

Tesis Doctoral

Diferentes estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mediadas por *Brucella abortus*

Velásquez, Lis N.

2016-03-02

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:

Velásquez, Lis N.. (2016-03-02). Diferentes estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mediadas por *Brucella abortus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Velásquez, Lis N.. "Diferentes estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mediadas por *Brucella abortus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-02.

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 Química Biológica

Diferentes estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mediadas por *Brucella abortus*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Lis N. Velásquez

Directora de Tesis: **Dra. Paula Barrionuevo**

Consejera de Estudios: **Dra. Verónica García**

Lugar de Trabajo: **Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina.**

Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, Hospital de Clínicas

“José de San Martín”, Facultad de Medicina, UBA.

Buenos Aires, 2016

Diferentes estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de histocompatibilidad mediadas por *Brucella abortus*

Resumen

Brucella abortus es un patógeno intracelular capaz de establecer una infección crónica a pesar de generar vigorosas respuestas T CD4⁺ y CD8⁺. No obstante, los mecanismos que permiten la supervivencia de este patógeno en presencia de poderosas respuestas de linfocitos T no habían sido explorados. Nuestros resultados demuestran que la infección de monocitos/macrófagos humanos con *B. abortus* disminuye la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-II y MHC-I en superficie. Como consecuencia, los macrófagos infectados presentan disminuida capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, respectivamente. Sin embargo, la estrategia empleada por *B. abortus* en cada caso difiere notablemente. En cuanto a MHC-I, demostramos que la inhibición depende de bacterias metabólicamente activas y reside en la capacidad de *B. abortus* para retener dichas moléculas dentro del aparato de Golgi. Además, la neutralización de la vía del receptor de EGF revirtió de manera parcial la inhibición de MHC-I y esto indica que ligandos del receptor de EGF podrían ser los mediadores solubles de este fenómeno. En cuanto a MHC-II, demostramos que *B. abortus* directamente inhibe su expresión proteica al inhibir la transcripción inducida por IFN- γ de los genes de MHC-II y del transactivador de clase II (CIITA). Demostramos también que *B. abortus* induce la transcripción de las proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS)-1 y -3. Finalmente, observamos que si bien *B. abortus* no es capaz de modificar la fosforilación de STAT-1, inhibe la expresión de la proteína IRF-1, esencial para la correcta inducción de la transcripción de CIITA. En conclusión, *B. abortus* orquesta estrategias notablemente diferentes para evadir las robustas respuestas adaptativas T CD4⁺ y CD8⁺ que provoca, previniendo el reconocimiento por estas células y promoviendo una infección crónica.

Palabras clave: *Brucella abortus*; monocitos; MHC-I; MHC-II; mecanismos de evasión.

Different strategies to inhibit major histocompatibility complex molecules expression employed by *Brucella abortus*

Abstract

Brucella abortus is an intracellular pathogen capable of establishing a chronic infection despite eliciting vigorous CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. However, the mechanisms whereby this pathogen is able to survive in the presence of powerful T cell responses had not been elucidated. Our results demonstrate that infection of monocytes/macrophages with *B. abortus* down-modulates the IFN- γ -induced cell surface expression of MHC-I and MHC-II molecules. As a consequence, infected macrophages have a decreased capacity to present antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, respectively. Remarkably, the strategy employed by *B. abortus* in each case differs noticeably. In regards to MHC-I, we demonstrated that the inhibition depends on metabolically active viable bacteria and resides on the capacity of *B. abortus* to retain these molecules within the Golgi apparatus. Neutralization of the EGF receptor (EGFR) pathway resulted in partial recovery of MHC-I expression which indicates that EGF-like ligands could be the soluble mediators of this phenomenon. Concerning MHC-II, we demonstrated that *B. abortus* directly diminishes its protein expression by inhibiting the IFN- γ -induced transcription of MHC-II genes and the MHC-II transactivator (CIITA). Also, we demonstrated that *B. abortus* induces the transcription of the negative regulators of IFN- γ signalling, suppressors of cytokine signalling (SOCS)-1 and 3. Finally, we observed that even though *B. abortus* is not able to modify STAT-1 phosphorylation, it inhibits the protein expression of IRF-1, which is essential for the adequate induction of CIITA transcription. Overall, these results indicate that *B. abortus* orchestrates remarkably different strategies to evade the robust adaptive CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses it elicits, preventing the recognition by these cells and promoting a chronic infection.

Keywords: *Brucella abortus*; monocytes; MHC-I; MHC-II; evasion strategies.

AGRADECIMIENTOS

A **Paula**, porque no solamente fue la persona que me dirigió de manera excelente durante todo el transcurso de mi carrera científica, sino porque también me brindó su amistad y cariño. Siempre voy a estar agradecida por la gran oportunidad que tuve de formarme bajo la guía de una persona tan excepcional como ella.

A mis compañeras de equipo: **Ayelén y Aldana**, por la gran amistad que nos une y que me hace disfrutar todos los días de trabajo y por la ayuda mutua que nos brindamos.

A **Vic**, por siempre contestar a todas mis dudas y ayudarme todas y cada una de las veces que se lo pedí a lo largo de estos 5 años.

A **Guille**, por todos sus consejos a nivel científico, siempre relevantes y significativos, que me permitieron ir avanzando y mejorar en mi carrera.

A **toda la gente del laboratorio de Inmuno I de la Academia Nacional de Medicina**, por habernos integrado luego de la mudanza y porque ningún día es aburrido junto a Uds.

A **las chicas de laboratorio Satz**, por su amistad y por todos los lindos momentos que compartimos a lo largo de estos años.

A mis padres y mi tía Claudia, por quererme y darme su apoyo incondicional, por la fe que siempre tuvieron en mí y porque sin ellos no habría podido llegar hasta este lugar.

A mi hermana, por compartir sus experiencias, darme consejos y quererme incondicionalmente.

A mis amigos de la facu y de la vida porque siempre están para darme su apoyo y escucharme a pesar de que algunos no siempre entiendan de qué hablo.

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
BRUCELOSIS.....	4
ETIOLOGÍA	4
EPIDEMIOLOGÍA.....	6
FUENTES Y VÍAS DE INFECCIÓN	9
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	11
COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE <i>BRUCELLA SPP.</i>	11
BIOLOGÍA DE <i>BRUCELLA SPP.</i> Y TRÁFICO INTRACELULAR	14
RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>BRUCELLA SPP.</i>	16
<i>Inmunidad Innata</i>	16
<i>Inmunidad Adaptativa</i>	19
LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)	21
<i>Estructura y distribución de las MHC</i>	21
<i>Regulación de la expresión de las MHC</i>	23
<i>Funciones de las MHC</i>	25
<i>Procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos T</i>	26
LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN- γ	29
ESTRATEGIAS DE EVASIÓN INMUNE MEDIADAS POR <i>BRUCELLA ABORTUS</i>	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
PARTE I	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
RESULTADOS.....	42
La infección por <i>B. abortus</i> inhibe la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I en monocitos humanos	43
La infección con <i>B. abortus</i> inhibe la expresión en superficie de MHC-I inducida por agonistas de TLRs.....	44
La inhibición de la expresión de MHC-I depende de la viabilidad bacteriana.....	46
La infección con <i>B. abortus</i> inhibe la activación de los linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos	46
La infección con <i>B. abortus</i> no afecta la expresión génica ni la síntesis proteica de MHC-I	47
La infección con <i>B. abortus</i> induce la retención intracelular de las moléculas de MHC-I	48
La infección con <i>B. abortus</i> induce la retención intracelular de MHC-I en el aparato de Golgi	50
<i>Brucella abortus</i> se encuentra en vacuolas LAMP-2 ⁺ con múltiples membranas	51

Cepas mutantes de <i>B. abortus</i> incapaces de persistir en monocitos también inhiben la expresión en superficie de MHC-I inducida por IFN- γ	53
La inhibición de MHC-I ocurre a tiempos tempranos durante la infección.....	56
<i>B. abortus</i> inhibe la expresión de MHC-I tanto en células infectadas como en células no infectadas	57
La vía del receptor de EGF está involucrada en la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por <i>B. abortus</i>	59
Ligandos del EGFR son mediadores solubles involucrados en la regulación negativa de MHC-I mediada por <i>B. abortus</i>	61
DISCUSIÓN	63
PARTE II	71
MATERIALES Y MÉTODOS	72
RESULTADOS.....	78
<i>Brucella abortus</i> disminuye la expresión en superficie e intracelular de las moléculas de MHC-II maduras inducida por IFN- γ	79
La inhibición de la expresión de moléculas de MHC-II maduras mediada por <i>B. abortus</i> no es debida a una acumulación de moléculas inmaduras	81
La disminución en los niveles proteicos totales de MHC-II inducida por la infección con <i>B. abortus</i> correlaciona con una disminución en la transcripción de HLA-DR y CIITA ..	84
Las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> son el componente bacteriano involucrado en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II	86
La IL-6 participa en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II	87
<i>B. abortus</i> y sus lipoproteínas inducen la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 a través de la secreción de IL-6 pero no previenen la fosforilación de STAT1.....	89
Las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> inhiben la expresión de MHC-II a través de un mecanismo independiente de SOCS-3	91
<i>B. abortus</i> inhibe la expresión de IRF-1, un factor crítico para la inducción de CIITA ...	92
DISCUSIÓN	94
DISCUSIÓN GENERAL.....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	103

Abreviaturas

Ac/s	Anticuerpo/s
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag/s	Antígeno/s
APC	Células presentadoras de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	American type culture collection
BCV	Vacuola que contiene a <i>Brucella</i> o Brucelosoma
CIITA	Transactivador de clase II
CLIP	Péptido derivado de la cadena invariante
DCs	Células dendríticas
dsRNA	Ácido ribonucleico doble cadena
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Fc γ RI	Receptor para la porción Fc de IgG tipo I
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAS	Sitio de activación para IFN- γ (Gamma activation site)
h	Hora/s
HKBA	<i>Brucella abortus</i> muerta por calor (Heat Killed <i>Brucella abortus</i>)
HLA	Human Leukocyte Antigens
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Ii	Cadena invariante
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de propidio
IRF	Factor regulatorio del IFN
ISRE	Elemento de respuesta al estímulo con IFN- γ
LB	Linfocito B
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
MAPK	Kinasas de proteínas activadas por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos

MO	Médula ósea
MOI	Multiplicidad de infección
NFκB	Factor de transcripción nuclear κB
NK	Células citotóxicas naturales
NLRCS	NOD-, LRR-and CARD-containing 5 o CITA, transactivador de clase I
Omp/s	Proteína/s de la membrana externa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridina Clorofil Proteína
PPD	Mycobacterial purified protein derivative
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RE	Retículo endoplasmático
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
SOCS	Supresores de la señalización de citoquinas
ssRNA	Ácido ribonucleico simple cadena
TACE	Enzima convertidora de TNF-α
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante (Transforming Growth Factor)
Th1	T “helper” 1
TLR/s	Receptor/es tipo TOLL
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response)

INTRODUCCIÓN

BRUCELOSIS

La brucelosis es una infección zoonótica de distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella* [1]. Esta enfermedad afecta al hombre y a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos. Su presentación en humanos está íntimamente relacionada con la enfermedad en animales domésticos [2]. 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 genere cuantiosas pérdidas económicas tanto en la industria agropecuaria como en la salud pública [3]. En la Argentina, la enfermedad es endémica a pesar de contar con un Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y las pérdidas económicas anuales se han estimado en US\$ 60.000.000 [4].

La brucelosis humana posee un amplio espectro clínico y se caracteriza por presentar una gran tendencia a la cronicidad, la cual se asocia a recaídas sucesivas a partir de una forma aguda o a manifestaciones focales. Los pacientes infectados con *Brucella* spp. pueden presentar distintas manifestaciones clínicas, las cuales varían dependiendo del estadio de la enfermedad, y los órganos y sistemas involucrados. Los síntomas más comunes son fiebre continua, intermitente o irregular, de duración variable (10 a 30 días), cefalea, fatiga, diaforesis, mialgias, pérdida de peso, anorexia y malestar generalizado. El examen físico es inespecífico, siendo la hepatomegalia y/o esplenomegalia el hallazgo más frecuente junto con adenopatías. En cuanto a las complicaciones debidas a la focalización de la enfermedad, estas se evidencian por infecciones supurativas de diferentes órganos o sistemas. La complicación más común corresponde a la enfermedad osteoarticular, la cual se puede presentar como artritis, espondilitis, sacroileítis u osteomielitis. El segundo sitio de focalización más común es el sistema genitourinario, donde se puede presentar en el hombre como orquitis o epididimitis. La infección adquirida durante el embarazo constituye un riesgo de aborto espontáneo. Otras manifestaciones pueden ser meningitis y astrogliosis (sistema nervioso central), hepatitis granulomatosa y difusa (a nivel hepático) y endocarditis (sistema cardiovascular), entre otras [1, 2].

ETIOLOGÍA

Las especies del género *Brucella* pertenecen a la clase α -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae [5]. El género *Brucella* está compuesto por cocobacilos Gram negativos pequeños, aerobios estrictos y de crecimiento lento. No poseen cápsulas ni flagelos, tampoco forman esporas y pueden sobrevivir en medio bacteriológico o en el medio ambiente aunque su nicho preferencial es el intracelular [6]. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está compuesto por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos [7]. La única excepción dentro del género lo constituye la biovariedad 3 de *B. suis* que cuenta con un único cromosoma de gran tamaño [8].

El género *Brucella* es un género en expansión. Históricamente constaba de 6 especies clásicas clasificadas de acuerdo a variaciones antigénicas y a su hospedador preferencial. Estas eran: *B.*

melitensis, *B. suis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. canis* y *B. ovis*. Actualmente también se reconocen biovariedades dentro de las 3 especies clásicas más importantes: *B. abortus* cuenta con 8, *B. melitensis* con 3 y *B. suis* posee 5 biovariedades [6]. Las primeras nuevas incorporaciones al género correspondieron a especies aisladas de animales marinos: *B. pinnipedialis* y *B. ceti* [9]. En 2008 se reportaron otras 2 nuevas especies: *B. microti*, aislada en un primer momento de ratones salvajes [10] y luego encontrada también en zorros rojos [11] y como contaminante en el suelo [12], y *B. inopinata*, la cual fue aislada de un implante mamario infectado de una mujer de 71 años con síntomas de brucelosis [13, 14]. A su vez, también se aisló la cepa de *Brucella* BO2 de un paciente con enfermedad pulmonar crónica y se determinó que tiene una gran similitud a *B. inopinata* [15]. Finalmente, en el año 2014 se estableció una nueva especie aislada a partir de crías nacidas muertas de mandriles, *B. papionis* [16]. En los últimos años, se han logrado secuenciar la mayoría de los genomas de las especies de *Brucella* y esto permitió demostrar que el género es altamente homogéneo. Los genomas de las 6 especies clásicas de *Brucella* tienen una homología mayor al 90% [6].

De las especies clásicas de *Brucella* sólo 4 son patógenas para el hombre: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. De ellas, las tres primeras son responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana [1, 17, 18]. En los últimos años también se reconoció el potencial zoonótico de las especies marinas y su aparente tendencia a las formas complicadas de la enfermedad como la neurobrucelosis [19, 20]. Por otra parte, *B. inopinata* fue aislada de un caso humano si bien no se conoce su reservorio natural ni su ecología (Tabla 1) [13, 14].

Las especies de *Brucella* se clasifican generalmente como lisas (S) o rugosas (R), de acuerdo al aspecto de las colonias que forman en medio sólido (Tabla 1). Estas diferencias en el fenotipo de la colonia se deben a diferencias en la composición química del lipopolisacárido (LPS) expresado en la superficie bacteriana. Además, existe una relación entre el tipo de colonia y la virulencia; las cepas lisas son más virulentas [21].

	ESPECIE	HOSPEDADOR PREFERENCIAL	NIVEL DE PATOGENICIDAD EN HUMANOS
Especies Lisas (S)	<i>B. melitensis</i>	Caprinos, ovinos, camélidos	Elevada. Causa más común de brucelosis humana.
	<i>B. abortus</i>	Bovinos, camélidos, búfalos, bisontes	Moderada. Segunda causa más común de brucelosis humana.
	<i>B. suis</i>	Porcinos, jabalíes, renos, caribúes, roedores	Moderada. En ascenso, con cazadores de jabalíes en riesgo.
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	No reportada
	<i>B. pinnipedae</i>	Focas, lobos marinos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	<i>B. cetaceae</i>	Delfines, focénidos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	<i>B. microti</i>	Roedores salvajes	No reportada
	<i>B. inopinata</i>	Desconocido	Aislada de un caso humano
	<i>B. papionis</i>	Mandriles	No reportada
Especies Rugosas (R)	<i>B. ovis</i>	Ovinos	No reportada
	<i>B. canis</i>	Caninos	Moderada. En ascenso en particular en Sudamérica

Tabla 1. Características de las especies del género *Brucella* [18, 22, 23].

EPIDEMIOLOGÍA

La brucelosis es considerada como la zoonosis bacteriana más común a nivel mundial con 500.000 nuevos casos por año [24]. La incidencia y prevalencia de la enfermedad en humanos varía geográficamente y además se encuentra en constante cambio debido a razones sanitarias, socioeconómicas y políticas, sumado a un aumento de los viajes internacionales (Figura 1) [3].

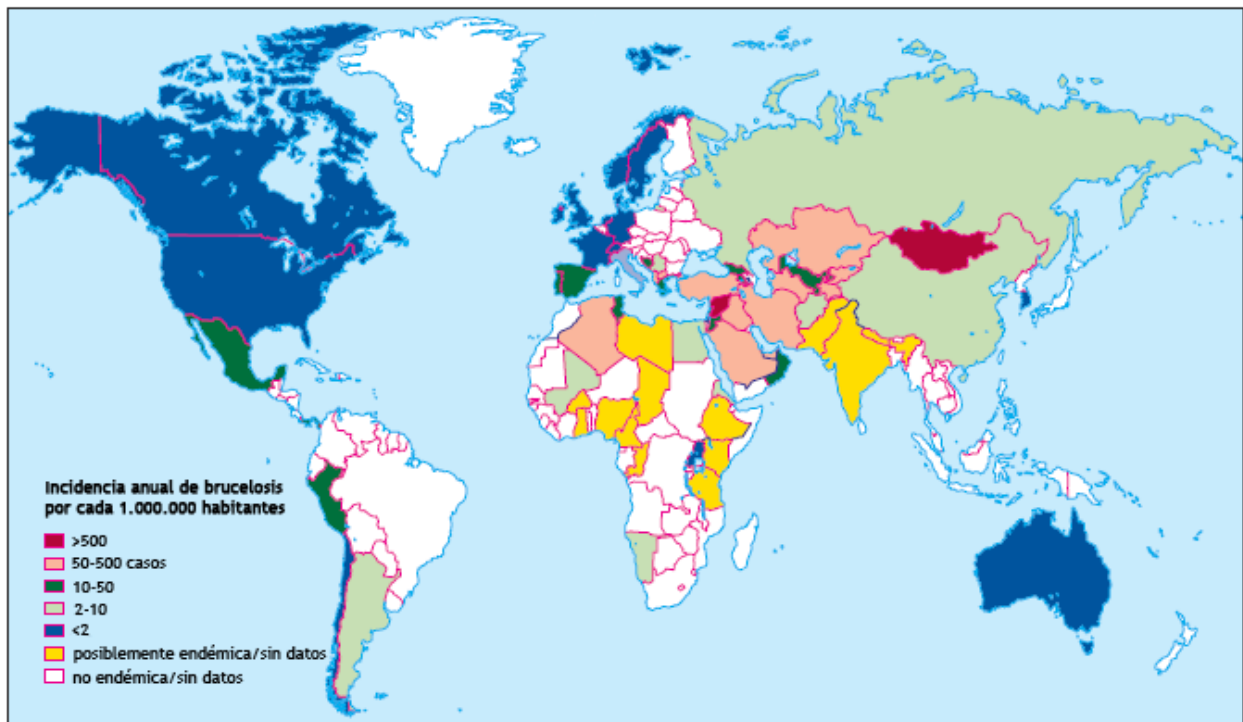


Figura 1. Mapa global de la incidencia de brucelosis humana, modificado de [24].

Históricamente las zonas de mayor prevalencia eran el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica [24]. Sin embargo, el mapa global de brucelosis ha cambiado significativamente en los últimos años. Entre los viejos focos endémicos, los países europeos del Mediterráneo han logrado reducir la incidencia de la enfermedad considerablemente. Francia fue declarada libre de la enfermedad en animales en 2005, mientras que el número de casos en España, Portugal y Grecia disminuye cada año. De manera similar, en Latinoamérica la incidencia en este momento es bastante baja, a excepción de México y Perú que continúan reportando una cantidad considerable de casos anualmente. Al contrario, países del Norte de África incluyendo Egipto presentan grandes problemas de endemia, mientras que el reconocimiento de la enfermedad en África subsahariana ha aumentado recientemente [18]. Por su parte, la situación en países del Medio Oriente está empeorando rápidamente. Siria continúa siendo el país con la mayor incidencia anual mundial y el número de casos reportados se duplica cada año. La incidencia en países como Turquía sigue siendo muy alta y la enfermedad aún es endémica en Irak y Afganistán, aunque las estadísticas oficiales estén subvaloradas y los esfuerzos para controlarla sean difíciles en parte por la guerra y la escasez de recursos [24].

