intrinsic,
21 lysostaphin-independent mechanism of BEC to eliminate staphylococci (Oviedo-Boyso *et*
22 *al.*, 2008b). Thus the data presented in Fig. 1 suggest a specific molecular signaling
23 response developed by BEC.

1 TNF- α is produced in the inflammatory reaction and plays important roles in the
2 innate immunity by activating the nuclear translocation of NF- κ B. Based on our previous
3 results on the internalization of *S. aureus* by BEC and its relation with the activity of NF-
4 κ B we speculated that activation of this transcription factor may also be associated with the
5 process of *S. epidermidis* internalization. We found that the same concentrations of TNF- α
6 that significantly increased the level of *S. aureus* internalization (Oviedo-Boyso *et al.*,
7 2008a) caused a marked decrease in *S. epidermidis* intracellular number (Fig. 2). This
8 finding suggests a differential response of BEC to staphylococci internalization. Taking
9 into account that bacteria adhesion to the membrane is considered the first step for
10 internalization, it is interesting that Cheung *et al.* (1991) found that TNF- α decreased the
11 adherence capacity of human endothelial cells to *S. epidermidis* and increased that of *S.*
12 *aureus*.

13 The amount of intracellular *S. epidermidis* in BEC treated with BAY or SN50 was
14 similar to that of the untreated control (Figs. 3A and B). Taking into account that BAY
15 blocks the TNF- α -induced I κ B α phosphorylation and SN50 inhibits the nuclear
16 translocation of NF- κ B the lack of effect of both inhibitors indicates that the basal activity
17 of NF- κ B is not implicated in the process of internalization. However, addition of TNF- α
18 after treatment of BEC with SN50, allowed BEC to only partially recover their behavior as
19 that shown when treated with TNF- α alone; this finding suggests that TNF- α activation of
20 BEC leads to the modulation of *S. epidermidis* internalization (Fig. 3B). It is likely that a
21 higher reduction was not possible because of the SN50 concentration used (50 μ M). An
22 alternative explanation is that other molecules different from NF- κ B (i.e. cJun activated by
23 JNK) are taking part in the *S. epidermidis* internalization induced by TNF- α . Interestingly,

1 when the endogenous basal activity of JNK and p38 was specifically inhibited, a partial
2 reduction of internalization was observed (Fig. 4). This result implies that the basal activity
3 of these kinases or perhaps their activation by *S. epidermidis* is associated with the
4 internalization process.

5 The fact that TNF- α enhances the phagocytic capacity of BEC for *S. aureus* while
6 decreasing that for *S. epidermidis* may be of relevance *in vivo* in the context of the
7 inflammatory reaction developed by the MG when it is initially infected with *S. aureus*. In
8 this scenario, the tissue damage caused by *S. aureus* in chronic bovine mastitis along with
9 the lack of TNF- α could be advantageous for the proliferation of *S. epidermidis* and its
10 invasion to the endothelium. In a different scenario and considering the invasion of the MG
11 cells as a factor contributing to the pathogenic potential of *S. epidermidis* we speculate that
12 TNF- α makes the endothelial cells less phagocytic. This reduction of *S. epidermidis*
13 phagocytosis by BEC may favor the exposition of this bacterium to the extracellular
14 medium where the killing effect of antibiotics and soluble molecules (i.e. complement) of
15 the innate immune system can control the infection.

16 In conclusion, this is the first report on the activation of signaling molecules from
17 endothelial cells implicated in the internalization of *S. epidermidis*. It indicates that basal
18 activity of NF- κ B is not necessary for internalization. However, TNF- α activation of BEC
19 caused a marked decrease in the level of internalization. The study also points out to the
20 contribution of the JNK and p38 basal activity for the *S. epidermidis* internalization process
21 because inhibition of these endogenous enzymes caused a reduction in the number of
22 intracellular bacteria. Either the basal activity of these enzymes is important for the
23 internalization or the interaction of *S. epidermidis* with BEC may act as the stimulus that

1 activates them. Altogether, the results presented indicate that the cellular mechanism
2 activated when *S. epidermidis* internalizes in BEC is different from the one activated by *S.*
3 *aureus* (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008a).

4

5 **Aknowledgements**

6 We thank Dr. Alejandro Zentella Dehesa from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
7 Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F. for his kind donation of BAY 11-7083 and the
8 macrophage cell line RAW264.7. This work was supported by Coordinación de
9 Investigación Científica of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, grant
10 14.4 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, grant 55657 to
11 VMBA. JOB received a doctoral scholarship from CONACYT, México.

