La prolactina estimula la endocitosis de *Staphylococcus aureus* en epitelio mamario bovino

Prolactin stimulates endocytosis of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary ephithelial cells

Alejandra Ochoa Zarzosa* Angelina Gutiérrez Barroso* Leticia Lara Zárate*
Pedro Damián Loeza Lara* José Luis Anaya López* Joel Edmundo López Meza*

Abstract

Bovine mastitis provokes inflammation of the mammary gland and is mainly caused by *Staphylococcus aureus*. Highest incidence occurs at drying off period and parturition, where prolactin (PRL) has a relevant function, although its role in the infection has not been studied. In this work, *in vitro* effect of the bovine PRL (1-50 ng/mL) on endocytosis and intracellular proliferation of *S. aureus* (ATCC 27543) in bovine mammary epithelial cells (BMEC) was evaluated. The BMEC treated during 24 h with 5 ng/mL of bPRL increases ~3 fold the endocytosis of *S. aureus*, besides inducing bacterial proliferation. This effect was specifically reverted by treating the BMEC with IgG anti-bPRL. *S. aureus* increased (~3 fold) its endocytosis in BMEC treated with bPRL (5 ng/mL), but the number of infected cells was not modified. In conclusion, the bPRL stimulates the endocytosis and the proliferation of *S. aureus* in BMEC.

Key words: BOVINE MASTITIS, PROLACTIN, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ENDOCYTOSIS.

Resumen

La mastitis bovina provoca la inflamación de la glándula mamaria y es ocasionada principalmente por *Staphylococcus aureus*. Presenta una incidencia mayor durante el parto o después de la lactancia, periodos en que la prolactina (PRL) tiene función relevante, aunque se desconoce su participación en la infección. En este trabajo se evaluó *in vitro*, el efecto de la PRL bovina (1-50 ng/mL) sobre la endocitosis y proliferación intracelular de *S. aureus* (ATCC 27543) en células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). Las CEMB tratadas durante 24 h con 5 ng/mL de bPRL incrementan ~3 veces la endocitosis de *S. aureus*, además de inducir la proliferación bacteriana. Este efecto fue revertido de manera específica tratando las CEMB con IgG anti-bPRL. Las CEMB tratadas con bPRL (5 ng/mL) presentaron mayor endocitosis de *S. aureus* (~3 veces), pero el número de células infectadas no se modificó. En conclusión, la presencia de bPRL favorece la endocitosis y la proliferación de *S. aureus* en las CEMB.

Palabras clave: MASTITIS BOVINA, PROLACTINA, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ENDOCITOSIS.

Recibido el 12 de septiembre 2006 y aceptado el 20 de abril de 2007.

*Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Apartado Postal 53, Administración Chapultepec, 58262, Morelia, Michoacán, México.
Autor para correspondencia: Dr. Joel Edmundo López Meza, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Acueducto esq. Tzintzuntzan s/n, Col. Matamoros, 58000, Morelia, Michoacán, México, Tele-Fax: (443) 295 80 29, correo electrónico: elmeza@zeus.umich.mx

Introduction

Bovine mastitis is a pathology of complex etiology, with clinical and subclinical manifestations, that generates considerable worldwide economic losses in dairy cattle. This pathology is characterized by inflammatory response of the mammary gland in the presence of infections by microorganisms, mainly of bacterial origin, that frequently invade and destroy the epithelial tissue of the mammary gland.[1] The highest incidence of udder infection, and, consequently, the presence of mastitis, is manifested during calving or after drying off periods.[2,3] These periods are characterized by presenting important physiological changes related with milk production and female's metabolism. Nevertheless, the function that lactogenic hormones exert, such as prolactin (PRL), during the infection process of mammary epithelium and the development of mastitis is unknown.

PRL is a protein hormone that has been associated with more than 300 different functions that comprehend reproductive, immunologic, behavioral, osmoregulating and some pathologic processes, for which it has been reconsidered as growth factor, neurotransmitter, and inclusive as cytokine.[4] During the presence of bovine lactation and parturition, PRL regulates diverse metabolic functions of the mammary epithelium, mainly stimulating the protein synthesis of milk, and together with growth hormone regulates milk production.[5,6] In spite of the functional diversity of this hormone, little study has been done on its participation on the onset of infection and in the endocytosis of pathogen microorganisms by the host's cells. In this sense, the inductor effect of PRL on the intracellular multiplication of *Mycobacterium avium* in bovine macrophages, and on the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii* in murine microglia has been described.[7,8]

Staphylococcus aureus is the pathogen that most frequently is isolated in mastitis cases (> 70%) and its capacity to infect mammary epithelium has been demonstrated *in vivo* and *in vitro* in cell cultures of bovine mammary epithelium.[9] With *in vivo* mastitis models, no changes have been detected in plasmatic concentrations of PRL of infected cows.[10] In addition to the effect that hypophyseal PRL exerts over the mammary epithelium, the autocrine/paracrine action and production of this hormone has been notified in this tissue.[11] Nevertheless, up to this moment the participation of the PRL has not been evaluated on the onset of the infection by *S. aureus*, in which adhesion events and endocytosis in bovine mammary epithelial cells are present.[12] Therefore, the aim of the present work consists on determining the participation of PRL in the process of endocytosis of *S. aureus* by the bovine

Introducción

La mastitis bovina es una patología de etiología compleja, con manifestaciones subclínicas y clínicas, que genera pérdidas económicas considerables en la ganadería lechera en todo el mundo. Esta patología se caracteriza por la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria ante infecciones por microorganismos, principalmente de origen bacteriano, que con frecuencia invaden y destruyen el tejido epitelial de la glándula mamaria.[1] La incidencia más alta de la infección de la ubre, y, por consiguiente, del establecimiento de la mastitis, se presenta durante el periodo de parto o luego del cese de la lactancia.[2,3] Estos periodos se caracterizan por presentar cambios fisiológicos importantes relacionados con la producción de leche y el metabolismo de la hembra. Sin embargo, se desconoce la función que ejercen las hormonas lactogénicas como la prolactina (PRL), durante el proceso de infección del epitelio mamario y el desarrollo de la mastitis.