Simultáneamente, han emergido dos grandes focos hiperendémicos: países del centro de Asia pertenecientes a la ex Unión Soviética y países de la península Balcánica. Armenia, Azerbaiyán, Georgia, Kirguistán, Uzbekistán, Tayikistán y Turkmenistán junto con Mongolia, otro país dentro de esta región, se encuentran dentro de los 25 países con mayor incidencia a nivel mundial [24]. La re-emergencia de la brucelosis en estas naciones se asoció al colapso de la infraestructura administrativa, económica y de

salud pública luego de la caída de la URSS (Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas) [17]. El otro nuevo foco endémico lo constituyen los países balcánicos. La enfermedad se ha esparcido en esta región y ha llegado a países previamente libres de brucelosis como Bulgaria. Sin embargo, el principal foco de la enfermedad se encuentra en Albania y Macedonia, mientras que Bosnia-Herzegovina ha visto un aumento dramático en el número de casos anuales [18]. Además de los focos de los países de la ex unión Soviética y la península Balcánica, nuevos focos de brucelosis son continuamente reportados, aún en los lugares menos pensados como por ejemplo Corea del Sur [25].

Últimamente, también se han reportado casos de re-emergencia de la enfermedad. En este apartado se encuentra por ejemplo China. En este país, la incidencia de la brucelosis era bastante severa hasta los años 1980 a partir del cual comenzó a mermar. Sin embargo, a mediados de los años 90 comenzaron a aumentar nuevamente los casos reportados por año y esta situación continúa hasta el presente. La distribución geográfica de los casos también varió desde las provincias del norte del país hacia las del sur [24, 26].

Actualmente solo unos pocos países han sido declarados libres de la enfermedad en animales, lo cual es determinante para la presencia de la enfermedad en humanos. Entre ellos se encuentran Francia, el Reino Unido, los países escandinavos, los Países Bajos, Bélgica, Austria, Suiza, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Sin embargo, la vigilancia en estos países debe ser continua, ya que por ejemplo se reportaron dos brotes de brucelosis bovina en Francia en 2012 [27]. La incidencia anual en ciertos países como Estados Unidos y Chile también ha alcanzado niveles realmente bajos, y solamente está relacionada al contagio de personas que viajaron a zonas endémicas [24].

Cabe destacar que, si bien en varios países los casos de brucelosis humana deben ser notificados a las autoridades sanitarias locales, la enfermedad está sub-reportada y los números oficiales constituyen sólo una fracción de la verdadera incidencia de la enfermedad. Las razones de esto se asocian a la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad. Por lo tanto, la incidencia real de la brucelosis es desconocida [3]. Por otra parte, muchos países no cuentan con estadísticas formales en cuanto a la enfermedad [24].

En la Argentina, la brucelosis humana está altamente relacionada con la enfermedad en animales. En nuestro país se conoce la infección por *B. abortus* (ganado bovino), *B. ovis* (ganado ovino), *B. melitensis* (ganado caprino) y en menor medida, *B. suis* (cerdos) y *B. canis* (perros) [28]. En cuanto a la brucelosis bovina, un estudio realizado en 2014 reveló una prevalencia animal del 0,8% y una prevalencia de predios del 12,35% para la zona de mayor producción bovina (Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Corrientes, La Pampa, San Luis, parte de Formosa, Santiago del Estero y Chaco) (Fuente: Programa de Brucelosis Senasa). La continua presencia de la enfermedad en animales constituye un foco de peligro constante para la población. En nuestro país los casos de brucelosis en humanos deben ser notificados y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Dirección de Epidemiología del

Ministerio de Salud de la Nación informa semanalmente los casos detectados por provincia y regiones sanitarias. El mayor pico de la enfermedad fue registrado en el año 1997 con 687 casos, a partir de ese punto la incidencia comenzó a descender hasta llegar en 2005 a los 300 casos por año en todo el país [28]. En los años subsiguientes el número de casos reportados fue variable pero continuó con la misma tendencia decreciente (Figura 2).

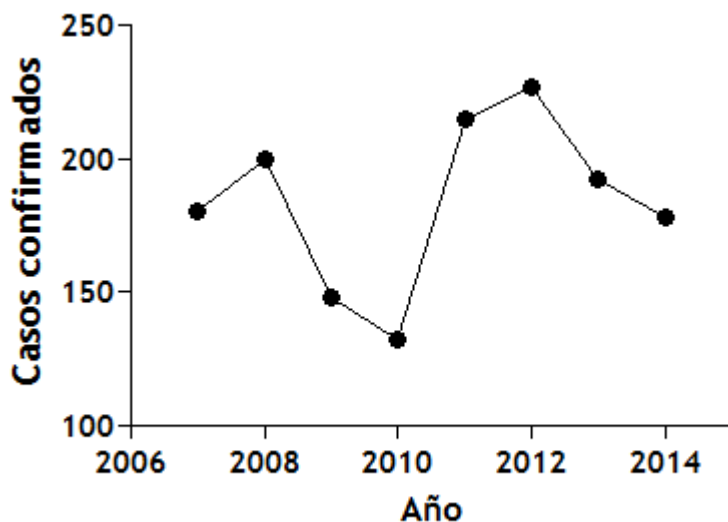


Figura 2. Incidencia de la brucelosis humana en Argentina. Fuente: Boletín integrado de Vigilancia.

A pesar de estos datos, nuevamente se debe reforzar el concepto de que las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas. Se estima que la verdadera incidencia de la enfermedad sería de 10 a 25 veces más alta que la indicada [28]. En este contexto, los esfuerzos para el control de la enfermedad deben ser constantes.

FUENTES Y VÍAS DE INFECCIÓN

La principal fuente de infección para humanos 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 las mucosas de las vías respiratoria y digestiva, aunque también pueden ingresar por abrasiones presentes en la piel (Tabla 2) [2, 29]. 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 [30].

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 [2].

En países en los cuales la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente. Sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual [31].

VÍA DE TRANSMISIÓN	PUERTA DE ENTRADA	FUENTE DE INFECCIÓN	POBLACIÓN EN RIESGO
Contacto	Piel erosionada, conjuntiva, mucosa nasal	Tejidos animales o personas infectadas o sus productos como ganglios, sangre, orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados y placentas	Trabajadores de la industria de la carne, veterinarios, peones de campo, personal de laboratorio o de servicios de salud
Ingestión	Mucosa digestiva	Alimentos no pasteurizados de origen animal como leche y sus derivados, y en menor medida carnes poco cocidas (la carga bacteriana en el tejido muscular es baja)	Población en general
Inhalación	Mucosa nasal	Aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en lugares contaminados como establos, mataderos, salas de recepción de leche, lanas, etc	Personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos
Inoculación	Parenteral o endovenosa por transfusiones	Vacunas vivas, material biológico contaminado	Personal de laboratorio, veterinarios, población en general
Perinatal	Vía transplacentaria o mucosas	Tejidos maternos infectados, leche materna	Fetos

Tabla 2. Distintas vías de infección de *Brucella spp.* en el hombre y las poblaciones susceptibles [2].

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Dada la naturaleza cambiante y el amplio espectro de manifestaciones clínicas que presenta la brucelosis humana su diagnóstico 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 contempla dos opciones: ambas incluyen la administración de doxiciclina (100 mg) durante 6 semanas, combinada con estreptomina (750 mg) durante 2 a 3 semanas, o rifampicina (600-900 mg) durante 6 semanas. Otros antimicrobianos que se pueden utilizar en combinación con los anteriores incluyen: trimetoprima-sulametoxazol o quinolonas [2, 32].

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 [33]. No existe hasta el momento una vacuna para humanos.

COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA Y ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE *BRUCELLA SPP.*

Al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, las bacterias del género *Brucella* poseen una envoltura celular, la cual está formada por una membrana interna y una membrana externa (ME), las cuales delimitan un espacio periplásmico intermedio. Éste espacio contiene componentes solubles y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (Figura 3) [34].

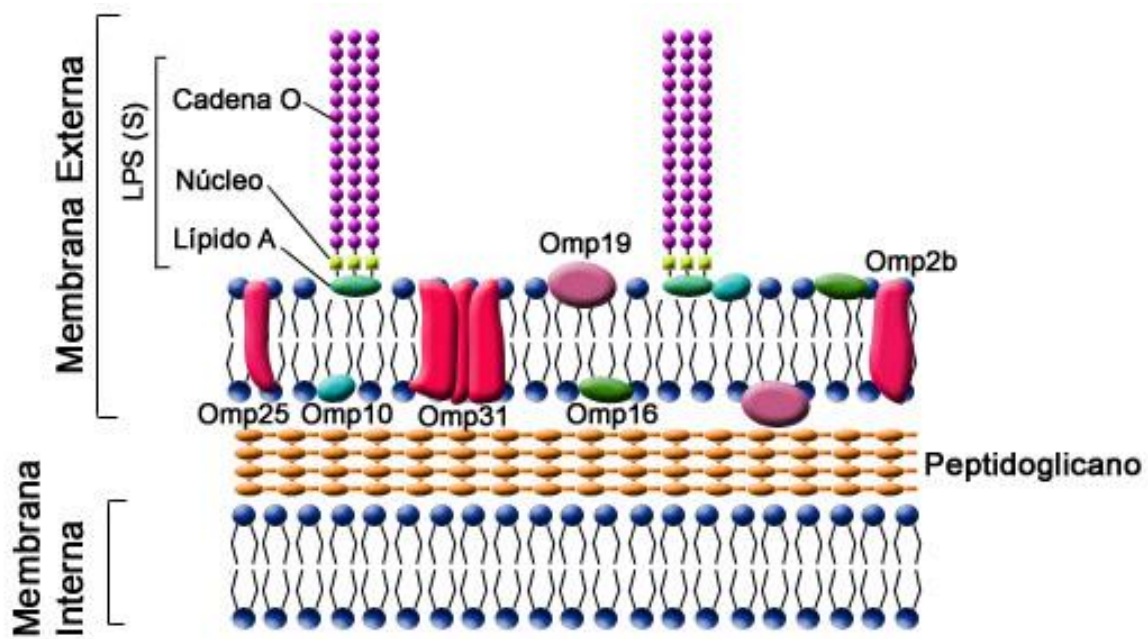


Figura 3. Esquema representativo de la membrana de las especies lisas de *Brucella* spp.

La ME de *Brucella* contiene proteínas, fosfolípidos y un lipopolisacárido (LPS), considerado como el principal antígeno en las bacterias Gram negativas [35]. El LPS es una molécula anfipática que consta de una parte exclusivamente polisacárida dirigida hacia el exterior, y otra parte glucolípida (lípido A) inserta en la ME, y por lo tanto no expuesta a la superficie. La parte polisacárida del LPS se divide en dos secciones: un oligosacárido intermedio, llamado núcleo; y la cadena O. Esta última es la estructura antigénica más expuesta de la bacteria, la cual está ausente en el LPS de cepas rugosas (LPS-R).

Las bacterias del género *Brucella* poseen un LPS atípico en comparación con el clásico LPS de las enterobacterias como *Escherichia coli* [36]. La estructura básica del lípido A está formada por un disacárido 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa (diaminoglucosa) unido en configuración β 1-6, y también por ácidos grasos saturados de cadena larga ligados mediante uniones éster o amida ($C_{16:0}$ a $C_{18:0}$) e hidroxilados (3-OH- $C_{12:0}$ a 29-OH- $C_{30:0}$). Se encuentra inmerso en la capa lipídica actuando como soporte o unión del resto de la molécula a la superficie bacteriana. El lípido A de *Brucella*, a diferencia del lípido A de la mayoría de las enterobacterias se caracteriza por su alta hidrofobicidad, su bajo grado de sustitución y por poseer cadenas alifáticas más largas [37]. El núcleo está compuesto por glucosa, manosa, 2-amino-2,6-dideoxi-D-glucosa (quinovosamina), 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (glucosamina), ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y otros azúcares aún no identificados. La cadena O de las cepas lisas es un homopolímero no ramificado compuesto por 4,6-dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo unidos en configuración α -1,2 usualmente con una longitud de cadena media de 96 a 100 subunidades glicosílicas (Figura 4) [38]. Las moléculas de LPS de las especies clásicas de *Brucella* se caracterizan también por su heterogeneidad a nivel, no sólo de la cadena O, sino también a nivel del

núcleo y del lípido [39]. Asimismo, se describió la presencia de moléculas de LPS atípicas en las nuevas especies de *Brucella* emergentes en particular a nivel de los epítopes antígenicos dominantes A y M [23].

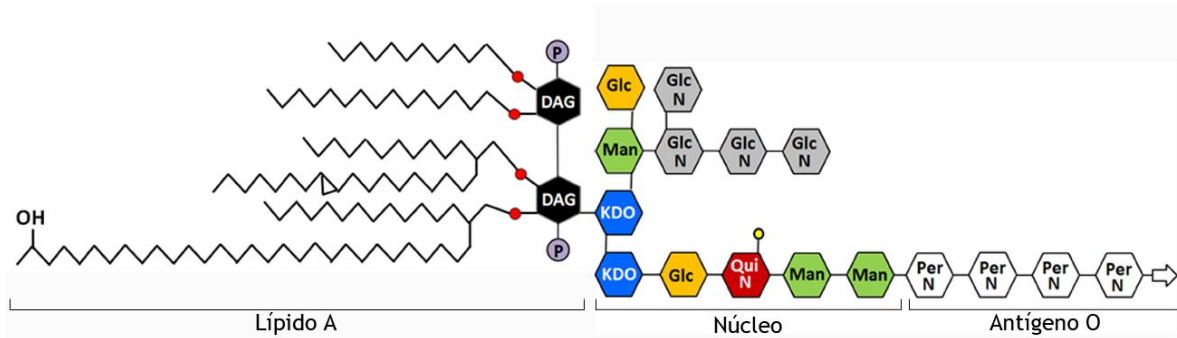


Figura 4. Estructura del LPS de las especies lisas de *Brucella*, modificado de [40].

Asociadas al LPS y formando parte de la membrana se encuentran proteínas de la membrana externa (Omps), muchas de las cuales han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional [41]. Estas proteínas se han dividido en 3 grupos de acuerdo a su peso molecular: grupo 1 (88 o 94 kDa); grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) [42]. Las Omps del grupo 2 fueron clasificadas como porinas y lipoproteínas que tienen semejanza a la lipoproteína de Braun de *E. coli* [43]. A su vez, las proteínas de los grupos 2 (Omp2a y Omp2b) y 3 (Omp25 y Omp31) 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 (Omp19, Omp16 y Omp10), son denominadas Omps “menores” [34]. 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 (Figura 3) [44]. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas [45, 46].

Además de las diferencias en cuanto a su LPS, existen diferencias sutiles pero notables en cuanto a la ME de las bacterias del género *Brucella* con respecto a las de otras Proteobacterias Gram negativas [47]. En varios estudios se reportó la incapacidad de extraer la envoltura celular de *Brucella* por los métodos estándares y también se determinó que estas bacterias son sensibles al uso de medios estándares utilizados para otras bacterias Gram negativas. La ME de *Brucella* tiene la tendencia a generar evaginaciones (“blebs”) espontáneas las cuales contienen componentes de la superficie celular y del espacio periplásmico [48]. A su vez, la ME de *Brucella* forma una bicapa más estable comparada a la de otras bacterias Gram negativas, debido tal vez a una mayor presencia del lípido fosfatidilcolina en la composición de su ME en comparación a fosfatidiletanolamina en otras bacterias Gram negativas. Los ácidos grasos en *Brucella* tienden a tener cadenas de acilos más largas por lo cual se propuso un modelo de membrana más extenso que el de bacterias Gram negativas convencionales [34]. Las interacciones entre las proteínas de la membrana externa (Omp; Outer membrane protein) de *Brucella* y los otros componentes de la ME también tienden a ser más hidrofóbicas que en otras bacterias Gram negativas. A su vez, las Omps de *Brucella* poseen un dominio hidrofóbico que les permite la interacción con la capa de

peptidoglicano y la superficie [49]. Por otra parte, se propuso que una porción de las Omps de *Brucella* podría estar covalentemente anclada a la capa de peptidoglicano [50, 51]. Si bien la inactivación de *Brucella* por calor causa el colapso de la membrana interna, la ME mantiene su morfología intacta lo que sugiere que la ME de *Brucella* posee una mayor rigidez en comparación a la de otras bacterias Gram negativas [47]. Debido a las características del LPS, sustratos hidrofóbicos fácilmente permean la ME de *Brucella* [43, 52]. Además, su resistencia a los policationes también le confiere resistencia a los sistemas bactericidas independientes del oxígeno de los fagocitos [53, 54].

BIOLOGÍA DE *BRUCELLA SPP.* Y TRÁFICO INTRACELULAR

Las bacterias de este género se comportan como patógenos intracelulares facultativos capaces de sobrevivir y replicar dentro de células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas (DCs). La principal vía de ingreso son las membranas mucosas del tracto respiratorio e intestinal, luego las bacterias se diseminan a tejidos preferenciales por medio de un tropismo celular, por ejemplo, hacia las células trofoblásticas placentarias en hembras embarazadas, al pulmón fetal, al sistema reticuloendotelial y al tracto reproductivo [1, 55, 56]. Si bien se considera que el nicho intracelular preferencial de las bacterias son las células fagocíticas y los trofoblastos placentarios, también son capaces de infectar otros tipos celulares como células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, células estrelladas hepáticas, linfocitos B y T y células del sistema nervioso [57-64].

Los mecanismos de ingreso de la bacteria a todos estos tipos celulares no han sido del todo investigados. Sin embargo, el tráfico intracelular en células epiteliales y macrófagos ha sido intensamente estudiado en los últimos años. En cuanto a los hallazgos obtenidos en células epiteliales, *Brucella* induce un mecanismo de tipo cremallera (“zipper-like”) para su internalización. La entrada ocurre a los pocos minutos de la interacción con la superficie de las células epiteliales y requiere de la activación de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [65]. *Brucella* sobrevive y replica dentro de células fagocíticas no-profesionales por hasta 72 h *in vitro* y se mueve a través del epitelio *in vivo* evadiendo la función de barrera epitelial para facilitar la migración transepitelial de las bacterias [56, 66].

En cuanto a las células macrofágicas, las cepas lisas de *Brucella* entran a través de sitios en la membrana celular ricos en colesterol conocidos como “lipid rafts” o microdominios lipídicos [67]. Se han propuesto dos receptores a través de los cuales los macrófagos internalizan a *Brucella*: el receptor Scavenger de clase A (SR-A) que interactúa con el LPS y la proteína celular priónica (PrPC), la cual se une a la molécula Hsp60 presente en la superficie bacteriana [68]. Sin embargo, el rol de este último receptor aún es controversial ya que otro estudio contradujo su participación en la entrada de *B. suis* y *B. abortus* en células macrofágicas [69]. De cualquier manera, tanto en células epiteliales como en macrófagos se sabe que *Brucella* se une a receptores de superficie que contienen ácido siálico y residuos sulfatados

[57]. Este mecanismo de entrada a través de “lipid rafts” pareciera ser clave para la supervivencia de las bacterias en los macrófagos infectados, ya que la disrupción farmacológica de los “lipid rafts” lleva a una fagocitosis independiente de los mismos y a la posterior eliminación de todas las bacterias fagocitadas [67]. Por su parte, cepas rugosas mutantes generadas por ingeniería genética a partir de cepas lisas virulentas ingresan de manera independiente de “lipid rafts”, no son capaces de reducir la activación del macrófago y son subsecuentemente eliminadas [70-72]. Por lo tanto, se había propuesto al antígeno O como esencial para dictar el destino intracelular y posterior supervivencia de las bacterias. Sin embargo, las cepas rugosas naturales *B. canis* y *B. ovis* también ingresan de manera dependiente de “lipid rafts”, lo cual se contrapone a esta aseveración [73]. En el caso de bacterias opsonizadas, éstas ingresan dentro de los macrófagos a través de receptores Fc para IgG y por lo tanto, de manera independiente de “lipid rafts”. A pesar de esto, tanto las bacterias opsonizadas como las no opsonizadas son capaces de replicar si bien la naturaleza del compartimiento replicativo donde residen es distinta [74]. La opsonización permite el ingreso de más bacterias dentro de las células pero a la vez, disminuye su capacidad de crecimiento intracelular [75, 76].

Una vez dentro de las células macrofágicas, estos microorganismos residen en una vacuola denominada vacuola conteniendo a *Brucella* (BCV) o “brucellosoma”, la cual interactúa con las vías endocítica y secretorias para asegurar la supervivencia bacteriana. El BCV recién formado interactúa con endosomas tempranos y adquiere marcadores como el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) y la proteína de unión a GTP Rab5 [77-79]. Estas interacciones ocurren inmediatamente luego de la internalización y son transitorias. 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 [80].

El BCV luego adquiere marcadores endocíticos tardíos/lisosomales como Rab7 y su efector la proteína lisosomal que interactúa con Rab (RILP), LAMP-1 y CD63. Los eventos de fusión con endosomas tardíos/lisosomas son limitados y controlados. Sin embargo, tanto estas interacciones como también la acidificación del BCV son importantes para la correcta maduración del compartimiento replicativo [81]. La disminución del pH del BCV facilita la expresión de genes que son necesarios para la supervivencia y división intracelular de *Brucella*. El factor de virulencia más importante que se induce por la acidez del medio es el sistema de secreción tipo IV VirB, el cual está codificado por los genes *virB1-virB12* presentes en el cromosoma II [82, 83]. Este aparato de secreción es esencial para la supervivencia de *Brucella* dentro de macrófagos y células epiteliales ya que mutantes que carecen de cualquiera de los genes *virB* son incapaces de replicar intracelularmente [82, 84, 85].

Después de su paso por endosomas tardíos, el BCV se asocia al retículo endoplasmático (RE) rugoso y la replicación de las bacterias tiene lugar en BCVs que contienen una única bacteria y sus

membranas cargadas de ribosomas [79]. El BCV es capaz de interceptar vesículas membranosas que trafican hacia el aparato de Golgi, provenientes de los sitios de salida del RE [86, 87]. La cooptación de membranas y componentes del RE por parte del BCV se acompaña de una fuerte reorganización tanto estructural como funcional del RE [79].