12

13 **References**

- 14 Aarestrup FM & Jensen NE (1997) Prevalence and duration of intramammary infection in
15 Danish heifers during the peripartum period. *J Dairy Sci* **80**: 307-312.
- 16 Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL & Cullor JS (2003)
17 The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J*
18 *Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**: 105-111.
- 19 Almeida RR & Oliver SP (2001) Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species
20 with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* **31**: 205-212.
- 21 Anaya-López JL, Contreras-Guzmán OE, Cárabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, López-
22 Meza JE, Valdez-Alarcón JJ & Ochoa-Zarzosa A (2006) Invasive potential of bacterial
23 isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Res Vet Sci* **81**: 358-361.

1 Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC & Rainard P (2004) *Escherichia coli*
2 and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following
3 intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**: 463-472

4 Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J & Lekeux P (2003) Increased nuclear factor
5 κ B activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci* **86**: 1259-1267.

6 Cajero-Juárez M, Ávila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez
7 de la Escalera G & Clapp C (2002) Immortalization of bovine umbilical vein endothelial
8 cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* **81**: 1-8.

9 Cheung AL, Koomey JM, Lee S, Jaffe EA & Fischetti VA (1991) Recombinant human
10 tumor necrosis factor alpha promotes adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured
11 human endothelial cells. *Infect Immun* **59**: 3827-3831.

12 Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR & Lee JC
13 (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is
14 stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* **364**: 229-233.

15 Dego OK, van Dijk JE & Nederbragt H (2002) Factors involved in the early pathogenesis
16 of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and
17 invasion. *Vet Quart* **24**: 181-198.

18 De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R & Schmid JA (2000) The transcription factor
19 NF-kappaB and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
20 **20**: E83-E88.

21 Ghosh S, May MJ & Kopp EB (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved
22 mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.

1 Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM & Firestein GS
2 (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint
3 destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108: 181-183.

4 Khalil H, Williams RJ, Stenbeck G, Henderson B, Meghji S & Nair SP (2007) Invasion of
5 bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect* 9: 460-465.

6 Nunes SF, Bexiga R, Cavaco LM & Vilela CL (2007) Antimicrobial susceptibility of
7 portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in
8 subclinical bovine mastitis. *J Dairy Sci* 90: 3242-3246.

9 Oviedo-Boyso J, Barriga-Rivera JG, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cárabez-Trejo A,
10 Cajero-Juárez M & Baizabal-Aguirre VM (2008a) Internalization of *Staphylococcus*
11 *aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and
12 modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scand J Immunol* 67:
13 169-176.

14 Oviedo-Boyso J, Cardoso-Correa BI, Cajero-Juárez M, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ
15 & Baizabal-Aguirre VM (2008b) The capacity of bovine endothelial cells to eliminate
16 intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the
17 pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *FEMS Immunol Med Microbiol* 54: 53-
18 59.

19 Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE,
20 Bravo-Patiño A & Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine
21 mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 54: 399-409.

22 Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T & Gerritsen ME (1997)
23 Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell

1 adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *J Biol Chem* **272**:
2 21096-21103.

3 Rajala-Schultz PJ, Smith KL, Hogan JS & Love BC (2004) Antimicrobial susceptibility of
4 mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol* 102: 33–42.

5 Schägger H & von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
6 electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal*
7 *Biochem* 166: 368–379.

8 Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH,
9 Peters G & Herrmann M (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus*
10 fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68**:
11 6871–6878.

12 Stoscheck CM (1990) Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein
13 assay to different proteins. *Anal Biochem* 184: 111–116.

14 Valbuena G & Walker DH (2006) The endothelium as a target for infections. *Annu Rev*
15 *Pathol Mech Dis* **1**: 171-198.

16 Yao-Zhong L, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR & Hawiger J (1995) Inhibition of nuclear
17 translocation of transcription factor NF-κB by a synthetic peptide containing a cell
18 membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **270**: 14255-
19 14258.

