

Tesis Doctoral

Rol de las lipoproteínas de *Brucella Abortus* en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis

Zwerdling, Astrid

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zwerdling, Astrid. (2009). Rol de las lipoproteínas de *Brucella Abortus* en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zwerdling, Astrid. "Rol de las lipoproteínas de *Brucella Abortus* en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

**ROL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE *BRUCELLA*
ABORTUS EN EL DESARROLLO DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA EN BRUCELOSIS**

Tesis para optar por el Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autora: **Astrid Zwerdling**

Director de Tesis: Dr. Guillermo Hernán Giambartolomei

Consejero de Estudios: Dr. Omar Adrián Coso

Lugar de Trabajo: Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU),
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Buenos Aires, 2009

ROL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE *BRUCELLA ABORTUS* EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN BRUCELOSIS

RESUMEN

La inflamación es un rasgo característico de la brucelosis humana, presente virtualmente en todos los órganos afectados por la misma. Esta particularidad, junto con la detección de bacterias en los tejidos inflamados, sugiere que *Brucella* estimula una robusta respuesta inflamatoria en los sitios en que se localiza.

Sin embargo, **los mecanismos por los cuales estas bacterias desencadenan esta respuesta son hasta el momento desconocidos.**

A pesar del poderoso potencial inmunomodulador de las lipoproteínas bacterianas, se les ha prestado hasta el momento poca atención en la brucelosis.

En esta tesis **investigamos la función de las lipoproteínas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria** asociada a esta enfermedad, poniendo énfasis en la interacción de *Brucella* con distintos tipos celulares fundamentales en el desarrollo de la respuesta innata. Nuestros resultados demuestran que *B. abortus* es capaz de inducir la respuesta inflamatoria por medio de la activación y producción de citoquinas en monocitos/macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. En relación al componente de *Brucella* responsable de inducir esta respuesta, nuestras observaciones experimentales indican que las lipoproteínas de *Brucella* estarían implicadas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis.

Palabras claves: Respuesta inflamatoria, *Brucella abortus*, Brucelosis, Lipoproteínas, Monocitos/macrófagos, Células dendríticas, Neutrófilos.

ROLE OF *BRUCELLA ABORTUS* LIPOPROTEINS IN THE DEVELOPMENT OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN BRUCELLOSIS

ABSTRACT

Regardless of the diversity of signs and symptoms of human brucellosis, inflammation is a hallmark of brucellosis, present in virtually all the organs affected by this disease. This trait, together with the detection of the bacterium in the inflamed tissues, suggests that *Brucella* stimulates a robust inflammatory response at sites of localization.

Yet, **the mechanisms by which these bacteria induce the inflammatory response are unknown.**

Despite the inherent immunomodulatory potential of bacterial lipoproteins, they have not received much consideration in brucellosis. In this thesis we **investigated for the first time the role of lipoproteins in the development of the inflammatory response associated with this disease.**

Focusing on the interactions of *Brucella* with different cell types key in the development of the innate immune response, we have demonstrated that *B. abortus* is capable of inducing an inflammatory profile through the activation of, and cytokine production by monocytes/macrophages, dendritic cells and neutrophils. Regarding to the bacterial constituent responsible of inducing this response, our experimental observations suggest that through the induction of phenotypical and functional changes associated with the activation of the different cell types studied, lipoproteins might be implicated in the development of the inflammatory response in brucellosis.

Key words: Inflammatory response, *Brucella abortus*, Brucellosis, Lipoproteins, Monocytes/macrophages, dendritic cells, Neutrophils.

AGRADECIMIENTOS

A Guille; por su asesoramiento científico y estímulo, por haber dirigido esta tesis en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamental para la realización de este trabajo. Por su buena disposición para tantas charlas científicas como también “extracurriculares” y por su humor.

A Juli y Pau; por sus valiosos aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

A Victuare; por su permanente disposición, ayuda y colaboración en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo; Kari, Clara, Lore, Chula y Andrés, por compartir inquietudes, éxitos y fracasos en la realización de los experimentos, por la compañía y diversión de todos los días.

A todo el laboratorio de Inmunogenética; por la colaboración y por tantas charlas de comedor.

Al Dr. Alberto Fossati; por facilitar mi inserción en los estudios de inmunología en brucelosis a través de una beca de la ANPCyT.

Al Dr. Pablo Baldi; por estar siempre bien dispuesto a compartir y transmitir sus conocimientos sobre inmunidad y biología de *Brucella*.

Al Dr. Ignacio Moriyón; por haberme cedido las preparaciones de LPS utilizadas en este trabajo de tesis.

A la Dra. Analía Trevani; por su generosa asesoría experimental en el trabajo con neutrófilos y contribución de reactivos.

Al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas “José de San Martín”; por aportar los “buffy coats”.

A mis amigos; que siempre están, y por tantos años de amistad.

A mis padres; por el apoyo que me brindaron, por la formación, por el cariño y por bancarme incondicionalmente.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción General	4
Brucelosis	4
Etiología	4
Composición de la membrana y estructura antigénica	6
Biología de <i>Brucella</i> spp.	8
Epidemiología	11
Fuentes y vías de infección	12
Diagnóstico, tratamiento y control	14
Respuesta inmune contra <i>Brucella</i> spp.	15
Inmunidad innata	15
Componentes celulares de la inmunidad innata	15
Receptores de la inmunidad innata involucrados en el reconocimiento de <i>Brucella</i> spp.	17
Inmunidad adaptativa	20
Células T $\alpha\beta$ CD4 ⁺ y CD8 ⁺	20
Células T $\gamma\delta$	21
Respuesta humoral	21
Citoquinas	22
Patogenia	22
Respuesta inflamatoria y patogenia	25
Activadores bacterianos de la respuesta inflamatoria	26
Hipótesis de trabajo y objetivos	30
Materiales y métodos	33
Animales	33
Bacterias	33
Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes Omp16 y Omp19 de <i>B. abortus</i>	33

Lipoproteínas y LPS	35
Células	35
Obtención y estimulación de líneas celulares y macrófagos murinos	35
Obtención y estimulación de DC humanas	36
Infección de DC	37
Obtención y estimulación de neutrófilos humanos	37
Bloqueo de TLR	38
Citometría de Flujo	38
Actividad endocítica	39
Cultivo mixto leucocitario	39
Producción de especies reactivas del oxígeno	40
Apoptosis	40
Quemotaxis	40
ELISA	41
Análisis estadístico	41
Capítulo 1: Respuesta inflamatoria inducida por <i>Brucella abortus</i> en monocitos/macrófagos	42
Introducción	43
Resultados	45
- El LPS no contribuye en la producción de citoquinas inducida por <i>B. abortus</i>	45
- La producción de citoquinas inducida por HKBA es dependiente de TLR2	50
- Clonado, expresión y purificación de las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> Omp16 y Omp19	52
- Las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> Omp16 y Omp19 inducen la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias en células THP-1	53
- La producción de citoquinas inducida por las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> es mediada por TLR2	57
Discusión	59
Capítulo 2: Las lipoproteínas de <i>Brucella</i> mimetizan la maduración de células dendríticas inducida por <i>Brucella abortus</i>	62
Introducción	63
Resultados	65

- <i>B. abortus</i> induce la maduración de células dendríticas	65
- El LPS de <i>B. abortus</i> no está involucrado en la maduración de células dendríticas inducida por HKBA	69
- Omp19 induce la maduración de DC	71
- La producción de citoquinas inducida por HKBA es dependiente de TLR2 y TLR4	75
Discusión	77
Capítulo 3: <i>Brucella abortus</i> induce la activación de neutrófilos	81
Introducción	82
Resultados	84
- <i>B. abortus</i> induce la activación de neutrófilos	84
- Las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> mimetizan la activación de neutrófilos inducida por <i>Brucella</i>	88
- <i>B. abortus</i> y Omp19 sensibilizan a los neutrófilos para el estallido respiratorio	90
- <i>B. abortus</i> y Omp19 prolongan la sobrevivencia de los neutrófilos	91
- <i>B. abortus</i> y Omp19 inducen la migración de neutrófilos	93
Discusión	95
Discusión General	98
Bibliografía	111

Abreviaturas

Ac/s	Anticuerpo/s
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ag/s	Antígeno/s
ATCC	American type culture collection
AV	Anexina V
BLS	<i>Brucella</i> Lumazina Sintetasa
DC	Células dendríticas
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
dsRNA	Ácido ribonucleico doble cadena
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	N-formil-L-metionil-L-Leucil-L-fenilalanina
HKBA	<i>Brucella abortus</i> muerta por calor
hs.	Horas
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Linfocito B
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min.	Minutos

MOI	Multiplicidad de infección
NF κ B	Factor de transcripción nuclear κ B
NK	Células citotóxicas naturales
Omp/s	Proteína/s de la membrana externa
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PB	Polimixina B
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PI	Ioduro de propidio
PMA	Forbol miristato acetato
PrPC	Proteína priónica celular
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PSO	Polisacárido O
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
ssRNA	Ácido ribonucleico simple cadena
Th1	T “helper” 1
TLR/s	Receptor/es tipo TOLL
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
Vit-D3	Vitamina D3

INTRODUCCIÓN GENERAL

BRUCELOSIS

La brucelosis es una zoonosis endémica de distribución mundial que afecta al hombre y a distintas especies animales, entre ellas las relacionadas con la actividad laboral ganadera [1]. La disminución de la capacidad reproductora y abortos en el ganado, el parto de crías débiles y la contaminación de lácteos y carne hacen que esta enfermedad continúe generando grandes pérdidas económicas tanto en la industria agropecuaria como en la salud pública. En nuestro país se considera que las pérdidas económicas relacionadas con la enfermedad superan los 300 millones de pesos anuales [2].

ETIOLOGÍA

Las bacterias del género *Brucella* fueron aisladas por primera vez en 1887 por David Bruce de los bazos de soldados que morían en la isla de Malta por una enfermedad conocida en ese entonces como Fiebre de Malta. El reservorio del agente causal no fue descubierto hasta 1904, cuando se lo aisló de orina y leche de cabras aparentemente sanas. La bacteria se denominó inicialmente *Micrococcus melitensis*, y luego fue rebautizada con el nombre de *Brucella melitensis* en honor a su descubridor. La segunda especie del grupo fue aislada por Bang en Dinamarca en 1897 de ganado vacuno que padecía de aborto infeccioso (enfermedad de Bang), y al que inicialmente se denominó *Bacillus abortus*; la tercera fue cultivada en Estados Unidos en 1914 del feto de una cerda prematuramente expulsado (*Bacillus suis*). En 1920 Evans reconoció que los tres microorganismos estaban estrechamente emparentados y los incluyó en un género aparte, denominado *Brucella* [3].

Las especies del género *Brucella* pertenecen a la clase α -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae. Este género está constituido por cocobacilos Gram negativos pequeños, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas y son muy resistentes a la desecación. Esto contribuye a que puedan permanecer viables durante largo tiempo en la paja y el

polvo de los establos, o en los alimentos, como leche, manteca y queso. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos [4]. El género *Brucella* consta de 7 especies diferentes, clasificadas de acuerdo a variaciones antigénicas y al hospedador preferencial: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. maris* [5]. De ellas, las tres primeras son responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana [6-8] (**Tabla I**). Recientemente, *B. maris* ha sido dividida en dos especies diferentes: *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, debido a la infección preferencial de distintos mamíferos marinos. Sin embargo, todavía no se ha establecido claramente la patogenicidad para humanos de estas especies encontradas en cetáceos y pinnípedos, respectivamente [9, 10]. *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se encuentran además subdivididas en distintas biovariedades en base a diferencias en propiedades serológicas y de cultivo [7].

	Especie	Hospedador preferencial	Patogenia	Patogenicidad para el hombre
Especies Lisas	<i>B. abortus</i>	Bovinos	Abortos. Orquitis. Epididimitis. Ocasionalmente artritis	Moderada
	<i>B. melitensis</i>	Caprinos	Abortos	Elevada
	<i>B. suis</i>	Porcinos	Aborto. Esterilidad. Orquitis	Moderada
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	—	No posee
	<i>B. maris</i>	Mamíferos marinos	—	Moderada
Especies Rugosas	<i>B. ovis</i>	Ovinos	Abortos (poco frecuentes). Epididimitis	No posee
	<i>B. canis</i>	Caninos	Abortos. Esterilidad. Epididimitis. Dermatitis escrotal	Moderada
	<i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> y <i>B. maris</i>	Hombre	Fiebre. Adenopatías. Hepatomegalia. Esplenomegalia. Complicaciones osteoarticulares	

Tabla I.

Composición de la membrana y estructura antigénica

La envoltura celular de las bacterias del género *Brucella* está formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. Desde un punto de vista antigénico, en la membrana de *Brucella* existen dos componentes fundamentales: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas. El LPS es una molécula anfipática que consta de una parte exclusivamente polisacáridica

dirigida hacia el exterior, y otra parte glucolípídica (lípid A) inserta en la membrana externa, y por tanto no expuesta en la superficie (**Ilustración 1**).

La parte polisacárida del LPS se divide en dos secciones: un oligosacárido intermedio, llamado núcleo; y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O que es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria, ausente (o presente con pocos residuos) en el LPS de cepas rugosas (LPS-R) (**Ilustración 1**). La longitud de la cadena O es variable, pudiendo presentar desde 30 a 100 residuos de glucosa [11]. El lípid A contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El lípid A del LPS de *Brucella*, a diferencia del lípid A de la mayoría de las enterobacterias, posee una estructura atípica caracterizada por su alta hidrofobicidad, su bajo grado de sustitución y por poseer cadenas alifáticas más largas [12]. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. El PSO es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina.

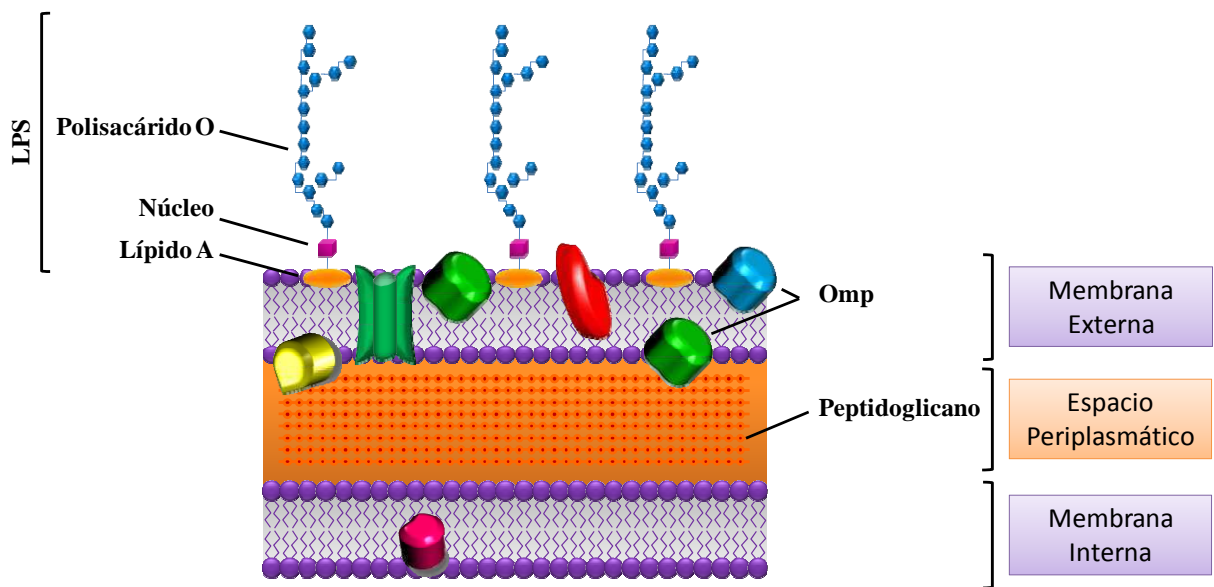


Ilustración 1.

Las proteínas de membrana externa (Omps) se asocian estrechamente con el LPS y muchas de las mismas han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional [13]. Estas proteínas se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares, Grupo 1: se relacionan con la biosíntesis de la propia envoltura celular (89-94 kDa), Grupo 2: equivalentes a las porinas de otras bacterias Gram negativas (35- 40 kDa) [14-17] y Grupo 3: interaccionan fuertemente con el LPS (25-30 kDa) [13, 18]. Las proteínas de los grupos 2 y 3 se encuentran en mayor cantidad y son conocidas como Omps “mayores”. Las proteínas del grupo 1 junto con otras con pesos moleculares entre 10 y 20 kDa, son denominadas Omps “menores”. Estos tres grupos de proteínas se encuentran expuestos en la membrana externa, y son reconocidos por el sistema inmune en el curso de la infección [19]. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas [20, 21].

En base al aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella* se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* y *B. maris* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis* (**Tabla I**). El aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del LPS en la superficie bacteriana, LPS-S en las lisas y LPS-R en las rugosas. Las cepas de *Brucella* en fase lisa son las más virulentas [22].

Biología de Brucella spp.

Las bacterias de este género son microorganismos intracelulares facultativos capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema reticuloendotelial y los tejidos asociados. Son capaces de infectar fagocitos profesionales (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) [6, 23] y no profesionales [24], así como también células no fagocíticas [25-27].

Los mecanismos de ingreso de la bacteria a estas células no son del todo claros, aunque se presume que el LPS y las proteínas de la membrana externa podrían participar en los mismos, mediante receptores tipo manosa o integrinas, respectivamente [28, 29]. En fagocitos no profesionales, la internalización requiere un gasto de energía, y los inhibidores del metabolismo energético y de la endocitosis mediada por receptor pueden suprimir este proceso. *Brucella* posee un sistema de dos componentes llamado BvrS/BvrR, el cual codifica para un sensor de histidina kinasa y controla la expresión de los determinantes moleculares necesarios para la invasión celular [30].

Las cepas lisas de *Brucella* entran a las células macrofágicas a través de sitios en la membrana celular ricos en colesterol conocidos como “lipid rafts” o microdominios lipídicos. Esto no ocurre en el caso de las cepas rugosas. El tráfico bacteriano vía “lipid rafts” podría estar involucrado en dirigir los eventos que ocurren luego de la infección. Como las cepas lisas y rugosas difieren en la composición de su LPS, particularmente de la cadena O polisacáridica, esta cadena podría ser la responsable de dirigir la entrada a través de los “lipid rafts”. Este mecanismo de entrada pareciera ser clave para la supervivencia de la bacteria en los macrófagos infectados, ya que la interrupción farmacológica de los “lipid rafts” lleva a una fagocitosis independiente de los mismos y a la posterior eliminación de todas las bacterias fagocitadas [31].

Watarai y col. propusieron que *Brucella* interactuaría con una proteína priónica celular (PrPC) de los macrófagos; esta proteína está anclada por una unión glicosilfosfatidilinositol en los “lipid rafts”. Esta interacción estaría mediada por la presencia en membrana de la proteína de choque térmico 60 (HSP60) de *Brucella*. La proteína PrPC podría ser necesaria para la fagocitosis mediada por “lipid-rafts” y consecuentemente para permitir la supervivencia intracelular de *Brucella* [32, 33].

Dentro de las células macrofágicas, estos microorganismos son capaces de inhibir la fusión del fagosoma al lisosoma [23]. De esta manera, si bien los macrófagos son capaces de lisar a la mayoría de las bacterias fagocitadas, un bajo

porcentaje logra sobrevivir y replicarse intracelularmente. Experimentos realizados con macrófagos murinos infectados con *B. abortus* demostraron que hay una disminución inicial del número de organismos luego de la fagocitosis. Durante esta etapa hasta un 90-99% de los organismos son eliminados, mientras que las bacterias que logran sobrevivir se replican posteriormente [34, 35]. Así, el macrófago se transforma en el nicho replicativo de bacterias viables en las formas crónicas de la enfermedad. Las cepas rugosas de *Brucella* también son capaces de bloquear la fusión fagolisosomal, aunque con menor eficiencia que las cepas lisas [36].

Para formar la vacuola replicativa (o brucelosoma) en macrófagos es necesario que la vacuola interactúe con el retículo endoplasmático. El comienzo de la replicación coincide con el momento en que se detectan proteínas del retículo endoplasmático en la vacuola que contiene *Brucella*. El brucelosoma madura en una vía endocítica por fusión continua con compartimentos endocíticos tempranos o tardíos. La disminución del pH del compartimento facilita la expresión de genes que se activan con la acidez del medio y que son necesarios para la supervivencia y división intracelular de *Brucella*. El operón más importante de respuesta a la acidez, es el VirB9, que codifica para el sistema de secreción tipo IV, que incluye tanto a virB1 y a virB2 [37].

No se han encontrado dentro del genoma de *Brucella* los sistemas de secreción tipo I, II y III ni islas de patogenicidad, tampoco se identificaron factores de virulencia clásicos como toxinas, fimbrias o cápsula, por lo que estos microorganismos parecieran utilizar mecanismos únicos para evadir al sistema inmune, penetrar a las células, alterar el tráfico intracelular, impidiendo su degradación y muerte en los lisosomas, y modular el ambiente intracelular para permitir su replicación y larga sobrevivencia en dicho nicho [38, 39].

La replicación de la bacteria tiene lugar en el retículo endoplasmático, sin afectar la integridad celular. Luego de la replicación, las bacterias son liberadas con la ayuda de hemolisinas y se induce la necrosis celular [30].

EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia y prevalencia de la brucelosis tienen importantes variaciones geográficas, siendo las zonas con mayor prevalencia el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica, especialmente países con bajos recursos económicos [40, 41]. En el mundo la infección animal por *B. abortus* sigue siendo la más frecuente a pesar de la vacunación masiva. En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En América del Norte, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México [42], mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. *B. abortus* está presente en todos los países de América Central, siendo la prevalencia de un 4 a un 8% [41]. En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y un problema sanitario importante [40, 43]. En Chile, la Décima Región de Los Lagos es la que comprende la mayor área productora de leche y, además, tiene la mayor concentración de ganado infectado [44]. Datos obtenidos por el SENASA en el año 2005 muestran que la prevalencia de la brucelosis en los bovinos a nivel nacional fue del 2.15% [45]. Sin embargo, una encuesta realizada el mismo año por el INTA Bariloche, la Dirección de Ganadería de la provincia de Río Negro y el Laboratorio de Brucelosis de la Fundación Barrera Patagónica revelaron que la prevalencia de la enfermedad en la ganadería bovina es más elevada que la informada por el SENASA. Los resultados mostraron un 21.4% de establecimientos positivos a *Brucella abortus* -con un rango de 10% al 40%- y una tasa de reaccionantes del 3.7% [46]. Las áreas más afectadas son el nordeste, la precordillera de los andes, la Mesopotamia y la pampa húmeda, ubicando a la brucelosis en el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles crónicas de la Argentina, después de la enfermedad de Chagas, la tuberculosis y la sífilis.

La distribución geográfica de la brucelosis humana está en estrecha relación con la distribución de la brucelosis animal. La incidencia puede variar desde valores inferiores a 0,01/100.000 habitantes en los países desarrollados hasta cifras

superiores a 200/100.000 habitantes en los países menos desarrollados. En la Argentina, donde no sólo hay un importante consumo de lácteos y carnes, sino que además la producción y elaboración de estos productos es una de las principales actividades económicas, la incidencia es muy alta siendo una de las enfermedades laborales más importantes. Se estima que entre 10.000 y 20.000 personas adquieren la infección anualmente [47].

Fuentes y vías de infección

Si bien en condiciones propicias *Brucella* puede sobrevivir en el medio ambiente por períodos relativamente largos, no hay evidencias de que este microorganismo se replique en un grado significativo en dichas circunstancias. A los fines prácticos, la fuente de infección la constituyen los animales infectados que excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales. La vía de penetración más importante es a través de la mucosa oronasal [48]. Debido a su potencial epidémico, la ausencia de una vacuna humana, y la eficiencia de la infección por aerosoles, *Brucella* es clasificada como un patógeno de nivel de bioseguridad 3 y es considerado un potencial agente bioterrorista [49].

En el hombre la brucelosis presenta dos patrones epidemiológicos: un patrón urbano-alimentario, por consumo de leche cruda y quesos contaminados; y un patrón rural-laboral, por exposición profesional al ganado infectado o sus productos ya sea por contacto o inhalación [50]. El consumo de carne no es una fuente importante de contaminación, dado que la carga bacteriana en los tejidos musculares de los animales es baja, pero se han reportado casos de infección asociados al consumo de bazo e hígado poco cocidos. [51]. *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos [52]. La mínima dosis infectiva capaz de inducir

brucelosis activa depende de la especie de *Brucella* y de la vía de entrada [53] (**Tabla II**).

Especie	Número de organismos	
	Oral	Inhalación
<i>B. melitensis</i>	5000	1300
<i>B. abortus</i>	10^6	< 100
<i>B. suis</i>	10^7	< 100

Tabla II. [53]

En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente [54], sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual. Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos [55].

En la **Tabla III** se resumen las distintas vías de infección en el hombre y la población susceptible.

Vía de Infección	Puerta de Entrada	Fuente de Infección	Población en riesgo
Oral	Mucosa digestiva	Derivados lácteos	Población en general
Por contacto	Piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal	Productos animales contaminados: placenta, heces, secreciones vaginales	Trabajadores de la industria de la carne, veterinarios, peones de campo, personal de laboratorio
Respiratoria	Mucosa nasal	Aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en establos, lanas	Personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos
Parenteral	Inoculación accidental, transfusiones	Vacunas vivas, material biológico contaminado	Personal de laboratorio, veterinarios, población en general

Tabla III.

DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL

El diagnóstico de brucelosis humana es difícil. Además de considerar la historia clínica, es recomendable realizar un estudio bacteriológico complementado con el análisis de los anticuerpos séricos. Si la enfermedad es diagnosticada tempranamente y se trata en forma adecuada tiene, en general, una evolución favorable.

El diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Los métodos serológicos sólo aportan un diagnóstico presuntivo. Sin embargo, las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado.

En las formas agudas de la enfermedad, la administración precoz y prolongada de una apropiada combinación de antibióticos provoca la remisión del cuadro clínico en al menos el 90% de los pacientes. El tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la brucelosis aguda en adultos es la

administración de rifampicina (600-900 mg) y doxiciclina (100 mg) dos veces al día durante un período mínimo de seis semanas [1].

Las vacunas para animales más ampliamente utilizadas se obtienen a partir de cepas vivas atenuadas. En la actualidad, se utilizan dos cepas vacunales lisas: *B. abortus* cepa 19 (S19) para el ganado vacuno y *B. melitensis* REV-1 para pequeños rumiantes, y una cepa atenuada rugosa: *B. abortus* RB51 para el ganado vacuno. [40]. No existe hasta el momento una vacuna para humanos. Al no disponer aún de una adecuada vacuna para humanos es fundamental el incremento de medidas de prevención. En Argentina la brucelosis humana es una enfermedad que persiste en las regiones donde la infección animal no está controlada; sin embargo se están realizando esfuerzos importantes para proveer asistencia, diagnóstico y vacunación en todas las provincias argentinas [2]. Algunas medidas de prevención a tener en cuenta son: programas de saneamiento del ganado, educación para la salud en áreas endémicas, medidas de higiene y seguridad en el trabajo y control sanitario en las fronteras.

RESPUESTA INMUNE CONTRA *BRUCELLA* SPP.

Inmunidad Innata

Componentes celulares de la inmunidad innata

En vertebrados, la inmunidad innata depende en su mayoría de células de origen mieloide. Las células mieloides incluyen los fagocitos mononucleares y los fagocitos polimorfonucleares. Los fagocitos mononucleares son los macrófagos, que derivan de los monocitos sanguíneos, y las cercanamente relacionadas células dendríticas (DC), también de origen monocítico, las cuales son altamente eficientes en presentar antígenos a los linfocitos T.

Las células del sistema inmune innato contribuyen a controlar las infecciones, no solo por su rol como células efectoras, sino también mediante la

producción de las citoquinas apropiadas luego de un encuentro inicial con el patógeno, que dirigirán la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil T “helper” determinado [36], dando lugar a la memoria inmunológica por parte de las células de la inmunidad adaptativa, los linfocitos T (LT), y los linfocitos B (LB) productores de anticuerpos. Las células que realizan esta tarea son los macrófagos y las células dendríticas, a través de su habilidad de producir Interleuquina (IL)-12 luego del reconocimiento del patógeno. La IL-12 promueve la síntesis de IFN- γ por las células NK, LT $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$.

En estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo un ambiente adecuado para generar una respuesta Th1 en el hospedador [7]. Los macrófagos, los neutrófilos y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo [56].

Muchos autores [57-59] han demostrado que los macrófagos y los neutrófilos poseen la capacidad de destruir a un alto porcentaje de las brucelas fagocitadas. Se pudo determinar que la fagocitosis y el estallido respiratorio en macrófagos son dependientes de la opsonización de las bacterias por Acs y complemento, y también de la activación celular por el interferón gama (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que puedan producir otras células [58, 59]. Todas las especies del género *Brucella* son sensibles a los metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, sin embargo son capaces de inhibir la degranulación de los gránulos primarios y secundarios aumentando su supervivencia intracelular [59, 60].

Hasta el presente no se ha determinado la importancia de las células dendríticas (DC) en el control de la infección por *Brucella* spp., pero recientemente se ha demostrado que *Brucella* puede sobrevivir dentro de estas células tal como lo hace en otros tipos celulares [61]. Además de las DC “clásicas” (B220⁻ LY-6C⁻ NK1.1⁻), en modelos murinos, se han definido recientemente varios subtipos de DC especializados. Las DC plasmocitoides, que expresan los marcadores B220⁺ CD11b⁻ LY-6C⁺ NK1.1⁻, se especializan en la producción de IFN- α y respuestas

antivirales [62]. Las NK DC, expresan CD11b⁻ DX5⁺ NK1.1⁺ y poseen funciones tanto citotóxicas como de presentación antigénica [62]. Un estudio reciente ha implicado a las DC B220⁻ CD11b⁺ LY-6C⁺ NK1.1⁻ iNOS⁺ en la infección con *Brucella* sugiriendo que las mismas serían los principales efectores de la respuesta Th1 murina contra bacterias intracelulares y que las mismas podrían también tener un rol importante en el desarrollo de la respuesta Th1 en humanos. El mismo trabajo también ha demostrado que la activación de las DC inflamatorias durante la infección de ratones con *Brucella* es dependiente de la señalización a través de Myd88, y que las DC B220⁻ CD11b⁺ LY-6C⁺ son reclutadas y activadas durante la infección y constituyen las principales células productoras de iNOS [62].

El rol de las células NK en la infección con *Brucella* no está del todo claro. Estas células no parecieran prestar una función fundamental en la erradicación de *Brucella* durante la infección aguda. Los ratones susceptibles BALB/c y los resistentes C57BL/10 controlan la infección por *B. abortus* 2308 en ausencia de células NK [63]. En pacientes con brucelosis, la actividad de las células NK se encuentra aparentemente suprimida [36]. Sin embargo, el co-cultivo de células NK humanas con macrófagos infectados con *B. suis*, activa a las NK para producir IFN- γ y TNF- α y destruir a los macrófagos infectados. Los niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) son normales en éstas células, de modo similar a lo que ocurre en macrófagos murinos infectados con *B. abortus* [64], por lo que la inducción de muerte por las células NK no ocurriría por este mecanismo. Tampoco está claro, cómo la infección suprime a las células NK, un mecanismo que parece ser exclusivo de la infección en humanos no evidenciándose en la infección murina [63].

Receptores de la inmunidad innata involucrados en el reconocimiento de *Brucella spp.*

La primera línea de los mecanismos de defensa, comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Hay diferentes clases funcionales

de PRR, la mejor caracterizada comprende a los receptores de tipo Toll (TLRs), que son receptores transmembrana que censan diversos productos microbianos [65].

Los TLRs juegan un rol importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores presentes en células fagocíticas profesionales reconocen los distintos PAMPs uniéndose directamente a ellos, reclutando un grupo de adaptadores intracelulares con dominios TIR e iniciando así una cascada de activación que va a culminar con la activación de MAP kinasas y factores de transcripción (como NF- κ B) que modulan la producción de citoquinas, quemoquinas y expresión de moléculas co-estimuladoras. Estos receptores pueden ser activados por diversos productos microbianos; TLR2 (formando heterodímeros con TLR1 o TLR6) reconoce productos de la pared celular de bacterias Gram positivas y lipoproteínas bacterianas; TLR3: dsRNA, TLR4: LPS, TLR5: flagelina, TLR9: motivos CpG no metilados y TLR7/8: ssRNA [65]. La localización subcelular de los TLRs correlaciona con la naturaleza de sus ligandos. TLR1, 2, 4, 5 y 6 están presentes en la membrana plasmática o asociados a endosomas, mientras que TLR3, 7, 8 y 9 se expresan en endosomas [65]. TLR2 y TLR4 exhiben patrones de expresión comparables y en “steady state” se expresan principalmente en monocitos, macrófagos, DC y neutrófilos [66, 67].