Por último, el BCV adquiere características autofágicas y vuelve a entrar en la vía endocítica para completar su ciclo de vida intracelular. En esta etapa, el BCV vuelve a ser positivo para el marcador LAMP-1, envuelve a varias bacterias a la vez y posee múltiples membranas. La formación de este BCV autofágico es necesaria para promover la liberación de las bacterias y contribuir a la infección de células adyacentes (Figura 5) [88].

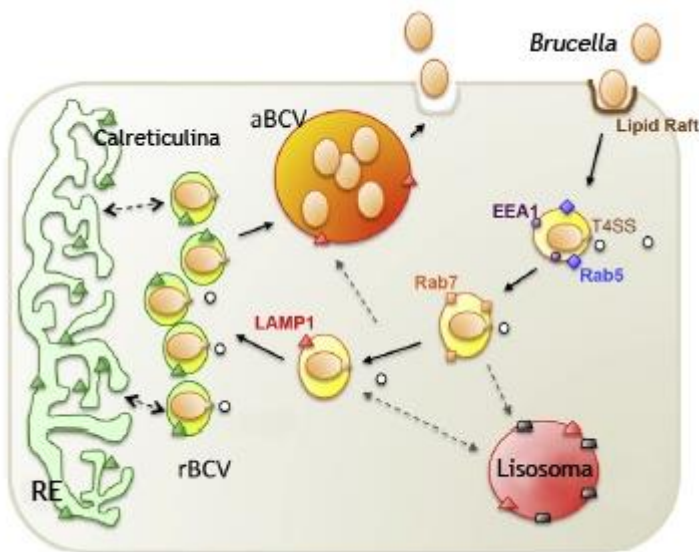


Figura 5. Tráfico intracelular de *Brucella* spp. en células macrofágicas, modificado de [56]. rBCV: BCV replicativo; aBCV: BCV autofágico; T4SS: sistema de secreción tipo IV.

RESPUESTA INMUNE CONTRA *BRUCELLA* SPP.

Inmunidad Innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos invasivos. Dentro de sus componentes se incluyen barreras anatómicas (la piel y epitelios internos), moléculas secretorias (citoquinas y quemoquinas, el sistema del complemento y distintas opsoninas) y poblaciones celulares tales como los fagocitos (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas (DCs)), y las células linfoides innatas (células natural killer (NK) y células T $\gamma\delta$).

Las células del sistema inmune innato contribuyen a controlar las infecciones, no sólo por su rol como células efectoras, sino también porque inician y dirigen la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil funcional determinado. En particular, los linfocitos T $CD4^+$ pueden diferenciarse en distintos perfiles (Th1, Th2, Th17 y Treg, entre otros), los cuales se caracterizan por la producción de diferentes citoquinas y median diferentes funciones inmunitarias. Las principales células que realizan esta tarea son los macrófagos y las células dendríticas, a través de su habilidad de producir mediadores pro-

inflamatorios (IL-12, IL-23, etc) y expresar determinadas moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86, CD40, etc) [89].

En estadios tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es prevenir la replicación y reducir el número inicial de bacterias promoviendo un ambiente adecuado para generar una respuesta adaptativa robusta. Los macrófagos, las DCs, los neutrófilos y el complemento participan con distintos roles en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo [90].

Células innatas

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la inmunidad frente a *Brucella*. Como fue mencionado anteriormente, el nicho preferencial de *Brucella* son las células fagocíticas, en particular los macrófagos. Estas células cumplen un papel dual en la infección frente a *Brucella*: por un lado, permiten la replicación y supervivencia de las bacterias durante las etapas tempranas de la infección; no obstante, en los estadios tardíos y, en particular una vez que se estableció la inmunidad adaptativa, los macrófagos activados son los principales responsables de la eliminación de *Brucella*. Esta actividad bactericida es inducida principalmente por el interferón gamma (IFN)- γ , y en segundo lugar por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α y reside en la capacidad de estas células de realizar el estallido respiratorio mediante la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno [91, 92].

Por su parte, las DCs humanas y murinas son susceptibles a la infección por *Brucella* [93-95]. A su vez, en nuestro laboratorio demostramos que la infección con *B. abortus* induce la expresión de las moléculas CD86, CD80, CCR7, CD83, MHC-II, MHC-I y CD40 en DCs, como también la secreción de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12. No sólo eso, sino que las lipoproteínas de la membrana externa de *B. abortus* serían las que inducen la maduración de estas células generando una respuesta de tipo Th1 [96].

En cuanto a las células NK, *in vitro* se demostró que el co-cultivo de estas células con macrófagos infectados con *B. suis* activa a estas células para producir IFN- γ y TNF- α y destruir dichos macrófagos [97]. Las células NK también parecen ser importantes para la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos [98]. A pesar de estos antecedentes, estas células no tendrían un rol crucial en el control de la brucelosis murina, ya que su depleción *in vivo* no afecta el curso de la infección en ratones [99] como así tampoco en humanos, donde se describió una disminuida actividad citotóxica por parte de células NK en pacientes con brucelosis aguda [100].

Finalmente, en nuestro laboratorio demostramos que *B. abortus* es capaz de activar neutrófilos humanos y prolongar su sobrevivencia *in vitro*. Este efecto también es mediado por las lipoproteínas de la membrana externa de *Brucella* y estaría asociado a la patogénesis de la brucelosis ya que contribuiría al daño tisular e inflamación localizada características de la enfermedad [101]. El rol de los neutrófilos en el control de la brucelosis *in vivo* también es controversial. En primer lugar, se demostró que estas células no parecieran tener un rol significativo en la eliminación de *Brucella* en las etapas tempranas de la

infección en ratones [102] y por otra parte, la depleción de neutrófilos permite la eliminación de las bacterias de manera más eficiente durante los estadios tardíos de la enfermedad [103].

Citoquinas, quemoquinas y receptores de la inmunidad innata

Durante las etapas tempranas de la infección con *Brucella* una de las primeras citoquinas en ser secretada es el TNF- α [75, 104]. Macrófagos activados por TNF- α son capaces de inhibir la replicación *in vitro* de *Brucella* [75] y además, esta citoquina junto con la IL-12 están directamente involucradas en la resistencia a la brucelosis murina [105, 106]. El rol de la IL-12 también es de clara importancia, no sólo porque esta citoquina juega un rol preponderante en la inducción de una respuesta de tipo Th1 con la consecuente producción de IFN- γ , sino porque esplenocitos provenientes de ratones depletados de IL-12 tienen una menor capacidad de generar el estallido respiratorio [105]. Asimismo, también ha sido reportada la secreción de IL-6, IL-1 β e IL-10 durante las primeras etapas de la infección [104, 107, 108]. Más allá de dichas citoquinas, tanto macrófagos como DCs infectados son capaces de producir quemoquinas en respuesta a la infección con *Brucella*, entre ellas MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, Gro- α e IL-8 [71, 109].

Esta 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). Existen diferentes clases funcionales de PRR, la mejor caracterizada comprende a los receptores de tipo Toll (TLRs), receptores transmembrana que censan diversos productos microbianos [110]. El rol de los TLRs en la resistencia contra la infección por *Brucella* ha sido intensamente estudiado durante estos últimos años. El TLR2 no parecería tener un rol preponderante en el control de la infección con *B. abortus* en ratones *in vivo* [111, 112]. A pesar de esto, la señalización a través de este receptor contribuye a la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células inmunes innatas [104, 112, 113]. En contraposición, se demostró el requerimiento de TLR9 para la eliminación de *B. abortus* en ratones infectados y, a diferencia del anterior, ejercería un papel fundamental en el control de la infección [114]. Por otra parte, se han reportado resultados controversiales en la literatura con respecto a TLR4. Mientras algunos autores muestran que el receptor TLR4 sería esencial para controlar la infección [111], otros muestran que si bien la secreción de TNF- α durante la infección depende de TLR4, este receptor no sería necesario para la eliminación del patógeno [112]. Por último, ratones deficientes en el adaptador MyD88, (MyD88^{-/-}), común a todos los receptores de tipo TLR menos TLR3, son muy susceptibles a la infección con *Brucella* [112, 114, 115]. 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 *Brucella* [114].

Existen otros receptores de la inmunidad innata capaces de reconocer y montar una respuesta frente a patógenos intracelulares. Recientemente se han reportado distintos roles tanto de los

receptores tipo NOD (NLRs) y los inflamasomas [116] como de los IFN de tipo I y el receptor IFN- $\alpha\beta$ R [117] en la infección con *B. abortus*.

Inmunidad Adaptativa

A pesar de todos los componentes y mecanismos de la inmunidad innata que se activan frente a la infección con *B. abortus*, estos no siempre son suficientes para su erradicación y es absolutamente necesario el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que combata a la infección [92].

Se han identificado 3 mecanismos de la respuesta inmune adaptativa esenciales para 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 las bacterias [118-121]; segundo, la citotoxicidad T CD8⁺ y $\gamma\delta$ puede destruir al macrófago infectado [122-126]; y por último, los isotipos de Acs de tipo Th1 como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan su fagocitosis [127, 128].

Células T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺

Los antígenos de *B. abortus* son capaces de ser presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, y de esta manera activar tanto a células T CD4⁺ como T CD8⁺ [122, 129, 130]. La mayoría de los estudios señala a las células T CD4⁺ como las principales productoras de IFN- γ [107, 108, 118], aunque también hay producción de esta citoquina por parte de linfocitos T CD8⁺, $\gamma\delta$ y células NK [131].

La infección con *B. abortus* genera una poderosa inducción hacia el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 [92, 132]. La importancia de las células Th1 en la respuesta frente a *Brucella* se determinó en primer lugar en el modelo murino. Diversos estudios demostraron que ratones deficientes en elementos clave de la respuesta Th1 como el IFN- γ o la IL-12 eran más susceptibles a la infección, y asimismo se determinó que la administración de estas citoquinas de manera exógena favorecía el desarrollo de una respuesta protectora en dichos ratones [105, 118, 121]. Más aún, estudios en pacientes con brucelosis también señalan la importancia del desarrollo de una respuesta de tipo Th1 para combatir la infección, ya que existe una correlación entre disminuidas respuestas Th1 y recaídas o estadios crónicos de la enfermedad [133-136] así como una asociación entre determinados polimorfismos o mutaciones genéticas que afectan a este tipo de respuesta y una mayor susceptibilidad a la brucelosis [137].

Las células T CD8⁺ no sólo contribuyen a la respuesta frente a *Brucella* mediante la secreción de IFN- γ , sino que su función principal es la de eliminar células infectadas mediante la interacción Fas-FasL o la secreción de perforinas y granzimas [122-124]. Además de las células T CD8⁺ citotóxicas, recientemente se ha descrito el potencial citotóxico de las células T CD4⁺ frente a *B. abortus* en ratones [138].

Células T $\gamma\delta$

Las células T $\gamma\delta$ también cumplirían una importante función en la inmunidad frente a *Brucella*. El número de células T V γ 9V δ 2 aumenta en sangre periférica de pacientes con brucelosis aguda y declina luego de un tratamiento exitoso [139, 140]. Por otra parte, ratones deficientes en células T $\gamma\delta$ poseen una aumentada susceptibilidad a la infección con *B. abortus*, lo cual se relacionó a una falla en la inmunidad innata desarrollada por estos ratones frente a dichas bacterias, lo que sugeriría que la función protectora de estas células transcurre durante los estadios tempranos de la enfermedad [125]. Asimismo, células T $\gamma\delta$ activadas por Ags no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares debido a que 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 serían capaces de lisar a las células infectadas, ya sea por contacto directo o de manera indirecta a través de la secreción de un factor bactericida, la catelicidina LL-37 [141, 142].

Respuesta humoral

La contribución de la inmunidad humoral en la respuesta frente a la brucelosis no ha sido del todo esclarecida. Tempranamente en la infección aparecen anticuerpos (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 [143]. Desde el punto de vista clínico, la detección de Acs dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, y seguimiento de la infección [144]. En ratones se observó un cierto nivel de protección conferido por Acs contra la cadena O del LPS de *Brucella* [145-147]. No obstante, si bien la opsonización de las bacterias por Acs aumenta su fagocitosis y por lo tanto, disminuye el nivel inicial de infección, la naturaleza intracelular de *Brucella* hace que este efecto sea limitado y que de cualquier manera progrese la enfermedad [74]. Asimismo, un estudio reciente demostró que células B murinas pueden establecerse como un nicho intracelular para *B. abortus* opsonizadas por IgM o el complemento [63].

Citoquinas

Una de las citoquinas de mayor relevancia en la infección por *Brucella* es el IFN- γ . Dicha molécula tiene un rol central en la inmunidad frente a *Brucella* principalmente mediante la activación de las funciones bactericidas del macrófago, la inducción de la expresión de moléculas de MHC y co-estimuladoras en las células presentadoras de antígenos profesionales (CPAs), la estimulación de la citotoxicidad por parte de células T citotóxicas y la potenciación de la muerte de los macrófagos infectados [132]. Como ya fue mencionado anteriormente, la importancia del IFN- γ en la resolución de la infección por *Brucella* fue demostrada en estudios con ratones deficientes en el gen de esta citoquina. Estos ratones mueren 6 semanas después de la infección con *B. abortus* [120]. 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 [148]. Otros estudios han sugerido que la activación con IFN- γ impide que *Brucella* establezca su nicho replicativo y que, por lo tanto, si las bacterias ya están localizadas intracelularmente, el IFN- γ no tiene efecto alguno [80]. La producción temprana durante la infección de una citoquina inmunomoduladora como IL-10 podría explicar en parte este fenómeno [149].

LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) está constituido por un conjunto de genes que codifican para la expresión de moléculas involucradas en el reconocimiento de lo ajeno, en su mayoría presentes en la superficie celular. Este complejo existe en todos los vertebrados superiores y se caracteriza por ser altamente polimórfico y poligénico. En el ser humano se denominada HLA (Human Leukocyte Antigens) y se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 6. Su principal función es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T. Si bien existen 3 clases de genes, solamente los productos de los genes de clase I y de clase II, las moléculas de MHC-I y de MHC-II, están involucradas en la presentación antigénica a células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente [89].

Estructura y distribución de las MHC

Las moléculas de MHC son glucoproteínas de membrana que comparten en líneas generales su estructura tridimensional. Esta similitud se basa en que ambas moléculas poseen 4 dominios extracelulares que se pliegan de manera similar. Los dominios más alejados de la membrana plasmática se pliegan de tal modo que crean un surco alargado capaz de albergar un péptido, cuya longitud varía según se trate de moléculas de MHC-I o MHC-II (Figura 6).

Las moléculas de MHC-I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente, una llamada α de aproximadamente 340 aminoácidos y un peso molecular de 42-44 kD y una cadena pequeña no polimórfica de 12 kD (99 aminoácidos), denominada β 2-microglobulina (Figura 6). Esta última no se encuentra codificada dentro del MHC. La cadena α se divide en tres dominios proteicos globulares de 90 aminoácidos cada uno, expuestos hacia el exterior de la célula. El que contiene el extremo N-terminal se denomina α 1 y junto con el α 2 determinan el sitio de unión al péptido o sitio de presentación antigénica; el dominio α 3 es el que se encuentra más cercano a la membrana. La cadena pesada continúa con un tramo de 40 aminoácidos hidrofóbicos que atraviesa la membrana y termina en una cola citoplasmática de 28 aminoácidos hidrofílicos donde se encuentra el extremo C-terminal. Los dominios α 2, α 3 y la β 2-microglobulina tienen un puente disulfuro intracatenario que estabiliza la molécula.

Las moléculas de MHC-II también poseen dos cadenas, una α de 229 aminoácidos (32-34 kD) y una β de 237 aminoácidos (28-29 kD), unidas no covalentemente (Figura 6). En este caso ambas se

encuentran codificadas dentro del MHC. Cada una de estas cadenas posee dos dominios globulares externos, un segmento transmembrana de 21 residuos hidrofóbicos y una cola citoplasmática de longitud variable según el producto, entre 8-18 aminoácidos, que contiene el extremo C-terminal. Los dominios más externos de las cadenas α y β se denominan α_1 y β_1 respectivamente, y son los involucrados en la presentación del antígeno. De la misma manera, a los dominios más cercanos a la membrana se los conoce como α_2 y β_2 . Los dominios α_2 , β_1 y β_2 se encuentran estabilizados por puentes disulfuro intracatenarios.

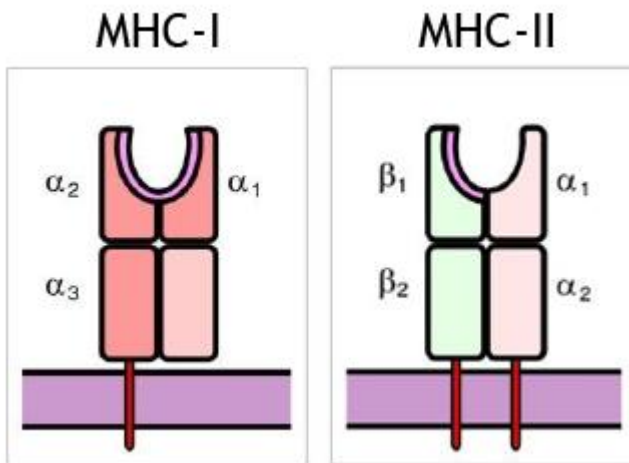


Figura 6. Estructura de las moléculas de MHC-I y MHC-II, modificado de [89].

En el hombre existen tres moléculas de MHC-I distintas, HLA-A, HLA-B y HLA-C (también denominadas moléculas de MHC-I clásicas), que cumplen la función de presentación de péptidos a los linfocitos T CD8⁺. Las tres se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células nucleadas, con excepción de los glóbulos rojos, el sincicio trofoblasto y las neuronas. La cadena α de cada una de estas moléculas está codificada dentro del MHC por un gen diferente (el A para HLA-A, el B para HLA-B y el C para HLA-C), pero todas comparten la misma cadena β 2-microglobulina. La expresión de estas moléculas en la superficie de las células es codominante, es decir, se expresan simultáneamente las moléculas codificadas por el cromosoma materno y paterno. El elevado polimorfismo poblacional existente dentro de estos genes determina que la mayoría de los individuos sean heterocigotas y exhiban en la superficie celular seis productos de clase I diferentes: dos moléculas HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C.

Existen varias moléculas de MHC-II diferentes que se expresan simultáneamente en la superficie celular, y su función es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T CD4⁺. En el ser humano, hay 3 grupos de genes que codifican para moléculas de MHC-II, los cuales se denominan HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Cada grupo de genes contiene al menos un gen que codifica para la cadena α (genes DRA, DQA1 y DPA1) y un gen para la cadena β (genes DRB1, DQB1 y DPB1). En el caso de DR existe más de un gen que codifica para la cadena β aunque todos comparten la misma cadena α . Aquí también los productos maternos y paternos se expresan codominantemente, por lo que, junto al polimorfismo del sistema, la

mayoría de los individuos exhiben al menos seis productos de clase II distintos. A esto además se le debe sumar el fenómeno de transasociación, por el cual las cadenas α de origen materno pueden asociarse con las cadenas β de origen materno como también con las cadenas β de origen paterno y viceversa. De esta manera, un individuo heterocigota puede llegar a expresar hasta 12 moléculas de MHC-II distintas. A diferencia de las moléculas de MHC-I, la distribución tisular de MHC-II es muy restringida, expresándose constitutivamente en la superficie de linfocitos B, monocitos y macrófagos, DCs, precursores eritroides y el epitelio tímico. Por otra parte, su expresión puede inducirse por IFN- γ en linfocitos T, células NK, células del endotelio vascular, queratinocitos, melanocitos, astrocitos y fibroblastos [89].

Regulación de la expresión de las MHC

El papel crucial que juegan las moléculas de MHC-I y MHC-II en el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa contra los patógenos invasores hace que el control de su expresión sea de extrema importancia para el organismo. En efecto, deficiencias en la expresión de las moléculas de MHC-II pueden causar inmunodeficiencias severas [150, 151], mientras que su expresión aberrante puede traer como consecuencia el desarrollo de enfermedades autoinmunes [152, 153].

Regulación de la expresión de las MHC-I

Los genes de clase I se expresan constitutivamente en casi todos los tejidos, con niveles altos en células linfoides, moderados en la mayoría de las células y bajos en otras como el hepatocito. Sin embargo, el nivel de expresión puede incrementarse por efecto de los IFN de tipo I (α y β) o el IFN- γ [89].

Existen varios elementos regulatorios actuando en *cis* a nivel de los promotores proximales de los genes de clase I. Los más importantes son: el enhancer A, el cual contiene sitios de unión para el factor nuclear κ B (NF- κ B); un elemento de respuesta al estímulo con IFN- γ (ISRE); y el módulo SXY, el cual está compuesto por las regiones W/S, X1, X2 e Y. La expresión constitutiva de las moléculas de MHC-I se debe principalmente a la unión de los factores de transcripción NF- κ B y Sp1 al enhancer A [89]. Por su parte, al elemento ISRE se unen miembros de la familia de los factores regulatorios del IFN (IRF), mientras que a las distintas regiones del módulo SXY se unen diferentes factores de transcripción (componentes del complejo RFX, CREB, ATF1 y las subunidades del factor NFY) y ensamblan un complejo multiproteico [154].

A pesar de la unión de todos estos factores de transcripción a los promotores de los genes de MHC-I se necesita de la presencia de un transactivador, es decir un factor de transcripción maestro, para la expresión de estas moléculas. Recientemente, se ha demostrado que un miembro de la familia de los receptores tipo NOD, el NLRC5 (NOD-, LRR-and CARD-containing 5, también llamado NOD27 y CLR16.1) cumple con este papel. NLRC5 tiene un rol crucial en la regulación *in vivo* e *in vitro* de la transcripción de MHC-I. Este factor se asocia y coopera con el complejo multiproteico ensamblado en el módulo SXY de

los promotores de MHC-I estabilizándolo y a su vez, actúa como una plataforma para las enzimas modificadoras de histonas que regulan la dinámica de la cromatina para permitir la transcripción de los genes de MHC-I (Figura 7) [154].