1 **Table 1** Inhibitors used to evaluate the NF- κ B, JNK and p38 participation in the phagocytosis of *S. epidermidis* by BEC

Inhibitor	Structure	Mechanism	References
BAY 11-7083	(E3-[4-t-butylphenyl]-sulfonyl]-2-propenenitrile)	Inhibits the I κ B α phosphorylation induced by TNF- α	Pierce <i>et al.</i> , 1997.
SN50	AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLM ^a	Inhibits the NF- κ B nuclear translocation	Yao-Zhong <i>et al.</i> , 1995
SP600125	1,9-Pyrazoloanthrone	Inhibits the activity of JNK	Han <i>et al.</i> , 2001
SB203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole	Inhibits the activity of p38	Cuenda <i>et al.</i> , 1995

2 ^aSingle letter code of aminoacids

Figure Legends

Fig 1. The level of intracellular *Staphylococcus epidermidis* increases with respect to the multiplicity of infection in bovine endothelial cells. A) Transmission electron microscopy of one BEC with several *S. epidermidis* (indicated by arrows) in the cytoplasm; magnification 8000x. B) BEC were infected with *S. epidermidis* at the indicated multiplicity of infection (MOI) for 20 min, washed, and treated with lysostaphin as described in Materials and methods. Bacteria were recovered from hypotonically-lysed cells, cultured on LBA for 19-24 h at 37°C, and counted. The data represent means \pm SEM (n = 3). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, compared with the value at 0.5 MOI.

Fig 2. TNF- α reduces the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells. (A) BEC were treated with 2.5 ng/ml TNF- α and then infected with *S. epidermidis* or *S. aureus* at the indicated MOIs. Extracellular bacteria were eliminated by addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically-lysed cells, cultured on LBA for 19-24 h at 37°C, and counted. The data represent means \pm SEM (n = 3). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$, compared with the untreated control value. (B) Immunodetection of p65 was performed in nuclear (n) and cytosolic (c) proteins extracted from BEC treated with 3 ng/ml TNF- α for 20 min or 4 h. Coomassie stained proteins around the range of 65 kDa is shown at the bottom to demonstrate equal protein loading. Ctrl, control of BEC not treated with TNF- α .

Fig 3. The specific NF- κ B chemical inhibitor BAY 11-7083 does not affect the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization by bovine endothelial cells. (A) BEC were left untreated (grey column) or treated with 5 μ M BAY 11-7083 (diagonally dashed column), 5

μM BAY 11-7083 followed by 2.5 ng/ml TNF- α (horizontally waved column) or 2.5 ng/ml TNF- α (black column). (B) BEC were left untreated (grey column) or treated with 50 μM SN50 (diagonally dashed column), 50 μM SN50 followed by 2.5 ng/ml TNF- α (horizontally waved column), or 2.5 ng/ml TNF- α (black column). After the indicated treatments, cells were infected with *Staphylococcus epidermidis* and extracellular bacteria eliminated by addition of lysostaphin. Bacteria were recovered from hypotonically-lysed cells, cultured on LBA for 19-24 h at 37°C, and counted. The data represent means \pm SEM (n = 4). * P < 0.05; ** P < 0.001, compared with the untreated control value.

Fig 4. The specific JNK and p38 inhibitors reduce the level of *Staphylococcus epidermidis* internalization. (A) BEC were left untreated (grey column), treated with 5 μM SP (inhibitor of JNK) (horizontally dashed column) or 5 μM SB (inhibitor of p38) (diagonally dashed column). (B) BEC were left untreated (grey column), treated with 5 μM SP and 5 μM SB (dark grey column) or with 5 μM SP and 5 μM SB followed by 2.5 ng/ml TNF- α (black column). In (A) and (B) BEC were infected with *S. epidermidis* after the treatments. Extracellular bacteria were eliminated by lysostaphin addition. Bacteria were recovered from hypotonically lysed cells, cultured on LBA for 19–24 h at 37C, and counted. The data represent mean \pm SEM (n = 3). * P < 0.05; ** P < 0.001, compared with the untreated control value.

Figure 1. Oviedo-Boyso *et al.*, 2008

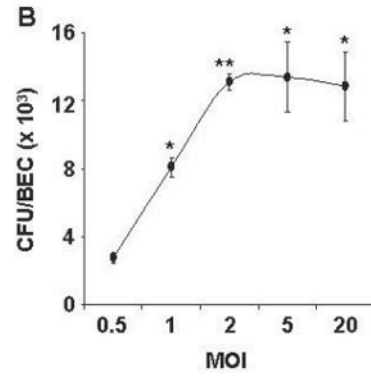
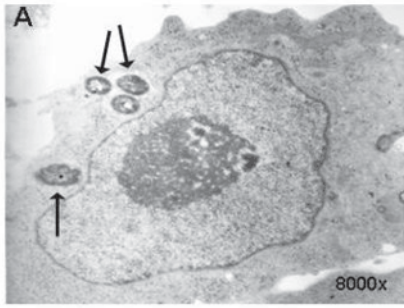