La PRL es una hormona proteínica que se ha asociado con más de 300 funciones diferentes que comprenden procesos reproductivos, inmunológicos, conductuales, osmorreguladores y algunos patológicos, por lo que se le ha reconsiderado como factor de crecimiento, neurotransmisor, e incluso como citocina.[4] Durante el establecimiento de la lactancia bovina y el parto, la PRL regula diversas funciones metabólicas del epitelio mamario, estimulando principalmente la síntesis de las proteínas de la leche, y en conjunto con la hormona de crecimiento regula la producción láctea.[5,6] A pesar de la diversidad funcional de esta hormona, se ha estudiado poco su participación en el establecimiento de la infección y en la endocitosis de microorganismos patógenos por las células del portador. En este sentido, se ha descrito el efecto inductor de la PRL en la multiplicación intracelular de *Mycobacterium avium* en macrófagos bovinos, y en la proliferación intracelular de *Toxoplasma gondii* en células de la microglia murina.[7,8]

Staphylococcus aureus es el patógeno que con mayor frecuencia se aísla de casos de mastitis (> 70%) y su capacidad de infectar el epitelio mamario se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* en cultivos de células de epitelio mamario bovino.[9] Con modelos de mastitis *in vivo*, no se han detectado cambios en las concentraciones plasmáticas de la PRL de las vacas infectadas.[10] Además del efecto que la PRL hipofisiaria ejerce sobre el epitelio mamario, la producción y acción autocrina/paracrina de esta hormona se ha notificado en este tejido.[11] Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la participación de la PRL en el establecimiento de la infección por *S. aureus*, en la que se presentan eventos de adhesión y endocitosis en las células epiteliales

mammary epithelial cells and intracellular bacterial proliferation.

Material and methods

Bacteria

Pathogenic strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 was used, cultivated in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C, coming from a clinical mastitis case.

Prolactin

The experiments were done with the standard of bovine prolactin (bPRL) from the National Health Institutes (United States of America).

Bovine mammary epithelial cell culture (BMEC)

The BMEC used in this work were isolated and cultured as previously described.[12] For its culture a mix of Dulbecco's minimum essential medium and F12 Ham (DMEM/F12*) was used, supplemented with penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively), 10% fetal bovine serum, insuline and hydrocortisone (10 µg/mL of each one).

Infection assays of the BMEC with Staphylococcus aureus

The infection assays were done in culture dishes of 24 wells** with confluent layers of BMEC, composed of 2×10^5 cells. Cells were infected during 2 h at 37°C with *S. aureus* strain. The bacterial inoculate was obtained from cultures grown during 16 h in Luria-Bertani*** at 37°C, establishing a standard of 6×10^6 colony forming units (CFU)/mL in DMEM/12 medium, without serum and antibiotics. A multiplicity of infection (MOI) of 30 bacteria per epithelial cell was used. To evaluate the effect of bPRL, this was added to the BMEC 24 h before and during infection in DMEM/F12 medium, without serum. To determine the specific effect of bPRL, competence assays were done with IgG anti-bPRL (10 µg), which were added to BMEC at the moment of adding bPRL. With the aim of eliminating the non endocyted bacteria, in all assays the BMEC were treated with 50 µg/mL of gentamicin during 1 h. After the infection, the BMEC were detached from the culture dish with trypsin-EDTA (0.25%-0.5 mM*) and were lysed with sterile water. The cell lysates were distributed in Petri dishes with LB agar and incubated for 18 h at 37°C. The number of recovered CFU, corresponding to the endocyted bacteria, was determined by plaque-forming count.

To determine the number of endocyted bacteria

mamarias bovinas.[12] Por ello, el objetivo del presente trabajo consistió en determinar la participación de la PRL en el proceso de endocitosis de *S. aureus* por células epiteliales mamarias bovinas y en la proliferación bacteriana intracelular.

Material y métodos

Bacteria

Se empleó la cepa patógena de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543, cultivada en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C, proveniente de un caso de mastitis clínica.

Prolactina

Los experimentos se realizaron con el estándar de prolactina bovina (bPRL) de los Institutos Nacionales de Salud (Estados Unidos de América).

Cultivo de células epiteliales mamarias bovinas (CEMB)

Las CEMB utilizadas en este trabajo se aislaron y cultivaron como se ha descrito previamente.[12] Para su cultivo se empleó la mezcla de medio mínimo esencial de Dulbecco y F12 de Ham (MMED/F12*), complementado con penicilina-estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente), 10% de suero fetal bovino, insulina e hidrocortisona (10 µg/mL de cada una).

Ensayos de infección de las CEMB con Staphylococcus aureus

Los ensayos de infección se realizaron en cajas de cultivo de 24 pozos** con monocapas confluentes de CEMB, compuestas por 2×10^5 células. Las células se infectaron durante 2 h a 37°C con la cepa de *S. aureus*. El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de cultivos crecidos durante 16 h en medio Luria-Bertani*** a 37°C, estableciendo un estándar de 6×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en medio MMED/F12, sin suero y sin antibióticos. Se empleó una multiplicidad de infección (MDI) de 30 bacterias por célula epitelial. Para evaluar el efecto de la bPRL, ésta se agregó a las CEMB 24 h antes y durante la infección en medio MMED/F12, sin suero. Para determinar el efecto específico de la bPRL, se realizaron ensayos de competencia con IgG anti-bPRL (10 µg), las cuales se adicionaron a las CEMB al momento de añadir la bPRL. Con el propósito de eliminar las bacterias no endocitadas, en todos los ensayos las CEMB se

*Sigma, Estados Unidos de América.
**Costar-Corning, Estados Unidos de América.
***Difco, Estados Unidos de América.

for each BMEC, infection assays were done in round coverslides covered with gelatin at 2%,** in which confluent monolayers of BMEC were cultured, composed of 3×10^5 cells. BMEC were infected for 2 h with *S. aureus* at a MOI of 30:1, as previously described. To eliminate non endocyted bacteria, the BMEC were treated with 50 µg/mL of gentamicin during 1 h and then fixed with paraformaldehyde*** at 4% in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), during 10 min, then washed three times with PBS, and were observed and photographed using clear field microscopy with a 100X† objective. To estimate the number of endocyted bacteria in the BMEC 30 different fields were counted from the taken photographs with the computing program Leica Qwin Standard v 2.3.‡

To evaluate intracellular proliferation of *S. aureus* in BMEC, a MOI of 30:1 was used, and the assays of infection were done during 15 min; cells were treated with 50 µg/mL of gentamicin for 1 h, later, the cells were detached from the culture dish at different post-infection timings (2, 4 and 8 h). BMEC were processed as previously described. The number of endocyted bacteria was expressed as quotient CFU/BMEC.