El rol de los TLRs en la resistencia contra la infección por *Brucella* también ha sido estudiado mediante ensayos de desafío *in vivo*. Sin embargo, se han reportado resultados controversiales en la literatura. Mientras algunos autores muestran que el receptor TLR4 sería esencial para controlar la infección [68], otros muestran que si bien tanto TLR2 como TLR4 estarían involucrados en la secreción de TNF- α durante la infección, no serían esenciales para controlar la infección [69]. En los ratones deficientes en el adaptador MyD88, (MyD88^{-/-}), común a ambos receptores, se observa un incremento drástico en el recuento de bacterias en el bazo a los 14 días posinfección con *Brucella* [69]. Los ratones MyD88^{-/-} presentan defectos en la maduración de células dendríticas y ausencia de producción de IL-12

y TNF- α por los macrófagos y DC en respuesta a bacterias enteras muertas por calor (HKBA). El tratamiento con IL-12 recombinante mejora la resistencia a la infección por *Brucella* en los ratones MyD88^{-/-}. La señalización vía MyD88 pareciera ser necesaria para el desarrollo de LT productores de IFN- γ en respuesta a diferentes antígenos de *Brucella* y para el control de la infección por *Brucella* [62].

Recientemente se ha descrito que *Brucella* también interferiría con la señalización vía TLRs por la producción de homólogos del dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR) inhibitorios. Se han descrito dos proteínas de *Brucella*, llamadas Btp1 y TcpB, que interfieren en la señalización por TLRs. La proteína Btp1 de *B. abortus* actuaría en la señalización vía TLR2, inhibiendo la maduración de las células dendríticas y la secreción de citoquinas proinflamatorias [70]. Mientras que la proteína TcpB de *B. melitensis*, interactuaría con MyD88 impidiendo la señalización por vía TLR2 y TLR4 y la secreción de citoquinas proinflamatorias [71]. Estas proteínas, podrían ser una nueva clase de factores de virulencia que actuarían inhibiendo la señalización vía TLRs y/o MyD88, y de esta manera disminuyendo la respuesta inmune innata e incrementando la virulencia [70-72].

Otro grupo de PRR son las proteínas con dominio de unión y oligomerización de nucleótidos, Nod1 y Nod2, receptores involucrados en la detección de bacterias intracelulares a través del reconocimiento de diferentes fragmentos estructurales del peptidoglicano [73]. Durante una infección, es poco probable que Nod1 y Nod2 sean activados en ausencia de una estimulación simultánea a través de TLRs. Por lo tanto, es posible que una de las funciones de estos receptores en las células presentadoras de Ags sea la de aumentar o modular las respuestas a los TLRs. Estudios recientes en el laboratorio del Dr. Sergio Costa Oliveira, demostraron que no habría una función significativa del receptor Nod2 en el control de la infección por *B. abortus in vivo* (comunicación personal).

Inmunidad Adaptativa

Se han identificado 3 mecanismos de la respuesta inmune adaptativa que parecen tener un rol en el control de la infección por *Brucella*. Primero, el IFN- γ producido por células T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ activa las funciones bactericidas del macrófago inhibiendo la supervivencia intracelular de la bacteria. Segundo, la citotoxicidad T CD8⁺ y $\gamma\delta$ puede destruir al macrófago infectado. Tercero, los isotipos de Abs de tipo Th1 como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan la fagocitosis [74, 75].

Células T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺

La respuesta de las células T se dirige contra un gran número de proteínas microbianas, cada una con un grupo acotado de determinantes para células T. Debido a que los LT reconocen Ags procesados, no es necesario que los Ags reconocidos por LT se encuentren expuestos en organismos intactos. Por ello, tanto los Ags de membrana externa como los Ags citoplasmáticos de *Brucella* pueden estimular LT y participar en la protección inmunespecífica [76-78].

Se ha caracterizado la importancia tanto de las células T CD4⁺ como CD8⁺ en la inmunidad contra *Brucella* [76, 77]. Estudios de transferencia adoptiva de Winter y col. [75] han demostrado que la inmunidad protectora contra *B. abortus* S19 en ratón se debe a un efecto combinado de células CD4⁺ (L3t4) y CD8⁺ (Lyt2). Sin embargo, experimentos en ratones deficientes en los genes que codifican para moléculas MHC I o MHC II demuestran que los ratones que no tienen células T CD8⁺ controlan la infección más lentamente que los ratones de la cepa salvaje. Los ratones deficientes en células T CD4⁺ controlan la infección en forma similar a los ratones de la cepa salvaje [79]. Por otro lado, otros autores utilizando *B. abortus* 2308 sugieren que los ratones deficientes en β 2 microglobulina controlan eficazmente la infección y que las células T CD8⁺ no son importantes hasta después de la primera semana de infección [64, 80]. Esto último está demostrado ya que ratones Balb/c

con una delección en el gen de IFN- γ , pueden prevenir el incremento de unidades formadoras de colonias (UFC) después de la primera semana posterior a la infección. En este mismo trabajo se demuestra que tanto la neutralización del TNF- α como la depleción de células T CD8⁺ producen el aumento de las UFC a las 3 semanas posinfección. Se ha descrito que linfocitos T CD8⁺ son activados durante la infección con *Brucella* [79, 81] y se han caracterizado algunos Ags que están involucrados en la inducción de esta respuesta citotóxica [76, 82].

Células T $\gamma\delta$

Se ha descrito que este tipo celular con el receptor T V γ 9V δ 2 está aumentado a nivel periférico en pacientes agudos infectados con *B. melitensis* [83]. Estas células activadas por Ags no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares porque secretan TNF- α e IFN- γ activando las funciones bactericidas del macrófago. Estudios *in vitro* sugieren que las células T V γ 9V δ 2 también podrían lisar directamente a las células infectadas [84].

Respuesta humoral

Tempranamente en la infección aparecen Acs que suelen permanecer detectables en el suero durante años. Estos Acs están dirigidos contra varios componentes del microorganismo, pero especialmente contra los Ags superficiales, particularmente el LPS [85]. Los Acs producidos colaboran en la lucha del hospedador contra el patógeno pero no son suficientes para evitar la enfermedad, seguramente debido al estilo de vida intracelular de *Brucella* spp. Sin embargo, la detección de Acs dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, y seguimiento de la infección [85].

Citoquinas

Las citoquinas estudiadas que desempeñan un rol importante en el control de la infección por *Brucella* spp. son la IL-12, el IFN- γ y el TNF- α [78, 86, 87].

La IL-12 es una citoquina clave que es producida por células B, macrófagos y DC y dirige la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th1 con producción de IFN- γ . La importancia de IL-12 en brucelosis ha sido bien descrita [88, 89]. Sin embargo, los mecanismos de inducción de IL-12 en estas células no se han elucidado.

El IFN- γ tiene un rol central en la inmunidad frente a *Brucella* mediante la activación de las funciones bactericidas del macrófago, induciendo la apoptosis, aumentando la diferenciación celular y la producción de citoquinas, induciendo el “switch” de inmunoglobulina G (IgG) a IgG2a y aumentando la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica [30]. La importancia del IFN- γ en la resolución de la infección por *Brucella* se demuestra en estudios con ratones deficientes en el gen de esta citoquina. Estos ratones mueren 6 semanas luego de la infección con *B. abortus* [80]. Sin embargo a pesar de ser *Brucella* un potente inductor de IFN- γ , esta bacteria es capaz de sobrevivir y reproducirse durante un largo período en el bazo de ratones infectados [90]. Otros estudios han sugerido que la activación con IFN- γ impide que *Brucella* establezca su nicho replicativo, y por tanto, si ya se estableció el bruceloma, el IFN- γ no tiene efecto alguno [34]. La producción temprana durante la infección de una citoquina inmunomoduladora como IL-10 podría explicar en parte este fenómeno [91].

PATOGENIA

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. La especial afinidad de las bacterias por el endometrio grávido y la placenta fetal condiciona que la principal manifestación clínica de la

infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables [92]. Se estima que el 40 al 50% de las vacas afectadas tienen obstaculizadas su capacidad reproductora, como resultado de la enfermedad [93]. La enfermedad es generalmente asintomática en las hembras no preñadas. En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo [94].

En el hombre presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y localización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso). La supervivencia intracelular de *Brucella* condiciona el curso ondulante de la enfermedad y la tendencia a la recaída y evolución crónica. Si bien constituye una enfermedad de baja mortalidad, puede dejar secuelas discapacitantes de magnitud variable. Por otra parte, la brucelosis humana no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, lo que favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva. Muchos pacientes padecen infecciones asintomáticas. El período de incubación varía entre 10 y 20 días, aunque la sintomatología puede aparecer varios meses después.

La brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, aguda, recurrente y crónica, según las manifestaciones clínicas. Sin embargo, la clasificación más aceptada es aquella que define la enfermedad aguda o crónica en base al tiempo de evolución de los síntomas [11]. Se considera pacientes agudos a aquellos que refieren haber padecido síntomas compatibles con brucelosis durante un lapso de hasta 1 año previo a la consulta. Mientras que se clasifican como crónicos aquellos pacientes que refieren haber padecido dichos síntomas durante un lapso superior a 1 año. Es interesante notar que la virulencia y la tendencia a la cronicidad varían entre especies de *Brucella*, siendo *B. abortus* y *B. suis* las de mayor tendencia a la cronicidad. Por el contrario, *B. melitensis* produce las infecciones más severas, tanto en humanos como

en animales [11]. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis. Debido al empleo de los antibióticos ya no se registra el clásico patrón de fiebre ondulante. El recuento de células en sangre se caracteriza usualmente por una leucopenia moderada y una relativa linfocitosis, junto con una leve anemia y trombocitopenia [30]. La tercera parte de los pacientes presenta tos seca o productiva, el 30% estreñimiento, el 5-10% diarreas. En el 50% de los casos se produce hepatomegalia ligera o moderada y esplenomegalia y en el 25% adenopatías. Más del 5% de los pacientes presentan lesiones cutáneas: erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo. Es característico el desarrollo de localizaciones específicas como la osteoarticular, respiratoria, genitourinaria y neuronal. Las recaídas o recidivas se presentan en el 15% de los casos, luego de 2 a 3 meses de terminado el tratamiento. La relación entre las distintas especies de *Brucella* y la patogenia tanto en los animales como en el hombre se detallan en la **Tabla I**.

En ambas fases, aguda y crónica, se observa un proceso inflamatorio generalizado. Los signos clínicos de esa inflamación son: fiebre ondulante, artritis, endocarditis, meningitis, pleocitosis, infiltración monocitaria de las articulaciones, granuloma hepático, etc. [11].

En rumiantes domésticos, los signos de la inflamación son orquitis en los machos y placentitis en las hembras [95]. *Brucella* puede infectar la placenta bovina e inducir abortos. En los infiltrados celulares de placenta se pueden encontrar macrófagos inmunoreactivos para antígenos de *Brucella*, neutrófilos y células linfocíticas [96].

En etapas tempranas de brucelosis humana se puede presentar una artritis inflamatoria intermitente, y algunos pacientes pueden desarrollar artritis inflamatoria crónica que asemeja otras formas de artritis inflamatorias humanas

[97]. La complicación osteoarticular es la presentación más frecuente de las formas localizadas de la enfermedad, la cual puede afectar articulaciones periféricas, articulaciones sacroilíacas o la columna vertebral [98-101].

En el hígado, la infección con *Brucella* induce lesiones hepáticas que pueden ser tanto granulomatosas como no granulomatosas [102, 103]. Histológicamente, los granulomas muestran necrosis central, un infiltrado de células polimórficas y fibrosis periférica [104].

En neurobrucelosis, la señal más característica de inflamación es la meningitis, la cual es ocasionada por la invasión del CNS por *Brucella* [105]. El examen del líquido cefalorraquídeo en la meningitis ocasionada por *Brucella* generalmente revela un elevado contenido de proteínas y pleocitosis linfocítica [105]. Las biopsias quirúrgicas del cerebro o meninges y el examen postmórtem del tejido nervioso evidencian infiltrado linfocítico perivascular y formación de granulomas [105].

La presencia de tejido granulomatoso es frecuentemente asociada con la persistencia de *Brucella*. La liberación de bacterias de estos granulomas puede favorecer la diseminación de la bacteria a distintas localizaciones a través de repetidos episodios de bacteremia [106].

Respuesta inflamatoria y patogenia

A pesar de la diversidad de signos y síntomas en la brucelosis humana, **la inflamación es un rasgo característico de esta enfermedad** presente virtualmente en todos los órganos afectados por la enfermedad. Esta particularidad, junto con la detección de bacterias en los tejidos inflamados, sugiere que *Brucella* estimula una robusta respuesta inflamatoria en los sitios en que se localiza.

B. abortus, uno de los agentes etiológicos de la enfermedad, ha demostrado ser capaz de activar poderosamente el sistema inmune innato y adaptativo, conduciendo a una fuerte respuesta proinflamatoria que favorece un perfil Th1 tanto *in vitro* como *in vivo* [56, 107]. Estudios conducidos hasta la fecha han revelado

que *B. abortus* puede inducir en diversos tipos celulares la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β [86, 108, 109], IL-6 [86, 109], IL-12 [68, 110-112] y TNF- α [68, 86, 109, 111, 112]. Estas citoquinas proinflamatorias generalmente poseen potentes funciones efectoras que se superponen para dar lugar a distintos componentes de la inflamación como por ejemplo: necrosis tisular [113], quimotaxis de infiltrados celulares, inducir la secreción de colagenasas y prostaglandinas por los fibroblastos sinoviales y condrocitos [114, 115], reabsorción ósea y destrucción del cartílago [116], al igual que una plétora de mecanismos microbicidas [117]. Además, se han reportado niveles aumentados de IFN- γ en pacientes con brucelosis aguda [107]; y otros estudios confirmaron que el IFN- γ y el TNF- α están involucrados en la patofisiología de la brucelosis y que se encuentran estrechamente relacionados con la activación inflamatoria de la enfermedad [107].

Sin embargo, **los mecanismos por los cuales estas bacterias desencadenan la respuesta inflamatoria son hasta el momento desconocidos.**

Activadores bacterianos de la respuesta inflamatoria

La mayoría de los rasgos relacionados con la patogenicidad de estas bacterias parecen estar concentrados en su membrana externa. Dentro de los componentes de la membrana con posible asociación a la patogenicidad, el LPS de *Brucella* ha suscitado especial interés [118, 119], a pesar de que ha sido demostrado que la mayoría de las características químicas, físicas y biológicas de esta molécula difieren cuantitativamente y cualitativamente del LPS “clásico” de las enterobacterias [120]. A diferencia de otras endotoxinas, el LPS de *Brucella* no es pirogénico, no induce una reacción de Shwartzman localizada, no aumenta la sensibilidad del hospedador a la histamina, no activa la cascada del complemento de manera significativa y es un mitógeno muy débil de LB murinos y humanos. Comparado con el LPS de las enterobacterias, se requieren concentraciones 100 veces más altas de LPS de

Brucella para inducir muerte por shock endotóxico. En cuanto a la producción de mediadores inflamatorios, se ha demostrado que la actividad biológica del LPS de *Brucella* es entre 3 y 4 órdenes de magnitud menor que el LPS de las enterobacterias [110, 111, 121]. Todas las propiedades biológicas del LPS dependen del lípido A, cuya estructura está conservada en un gran número de especies bacterianas [122]. La atenuada actividad biológica del LPS de *Brucella* parece estar relacionada con el lípido A de esta molécula y su particular estructura química mencionada anteriormente [123-125].

El mayor enigma que plantea el estudio de la patogenicidad en brucelosis es cómo pueden las bacterias del género *Brucella* desencadenar una respuesta inflamatoria si la actividad endotóxica de su LPS es despreciable. En forma alternativa, *B. abortus* podría utilizar su ADN para provocar una respuesta proinflamatoria. El ADN bacteriano se encuentra enriquecido en motivos CpG no metilados los cuales han demostrado activar el sistema inmune innato [126]. Sin embargo, se ha comprobado que el ADN de *B. abortus* es relativamente ineficiente en desencadenar la producción de citoquinas [111]. Se ha demostrado recientemente que HKBA induce la producción de TNF- α a través de una vía dependiente de TLR2; transductor específico de peptidoglicano y lipoproteínas; e independiente de TLR4 y TLR9 [112]. Dado que el LPS y el ADN bacteriano utilizan TLR4 y TLR9, respectivamente, para estimular la producción de citoquinas, éste último hallazgo sostiene la noción de que el LPS y el ADN de *B. abortus* no están involucrados en desencadenar la respuesta proinflamatoria en brucelosis. Esto implica que otros componentes bacterianos son los responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria.

Estudios desarrollados por el director de esta tesis, así como investigaciones realizadas por otros grupos de trabajo [127-129], han demostrado que las lipoproteínas bacterianas, ligandos TLR2 [130], son capaces de estimular la proliferación celular al igual que la producción de citoquinas proinflamatorias. Este fenómeno está asociado a la acilación de estas proteínas [127-129]. Además, se ha

demostrado que las lipoproteínas bacterianas también son capaces de inducir la producción de IL-10, una citoquina antiinflamatoria, en monocitos humanos [131]. La inhibición tanto autócrina como exócrina de la producción de IL-10 da como resultado un aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12 [132]. El hecho de que las lipoproteínas puedan inducir no sólo citoquinas inflamatorias, sino también antiinflamatorias, como IL-10, ha reforzado la idea de que **las lipoproteínas son factores cruciales en la patogénesis de las infecciones bacterianas.**

Mediante clonado y secuenciación se ha demostrado que tres genes que codifican para Omeps de *B. abortus*, Omp10, Omp16 y Omp19, exhiben características estructurales de precursores de lipoproteínas [133, 134], es decir que poseen un péptido señal aminoterminal que conforma la secuencia consenso necesaria para la modificación lipídica y el procesamiento de las lipoproteínas [133, 134]. El correcto procesamiento de Omp10, Omp16 y Omp19 en *E. coli* sugiere que el camino de maduración para lipoproteínas es funcionalmente compartido entre *Brucella* spp. y *E. coli* [134]. Análisis fisicoquímicos y funcionales confirmaron que Omp10, Omp16 y Omp19 son lipoproteínas y que se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa de *Brucella* [135]. El mismo trabajo ha demostrado que estas lipoproteínas están presentes en todas las especies del género *Brucella* y sus biovars.

A pesar del poderoso potencial inmunomodulador de las lipoproteínas, se les ha prestado hasta el momento poca atención en la brucelosis. En este trabajo **investigamos por primera vez la función de las lipoproteínas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria** asociada a esta enfermedad. Para ello, se puso especial énfasis en dilucidar que tipos celulares de la inmunidad innata son activados por estas moléculas, así como también las citoquinas inducidas como resultado de dicha activación. El entendimiento de los mecanismos y tipos celulares involucrados en desencadenar esta respuesta inflamatoria aportarán nuevas claves para entender, y por lo tanto mejorar el tratamiento y/o evitar la enfermedad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo de esta tesis está basada en evidencias que indican que bacterias intactas de *B. abortus* eran capaces de inducir activación celular en macrófagos peritoneales de ratones C3H/HeJ [120]. Estas células, son incapaces de responder a LPS ya que los ratones C3H/HeJ expresan un transductor de señales (TLR4) para LPS no funcional [136]. Se ha demostrado que ligandos diferentes de CD14 (tanto el LPS como las lipoproteínas de *B. abortus* lo son) [127, 137] emplean diferentes moléculas para transducir señales. El LPS de las enterobacterias transduce señales a través de TLR4 y las lipoproteínas bacterianas emplean TLR2 [138, 139]. La capacidad de *B. abortus* de activar células de ratones C3H/HeJ indica que el LPS de *B. abortus* induce activación celular a través de un TLR diferente a TLR4 o que otros componentes de la bacteria, por ejemplo las lipoproteínas, son capaces de desencadenar el proceso inflamatorio utilizando TLR2. Ambas posibilidades pueden coexistir, y resultados preliminares de nuestro laboratorio no permiten descartar ninguna de las dos. Por lo tanto, nos proponemos investigar la capacidad del LPS y las lipoproteínas de las bacterias del género *Brucella* para desencadenar una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas en brucelosis, y estudiar los componentes celulares involucrados en la señalización de esa respuesta.

En vista de la baja actividad endotóxica del LPS de *Brucella* y que el ADN de *Brucella* tampoco parece estar involucrado en la inducción de esta respuesta inflamatoria, es concebible que las lipoproteínas de *Brucella* puedan contribuir al desarrollo de la inflamación en esta enfermedad.

Para poner a prueba esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar la capacidad del LPS de *B. abortus* de inducir citoquinas inflamatorias en células de origen mieloide.
2. Clonar, expresar y purificar lipoproteínas de *B. abortus*.
3. Investigar la capacidad de las lipoproteínas de *B. abortus* de modular la respuesta inflamatoria en diferentes tipos celulares de origen mieloide:

3.1 Monocitos/macrófagos

3.2 Células dendríticas

3.3 Neutrófilos

4. Evaluar el efecto de la acilación en la actividad biológica de las lipoproteínas de *Brucella*.
5. Investigar el rol de diferentes TLRs en la activación celular inducida por las lipoproteínas y el LPS de las bacterias del género *Brucella*.

Nuestra aproximación experimental para determinar la activación de células de origen mieloide, involucró la evaluación de parámetros tanto estructurales como funcionales en los diferentes tipos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratones hembras de 4 a 6 semanas de edad de la cepa C3H/HeJ (Jackson Laboratory) y C3H/HeN (Charles River Laboratories). Los animales fueron asignados aleatoriamente a los distintos grupos experimentales. Los mismos fueron aclimatados y mantenidos en un bioterio convencional, recibiendo agua y alimento *ad libitum*.

Bacterias

Para el clonado y amplificación de las distintas construcciones se utilizó la cepa de *Escherichia coli* JM109 (Promega), mientras que para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa BL21 (DE3) (Stratagene). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) líquido o LB agar, suplementado cuando fue necesario, con 100 µg/ml de ampicilina. *B. abortus* 2308 y *E. coli* 11105 (ATCC) fueron crecidas en triptona de soja agar, suplementada con extracto de levadura (Merck). El número de bacterias en los cultivos en fase estacionaria fue obtenido comparando la DO a 600 nm con una curva estándar. Las bacterias fueron lavadas 5 veces durante 10 min. en PBS 0.01M pH 7.2. Las mismas fueron inactivadas hirviéndolas durante 20 min., alicuotadas y conservadas a -70°C hasta su uso (HKBA). La ausencia de viabilidad luego de la inactivación por calor fue corroborada por la ausencia de crecimiento bacteriano en triptona de soja agar.

Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes Omp16 y Omp19 de *B. abortus*

La secuencia completa de las proteínas Omp16 y Omp19 fue clonada en el vector pET22b+ (Novagen). Se diseñaron oligonucleótidos específicos conteniendo los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* en el extremo 5',

de acuerdo a las secuencias publicadas previamente por Tibor y col. [133, 134]. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

L-Omp16 sentido	5'CTCTGGCATATGCGCCGTATC3'
L-Omp16 antisentido	5'TTGCCGCTCGAGCCGTCCGGCCCC3'
L-Omp19 sentido	5'GTTGCCCATATGGCGTCAAAGAA3'
L-Omp19 antisentido	5'AAACTCGAGGCGCGACAGCGTCAC3'

Para obtener la versión no lipidada de las proteínas se utilizaron distintos oligonucleótidos sentido que amplifican la región 3' del gen de ambas proteínas sin el extremo aminoterminal correspondiente a la secuencia del péptido señal y la cisteína aminoterminal:

U-Omp16 sentido	5'GTTGCCCATATGGCGTCAAAGAA3'
U-Omp19 sentido	5'CTGGCCCATATGCAGAGCTCCCG3'

En la reacción de PCR se utilizó como templado el ADN genómico de *B. abortus* 544. El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes de la cepa JM109 y se purificó el ADN plasmídico con un kit comercial (Promega). Las construcciones así obtenidas (pET/L-Omp16, pET/L-Omp19, pET/U-Omp16, pET/U-Omp19) conteniendo el gen con el agregado de una cola de histidina-6X en el extremo carboxiterminal se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) en las cuales se expresaron las proteínas recombinantes luego de la inducción con IPTG (1mM). Las proteínas recombinantes lipidadas Omp16 (L-Omp16) y Omp-19 (L-Omp-19) fueron aisladas de la membrana bacteriana por extracción selectiva por separación de fases con Tritón X-114 al 2% [140]. Esta preparación fue purificada por cromatografía de afinidad con una columna de níquel-agarosa (Ni-NTA) (Qiagen). Las proteínas no lipidadas (U-Omp16 y U-Omp19) fueron extraídas de la fracción citosólica por sonicación. Posteriormente, las proteínas recombinantes fueron adsorbidas con Sepharosa-Polimixina B (Sigma Aldrich) para eliminar la

contaminación con LPS de *E. coli*. La concentración de LPS en las preparaciones de proteínas recombinantes fue menor a 0,25 unidades de endotoxina por µg de proteína según se determinó por el ensayo de “Limulus Amebocyte” (Associates of Cape Cod). La concentración proteica se determinó por el método de ácido bicinconínico (Pierce) utilizando seroalbúmina bovina como estándar. Las proteínas purificadas fueron alicuotadas y conservadas a -70°C hasta el momento de ser utilizadas. La pureza de las proteínas recombinantes se verificó por SDS-PAGE seguido de tinción argéntica, el tamaño molecular se corroboró por comparación con marcadores de peso molecular. La identidad de las proteínas se confirmó por “Western blot” con Acs monoclonales anti-Omp16 (8C3G3) o anti-Omp19 (5C10A8).

Lipoproteínas y LPS

El LPS de *B. abortus* 2308 y el de *E. coli* O111 K58H2 fueron cedidos gentilmente por el Dr. I. Moriyón (Universidad de Navarra, Pamplona, España). La calidad y pureza de estas preparaciones se encuentran descritas en la literatura [141]. El LPS fue solubilizado en agua por sonicación en las concentraciones apropiadas y autoclavado previo a su uso. Las proteínas recombinantes de la membrana externa de *Borrelia burgdorferi*, OspA lipidada (L-OspA) y no lipidada (U-OspA) fueron cedidas por el Dr. John Dunn (Brookhaven National Laboratories). El lipohexapéptido sintético Pam₃Cys fue obtenido de Boehringer Mannheim.

Células

Obtención y estimulación de líneas celulares y macrófagos murinos

Células de la línea THP-1 fueron obtenidas de ATCC y fueron cultivadas como se describió previamente [127, 132]. Para inducir la expresión de CD14, las células fueron cultivadas entre 48 y 72 hs. [142] en presencia de 1,25-dihidroxitamina D3 (Vit-D3) (Calbiochem-Novabiochem) 0.05 µM.

Se aislaron macrófagos peritoneales a partir de ratones de las cepas C3H/HeJ y C3H/HeN, previamente inyectados con 1ml de tioglicolato estéril 3% por vía intraperitoneal, según se describe en literatura [143].

Células THP-1 tratadas con Vit-D3 o macrófagos peritoneales murinos (1×10^6 células/ml) fueron cultivados en placas de 48 pocillos de polipropileno de fondo plano (Corning) en medio completo (RPMI 1640, 25 mM buffer HEPES, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina y 0.25 μ g/ml de fungizona) con 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL Life Technologies).

Para los estudios de dosis-respuesta las células fueron estimuladas con HKBA, L-Omp16, U-Omp16, L-Omp19, U-Omp19, L-OspA, U-OspA, LPS de *B. abortus* (BaLPS) y LPS de *E. coli* (EcLPS). Las concentraciones de estimulantes utilizadas fueron 500 ng/ml de L-OspA y U-OspA, 10, 100, 500 y 1000 ng/ml de L-Omp16, U-Omp16, L-Omp19 y U-Omp19, y 100 ng/ml de LPS de *E. coli*. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda (5% CO₂, 95% aire) por 24 hs., excepto cuando se indica en el texto. En donde se indica, los cultivos fueron incubados en presencia de 10 μ g/ml de polimixina B sulfato (Sigma-Aldrich). Al final del cultivo, las células fueron centrifugadas a 4000 x g a 4°C durante 10 min. y los sobrenadantes fueron alicuotados y almacenados a -70°C hasta su posterior utilización.

Para los estudios de cinética de la producción de citoquinas, las células THP-1 fueron incubadas con los estímulos indicados durante 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 hs. y se colectaron los sobrenadantes de cultivo.

Obtención y estimulación de DC humanas

Se obtuvieron PBMCs humanos de dadores sanos a partir de un gradiente de Ficoll-Paque® (GE Bio-Sciences). Los monocitos fueron posteriormente purificados de los PBMCs por gradiente de Percoll (GE Bio-Sciences). La pureza de los monocitos aislados, CD14⁺, fue mayor al 90% según se determinó por citometría de flujo. Para inducir la diferenciación de DC, los monocitos CD14⁺

fueron cultivados en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ a 37°C en medio completo con 10% SFB, suplementado con 50 ng/ml de Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF) (Gautier Laboratories) y 10 ng/ml de IL-4 recombinante humana (rhIL-4) (Preprotech). Al día 6, las células exhibieron una morfología típica de DC inmaduras, con un fenotipo CD14⁻, CD1A⁺ y DC-SIGN⁺ evaluado por citometría de flujo.

Para inducir la maduración de las DC, las mismas fueron infectadas (como se indica a continuación) o re-cultivadas en medio completo fresco con los distintos estímulos por otras 24hs. Las concentraciones de estímulos utilizadas fueron las siguientes: *E. coli* LPS (EcLPS) (10 ng/ml), *B. abortus* LPS (BaLPS) (1000 ng/ml), HKBA (1 x 10⁸ y 1 x 10⁹ bacterias/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml), L-Omp19 y U-Omp19 (10, 100 y 1000 ng/ml). Donde se indica, los cultivos también contenían 10 µg/ml de polimixina B sulfato.

Infeción de DC

Las DC (1 x 10⁶ células/ml) fueron infectadas con *B. abortus* o *E. coli* a una MOI de 5 durante 1 h. en medio sin antibióticos. Posteriormente, se lavaron las células extensivamente para remover las bacterias no internalizadas y se continuó la infección por otras 24hs en presencia de antibióticos (100 µg/ml gentamicina y 50 µg/ml estreptomycin) para eliminar las bacterias extracelulares remanentes. Para monitorear la replicación intracelular de *Brucella*, las células infectadas se lavaron y lisaron a distintos intervalos posinfección con 0.1% de Tritón X-100 (vol/vol). El número de bacterias intracelulares viables (expresado como UFC/pocillo) fue determinado plaqueando diluciones seriales en tripton de soja agar.

Obtención y estimulación de neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos fueron obtenidos a partir de sangre periférica de dadores sanos por gradiente de Ficoll-Paque® seguido de una sedimentación con Dextran al 6% y una lisis hipotónica con solución salina para eliminar los

eritrocitos contaminantes. Los neutrófilos así obtenidos, fueron lavados dos veces con PBS y resuspendidos en medio completo con 5% de SFB, en una concentración final de 1×10^6 células/ml. La viabilidad celular fue mayor al 98% según se determinó por exclusión del colorante azul de tripan. La pureza final de la preparación de neutrófilos fue mayor al 95% de acuerdo al examen morfológico con tinción de Giemsa y patrones de citometría de flujo.

Los neutrófilos fueron estimulados con los diferentes estímulos de acuerdo a lo indicado en cada ensayo. Para los estudios de cinética de la producción de IL-8, los neutrófilos fueron incubados con los estímulos indicados durante 4, 8, 24 y 48 hs. y se colectaron los sobrenadantes de cultivo.

Bloqueo de TLRs

Las células THP-1 o DC (1×10^6 células/ml) fueron pre-incubadas con 20 μ g/ml de Ac monoclonal anti-TLR2 humano (clon TL2.1. eBiosciences), anti-TLR4 humano (clon HTA125. eBiosciences), o el Ac IgG2a, utilizado como control de isotipo, durante 30 min. a 4°C. Esta preparación fue posteriormente incubada con LPS de *E. coli* (10 ng/ml), LPS de *B. abortus* (1000 ng/ml), L-OspA (500 ng/ml), HKBA (1×10^8 bacterias/ml) o L-Omp19 (500 ng/ml). Los cultivos fueron incubados por 24 hs., como se mencionó previamente, y los sobrenadantes fueron analizados para determinar la concentración de las distintas citoquinas.