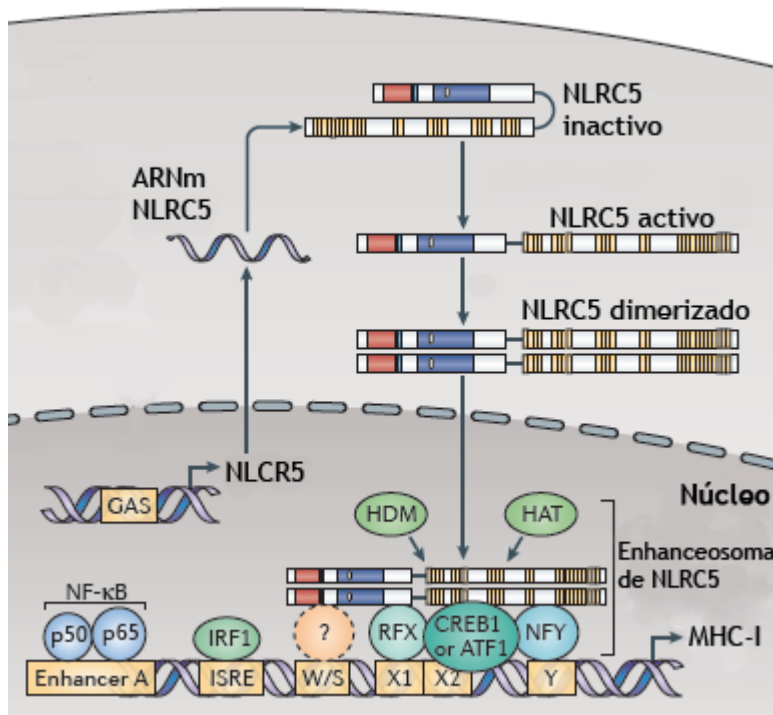


Figura 7. Factores de transcripción involucrados en la expresión de los genes de MHC-I, modificado de [154].

Regulación de la expresión de las MHC-II

Los genes de clase II se expresan en un número restringido de tejidos y su expresión en otros puede inducirse por diversas citoquinas, siendo la más potente el IFN- γ . Células endoteliales y fibroblastos pueden adquirir bajo el efecto del IFN- γ , la capacidad de presentar péptidos antigénicos. Otras citoquinas capaces de inducir la expresión de las moléculas de MHC-II son la IL-4 y la IL-13. Al contrario, la IL-10, el IFN- β y el TGF- β disminuyen su expresión [89].

A diferencia de lo que ocurre con los genes de MHC-I, los promotores proximales de los genes de MHC-II sólo contienen un módulo SXY (compuesto por las regiones W/S, X1, X2 e Y.). Esto hace que la expresión de estas moléculas sea absolutamente dependiente de este módulo y los factores que se unen a él. En este caso, y si bien los factores de transcripción que se unen al módulo SXY son iguales a los de MHC-I (componentes del complejo RFX, CREB, ATF1 y las subunidades del factor NFY), además se recluta un factor de transcripción maestro denominado el transactivador de clase II (CIITA). La expresión y unión de CIITA al complejo multiproteico ensamblado en el módulo SXY de los promotores de MHC-II es indispensable para su transcripción ya que este factor ayuda en la estabilización del complejo y a su vez actúa como una plataforma para el reclutamiento de varios co-activadores transcripcionales que modifican y remodelan la arquitectura de la cromatina que rodea a los promotores de MHC-II (Figura 8) [154].

La expresión de CIITA se encuentra restringida a las células que expresan MHC-II y su regulación se da principalmente a nivel transcripcional. El control de la expresión de CIITA es complejo, en parte ya que existen 3 promotores diferentes los cuales actúan de manera específica en un determinado tipo celular o en respuesta a un estímulo particular. Cada uno de estos promotores se asocia a la producción de una isoforma distinta de CIITA, las cuales difieren en su N-terminal. El promotor I (pI) es utilizado en DCs y lleva a la expresión de la isoforma más larga de CIITA de 132kDa. El promotor III (pIII) está involucrado en la producción de una isoforma de 124kDa, la cual se expresa principalmente en células de la línea linfocítica. En contraposición, el promotor IV (pIV) responde primordialmente al estímulo con IFN- γ y lleva a la producción de la isoforma más corta de CIITA de 121kDa en la mayoría de los tipos celulares. La respuesta al IFN- γ por parte de este último promotor se debe a la presencia de una región proximal que contiene un sitio de activación para IFN- γ (GAS), una secuencia E-box y un sitio de unión para IRF-1. A los dos primeros elementos se unen los factores de transcripción STAT1 y USF-1 respectivamente. Es necesario que los 3 sitios se encuentren ocupados por sus respectivos factores para que se dé la transcripción de CIITA. Dado que la síntesis de IRF-1 es a su vez inducida por IFN- γ , esto explicaría la demora en la inducción de CIITA por parte del IFN- γ (Figura 8) [155, 156].

De manera similar a lo que ocurre con los genes de MHC-II, la expresión de CIITA no es solamente inducida por IFN- γ , la IL-4 y el LPS también son capaces de hacerlo. En contraposición, su transcripción puede ser inhibida por el IFN- β , la IL-10, el óxido nítrico y el TGF- β [155].

CIITA también es reclutado a los factores ensamblados en el módulo SXY de los promotores de los genes de MHC-I y B2M. Sin embargo, este factor cumple un papel más bien secundario en la expresión de las moléculas de MHC-I, en particular en la inducida por IFN- γ [154].

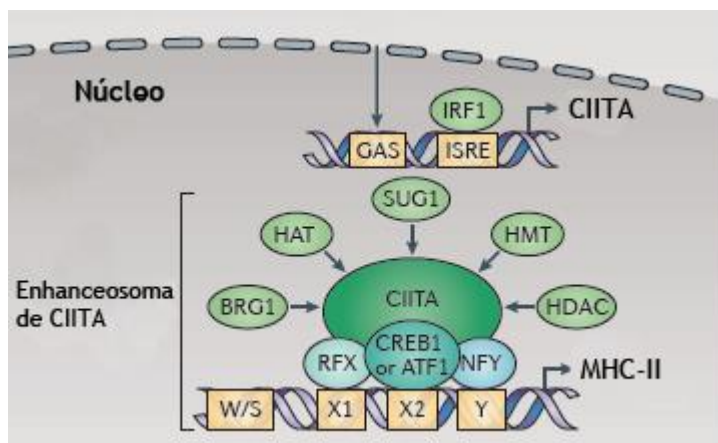


Figura 8. Factores de transcripción involucrados en la expresión de los genes de MHC-II, modificado de [154]

Funciones de las MHC

La principal función biológica de las moléculas del MHC es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T y de esta manera desencadenar algún tipo de respuesta inmune. Las moléculas de MHC-I

tienen además una segunda función, la cual es actuar como ligandos de los receptores expresados por las células NK.

El receptor T (TCR) interactúa con los dominios más externos y más polimórficos de las moléculas de histocompatibilidad y con el péptido. Las moléculas accesorias CD4 de los linfocitos T helper o CD8 de los linfocitos T citotóxicos, también están involucradas en el reconocimiento antigénico interactuando con los dominios más conservados de las moléculas de MHC-II y MHC-I respectivamente. Esta interacción estabilizaría el contacto célula T-célula presentadora de antígeno y jugaría un papel importante en la transducción de señales en el linfocito T (Figura 9) [89].

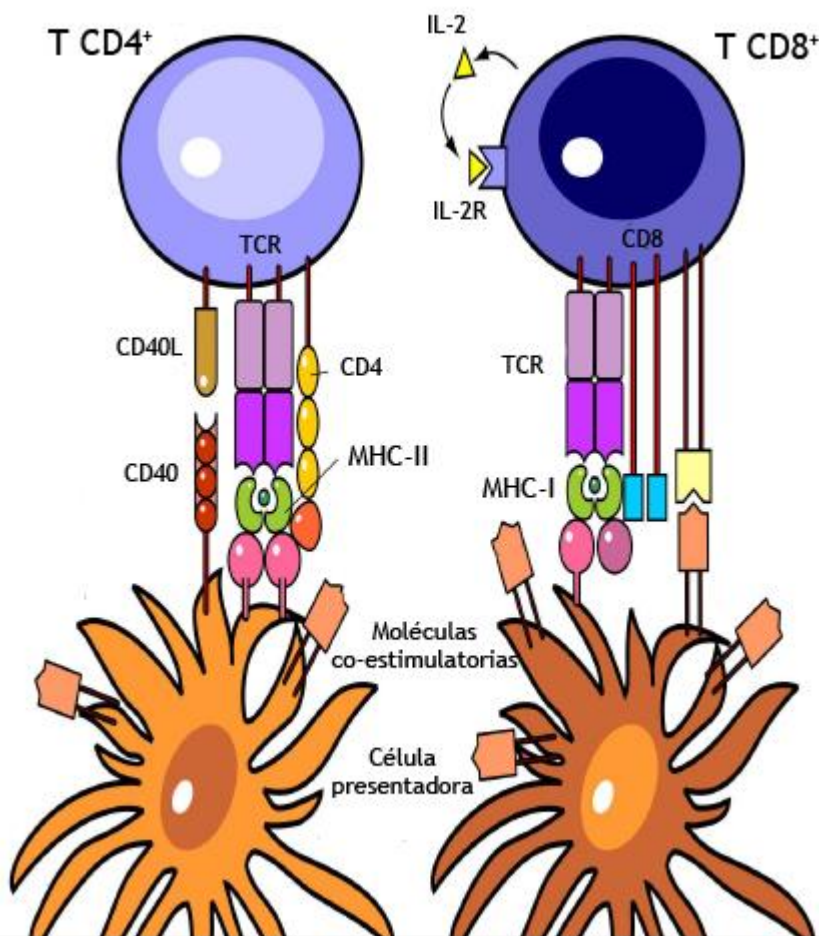


Figura 9. Interacción entre el receptor T y el complejo péptido-molécula de MHC-II o MHC-I, modificado de [89].

Procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos T

Para poder ser reconocidos por los linfocitos T, los antígenos proteicos primero deben ser procesados por las células presentadoras. Para este fin existen dos grandes vías: la vía endógena involucrada en la presentación de moléculas presentes en el citosol celular y la vía exógena involucrada en la presentación de moléculas provenientes del material endocitado por las células. La primera vía genera péptidos que son presentados por las moléculas de MHC-I para estimular células T CD8⁺ y la segunda presenta péptidos a través de las moléculas de MHC-II a células T CD4⁺.

A pesar de esta distinción, cabe destacar la importancia de la denominada presentación cruzada, a partir de la cual péptidos provenientes de proteínas endógenas pueden presentarse por moléculas de MHC-II e inducir la respuesta de linfocitos T CD4⁺, así como también antígenos endocitados pueden acceder al citosol, ser procesados por la vía endógena e inducir respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8⁺ [89].

Vía endógena o biosintética

Los péptidos unidos por las moléculas de MHC-I provienen de proteínas presentes en el citosol. Los antígenos que dan origen a estos péptidos son degradados por proteasomas, los cuales son complejos proteicos multicatalíticos. La mayoría de los péptidos son generados por el proteasoma 26S. Sin embargo, también se han descrito dos proteasomas alternativos: el inmunoproteasoma, el cual es expresado por varias células inmunes, y un proteasoma timo-específico expresado únicamente por las células epiteliales tímicas. Los péptidos resultantes son transportados al RE por proteínas transportadoras denominadas TAP. El transportador TAP es un heterodímero formado por los productos de los genes TAP1 y TAP2, cada uno tiene un dominio citosólico de unión a ATP y un dominio con siete segmentos transmembrana. El transporte de péptidos por TAP es dependiente de ATP.

Por su parte, las moléculas de MHC-I se encuentran dentro del RE. Dado que para su estabilidad es indispensable la unión del péptido antigénico, las moléculas de MHC-I recién sintetizadas se asocian a chaperonas presentes en el RE. Durante el proceso de plegamiento, en primer lugar la cadena α de la molécula de MHC-I se debe asociar con la subunidad β 2-microglobulina. Esta unión tiene como chaperona a la calnexina, que se mantiene unida hasta que el complejo heterodimérico es formado. El heterodímero cadena α - β 2-microglobulina luego se asocia con el complejo de carga peptídica, el cual está compuesto por la molécula de MHC-I naciente, las chaperonas calreticulina y ERp57, la tapasina y el complejo TAP. El complejo de carga peptídica asegura la correcta unión de los péptidos a las moléculas de MHC-I. Las moléculas correctamente plegadas y cargadas con el péptido salen del RE y son exportadas a la membrana celular atravesando el aparato de Golgi (Figura 10). Los heterodímeros que no se asocian inmediatamente con TAP o son cargados con un péptido inapropiado, no son exportados al Golgi y son degradados o reciclados para ser nuevamente cargados con péptidos [157].

Las moléculas de MHC-I no son residentes estáticos de la membrana plasmática. Estas moléculas son continuamente internalizadas por endocitosis. La familia de proteínas MARCH son una de las encargadas de este proceso, ya que son capaces de ubiquitinar a las moléculas de MHC-I. El destino de las MHC-I internalizadas puede variar, es decir, pueden ser recicladas nuevamente a la superficie celular o ser enviadas a su degradación. El primer proceso es importante para el fenómeno de presentación cruzada ya que dentro de los endosomas, las moléculas de MHC-I pueden interactuar con péptidos antigénicos exógenos [158].

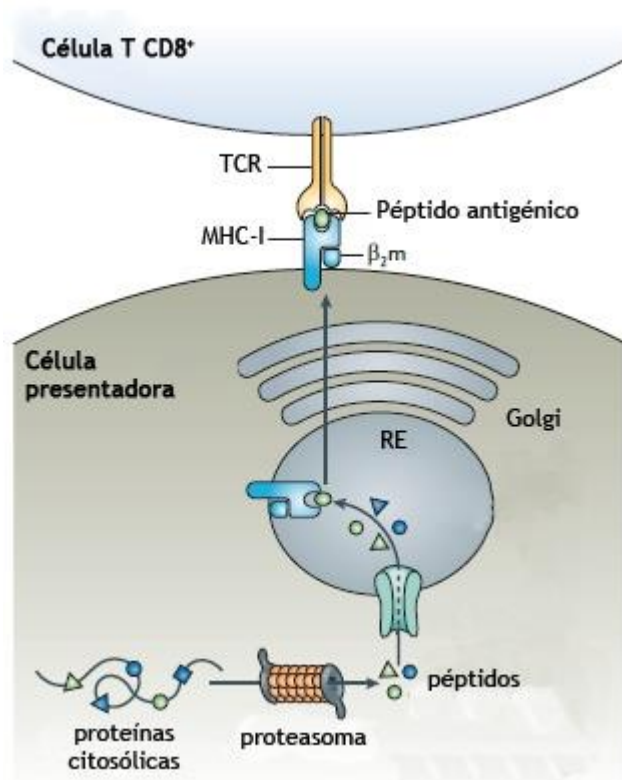


Figura 10. Vía endógena de presentación antigénica, modificado de [157].

Vía exógena o endocítica

A través de esta vía se presentan principalmente péptidos que provienen de proteínas endocitadas. Dentro de los endosomas, estas proteínas son procesadas por proteasas que se activan a medida que ocurre la fusión con los lisosomas y disminuye el pH de estas vesículas. Entre ellas se destacan las catepsinas B, D, L, H, S, C, X y AEP [89].

Las moléculas de MHC-II, al igual que las de MHC-I, se ensamblan en el RE y rápidamente se asocian a la llamada cadena invariante (Ii). La unión de las moléculas de MHC-II nacientes a Ii es de suma importancia ya que evita que estas moléculas se unan a los péptidos translocados por el complejo TAP destinados a unirse a las moléculas de MHC-I. El complejo MHC-II-Ii luego sale del RE, trafica a través del aparato de Golgi y se localiza en primer lugar en la membrana plasmática. A continuación ocurre su internalización dado que la Ii además contiene secuencias señal que permiten la endocitosis mediada por clatrina de los complejos MHC-II-Ii. Una vez internalizados, los complejos trafican a través de la vía endocítica por compartimientos vesiculares donde ocurre el procesamiento antigénico. Allí ocurre la proteólisis secuencial de la Ii, la cual concluye en la generación del péptido CLIP. Este péptido ocupa el surco antigénico de la molécula de MHC-II. La remoción y el reemplazo de CLIP por el péptido antigénico es catalizado por la molécula HLA-DM, la cual también está presente en las vesículas endocíticas y cuya actividad se encuentra regulada por la molécula HLA-DO. Luego de la unión del péptido antigénico, las moléculas de MHC-II dejan los compartimientos de procesamiento antigénico y son transportadas a la membrana plasmática. De la misma manera que las moléculas de MHC-I, las de MHC-II tampoco se

localizan permanentemente en la superficie celular. Estas moléculas no solamente pueden ser internalizadas y dirigidas ya sea a su degradación o ser recicladas nuevamente a la membrana plasmática, sino que también son capaces de ser liberadas al medio extracelular asociadas a exosomas (Figura 11) [159].

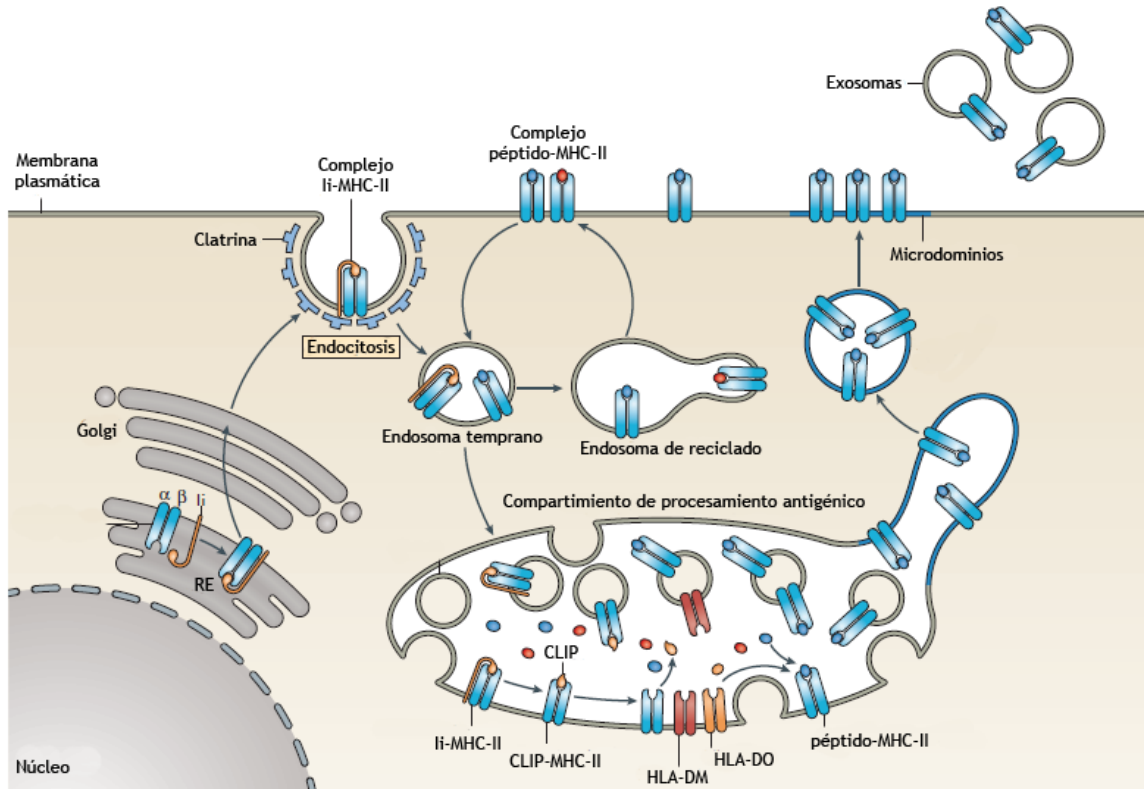


Figura 11. Vía exógena de presentación antigénica, modificado de [159].

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL IFN- γ

Los IFN pertenecen a una familia de citoquinas ampliamente expresada por distintos tipos celulares y que tienen una importante función en el desarrollo de la respuesta inmune. La familia de los IFN se divide en dos: los IFN de tipo I (α , β , δ , ϵ , κ , τ y ω) y los de tipo II, del cual existe un solo tipo, el IFN- γ . La importancia del IFN- γ en la inmunidad frente a *Brucella* ya fue mencionada anteriormente.

El receptor de IFN- γ , denominado el receptor de IFN de tipo II, está constituido por dos cadenas polipeptídicas (IFNGR1 e IFNGR2). Cada una de estas subunidades interactúa con una subunidad de la familia de las quinasas JAK. La subunidad IFNGR1 se asocia a JAK1 mientras que la subunidad IFNGR2 se asocia a JAK2. El paso inicial en la vía de señalización del IFN- γ ocurre en respuesta a la unión del receptor con su ligando. El consecuente cambio conformacional inducido por este hecho causa la activación de JAK2 y su autofosforilación. A continuación, JAK2 es capaz de transfosforilar a JAK1. Una vez activada, JAK1 fosforila residuos tirosina críticos en la cadena de IFNGR1, lo cual permite la formación de sitios de anclaje para los dominios con homología Src (SH)₂ de STAT1. El par de subunidades de STAT1 reclutadas consecuentemente por el receptor son a su vez fosforiladas por las proteínas JAK en el

residuo tirosina 701 (Y701). Esta fosforilación induce la homodimerización de STAT1 y su posterior liberación del receptor. A continuación, el homodímero de STAT1 transloca al núcleo y se une a las secuencias promotoras de genes regulados por el IFN- γ . La secuencia en el ADN a la cual se une el homodímero de STAT1 es denominado el sitio de activación para IFN- γ (GAS) y se encuentra presente en numerosos genes, entre ellos, la familia de factores de transcripción IRF, CIITA y NLRC5 (Figura 12) [160, 161].