Generation and purification of IgG anti-bPRL

The polyclonal anti-bPRL antibodies were generated by subcutaneous immunization of New Zealand rabbits. The bPRL was separated by electrophoresis on polyacrylamide gels at 10%, visualized with Coomassie blue. The correspondent band for bPRL was obtained from the gel, it was equilibrated at pH 7.2 with PBS and homogenized. The immunizations were developed in weekly intervals, until administering from 30 to 40 µg of protein per rabbit (doe). Blood was collected from the auricular vein two weeks after the last immunization and the serum was separated. The immune serum titter was determined by dot inmunoblot.[13] The IgG of the immune serum were purified in columns of protein A-sepharose* in accordance to previous reports.[14] The immune serum was added to previously equilibrated and washed columns with PBS (pH 8). The IgG were eluted from the column with a solution 0.1 M of sodium acetate (pH 3) and collected in tubes with 1.5 M of Tris-HCL (pH 7.5). The concentration of IgG was determined by the Bradford method and electrophoresis in polyacrylamide gel.[13] The activity of the IgG was evaluated in the Nb2 cellular line from rat lymphoma.[15] The IgG were used to determine the specific effect of bPRL, as described in the infection assays' section.

Bioassay on Nb2 cells

The assay on Nb2 cells was used to evaluate the IgG

trataron con 50 µg/mL de gentamicina durante 1 h. Después de la infección, las CEMB se despegaron del plato de cultivo con tripsina-EDTA (0.25%-0.5 mM*) y se lisaron con agua estéril. Los lisados celulares se distribuyeron en cajas Petri con agar LB y se incubaron por 18 h a 37°C. El número de UFC recuperadas, correspondientes a las bacterias endocitadas, se determinó mediante conteo en placa.

Para determinar el número de bacterias endocitadas por cada CEMB, se realizaron ensayos de infección en cubreobjetos redondos cubiertos con gelatina al 2%,** en los cuales se cultivaron monocapas confluentes de CEMB, compuestas por 3×10^5 células. Las CEMB se infectaron por 2 h con *S. aureus* a una MDI de 30:1, como se describió anteriormente. Para eliminar las bacterias no endocitadas, las CEMB se trataron con 50 µg/mL de gentamicina durante 1 h. Después de la infección, las CEMB se fijaron con paraformaldehído*** al 4% en fosfato salino amortiguado (PBS, pH 7.4), durante 10 min, luego se lavaron tres veces con PBS, se observaron y se fotografiaron empleando microscopía de campo claro con un objetivo de 100X† Para estimar el número de bacterias endocitadas en las CEMB se contaron 30 campos diferentes a partir de las fotografías tomadas con el programa de cómputo Leica QWin Standard v 2.3.‡

Para evaluar la proliferación intracelular de *S. aureus* en las CEMB, se empleó una MDI de 30:1, y los ensayos de infección se realizaron durante 15 min; se trataron con 50 µg/mL de gentamicina durante 1 h, y luego las células se despegaron del plato de cultivo a diferentes tiempos posinfección (2, 4 y 8 h). Las CEMB se procesaron como se describió anteriormente. El número de bacterias endocitadas se expresó como el cociente UFC/CEMB.

Generación y purificación de las IgG anti-bPRL

Los anticuerpos policlonales anti-bPRL se generaron inmunizando subcutáneamente a conejas Nueva Zelanda. La bPRL se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, visualizados con azul de Coomassie. La banda correspondiente a la bPRL se obtuvo del gel, se equilibró a pH 7.2 con PBS y se homogeneizó. Las inmunizaciones se desarrollaron en intervalos semanales, hasta administrar de 30 a 40 µg de proteína por coneja. La sangre se recolectó de la vena auricular dos semanas después de la última inmunización y se separó el suero. El título del suero inmune se determinó mediante dot inmunoblot.[13]

*Sigma, Estados Unidos de América.
**Sigma, Estados Unidos de América.
***Sigma, Estados Unidos de América.
†Leica Microsystems, Alemania.
‡Leica Microsystems, Alemania.

specificity. These cells come from a rat lymphoma and only proliferate as a response to PRL and other lactogenic hormones, reason why they are used as bioassays for these hormones.[15] Cells were cultivated in DMEM medium supplemented with antibiotics, 10% fetal bovine and 10% horse serum. For the bioassay 2 500 cells/well were seeded in supplemented medium only with antibiotics and 10% horse serum. Different concentrations were added of bPRL alone or in presence of 10 µg of IgG. It was incubated for 48 h at 37°C, and later cellular proliferation was determined by means of tetrazolium salt reduction assay MTT,** optic density was determined at 595 nm.[16]

BMEC viability assay

To evaluate the viability of infected BMEC the trypan blue*** exclusion method was used and the number of BMEC was determined by count in an hemocytometer.[16]

Statistical analysis

Each experiment was done at least twice by triplicate. Mean comparisons were done by Student's t or ANOVA tests. Significant differences were considered when $P \leq 0.05$.

Results

In the present study the participation of bovine prolactin (bPRL) was evaluated on endocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary epithelial cells (BMEC). Concentrations of bPRL were evaluated in the range of 1 to 50 ng/mL. The BMEC responded to the different concentrations of bPRL through a bell-shape curve. It was observed that BMEC previously cultured with 5 ng/mL of bPRL during 24 h and after being infected for 2 h with *S. aureus,* increase ~3 times its capacity to endocyte bacteria, in relation to the control without treatment with bPRL (Figure 1). Likewise, the obtained results allowed to determine that the treatment of BMEC with low (< 5 ng/mL) or high (> 10 ng/mL) doses of bPRL, did not modify the level of endocytosis of *S. aureus*, since there were no significant differences in relation to the cells without hormonal treatment.

With the aim to demonstrate that the stimulating effect of bPRL on endocytosis of *S. aureus* in BMEC is specific for this hormone, assays of competence were done with anti-bPRL antibodies. For this purpose, female rabbits of New Zealand breed were immunized with the purpose to generate polyclonal anti-bPRL antibodies, and from immune serum IgG were purified. The specificity and inhibitory effect of IgG were

Las IgG del suero inmune se purificaron en columnas de proteína A-sefarosa* de acuerdo con informes previos.[14] El suero inmune se añadió a columnas previamente equilibradas y lavadas con PBS (pH 8). Las IgG se eluyeron de la columna con una solución 0.1 M de acetato de sodio (pH 3) y se recolectaron en tubos con 1.5 M de Tris-HCl (pH 7.5). La concentración de IgG se determinó por el método de Bradford y por electroforesis en gel de poliacrilamida.[13] La actividad de las IgG se evaluó en la línea celular de linfoma de rata Nb2.[15] Las IgG se utilizaron para determinar el efecto específico de la bPRL, como se describe en el apartado de los ensayos de infección.