Citometría de flujo

Se utilizó citometría de flujo para caracterizar el fenotipo de los distintos tipos celulares y para evaluar la expresión de las distintas moléculas de superficie analizadas. Los Acs monoclonales conjugados a FITC anti-CD14 y CD1a y los conjugados a PE anti-CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCII, MHCI, CD40, DC-SIGN, CD11b, CD62L y CD35, fueron obtenidos de BD Biosciences. Previo al

análisis en un citómetro de flujo FacsCalibur Flow Cytometer[®], las células fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído al 1%.

Para cada muestra se adquirieron 10.000 eventos y los datos fueron procesados utilizando el software CellQuest (BD Biosciences). A partir de los histogramas se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada población analizada.

Actividad endocítica

La actividad endocítica de las DC fue medida por la incorporación de ovoalbúmina conjugada a FITC (OVA-FITC) (gentilmente cedida por la Dra. Vermeulen) como se describe en la literatura [144]. Las células fueron incubadas en medio completo con 100 µg/ml de OVA-FITC durante 1 h. a 4°C para determinar la endocitosis inespecífica, o a 37°C para determinar la endocitosis específica. Luego se lavaron las células y fueron analizadas por citometría de flujo.

Cultivo mixto leucocitario (CML)

Las DC estimuladas con L-Omp19, U-Omp19, HKBA o LPS de *E. coli* fueron tratadas con 30 µg/ml Mitomicina C (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 30 min., se lavaron exhaustivamente y se incubaron en medio fresco en placas de 96-pocillos de fondo en U, durante 5 días con PBMCs (2 x 10⁵/pocillo) provenientes de un dador no relacionado, en distintas relaciones (1:20; 1:50; 1:100). Para medir la proliferación linfocitaria, se agregó 1 µCi/pocillo de [³H]-Timidina (ICN Pharmaceuticals Inc.) y se incubó otras 18 hs. Luego de cosechar los cultivos, se determinó la incorporación de [³H]-Timidina mediante un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments).

Producción de especies reactivas del oxígeno

Para determinar la capacidad de los distintos estímulos de inducir el estallido respiratorio en neutrófilos, se determinó la capacidad de los mismos de sensibilizar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducida por PMA. Neutrófilos purificados (2.5×10^5) fueron incubados a 37°C con los estímulos indicados durante 30 min. Posteriormente se incubaron con Dihidroxirodamina (DHR, Invitrogen) (1mM), transcurridos 15 min. se agregó PMA (5 ng/ml) y se incubó por otros 15 min. Inmediatamente después las células fueron analizadas por citometría de flujo como se describe en la literatura [145].

Apoptosis

Los neutrófilos purificados (1×10^6 células/ml) fueron incubados con los estímulos indicados por 6, 24, 48, o 72 hs. Las células fueron luego lavadas y se determinó el porcentaje de neutrófilos apoptóticos mediante el ensayo de Anexina V (AV). Las células fueron tratadas con ioduro de propidio (PI) y AV-FITC (Sigma-Aldrich) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células AV⁺/PI⁻ se consideraron en apoptosis temprana, y las células AV⁺/PI⁺ se consideraron en apoptosis tardía.

Quemotaxis

Para medir la migración celular se utilizaron placas de microquemotaxis de 96 pocillos con filtro de policarbonato con un poro de $0.3 \mu\text{m}$ de diámetro (Corning). Los neutrófilos (1×10^6 células/ml) fueron sembrados en el pocillo superior de las cámaras y se colocaron los estímulos indicados en el pocillo inferior de las cámaras. La migración celular fue cuantificada mediante el recuento del número de células que alcanzaron el pocillo inferior de la cámara luego de un periodo de incubación de 2 hs. Como control positivo se utilizó fMLP (cedido por la Dra. Analía Trevani) (1×10^{-7} M) y el LPS de *E. coli*.

ELISA

La concentración de citoquinas humanas y murinas (IL-6, IL-12, IL-10, IL-8 y TNF- α) en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante ELISA de captura utilizando Acs monoclonales específicos para las citoquinas mencionadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con un post-test de Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism versión 4.00.

CAPÍTULO 1:

Respuesta inflamatoria inducida por Brucella abortus en monocitos/macrófagos

INTRODUCCIÓN

Los monocitos son originados en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide común que es compartido con los neutrófilos, y luego se dirigen a la circulación periférica en donde circulan durante varios días antes de entrar en los tejidos para repoblar el pool de macrófagos tisulares. Los macrófagos se encuentran distribuidos en todos los tejidos del cuerpo humano, y de introducirse un inoculo infeccioso por cualquier vía, un macrófago se encontrará generalmente muy próximo al microorganismo invasor. Todos los estímulos proinflamatorios, metabólicos e inmunes, generan un aumento en el reclutamiento de monocitos a los sitios periféricos, en donde tendrá lugar la diferenciación a macrófagos y DC [146].

Como se mencionó en la introducción, los monocitos/macrófagos tienen un rol central en la infección con *Brucella* [36, 56]. Estas bacterias son capaces de invadir células del sistema reticuloendotelial, y pueden ser secuestradas por los macrófagos en sitios específicos del hospedador, como el bazo, hígado, cerebro, articulaciones, corazón y médula ósea. Los monocitos/macrófagos son además una de las células con mayor capacidad de producir citoquinas. La importancia de las citoquinas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria ha sido bien documentada, y se ha encontrado que las mismas están involucradas en la fisiopatología de la brucelosis [107].

A pesar de que se ha documentado que el LPS de las enterobacterias juega un rol central en la patogénesis de las infecciones con bacterias Gram-negativas [147], la capacidad del LPS de *Brucella* de inducir una respuesta inflamatoria ha sido cuestionada [111, 112, 121]. Por otro lado, las lipoproteínas bacterianas poseen propiedades inmunoestimuladoras intrínsecas [127-129].

Para investigar el papel que tienen estos componentes bacterianos en la inflamación asociada a la infección con bacterias del género *Brucella*, comenzamos

entonces por analizar la capacidad de dichas moléculas de inducir la activación de monocitos/macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias. Como modelo de célula monocítica se utilizó la línea monocítica humana THP-1. Además, la estimulación con *B. abortus*, nos permitió inferir si las lipoproteínas o el LPS son los principales estimulantes de monocitos/macrófagos en estas bacterias.

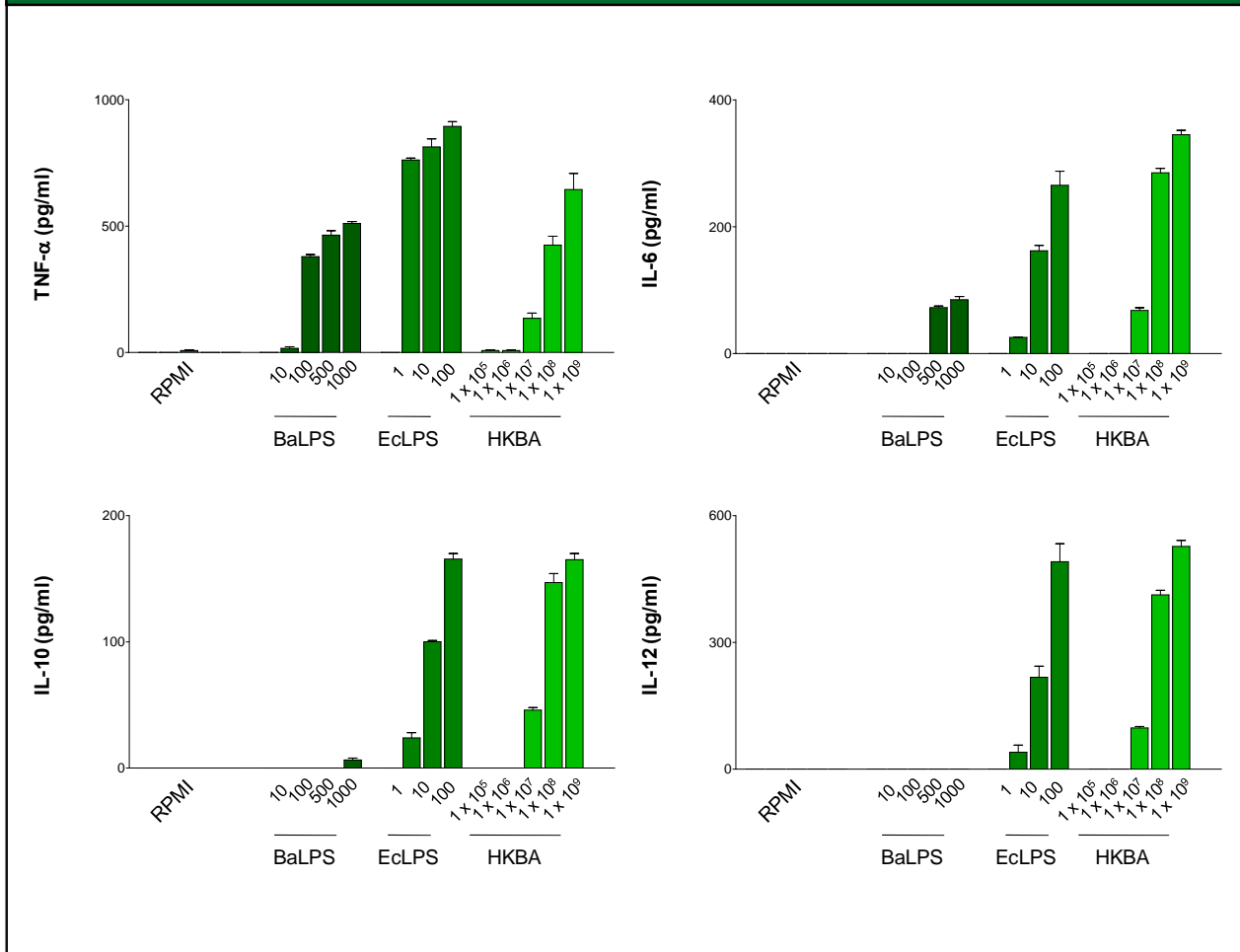
RESULTADOS

El LPS no contribuye en la producción de citoquinas inducida por *B. abortus*

En primer lugar se evaluó la contribución del LPS de *B. abortus* en la producción de citoquinas inflamatorias mediada por *Brucella* en monocitos. Células THP-1 fueron incubadas con bacterias enteras muertas por calor (HKBA), LPS de *B. abortus*, o LPS de *E. coli* utilizado como control, y luego de 24 hs. de cultivo, se cuantificó la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. La producción de todas las citoquinas investigadas se vio marcadamente aumentada en los sobrenadantes de cultivo provenientes de células estimuladas con HKBA comparada con las células sin estimular. La producción de citoquinas aumentó en función de la cantidad de bacterias presentes en el cultivo. Se detectó un aumento significativo ($P < 0.01$) en los cultivos que contenían entre 1×10^7 y 1×10^9 bacterias/ml. La producción de citoquinas en los cultivos con 1×10^6 bacterias/ml o menos cayó dramáticamente al nivel de las células no estimuladas (**Figura 1**) Por el contrario, el LPS de *B. abortus* resultó ser un inductor débil de la producción de citoquinas. En concentraciones comparables a las que se suponen se encuentran presentes en 1×10^7 a 1×10^9 bacterias/ml, el LPS de *B. abortus* indujo la secreción de cantidades marginales de IL-10 y fue incapaz de inducir la producción de IL-12 (1×10^7 células de *B. abortus* 2308 contienen una cantidad de LPS estimada de 10 ng, cantidades similares de LPS fueron informadas para las células de *B. abortus* RB51 [148]). En las células THP-1, el LPS de *B. abortus* sólo fue capaz de inducir la producción de IL-6 y TNF- α , sin embargo la producción en cantidades significativas de estas citoquinas ($P < 0.01$) se logró con concentraciones de 100 ng/ml o superiores (**Figura 1**). Estos resultados indican que HKBA es capaz de inducir la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias

en células THP-1. También sugieren que dada su baja actividad biológica, el LPS de *B. abortus* no parece estar involucrado en desencadenar esta última respuesta.

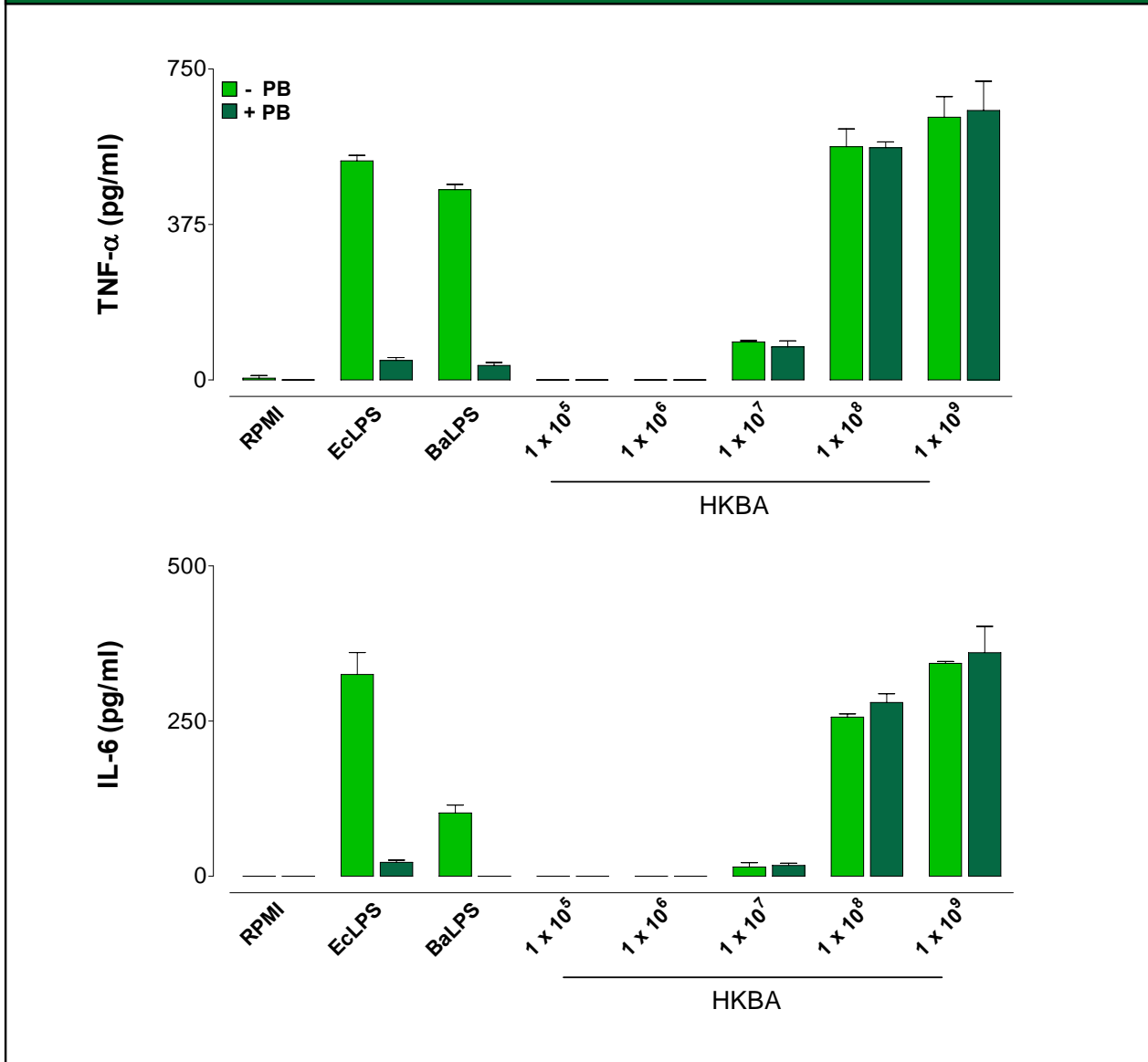
Figura 1. HKBA induce la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias en células THP-1 en mayor medida que el LPS de *B. abortus*.



Células THP-1 (1×10^6 células /ml) tratadas con Vit-D3 fueron incubadas durante 24 hs. con medio completo (RPMI), LPS de *B. abortus* (BaLPS), LPS de *E. coli* (EcLPS) (ng/ml) o distintas concentraciones de HKBA (bacterias/ml) y se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado.

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos para evaluar la contribución del LPS en la producción de citoquinas mediada por HKBA. Con este propósito las células THP-1 fueron incubadas con HKBA, LPS de *B. abortus* o LPS de *E. coli* en presencia o ausencia de polimixina B, un inhibidor específico de la actividad del LPS [149], y luego de 24 hs. de cultivo se evaluó por ELISA la producción de IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo. Una vez más, HKBA indujo significativamente ($P < 0.01$) la producción de IL-6 y TNF- α en forma dosis-dependiente. La secreción de citoquinas no fue debida al LPS de *B. abortus*, ya que el agregado de polimixina B al cultivo no tuvo efecto alguno en la producción de citoquinas inducida por HKBA, en una concentración tal que bloqueaba por completo la producción de citoquinas en respuesta a 100 ng/ml de LPS de *E. coli* y 1000 ng/ml de LPS de *B. abortus* (**Figura 2**).

Figura 2. El LPS de *B. abortus* no está involucrado en la producción de citoquinas mediada por HKBA.

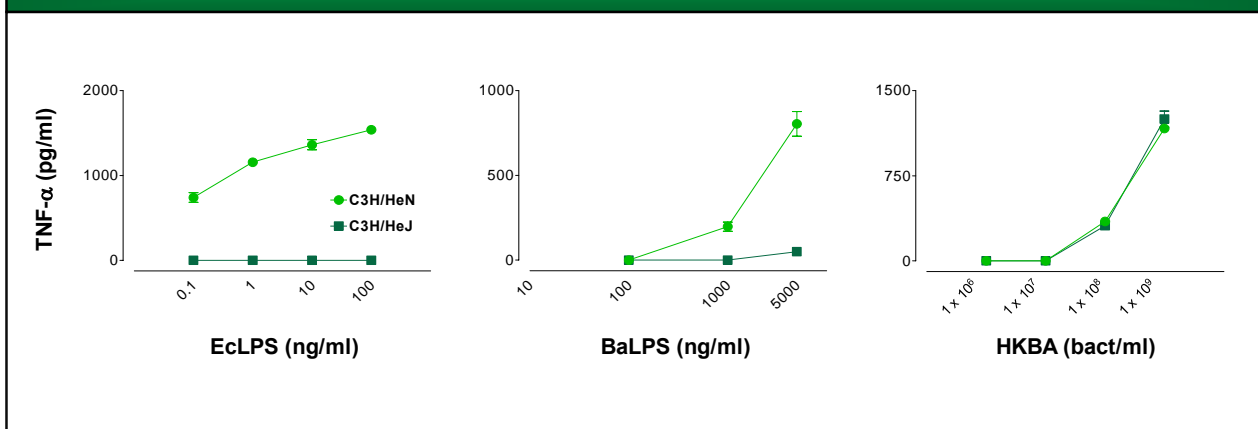


Células THP-1 (1×10^6 células/ml) tratadas con Vit-D3 fueron incubadas con medio completo (RPMI), LPS de *B. abortus* (BaLPS) (1000 ng/ml), LPS de *E. coli* (EclPS) (100 ng/ml) o distintas concentraciones de HKBA (bacterias/ml), en presencia (+ PB) o ausencia de Polimixina B (- PB). Luego de 24 hs. se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado.

Para corroborar la falta de contribución del LPS en la producción de citoquinas inducida por *B. abortus*, se evaluó la producción de TNF- α inducida por HKBA en macrófagos peritoneales de ratones C3H/HeJ que no responden al LPS por poseer un receptor TLR4 no funcional [136]. Células provenientes de la cepa salvaje C3H/HeN tratadas con LPS de *B. abortus* y LPS de *E. coli*, secretaron TNF- α en forma dosis dependiente. Ambas preparaciones de LPS fueron incapaces de inducir TNF- α en células provenientes de ratones C3H/HeJ (**Figura 3**). Por el contrario, HKBA indujo las mismas cantidades de TNF- α ($P > 0.05$) en macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratones, indicando que la activación mediada por HKBA es independiente del LPS (**Figura 3**).

En su conjunto, estos resultados indican que el LPS de *B. abortus* no contribuye en la producción de citoquinas inducida por HKBA. Los mismos también indican que el LPS de *B. abortus*, pero no HKBA, activa a los macrófagos a través de TLR4.

Figura 3. La producción de TNF- α inducida por HKBA es independiente de TLR4.

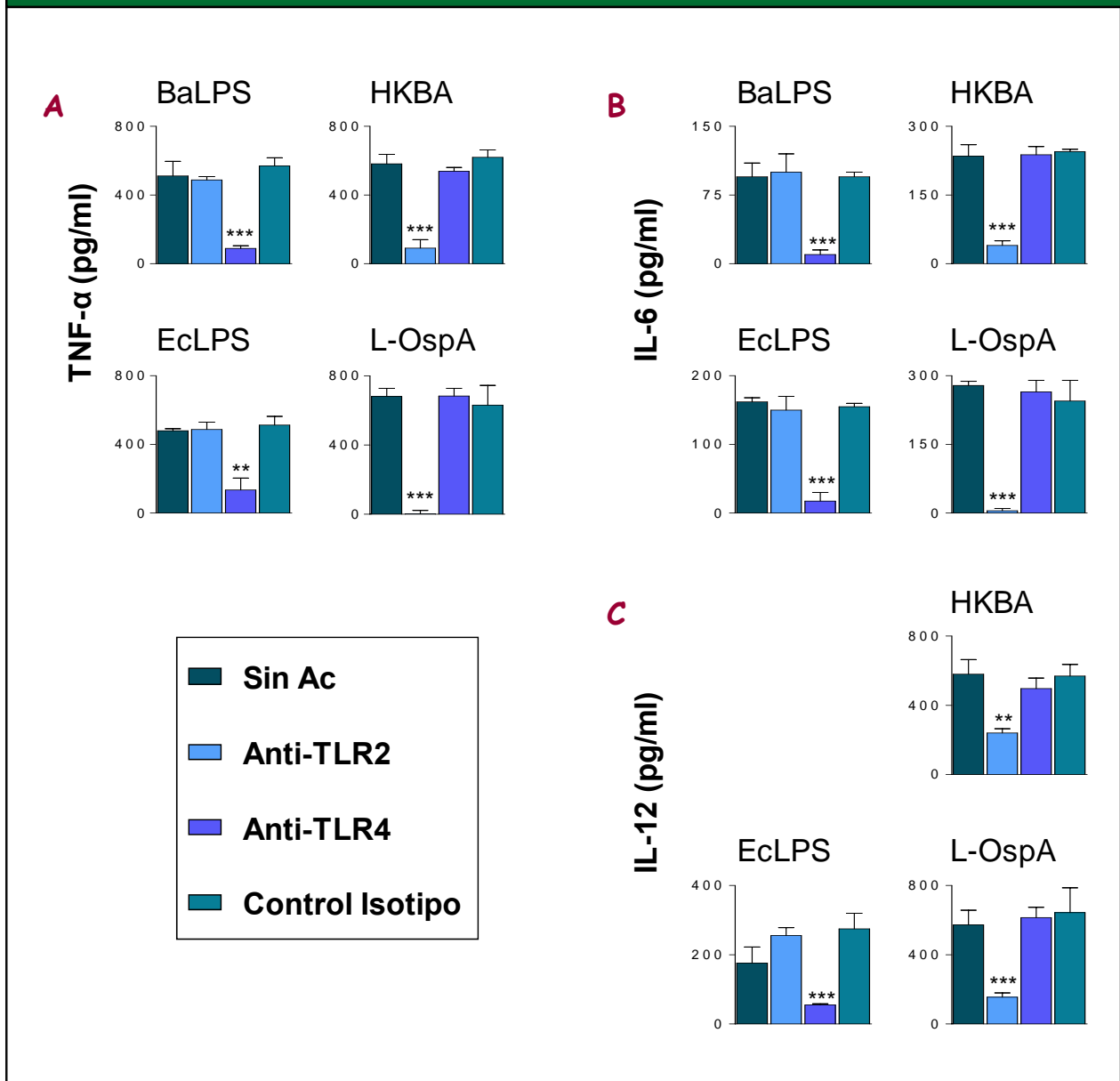


Macrófagos peritoneales provenientes de ratones C3H/HeJ o C3H/HeN fueron incubados con LPS de *E. coli* (EcLPS), LPS de *B. abortus* (BaLPS) o distintas concentraciones de HKBA (bacterias/ml). Luego de 24 hs. se determinó la producción de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado.

La producción de citoquinas inducida por HKBA es dependiente de TLR2

Para continuar examinando el rol de TLR4 y TLR2 en la producción de citoquinas inducida por HKBA en monocitos humanos, se pre-incubaron células THP-1 con Acs monoclonales anti-TLR4 y anti-TLR2, o sus respectivos controles de isotipo, y luego las células fueron estimuladas con HKBA o LPS de *B. abortus*. Luego del cultivo se evaluó la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Como control se utilizó LPS de *E. coli* y la lipoproteína de *Borrelia burgdorferi* L-OspA, un ligando TLR2. Como era de esperarse, la pre-incubación de las células THP-1 con anti-TLR4 bloqueó significativamente ($P < 0.01$) la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 mediada por el LPS tanto de *E. coli* como de *B. abortus*, mientras que el Ac anti-TLR2 inhibió significativamente ($P < 0.001$) la producción de las tres citoquinas mediada por L-OspA (**Figura 4**). El Ac anti-TLR2 también bloqueó de manera significativa ($P < 0.01$) la producción TNF- α , IL-6 e IL-12 mediada por HKBA. En cambio, el Ac anti-TLR4 no tuvo efecto alguno en esta respuesta (**Figura 4**). Los Acs utilizados como control de isotipo no tuvieron efecto alguno en ninguna de las respuestas estudiadas. Estos resultados indican que la activación de monocitos y la producción de citoquinas inducida por *B. abortus* depende de TLR2.

Figura 4. La producción de citoquinas inducida por HKBA es dependiente de TLR2.

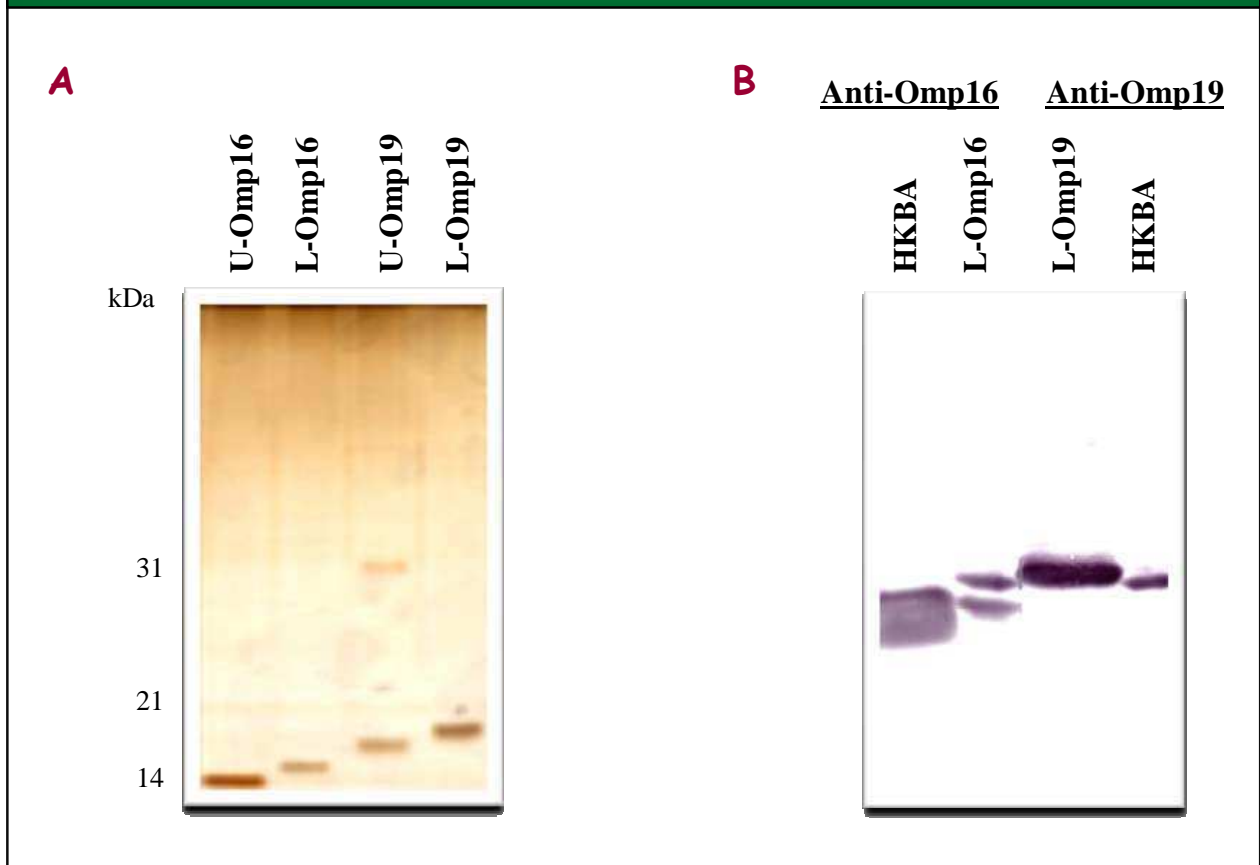


Células THP-1 (1×10^6 células/ml) fueron dejadas sin tratar (Sin Ac) o pre-incubadas con el Ac monoclonal anti-TLR2, anti-TLR4 o el respectivo control de isotipo durante 30 min. a 4°C , previo al agregado de los distintos estímulos: LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml), LPS de *B. abortus* (BaLPS) (1000 ng/ml), L-OspA (500 ng/ml) o HKBA (1×10^8 bacterias/ml). Luego de 24 hs. se determinó la producción de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-12 (C) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. Sin Ac.

Clonado, expresión y purificación de las lipoproteínas de *B. abortus* Omp16 y Omp19

Dado que la producción de citoquinas inducida por HKBA procede a través de TLR2 y teniendo en cuenta que las lipoproteínas bacterianas son potentes inductores de citoquinas en una gran variedad de células [127-129] a través de una vía mediada por TLR2 [130], hipotetizamos que las lipoproteínas de *Brucella* podrían ser las responsables de la estimulación de citoquinas observada en las células THP-1 estimuladas con HKBA. Para probar esta hipótesis, se clonaron las lipoproteínas de *B. abortus* Omp16 y Omp19, se expresaron en *E. coli* y se purificaron con el fin de ser usadas como estimulantes modelo de lipoproteínas de *B. abortus*. Además, para investigar si el dominio activo de Omp16 y Omp19 era la porción aminoterminal con un residuo de cisteína tripalmitoilada, también se clonaron y purificaron las versiones no lipidadas de ambas Omps carentes del péptido señal y la cisteína aminoterminal. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y posteriormente purificadas por cromatografía de afinidad. Se obtuvo una pureza mayor al 95% para cada una de las preparaciones resultantes (**Figura 5A**). El análisis en geles de poliacrilamida reveló que ambas proteínas tenían un peso similar al de las proteínas nativas (**Figura 5B**). La identidad de Omp16 y Omp19 se verificó por “Western-blot” mediante el empleo de Acs monoclonales específicos. El Ac monoclonal contra Omp16 detectó además una banda adicional con un peso molecular ligeramente mayor en la preparación de L-Omp16 (**Figura 5B**). Ya que el proceso de acilación de las proteínas es una modificación post-traducciona, esta banda podría corresponder a una forma precursora de Omp16 [135].

Figura 5. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes de *B. abortus* Omp16 y Omp19.



Las proteínas recombinantes U-Omp16, L-Omp16, U-Omp19 y L-Omp19 fueron purificadas por cromatografía de afinidad, la pureza de las proteínas se verificó por SDS-PAGE seguido de tinción argéntica (**A**). La identidad de L-Omp16 y L-Omp19 se confirmó por “Western blot” con los Acs monoclonales anti-Omp16 y anti-Omp19 (**B**).