Figure 2. Oviedo-Boyso *et al.*, 2008

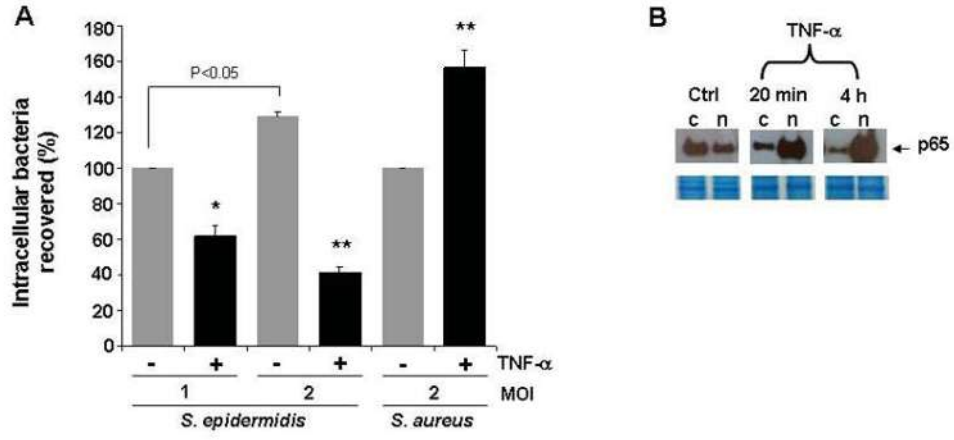


Figure 3. Oviedo-Boyso *et al.*, 2008

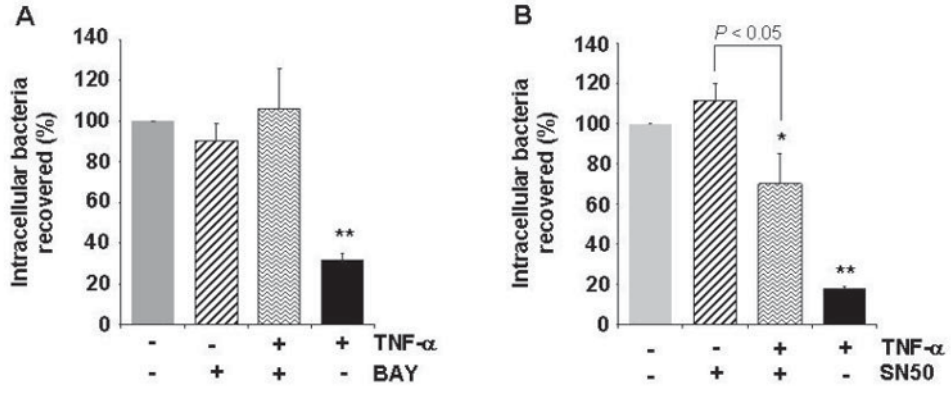
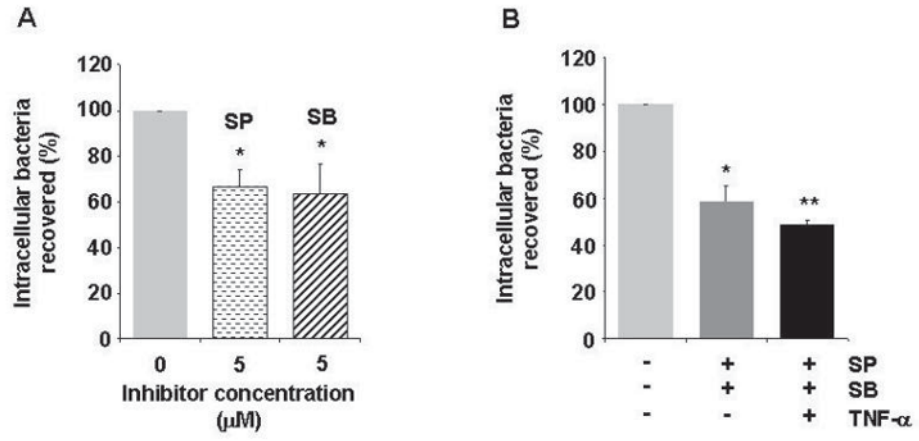


Figure 4. Oviedo-Boyso *et al.*, 2008



12. APÉNDICES

Apéndice 1. Buffer salino de fosfatos (PBS)

Compuesto	Cantidad (g/L)
Cloruro de sodio (NaCl)	8.00
Cloruro de potasio (KCl)	0.20
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1.44
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.24

Apéndice 2. Gel de poliacrilamida al 10% (gel de separación de 1.5 mm)

Compuesto	Cantidad
Acrilamida 30 %-bisacrilamida 0.8 %	4.4 ml
Amortiguador para el gel (pH 8.9)	4.4 ml
Agua desionizada	2.596 ml
Glicerol (1 g/ml)	1.760 ml
Persulfato de amonio al 10 %	44 µl*
TEMED concentrado	5 µl

*Pesar 0.01 g/100 µl de agua desionizada inmediatamente antes de usarse.