Bioensayo en las células Nb2

Se empleó el ensayo en células Nb2 para evaluar la especificidad de las IgG. Estas células provienen de un linfoma de rata y proliferan únicamente como respuesta a la PRL y otras hormonas lactogénicas, por lo que son empleadas como bioensayo para estas hormonas.[15] Se cultivaron las células en medio MMED complementado con antibióticos, 10% de suero fetal bovino y 10% de suero de caballo. Para el bioensayo se sembraron 2 500 células/pozo en medio complementado únicamente con antibióticos y 10% de suero de caballo. Se añadieron distintas concentraciones de la bPRL sola o en presencia de 10 µg de las IgG. Se incubó durante 48 h a 37°C, y posteriormente se determinó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio MTT,** la densidad óptica se determinó a 595 nm.[16]

Ensayo de viabilidad de las CEMB

Para evaluar la viabilidad de las CEMB infectadas se empleó el método de exclusión de azul de tripano*** y se determinó el número de CEMB mediante el conteo en hemocitómetro.[16]

Análisis estadístico

Cada experimento se efectuó al menos dos veces por triplicado. Se realizaron comparaciones de medias mediante las pruebas t de Student o ANDEVA. Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

Resultados

En el presente trabajo se evaluó la participación de la prolactina bovina (bPRL) en la endocitosis de *Staphylococcus aureus* por las células epiteliales mamarias

*Sigma, Estados Unidos de América.
**Sigma, Estados Unidos de América.
***Sigma, Estados Unidos de América.

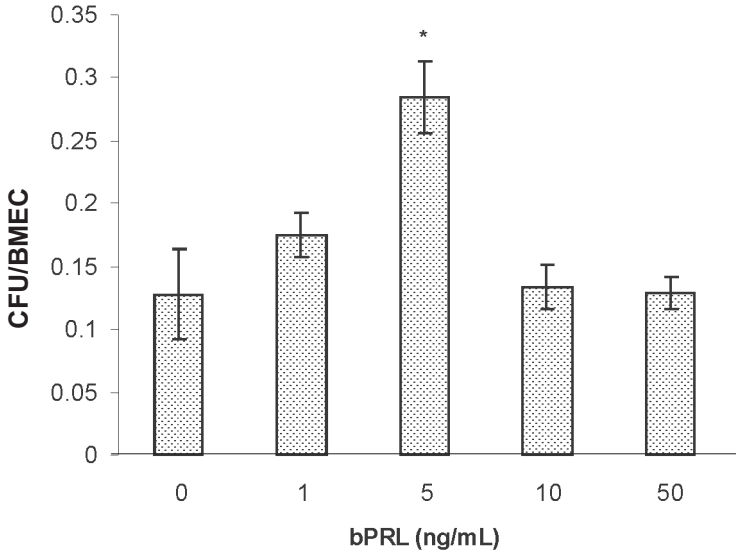

Figura 1: Efecto de prolactina bovina (bPRL) sobre la endocitosis de *Staphylococcus aureus* por las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). El número de bacterias endocitadas se expresa como el cociente UFC/CEMB. Los datos corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. *P ≤ 0.05 con respecto al tratamiento sin la bPRL.

Figure 1: Bovine prolactin effect (bPRL) on endocytosis of *Staphylococcus aureus* by mammary epithelial cells (BMEC). The number of endocyted cells is express as the quotient CFU/BMEC. Data correspond to the average of four independent experiments done by triplicate. *P ≤ 0.05 in respect of treatment without bPRL.

initially evaluated on the line of rat lymphoma Nb2, which it is known that it proliferates in a specific way to bPRL. As shown in Figure 2A, Nb2 cells proliferate in response to increasing concentrations of bPRL; nevertheless, when this hormone was jointly added to IgG (10 µg), this effect was reverted depending on the bPRL concentration, showing that the IgG generated may inhibit the stimulating effect of bPRL on Nb2 cells. Once the specificity and inhibitory effect of IgG anti-bPRL was determined on Nb2 cells, the inhibitory effect of these on endocytosis of *S. aureus* in BMEC, promoted by bPRL was evaluated. BMEC in presence of bPRL (5 ng/mL) and IgG anti-bPRL (10 µg) endocyte a smaller number of *S. aureus* (~3 times), in accordance with the number of CFU recovered after the infection and lyses of BMEC (Figure 2B). This behavior was similar to the one presented by BMEC without treatment with bPRL and shows that the effect of this hormone on endocytosis of *S. aureus* in BMEC is specific.

Once the promoter effect of the endocytosis by bPRL and its specificity were determined, the subsequent experiments were done with a bPRL concentration of 5 ng/mL, because in this concentration it was observed major endocytosis. Further on, bPRL effect on intracellular proliferation of *S. aureus* in BMEC was evaluated. For this, the BMEC were infected during 15 min and cultured at different post-infection times (2-8 h). At the end of these periods, BMEC were lysed and processed according to the described in "Material and methods" section. The obtained results showed that since the beginning of the infection, the BMEC treated with bPRL endocyte a greater number of bacteria; at 0.5 h, treated cells with hormone endocyte ~3 times more bacteria than BMEC without treatment (Figure 3A). This behavior was maintained until 8 h

bovinas (CEMB). Se evaluaron concentraciones de la bPRL en el rango de 1 a 50 ng/mL. Las CEMB respondieron a las distintas concentraciones de la bPRL a través de una curva con "forma de campana". Se observó que las CEMB cultivadas previamente con 5 ng/mL de la bPRL durante 24 h y luego de ser infectadas por 2 h con *S. aureus*, incrementan ~3 veces su capacidad para endocitar las bacterias, en relación con el testigo sin tratamiento con la bPRL (Figura 1). Asimismo, los resultados obtenidos permitieron determinar que el tratamiento de las CEMB con dosis bajas (< 5 ng/mL) o altas (> 10 ng/mL) de la bPRL, no modificó el nivel de endocitosis de *S. aureus*, ya que no existieron diferencias significativas con respecto a las células sin tratamiento con la hormona.