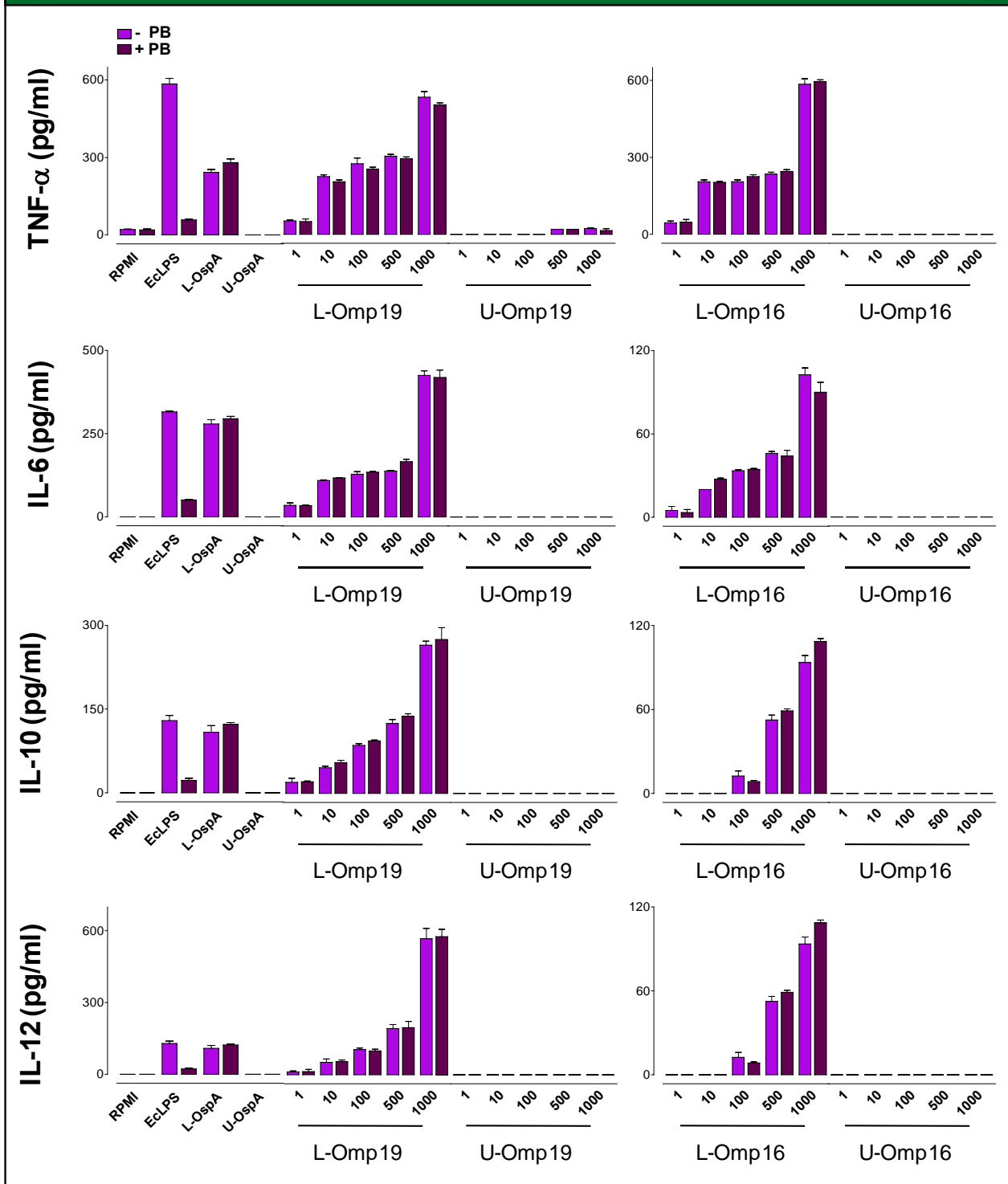
Las lipoproteínas de *B. abortus* Omp16 y Omp19 inducen la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias en células THP-1

A continuación se determinó la capacidad de Omp16 y Omp19 para inducir la secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias en células THP-1. Las células fueron incubadas con L-Omp16, U-Omp16, L-Omp19 o U-Omp19, y luego de 24 hs. de cultivo se evaluó por ELISA la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo. Nuevamente, se utilizó el LPS de *E. coli* y la lipoproteína L-OspA como controles. L-Omp16 y L-Omp19 indujeron, en forma

dosis dependiente, la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α . Concentraciones tan bajas como 1 ng/ml de L-Omp19 desencadenaron la producción significativa ($P < 0.05$) de TNF- α , IL-10 e IL-6, y una producción significativa ($P < 0.05$) de IL-12 se observó a partir de concentraciones de 10 ng/ml de L-Omp19. La máxima producción de todas las citoquinas se alcanzó con 1000 ng/ml de proteína (**Figura 6**). Ambas Omps fueron igualmente efectivas en la inducción de TNF- α . L-Omp16 indujo cantidades significativas ($P < 0.05$) de IL-6, IL-10 e IL-12 a partir de una concentración de 100 ng/ml. La producción de citoquinas por las células THP-1 estimuladas con estas lipoproteínas fue dependiente de la lipidación de estas moléculas, ya que U-Omp16 y U-Omp19 fueron incapaces de inducir IL-6, IL-10, IL-12 o TNF- α en cualquiera de las concentraciones probadas (**Figura 6**).

Para asegurarnos de que la producción de citoquinas no fuera debida al LPS de *E. coli* que podría haber sido copurificado con las Omps, los cultivos fueron hechos en presencia o ausencia de polimixina B. La secreción de citoquinas no fue, en efecto, debida a una contaminación con LPS, ya que el agregado de polimixina B no alteró en forma alguna la producción de citoquinas inducida por L-Omp16 o L-Omp19 en condiciones en las que si bloqueó completamente la producción de citoquinas en respuesta a 100 ng/ml de LPS de *E. coli* (**Figura 6**). Como se esperaba, L-OspA indujo altos niveles de todas las citoquinas analizadas y los mismos no se vieron afectados por el agregado de polimixina B. Estos resultados demuestran que las lipoproteínas de *B. abortus* inducen citoquinas pro y antiinflamatorias en células THP-1. También indican que la modificación lipídica de Omp16 y Omp19 es esencial para la inducción de citoquinas en monocitos.

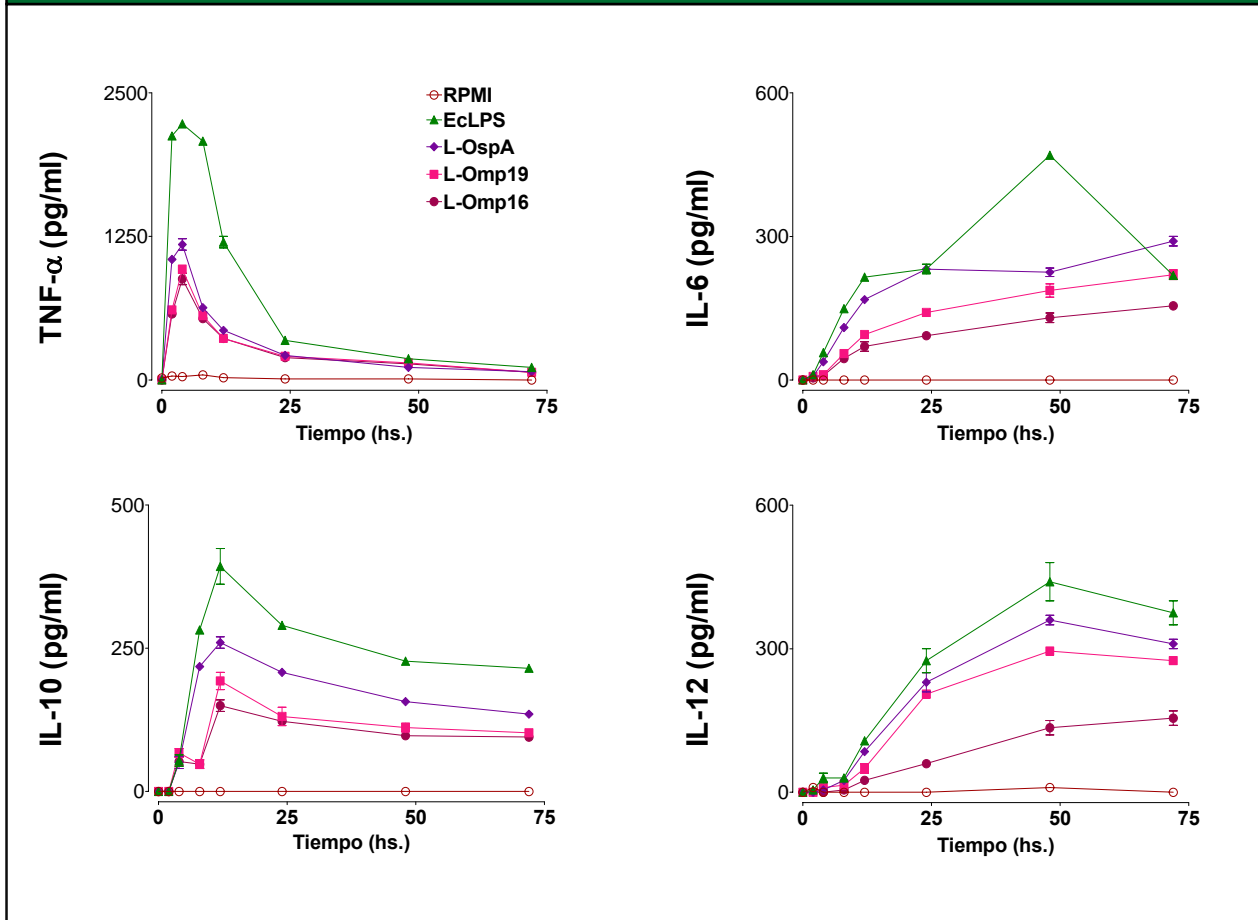
Figura 6. Las lipoproteínas de *B. abortus* inducen la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias.



Células THP-1 (1×10^6 células/ml) tratadas con Vit-D3 fueron incubadas con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EclPS) (100 ng/ml), L-OspA (500 ng/ml), U-OspA (500 ng/ml) o distintas concentraciones de L-Omp19, U-Omp19, L-Omp16 y U-Omp16 (ng/ml), en presencia (+ PB) o ausencia de Polimixina B (- PB). Luego de 24 hs. se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado.

También se determinó la cinética de la producción de citoquinas en células THP-1 incubadas con L-Omp16, U-Omp16, L-Omp19, U-Omp19, L-OspA y LPS de *E. coli*. La concentración de citoquinas se determinó mediante ELISA a las 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 hs luego de agregar los estímulos a los cultivos. U-Omp16 y U-Omp19 fueron incapaces de inducir la producción de ninguna citoquina en ninguno de los tiempos analizados (datos no mostrados). La producción de todas las citoquinas estudiadas aumentó rápidamente de manera significativa ($P < 0.05$) en las primeras 20 hs. de estimulación con L-Omp16, L-Omp19, L-OspA y LPS de *E. coli*. Luego de este tiempo, la concentración de citoquinas continuó aumentando a una tasa menor (IL-6 e IL-12) o declinó gradualmente (IL-10 y TNF- α) (**Figura 7**). La concentración de TNF- α alcanzó su valor máximo a las 2 hs. postestimulación, para luego declinar rápidamente. La concentración de IL-10 obtuvo valores máximos entre las 8 y las 16 hs. postestimulación y luego declinó. Las concentraciones de IL-6 e IL-12 aumentaron más lentamente que las citoquinas mencionadas anteriormente y alcanzaron una meseta a las 48 hs. postestimulación.

Figura 7. Cinética de la producción de citoquinas.



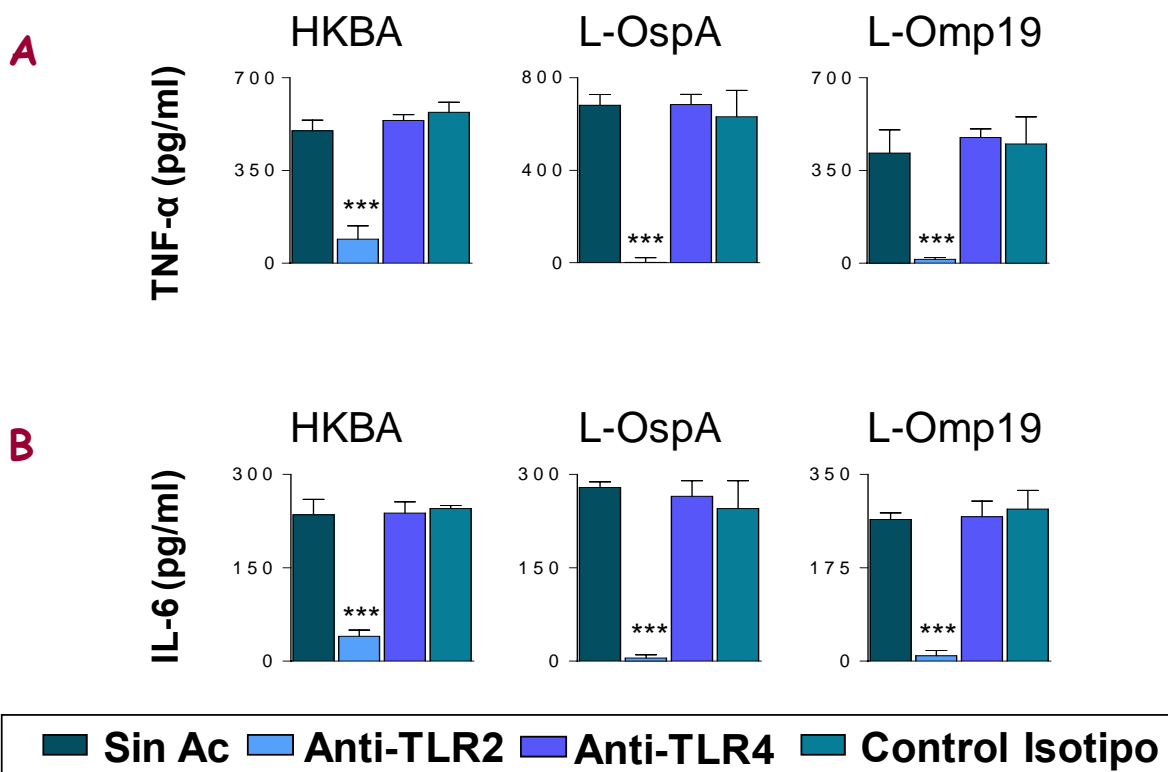
Células THP-1 (1×10^6 células/ml) tratadas con Vit-D3 fueron incubadas con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EcLPS) (100 ng/ml), L-OspA (500 ng/ml), L-Omp19 (500 ng/ml) o L-Omp16 (500 ng/ml). Luego de 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 hs. se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado.

La producción de citoquinas inducida por las lipoproteínas de *B. abortus* es mediada por TLR2

Previamente, fue demostrado que TLR2 media las respuestas de las lipoproteínas bacterianas en células de linaje monocítico [150]. Por lo tanto, se estudió el rol de TLR2 en la producción de citoquinas inducida por las lipoproteínas de *B. abortus*. Las células THP-1 fueron pre-incubadas con Acs anti-TLR2, anti-TLR4 o los respectivos controles de isotipo, y luego estimuladas con

HKBA o L-Omp19. Posteriormente se evaluó la producción de IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. La pre-incubación de las células THP-1 con anti-TLR2 bloqueó significativamente ($P < 0.001$) tanto la producción de IL-6 como de TNF- α mediada por L-Omp19. Este Ac también inhibió significativamente ($P < 0.001$) la producción de ambas citoquinas mediada por HKBA (**Figura 8**). Los Acs anti-TLR4 y controles de isotipo no tuvieron ningún efecto en la respuesta investigada. Estos resultados indican que la producción de citoquinas inducida por las lipoproteínas de *B. abortus* es dependiente de TLR2.

Figura 8. La producción de citoquinas inducida por las lipoproteínas de *B. abortus* es dependiente de TLR2.



Células THP-1 (1×10^6 células/ml) fueron dejadas sin tratar (Sin Ac) o pre-incubadas con el Ac monoclonal anti-TLR2, anti-TLR4 o el respectivo control de isotipo durante 30 min. a 4°C, previo al agregado de los distintos estímulos: L-OspA (500 ng/ml), HKBA (1×10^8 bacterias/ml) o L-Omp19 (500 ng/ml). Luego de 24 hs. se determinó la producción de TNF- α (**A**) e IL-6 (**B**) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado 3 veces por duplicado. *** $P < 0.001$ vs. Sin Ac.

DISCUSIÓN

A pesar de que se encuentra documentado claramente que el LPS de las enterobacterias tiene un rol central en la patogénesis de las infecciones con bacterias Gram negativas [147], la capacidad del LPS de *Brucella* de inducir una respuesta inflamatoria ha sido cuestionada [111, 112, 121]. En esta tesis presentamos evidencias que indican que la producción de citoquinas inflamatorias inducida por *B. abortus* es independiente del LPS de *Brucella*. HKBA indujo la producción de TNF- α e IL-6 en macrófagos peritoneales de ratones C3H/HeJ y C3H/HeN, mientras que el LPS de *B. abortus* sólo estimuló las células provenientes de ratones C3H/HeN. Aún más, la polimixina B, un inhibidor específico de la actividad del LPS [149] fue incapaz de inhibir la producción de TNF- α e IL-6 inducida por HKBA en células THP-1. Si bien el LPS de *B. abortus* altamente purificado en muy altas concentraciones (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) indujo la producción de IL-6 y TNF- α en monocitos; estos resultados obtenidos *in vitro*, probablemente no sean relevantes a nivel fisiológico. Una concentración bacteriana de 1×10^8 bacterias/ml indujo niveles comparables de citoquinas, pero por una vía que no fue inhibida por polimixina B. Por tanto, ni siquiera esta alta concentración de bacterias posee una suficiente cantidad de LPS disponible para que el mismo sea funcionalmente detectable.

Por otro lado, L-Omp16 y L-Omp19 fueron igualmente potentes en la inducción de TNF- α . L-Omp16 fue relativamente menos eficiente que L-Omp19 en la inducción de IL-6, IL-10 e IL-12. Las causas de estas diferencias podrían estar relacionadas con la presencia de un precursor de lipoproteína no completamente acilado en las preparaciones de Omp16 (**Figura 5B**). Ya que diferentes TLRs están involucrados en la señalización de lipoproteínas total y parcialmente lipidadas [151, 152], es posible que el conjunto de receptores TLRs involucrados en transducir la señal de Omp16 para la producción de IL-6, IL-10 e IL-12 sea menos eficiente con

Omp16 parcialmente acilada que con Omp19, la cual esta acilada uniformemente. Con respecto a esto, experimentos conducidos con ratones TLRs “knock-out” indicaron que diferentes vías de señalización mediadas por TLRs podrían resultar en la inducción selectiva de citoquinas antiinflamatorias o proinflamatorias [151].

Ciertos estudios han sugerido que las cepas de *Brucella* no inducirían la producción de TNF- α en macrófagos humanos [153]. Ahmed y col. [154] ha reportado niveles de TNF- α indetectables en el suero de pacientes con brucelosis aguda. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, otros experimentos *in vitro* han demostrado que *B. abortus* induce la producción de citoquinas anti y proinflamatorias en monocitos humanos y murinos, como IL1- β y TNF- α , siendo TNF- α un co-estimulador de la producción de IFN- γ [87, 155] Demirdag y col. [107] ha encontrado que los niveles de TNF- α se encuentran significativamente aumentados en la etapa aguda de la enfermedad, en comparación con los valores posteriores al tratamiento o el grupo control. Aún más, se observó que los elevados niveles de TNF- α en la etapa aguda de la enfermedad se encontraban correlacionados con un aumento en los niveles de IFN- γ [107].

La contribución relativa de TLR2 y TLR4 en la producción de citoquinas mediada por *B. abortus* amerita cierta discusión. Nuestros resultados indican que HKBA induce la producción de IL-12, IL-6 y TNF- α vía TLR2 en monocitos humanos, y coinciden en este sentido con resultados obtenidos por Huang y col. [112], los cuales demuestran que HKBA induce la producción de TNF- α vía TLR2 en células murinas. Contrariamente, otros investigadores obtuvieron evidencias que sugieren que la producción de TNF- α inducida por HKBA es dependiente de TLR4 [68]. Ambos trabajos, al igual que el nuestro, coinciden en que el LPS de *B. abortus* utiliza TLR4. Además, hemos demostrado que el LPS no es un mediador de la actividad proinflamatoria de HKBA, y establecimos la prueba de concepto de que las lipoproteínas de *B. abortus* serían el ligando TLR2 que utilizan estas bacterias para disparar la liberación de mediadores pro y antiinflamatorios en monocitos.

Nuestros resultados, sumados a estas evidencias, refuerzan el concepto de que *Brucella* es capaz de inducir citoquinas proinflamatorias en monocitos/macrófagos, y que las mismas juegan un rol importante en la patogenia de esta enfermedad [156].

La estimulación de TLR2 por las lipoproteínas de *Brucella* en células de linaje monocítico podría ser suficiente para desencadenar la inflamación asociada a la infección.

CAPÍTULO 2:

*Las Lipoproteínas de Brucella Mimetizan la
Maduración de Células Dendríticas Inducida por*

B. abortus

INTRODUCCIÓN

La infección con *Brucella* spp. induce la activación de la inmunidad innata y adaptativa desencadenando una potente respuesta proinflamatoria con producción de IL-12, IFN- γ , TNF- α y otras citoquinas. Esto manifiesta la habilidad de estos microorganismos de reclutar y activar componentes celulares clave en la respuesta inmune. La IL-12, una citoquina fundamental en la infección, es producida por los macrófagos y las DC, y dirige la respuesta inmune hacia un perfil Th1 induciendo la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ [56]. Debido a su habilidad de inducir una vigorosa respuesta Th1, induciendo la producción de IL-12 en células del sistema inmune innato [110, 112], se ha propuesto a HKBA como un poderoso adyuvante y “carrier” de vacunas. Esta reconocida habilidad de inducir una respuesta Th1, indica que determinados componentes de *Brucella* serían capaces de reclutar mecanismos proinflamatorios. Sin embargo, los medios por los cuales *B. abortus* induce esta respuesta todavía no han sido completamente elucidados.

Las células dendríticas (DC) tienen un rol fundamental al influenciar la naturaleza de la inmunidad adaptativa. *In vivo*, las DC inmaduras residen en la periferia donde sirven como centinelas en búsqueda de Ags foráneos y patógenos microbianos. Al interactuar con un estímulo inflamatorio proveniente de los microorganismos, inician un programa de maduración crítico en el cual las DC modulan la expresión de moléculas de superficie y adquieren la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos regionales en donde fuertes interacciones con los LT van a dictar el destino de la respuesta inmune [157]. Esta maduración de DC inducida por los microorganismos, provee el elemento crucial que se requiere para la inducción selectiva de una respuesta Th1 [157] y *B. abortus* tiene la habilidad de infectar y reproducirse dentro de estas células [61].

La activación y maduración de DC inducida por componentes presentes en los patógenos ha sido estudiada por mucho tiempo [158, 159], y si bien es sabido que

algunos productos microbianos, en particular el LPS de enterobacterias, inducen la maduración de DC [160], el LPS de *B. abortus* no es un candidato probable para inducir la maduración de estas células, ya que como mostramos previamente es un activador celular débil y un pobre inductor de citoquinas proinflamatorias en células monocíticas.

Habiendo demostrado que las lipoproteínas de *B. abortus*, y no su LPS, son las moléculas responsables de la activación de monocitos/macrófagos y la consecuente respuesta proinflamatoria desencadenada por HKBA, nuestros resultados previos sugieren que la habilidad de promover una respuesta Th1 podría deberse a las lipoproteínas de *Brucella*.

Por tanto, teniendo en cuenta la relevancia de las DC en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en la conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa, y que la inducción de la maduración de DC por los organismos del género *Brucella* podría explicar el mecanismo por el cual estos organismos modulan la respuesta inmune hacia un perfil Th1, en esta parte del trabajo nos enfocamos en la interacción entre *B. abortus* y DC humanas.

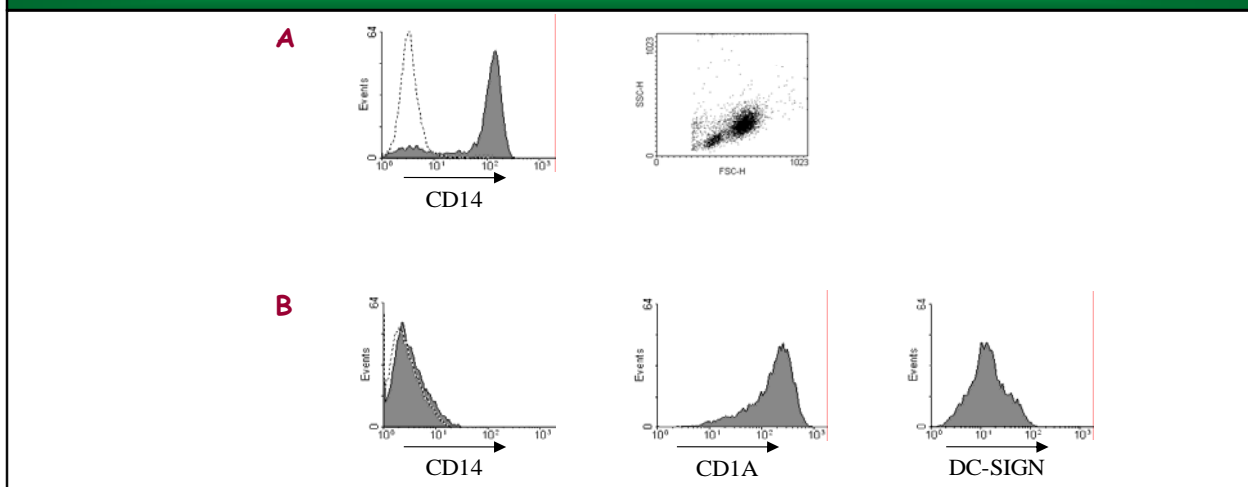
En primer lugar investigamos la habilidad de *B. abortus* de inducir los cambios fenotípicos y funcionales asociados a la maduración de DC. Además, teniendo en cuenta que otras lipoproteínas bacterianas son capaces de activar las DC [161], junto con el hallazgo realizado en nuestro laboratorio de que las lipoproteínas de *B. abortus* pueden activar a las células del sistema inmune innato [156], investigamos el rol de las lipoproteínas de *Brucella* en la maduración de DC inducida por *B. abortus*. Para ello, utilizamos la proteína recombinante de *B. abortus*, Omp19, obtenida previamente, como modelo de lipoproteína de *Brucella*.

RESULTADOS

B. abortus induce la maduración de DC

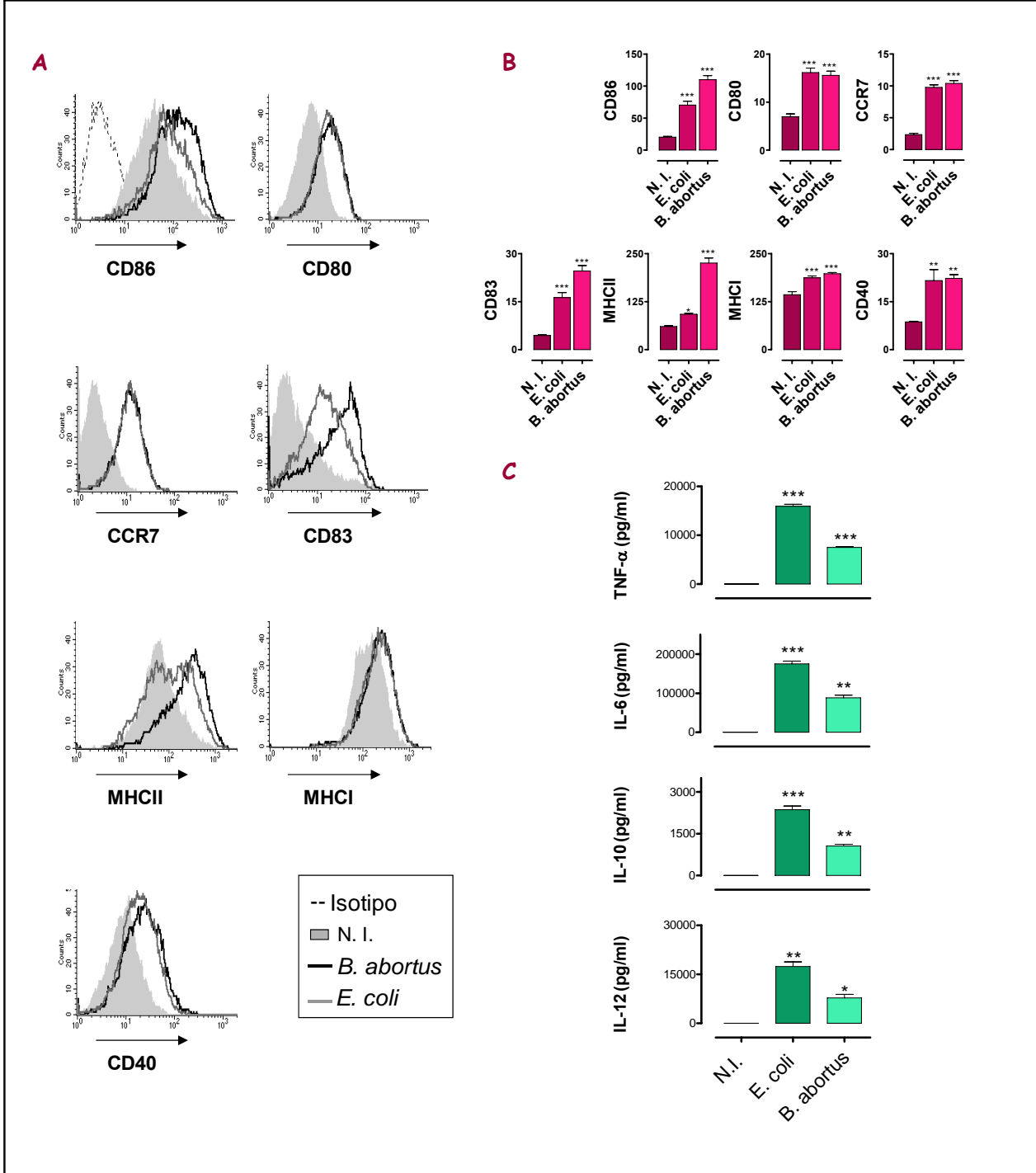
En primer lugar investigamos la capacidad de *B. abortus* de inducir los cambios fenotípicos asociados a la maduración de DC. Para ello se infectaron DC inmaduras derivadas de monocitos y se midió la expresión de marcadores de maduración por citometría de flujo. El fenotipo de las DC inmaduras fue confirmado por la expresión de CD1a y DC-SIGN, y la ausencia de CD14 (**Figura 9**). La infección con *B. abortus* indujo la maduración de DC como se evidenció por un aumento significativo ($P < 0.01$) en la expresión de CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCI, MHCII y CD40 (**Figura 10A y B**). También se analizó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Al igual que con la expresión de los marcadores de superficie, la infección con *B. abortus* indujo significativamente ($P < 0.05$) la producción de IL-12, IL-6, IL-10 y TNF- α (**Figura 10C**). La infección con *E. coli*, utilizada como control positivo de maduración, también indujo un aumento en los marcadores de superficie y la producción de citoquinas (**Figura 10**).

Figura 9. Fenotipo de DC inmaduras.



(A) Fenotipo de los monocitos CD14⁺ aislados por gradiente de Percoll. La pureza de los mismos fue mayor al 90% según se determinó por citometría de flujo. **(B)** Fenotipo de las DC inmaduras diferenciadas a partir del cultivo de los monocitos humanos CD14⁺ durante seis días con rhGM-CSF e IL-4. La expresión de CD14, CD1A y DC-SIGN fue determinada por citometría de flujo.

Figura 10. *B. abortus* induce la maduración de DC.