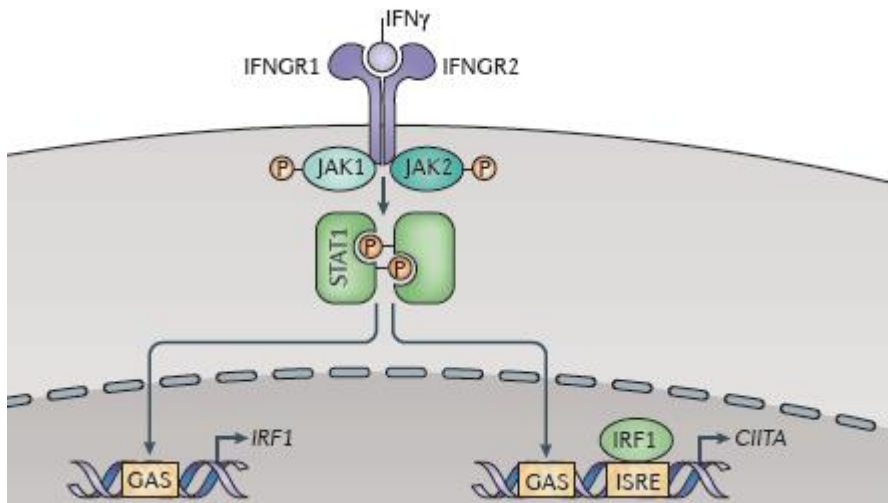


Figura 12. Vía de señalización del IFN- γ , modificado de [154].

ESTRATEGIAS DE EVASIÓN INMUNE MEDIADAS POR *BRUCELLA ABORTUS*

Luego de la infección con *Brucella* spp. la mayoría de los individuos infectados cursan una fase aguda de la enfermedad, la cual puede progresar hacia la cronicidad. Tal como fue mencionado, la infección con *B. abortus* activa tanto el sistema inmune innato como adaptativo provocando una respuesta pro-inflamatoria que favorece la diferenciación de células T CD4⁺ hacia un perfil Th1 [1], con la consecuente inducción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. En estudios previos en humanos, ratones y bovinos se han observado linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos contra antígenos de la bacteria [137, 162, 163], confirmando la habilidad de los macrófagos infectados con *Brucella* para presentar antígenos en el contexto de las moléculas de MHC-II y MHC-I respectivamente, y activar ambos tipos de respuestas, “helper” y citotóxicas. Las células Th1 producen IFN- γ , una citoquina que no sólo aumenta las funciones microbicidas del macrófago sino que también induce la expresión de moléculas clave del macrófago, como las MHC-I y MHC-II, moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), el receptor de tipo I para la porción Fc de IgG (Fc γ RI o CD64) y CD11b, entre otras. Todo esto llevaría en última instancia a la lisis de la bacteria y la erradicación de la infección [164]. Sin embargo, *B. abortus* puede persistir dentro de los macrófagos que infecta. Por lo tanto, la pregunta que reviste gran relevancia es: **¿Cómo hace *Brucella* para persistir en presencia de una poderosa respuesta tanto de linfocitos T CD4⁺ como T CD8⁺?**

B. abortus como patógeno crónico exitoso puede desplegar una serie de estrategias para evadir o contraatacar la respuesta inmune del hospedador. Al comienzo de la infección *B. abortus* utiliza

diversos mecanismos de evasión [36, 54, 165], que aumentan sus posibilidades de supervivencia antes de alcanzar su nicho intracelular, el macrófago. Una vez dentro del macrófago, *Brucella* habita en un compartimiento acidificado que se fusiona con componentes de la vía endosomal temprana [79]. Allí, la gran mayoría de las bacterias mueren rápidamente. Sin embargo, el establecimiento de una infección persistente depende de la capacidad de la bacteria para formar una vacuola que contiene *Brucella* (BCV), la cual transita del compartimiento endocítico al retículo endoplasmático [79, 166]. Una vez en el interior de la BCV replicativa, las bacterias son resistentes a nuevos ataques y comienzan a multiplicarse dramáticamente [79, 167]. *Brucella* también inhibe la apoptosis de macrófagos [21, 168], lo que a su vez favorece su supervivencia y la replicación. A pesar de este refinado mecanismo de escape *Brucella* afronta un segundo desafío si pretende persistir dentro del macrófago por mucho tiempo: enfrentarse a su principal atacante, el linfocito T.

Las estrategias que permiten a *B. abortus* sobrevivir por períodos prolongados dentro de los macrófagos en presencia de vigorosas respuestas T CD4⁺ y T CD8⁺ no se encuentran completamente delineados. En nuestro laboratorio anteriormente se demostró que *Brucella* es capaz de disminuir la respuesta Th1 durante la fase crónica de la enfermedad en humanos [133]. Los resultados demostraron una estrecha correlación entre el estadio clínico del paciente y la respuesta de células T frente a antígenos de la bacteria. Células de pacientes con brucelosis aguda proliferan *in vitro* en presencia de antígenos bacterianos y secretan citoquinas del tipo Th1 (IFN- γ e IL-2), mientras que células de pacientes crónicos no. Estos resultados también sugieren que la producción disminuida de citoquinas Th1 puede contribuir a la falta de respuesta de células T observada en brucelosis crónica humana [133]. Además, fue descrito que los pacientes con brucelosis crónica presentan un disminuido porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ periféricos como también anergia de linfocitos T, lo cual está asociado con una mala prognosis [169-172]. También fue demostrado que el LPS de *B. abortus* disminuye la activación de las células T por macrófagos peritoneales murinos, perjudicando la vía de presentación por MHC-II [173]. Este fenómeno es debido a la formación de macrodominios de LPS en la membrana plasmática los cuales interfieren con la presentación MHC-II de péptidos a hibridomas de células T específicos. Otros autores identificaron una proteína de *Brucella* que pertenece a la familia de las racemasas de prolina, PrpA, involucrada directamente en la modulación inmune del hospedador [174, 175]. Sin embargo, se conocía poco acerca de otros potenciales mecanismos o factores por los cuales *B. abortus* puede evadir las respuestas de células T y promover la infección crónica. En nuestro laboratorio además demostramos que si bien *B. abortus* no es capaz de replicar en linfocitos T humanos, el contacto directo de las bacterias con estas células inhibe la proliferación y producción de IL-2 e IFN- γ por parte de las mismas. Por otra parte, *B. abortus* mediante la secreción de TNF- α es capaz de inducir una incrementada apoptosis de linfocitos T (resultados no publicados, [64]). Además, demostramos que la infección de monocitos/macrófagos humanos con *B. abortus* es capaz de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de

MHC-II y del receptor de tipo I para la porción Fc de IgG (FcγRI o CD64). Como consecuencia, los macrófagos infectados presentan disminuida capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y disminuida fagocitosis restringida al FcγRI [176, 177]. Respecto de la inhibición de MHC-II, demostramos que el fenómeno es producido por las lipoproteínas de *B. abortus*, depende del receptor tipo Toll (TLR) 2 y es mediado por IL-6

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de las vigorosas respuestas T CD4⁺ y CD8⁺ generadas por *B. abortus*, esta bacteria intracelular puede persistir dentro de las células de su hospedador por muchos años, estableciendo una infección crónica. Los mecanismos que permiten la supervivencia de este patógeno en presencia de poderosas respuestas de linfocitos T, no fueron prácticamente explorados. Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue estudiar las estrategias y los mecanismos empleados por *B. abortus* sobre los monocitos/macrófagos para evadir la vigilancia inmunológica y persistir crónicamente en el hospedador.

Nuestros resultados y evidencias previas nos llevaron a plantear como hipótesis de trabajo que *B. abortus* no sólo sería capaz de disminuir la expresión de MHC-II a través de mecanismos de inhibición a nivel transcripcional/traducciona l o de interferencia con la vía de transducción de señal del IFN- γ , sino también sería capaz de regular la expresión de las moléculas de MHC-I y por lo tanto afectar no sólo la respuesta de linfocitos T CD4⁺ sino también de linfocitos T CD8⁺. El empleo de múltiples mecanismos y estrategias de evasión sobre monocitos/macrófagos le darían a *B. abortus* una mayor versatilidad para mantener una continua inhibición de la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y de ese modo persistir crónicamente en el hospedador, evadiendo la respuesta inmune adaptativa. Para poner a prueba nuestra hipótesis, formulamos los siguientes objetivos específicos:

- 1. Determinar la capacidad de *B. abortus* para inhibir la expresión de las moléculas de MHC-I sobre los monocitos/macrófagos y la presentación antigénica a los linfocitos T CD8⁺.**
- 2. Investigar el mecanismo molecular implicado en la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-I y MHC-II, mediada por *B. abortus*.**

PARTE I

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias.

Bacterias *B. abortus* S2308, S2308-GFP, *B. abortus* RB51 y *B. abortus virB10* fueron crecidas en triptona de soja agar, suplementada con extracto de levadura (Merck Millipore). El número de bacterias en los cultivos en fase estacionaria fue determinado por comparación de la densidad óptica a 600 nm con una curva estándar. Para obtener *B. abortus* muerta por calor (HKBA) las bacterias fueron lavadas 5 veces durante 10 minutos en PBS estéril. Las mismas fueron inactivadas por calentamiento a 70°C durante 20 minutos, alicuotadas y conservadas a -70°C hasta su utilización. La ausencia total de viabilidad de *B. abortus* luego de la inactivación por calor fue verificada por la ausencia de crecimiento bacteriano en triptona soja agar. Todas las manipulaciones con las bacterias vivas se realizaron en el área de bioseguridad de nivel 3 del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, Facultad de Medicina, UBA.

Células.

Las células de la línea monocítica humana THP-1 fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) y cultivadas en medio estándar compuesto por RPMI 1640 suplementado con 25mM de Buffer Hepes, 2mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Natocor), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Para inducir la maduración las células fueron cultivadas con 0,05 µM de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (Calbiochem Merck Millipore) por 72 h. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) de sangre humana colectada de individuos adultos sanos del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas. La sangre fue obtenida del descarte de bolsas de donantes voluntarios y los datos de los individuos no fueron recolectados (p. ej. nombre, sexo, etc.), garantizando el carácter anónimo de los donadores. Los monocitos humanos fueron obtenidos luego de la centrifugación de los PBMCs en un gradiente de Percoll (GE Healthcare) y luego resuspendidos en medio estándar. La viabilidad celular se midió por el test de exclusión de azul de tripán y fue mayor al 95% en todos los experimentos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Infecciones in vitro.

Células THP-1 o monocitos humanos (0,5 x 10⁶ células/ml) fueron infectados con *B. abortus* a distintas multiplicidades de infección (MOI) por 2 h en medio sin antibiótico en presencia de 150 U/ml de IFN- γ (Endogen) o 1 µg/ml de LPS de *E. coli*, 100 µg/ml de Poly I:C (InvivoGen), 1,5 µM de CpG (IDT) y 100 ng/ml de Pam₃Cys (Boehringer). Posteriormente, se lavaron las células extensivamente para remover las bacterias no internalizadas y se incubaron en medio suplementado con IFN- γ o los agonistas de TLRs, 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares que pudieran haber quedado por 8, 24 o 48 h adicionales como está indicado en cada pie de figura. A

diferentes tiempos post-infección (8, 24 o 48 h) se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de células infectadas, se esterilizaron pasándolos por un filtro de polifluoruro de vinilideno de 0,22 μm , y luego se utilizaron para estimular células THP-1 no-infectadas. Los sobrenadantes fueron diluidos 1/5 o 1/2 en medio completo. Para monitorear la sobrevivencia intracelular de las bacterias, las células fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y lisadas con 0,1% (vol/vol) de Tritón X-100 en H_2O . Diluciones seriadas de los lisados fueron rápidamente plaqueados en triptona de soja agar para contar unidades formadoras de colonias (UFC).

Citometría de flujo.

Células THP-1 o monocitos humanos ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron infectados con diferentes MOI (25:1, 50:1 y 100:1) de *B. abortus* S2308, *B. abortus* S2308-GFP, *B. abortus* RB51 o *B. abortus virB10⁻*, incubados con distintas concentraciones de HKBA (1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 bacterias/ml) o tratados con EGF (25 ng/ml) o TGF- α (50 ng/ml) (Peprotech) en presencia de IFN- γ o los agonistas de TLRs por 8, 24 o 48 h tal como se indica en cada pie de figura. Las células luego fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo (Ac) monoclonal anti-HLA-ABC humano (clon G46-2.6; BD Pharmingen) o un Ac anti-CD71 humano (clon M-A712; BD Pharmingen) conjugados a FITC, un Ac anti-CD11b humano (clon ICRF44; eBioscience) o un Ac anti-CD40 humano (clon 5C3; BD Pharmingen) conjugados a PE o sus respectivos controles de isotipo. Luego de la marcación, las células fueron lavadas y analizadas con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos procesados con el software CellQuest (BD Biosciences).

Evaluación de la Apoptosis por Anexina V/ Ioduro de Propidio.

Células THP-1 ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron infectadas con diferentes MOI (25:1, 50:1, 100:1 y 500:1) de *B. abortus* S2308 en presencia de IFN- γ o fueron tratadas con paraformaldehído (PFA) al 2%. A las 48 h las células fueron lavadas e incubadas con Anexina V-FITC e Ioduro de Propidio (BD Pharmingen) por 10 minutos en hielo y oscuridad. Posteriormente, las células apoptóticas fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos procesados con el software CellQuest (BD Biosciences).

Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺.

PBMCs aislados de individuos sanos respondedores a PPD (mycobacterial purified protein derivative) fueron estimulados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de un lisado de *Mycobacterium tuberculosis* y 10 U/ml de IL-2 recombinante humana (BD Pharmingen) por 10 días. Luego de ese tiempo, se aislaron los linfocitos T CD8⁺ utilizando un kit de selección negativa (BD IMag) siguiendo las instrucciones del fabricante. Simultáneamente, monocitos autólogos ($0,5 \times 10^6$ células/ml) purificados como fue descrito anteriormente fueron tratados con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 24 h y luego infectados con *B. abortus* S2308 (MOI 50:1 y 100:1) en presencia de IFN- γ por otras 24 h. Después de esta incubación, se

descartó el medio y se lavaron las células extensivamente antes de re-exponerlas al antígeno (Ag). Las células entonces fueron incubadas con 10 µg/ml del mismo lisado de *Mycobacterium tuberculosis* por 24 h. A continuación, se agregaron los linfocitos T CD8⁺ al cultivo junto con un Ac monoclonal anti-CD107a humano conjugado a FITC (clon H4A3; BD Pharmingen). Luego de 1 h de incubación se adicionó 1 µl por pocillo de BD GolgiStop (BD Biosciences) y se cultivaron las células por 5 h adicionales. Se realizó la marcación de las células en superficie con un Ac monoclonal anti-CD8 humano conjugado a PerCP (clon SK1; BD Biosciences). Luego, las células fueron permeabilizadas y marcadas con un Ac monoclonal anti-IFN-γ humano conjugado a PE (clon 4SB3; BD Pharmingen) para determinar la producción intracelular de esta citoquina. Después de la marcación, las células fueron lavadas y analizadas con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos procesados con el software CellQuest (BD Biosciences).

Extracción de ARNm y PCR en tiempo real.

Células THP-1 (1 x 10⁶ células/ml) fueron infectadas con *B. abortus* S2308 (MOI 100:1) en presencia de IFN-γ por 48 h. Se extrajo el ARN total utilizando el kit comercial Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) y luego 1 µg de ARN fue sometido a transcripción reversa utilizando la enzima ImpromII (Promega). Se realizó el análisis de PCR con el sistema de detección Mx3000P (Stratagene) utilizando SYBR Green como fluorocromo de unión a ADN. Los sets de primers utilizados para la amplificación fueron los siguientes: GAPDH sense 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3', GAPDH antisense 5'-TTACTCCTTGAGGCCATGT-3'; HLA-A sense 5'-GCGGCTACTACAACCAGAGC-3'; y HLA-A antisense 5'-CCAGGTAGGCTCTCAACTGC-3'. El protocolo de amplificación fue de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos. Todos los sets de primers produjeron una única banda y del tamaño en pares de bases esperado. La expresión relativa fue normalizada utilizando a GAPDH como gen housekeeping. El fold change fue calculado mediante el método de ΔΔCT y utilizando la condición sin tratar como calibrador.

Western Blot.

Células THP-1 (1 x 10⁶ células/ml) fueron infectadas con diferentes MOI (25:1, 50:1 y 100:1) de *B. abortus* S2308 en presencia de IFN-γ. A las 48 h las células fueron lavadas y lisadas por incubación en 0,2 ml de buffer frío conteniendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 1% de SDS, 1% de Tritón X-100, 1% de deoxicolato de sodio, 100 µg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de estreptomicina, 0,2% de azida y un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) por 2 h a -70°C. Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. La concentración proteica fue determinada utilizando el ensayo de BCA (Thermo Scientific Pierce). Cantidades iguales de proteína (20 µg) de cada tratamiento fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 10%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham GE Healthcare) por 1 h a 300 mA y la misma fue bloqueada con una solución de leche al 5% en TBS 0,05 % de Tween-20 durante una noche a 4°C.

Luego, se incubó la membrana con 1µg/ml de un Ac policlonal anti-MHC-I humano hecho en conejo (clon H-300; Santa Cruz Biotechnology), un Ac anti-β-actina hecho en ratón (clon C4; Santa Cruz Biotechnology) o un Ac anti-GAPDH hecho en ratón (clon A-3; Santa Cruz Biotechnology) durante una noche. Se lavó la membrana 3 veces con TBS 0,05% de Tween-20 y se la incubó por 1 h con un Ac secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugados a HRP (Santa Cruz Biotechnology). La inmunoreactividad luego fue detectada utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific Pierce). Las bandas proteicas fueron visualizadas utilizando placas radiográficas Kodak Medical X-Ray General Purpose Film. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas utilizando el software Image J.

Microscopía confocal.

Células THP-1 (0,2 x 10⁶ células/pocillo) fueron incubadas en un portaobjetos con pocillos (chamber slide) con 10 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich) por 24 h para promover su adherencia. Luego, las células fueron infectadas con *B. abortus* S2308, *B. abortus* S2308-GFP, *B. abortus* RB51 o *B. abortus virB10* (MOI 100:1) o tratadas con EGF (25 ng/ml) o TGF-α (50 ng/ml) (Peprotech) en presencia de IFN-γ por 48 h, fijadas con PFA al 2%, permeabilizadas con 0,1% de saponina e incubadas con un Ac monoclonal primario anti-HLA-ABC humano (clon W6/32; purificado del sobrenadante de cultivo de un hibridoma murino) y luego un Ac secundario anti-IgG de ratón conjugado a Cy3 o a Alexa 546. Para los experimentos de localización subcelular, las células fueron incubadas con el mismo Ac primario anti-HLA-ABC seguido de un Ac secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 546 (Molecular Probes Life Technologies). Los compartimentos subcelulares fueron detectados utilizando Acs específicos anti-EEA1 (endosomas tempranos), LAMP-2 (endosomas tardíos/lisosomas), GM130 (aparato de Golgi) y calnexina (retículo endoplasmático) (BD Pharmingen) seguidos de un Ac secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (Molecular Probes Life Technologies). En todos los casos, luego de la marcación los portaobjetos fueron montados con PolyMount (Polysciences) y analizados utilizando un microscopio confocal FV-1000 con un objetivo de inmersión en aceite de Plano Apocromático 60X NA1.42 (Olympus).

Microscopía electrónica.

Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* S2308 (MOI 100:1) en presencia de IFN-γ por 48 h. Para la microscopía electrónica de transmisión, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 3% por 1 h a temperatura ambiente y luego a 4°C durante una noche; incubadas por 2 h con 1,5% de OsO₄ en 0,1 M de buffer fosfato pH 7,5, deshidratadas en una serie creciente de diluciones de etanol y embebidas en resina Epoxi (Epoxi Embedding Medium Kit; Sigma-Aldrich). Secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo al 2% y solución de Reynold. Para la microscopía inmuno-electrónica, las células fueron fijadas con PFA al 4% y glutaraldehído al 0,25% por 24 h. Los pellets fueron incubados en buffer

fosfato 0,1 M pH 7,5 por 20 minutos y luego en una solución de sacarosa 0,2 M durante una noche a 4°C. Los pellets fueron deshidratados en etanol 70% y embebidos en LR-White (Sigma-Aldrich) a 50°C. Secciones ultrafinas fueron colectadas en grillas de níquel. Las secciones fueron inmuno marcadas con un Ac monoclonal anti-LAMP-2 hecho en ratón (Invitrogen Life Technologies) durante una noche a 4°C. Luego, se utilizó un Ac anti-IgG de ratón conjugado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la inmuno marcación, las secciones fueron post-teñidas con acetato de uranilo y observadas con una cámara digital de 11 Mega pixeles de resolución para imágenes electrónicas.

Neutralización de receptores ErbB.

Células THP-1 ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron infectadas con diferentes MOI (25:1, 50:1 y 100:1) de *B. abortus* S2308 en presencia de IFN- γ y un Ac monoclonal bloqueante del EGFR (cetuximab; Erbitux®-Merck), un Ac monoclonal bloqueante de HER2 (trastuzumab; Herceptin®-Roche) o IgG humana como isotipo a una concentración de 50 μ g/ml por 48 h. Alternativamente, las células fueron infectadas en presencia de IFN- γ y un inhibidor de la enzima TACE (GM6001; Chemicon-EMD Millipore) o su control negativo (GM6001 Nc). Luego fueron teñidas para citometría de flujo o microscopía confocal como fue previamente descrito.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de la varianza de uno o dos factores (ANOVA) con un *post-hoc* test de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.00.