Con el propósito de demostrar que el efecto estimulador de la bPRL sobre la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB es específico para esta hormona, se realizaron ensayos de competencia con anticuerpos anti-bPRL. Para este fin, se inmunizaron conejas de la raza Nueva Zelanda con el objeto de generar anticuerpos policlonales anti-bPRL, y a partir del suero inmune se purificaron las IgG. La especificidad y el efecto inhibitorio de las IgG se evaluaron inicialmente en la línea de linfoma de rata Nb2, la cual se sabe que prolifera de manera específica a la bPRL. Como se muestra en la Figura 2A, las células Nb2 proliferan en respuesta a concentraciones crecientes de la bPRL; sin embargo, cuando se añade esta hormona en conjunto con las IgG (10 µg), se revierte este efecto de manera dependiente de la concentración de la bPRL, demostrando que las IgG generadas pueden inhibir el efecto estimulador de la bPRL en las células Nb2. Una vez determinada la especificidad y efecto inhibitorio de las IgG anti-bPRL en las células Nb2, se evaluó el efecto inhibitorio de éstas sobre la endocitosis de *S. aureus* en las

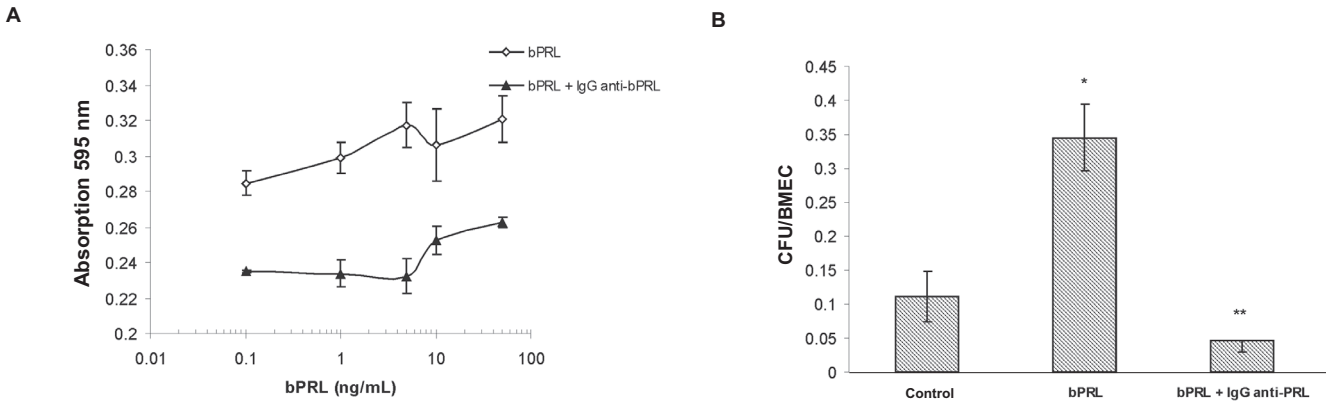

Figura 2: Evaluación de la especificidad de la prolactina bovina (bPRL) sobre la endocitosis de *Staphylococcus aureus* por las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). A. Ensayo de dosis-respuesta de la bPRL e IgG anti-bPRL en células Nb2. Los datos corresponden a un experimento realizado por quintuplicado. B. Inhibición del efecto promotor de la bPRL sobre la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB. La gráfica corresponde al promedio de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. *P < 0.05 con respecto al tratamiento sin la bPRL.

Figure 2: Evaluation of bovine prolactin specificity (bPRL) on the endocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary epithelial cells (BMEC). A. Assay of dose-response of bPRL and IgG anti-bPRL in cells Nb2. Data correspond to an experiment done by quintuple. B. Inhibition of the promoter effect of bPRL on the endocytosis of *S. aureus* by BMEC. The graphic corresponds to the average of four independent experiments done by triplicate. *P < 0.05 with respect to treatment without bPRL.

post- infection. After this period it was not possible to determine the effect of bPRL on the endocytosis of *S. aureus* in BMEC, because cells started to die (Figure 3B).

Up to date, results establish that bPRL stimulates endocytosis of *S. aureus* in BMEC in a specific way, and that this effect is maintained during the first post-infection hours. With the aim to determine if the observed differences between the treatments were due to a greater number of infected BMEC, or an increment in the number of *S. aureus* endocyted for each BMEC, the infected cells and endocyted bacteria were counted. For that purpose, infection assays were done in round coverslides covered with gelatin, in which BMEC were cultured, and were infected for 2 h with *S. aureus*. Later, treated and not treated individual cells with 5 ng/mL of bPRL were counted. The generated results allowed to establish that the treatment of BMEC with bPRL did not modify the number of cells infected with *S. aureus* in relation to the control cells, since in both situations 50% of cell's infection was estimated (Figure 4A). Nevertheless, it was observed that bPRL had a notorious effect on the number of endocyted *S. aureus* by BMEC treated with this hormone. The BMEC treated with 5 ng/mL of bPRL, endocyte more bacteria than the control cells (Figure 4C and D). When quantifying this result it was found that 75% of the treated cells with bPRL contained more than 20 bacteria/cell, in contrast to control cells or cells treated with IgG anti-bPRL (Figure 4B). This result suggests that bPRL favors endocytosis of a greater number of *S. aureus* in BMEC.

CEMB, promovida por la bPRL. Las CEMB en presencia de la bPRL (5 ng/mL) e IgG anti-bPRL (10 µg) endocitan un número menor de *S. aureus* (~3 veces), de acuerdo con el número de UFC recuperadas después de la infección y lisis de las CEMB (Figura 2B). Este comportamiento es similar al que presentan las CEMB sin tratamiento con la bPRL y demuestra que el efecto de esta hormona sobre la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB es específico.

Una vez determinado el efecto promotor de la endocitosis por la bPRL y de su especificidad, los experimentos subsecuentes se realizaron con una concentración de 5 ng/mL de la bPRL debido a que en esta concentración se observó endocitosis mayor. A continuación se evaluó el efecto de la bPRL sobre la proliferación intracelular de *S. aureus* en las CEMB. Para ello, las CEMB se infectaron durante 15 min y se cultivaron a diferentes tiempos posinfección (2-8 h). Al final de estos periodos, las CEMB se lisaron y se procesaron de acuerdo con lo descrito en la sección "Material y métodos". Los resultados obtenidos mostraron que desde el inicio de la infección, las CEMB tratadas con la bPRL endocitan un número mayor de bacterias; a las 0.5 h, las células tratadas con la hormona endocitan ~3 veces más bacterias que las CEMB sin tratamiento (Figura 3A). Este comportamiento se mantuvo hasta las 8 h posinfección. Después de este periodo no fue posible determinar el efecto de la bPRL sobre la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB, debido a que las células comenzaron a morir (Figura 3B).

Los resultados descritos hasta ahora establecen que la bPRL estimula la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB de manera específica, y que este efecto se mantiene durante las primeras horas posinfección. Con el

Discussion

Mastitis is one of the diseases that most affects dairy bovine cattle, and it is caused by a great variety of microorganisms, among them *Staphylococcus aureus*. The highest incidence of infection of the udder occurs during calving or when lactation ceases, physiological stages characterized by high plasmatic levels of prolactin (bPRL).[2,3] This apparent association among the plasmatic levels of bPRL and mastitis incidence induced to hypothesize that bPRL favors endocytosis of *S. aureus* in BMEC and, as consequence, the onset of the disease.