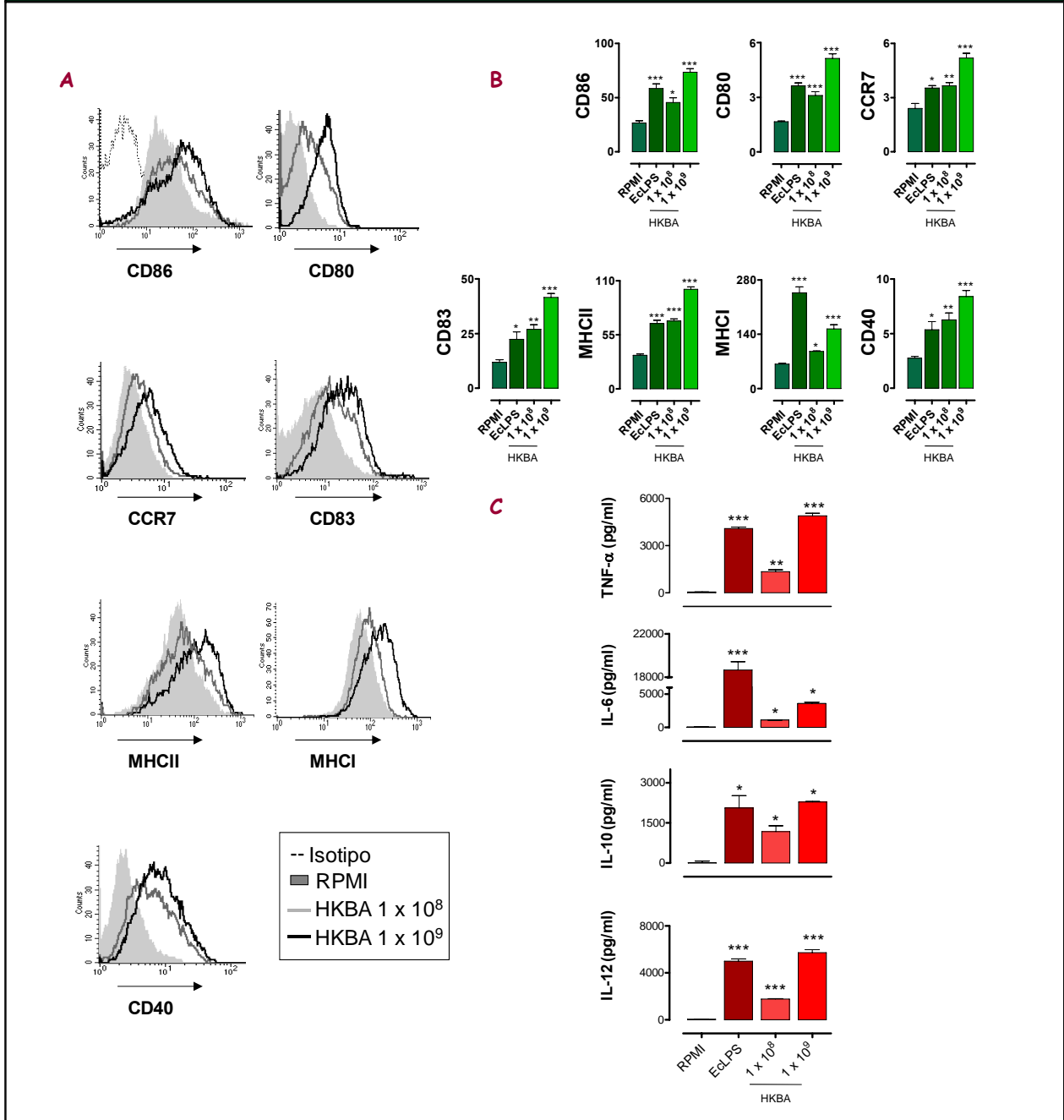


DC inmaduras fueron infectadas con *B. abortus* o *E. coli* y luego de 24 hs. se determinó la expresión de los marcadores de maduración indicados por citometría de flujo (A) y (B), o se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA (C). Los histogramas corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Las barras muestran la MFI \pm S.E.M. de cinco experimentos. Los resultados del ELISA están expresados como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. N. I. (células no infectadas).

Para evaluar si la viabilidad de la bacteria era necesaria para inducir la maduración de las DC, se examinó la capacidad de HKBA de aumentar la expresión de los distintos marcadores de maduración e inducir la secreción de citoquinas. Al igual que lo observado con la bacteria viva, HKBA indujo un aumento significativo ($P < 0.05$) de la expresión de CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCI, MHCII y CD40. El nivel de expresión de estos marcadores fue dependiente de la cantidad de bacterias presentes en el cultivo (**Figura 11A y B**). HKBA también indujo de manera significativa ($P < 0.05$) la producción de IL-12, IL-6, IL-10 y TNF- α (**Figura 11C**) en forma dosis dependiente. El LPS de *E. coli*, un estímulo de maduración conocido, utilizado como control positivo, también indujo el aumento en la expresión de los marcadores de superficie y en la producción de citoquinas (**Figura 11C**).

Estos resultados demuestran la capacidad de *B. abortus* de inducir la maduración de DC humanas. Además, el hecho de que HKBA también induzca la maduración, sugiere que este fenómeno estaría mediado por un componente estructural de la bacteria.

Figura 11. HKBA induce la maduración de DC.



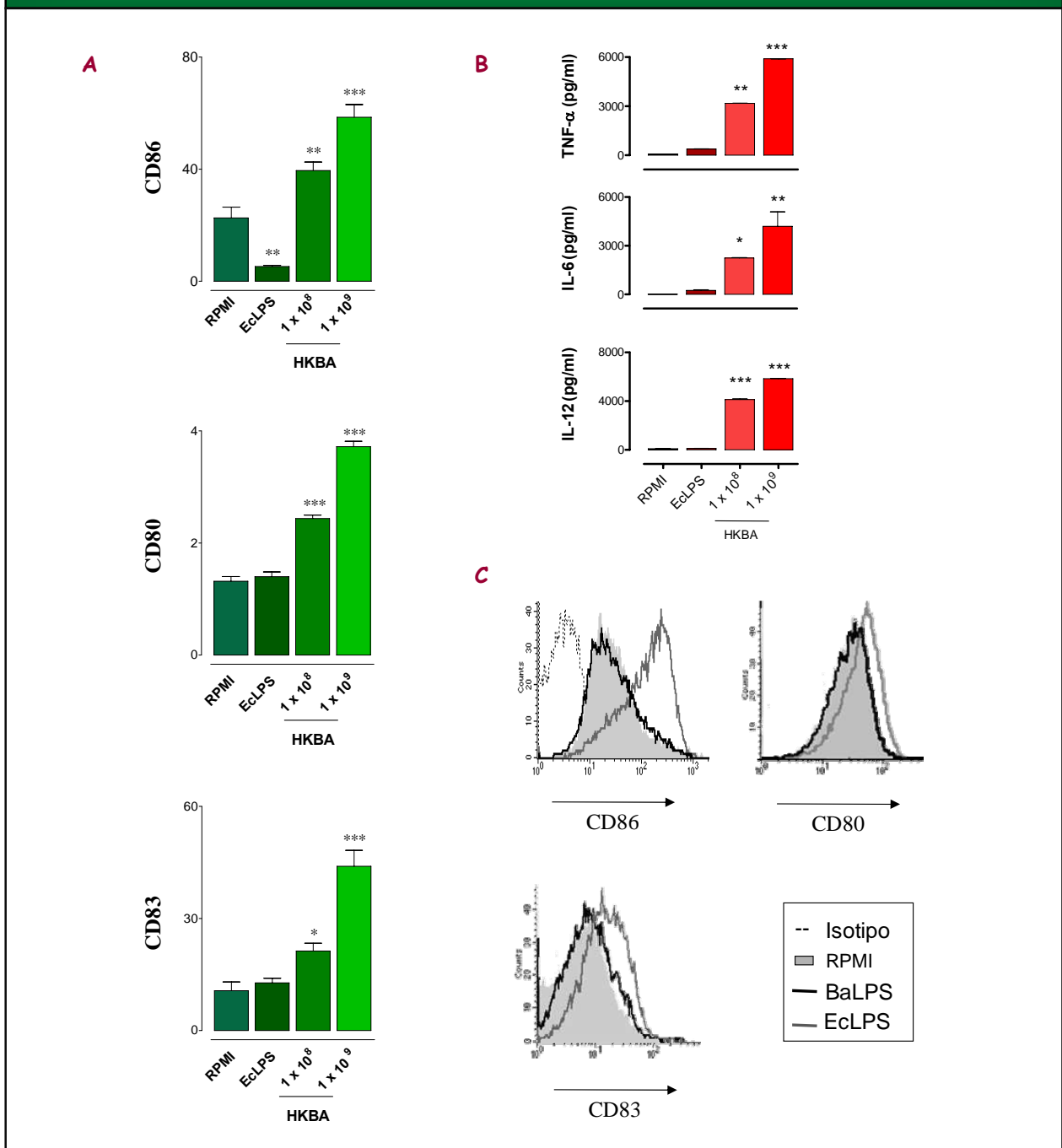
DC inmaduras fueron incubadas con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EclPS) (10 ng/ml) o distintas concentraciones de HKBA (bacterias/ml) y luego de 24 hs. se determinó la expresión de los marcadores de maduración indicados por citometría de flujo (A) y (B), o se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA (C). Los histogramas corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Las barras muestran la MFI ± S.E.M. de cinco experimentos. Los resultados del ELISA están expresados como la media (pg/ml) ± S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

El LPS de *B. abortus* no está involucrado en la maduración de DC inducida por HKBA

A continuación analizamos la contribución del LPS de *B. abortus* en la maduración de DC inducida por HKBA. Con este propósito, DC inmaduras fueron estimuladas con HKBA o LPS de *E. coli* en presencia de polimixina B, un inhibidor específico de la actividad del LPS [143], y luego de 24 hs. de cultivo se determinó la expresión de marcadores de maduración de DC y la producción de citoquinas por citometría de flujo y ELISA, respectivamente. La expresión de los marcadores de superficie (**Figura 12A**) y la producción de citoquinas (**Figura 12B**) no se vieron modificadas por el agregado de polimixina B a los cultivos, en condiciones en las cuales bloqueó completamente la respuesta a 10 ng/ml de LPS de *E. coli*. Esto se observó para cualquiera de los marcadores de superficie o citoquinas analizadas. Aun más, el LPS de *B. abortus* altamente purificado, en cantidades comparables a las que se estiman están presentes en las concentraciones de bacterias utilizadas [148], fue incapaz de inducir la maduración de las DC (**Figura 12C**).

En conjunto estos resultados indican que el LPS de *B. abortus* no contribuye en la maduración de DC inducida por HKBA.

Figura 12. El LPS de *B. abortus* no está involucrado en la maduración de DC inducida por HKBA



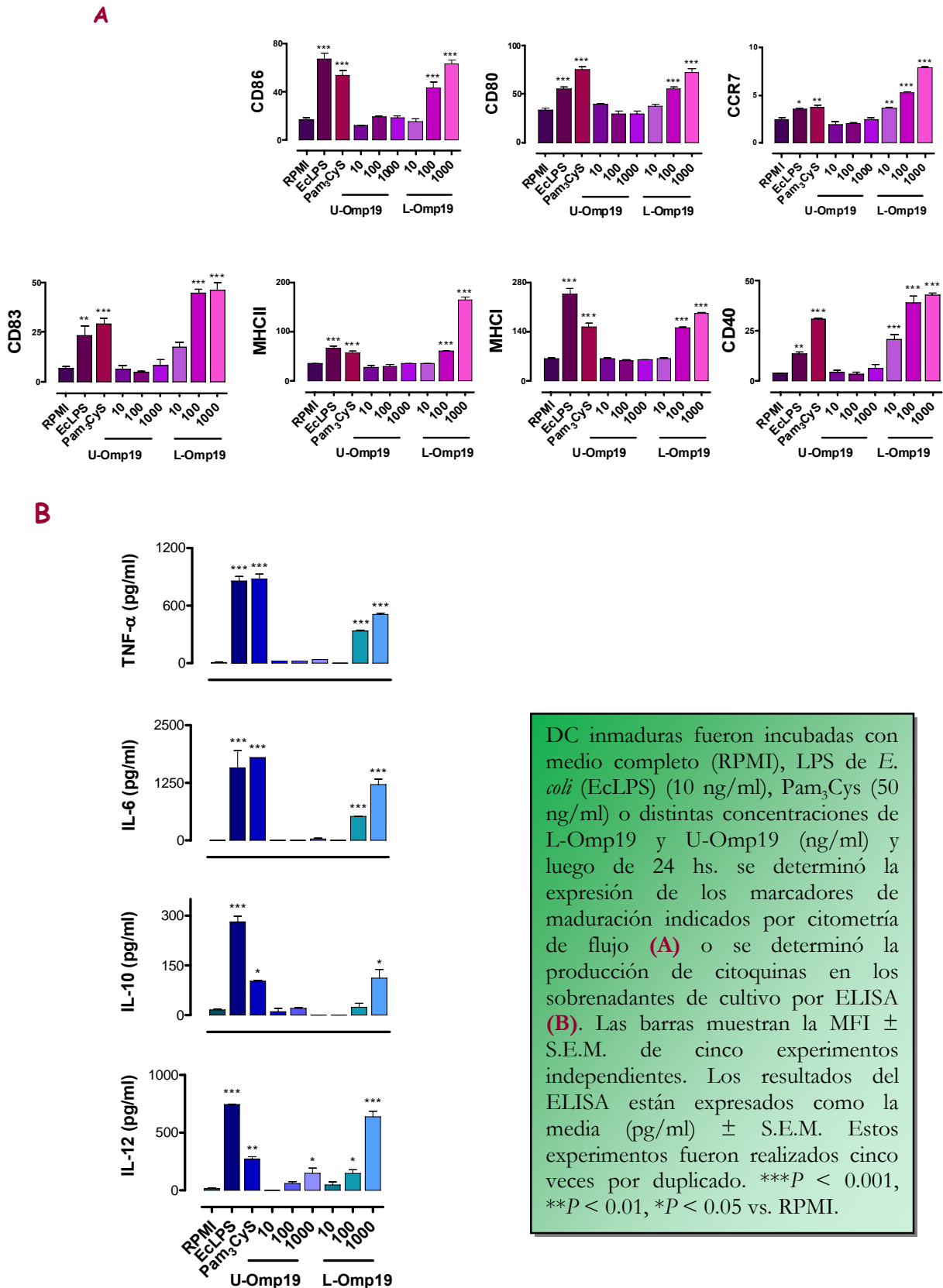
DC inmaduras fueron incubadas con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml) o distintas concentraciones de HKBA (bacterias/ml) en presencia de Polimixina B y luego de 24 hs. se determinó la expresión de los marcadores de maduración indicados por citometría de flujo **(A)** o se determinó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA **(B)**. **(C)** Expresión de los marcadores de superficie indicados en DC inmaduras incubadas durante 24 hs. con medio completo (RPMI), LPS de *B. abortus* (BaLPS) (1000 ng/ml) o LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml). Las barras muestran la MFI \pm S.E.M. de cinco experimentos independientes. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Los resultados del ELISA están expresados como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

Omp19 induce la maduración de DC

Dado que el LPS no estaba involucrado en este fenómeno, analizamos si las lipoproteínas de *B. abortus* podían inducir la maduración de DC. Dado que Omp16 y Omp19 presentaban una actividad biológica similar en monocitos, y debido a que esta última se obtenía en mayor cantidad con mayor facilidad, y habiendo demostrado que la actividad biológica de ambas proteínas residía en su dominio lipídico, el cual era idéntico en ambas proteínas, decidimos continuar utilizando Omp19 como modelo de lipoproteína de *Brucella*.

DC inmaduras estimuladas con L-Omp19 sufrieron un aumento en la expresión de CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCI, MHCII y CD40 en forma dosis dependiente (**Figura 13A**). La maduración de DC inducida por la lipoproteína de *Brucella* fue dependiente del dominio lipídico de esta proteína, ya que la versión no lipidada de la misma, U-Omp19, no aumentó la expresión de CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCI, MHCII ni CD40 en cualquiera de las concentraciones utilizadas. El requerimiento de la lipidación fue reforzado por el hecho de que Pam₃Cys, un lipohexapéptido sintético con una secuencia peptídica irrelevante, también aumentó la expresión de las moléculas investigadas (**Figura 13A**). Por otro lado, las DC estimuladas con L-Omp19 también secretaron IL-12, IL-6, IL-10 y TNF- α . La producción de citoquinas resultó ser dependiente de la cantidad de lipoproteína presente en el cultivo. Por el contrario, U-Omp19 no indujo la producción de citoquinas o sólo lo hizo levemente (**Figura 13B**).

Figura 13. Omp19 induce la maduración de DC.



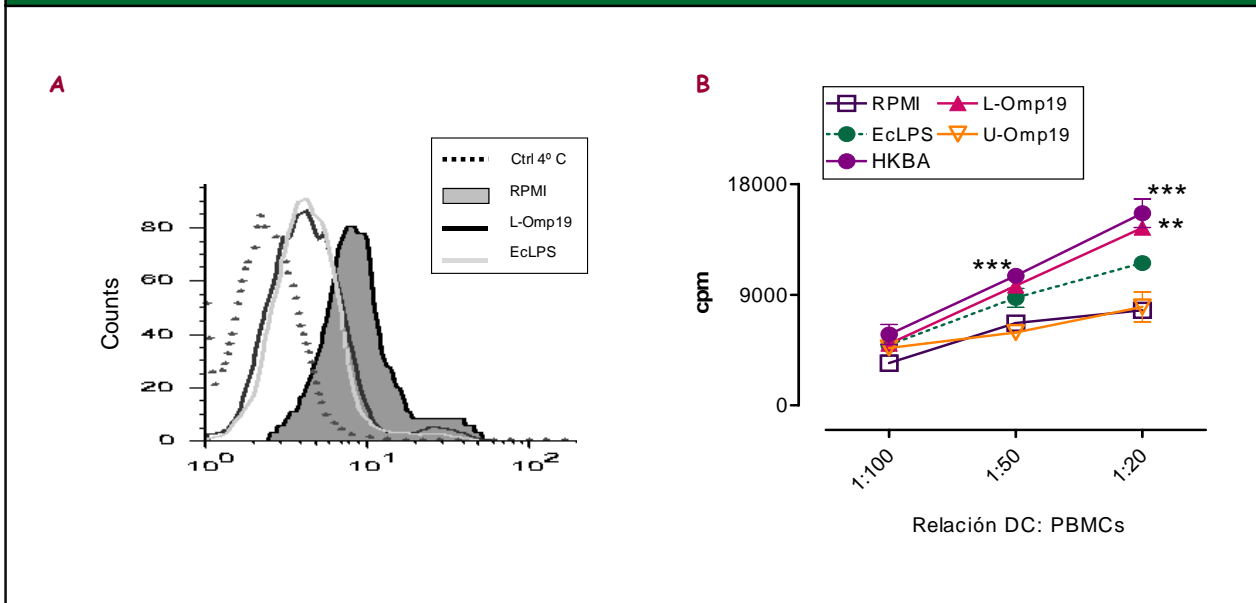
Durante la maduración, concomitante con un aumento en las funciones de presentación antigénicas, las DC sufren una reducción de su capacidad de capturar Ags a través de la vía endocítica. Para determinar si los mecanismos de captura de Ag también estaban siendo modulados por las lipoproteínas de *B. abortus*, se evaluó la actividad endocítica de las DC tratadas con L-Omp19 midiendo la endocitosis de OVA-FITC por citometría de flujo. Las DC tratadas con L-Omp19, al igual que aquellas estimuladas con LPS de *E. coli*, endocitaron menor cantidad de OVA-FITC en comparación con las DC inmaduras (**Figura 14A**). Este resultado provee mayor evidencia de que las lipoproteínas de *B. abortus* son capaces de inducir la maduración de DC.

Dado que observamos que tanto las DC maduras con L-Omp19 como las maduras con HKBA presentaban altos niveles de moléculas co-estimuladoras así como de moléculas involucradas en la presentación antigénica, quisimos determinar si estos cambios fenotípicos se traducían en cambios funcionales. Para ello, determinamos la capacidad de estas DC estimuladas con HKBA y L-Omp19 de estimular LT en un cultivo mixto leucocitario (CML) comparada con la de las DC inmaduras. Las DC estimuladas con HKBA, L-Omp19 o U-Omp19 fueron cocultivadas con PBMCs provenientes de un dador no relacionado. Las DC tratadas con HKBA fueron más eficientes que las células no tratadas (DC inmaduras) como estimulantes en el CML, como se demuestra por un aumento en la proliferación de LT (**Figura 14B**). Una respuesta similar se obtuvo con las DC tratadas con L-Omp19; mientras que por el contrario, las DC tratadas con U-Omp19 no modificaron la proliferación de las células T. La mayor eficiencia de estimulación en el CML de las DC tratadas con HKBA y L-Omp19 con respecto a las células no tratadas se correlaciona con la capacidad de estos estímulos de aumentar la expresión de MHCII y MHCI.

En conjunto, estos resultados indican que *B. abortus* y sus lipoproteínas son capaces de inducir no sólo los cambios fenotípicos sino también los cambios funcionales necesarios para la maduración de las DC. También indican que las DC

tratadas con L-Omp19 aumentan la actividad estimuladora de LT en igual medida que las DC tratadas con HKBA.

Figura 14. Las DC estimuladas con Omp19 presentan una menor actividad endocítica y una mayor actividad estimuladora de células T en un CML.

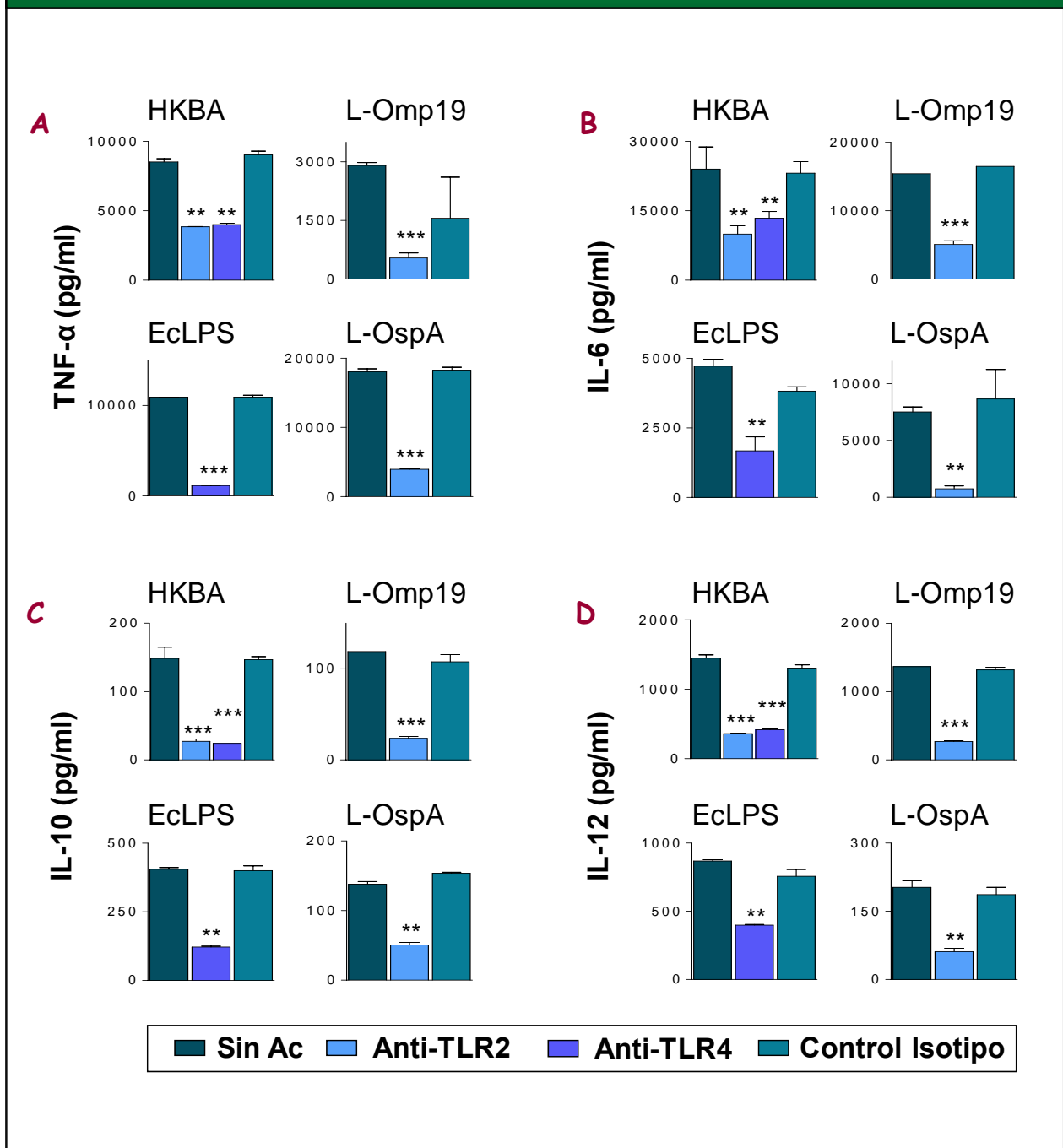


(A) DC inmaduras fueron incubadas durante 24 hs. con los estímulos indicados y se analizó la actividad endocítica por la incorporación de OVA-FITC. Las células fueron incubadas con OVA-FITC (100 µg/ml) durante 1 hs. a 37°C para determinar la endocitosis específica o a 4°C para determinar la endocitosis inespecífica, y luego fueron analizadas por citometría de flujo. **(B)** DC inmaduras fueron incubadas con L-Omp19 (1000 ng/ml), U-Omp19 (1000 ng/ml), HKBA (1 x 10⁹ bacterias/ml) o LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml) y posteriormente fueron utilizadas como células estimulantes en un CML. La proliferación se determinó por la incorporación de [³H]-Timidina (cpm). Los resultados se expresan como la media (cpm) ± S.E.M. de cinco experimentos realizados por triplicado. ****P* < 0.001, ***P* < 0.01 vs. RPMI.

La producción de citoquinas inducida por HKBA es dependiente de TLR2 y TLR4

Habiendo demostrado que TLR2 media la respuesta a HKBA y las lipoproteínas de *B. abortus* en monocitos, continuamos analizando el rol de TLR2 en la producción de citoquinas en DC inducida por HKBA y L-Omp19. DC inmaduras fueron pre-incubadas con Ac monoclonales anti-TLR2, anti-TLR4 o el correspondiente control de isotipo; estimuladas con HKBA o L-Omp19, y posteriormente se evaluó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Nuevamente, se utilizó el LPS de *E. coli* y la lipoproteína L-OspA como control. La pre-incubación de las DC con anti-TLR4 bloqueó significativamente ($P < 0.01$) la producción de TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 mediada por el LPS de *E. coli*; mientras que el Ac monoclonal anti-TLR2 bloqueó de manera significativa ($P < 0.01$) la producción de citoquinas mediada por L-OspA (**Figura 15**). La pre-incubación de las DC con anti-TLR2 bloqueó la producción de todas las citoquinas analizadas mediada por L-Omp19 significativamente ($P < 0.001$). Este Ac monoclonal también inhibió de manera significativa ($P < 0.01$) la producción de TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 mediada por HKBA (**Figura 15**). Para nuestra sorpresa, el Ac monoclonal anti-TLR4 también bloqueó la producción de citoquinas ($P < 0.01$) en respuesta a HKBA. El Ac monoclonal utilizado como control de isotipo no tuvo efecto alguno en ninguna de las respuestas investigadas. Estos resultados sugieren que, en DC, la producción de citoquinas inducida por *B. abortus* depende de TLR2 y TLR4. Los mismos sugieren fuertemente que el ligando TLR2 en HKBA son las lipoproteínas de *B. abortus*. Ya que el LPS de *B. abortus*, que señala por TLR4, no está involucrado en la maduración de DC, este hallazgo hace suponer que habría otro ligando TLR4 involucrado, distinto al LPS.

Figura 15. La producción de citoquinas inducida por HKBA en DC es dependiente de TLR2 y TLR4.



DC inmaduras fueron dejadas sin tratar (Sin Ac) o pre-incubadas con Ac monoclonal anti-TLR2, anti-TLR4 o el respectivo control de isotipo durante 30 min. a 4°C, previo al agregado de los distintos estímulos: L-OspA (500 ng/ml), HKBA (1×10^8 bacterias/ml), L-Omp19 (500 ng/ml) o LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml). Luego de 24 hs. se determinó la producción de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e IL-12 (D) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como la media (pg/ml) \pm S.E.M. Este experimento fue realizado cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. Sin Ac.

DISCUSIÓN

La capacidad de las distintas especies de *Brucella* de inducir una respuesta Th1 [56] pone de manifiesto la habilidad de estos microorganismos de reclutar y activar componentes celulares clave de la respuesta inmune [158].

En este capítulo presentamos evidencias de que DC infectadas con *B. abortus* aumentan la expresión de los marcadores de superficie CD86, CD80, CCR7, CD83, MHCII, MHCI y CD40. Junto con el aumento de la expresión de moléculas de superficie, *B. abortus* indujo también la producción de citoquinas necesaria para el inicio y modulación de la respuesta inmune adaptativa. Este efecto fue observado con una MOI de 5 y no fue debido a una reversión del fenotipo celular, dado que aún después de la infección las células mantuvieron el fenotipo de DC (CD14⁻, CD1A⁺ y DC-SIGN⁺). Tanto el aumento de los marcadores de maduración como la producción de citoquinas no fueron dependientes de la viabilidad de la bacteria, ya que los mismos fueron a su vez inducidos por la exposición de las DC a HKBA, sugiriendo que eran inducidos por un componente bacteriano estructural.

Coincidiendo con los resultados obtenidos en monocitos/macrófagos, la producción de citoquinas inflamatorias resultó ser independiente del LPS de *Brucella* en DC.

Al igual que su acción en monocitos, la actividad de Omp19 en DC está relacionada con el dominio lipídico de la proteína, no encontrándose ninguna modificación en las DC estimuladas con la versión no lipidada de la proteína, U-Omp19.

Los resultados obtenidos en DC en este trabajo coinciden con los del trabajo de Macedo y col., el cual demuestra que la exposición de DC murinas a *B. abortus* induce su maduración [162]; pero difieren con los resultados obtenidos por Billard y col. [163, 164] y Salcedo y col. [70]. Se han presentado discrepancias similares para

Mycobacterium tuberculosis, para la cual varios estudios observaron que la infección de DC murinas y humanas con esta bacteria inducía la maduración de estas células [165, 166], mientras que otro estudio ha reportado una inhibición de la maduración en DC infectadas con *M. tuberculosis* [167]. Si bien sólo podemos especular las razones para estas diferencias, se deben tener en cuenta varias consideraciones: en primer lugar, el uso de diferentes metodologías para el aislamiento de las células; en el trabajo de Billard y col. los monocitos fueron aislados por selección positiva de las células CD14⁺ mientras que en nuestro caso utilizamos un gradiente de Percoll para la purificación de monocitos a partir de PBMCs. En segundo lugar, en nuestros estudios las DC infectadas fueron incubadas en placas de 24 pocillos en una concentración de 1×10^6 DC/ml (5×10^5 células/pocillo) a diferencia del trabajo de Billard y col. en el cual solo se utilizaron 2×10^5 DC/pocillo, lo que podría resultar en una reducida interacción entre las células y por consiguiente en una menor estimulación autócrina. En tercer lugar, mientras que todos nuestros experimentos fueron conducidos con *B. abortus* cepa salvaje en los de Billard y col. las DC fueron infectadas con una cepa mutante de la bacteria que expresa la proteína GFP. A pesar de estas diferencias, es también importante destacar que si bien la expresión de los marcadores de maduración se ve disminuida cuando se los compara con los de *Salmonella*, utilizada como control positivo de la infección en el trabajo de Billard y col., la expresión de estos marcadores en DC infectadas con *B. abortus* se encuentran en niveles comparables a los de nuestros resultados si se los compara con las células no infectadas [70, 163]. De hecho, la infección con *B. abortus* indujo la producción de niveles significativos de IL-12 [70]. Independientemente de las diferencias en los distintos sistemas *in vitro* utilizados, la activación de las DC con *B. abortus* es probablemente relevante en el inicio de la respuesta inmune cuando se dispara una respuesta Th1. En tiempos más tardíos *Brucella* podría ser capaz de sortear esta respuesta Th1 para establecer una infección crónica por medio de distintos mecanismos de evasión como por ejemplo la modulación de la

expresión de MHCII en macrófagos [168] o incluso la inhibición de la maduración de DC postulada por Billard y col [163].

De la misma manera hemos encontrado que la liberación de citoquinas en DC, incluyendo IL-12, es dependiente de TLR2. Contrariamente, otros autores han reportado que en DC murinas la producción de IL-12 inducida por HKBA es dependiente de TLR9 [162, 169]. Esta aparente discrepancia puede ser explicada por diferencias existentes entre las DC murinas y humanas [170, 171]. Mientras que las DC murinas poseen considerable plasticidad en cuanto a la producción de citoquinas [172], las subpoblaciones de DC humanas se encuentran restringidas por su patrón de expresión de receptores [172]. En humanos, las DC mieloides expresan TLR2 y TLR4, y las plasmocitoides sólo expresan TLR7 y TLR9 [170, 173]. Por tanto, a diferencia de las DC murinas, las DC mieloides humanas; principales productoras de citoquinas y disparadoras de la respuesta inmune adaptativa debido a su capacidad de activar las células T; no expresan TLR9.