RESULTADOS

La infección por *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I en monocitos humanos

La infección por *Brucella* induce la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Sin embargo, se desconocía cómo hace *Brucella* para persistir en presencia de esta poderosa respuesta citotóxica. Es por esto que determinamos la habilidad de *B. abortus* de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-I en monocitos humanos. Para dilucidar esto, infectamos células de la línea monocítica humana THP-1 con diferentes multiplicidades de infección (MOI) de *B. abortus* (25:1, 50:1 y 100:1) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavamos las células para remover las bacterias no internalizadas y luego mantuvimos la infección en presencia de IFN- γ por 48 h adicionales. A continuación, la expresión en superficie de las moléculas de MHC-I (HLA-ABC) fue evaluada mediante citometría de flujo. La infección con *B. abortus* inhibió la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I en la superficie celular de manera dosis dependiente (Figura 1A y B). Por el contrario, la expresión en superficie de CD11b, CD40 y el receptor de transferrina (CD71) no difirió entre células infectadas y no infectadas (Figura 1C-E) indicando que *B. abortus* no disminuye la expresión de todas las moléculas de superficie de manera global. Evaluamos a su vez si el efecto de la inhibición de la expresión de MHC-I mediado por la infección con *B. abortus* podía extenderse a monocitos humanos. Para esto, infectamos monocitos purificados de sangre periférica humana con *B. abortus* en presencia de IFN- γ como fue descrito anteriormente y determinamos la expresión de MHC-I mediante citometría de flujo. La infección con *B. abortus* también disminuyó la expresión de MHC-I en monocitos humanos purificados (Figura 1F). Esta inhibición de la expresión no fue debida a una pérdida de la viabilidad celular en los cultivos infectados. Dos medidas independientes, la exclusión del colorante vital azul de tripán (datos no mostrados) y el ensayo de Anexina V (Figura 1G), no revelaron diferencias en el porcentaje de viabilidad entre células infectadas y no infectadas, aún en el nivel más alto de infección (500 bacterias/ célula). Por el contrario, se obtuvieron altos niveles de apoptosis en el control positivo con paraformaldehído (PFA).

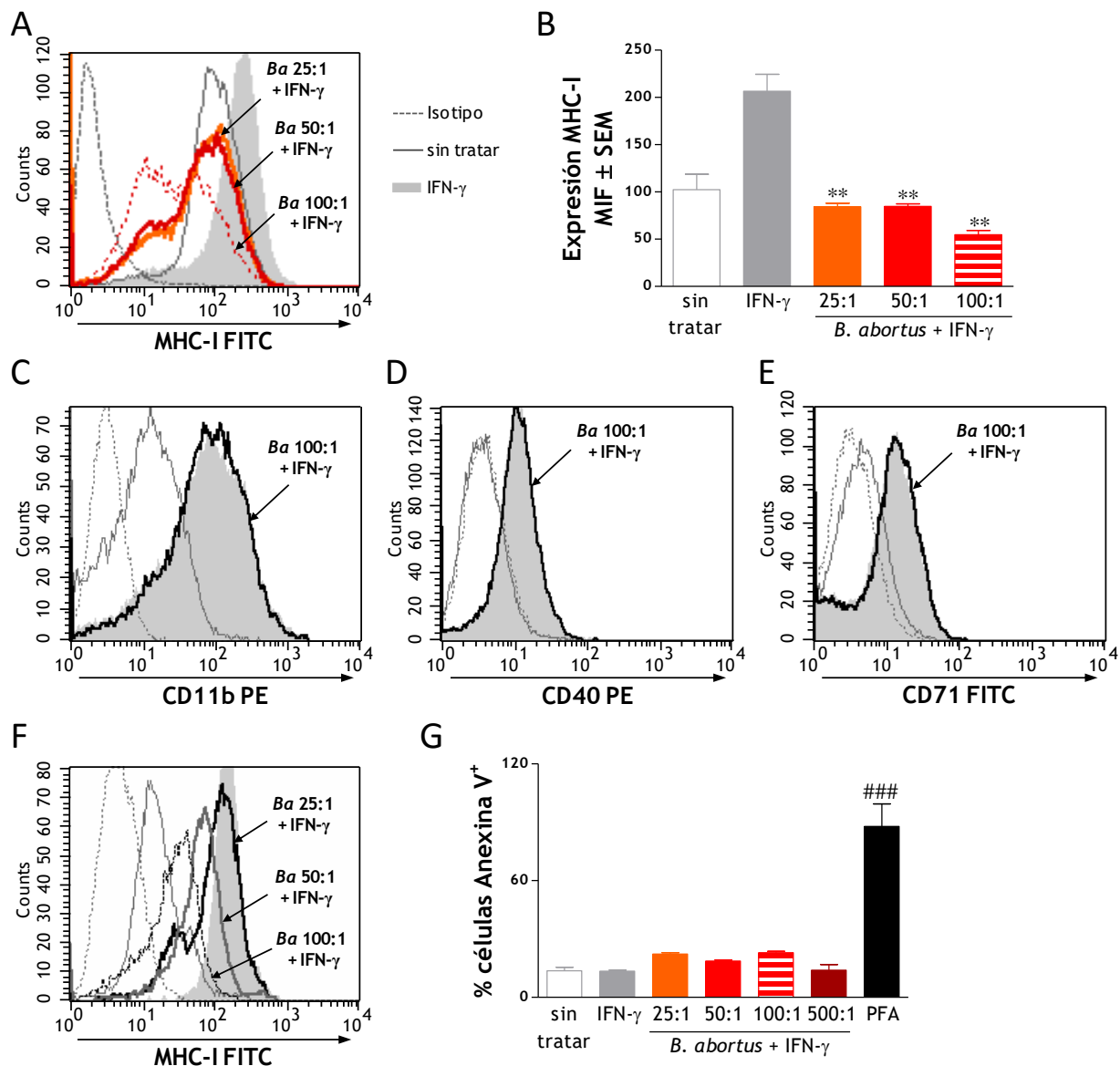


Figura 1. La infección con *B. abortus* inhibe la expresión en superficie de MHC-I inducida por IFN- γ . *A-E.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I (A y B), CD11b (C), CD40 (D) y CD71 (E) por citometría de flujo. *F.* Monocitos humanos purificados de sangre periférica fueron infectados con *B. abortus* como fue descrito, y la expresión de MHC-I se determinó por citometría de flujo. Las barras en el panel B representan la media aritmética \pm SEM de 5 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ . *G.* Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* como fue descrito, y se determinó la apoptosis mediante el ensayo de Anexina V por citometría de flujo. Las barras indican el porcentaje de células Anexina V positivas \pm SEM de 3 experimentos. ### $P < 0,001$ vs. sin tratar.

La infección con *B. abortus* inhibe la expresión en superficie de MHC-I inducida por agonistas de TLRs

La expresión en superficie de MHC-I en monocitos no sólo es inducida por IFN- γ , distintos ligandos para TLRs también son capaces de aumentar dicha expresión [178-180]. Por lo tanto, nos preguntamos si *B. abortus* era capaz de inhibir la expresión de MHC-I inducida por diferentes ligandos para TLRs. Para esto, infectamos células THP-1 con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de LPS de *E. coli* (agonista de TLR4), el lipohexapéptido sintético Pam₃Cys (agonista de TLR2), CpG (agonista de

TLR9) y Poly I:C (agonista de TLR3) por 2 h, lavamos y luego mantuvimos la infección en presencia de los distintos agonistas por 48 h. La infección con *B. abortus* fue capaz de inhibir la expresión en superficie de MHC-I inducida por los distintos ligandos para TLRs de manera similar a lo observado para el tratamiento con IFN- γ (Figura 2A-D).

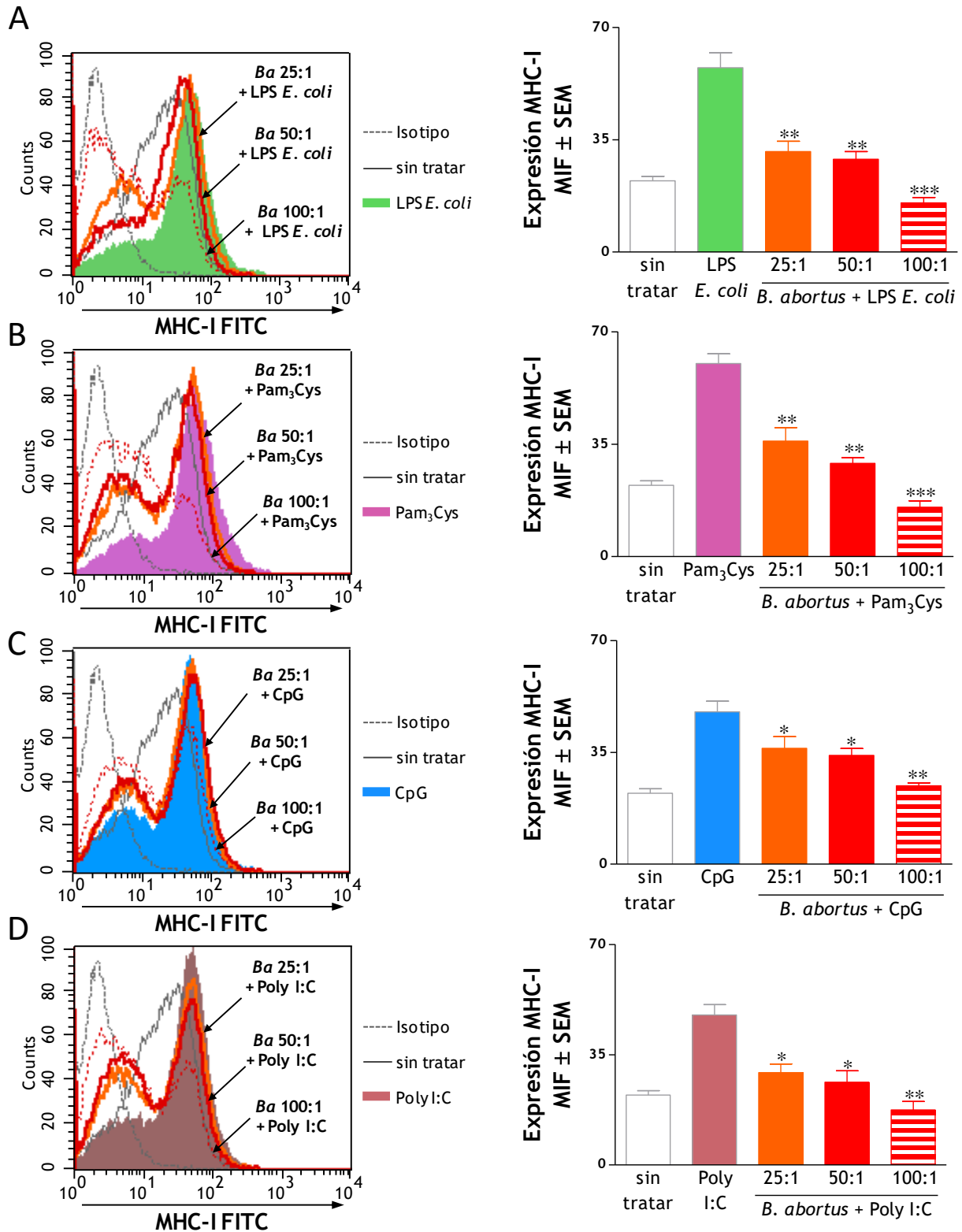


Figura 2. La infección con *B. abortus* inhibe la expresión en superficie de MHC-I inducida por agonistas de TLRs. *A-D.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de (A) LPS de *E. coli*, (B) Pam₃Cys, (C) CpG o (D) Poly I:C por 2 h, lavadas, e incubadas con los mismos estímulos por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. LPS *E. coli*, Pam₃Cys, CpG o Poly I:C respectivamente.

La inhibición de la expresión de MHC-I depende de la viabilidad bacteriana

A continuación, para comprobar si era necesaria la viabilidad bacteriana para desencadenar el fenómeno examinamos la habilidad de *Brucella abortus* muerta por calor (HKBA) para disminuir la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I. Al contrario de lo que ocurre con la bacteria viva, ninguna de las concentraciones testeadas de HKBA fue capaz de inhibir la expresión de MHC-I (Figura 3A y B). En conclusión, estos resultados junto con los anteriores demuestran que la infección con *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ y distintos agonistas de TLRs de las moléculas de MHC-I en superficie de células THP-1 y monocitos humanos de sangre periférica. A su vez, demuestran que la inhibición de la expresión de MHC-I requiere que las bacterias se encuentren metabólicamente activas.

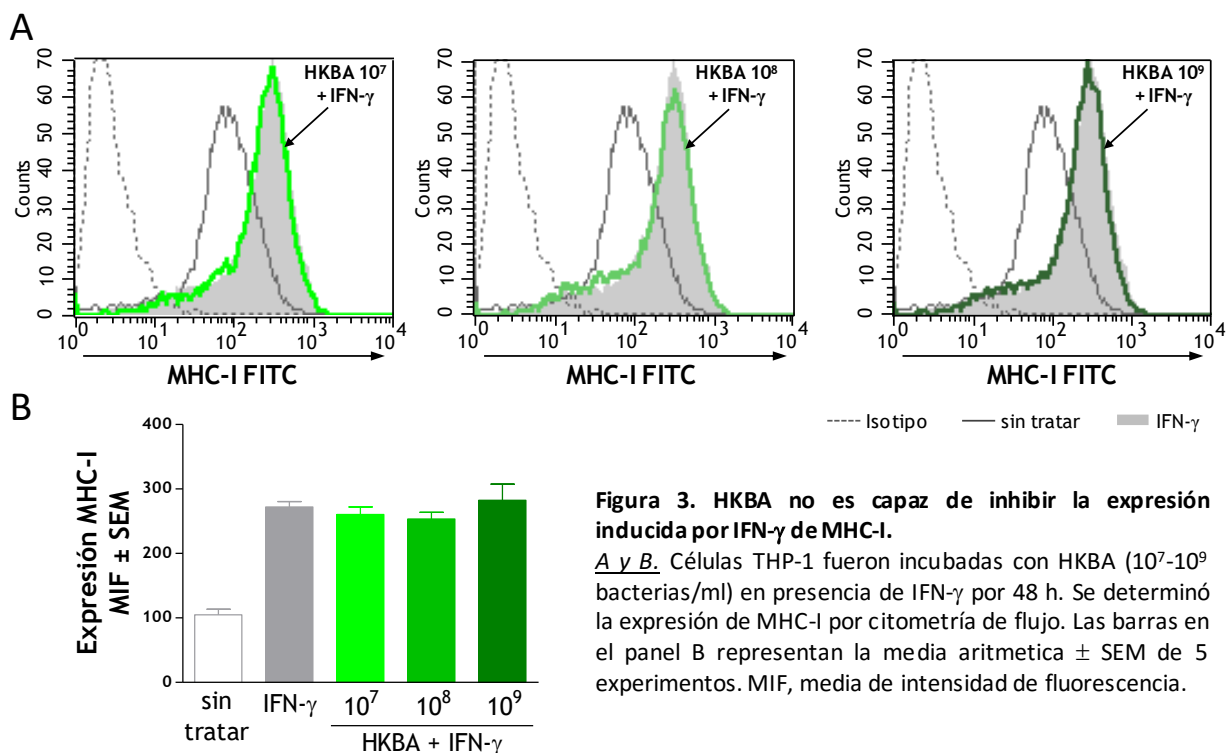


Figura 3. HKBA no es capaz de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I.

A y B. Células THP-1 fueron incubadas con HKBA (10^7 - 10^9 bacterias/ml) en presencia de IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo. Las barras en el panel B representan la media aritmética \pm SEM de 5 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia.

La infección con *B. abortus* inhibe la activación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos

A continuación nos preguntamos si la inhibición de MHC-I mediada por *B. abortus* correlacionaba con una disminuida función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺. Para esto, monocitos humanos obtenidos de dadores respondedores a PPD (mycobacterial purified protein derivative) fueron infectados con *B. abortus* y enfrentados a linfocitos T CD8⁺ autólogos activados con un lisado de *Mycobacterium tuberculosis*. La infección con *B. abortus* disminuyó significativamente la activación de los linfocitos T

CD8⁺, medida como una disminución de la expresión en superficie del marcador de degranulación CD107a (Figura 4A). A su vez observamos una disminución significativa de la producción de IFN- γ intracitoplasmático en los linfocitos T CD8⁺CD107a⁺ (Figura 4B). Estos resultados indican que la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus* correlaciona con un disminuido procesamiento y presentación antigénica a células T CD8⁺ citotóxicas.

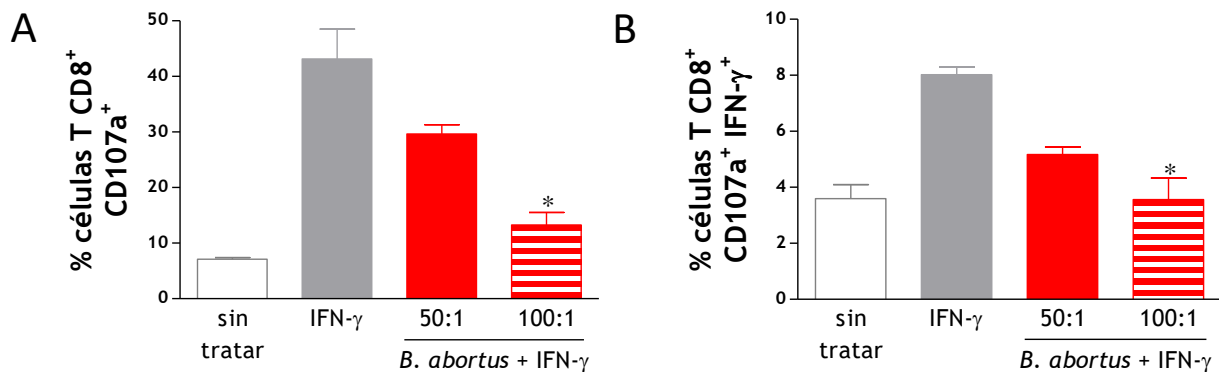


Figura 4. La infección con *B. abortus* inhibe la presentación antigénica restringida a MHC-I. *A y B.* Monocitos aislados de dadores sanos PPD⁺ fueron infectados con *B. abortus* (MOI 50 y 100) en presencia de IFN- γ . A las 24 h las células fueron tratadas con un lisado de *M. tuberculosis* y se las incubó por otras 24 h. Luego, se agregaron linfocitos T CD8⁺ autólogos purificados al cultivo y la citotoxicidad fue evaluada analizando la expresión de CD107a, CD8 e IFN- γ por citometría de flujo. (A) Cuantificación del porcentaje de células T CD8⁺ CD107a⁺. (B) Cuantificación del porcentaje de células T CD8⁺ CD107a⁺ IFN- γ ⁺. Los gráficos muestran un experimento representativo de 3 realizados. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de duplicados. * $P < 0,05$ vs. IFN- γ .

La infección con *B. abortus* no afecta la expresión génica ni la síntesis proteica de MHC-I

Luego investigamos el mecanismo molecular involucrado en la disminución de MHC-I en superficie. En un primer momento, investigamos si la infección con *B. abortus* modificaba la regulación de MHC-I a nivel transcripcional. Para esto determinamos la expresión del ARN mensajero (ARNm) de uno de los genes de MHC-I, HLA-A, mediante la técnica de PCR en tiempo real en células THP-1 bajo las mismas condiciones de infección utilizadas en los experimentos de citometría de flujo mencionados anteriormente. La infección con *B. abortus* no sólo no fue capaz de inhibir la expresión del ARNm de HLA-A, sino que la aumentó significativamente (Figura 5A). A su vez, evaluamos la carga proteica total de MHC-I por la técnica de Western Blot. De acuerdo a lo esperado, el tratamiento con IFN- γ aumentó significativamente la expresión proteica de MHC-I. Sin embargo, este incremento no se vio alterado en las células infectadas con *B. abortus* (Figura 5B y C). En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ en superficie de MHC-I mediada por *B. abortus* no correlaciona con una disminuida transcripción ni síntesis proteica de estas moléculas.