Data shown in this study allowed to establish that BMEC previous treatment during 24 h with 5 ng/mL of bPRL favors endocytosis of *S. aureus* (Figure 1). Nevertheless, the use of lower concentrations to 1 ng/mL or higher than 10 ng/mL of bPRL, did not show differential effect in respect of the control one. This result generated a response through a bell-shape curve, that corresponds to the way of interaction that bPRL presents with its receptor, which is located in the membrane of mammary epithelial cells. This behavior suggests that the inductor effect of endocytosis on BMEC by bPRL is initially due to its receptor activation, and that treatment with high doses does not induce a higher response because the receptor is saturated.[17] The observed promoter effect of bPRL at doses of 5 ng/mL is also related to the physiological concentrations of the registered hormone in lactating bovines, in which there have been detected near values to 5 ng/mL.[10] By *in vitro* studies, it has been demonstrated that *S. aureus* can invade macrophages, epithelial and endothelial cells, fibroblasts, osteo-

objetivo de determinar si las diferencias observadas entre los tratamientos se debían al mayor número de CEMB infectadas, o a un incremento en el número de *S. aureus* endocitados por cada CEMB, se contaron las células infectadas y las bacterias endocitadas. Para ello se realizaron ensayos de infección en cubreobjetos redondos cubiertos con gelatina, en los que se cultivaron las CEMB, y se infectaron por 2 h con *S. aureus*. Luego se contaron células individuales tratadas y no tratadas con 5 ng/mL de la bPRL. Los resultados generados permitieron establecer que el tratamiento de las CEMB con la bPRL no modificó el número de células infectadas con *S. aureus* con respecto a las células testigo, pues en las dos situaciones se estimó 50% de infección de las células (Figura 4A). Sin embargo, se observó que la bPRL sí tuvo un efecto notorio sobre el número de *S. aureus* endocitados por las CEMB tratadas con esta hormona. Las CEMB tratadas con 5 ng/mL de la bPRL, endocitan más bacterias que las células testigo (Figura 4C y D). Al cuantificar este resultado se encontró que 75% de las células tratadas con la bPRL contienen más de 20 bacterias/célula, a diferencia de las células testigo o las células tratadas con IgG anti-bPRL (Figura 4B). Este resultado sugiere que la bPRL favorece la endocitosis de un número mayor de *S. aureus* en las CEMB.

Discusión

La mastitis es una de las enfermedades que más afecta al ganado bovino lechero, y es provocada por gran variedad de microorganismos, entre ellos *Staphylococcus aureus*. La incidencia más alta de infección de la ubre ocurre durante el periodo de parto o cuando

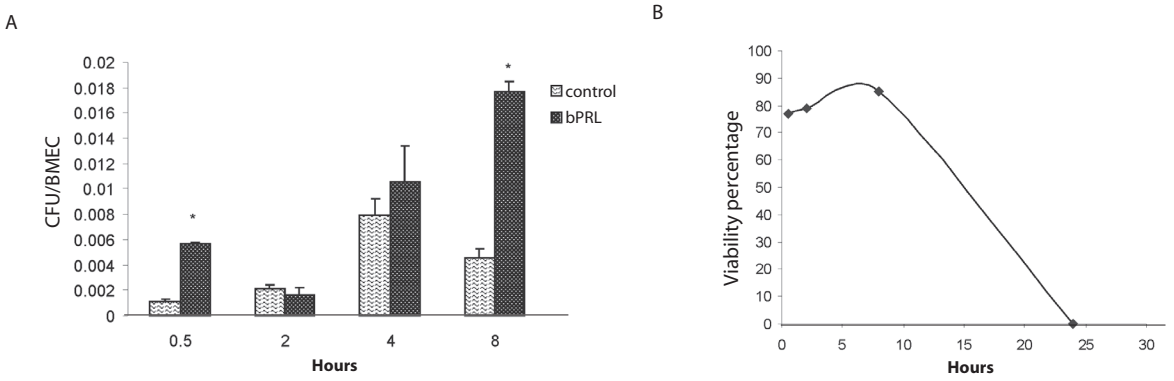

Figura 3: Efecto de la prolactina bovina (bPRL) sobre la proliferación de *Staphylococcus aureus* en las células epiteliales mamarias bovinas (CEMB). A. Proliferación de *S. aureus* en las CEMB después de diferentes tiempos de incubación. Se presenta el promedio de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *P < 0.05 con respecto a los tratamientos sin la bPRL. B. Viabilidad de las CEMB infectadas con *S. aureus*. Se muestra el promedio de triplicados y corresponde a la media de dos experimentos independientes.

Figure 3: Effect of bovine prolactin (bPRL) on the proliferation of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary epithelial cells (BMEC). A. Proliferation of *S. aureus* in BMEC after different times of incubation. The average of two independent experiments done by triplicate is presented. *P < 0.05 in respect of treatments without bPRL. B. Viability of infected BMEC with *S. aureus*. The average of triplicates is shown and corresponds to the mean of two independent experiments.