Estas diferencias entre las DC murinas y humanas se deben advertir al hacer una mera extrapolación de DC murinas al modelo humano, por ello es poco probable que sea factible el modelo propuesto por Huang y col. en humanos. Sin embargo, se puede suponer una contribución de TLR9 en un tiempo más tardío de la infección posterior a la activación de las DC plasmocitoides. En este contexto sería posible especular una colaboración entre TLR2 y TLR9 en el desarrollo de la respuesta inmune en la infección con *Brucella* como fue reportado para *M. tuberculosis* por Bafica y col. [174].

Por otro lado, a diferencia de lo observado en monocitos, la producción de citoquinas en DC resultó ser dependiente no sólo de TLR2, sino también de TLR4. Un posible ligando TLR4 podría ser la enzima lumazina sintetasa de *Brucella* spp. (BLS), la cual se ha demostrado recientemente es capaz de inducir la maduración de DC murinas a través de TLR4 [175].

En suma, este estudio demuestra la capacidad de *B. abortus* de inducir la maduración de DC humanas, no sólo a nivel de expresión de marcadores de

superficie, sino también a nivel de producción de citoquinas y cambios funcionales. Además, utilizando Omp19 como modelo, revelamos la capacidad de las lipoproteínas de *B. abortus* de inducir los cambios fenotípicos y funcionales asociados a la maduración de DC [176].

Nuestros resultados coinciden en este sentido, con otros estudios que demuestran la capacidad de otras lipoproteínas bacterianas de inducir la maduración de DC [138, 161, 177]. Los mismos también indican que la habilidad de *B. abortus* de promover una respuesta Th1 mediada por IL-12 podría deberse a sus lipoproteínas.

CAPÍTULO 3:

***B. abortus y sus lipoproteínas inducen la activación
de neutrófilos***

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente, las formas localizadas de la brucelosis se suelen presentar con infiltrado celular, formación de granulomas e inflamación [103, 104]. La complicación osteoarticular es la presentación más frecuente de las formas localizadas de la enfermedad, la cual puede afectar articulaciones periféricas, articulaciones sacroilíacas o la columna vertebral [98, 100, 101, 104]. Como ocurre con otras infecciones articulares, la persistencia de la enfermedad en la articulación infectada puede resultar en daño tisular. El daño en las articulaciones está frecuentemente asociado con la presencia de *Brucella* en dichas articulaciones, como se demostró por el cultivo *in vitro* de fluido y tejido sinovial [178, 179] demostrando que los síntomas son causados por una verdadera infección de la articulación.

Además de los monocitos/macrófagos y las DC, que tienen un rol central en las infecciones con *Brucella*, otras células de la inmunidad innata son reclutadas e influenciadas por las interacciones entre la bacteria y el hospedador [107]. Es importante destacar que el tejido sinovial revela, característicamente, un infiltrado celular compuesto principalmente por monocitos y neutrófilos, e hiperplasia de las células sinoviales [179-182]. Por otra parte, se ha reportado la presencia de un infiltrado neutrofílico en otros sitios de focalización de la enfermedad [183-185].

Además de las funciones microbicidas, los neutrófilos también secretan una variedad de mediadores [186] capaces de inducir una respuesta inflamatoria en las articulaciones, y por lo tanto, la activación de los neutrófilos podría conducir a una serie de eventos patológicos, siendo las células con el mayor potencial para causar un daño severo en las articulaciones afectadas por la enfermedad [186].

La activación de neutrófilos incluye un amplio rango de cambios fenotípicos y funcionales que ocurren en varias etapas [187]. Algunos cambios tempranos incluyen la modulación de receptores de superficie que interviene en la adhesión vascular y la diapédesis, en la unión a microbios y opsoninas, y en la unión de

quimioattractantes. CD62L (una L-selectina) es altamente expresado en los neutrófilos en reposo, media las interacciones neutrófilos-endotelio previas a la diapédesis, y su expresión es disminuida por “shedding” durante la activación de los neutrófilos y la migración a los sitios extravasculares. CD11b/CD18 (CR3) es una integrina que se localiza dentro de vesículas intracelulares de los neutrófilos en reposo, y es transferido a la membrana plasmática durante la activación. CD35 (CR1) es almacenado en vesículas secretorias y une las moléculas del complemento C3b y C4b. La activación de los neutrófilos da como resultado la desgranulación y el incremento de la expresión en superficie de CD35 y CD11b al igual que una disminución en la expresión de CD62L [187-189]. Posteriores cambios durante la activación de neutrófilos incluyen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). La producción de ROS se encuentra altamente regulada en neutrófilos, requiriendo una estimulación sensibilizante para una respuesta apropiada detectable [190, 191]. También es sabido que los productos bacterianos retardan la tasa de apoptosis constitutiva de los neutrófilos como consecuencia de la activación celular [192, 193].

A pesar de que se han llevado a cabo algunos estudios en relación con la capacidad de *Brucella* de sobrevivir dentro de los neutrófilos [194, 195], la capacidad de estas bacterias de activar estas células confiriéndoles un rol potencial en el daño tisular y la inflamación no ha sido investigada aún. Habiendo ya demostrado el efecto de *B. abortus* y sus lipoproteínas en uno de los dos tipos celulares mayoritarios de los infiltrados celulares presentes en los tejidos inflamados; los monocitos; en esta última etapa del trabajo, nos propusimos estudiar el efecto de *B. abortus* y sus lipoproteínas en la respuesta del otro componente celular predominante; los neutrófilos.

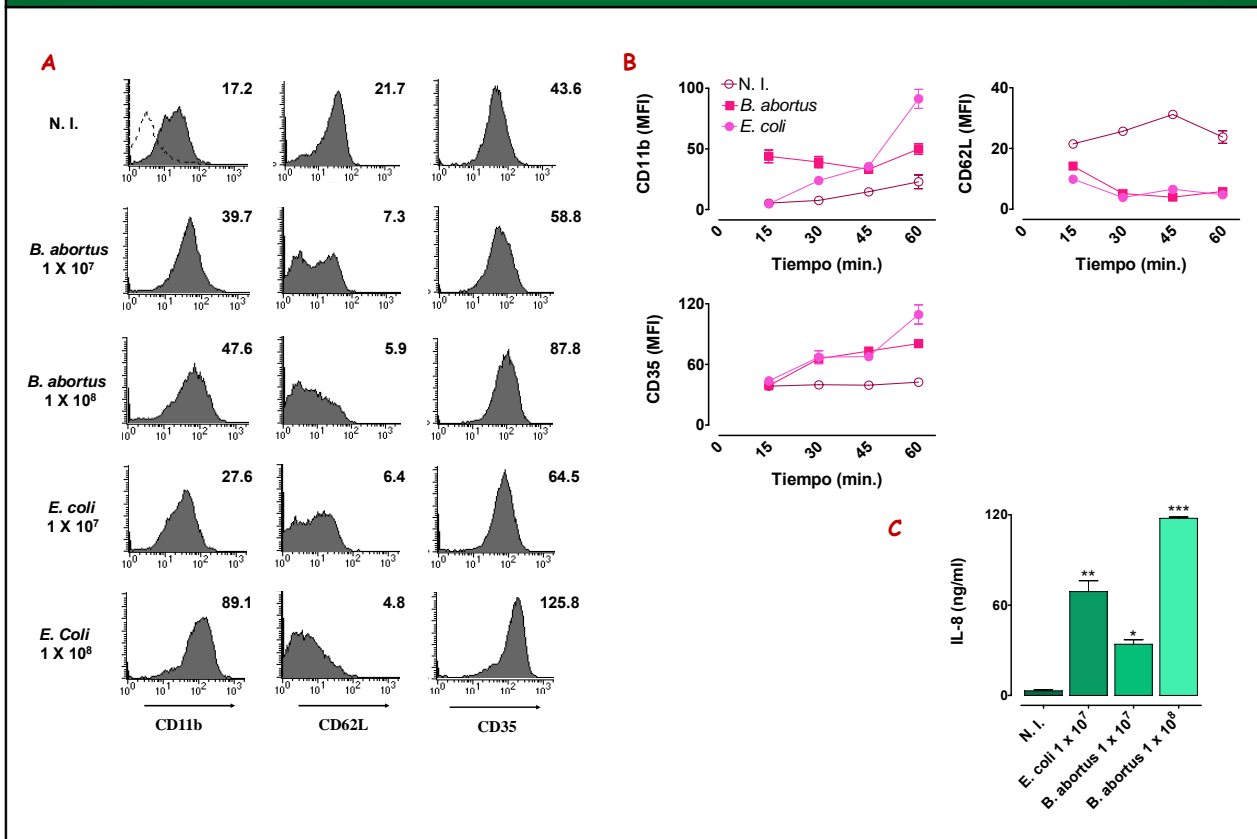
RESULTADOS

***B. abortus* induce la activación de neutrófilos**

Para determinar si *Brucella* es capaz de inducir la activación de neutrófilos humanos, evaluamos en primer lugar la expresión de CD62L, CD11b y CD35 en neutrófilos estimulados con bacterias vivas. Las células incubadas con *B. abortus* experimentaron una reducción en la expresión de la L-selectina al igual que un aumento en la expresión de CD11b y CD35 en forma dosis y tiempo-dependiente ($P < 0.01$). Estos cambios fueron comparables a los observados luego de la estimulación con *E. coli*, utilizado como control positivo de la activación de neutrófilos (**Figura 16A y B**).

La activación temprana de neutrófilos es seguida por la inducción de la producción de IL-8, un quimioattractante crítico para el reclutamiento de neutrófilos. La concentración de esta quemoquina fue significativamente ($P < 0.05$) aumentada en los sobrenadantes de células incubadas con *B. abortus*, al igual que en los provenientes de células incubadas con *E. coli* ($P < 0.01$) (**Figura 16C**).

Figura 16. *B. abortus* induce la activación de neutrófilos.



(A) Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ml) fueron incubados durante 60 min. a 37°C con medio completo, *B. abortus* o *E. coli* (bacterias/ml) en las concentraciones indicadas y luego se determinó la expresión de CD11b, CD62L y CD35 por citometría de flujo. Línea punteada (control de isotipo). Para cada histograma se muestra la MFI. Los datos corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. **(B)** Expresión de CD11b, CD62L y CD35 en neutrófilos humanos incubados durante 15, 30, 45 o 60 min. con medio completo, *B. abortus* o *E. coli* (1×10^8 bacterias/ml). **(C)** Concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos incubados con los estímulos indicados durante 24 hs. determinada por ELISA. Los resultados se expresan como la media (ng/ml) \pm S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. N. I.

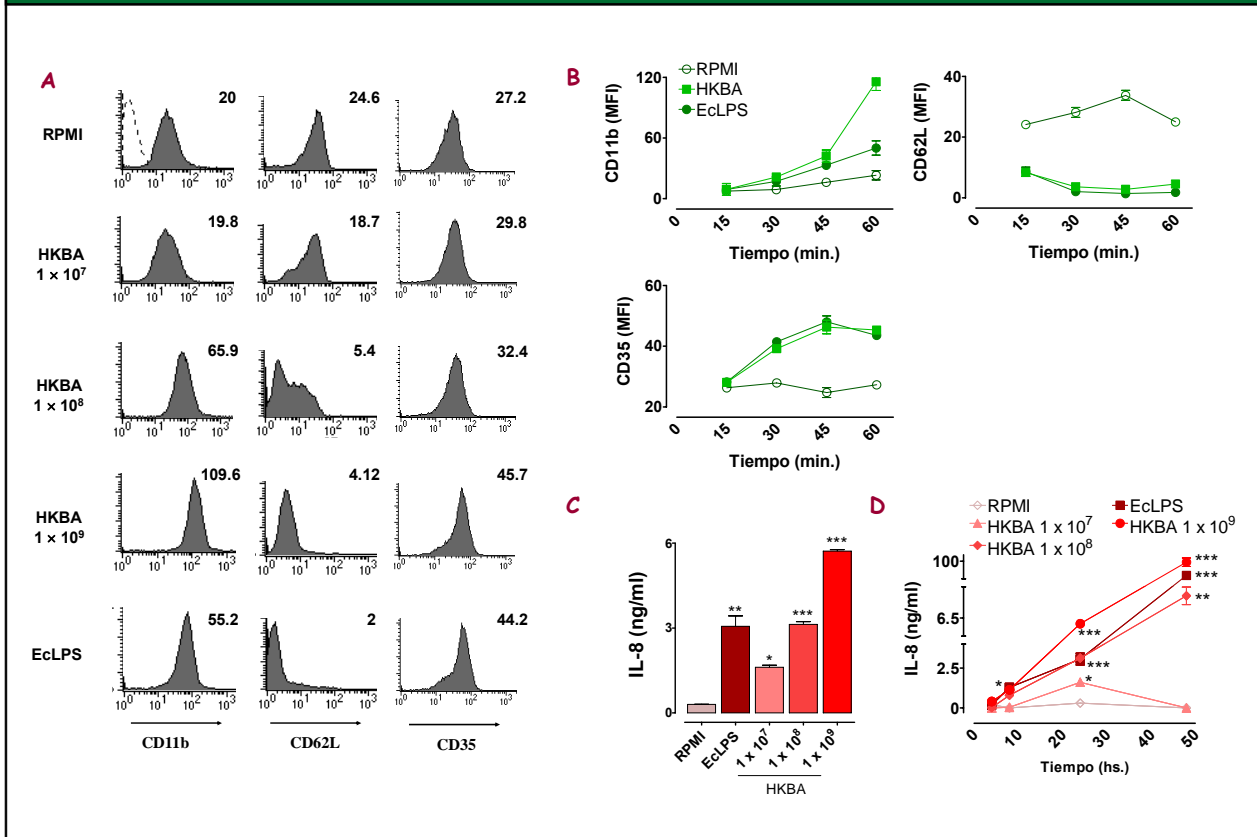
Una vez más, encontramos que la respuesta de *B. abortus* no estaba ligada a la viabilidad bacteriana. La estimulación con HKBA también indujo la modulación de la expresión de los marcadores de superficie celular y la producción de IL-8 en forma dosis dependiente en cantidades comparables a aquellas obtenidas con un estímulo de activación conocido como el LPS de *E. coli* (Figura 17).

La cinética de la expresión de las moléculas de superficie también es relevante para una rápida respuesta celular. La activación de los neutrófilos por la bacteria viva y HKBA ocasionó un rápido aumento significativo ($P < 0.05$) de CD11b y CD35, empezando a los 30 min. postestimulación y aumentando posteriormente, mientras que una disminución significativa de CD62L ($P < 0.01$) resultó evidente tan pronto como a las 15 min postestimulación (**Figura 16B y 17B**).

La producción de IL-8 en respuesta a HKBA, al igual que la expresión de los marcadores de superficie, fue tiempo-dependiente (**Figura 17C y D**). La concentración de IL-8 comenzó a aumentar significativamente ($P < 0.05$) a las 8 hs. postestimulación, y continuó incrementándose posteriormente.

Estos resultados indican que la exposición de los neutrófilos a *Brucella* estimula el “shedding” de L-selectina, el aumento de CD11b y CD35 y la producción de IL-8, todas ellas respuestas consideradas características de la activación de neutrófilos. Estos fenómenos se siguieron observando al utilizar bacterias muertas, indicando que los mismos podrían ser logrados por un componente estructural de la bacteria.

Figura 17. HKBA induce la activación de neutrófilos.



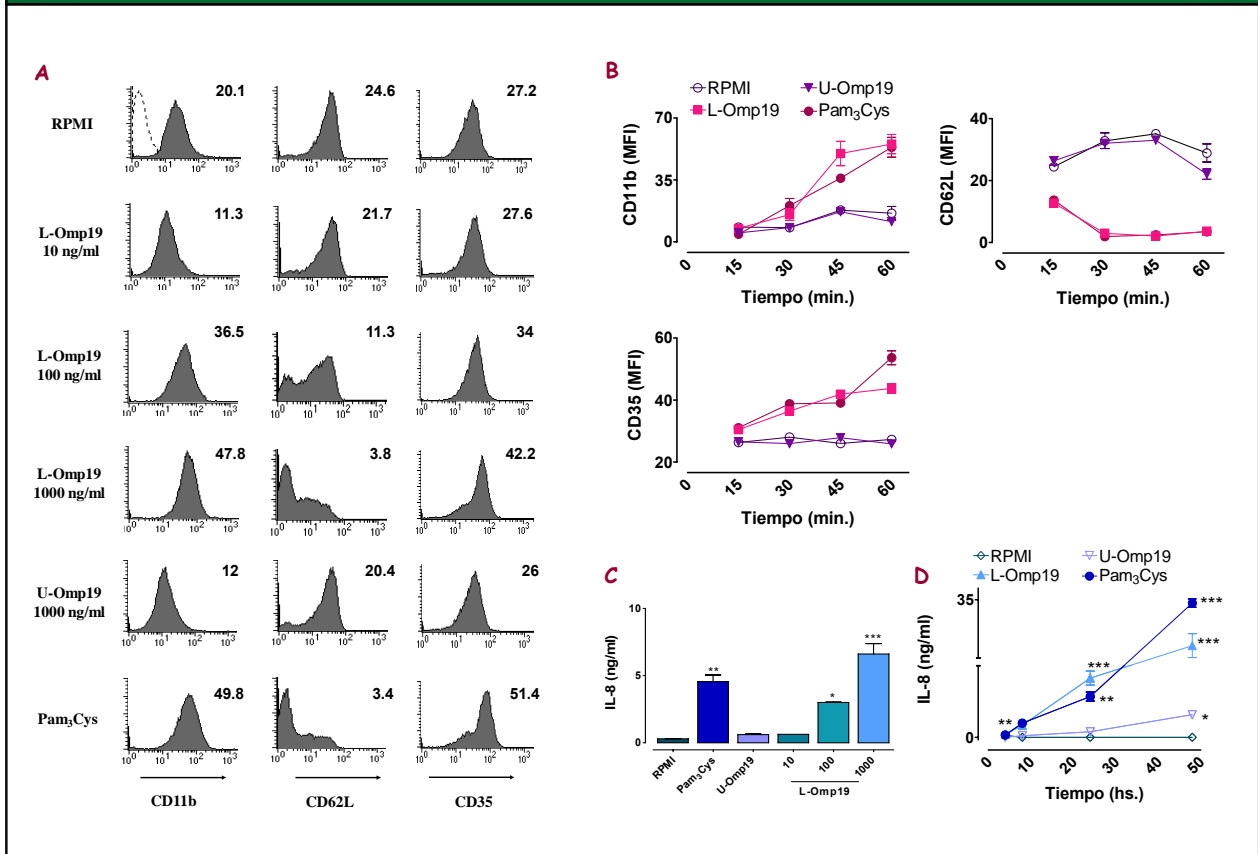
(A) Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ml) fueron incubados durante 60 min. a 37°C con medio completo (RPMI), HKBA (bacterias/ml) en las concentraciones indicadas o LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml) y luego se determinó la expresión de CD11b, CD62L y CD35 por citometría de flujo. Línea punteada (control de isotipo). Para cada histograma se muestra la MFI. Los datos corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. **(B)** Expresión de CD11b, CD62L y CD35 en neutrófilos humanos incubados durante 15, 30, 45 o 60 min. con medio completo (RPMI), HKBA (1×10^9 bacterias/ml) o LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml). **(C)** Concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos incubados con los estímulos indicados durante 24 hs. determinada por ELISA. **(D)** Concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos incubados con los estímulos indicados durante 4, 8, 24 o 48 hs. determinada por ELISA. Los resultados están expresados como la media (ng/ml) \pm S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

Las lipoproteínas de *B. abortus* mimetizan la activación de neutrófilos inducida por *Brucella*

Dado que Omp19 era capaz de activar monocitos y DC, a continuación evaluamos su impacto en los neutrófilos. L-Omp19 promovió una disminución en la expresión de CD62L en la superficie celular, y un aumento en la expresión de CD11b y CD35 (**Figura 18A y B**) al igual que una mayor producción de IL-8 de forma dosis y tiempo-dependiente ($P < 0.05$) (**Figura 18C y D**). La activación de los neutrófilos inducida por L-Omp19 se vio abolida cuando la proteína estaba desprovista de su dominio lipídico (U-Omp19). Pam₃Cys indujo una respuesta casi idéntica a la inducida por L-Omp19 (**Figura 18**), todo esto confirmando una vez más la dependencia de la lipidación para la actividad biológica de esta proteína. Por otro lado, la cinética de la respuesta a L-Omp19 fue similar que la observada para HKBA, mientras que U-Omp19 fue ineficiente en cualquiera de los tiempos ensayados (**Figura 18B y D**).

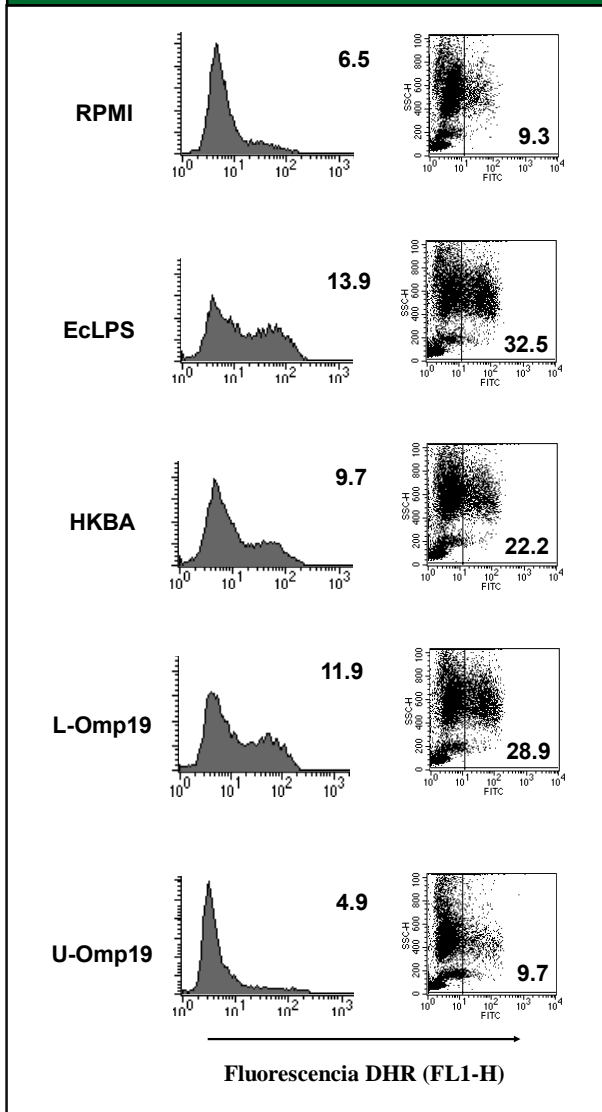
En conjunto, estos resultados demuestran que las lipoproteínas de *Brucella* purificadas mimetizan la activación de neutrófilos inducida por bacterias vivas y HKBA.

Figura 18. Omp19 induce la activación de neutrófilos.



(A) Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ml) fueron incubados durante 60 min. a 37°C con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml), Pam₃Cys (100 ng/ml), L-Omp19 o U-Omp19 en las concentraciones indicadas y luego se determinó la expresión de CD11b, CD62L y CD35 por citometría de flujo. Línea punteada (control de isotipo). Para cada histograma se muestra la MFI. Los datos corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. (B) Expresión de CD11b, CD62L y CD35 en neutrófilos humanos incubados durante 15, 30, 45 o 60 min. con medio completo (RPMI), Pam₃Cys (100 ng/ml), L-Omp19 (1000 ng/ml) o U-Omp19 (1000 ng/ml). (C) Concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos incubados con los estímulos indicados durante 24 hs. determinada por ELISA. (D) Concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos incubados con los estímulos indicados durante 4, 8, 24 o 48 hs. determinada por ELISA. Los resultados se expresan como la media (ng/ml) \pm S.E.M. Estos experimentos fueron realizados cinco veces por duplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

Figura 19. *B. abortus* y Omp19 sensibilizan a los neutrófilos para el estallido respiratorio.



Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ml) fueron incubados durante 30 min. a 37°C con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml), HKBA (1×10^9 bacterias/ml), L-Omp19 (1000 ng/ml) o U-Omp19 (1000 ng/ml), luego se agregó DHR y las células fueron incubadas por otros 15 min. Posteriormente las células fueron expuestas a PMA por 15 min. para inducir el estallido respiratorio. Las células fueron inmediatamente analizadas por citometría de flujo. Los datos corresponden a un experimento representativo de cinco experimentos independientes. Los histogramas muestran la MFI y los “dot plots” el porcentaje de células FITC positivas.

B. abortus y Omp19 sensibilizan a los neutrófilos para el estallido respiratorio

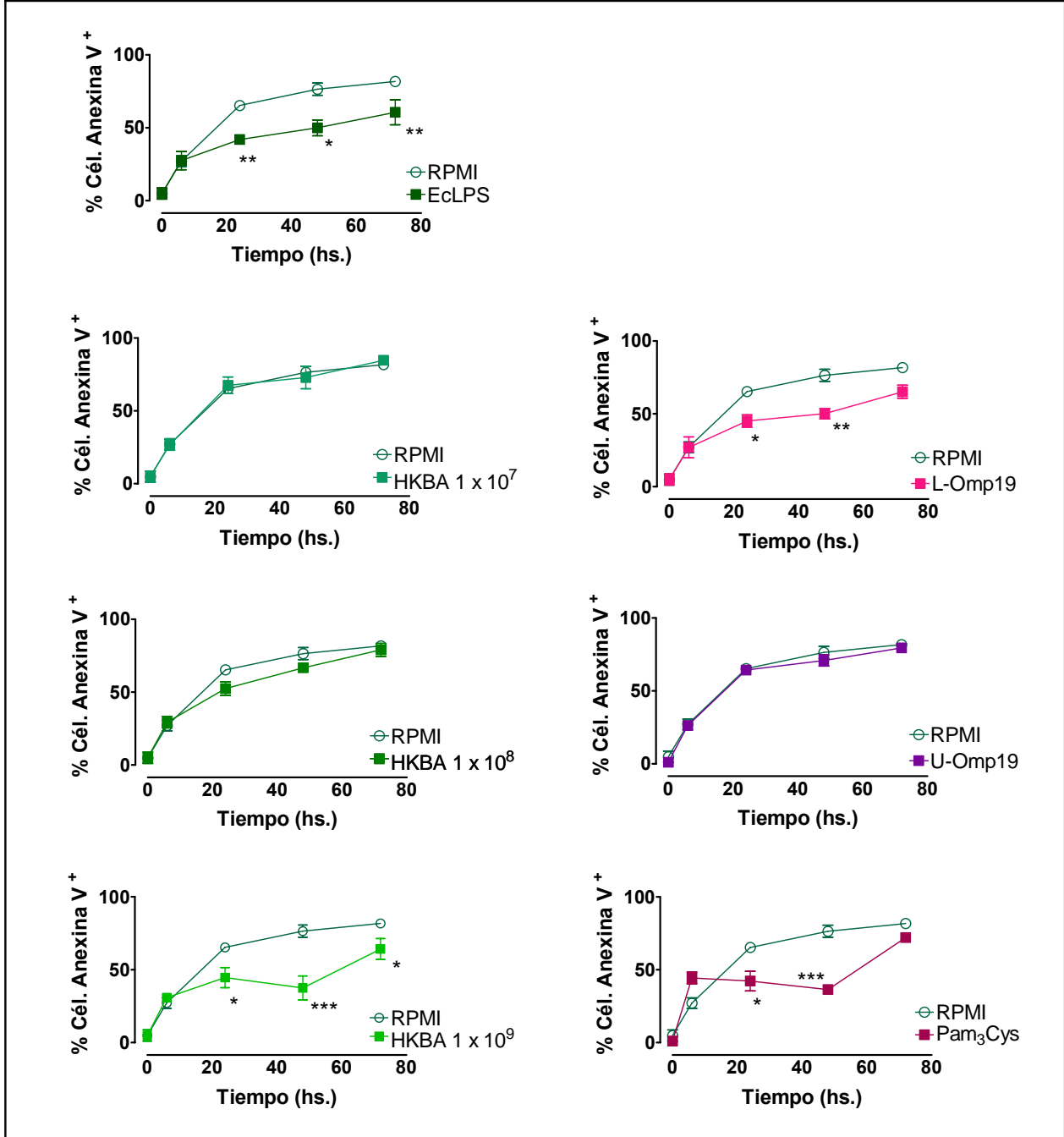
Por medio de citometría de flujo se determinó la oxidación de Dihidroirrodamina (DHR) como medida del estallido respiratorio resultante de la activación de los neutrófilos.

HKBA y L-Omp19, ambos se comportaron como agentes sensibilizantes para aumentar el subsecuente estallido respiratorio de los neutrófilos expuestos a PMA. Luego de la sensibilización de los neutrófilos con HKBA y L-Omp19, la producción de ROS aumentó entre dos y tres veces, respectivamente (Figura 19). El incremento en la respuesta al subsecuente estallido respiratorio de los neutrófilos expuestos a PMA fue similar al del estímulo control, el LPS de *E. coli*. La producción de ROS luego de la sensibilización con U-Omp19 se mantuvo sin alteración con respecto a las células no tratadas.

***B. abortus* y Omp19 prolongan la sobrevivencia de los neutrófilos**

Se sabe que los productos de la pared celular bacteriana son capaces de retardar la tasa de apoptosis constitutiva de los neutrófilos como consecuencia de la activación celular [193]. Dado que nuestros resultados indican que las lipoproteínas de *Brucella* son capaces de modular los receptores de superficie y aumentar la producción de ROS, fenómenos asociados a un fenotipo inflamatorio de los neutrófilos; y considerando que el daño en las articulaciones en brucelosis está relacionado con la presencia de bacterias en las articulaciones afectadas, investigamos a continuación el efecto de *Brucella* y sus lipoproteínas en la apoptosis de neutrófilos. Las células fueron estimuladas con LPS de *E. coli*, diferentes concentraciones de HKBA, Pam₃Cys, L-Omp19 o U-Omp19. Posteriormente, se determinó la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular por Anexina V (AV)-FITC. El análisis por citometría de flujo mostró que luego de un período de 72 hs. hasta un 80% de los neutrófilos demostraban evidencias de apoptosis. El nivel de las células AV⁺ disminuyó significativamente ($P < 0.05$) en los neutrófilos estimulados con HKBA (**Figura 20**). A mayor concentración de bacterias, mayor la diferencia observada en la apoptosis de neutrófilos entre las células no tratadas y las estimuladas con HKBA. Sin embargo, en presencia de HKBA el porcentaje de células apoptóticas aún continuó creciendo desde un 30% (a las 6 hs.) hasta un 65% (a las 72 hs.), indicando que la señal de supervivencia inducida por HKBA retardaba pero no prevenía la apoptosis. Un retraso similar en la apoptosis espontánea de los neutrófilos se observó con L-Omp19, la cual en una concentración de 1000 ng/ml prolongó la sobrevivencia de los neutrófilos de manera significativa ($P < 0.05$); por el contrario, U-Omp19 fue incapaz de inhibir o retardar la progresión de la muerte celular por apoptosis (**Figura 20**). Los presentes resultados proveen evidencia de un mecanismo por el cual las lipoproteínas de *Brucella* podrían contribuir a la inflamación retardando la apoptosis de los neutrófilos y extendiendo así el tiempo de vida funcional de los mismos.

Figura 20. *B. abortus* y *Omp19* prolongan la sobrevivencia de los neutrófilos.