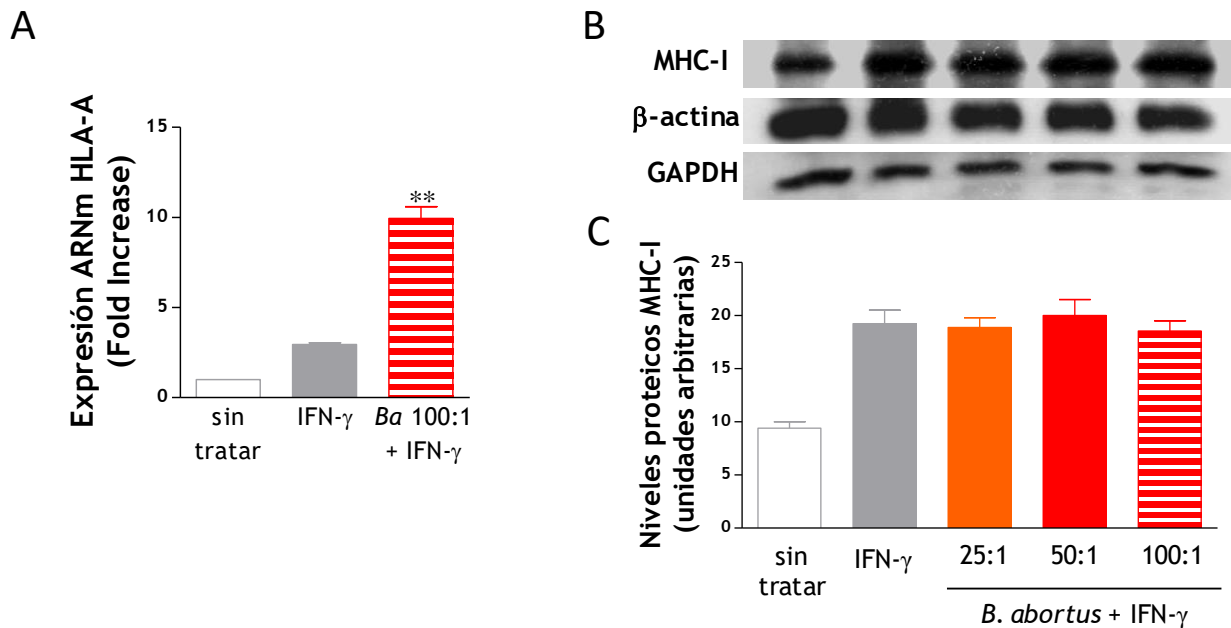


Figura 5. La infección con *B. abortus* no afecta la transcripción ni la síntesis proteica de MHC-I. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, y cultivadas en presencia de IFN- γ por 48 h. **A.** Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-A mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ . **B.** Se obtuvieron extractos celulares totales y se determinó la expresión de MHC-I por Western Blot. β -actina y GAPDH fueron utilizados como control de carga. **C.** Análisis densitométrico de los niveles proteicos de MHC-I de 2 experimentos independientes.

La infección con *B. abortus* induce la retención intracelular de las moléculas de MHC-I

Dado que *B. abortus* no modifica la cantidad de proteína total de MHC-I, pero sin embargo disminuye la expresión en superficie, nosotros especulamos que *B. abortus* podía estar induciendo la retención intracelular de las moléculas de MHC-I. Para evaluar esto, la localización de las moléculas de MHC-I se determinó por microscopía confocal en células infectadas con *B. abortus*-GFP (Green Fluorescent Protein). Primero confirmamos por citometría de flujo que *B. abortus*-GFP era igualmente capaz de disminuir la expresión de MHC-I en superficie que *B. abortus* sin GFP (Figura 6A). Para los experimentos de microscopía confocal, infectamos células THP-1 con *B. abortus*-GFP en presencia de IFN- γ , y evaluamos la expresión de MHC-I marcando dichas moléculas con un Ac primario específico (clon W6/32) seguido de un Ac conjugado a Cy3 (rojo). A las 48 h de cultivo observamos que la mayoría de las células tratadas con IFN- γ solo presentaban marcación de MHC-I predominantemente confinada a la membrana celular (Figura 6B y C). Por el contrario, la mayoría de las células infectadas con *B. abortus* mostraron marcación de MHC-I principalmente restringida al interior celular, de forma concomitante con una disminuida expresión en superficie de esta molécula (Figura 6B y C). Es de destacar que *B. abortus* no co-localiza con las moléculas de MHC-I (Figura 6B). Estos resultados indican que la infección con *B. abortus* induce la retención intracelular de las moléculas MHC-I, sin embargo dichas moléculas no se encuentran confinadas a las vacuolas donde replica *Brucella*.

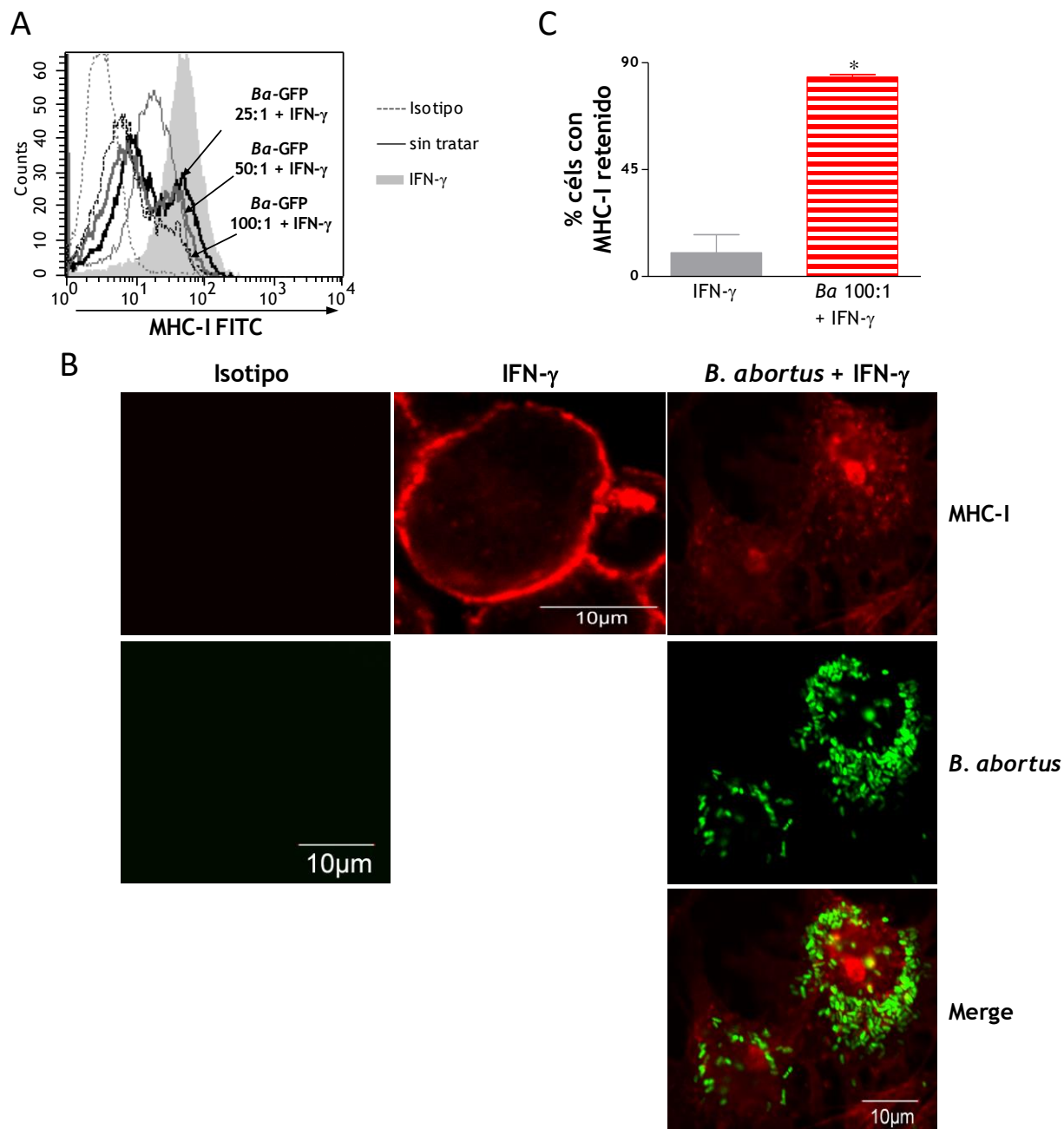


Figura 6. La infección con *B. abortus* induce la retención intracelular de MHC-I. A. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus*-GFP en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo. B. Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP (MOI 100) en presencia de IFN- γ , y luego marcadas con un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Cy3 (rojo). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. C. Cuantificación de la retención de MHC-I. Los valores representan el porcentaje de células con MHC-I retenido \pm SEM de 2 experimentos. * $P < 0,05$ vs. IFN- γ .

La infección con *B. abortus* induce la retención intracelular de MHC-I en el aparato de Golgi

A continuación investigamos la localización subcelular de las moléculas de MHC-I retenidas. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* (sin GFP) en presencia de IFN- γ y luego la localización de MHC-I en los distintos compartimentos celulares se determinó por microscopía confocal. Las moléculas de MHC-I fueron detectadas con un Ac conjugado a Alexa 546 (rojo) y los distintos compartimentos celulares con Acs primarios específicos seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 488 (verde). Se utilizaron Acs anti-EEA1 para detectar endosomas tempranos, LAMP-2 para endosomas tardíos/lisosomas, GM130 para aparato de Golgi y calnexina para retículo endoplasmático. Nuevamente, cuando las células THP-1 fueron tratadas únicamente con IFN- γ por 48 h la expresión de MHC-I se encontró restringida casi exclusivamente a la superficie celular. No se detectó co-localización de MHC-I con EEA1, LAMP-2 ni calnexina. Sólo hubo una pequeña co-localización de MHC-I con aparato de Golgi, coherente con un proceso activo de síntesis y transporte de las moléculas de MHC-I inducidas por IFN- γ (Figura 7A). Al contrario, en células infectadas con *B. abortus* la expresión de las moléculas de MHC-I se encontraba mayormente restringida al interior celular y en un $93 \pm 2\%$ de las células con MHC-I retenido, la marca de MHC-I co-localizaba con el marcador de aparato de Golgi, GM130 (Figura 7B y C).

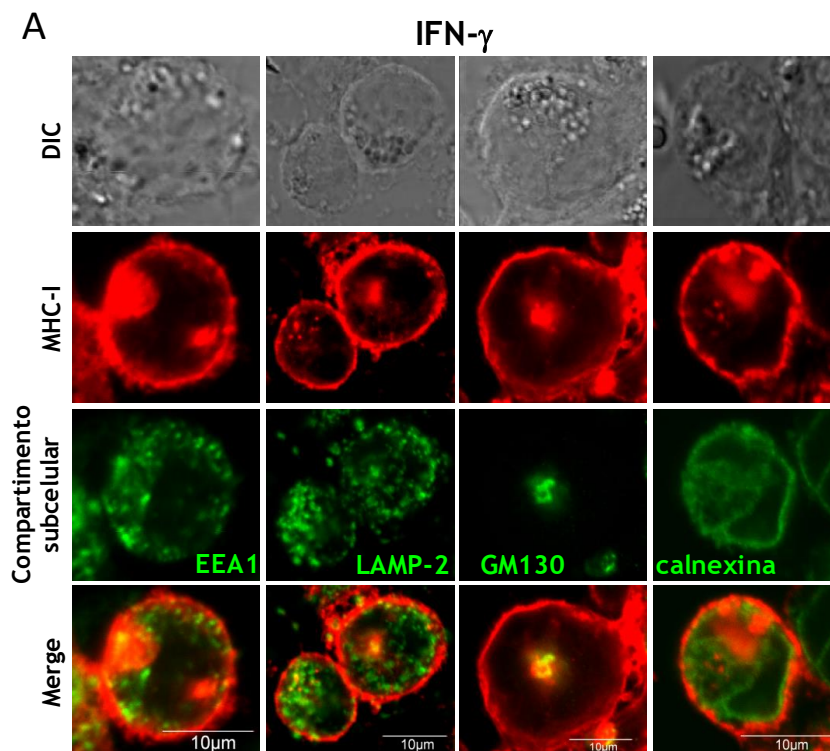
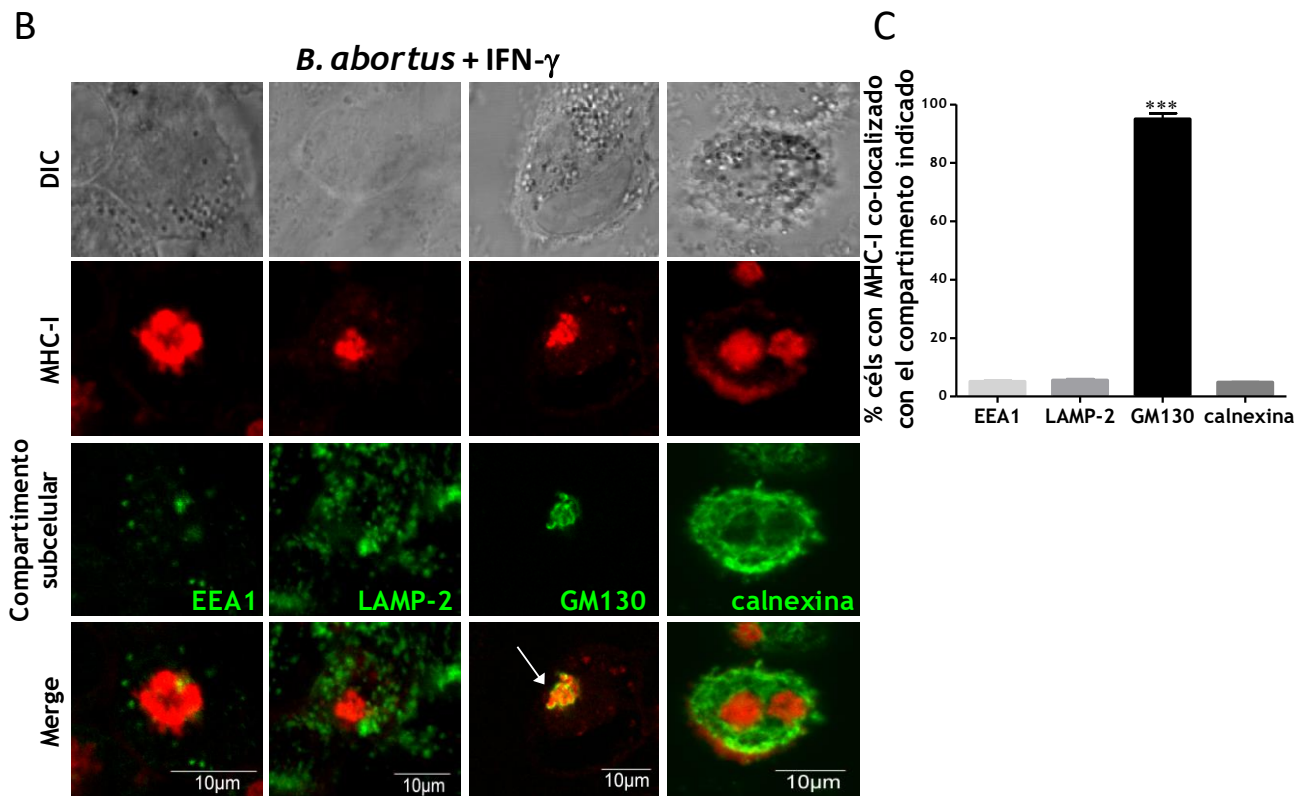


Figura 7. La infección con *B. abortus* induce la retención de las moléculas de MHC-I en el aparato de Golgi. A y B. Microscopías confocales de células THP-1 tratadas con IFN- γ (A) o infectadas con *B. abortus* (MOI 100) en presencia de IFN- γ (B). La expresión de MHC-I se determinó utilizando un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Los marcadores subcelulares fueron detectados utilizando Ac específicos para EEA1 (endosomas tempranos), LAMP-2 (endosomas tardíos/lisosomas), GM130 (aparato de Golgi) y calnexina (RE) seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 488 (verde). La flecha blanca indica co-localización (marca amarilla). DIC, contraste de interferencia diferencial. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. C. Cuantificación de las células con MHC-I retenido co-localizando con los compartimentos subcelulares indicados. Los valores representan el porcentaje de co-localización de MHC-I con los diferentes marcadores de compartimentos y son la media \pm SEM de 2 experimentos. *** $P < 0,001$ vs. EEA1, LAMP-2 y calnexina.



***Brucella abortus* se encuentra en vacuolas LAMP-2⁺ con múltiples membranas**

Una vez dilucidada la localización intracelular de MHC-I nos propusimos determinar la localización subcelular de *B. abortus*, la cual no co-localizó con las moléculas de MHC-I después de 48 h de infección. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus*-GFP en presencia de IFN- γ y luego se determinó la localización subcelular de las bacterias por microscopía confocal marcando a los distintos compartimentos celulares con Acs primarios específicos seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Nuestros resultados demostraron que *B. abortus* se encontraba en grandes vacuolas positivas para LAMP-2, pero negativas para EEA1, GM130 y calnexina, luego de 48 h de infección (Figura 8A y B). Esto fue confirmado por microscopía electrónica, tanto por ultraestructura (Figura 8C) como por marcación de LAMP-2 por inmunogold (Figura 8D), indicando que *B. abortus* (en la mayoría de los casos más de una bacteria) se encontraba en vacuolas LAMP-2 positivas con múltiples membranas. A su vez, estos resultados fueron confirmados utilizando nuevamente *B. abortus*-GFP y aplicando una estrategia para microscopía confocal de 3 colores. Como se muestra en la Figura 9A, las moléculas de MHC-I co-localizan con el marcador de aparato de Golgi, GM130. Por su parte, *B. abortus*-GFP está excluida de esta localización subcelular y se encuentra encerrada en vacuolas LAMP-2 positivas. En conjunto, estos resultados indican que la infección con *B. abortus* induce la retención intracelular de las moléculas de MHC-I, y que esta retención está predominantemente confinada al aparato de Golgi.

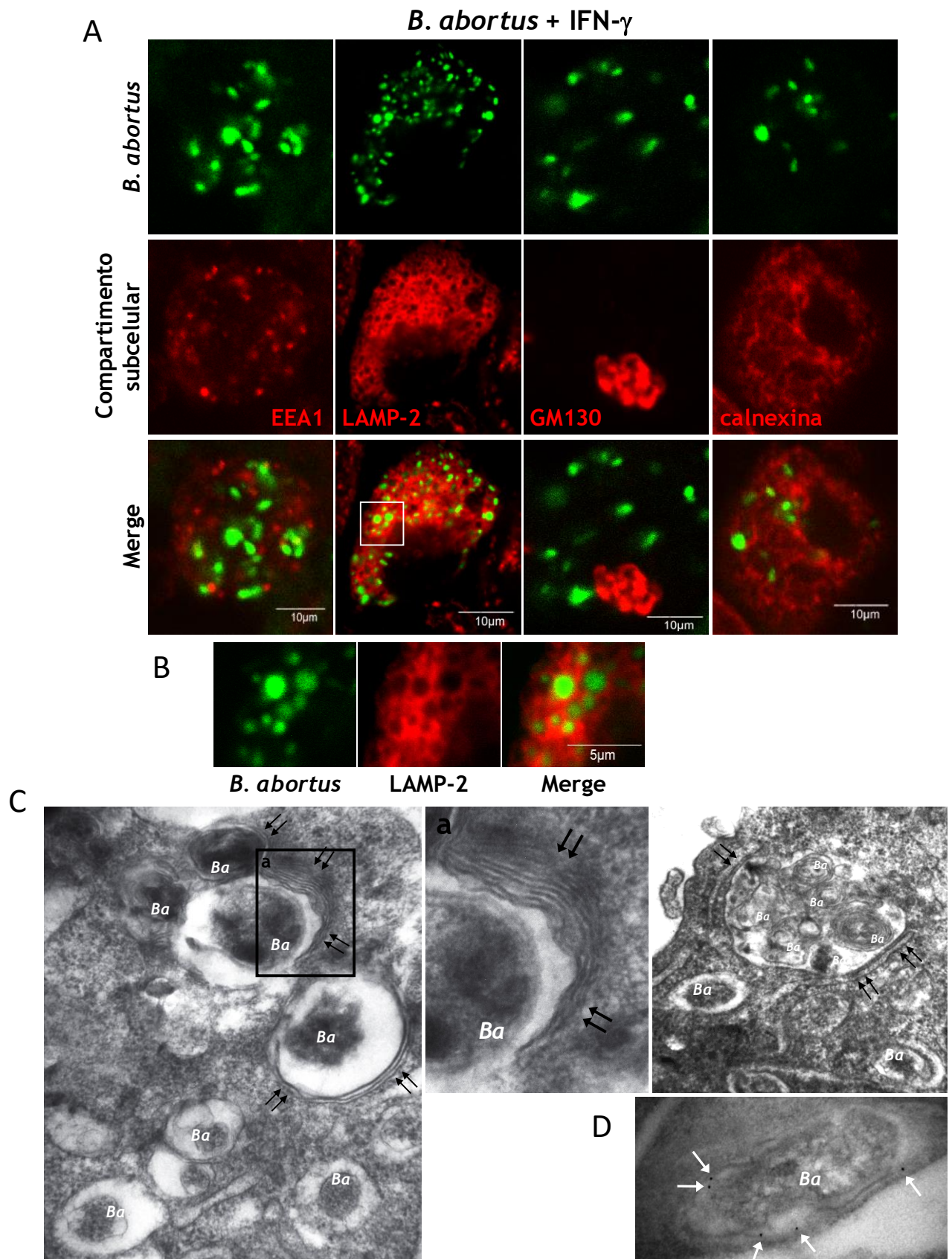


Figura 8. *B. abortus* se encuentra en vacuolas LAMP-2 positivas. **A.** Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP (MOI 100) en presencia de IFN- γ . Los marcadores subcelulares fueron detectados utilizando Acs específicos para EEA1, LAMP-2, GM130 y calnexina seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. **B.** Magnificación del recuadro en (A) mostrando a *B. abortus* encerrada en vacuolas LAMP-2⁺. **C.** Imágenes de microscopía electrónica de células THP-1 infectadas con *B. abortus* (MOI 100) en presencia de IFN- γ por 48 h. Las flechas negras indican estructuras de doble o múltiples membranas alrededor de las bacterias. El recuadro muestra a *B. abortus* contenida en una vacuola con múltiples membranas. **D.** Micrografía inmuno-electrónica de células THP-1 infectadas como fue descrito anteriormente y procesadas para la tinción con inmunogold para LAMP-2. Las flechas blancas muestran a LAMP-2 asociada a estructuras de membrana. *Ba*: *B. abortus*.