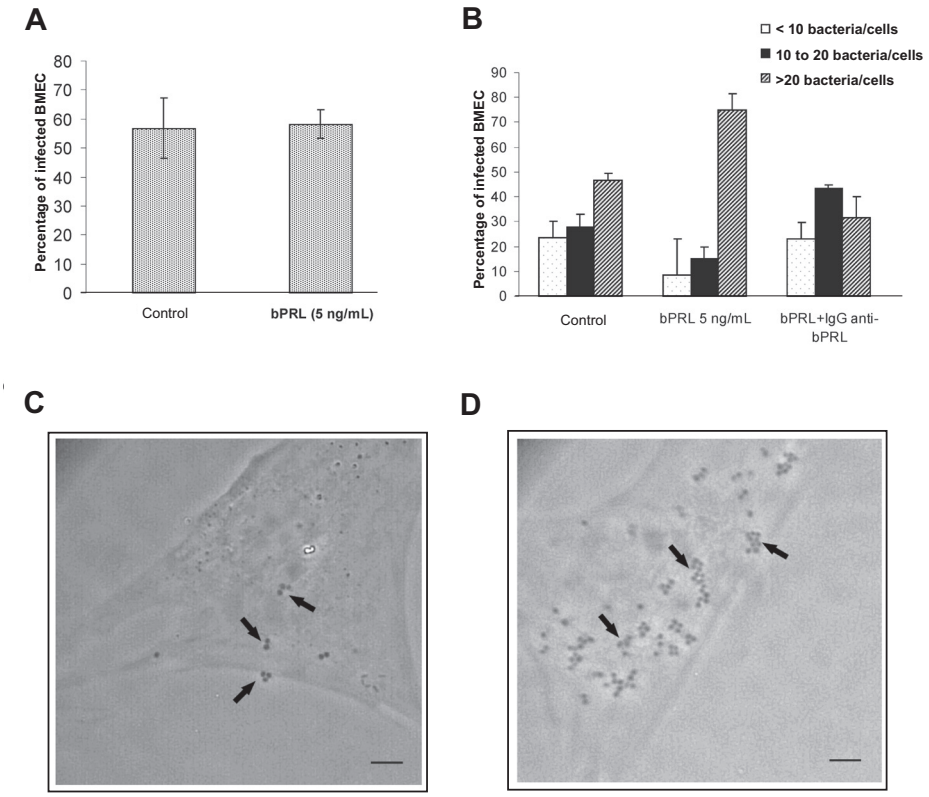

Figura 4: Efecto de la prolactina bovina (bPRL) sobre el número de células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) que endocitan *Staphylococcus aureus*. A) Número de CEMB infectadas por *S. aureus*. B) Número de bacterias endocitadas en las CEMB C) y D) Fotografías de CEMB infectadas sin la bPRL (testigo) e infectadas en presencia de 5 ng/mL de la bPRL, respectivamente. Las bacterias están señaladas con flechas. Barras de escala: 1 µm. A y B corresponden al promedio de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *P ≤ 0.05 con respecto al tratamiento sin la bPRL.

Figure 4: Bovine prolactin effect (bPRL) on the number of bovine mammary epithelial cells (BMEC) that endocyte *Staphylococcus aureus*. A) Number of infected BMEC by *S. aureus*. B) Number of endocyted bacteria in BMEC. C) and D) Photographs of infected BMEC without bPRL (control) and infected with 5 ng/mL of bPRL, respectively. Bacteria are marked with arrows. Scale bars: 1 µm. A and B correspond to the average of two independent experiments done by triplicate. *P ≤ 0.05 in respect of treatment without bPRL.

blasts, keratinocytes and renal cells,[18] through an active participation of cytoskeleton. It has also been notified that bPRL can induce a cytoskeleton modification through microtubules net,[19] which could partially explain the promoter effect of bPRL on *S. aureus* endocytosis in BMEC. Cultures of BMEC utilized in this work are found polarized on collagen matrixes. This fact favors bPRL interaction with its receptor on the epithelial cell apical surface; in consequence, it can facilitate endocytosis of microorganisms coming from milk towards BMEC. Until the moment, this is the first report that shows an effect of bPRL and endocytosis of microorganisms associated with bovine mastitis. Although molecular mechanisms that participate in this process are unknown, there have been similar results of regulated infection by PRL for *Mycobacterium avium* in bovine macrophages registered,[7] these do not modify their phagocytes' rate in presence of doses >10 ng/mL of bPRL, but when macrophages are treated during five days with bPRL, higher intracellular multiplication is present. Likewise, this result supports *in vivo* evidences that demonstrate that a high incidence period of mastitis occurs during calving, when there are high concentrations of PRL.[10]

It can be demonstrated that the stimulatory effect of bPRL on endocytosis of *S. aureus* by BMEC was specific, New Zealand rabbits were immunized with bPRL and immune serum was obtained from which IgG anti-bPRL were purified. In competence assays, pre-

cesa la lactancia, estados fisiológicos caracterizados por altos niveles plasmáticos de prolactina bovina (bPRL).[2,3] Esta aparente asociación entre los niveles plasmáticos de la bPRL y la incidencia de la mastitis indujo a plantear la hipótesis de que la bPRL favorece la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB y, como consecuencia, el establecimiento de la enfermedad.

Los datos mostrados en este trabajo permitieron establecer que el tratamiento previo de las CEMB durante 24 h con 5 ng/mL de la bPRL favorece la endocitosis de *S. aureus* (Figura 1). Sin embargo, el uso de concentraciones menores a 1 ng/mL o mayores de 10 ng/mL de bPRL, no mostraron efecto diferencial respecto del testigo. Este resultado generó una respuesta a través de una curva en forma de campana (*bell-shape curve*), lo que corresponde con el modo de interacción que presenta la bPRL con su receptor, el cual está localizado en la membrana de las células epiteliales mamarias. Este comportamiento sugiere que el efecto inductor de la endocitosis en las CEMB por la bPRL se debe inicialmente a la activación de su receptor, y que el tratamiento con dosis altas no induce una respuesta mayor debido a que el receptor se encuentra saturado.[17] El efecto promotor de la bPRL observado a dosis de 5 ng/mL se relaciona también con las concentraciones fisiológicas de la hormona registrada en bovinos lactantes, en los cuales se han detectado valores cercanos a 5 ng/mL.[10] Mediante estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que *S. aureus* puede

vious treatment of BMEC with IgG anti-bPRL, inhibited the stimulatory effect of PRL endocytosis on a similar level to that of cells without treatment (Figure 2B). This result supports the idea that the stimulatory effect of endocytosis on *S. aureus* by bPRL in BMEC, is due to the activation of the receptor present in BMEC membrane.[17] Nevertheless, as it has been noticed, it is still unknown which are the involved molecular mechanisms in this bPRL effect.

Likewise, treatment of BMEC with 5 ng/mL of bPRL favors bacteria proliferation beginning with 4 h incubation. This fact can be the result that since the beginning a great number of bacteria were endocyted (Figure 3A). These results coincide with similar effects of bPRL on endocytosis and intracellular growth of *M. avium* by bovine macrophages.[7] However, bPRL effect on intracellular proliferation of *S. aureus* was not possible to evaluate on BMEC after 8 h of infection, because BMEC began to die (Figure 3B). This circumstance can be due to induction of program cellular death, or apoptosis, in BMEC, that has been registered in this cellular type after *S. aureus* infection.[20]

In conclusion, the results of this study indicate that bPRL at physiological concentrations, stimulates endocytosis of *S. aureus* in BMEC. In this sense, mentioned data support the theory that pathogen microorganisms, as *S. aureus*, utilize the environment of its host to infect it, as is the case of bPRL in bovine mammary epithelium.

Acknowledgements

Authors give special thanks to Dr. Carmen Clapp (Neurobiology Institute, National Autonomous University of Mexico, Juriquilla, Queretaro) for the donation of bovine prolactin, and to Dr. Victor M. Baizabal (Multidisciplinary Center of Biotechnological Studies, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo) for providing the *Staphylococcus aureus* pathogen strain ATCC 27543. The financial support was provided by the Scientific Investigation Coordination of the Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo for the fulfillment of this study, through projects CIC14.1 and CIC14.5, assigned to Alejandra Ochoa Zarzosa and Joel E. Lopez Meza, respectively.