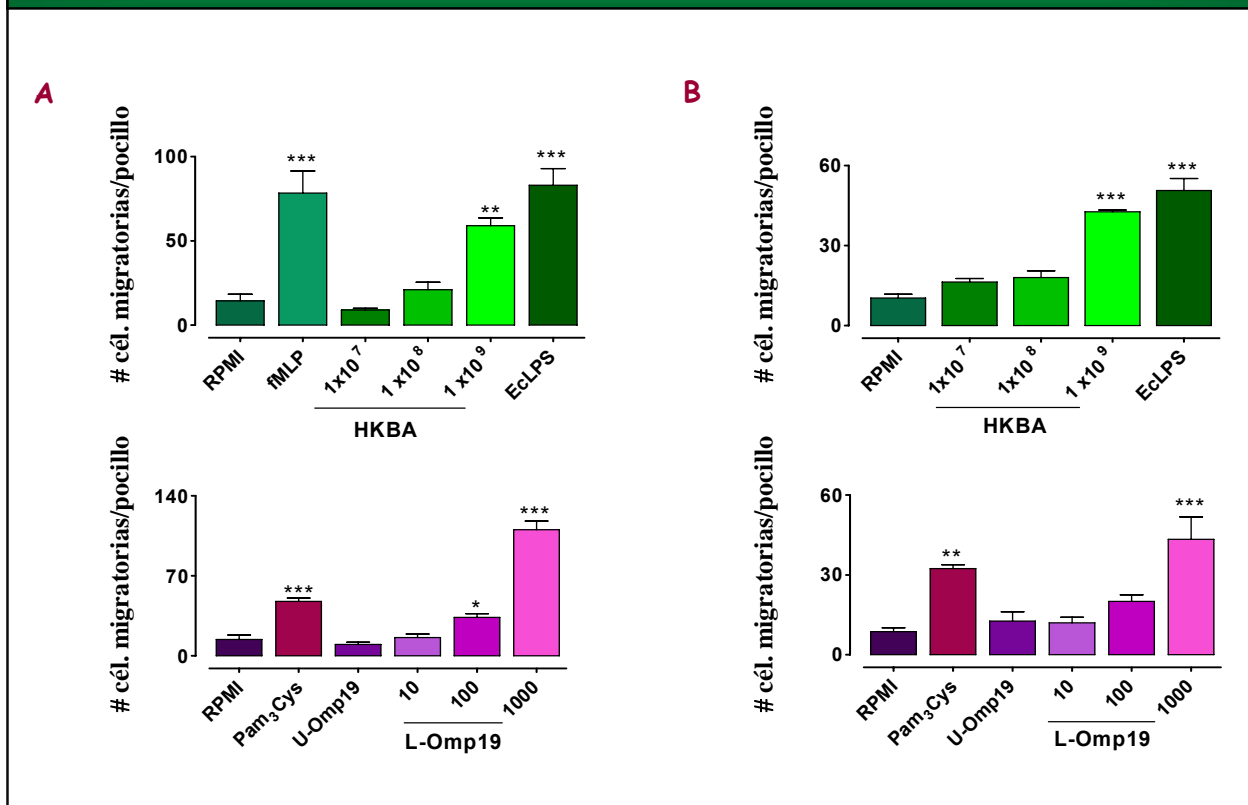
Neutrófilos humanos (1×10^6 células/ml) fueron incubados durante 6, 24, 48 o 72 hs. a 37°C con medio completo (RPMI), LPS de *E. coli* (EcLPS) (10 ng/ml), L-Omp19 (1000 ng/ml) o U-Omp19 (1000 ng/ml), Pam₃Cys (100 ng/ml) o HKBA (bacterias/ml) en las concentraciones indicadas. Posteriormente se determinó el porcentaje de células apoptóticas por el ensayo de Anexina V. Los datos corresponden a cinco experimentos independientes y se expresan como porcentaje de células Anexina V⁺ \pm S.E.M. La proporción de células necróticas fue siempre menor al 2%. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

***B. abortus* y Omp19 inducen la migración de neutrófilos**

Los neutrófilos son células con una vida media relativamente corta. Incluso aún si la apoptosis fuese retardada, son capaces de sobrevivir en un estado funcional sólo por unos cuantos días [196]. Entonces, para que los neutrófilos puedan contribuir en el proceso de inflamación localizada a largo plazo, tiene que haber un subsiguiente y continuo reclutamiento de nuevas células desde la circulación. La infiltración de las articulaciones por las células inmunes requiere de la producción local de quimioattractantes. Considerando que los neutrófilos activados tanto por *B. abortus* viva, HKBA y L-Omp19 secretan una de las sustancias quimioattractantes más poderosas, como IL-8, y modulan a su vez importantes moléculas que median la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular (**Figura 16, 17 y 18**), se realizaron experimentos para evaluar si HKBA y L-Omp19 son también capaces de inducir la migración de neutrófilos. Con este propósito, neutrófilos purificados fueron colocados en la cámara superior de placas de microquemotaxis y los distintos estimulantes fueron colocados en la cámara inferior de las placas. La migración fue cuantificada contando el número de células que alcanzaron la cámara inferior luego de un período de 2 hs. de incubación. El número de células que migraron fue significativamente mayor ($P < 0.01$) en los pocillos conteniendo HKBA (59 ± 4.6 células/pocillo) y L-Omp19 (100 ± 7.5 células/pocillo) que los niveles basales (14 ± 4 células/pocillo), mientras que los pocillos conteniendo U-Omp19 se mantuvieron igual (10 ± 2 células/pocillo) que los niveles basales. Pam₃Cys, de forma similar a L-Omp19, aumentó el número de células migratorias (50 ± 3 células/pocillo), y también lo hicieron los controles utilizados, fMLP (78 ± 13 células/pocillo) y LPS de *E. coli* (80 ± 10 células/pocillo) (**Figura 21A**). Consecuentemente, los sobrenadantes provenientes de neutrófilos tratados con HKBA, L-Omp19, Pam₃Cys y LPS de *E. coli*, indujeron la migración de los neutrófilos, mientras que el sobrenadante de las células tratadas con U-Omp19 no promovieron la movilización celular (**Figura 21B**). Esto puede indicar que la producción de IL-8 derivada de las células estimuladas con HKBA y L-

Omp19 podría tener un papel importante en la regulación de la inflamación localizada debido a su función como quimioattractante, reclutando más neutrófilos al sitio de la infección.

Figura 21. *B. abortus* y Omp19 inducen la migración de neutrófilos.



Migración de neutrófilos humanos incubados con los estímulos indicados (A) o con sobrenadante de neutrófilos incubados con los estímulos indicados (B), luego de un período de incubación de 2 hs. Los resultados se expresan como la media (número de células migratorias/pocillo) \pm S.E.M. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. RPMI.

DISCUSIÓN

La patofisiología de la artritis por *Brucella* es desconocida. Gotuzzo y col. sugirieron dos mecanismos patogénicos: una forma séptica y otra forma reactiva. La artritis séptica pareciera ser más probable ya que *Brucella* se extiende a través de la sangre, y por lo tanto la artritis es probablemente adquirida a través del flujo sanguíneo, como ocurre en otras artritis bacterianas [180]. Además, el aislamiento de *Brucella* del fluido sinovial o tejidos sustenta la teoría de la forma séptica. La diferencia entre las presentaciones clínicas de las llamadas formas séptica y reactiva podrían deberse a diferencias en la virulencia de estos microorganismos en los distintos pacientes. La ausencia de secuelas destructivas en las articulaciones de algunos pacientes podría deberse a un diagnóstico y tratamiento más temprano [197].

Por otro lado, también se ha reportado una predominancia de linfocitos en el líquido sinovial de pacientes con brucelosis en contraste a una predominancia de neutrófilos en pacientes con artritis séptica [197].

La acumulación y supervivencia de los neutrófilos en el foco inflamatorio ya ha sido implicada en la patología de otras enfermedades inflamatorias como la artritis, meningitis y peritonitis [198-200]. *B. abortus* indujo un aumento en la expresión de CD35 y CD11b y una disminución en la expresión de CD62L, acompañada de la producción de IL-8, una respuesta compatible con la activación de neutrófilos. La lipoproteína de *Brucella* Omp19 mimetizó los cambios fenotípicos y funcionales inducidos por la bacteria viva y HKBA. Nuestra observación de la capacidad de una lipoproteína purificada de *B. abortus* de activar directamente a neutrófilos humanos extiende el rol potencial de las lipoproteínas de *Brucella* en la inducción y mantenimiento del proceso inflamatorio. Las lipoproteínas de *B. abortus* podrían contribuir a la patogénesis de la brucelosis mediante el reclutamiento y activación de los neutrófilos [201]. A su vez, al

prolongar la sobrevivencia de estas células, se estaría limitando la resolución de la inflamación al no haber remoción de neutrófilos apoptóticos por células fagocíticas. De esta forma, se podría exacerbar el tráfico leucocitario a los tejidos inflamados llevando al daño tisular por la continua liberación del contenido de los gránulos citotóxicos de los neutrófilos. De hecho, el aumento en la producción de ROS en respuesta a HKBA o a Omp19 es compatible con el aumento reportado en la producción de ROS en neutrófilos de pacientes con bacteremia [202]. Aún más, los neutrófilos estimulados con *B. abortus* y Omp19, al igual que los sobrenadantes de estas células aumentaron la capacidad migratoria de los neutrófilos, sustentando el reclutamiento de neutrófilos al foco inflamatorio. Esto último está en concordancia con un aumento en la movilidad de neutrófilos hallada en pacientes con brucelosis [202].

Por lo tanto, las lipoproteínas de *Brucella* poseen propiedades proinflamatorias que podrían contribuir al daño tisular localizado e inflamación por medio de la activación directa de los neutrófilos. La cooperación entre estas células y los macrófagos o la activación directa de los macrófagos por las lipoproteínas también podría intensificar el microambiente nocivo desencadenado por los neutrófilos.

DISCUSIÓN GENERAL

La brucelosis es una de las zoonosis más frecuentes. En los últimos 30 años, ha progresado mucho nuestro entendimiento de la brucelosis animal, sin embargo, nuestro conocimiento sobre la patogénesis de la enfermedad en el hombre sigue siendo rudimentario. A pesar de los avances utilizando modelos murinos de brucelosis, aun queda mucho por conocer en relación con los componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa inducidos por la infección con *Brucella* en el hombre. Si bien es tentador extrapolar los resultados obtenidos en animales a la enfermedad humana, hay que tener ciertas precauciones al hacerlo [11]. La patofisiología de la infección humana difiere en muchos aspectos de la enfermedad inducida en animales. En rumiantes domésticos, la infección resulta principalmente en abortos en las hembras y orquitis en los machos [95] mientras que en ratones, la infección se asemeja a la septicemia y no se hace realmente crónica [203].

La falta de una terapia apropiada durante la etapa aguda de la enfermedad puede resultar en la localización de la bacteria en varios tejidos llevando a una enfermedad crónica que puede presentar severas manifestaciones clínicas [8]. Las manifestaciones de la brucelosis son en algunos casos más pronunciadas o limitadas a órganos o sistemas específicos, cuando esto ocurre en el transcurso de la infección aguda se denomina complicación; cuando ocurre en ausencia de otros signos de enfermedad sistémica, es denominada brucelosis localizada [97]. Dado que *Brucella* se localiza dentro de tejidos que son ricos en elementos del sistema reticuloendotelial, no es sorprendente que la infección involucra regularmente nódulos linfáticos, bazo, hígado y huesos [97]. Todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad, tanto en la etapa aguda como crónica, se presentan con un gran componente inflamatorio.

Las preguntas que aún requieren ser contestadas entre la relación de los aspectos de la respuesta inmune y las manifestaciones clínicas de la brucelosis humana incluyen [11]:

- ¿Cuáles son los componentes de *Brucella* responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria?
- ¿Cuáles son las células efectoras de esta respuesta?
- ¿La inmunidad tiene algún papel en la patogénesis de la enfermedad o en las lesiones en brucelosis?

Existen muy pocos estudios en cuanto al rol de los mecanismos inmunes en la patogénesis de las lesiones [11]; y muchos menos aún en cuanto a los efectores inmunes en la fisiopatología de la brucelosis humana. Parece razonable que los factores involucrados en la defensa inmune también estén involucrados en la formación de las lesiones patológicas. En muchas infecciones, las manifestaciones clínicas de la enfermedad resultan de la interacción entre el organismo y la respuesta inmune del hospedador. El granuloma sirve para localizar la infección, pero a expensas de daño tisular. Por lo tanto, a veces es difícil separar los efectos protectores de los efectos patogénicos de la respuesta inmune [11].

A pesar de los diversos signos y síntomas que evidencian la presencia de un fuerte componente inflamatorio en la brucelosis humana, los medios que utilizan estas bacterias para desencadenar el proceso inflamatorio son desconocidos.

Las citoquinas parecen tener un rol importante en la patogénesis de la brucelosis, y un balance Th1/Th2 podría estar involucrado en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad [204]. Algunos estudios han confirmado que las citoquinas están involucradas en la patofisiología de la brucelosis y que se encuentran estrechamente relacionadas con la activación inflamatoria de la enfermedad [107].

Por otro lado, también se ha asociado la presencia de *Brucella* con el desarrollo de la inflamación en los tejidos afectados. La prueba definitiva de esta asociación, es el aislamiento de la bacteria de estos tejidos [178, 179]. Diferentes trabajos han demostrado que, de hecho, la infección con *Brucella* induce una respuesta Th1 [68, 86, 107, 109]. Esto sumado al aislamiento de la bacteria de los sitios inflamatorios, sugiere que algún componente de la bacteria es el responsable de

activar a las células del sistema inmune innato induciendo una respuesta inflamatoria.

Las células encargadas de originar la respuesta innata y de inducir una respuesta inflamatoria son células de origen mieloide como los monocitos/macrófagos, DC y neutrófilos. Focalizándonos en la interacción de *Brucella* con estos tipos celulares clave en el desarrollo de la respuesta innata, hemos demostrado que *B. abortus* es capaz de inducir un perfil inflamatorio por medio de la activación y producción de citoquinas inflamatorias en monocitos/macrófagos, DC y neutrófilos. Si bien las concentraciones necesarias para modular la activación de DC y neutrófilos de bacteria muerta por calor fueron mayores que las requeridas al utilizar la bacteria viva, HKBA fue de todas formas efectiva en la inducción de la activación celular. Aunque desconocemos las razones por las cuales *B. abortus* viva puede tener mayor estimulación, este efecto también se ha reportado para otras bacterias que inducen una mayor producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a los organismos vivos comparados con la bacteria muerta o lisados de bacterias [205]. El contacto temprano de *Brucella* con las células fagocíticas involucra un desplazamiento en la superficie celular con un “ruffling” generalizado de membrana [206]. Durante estas interacciones tempranas las bacterias son capaces de secuestrar “lipid rafts” [207], facilitando el reconocimiento de los componentes bacterianos a través de los TLRs confinados en los mismos [208]. Además, se ha demostrado que *Brucella* forma microcolonias durante la adhesión a la superficie celular a través de interacciones con residuos de ácido siálico [26]. Una mayor eficiencia por parte de la bacteria viva para realizar cualquiera de estas interacciones celulares tempranas podría dar cuenta de las diferencias observadas entre la bacteria viva y muerta. Por ejemplo, la bacteria viva podría ser más eficiente para movilizarse en la membrana celular desde el sitio de contacto inicial dada su habilidad de desplazarse sobre la membrana celular, resultando en un mayor reclutamiento de TLRs a los “lipid rafts” pudiendo llevar a un aumento en el reconocimiento de la señal. En forma alternativa, una mayor activación celular

podría reflejar diferentes eventos de señalización luego de la internalización de la bacteria. En cualquier caso, el hecho de que HKBA también sea capaz de inducir la activación celular demuestra que por lo menos uno de los ligandos celulares estimuladores es un componente estructural de la bacteria; la bacteria viva podría ser más eficiente para presentar este ligando o podría valerse de mecanismos estimuladores adicionales, sin embargo no podemos discriminar entre estas dos posibilidades.

En relación al componente de *Brucella* responsable de inducir esta respuesta inflamatoria, nuestras observaciones experimentales sumadas a las de otros investigadores sugieren que el LPS de *B. abortus* no ejerce efecto alguno en la patogenia inflamatoria de la brucelosis.

Por otro lado, utilizando proteínas de la membrana externa de *B. abortus* como modelo, hemos demostrado la capacidad de las lipoproteínas de *Brucella* de inducir una respuesta proinflamatoria, a través de la inducción de cambios fenotípicos y funcionales asociados a la activación de distintos tipos celulares: monocitos/macrófagos, DC y neutrófilos. El uso de éstas, o cualquier otra lipoproteína como modelo se encuentra justificado por el hecho de que los efectos inmunológicos son desencadenados por el dominio lipídico de las mismas, y no por la porción proteica. Este dominio lipídico es probablemente compartido por todas las lipoproteínas bacterianas. El hecho de que Omp19 mimetice los efectos de HKBA en los distintos tipos celulares nos permite inferir que las lipoproteínas son uno de los principales estimulantes de estas células en la bacteria.

La acilación de las lipoproteínas es esencial para desencadenar una respuesta inflamatoria. Las modificaciones lipídicas en las lipoproteínas de *B. abortus* son probablemente idénticas en todas las moléculas de lipoproteína de este organismo. Esto implica que otras lipoproteínas también tendrían potencialmente la capacidad de activar los distintos tipos celulares e inducir la producción de citoquinas inflamatorias. Dado que el genoma de *B. abortus* contiene al menos 80 genes que codifican para lipoproteínas [209], se deduce que la concentración local de las

lipoproteínas de *Brucella* en microambientes confinados de los tejidos sería suficiente para ejercer sus efectos biológicos. En este contexto, se puede hipotetizar que cualquier lipoproteína de *Brucella* expuesta en la superficie sería relevante más allá de ensayos *in vitro* y no una única lipoproteína sino más bien una combinación de ellas llevarían al desarrollo de la respuesta proinflamatoria. En este caso, la producción de mediadores proinflamatorios inducidos por las lipoproteínas podrían ser lo suficientemente potentes como para explicar porque la inflamación en brucelosis se puede manifestar aun cuando es difícil de detectar la bacteria en lesiones o fluidos corporales.

Es difícil determinar la verdadera concentración de lipoproteínas presentes *in vivo* bajo condiciones fisiopatológicas, pero las mismas probablemente se acumulen en niveles de bioactividad significativa. Se ha demostrado que las lipoproteínas son las proteínas más abundantes en la pared celular de ciertas bacterias Gram negativas, pudiendo superar al LPS como componente de la pared celular en hasta 4 veces [193]. Se deduce entonces que las lipoproteínas representan un Ag ubicuo que podría contribuir a la regulación inmune. Las lipoproteínas son uno de los componentes mayoritarios en la pared celular de *Brucella*, y también podrían ser liberadas en niveles significativos en el medio circundante, como ocurre con otras lipoproteínas bacterianas [210, 211]. Existe la posibilidad entonces, de que las lipoproteínas liberadas *in vivo* por las bacterias en crecimiento o bacterias lisadas también contribuyan a inducir la respuesta inflamatoria.

Nuestros resultados indican que la habilidad de *Brucella* de desencadenar una respuesta inflamatoria podría deberse, por lo menos en parte, a las lipoproteínas de *Brucella*. Estos resultados también sugieren que la respuesta inmune innata, junto con la persistencia bacteriana en los tejidos, podrían conducir a la patología inflamatoria en la brucelosis.

Para poder comprender cuál sería el rol de las lipoproteínas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en brucelosis, nosotros proponemos el siguiente

escenario basado en nuestros resultados y en las evidencias acumuladas en el campo de la brucelosis:

Las bacterias penetran al hospedador a través de las mucosas o la piel lesionada en sitios como brazos, manos, orofaringe, conjuntiva o pulmones. Luego de cruzar el epitelio escamoso en el sitio de entrada, los microorganismos son rápidamente fagocitados por neutrófilos y macrófagos. Si el inoculo es pequeño, puede ser completamente eliminado por estas células; sin embargo, cuando el inoculo es grande, algunos microorganismos pueden tener acceso a los vasos linfáticos, y alcanzar los nódulos linfáticos regionales, donde serán fagocitados por los macrófagos. En los casos en los que el inoculo es tan elevado que los mecanismos de defensa locales y regionales son incapaces de contener la infección, muchos de éstos microorganismos pueden alcanzar el flujo sanguíneo resultando en bacteremia [97, 106].

Así, *Brucella* puede diseminarse en distintos tejidos, con tropismo por el sistema reticuloendotelial [30]. La invasión del bazo, cerebro, articulaciones, corazón, hígado y médula ósea por *Brucella* permitiría la introducción de las lipoproteínas en estos tejidos. La interacción de Omp16 y Omp19, o cualquier otra lipoproteína de *B. abortus*, con los macrófagos y neutrófilos, podría causar la producción de citoquinas, proliferación y reclutamiento de células inflamatorias, llevando a la inflamación tisular. Por otro lado, la activación de DC mediada por las lipoproteínas de *Brucella*, explicaría el desarrollo de una poderosa respuesta adaptativa hacia un perfil Th1.

De esta manera, en la etapa inicial de la infección, la interacción de las lipoproteínas con los macrófagos residentes de los tejidos a través del reconocimiento por TLR2, induce la producción de citoquinas inflamatorias. Posteriormente, otras células del sistema inmune innato también serían capaces de producir estas citoquinas inflamatorias en respuesta a las lipoproteínas, como son los neutrófilos y las DC. Sin embargo, la principal fuente de citoquinas en la etapa inicial de la infección con *Brucella* en humanos sea probablemente los

monocitos/macrófagos [146]. A su vez, la activación a través de TLR2 también podría disparar una rápida diferenciación de monocitos a macrófagos y DC [212]. Los monocitos migran desde la sangre al sitio inflamatorio y generan mediadores proinflamatorios y quemoquinas que modulan la actividad de otras células de origen mieloide, en particular los neutrófilos [213].

Los neutrófilos son los primeros leucocitos en migrar a través del endotelio de tejidos en respuesta a agentes quimiotácticos. La adhesión, diapédesis y migración de los neutrófilos al foco de inflamación comienza en las primeras horas posinfección: el endotelio activado por IL-8, factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 y otros quimioattractantes de neutrófilos como las lipoproteínas de *Brucella*, inducirían la expresión de moléculas de adhesión que detienen y activan a los neutrófilos. Una vez en el foco de infección, los mismos pueden ser activados por las lipoproteínas de *Brucella* a través del reconocimiento por TLR2, iniciando la producción de sustancias proinflamatorias y mecanismos microbicidas que en última instancia podrían llevar a ocasionar el daño tisular. Los neutrófilos así activados por las lipoproteínas aumentan la producción de IL-8 que modula la funcionalidad de los neutrófilos de forma autócrina y favorece el reclutamiento de estas células al foco inflamatorio.

Coincidiendo con este modelo, el daño tisular en brucelosis se asocia con una fuerte presencia de un infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos [97, 104, 179, 182, 183, 185]. Los macrófagos, y en mayor medida las DC, también inician la respuesta inmune adaptativa presentando Ags a los LT CD4⁺ vía MHCII. A través de la interacción con TLR2, las lipoproteínas de *Brucella* tendrían la habilidad de iniciar una respuesta inmune adaptativa mediante la activación de células presentadoras de Ag profesionales, como son las DC. En este contexto, la IL-12 generada por macrófagos y DC en respuesta a las lipoproteínas tiene un rol importante dirigiendo las células T hacia un perfil Th1, y por lo tanto en la producción de IFN- γ .

Brucella actuaría en el sistema inmune estimulando las DC vía TLR2 para secretar citoquinas proinflamatorias, induciendo la maduración de las DC seguida de la migración hacia los nódulos linfáticos aferentes. Es posible que, dado que los neutrófilos poseen una vida media corta, y los macrófagos se supone que no abandonan el sitio de infección local, las DC transporten las bacterias y los productos de las bacterias a los nódulos linfáticos, en donde las respuestas de las células T se desarrollarán para controlar la infección. El ligando TLR2 en *Brucella* serían sus lipoproteínas. Las DC en las zonas T de los ganglios estimuladas por *Brucella* vía TLR2, secretarían IL-12 que a su vez activa a las células T cercanas para diferenciarse a células Th1 y secretar IFN- γ . Alternativamente, las DC también podrían ser estimuladas a través de TLR4 por la BLS o de TLR9 por el ADN de *Brucella*.

A pesar de una continua activación por las lipoproteínas que contribuye a generar la inflamación localizada, este microorganismo también es capaz de generar una infección crónica evadiendo la eliminación completa de la bacteria en el hospedador. Si bien la respuesta inmune desencadenada es capaz de eliminar a la mayoría de las bacterias dentro de los macrófagos; algunas bacterias logran sobrevivir y se replican. Dentro de los macrófagos, *Brucella* evade la fusión fagolisosomal alterando los procesos de maduración del fagosoma. [214].

Allí, la exposición prolongada a la bacteria podría inhibir ciertos mecanismos inmunes. Una señalización prolongada de TLR2 por *Brucella* podría inhibir ciertas respuestas de los macrófagos a IFN- γ , en particular aquellas relacionadas con la presentación de Ags por MHCII. Esta inhibición promovería la evasión de *Brucella* de las respuestas de células T y la persistencia de la infección en brucelosis [168]. La inhibición de las respuestas inducidas por IFN- γ le permitiría a esta bacteria intracelular la evasión de la vigilancia inmune por las células T, contribuyendo a mantener una infección crónica. *Brucella* podría ser particularmente eficiente en inducir y explotar esta inhibición de las respuestas a IFN- γ . En primer lugar, *Brucella* reside dentro de los macrófagos, un tipo celular que expresa TLR2 y exhibe

modulación de varios genes involucrados en la defensa inmune dependientes de IFN- γ . En segundo lugar, *Brucella* posee mecanismos que le permiten resistir los mecanismos innatos microbicidas agudos, permitiendo la persistencia dentro de los macrófagos por el tiempo suficiente para proveer una exposición crónica a ciertos PAMPs, como las lipoproteínas de *Brucella*. En tercer lugar, las lipoproteínas podrían ser liberadas de las bacterias viables intracelulares, estando disponible para estimular TLR2 el cual se encuentra presente y es reclutado a los compartimientos fagosomales. La persistencia intracelular de *Brucella* y sus lipoproteínas serían medios efectivos para la estimulación crónica de TLR2 y la consecuente inhibición de los genes modulados por IFN- γ . Esta inhibición de las respuestas a IFN- γ a través de la exposición prolongada de agonistas TLRs pareciera ser discordante con el rol de los TLRs en la activación inmune aguda, pero esta inhibición representa un mecanismo contra regulatorio para promover la homeostasis inmune.

De esta manera, la señalización aguda a través de TLR2 inducida por las lipoproteínas de *Brucella* producen las respuestas inmunes proinflamatorias que contribuyen en la defensa inmune, mientras que ciertos aspectos de estas respuestas pueden ser disminuidos en forma tardía luego de la fase aguda; cumpliendo también de esta manera las lipoproteínas de *Brucella* un rol importante en la homeostasis de la respuesta inmune. Durante la infección aguda con *Brucella* se dispararían así las funciones inmunes innatas. Sin embargo, *Brucella* es capaz de sobrevivir esta fase aguda de la inmunidad innata y persistir dentro de los macrófagos. La señalización prolongada a través de TLR2 reduciría luego la presentación antigénica en los macrófagos infectados que luego servirán como nichos en los cuales *Brucella* persistiría sin la detección de células T CD4⁺. Si incluso una pequeña proporción de los macrófagos proveen estos nichos, esto crearía un mecanismo efectivo de evasión inmune para promover la infección crónica, incluso con una continua presentación antigénica por otras células.

Es probable que se induzcan mecanismos contra regulatorios luego de una estimulación prolongada a través de los TLRs para limitar potenciales reacciones

inflamatorias excesivas. La señalización de las lipoproteínas vía TLR2 induce no sólo IL-12, promoviendo la respuesta Th1, sino también IL-10, que puede contrarrestar los efectos de IL-12 suprimiendo el desarrollo de la respuesta inmune contra este patógeno. Mediante la producción de IL-10 se previene la activación excesiva de la respuesta inmune limitando la patología inmune, pero también en forma alternativa previniendo la erradicación completa de *Brucella* inhibiendo la inmunidad Th1. La capacidad de las lipoproteínas de *B. abortus* de inducir no sólo citoquinas inflamatorias, sino también IL-10, una potente citoquina antiinflamatoria, en el mismo tipo celular, y el hecho de que estas citoquinas pudiesen actuar concertadamente en el mismo microambiente del tejido infectado con *Brucella*, acentúa la noción de que IL-10 podría tener una participación en el control de la inflamación en brucelosis [111]. Aún más, la capacidad de las lipoproteínas de *B. abortus* de inducir citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-10, podría explicar la naturaleza focal y transiente de los episodios inflamatorios durante las infecciones con *Brucella* [97].

Dentro del bruceloso, las bacterias se replican sin ocasionar daño celular. La extensiva replicación bacteriana eventualmente genera necrosis luego de la liberación de las bacterias de las células, con el proceso inflamatorio concomitante. Luego de que las bacterias han sido liberadas, puede proceder la infección a otras células [155].

Considerando que en el sitio de infección al mismo tiempo va a haber macrófagos activados, induciendo una respuesta inflamatoria, y macrófagos en los cuales la bacteria ha alcanzado ya su nicho replicativo, evadiendo la respuesta inmune, en este escenario tendrá lugar un delicado balance entre las células activadas y las células inhibidas por *Brucella* para generar una respuesta inmune específica o limitar la inflamación.

Es importante destacar, que al momento de iniciar esta tesis, subyacía en el área de investigación una línea de pensamiento destinada a develar los mecanismos de interacción y reconocimiento de *Brucella* spp. por el sistema inmune innato.

Varios trabajos presentes en el dominio público proponían al LPS de *Brucella* como un débil inductor del sistema inmune y sugerían que algún otro componente de *Brucella* podría ser el responsable de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias [112, 169]. Los resultados de este trabajo vinieron a develar esta incógnita, postulando a las lipoproteínas de *Brucella* como poderosas moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inflamatoria. En su conjunto, los resultados obtenidos en monocitos/macrófagos, DC y neutrófilos implican a las lipoproteínas de *Brucella* en la patología inflamatoria de la brucelosis humana.

Finalmente, los resultados de esta tesis sustentan un modelo en el cual por lo menos tres factores contribuyen en el desarrollo de la patología inflamatoria en brucelosis. Estos factores son la invasión y persistencia de la bacteria en los tejidos, la interacción de las lipoproteínas con células efectoras, y la regulación de este efecto por citoquinas moduladoras producidas en el microambiente del tejido invadido. Podría ser que el destino de la patología en brucelosis, en particular la naturaleza transiente y recurrente de los episodios inflamatorios de la enfermedad, dependiera de un delicado balance entre citoquinas pro y antiinflamatorias inducidas por las lipoproteínas de *Brucella*.

Autora
Lic. Astrid Zwerdling

Director de Tesis
Dr. Guillermo H. Giambartolomei

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO-WHO. **Joint Expert Committee on Brucellosis. Sixth Report. Technical Report Series.** Geneva. World Health Organization. 1986.
2. Samartino, L. E. 2002. **Brucellosis in Argentina.** *Vet Microbiol.* 90: 71.
3. Rivero Puente, E. M.-P., M. Burusco y R Díaz. 1978. **Brucellosis.**
4. Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D. and Ramuz, M. 1997. **Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*.** *J Bacteriol.* 179: 3244.
5. Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., Paquet, J. Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. and Godfroid, J. 2001. **Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus.** *Microbes Infect.* 3: 729.
6. Young, E. J. 1995. **An overview of human brucellosis.** *Clin Infect Dis.* 21: 283.
7. Ko, J. and Splitter, G. A. 2003. **Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.** *Clin Microbiol Rev.* 16: 65.
8. Mantur, B. G., Amarnath, S. K. and Shinde, R. S. 2007. **Review of clinical and laboratory features of human brucellosis.** *Indian J Med Microbiol.* 25: 188.
9. Tryland, M., Sorensen, K. K. and Godfroid, J. 2005. **Prevalence of *Brucella pinnipediae* in healthy hooded seals (*Cystophora cristata*) from the North Atlantic Ocean and ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard.** *Vet Microbiol.* 105: 103.
10. Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. and Cloeckaert, A. 2007. ***Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts.** *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 2688.
11. Serre, A. **Immunology and pathophysiology of human brucellosis.** In: *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects.* Young, E. J. Corbel, M. J. ed. 1989. p. 85. CRC Press.
12. Moriyon, I. and Lopez-Goni, I. 1998. **Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*.** *Int Microbiol.* 1: 19.
13. Cloeckaert, A., Vizcaino, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A. and Elzer, P. H. 2002. **Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future.** *Vet Microbiol.* 90: 229.
14. Douglas, J. T., Rosenberg, E. Y., Nikaido, H., Verstrete, D. R. and Winter, A. J. 1984. **Porins of *Brucella* species.** *Infect Immun.* 44: 16.
15. Mobasher, H., Ficht, T. A., Marquis, H., Lea, E. J. and Lakey, J. H. 1997. ***Brucella* Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction.** *FEMS Microbiol Lett.* 155: 23.
16. Marquis, H. and Ficht, T. A. 1993. **The omp2 gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins.** *Infect Immun.* 61: 3785.

17. Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M. and Vizcaino, N. 1996. **Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella***. *FEMS Microbiol Lett.* 145: 1.
18. Salhi, I., Boigegrain, R. A., Machold, J., Weise, C., Cloeckaert, A. and Rouot, B. 2003. **Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp.** *Infect Immun.* 71: 4326.
19. Bae, J. E., Schurig, G. G. and Toth, T. E. 2002. **Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens.** *Vet Microbiol.* 88: 189.
20. Winter, A. J., Verstrete, D. R., Hall, C. E., Jacobson, R. H., Castleman, W. L., Meredith, M. P. and McLaughlin, C. A. 1983. **Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants.** *Infect Immun.* 42: 1159.
21. Bowden, R. A., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S. and Dubray, G. 1998. **Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*.** *J Med Microbiol.* 47: 39.
22. Ariza Cardenal, J. **Brucelosis.** In: *Farreras-Rozman Medicina Interna.* (13^{ta} Edición). Barcelona. Mosby-Doyma Libros S. A. 1995. p. 2312.
23. Porte, F., Liautard, J. P. and Kohler, S. 1999. **Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages.** *Infect Immun.* 67: 4041.
24. Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. and Cheville, N. F. 1990. **Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy.** *Vet Pathol.* 27: 317.
25. Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. and Cheville, N. F. 1990. **Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro.** *Infect Immun.* 58: 2320.
26. Castaneda-Roldan, E. I., Avelino-Flores, F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J. and Giron, J. A. 2004. **Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues.** *Cell Microbiol.* 6: 435.
27. Delpino, M. V., Fossati, C. A. and Baldi, P. C. 2009. **Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp.** *Infect Immun.* 77: 984.
28. Pontow, S. E., Kery, V. and Stahl, P. D. 1992. **Mannose receptor.** *Int Rev Cytol.* 137B: 221.
29. Aréstegui, M. B., Gualtieri, C. S., Domínguez, J. and Scharovsky, G. 2001. **El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico.** *Vet Mex.* 32: 131.
30. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. and Tsianos, E. 2005. **Brucellosis.** *N Engl J Med.* 352: 2325.

31. Watarai, M., Makino, S., Michikawa, M., Yanagisawa, K., Murakami, S. and Shirahata, T. 2002. **Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice.** *Infect Immun.* 70: 4818.
32. Watarai, M. 2004. **Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains.** *Microbes Infect.* 6: 93.
33. Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., Shirahata, T., Sakaguchi, S. and Katamine, S. 2003. **Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages.** *J Exp Med.* 198: 5.
34. Jiang, X. and Baldwin, C. L. 1993. **Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 61: 124.
35. Jiang, X., Leonard, B., Benson, R. and Baldwin, C. L. 1993. **Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide.** *Cell Immunol.* 151: 309.
36. Baldwin, C. L. and Goenka, R. 2006. **Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection?** *Crit Rev Immunol.* 26: 407.
37. Boschirolí, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazeveille, C., Liautard, J. P., Ramuz, M. and O'Callaghan, D. 2002. **The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 1544.
38. Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H. and Smits, H. L. 2007. **Human brucellosis.** *Lancet Infect Dis.* 7: 775.
39. Seleem, M. N., Boyle, S. M. and Sriranganathan, N. 2008. ***Brucella*: a pathogen without classic virulence genes.** *Vet Microbiol.* 129: 1.
40. Corbel, M. J. 1997. **Brucellosis: an overview.** *Emerg Infect Dis.* 3: 213.
41. Moreno, E. 2002. **Brucellosis in Central America.** *Vet Microbiol.* 90: 31.
42. Gandara, B., Merino, A. L., Rogel, M. A. and Martinez-Romero, E. 2001. **Limited genetic diversity of *Brucella* spp.** *J Clin Microbiol.* 39: 235.
43. Lucero, N. E., Foglia, L., Ayala, S. M., Gall, D. and Nielsen, K. 1999. **Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis.** *J Clin Microbiol.* 37: 3245.
44. Rivera, S. A., Ramirez, M. C. and Lopetegui, I. P. 2002. **Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile.** *Vet Microbiol.* 90: 45.
45. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2005. **SENASA Argentina** [On-line]. <http://www.senasa.gov.ar/indexhtml.php>.
46. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2005. **INTA** [On-line]. <http://www.inta.gov.ar/actual/ant/2005/may18.htm>.
47. Garcia-Carrillo, C. **La brucelosis de los animales en America y su relación con la infección humana.** Paris. OIE. 1987. p. 303.

48. Rodríguez, A., Orduña, A., Ariza, X., Moriyon, I., Díaz, R., Blasco, J., Almaraz, A., Martínez, F., Ruiz, C. and Abad, R. 2001. **Manual de Brucelosis**. Ed. Junta de Castilla y León.
49. Kaufmann, A. F., Meltzer, M. I. and Schmid, G. P. 1997. **The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?** *Emerg Infect Dis.* 3: 83.
50. Moreno-Lafont, M. C., Lopez-Merino, A. and Lopez-Santiago, R. 1995. **Cell response to a salt-extractable and sonicated *Brucella melitensis* 16M antigen in human brucellosis.** *Clin Diagn Lab Immunol.* 2: 377.
51. Malik, G. M. 1997. **A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia.** *Am J Trop Med Hyg.* 56: 375.
52. Sauret, J. M. and Vilissova, N. 2002. **Human brucellosis.** *J Am Board Fam Pract.* 15: 401.
53. Madkour, M. M. **Brucellosis: Overview.** In: *Brucellosis. (2nd Edition).* 2001. p. 1. Springer.
54. Yagupsky, P. 1999. **Detection of Brucellae in blood cultures.** *J Clin Microbiol.* 37: 3437.
55. Fiori, P. L., Mastrandrea, S., Rappelli, P. and Cappuccinelli, P. 2000. ***Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories.** *J Clin Microbiol.* 38: 2005.
56. Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N. and Golding, H. 2001. **Immunity and protection against *Brucella abortus*.** *Microbes Infect.* 3: 43.
57. Spector, W. G., Reichhold, N. and Ryan, G. B. 1970. **Degradation of granuloma-inducing micro-organisms by macrophages.** *J Pathol.* 101: 339.
58. Eze, M. O., Yuan, L., Crawford, R. M., Paravitana, C. M., Hadfield, T. L., Bhattacharjee, A. K., Warren, R. L. and Hoover, D. L. 2000. **Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro.** *Infect Immun.* 68: 257.
59. Canning, P. C. **Phagocyte function in resistance to brucellosis.** In: *Advances in brucellosis research.* Adams, L. G. 1990. p. 151. Texas A&M University Press, College Station.
60. Frenchick, P. J., Markham, R. J. and Cochrane, A. H. 1985. **Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*.** *Am J Vet Res.* 46: 332.
61. Billard, E., Cazevielle, C., Dornand, J. and Gross, A. 2005. **High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*.** *Infect Immun.* 73: 8418.
62. Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J. J. and Muraille, E. 2007. **MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection.** *J Immunol.* 178: 5182.
63. Fernandes, D. M., Benson, R. and Baldwin, C. L. 1995. **Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice.** *Infect Immun.* 63: 4029.

64. Murphy, E. A., Parent, M., Sathiyaseelan, J., Jiang, X. and Baldwin, C. L. 2001. **Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 32: 85.
65. Takeda, K. and Akira, S. 2007. **Toll-like receptors.** *Curr Protoc Immunol.* Chapter 14: Unit 14 12.
66. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. and Mantovani, A. 2000. **Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.** *J Immunol.* 164: 5998.
67. Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Manoj Kumar, P. P. and Mantovani, A. 2000. **Toll-like receptor family and signalling pathway.** *Biochem Soc Trans.* 28: 563.
68. Campos, M. A., Rosinha, G. M., Almeida, I. C., Salgueiro, X. S., Jarvis, B. W., Splitter, G. A., Qureshi, N., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T. and Oliveira, S. C. 2004. **Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice.** *Infect Immun.* 72: 176.
69. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A. and Moreno, E. 2005. **MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 73: 5137.
70. Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Commerci, D. J., Ugalde, R. A., Pierre, P. and Gorvel, J. P. 2008. ***Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1.** *PLoS Pathog.* 4: e21.
71. CirI, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C. and Miethke, T. 2008. **Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins.** *Nat Med.* 14: 399.
72. Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A. and Carvalho, N. B. 2008. **The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond.** *Microbes Infect.* 10: 1005.
73. Inohara, Chamailard, McDonald, C. and Nunez, G. 2005. **NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease.** *Annu Rev Biochem.* 74: 355.
74. Elzer, P. H., Jacobson, R. H., Jones, S. M., Nielsen, K. H., Douglas, J. T. and Winter, A. J. 1994. **Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19.** *Immunology.* 82: 651.
75. Winter, A. J., Duncan, J. R., Santisteban, C. G., Douglas, J. T. and Adams, L. G. 1989. **Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice.** *Infect Immun.* 57: 3438.
76. Cassataro, J., Velikovskiy, C. A., de la Barrera, S., Estein, S. M., Bruno, L., Bowden, R., Pasquevich, K. A., Fossati, C. A. and Giambartolomei, G. H. 2005. **A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response.** *Infect Immun.* 73: 6537.

77. Pasquevich, K. A., Estein, S. M., Garcia Samartino, C., Zwerdling, A., Coria, L. M., Barrionuevo, P., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H. and Cassataro, J. 2009. **Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection.** *Infect Immun.* 77: 436.
78. Zhan, Y., Yang, J. and Cheers, C. 1993. **Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins.** *Infect Immun.* 61: 2841.
79. Oliveira, S. C. and Splitter, G. A. 1995. **CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice.** *Eur J Immunol.* 25: 2551.
80. Murphy, E. A., Sathiyaseelan, J., Parent, M. A., Zou, B. and Baldwin, C. L. 2001. **Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice.** *Immunology.* 103: 511.
81. Kunkle, R. A., Steadham, E. M. and Cheville, N. F. 1995. **Morphometric analysis of CD4+, CD8+, and gamma/delta+ T-lymphocytes in lymph nodes of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strains RB51 and 19.** *Vet Immunol Immunopathol.* 49: 271.
82. Munoz-Montesino, C., Andrews, E., Rivers, R., Gonzalez-Smith, A., Moraga-Cid, G., Folch, H., Cespedes, S. and Onate, A. A. 2004. **Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4+ and CD8+ T cells.** *Infect Immun.* 72: 2081.
83. Bertotto, A., Gerli, R., Spinozzi, F., Muscat, C., Scalise, F., Castellucci, G., Sposito, M., Candio, F. and Vaccaro, R. 1993. **Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection.** *Eur J Immunol.* 23: 1177.
84. Ottones, F., Dornand, J., Naroeni, A., Liautard, J. P. and Favero, J. 2000. **V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect.** *J Immunol.* 165: 7133.
85. Gamazo, C., Winter, A. J., Moriyon, I., Riezu-Boj, J. I., Blasco, J. M. and Diaz, R. 1989. **Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*.** *Infect Immun.* 57: 1419.
86. Zhan, Y., Kelso, A. and Cheers, C. 1993. **Cytokine production in the murine response to *brucella* infection or immunization with antigenic extracts.** *Immunology.* 80: 458.
87. Zhan, Y., Liu, Z. and Cheers, C. 1996. **Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms.** *Infect Immun.* 64: 2782.
88. Ko, J., Gendron-Fitzpatrick, A. and Splitter, G. A. 2002. **Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis.** *J Immunol.* 168: 2433.

89. Zhan, Y. and Cheers, C. 1995. **Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection.** *Infect Immun.* 63: 1387.
90. Ho, M. and Cheers, C. 1982. **Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*.** *J Infect Dis.* 146: 381.
91. Fernandes, D. M. and Baldwin, C. L. 1995. **Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 63: 1130.
92. Ficht, T. A. 2003. **Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence.** *Vet Microbiol.* 92: 213.
93. Runnells, R., Monlux, W. and Monlux, A. **Brucellosis.** In: *Principios de Patología Veterinaria: Anatomía Patológica.* 1980. p. 645. Editorial Continental, S.A. (1^{ra} Edición en Español, Novena reimpresión).
94. Hausler, W. and Koontz, F. 1974. **Manual of Clinical Microbiology. (2nd ed.).** Lennette, E., Spaulding, E., Truant, J. (eds.). American Society of Microbiology.
95. Enright, F. M. **The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals.** In: *Animal Brucellosis.* Nielsen, K. Duncan, J. R. ed. 1990. p. 301. CRC Press.
96. Palmer, M. V., Cheville, N. F. and Jensen, A. E. 1996. **Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB51: pathologic, bacteriologic, and serologic findings.** *Vet Pathol.* 33: 682.
97. Young, E. J. **Clinical manifestations of human brucellosis.** In: *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects.* Young, E. J. Corbel, M. J. ed. 1989. p. 97. CRC Press.
98. Chevrel, J., Riojas, A., Lafargues, J. P., Sarlangue, J. and Barbier, R. 2001. **[Osteoarticular brucellosis and signs of autoimmunity].** *Arch Pediatr.* 8: 834.
99. Colmenero, J. D., Reguera, J. M., Fernandez-Nebro, A. and Cabrera-Franquelo, F. 1991. **Osteoarticular complications of brucellosis.** *Ann Rheum Dis.* 50: 23.
100. Kubler, P. A. and Klestov, A. C. 2001. **Osteoarticular brucellosis with long latent period.** *Clin Rheumatol.* 20: 444.
101. Priest, J. R., Low, D., Wang, C. and Bush, T. 2008. **Brucellosis and sacroiliitis: a common presentation of an uncommon pathogen.** *J Am Board Fam Med.* 21: 158.
102. Young, E. J. 1979. ***Brucella melitensis* hepatitis: the absence of granulomas.** *Ann Intern Med.* 91: 414.
103. Jordans, H. G. and DeBruin, K. D. 1980. **Granulomas in *Brucella melitensis* infection.** *Ann Intern Med.* 92: 264.
104. Colmenero J de, D., Queipo-Ortuno, M. I., Maria Reguera, J., Angel Suarez-Munoz, M., Martin-Carballino, S. and Morata, P. 2002. **Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 42: 159.

105. Bouza, E., Garcia de la Torre, M., Parras, F., Guerrero, A., Rodriguez-Creixems, M. and Gobernado, J. 1987. **Brucellar meningitis.** *Rev Infect Dis.* 9: 810.
106. Madkour, M. M. **Histopathological features.** In: *Brucellosis. (2nd Edition).* 2001. p. 65. Springer.
107. Demirdag, K., Ozden, M., Kalkan, A., Godekmerdan, A. and Sirri Kilic, S. 2003. **Serum cytokine levels in patients with acute brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 39: 149.
108. Stevens, M. G. and Olsen, S. C. 1994. **In vitro effects of live and killed *Brucella abortus* on bovine cytokine and prostaglandin E2 production.** *Vet Immunol Immunopathol.* 40: 149.
109. Zhan, Y. and Cheers, C. 1995. **Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro.** *Infect Immun.* 63: 720.
110. Zaitseva, M., Golding, H., Manischewitz, J., Webb, D. and Golding, B. 1996. ***Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*.** *Infect Immun.* 64: 3109.
111. Huang, L., Krieg, A. M., Eller, N. and Scott, D. E. 1999. **Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria.** *Infect Immun.* 67: 6257.
112. Huang, L. Y., Aliberti, J., Leifer, C. A., Segal, D. M., Sher, A., Golenbock, D. T. and Golding, B. 2003. **Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent.** *J Immunol.* 171: 1441.
113. Waage, A., Halstensen, A. and Espevik, T. 1987. **Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.** *Lancet.* 1: 355.
114. Dayer, J. M., de Rochemonteix, B., Burrus, B., Demczuk, S. and Dinarello, C. A. 1986. **Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells.** *J Clin Invest.* 77: 645.
115. Evequoz, V., Bettens, F., Kristensen, F., Trechsel, U., Stadler, B. M., Dayer, J. M., De Weck, A. L. and Fleisch, H. 1984. **Interleukin 2-independent stimulation of rabbit chondrocyte collagenase and prostaglandin E2 production by an interleukin 1-like factor.** *Eur J Immunol.* 14: 490.
116. Vassalli, P. 1992. **The pathophysiology of tumor necrosis factors.** *Annu Rev Immunol.* 10: 411.
117. Takemura, R. and Werb, Z. 1984. **Secretory products of macrophages and their physiological functions.** *Am J Physiol.* 246: C1.
118. Kreutzer, D. L. and Robertson, D. C. 1979. **Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 23: 819.
119. Young, E. J., Borchert, M., Kretzer, F. L. and Musher, D. M. 1985. **Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes.** *J Infect Dis.* 151: 682.

120. Moreno, E., Berman, D. T. and Boettcher, L. A. 1981. **Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides.** *Infect Immun.* 31: 362.
121. Goldstein, J., Hoffman, T., Frasc, C., Lizzio, E. F., Beining, P. R., Hochstein, D., Lee, Y. L., Angus, R. D. and Golding, B. 1992. **Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines.** *Infect Immun.* 60: 1385.
122. Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S. 1995. **Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.** *Annu Rev Immunol.* 13: 437.
123. Berman, D. T. and Kurtz, R. S. 1987. **Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS.** *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 138: 98.
124. Netea, M. G., van Deuren, M., Kullberg, B. J., Cavaillon, J. M. and Van der Meer, J. W. 2002. **Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?** *Trends Immunol.* 23: 135.
125. Qureshi, N., Takayama, K., Seydel, U., Wang, R., Cotter, J., Agrawal, P. K., Bush, C. A., Kurtz, R. and Berman, D. T. 1994. **Structural analysis of lipid A derived from lipopolysaccharide of *Brucella abortus*.** *J. Endotoxin Res.* 1: 137.
126. Krieg, A. M. 2002. **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** *Annu Rev Immunol.* 20: 709.
127. Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A., Lasater, B. L. and Philipp, M. T. 1999. **Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14.** *Infect Immun.* 67: 140.
128. Ma, Y. and Weis, J. J. 1993. ***Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties.** *Infect Immun.* 61: 3843.
129. Radolf, J. D., Arndt, L. L., Akins, D. R., Curetty, L. L., Levi, M. E., Shen, Y., Davis, L. S. and Norgard, M. V. 1995. ***Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages.** *J Immunol.* 154: 2866.
130. Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. and Zychlinsky, A. 1999. **Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2.** *Science.* 285: 736.
131. Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A. and Philipp, M. T. 1998. ***Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys.** *Infect Immun.* 66: 2691.
132. Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A., Lasater, B. L., Murthy, P. K. and Philipp, M. T. 2002. **Autocrine and exocrine regulation of interleukin-10 production in THP-1 cells stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins.** *Infect Immun.* 70: 1881.
133. Tibor, A., Weynants, V., Denoel, P., Lichtfouse, B., De Bolle, X., Saman, E., Limet, J. N. and Letesson, J. J. 1994. **Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins.** *Infect Immun.* 62: 3633.

134. Tibor, A., Saman, E., de Wergifosse, P., Cloeckert, A., Limet, J. N. and Letesson, J. J. 1996. **Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 64: 100.
135. Tibor, A., Decelle, B. and Letesson, J. J. 1999. **Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins.** *Infect Immun.* 67: 4960.
136. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. 1998. **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.** *Science.* 282: 2085.
137. Miyake, K. 2006. **Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors.** *J Endotoxin Res.* 12: 195.
138. Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. and Modlin, R. L. 1999. **Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors.** *Science.* 285: 732.
139. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell.* 124: 783.
140. Radolf, J. D., Chamberlain, N. R., Clausell, A. and Norgard, M. V. 1988. **Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by phase partitioning with the nonionic detergent triton X-114.** *Infect Immun.* 56: 490.
141. Velasco, J., Bengoechea, J. A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., Gonzalez, D., Zahringer, U., Moreno, E. and Moriyon, I. 2000. ***Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance.** *Infect Immun.* 68: 3210.
142. Kitchens, R. L. and Munford, R. S. 1995. **Enzymatically deacylated lipopolysaccharide (LPS) can antagonize LPS at multiple sites in the LPS recognition pathway.** *J Biol Chem.* 270: 9904.
143. Munford, R. S. and Hall, C. L. 1985. **Uptake and deacylation of bacterial lipopolysaccharides by macrophages from normal and endotoxin-hyporesponsive mice.** *Infect Immun.* 48: 464.
144. Vermeulen, M., Giordano, M., Trevani, A. S., Sedlik, C., Gamberale, R., Fernandez-Calotti, P., Salamone, G., Raiden, S., Sanjurjo, J. and Geffner, J. R. 2004. **Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells.** *J Immunol.* 172: 3196.
145. Richardson, M. P., Ayliffe, M. J., Helbert, M. and Davies, E. G. 1998. **A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test.** *J Immunol Methods.* 219: 187.
146. Fainboim, L. and Geffner, J. R. 2005. **Introducción a la inmunología humana.** Editorial Médica Panamericana.

147. Beutler, B. 2002. **LPS in microbial pathogenesis: promise and fulfilment.** *J Endotoxin Res.* 8: 329.
148. Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. and Schaechter, M. 1990. **Physiology of the bacterial cell.** Sinauer Associates.
149. Morrison, D. C. and Jacobs, D. M. 1976. **Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides.** *Immunochemistry.* 13: 813.
150. Hirschfeld, M., Kirschning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M. and Weis, J. J. 1999. **Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2.** *J Immunol.* 163: 2382.
151. Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R. T., Medzhitov, R., Fikrig, E. and Flavell, R. A. 2002. **Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice.** *Nat Med.* 8: 878.
152. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S. 2001. **Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6.** *Int Immunol.* 13: 933.
153. Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. and Liautard, J. P. 2002. **The innate immune response against *Brucella* in humans.** *Vet Microbiol.* 90: 383.
154. Ahmed, K., Al-Matrouk, K. A., Martinez, G., Oishi, K., Rotimi, V. O. and Nagatake, T. 1999. **Increased serum levels of interferon-gamma and interleukin-12 during human brucellosis.** *Am J Trop Med Hyg.* 61: 425.
155. Gorvel, J. P. and Moreno, E. 2002. ***Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication.** *Vet Microbiol.* 90: 281.
156. Giambartolomei, G. H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C. A. and Philipp, M. T. 2004. **Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*.** *J Immunol.* 173: 4635.
157. Colonna, M., Pulendran, B. and Iwasaki, A. 2006. **Dendritic cells at the host-pathogen interface.** *Nat Immunol.* 7: 117.
158. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. 2000. **Immunobiology of dendritic cells.** *Annu Rev Immunol.* 18: 767.
159. Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. and Medzhitov, R. 2001. **Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.** *Nat Immunol.* 2: 947.
160. Reis e Sousa, C. 2001. **Dendritic cells as sensors of infection.** *Immunity.* 14: 495.
161. Hertz, C. J., Kiertcher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D. and Modlin, R. L. 2001. **Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2.** *J Immunol.* 166: 2444.

162. Macedo, G. C., Magnani, D. M., Carvalho, N. B., Bruna-Romero, O., Gazzinelli, R. T. and Oliveira, S. C. 2008. **Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection.** *J Immunol.* 180: 1080.
163. Billard, E., Dornand, J. and Gross, A. 2007. **Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells.** *Infect Immun.* 75: 5916.
164. Billard, E., Dornand, J. and Gross, A. 2007. ***Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion.** *Infect Immun.* 75: 4980.
165. Cheadle, E. J., Selby, P. J. and Jackson, A. M. 2003. ***Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism.** *Immunology.* 108: 79.
166. Henderson, R. A., Watkins, S. C. and Flynn, J. L. 1997. **Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Immunol.* 159: 635.
167. Hanekom, W. A., Mendillo, M., Manca, C., Haslett, P. A., Siddiqui, M. R., Barry, C., 3rd and Kaplan, G. 2003. ***Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro.** *J Infect Dis.* 188: 257.
168. Barrionuevo, P., Cassataro, J., Delpino, M. V., Zwerdling, A., Pasquevich, K. A., Garcia Samartino, C., Wallach, J. C., Fossati, C. A. and Giambartolomei, G. H. 2008. ***Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2.** *Infect Immun.* 76: 250.
169. Huang, L. Y., Ishii, K. J., Akira, S., Aliberti, J. and Golding, B. 2005. **Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9.** *J Immunol.* 175: 3964.
170. Rehli, M. 2002. **Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression.** *Trends Immunol.* 23: 375.
171. Shortman, K. and Liu, Y. J. 2002. **Mouse and human dendritic cell subtypes.** *Nat Rev Immunol.* 2: 151.
172. Edwards, A. D., Manickasingham, S. P., Sporri, R., Diebold, S. S., Schulz, O., Sher, A., Kaisho, T., Akira, S. and Reis e Sousa, C. 2002. **Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering.** *J Immunol.* 169: 3652.
173. Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. and Liu, Y. J. 2001. **Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.** *J Exp Med.* 194: 863.
174. Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A. and Sher, A. 2005. **TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Exp Med.* 202: 1715.

175. Berguer, P. M., Mundinano, J., Piazzon, I. and Goldbaum, F. A. 2006. **A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4.** *J Immunol.* 176: 2366.
176. Zwerdling, A., Delpino, M. V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K. A., Garcia Samartino, C., Fossati, C. A. and Giambartolomei, G. H. 2008. ***Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*.** *Microbes Infect.* 10: 1346.
177. Pecora, N. D., Gehring, A. J., Canaday, D. H., Boom, W. H. and Harding, C. V. 2006. ***Mycobacterium tuberculosis* LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function.** *J Immunol.* 177: 422.
178. Kelly, P. J., Martin, W. J., Schirger, A. and Weed, L. A. 1960. **Brucellosis of the bones and joints. Experience with thirty-six patients.** *Jama.* 174: 347.
179. Ibero, I., Vela, P. and Pascual, E. 1997. **Arthritis of shoulder and spinal cord compression due to *Brucella* disc infection.** *Br J Rheumatol.* 36: 377.
180. Gotuzzo, E., Alarcon, G. S., Bocanegra, T. S., Carrillo, C., Guerra, J. C., Rolando, I. and Espinoza, L. R. 1982. **Articular involvement in human brucellosis: a retrospective analysis of 304 cases.** *Semin Arthritis Rheum.* 12: 245.
181. Kasim, R. A., Araj, G. F., Afeiche, N. E. and Tabbarah, Z. A. 2004. ***Brucella* infection in total hip replacement: case report and review of the literature.** *Scand J Infect Dis.* 36: 65.
182. Press, J., Peled, N., Buskila, D. and Yagupsky, P. 2002. **Leukocyte count in the synovial fluid of children with culture-proven brucellar arthritis.** *Clin Rheumatol.* 21: 191.
183. Alba, D., Torres, E., Molina, F. and Vazquez, J. J. 1992. **[Neutrophilic pleocytosis in *brucella* meningitis].** *Med Clin (Barc).* 99: 478.
184. Miranda, R. T., Gimeno, A. E., Rodriguez, T. F., de Arriba, J. J., Olmo, D. G. and Solera, J. 2001. **Acute cholecystitis caused by *Brucella melitensis*: case report and review.** *J Infect.* 42: 77.
185. Zengi, A., Elmas, F., Tasbakan, M., Basoglu, O. K. and Ozhan, M. H. 2006. **Exudative pleural effusion due to brucellosis in a patient with chronic obstructive pulmonary disease.** *Trop Doct.* 36: 253.
186. Edwards, S. W. and Hallett, M. B. 1997. **Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis.** *Immunol Today.* 18: 320.
187. Sabroe, I., Dower, S. K. and Whyte, M. K. 2005. **The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis.** *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 7: S421.
188. Hayashi, F., Means, T. K. and Luster, A. D. 2003. **Toll-like receptors stimulate human neutrophil function.** *Blood.* 102: 2660.
189. Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M. and Witko-Sarsat, V. 2008. **The role of neutrophils and monocytes in innate immunity.** *Contrib Microbiol.* 15: 118.
190. Babior, B. M. 1984. **The respiratory burst of phagocytes.** *J Clin Invest.* 73: 599.

191. Forehand, J. R., Pabst, M. J., Phillips, W. A. and Johnston, R. B., Jr. 1989. **Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium.** *J Clin Invest.* 83: 74.
192. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. and Mantovani, A. 1992. **Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.** *Blood.* 80: 2012.
193. Power, C. P., Wang, J. H., Manning, B., Kell, M. R., Aherne, N. J., Wu, Q. D. and Redmond, H. P. 2004. **Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity: regulatory roles for CD14 and TLR-2.** *J Immunol.* 173: 5229.
194. Kreutzer, D. L., Dreyfus, L. A. and Robertson, D. C. 1979. **Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*.** *Infect Immun.* 23: 737.
195. Riley, L. K. and Robertson, D. C. 1984. **Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes.** *Infect Immun.* 46: 224.
196. Haslett, C., Lee, A., Savill, J. S., Meagher, L. and Whyte, M. K. 1991. **Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators.** *Chest.* 99: 6S.
197. Khateeb, M. I., Araj, G. F., Majeed, S. A. and Lulu, A. R. 1990. ***Brucella* arthritis: a study of 96 cases in Kuwait.** *Ann Rheum Dis.* 49: 994.
198. Liu, H. and Pope, R. M. 2004. **Apoptosis in rheumatoid arthritis: friend or foe.** *Rheum Dis Clin North Am.* 30: 603.
199. Liu, H. and Pope, R. M. 2004. **Phagocytes: mechanisms of inflammation and tissue destruction.** *Rheum Dis Clin North Am.* 30: 19.
200. Pluskota, E., Soloviev, D. A., Szpak, D., Weber, C. and Plow, E. F. 2008. **Neutrophil apoptosis: selective regulation by different ligands of integrin alphaMbeta2.** *J Immunol.* 181: 3609.
201. Zwerdling, A., Delpino, M. V., Pasquevich, K. A., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Garcia Samartino, C. and Giambartolomei, G. H. 2009. ***Brucella abortus* activates human neutrophils.** *Microbes Infect.* 11: 689.
202. Ocon, P., Reguera, J. M., Morata, P., Juarez, C., Alonso, A. and Colmenero, J. D. 1994. **Phagocytic cell function in active brucellosis.** *Infect Immun.* 62: 910.
203. Garcia-Carrillo, C. **Laboratory animal models for brucellosis studies,** . In: *Animal Brucellosis.* Nielsen, K. 1990. p. 423. CRC Press.
204. Galanakis, E., Makis, A., Bourantas, K. L. and Papadopoulou, Z. L. 2002. **Interleukin-3 and interleukin-4 in childhood brucellosis.** *Infection.* 30: 33.
205. Cruz, A. R., Moore, M. W., La Vake, C. J., Eggers, C. H., Salazar, J. C. and Radolf, J. D. 2008. **Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes.** *Infect Immun.* 76: 56.

206. Kim, S., Watarai, M., Makino, S. and Shirahata, T. 2002. **Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions.** *Microb Pathog.* 33: 225.
207. Naroeni, A. and Porte, F. 2002. **Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages.** *Infect Immun.* 70: 1640.
208. Triantafilou, M., Morath, S., Mackie, A., Hartung, T. and Triantafilou, K. 2004. **Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane.** *J Cell Sci.* 117: 4007.
209. Chain, P. S., Comerci, D. J., Tolmasky, M. E., Larimer, F. W., Malfatti, S. A., Vergez, L. M., Agüero, F., Land, M. L., Ugalde, R. A. and Garcia, E. 2005. **Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*.** *Infect Immun.* 73: 8353.
210. Neyrolles, O., Gould, K., Gares, M. P., Brett, S., Janssen, R., O'Gaora, P., Herrmann, J. L., Prevost, M. C., Perret, E., Thole, J. E. and Young, D. 2001. **Lipoprotein access to MHC class I presentation during infection of murine macrophages with live mycobacteria.** *J Immunol.* 166: 447.
211. Zhang, H., Niesel, D. W., Peterson, J. W. and Klimpel, G. R. 1998. **Lipoprotein release by bacteria: potential factor in bacterial pathogenesis.** *Infect Immun.* 66: 5196.
212. Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M. T., Liu, P. T., Sharfstein, S. E., Graeber, T. G., Sieling, P. A., Liu, Y. J., Rea, T. H., Bloom, B. R. and Modlin, R. L. 2005. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** *Nat Med.* 11: 653.
213. Sabroe, I., Prince, L. R., Dower, S. K., Walmsley, S. R., Chilvers, E. R. and Whyte, M. K. 2004. **What can we learn from highly purified neutrophils?** *Biochem Soc Trans.* 32: 468.
214. Wang, M., Qureshi, N., Soeurt, N. and Splitter, G. 2001. **High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of *Brucella abortus* in macrophages.** *Microb Pathog.* 31: 221.