Apéndice 3. Gel de poliacrilamida al 4 % (gel de condensación de 1.5 mm)

Compuesto	Cantidad
Acrilamida 30 %-Bisacrilamida 0.8 %	704 µl
Amortiguador para el gel (pH 8.9)	1.320 ml
Agua desionizada	3.256 ml
Persulfato de amonio al 10 %	44 µl*
TEMED concentrado	5 µl

Apéndice 4. Acrilamida-bisacrilamida

Compuesto	Cantidad para 100 ml de H ₂ O desionizada
Acrilamida 30 % (w/v)	29.2 g
Bisacrilamida 0.8 % (w/v)	0.8 g

Apéndice 5. Amortiguador para el gel (pH 8.9)

Compuesto	Cantidad para 100 ml de H₂O desionizada
Tris (3 M)	36.342 g
SDS (0.3 %)	0.3 g
HCl (1 N)	8.6 ml
El pH final debe tener un valor igual o cercano a 8.9	

Apéndice 6. Amortiguador de corrida (2X)

Compuesto	Cantidad
Tris (0.1 M)	0.3029 g
SDS (10 %)	2.5 g
Glicerol (30 %, v/v)	7.5 ml
Azul de bromofenol (0.6 %)	0.15 g
Agua desionizada, cbp	25 ml
Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N	

Apéndice 7. Gel no desnaturizante de poliacrilamida al 4% (50 ml)

Compuesto	Cantidad
Acrilamida/bisacrilamida 40 % (37.5:1)	5 ml
Persulfato de amonio	250 µl*
TEMED concentrado	50 µl
TBE 1X	43.75 ml

Apéndice 8. Preparación de TBE (5X)

Compuesto	Cantidad para 1 L de agua desionizada
Tris (89 mM)	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA (0.5 M; pH 8)	20 ml

Apéndice 9. Amortiguador de transferencia

Compuesto	Cantidad
Tris (25 mM)	4.543 g
Glicina (192 mM)	21.62 g
Metanol (20 %)	300 ml
SDS (0.1 %)	1.5 g
Agua desionizada, cbp	1.5 L

Apéndice 10. Buffer salino a base de Tris (TBS)

Compuesto	Cantidad para 0.5 L de H₂O desionizada
Tris (50 mM)	3.029 g
NaCl (150 mM)	4.383 g
Ajustar el pH a 7.5 con HCl 6 N	

Para preparar el TTBS, se agregan 100 µl de Tween-20 a 100 ml de TBS

Apéndice 11. Marcaje del oligonucleótido para realizar EMSA

Compuesto	Cantidad
Buffer "A" PNK (Fermentas)	1 µl
T4 polinucleótido cinasa (Fermentas)	1 µl
Oligonucleótido (PROMEGA)	2 µl
Agua desionizada	5.5 µl
[γ ³² P]ATP	0.5 µl

Apéndice 12. Mezcla de reacción de unión para realizar EMSA

Compuesto	Cantidad
Buffer "D" (Fermentas)	2 µl
Poli dI-dC	1 µl
Oligonucleótido marcado	1 µl
BSA (100 mg/ml)	1 µl
Ditiotreitol (DTT 1.0 mM)	1 µl

Apéndice 13. Glicerol (1 g/ml)

Compuesto	Cantidad (ml)
Glicerol	39.683
Agua desionizada, cbp	50 ml
Densidad del glicerol, 1.26 g/ml	

Apéndice 14. Amortiguador del cátodo

Compuesto	Cantidad para 0.5 L de H₂O desionizada
Tris (0.1 M)	6.057 g
Tricina (0.1 M)	8.96 g
SDS (0.1 %)	0.5 g

El pH obtenido es de aproximadamente 8.04

Apéndice 15. Amortiguador del ánodo

Compuesto	Cantidad para 0.5 L de H₂O desionizada
Tris (0.2 M)	12.114 g
Ajustar el pH a 8.9 con HCl 1 N	