Referencias

1. Wanasinghe DD. Adherence as a prerequisite for infection of the bovine mammary gland by bacteria. Acta Vet Scand 1981; 22: 109-117.
2. Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. Vet Clin Food Anim 2003; 19: 1-45.
3. Burvenich C, Paape MJ, Hoeben D, Dosogne H, Massart-Leën AM, Blum J. Modulation of the inflamma-

invadir macrófagos, células epiteliales y endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, queratinocitos y células renales,[18] a través de una participación activa del citoesqueleto. Se ha informado también que la bPRL puede inducir una modificación del citoesqueleto a través de la red de microtúbulos,[19] lo cual pudiera explicar parcialmente el efecto promotor de la bPRL en la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB. Los cultivos de las CEMB utilizados en este trabajo se encuentran polarizados sobre matrices de colágena. Este hecho favorece la interacción de la bPRL con su receptor en la superficie apical de la célula epitelial; por consiguiente, puede facilitar la endocitosis de microorganismos provenientes de la leche hacia las CEMB. Hasta el momento, éste es el primer informe que demuestra un efecto de la bPRL y la endocitosis de microorganismos asociados con mastitis bovina. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares que participan en este proceso, se han registrado resultados similares de infección regulada por la PRL para *Mycobacterium avium* en macrófagos bovinos,[7] éstos no modifican su tasa de fagocitosis ante dosis >10 ng/mL de la bPRL, pero cuando los macrófagos son tratados durante cinco días con la bPRL, se presenta mayor multiplicación intracelular. De igual forma, este resultado apoya evidencias *in vivo* que demuestran que un periodo de alta incidencia de mastitis ocurre durante el parto, cuando hay altas concentraciones de la PRL.[10]

Para demostrar que el efecto estimulador de la bPRL en la endocitosis de *S. aureus* por las CEMB era específico, se inmunizaron conejas Nueva Zelanda con la bPRL y se obtuvo el suero inmune del cual se purificaron las IgG anti-bPRL. En ensayos de competencia, el tratamiento previo de las CEMB con las IgG anti-bPRL, inhibió el efecto estimulador de la endocitosis de la bPRL en un nivel similar al de las células sin tratar (Figura 2B). Este resultado apoya la idea de que el efecto estimulador de la endocitosis de *S. aureus* por la bPRL en las CEMB, se debe a la activación del receptor presente en la membrana de las CEMB.[17] Sin embargo, como se ha señalado, todavía falta por dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en este efecto de la bPRL.

Asimismo, el tratamiento de las CEMB con 5 ng/mL de la bPRL favorece la proliferación bacteriana a partir de las 4 h de incubación. Este hecho puede ser resultado de que desde un inicio se endocitó un número mayor de bacterias (Figura 3A). Estos resultados coinciden con efectos similares de la bPRL sobre la endocitosis y el crecimiento intracelular de *M. avium* por macrófagos bovinos.[7] No obstante, el efecto de la bPRL sobre la proliferación intracelular de *S. aureus* no pudo evaluarse en las CEMB después de las 8 h de la infección, debido a que las CEMB comenzaron a morir (Figura 3B). Esta circunstancia puede deberse

tory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. Dom Anim Endocrinol 1999; 17: 149-159.
4. Ochoa-Zarzosa A. La prolactina: una hormona con diversidad funcional. Ciencia Nicolaita 2003; 35: 115-128.
5. Svennersten-Sjaunja K, Olsson K. Endocrinology of milk production. Dom Anim Endocrinol 2005; 29: 241-258.
6. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2002; 7: 49-66.
7. Feola RP, Collins MT, Czuprynski CJ. Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis in bovine peripheral blood monocytes. Microb Pathogen 1999; 26: 1-11.
8. Benedetto N, Folgore A, Romano-Carratelli C, Galdiero F. Effects of cytokines and prolactin on the replication of *Toxoplasma gondii* in murine microglia. Eur Cyt Net 2001; 12: 348-358.
9. Kerro-Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. Vet Q 2002; 24: 181-198.
10. Hockett ME, Hopkins FM, Lewis MJ, Saxton AM, Dowlen HH, Oliver SP *et al.* Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. Anim Reprod Sci 2000; 58: 241-251.
11. Clevenger CV, Plank TL. Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1997; 2: 59-68.
12. Anaya-Lopez JL, Contreras-Guzman OE, Carabez-Trejo A, Baizabal-Aguirre VM, Lopez-Meza JE, Valdez-Alarcon JJ *et al.* Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. Res Vet Sci 2006; 81: 358-361.
13. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory NY: Cold Spring Harbor, 2001.
14. Baglia AL, Cruz D, Shaw JE. An Epstein-Barr virus negative burkitt lymphoma cell line (sfRamos) secretes a prolactin-like protein during continuous growth in serum-free medium. Endocrinology 1991; 128: 2266-2272.
15. Tanaka T, Shiu R, Gout P, Beere C, Noble RL, Friesen JA. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. Clin Endocrin Metab 1980; 51: 1058-1063.

a la inducción de la muerte celular programada, o apoptosis, en las CEMB, que se ha registrado en este tipo celular tras la infección por *S. aureus*.[20]

En conclusión, los resultados de este estudio indican que la bPRL en concentraciones fisiológicas, estimula la endocitosis de *S. aureus* en las CEMB. De esta forma, los datos mencionados apoyan la teoría de que los microorganismos patógenos, como *S. aureus*, utilizan el ambiente de su portador para infectarlo, como es el caso de la bPRL en el epitelio mamario bovino.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Carmen Clapp (Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro) la donación de la prolactina bovina, y al Dr. Víctor M. Baizabal (Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) por proporcionar la cepa patógena de *Staphylococcus aureus* ATCC 27543. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a través de los proyectos CIC14.1 y CIC14.5, asignados a Alejandra Ochoa Zarzosa y Joel E. López Meza, respectivamente.

16. Anaya-Lopez JL, Lopez-Meza JE, Baizabal-Aguirre VM, Cano-Camacho H, Ochoa-Zarzosa A. Fungicidal and cytotoxic activity of a Capsicum chinense defensin expressed by endothelial cells. Biotechnol Lett 2006; 28: 1101-1108.
17. Fuh G, Colosi P, Woods WI, Wells JA. Mechanism-base design of prolactin receptor antagonists. J Biol Chem 1993; 268: 5376-5381.
18. Hauck C, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 5–11.
19. Zoubiane GS, Valentijn A, Lowe ET, Akhtar N, Bagley S, Gilmore AP *et al.* A role for the cytoskeleton in prolactin-dependent mammary epithelial cell differentiation. J Cell Sci 2004; 117: 271-280.
20. 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: 336-342.