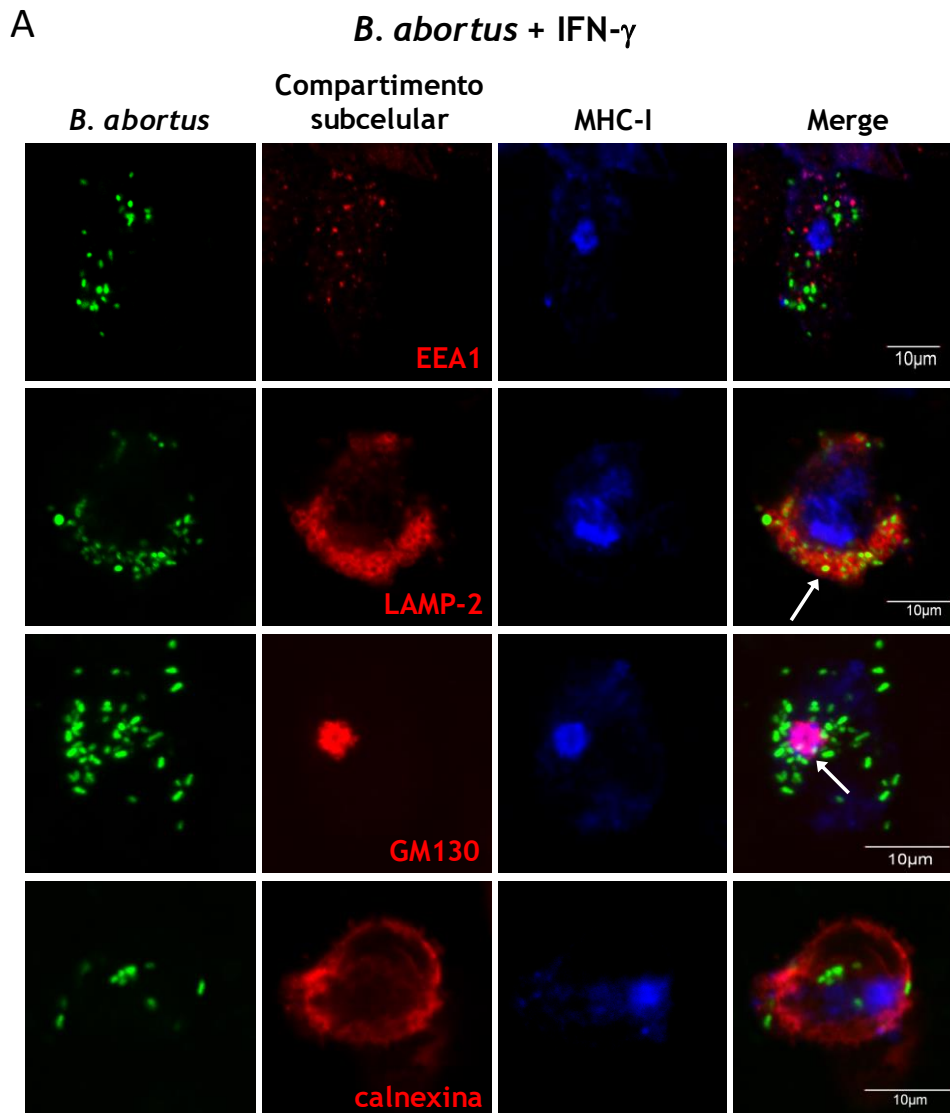
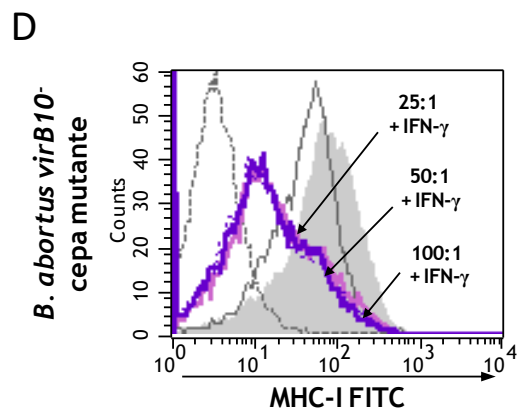
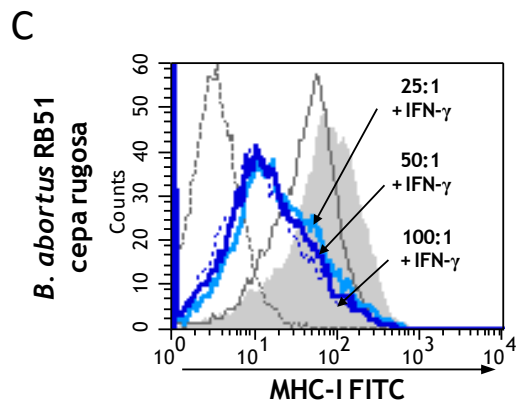
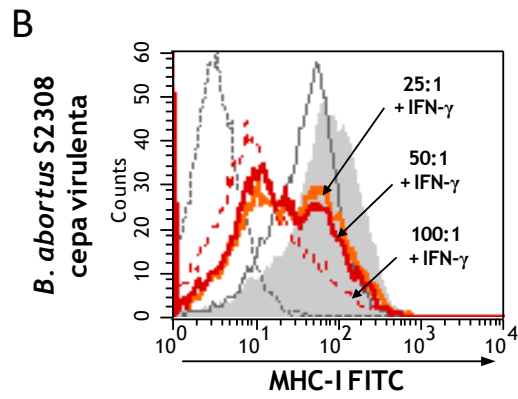
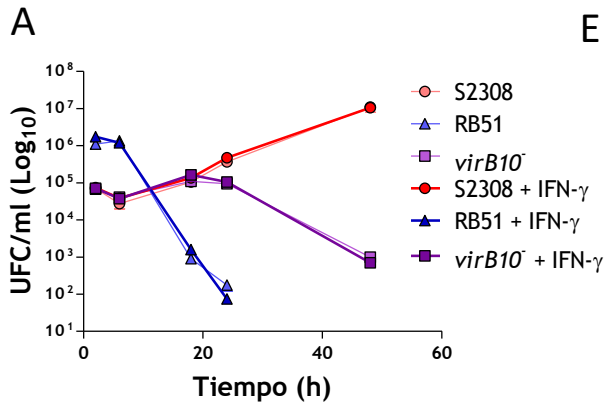


Figura 9. Las moléculas de MHC-I quedan retenidas en el aparato de Golgi mientras que *B. abortus* se aloja en vacuolas LAMP-2⁺. Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus*-GFP (MOI 100) en presencia de IFN- γ . La expresión de MHC-I se determinó utilizando un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Alexa 633 (azul). Los marcadores subcelulares fueron detectados utilizando Ac específicos para EEA1, LAMP-2, GM130 y calnexina seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Las flechas blancas indican a *B. abortus* rodeada de vacuolas LAMP-2⁺ y a MHC-I co-localizando con GM130 (marca rosa). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Cepas mutantes de *B. abortus* incapaces de persistir en monocitos también inhiben la expresión en superficie de MHC-I inducida por IFN- γ

Teniendo en cuenta que la inhibición de MHC-I mediada por *B. abortus* depende de la viabilidad bacteriana, a continuación investigamos si la capacidad de *B. abortus* para inducir dicho fenómeno estaba relacionada con la virulencia de las bacterias y/o a su capacidad de replicar en las células del hospedador. Es ampliamente sabido que cepas mutantes para factores de virulencia clave para *B. abortus*, como el antígeno O del LPS ó el sistema de secreción VirB tipo IV, son incapaces de sobrevivir intracelularmente en monocitos a pesar de tener la habilidad de infectar dichas células [70, 79, 181]. Por

lo tanto, a continuación evaluamos el efecto de dichas cepas mutantes sobre la expresión de MHC-I. Para esto, infectamos células THP-1 con *B. abortus* wild type, la cepa virulenta S2308; una mutante para el LPS de *B. abortus*, la cepa rugosa RB51; y una mutante para el sistema de secreción VirB tipo IV, la mutante *virB10*. Evaluamos en un primer momento la capacidad infectiva de estas 3 cepas lisando las células a distintos tiempos post-infección y realizando el recuento de bacterias intracelulares viables en placas de tripteína soja agar. Como era de esperar, y aún en presencia de IFN- γ , las 3 cepas de *B. abortus* fueron capaces de infectar monocitos humanos. Sin embargo, sólo *B. abortus* S2308 pudo sobrevivir intracelularmente y generar una infección estable (Figura 10A). A continuación, evaluamos la expresión en superficie de las moléculas de MHC-I a las 48 h post-infección por citometría de flujo tal como se describió anteriormente. Las 3 cepas de *B. abortus* fueron capaces de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I en la superficie celular de manera dosis dependiente (Figura 10B-D). También determinamos la localización subcelular de las moléculas de MHC-I mediante microscopía confocal en células THP-1 tratadas con IFN- γ e infectadas con las 3 cepas de *B. abortus*. Tanto las células infectadas con *B. abortus* RB51 como las infectadas con *B. abortus virB10* reprodujeron la retención intracelular de las moléculas de MHC-I dentro del aparato de Golgi observada con la cepa virulenta *B. abortus* S2308 (Figura 10E-H). Estos resultados indican que la retención intracelular de MHC-I es independiente del LPS de la bacteria y no está mediada por el sistema de secreción tipo IV VirB de *B. abortus*. A su vez, en conjunto estos resultados indican que a pesar de que las cepas mutantes de *B. abortus* son incapaces de persistir dentro de los monocitos por un largo período de tiempo, conservan la capacidad de retener a las moléculas de MHC-I dentro del aparato de Golgi, y por lo tanto, inhibir su expresión en superficie tal como lo hacen las bacterias wild type. Por otra parte, esto sugiere que el fenómeno de inhibición de la expresión de MHC-I es un evento que se dispara de manera temprana durante la infección con *B. abortus*.



----- Isotipo
 — sin tratar
 ■ IFN- γ

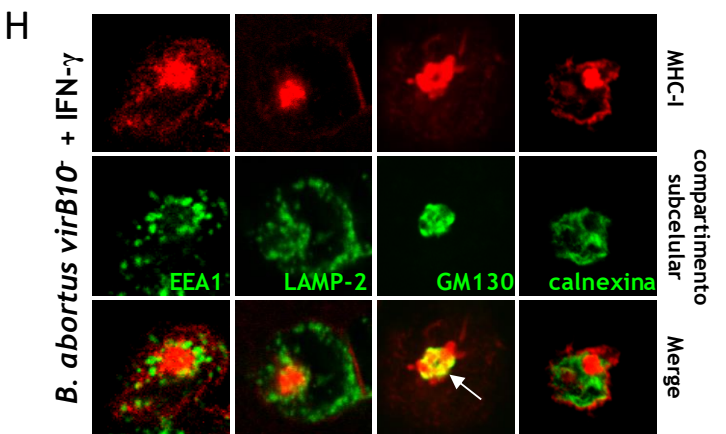
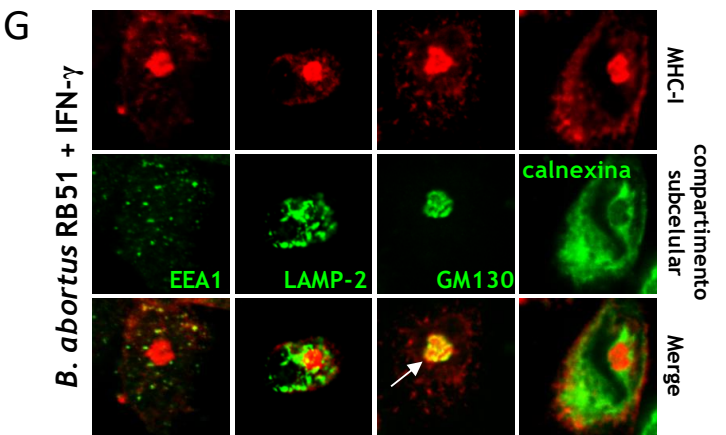
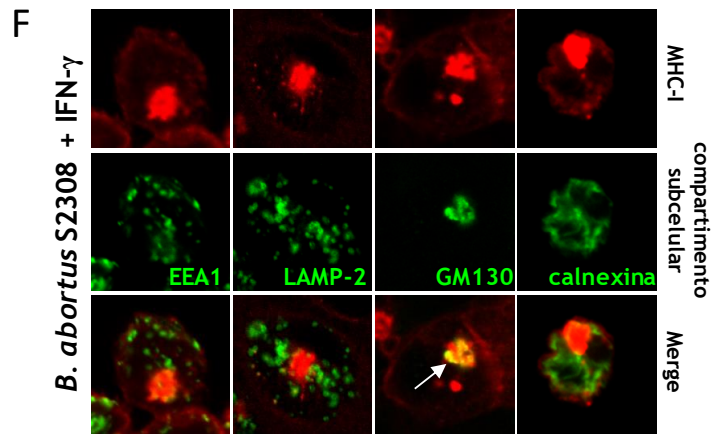
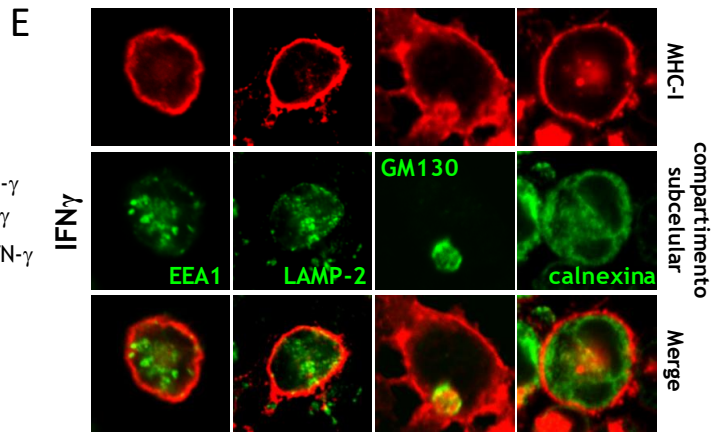


Figura 10. *B. abortus* S2308, RB51 y *virB10* inhiben la expresión en superficie de MHC-I inducida por IFN- γ y retienen a las moléculas de MHC-I dentro del aparato de Golgi. A. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* S2308, RB51 y *virB10* (MOI 100) en presencia o ausencia de IFN- γ . Se lisaron las células a distintos tiempos post-infección y se determinó el número de bacterias intracelulares viables plaqueando los lisados en tripteína soja agar. B-D. Se determinó la expresión de MHC-I en células THP-1 infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* S2308 (B), RB51 (C) y *virB10* (D) en presencia de IFN- γ por 48 h mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran un experimento representativo de 3 realizados. E-H. Microscopías confocales de células THP-1 tratadas con IFN- γ (E) o infectadas con *B. abortus* (MOI 100) S2308 (F), RB51 (G) y *virB10* (H) en presencia de IFN- γ . La expresión de MHC-I se determinó utilizando un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Los marcadores subcelulares fueron detectados utilizando Ac específicos para EEA1, LAMP-2, GM130 y calnexina seguidos de un Ac secundario conjugado a Alexa 488 (verde). Las flechas blancas indican co-localización (marca amarilla). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

La inhibición de MHC-I ocurre a tiempos tempranos durante la infección

A continuación decidimos evaluar la cinética del fenómeno de inhibición de la expresión de las moléculas de MHC-I. Para lo cual infectamos células THP-1 con las 3 cepas bacterianas a distintas MOI en presencia de IFN- γ y evaluamos la expresión de MHC-I a distintos tiempos post-infección mediante citometría de flujo. En los 3 casos la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I comenzó a visualizarse a partir de las 8 h post-infección, en especial en las MOI más altas (Figura 11A-C). A las 24 h el fenómeno se hizo más evidente y aumentó aún más a las 48 h post-infección (Figura 11A-C). Estos resultados confirman que la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus* es un fenómeno que se gatilla tempranamente durante la infección y concuerdan con que los tres tipos bacterianos fueran capaces de inhibir la expresión de las moléculas de MHC-I, si bien sólo la cepa S2308 genera una infección estable en el tiempo.

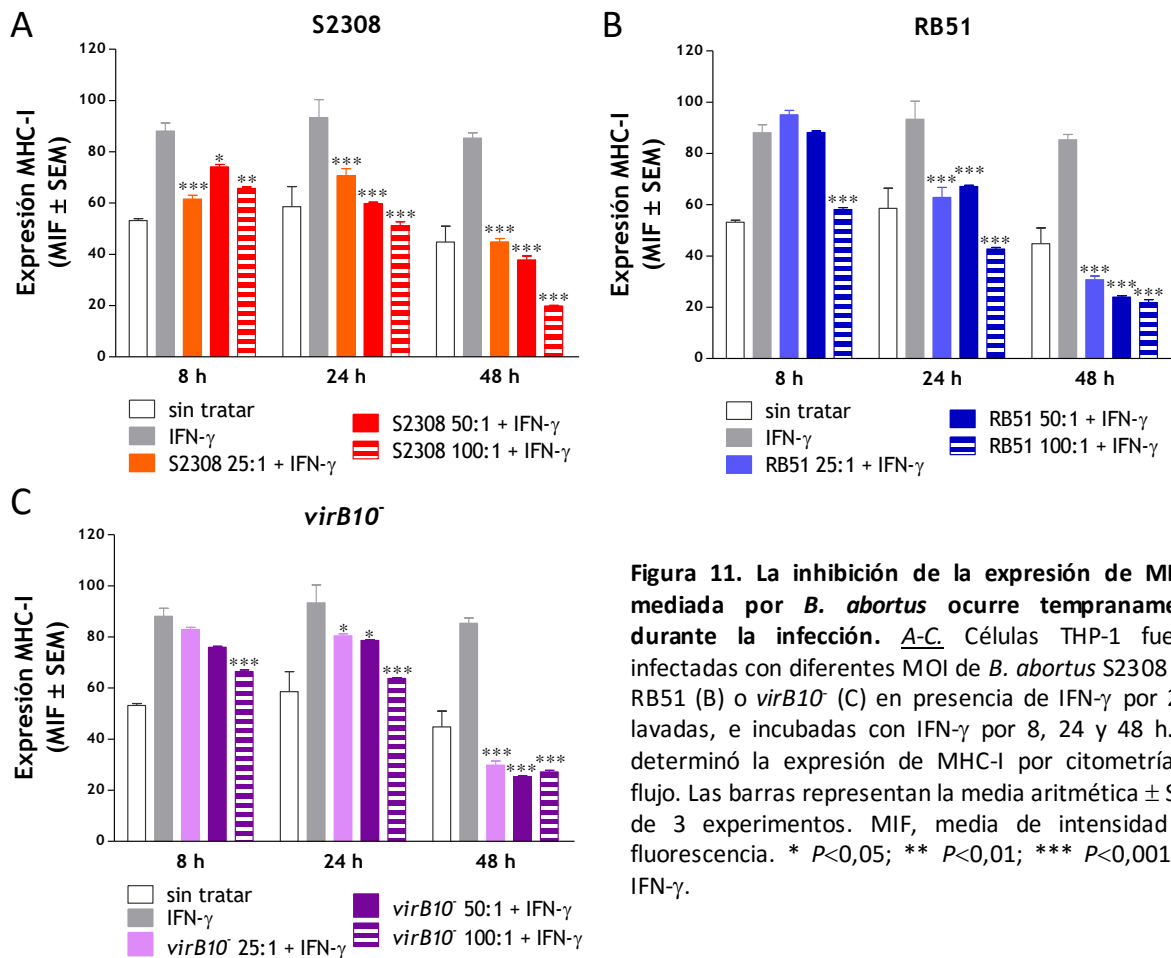


Figura 11. La inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus* ocurre tempranamente durante la infección. *A-C.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* S2308 (A), RB51 (B) o *virB10⁻* (C) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 8, 24 y 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ .

***B. abortus* inhibe la expresión de MHC-I tanto en células infectadas como en células no-infectadas**

En un cultivo de células infectadas, *B. abortus* persiste solamente en un 5-10% de las células luego de 48 h [79]. Por lo tanto nos preguntamos si la inhibición de la expresión de MHC-I era un fenómeno que ocurría en toda la población o sólo en células que contenían a *B. abortus* intracelularmente. Para dilucidar esto, infectamos células THP-1 con *B. abortus*-GFP (S2308) a distintas MOI en presencia de IFN- γ . A las 48 h marcamos las moléculas de MHC-I con un Ac conjugado a PE y evaluamos su expresión por citometría de flujo. Observamos que la población celular se dividió en dos cuando las células estaban infectadas: se mantuvo una población con alta expresión de MHC-I (proveniente de la inducción con IFN- γ) pero apareció una con baja expresión (Figura 12A). Sin embargo, la disminución en la expresión de moléculas de MHC-I ocurrió de manera global, tanto en las células no infectadas (GFP⁻) como en las infectadas (GFP⁺) (Figura 12B). Además, lo que pudimos apreciar es que a medida que aumentaba la MOI aumentaba el porcentaje de células con baja expresión de MHC-I (Figura 12C) mientras que disminuía el porcentaje de células con alta expresión (Figura 12D), y esto ocurría de manera similar tanto en las células GFP⁻ como en las GFP⁺ (Figura 12 C y D).

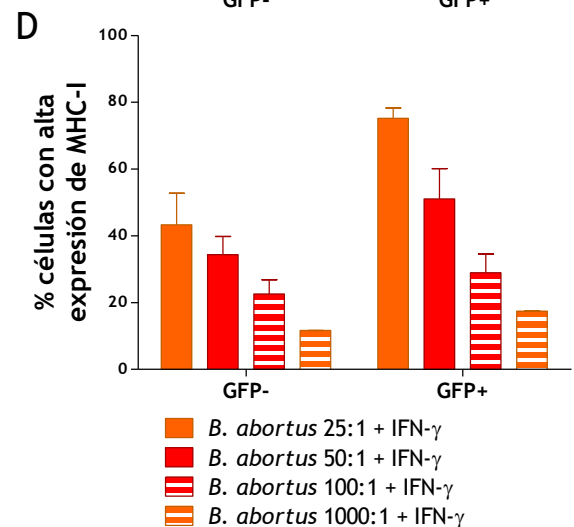
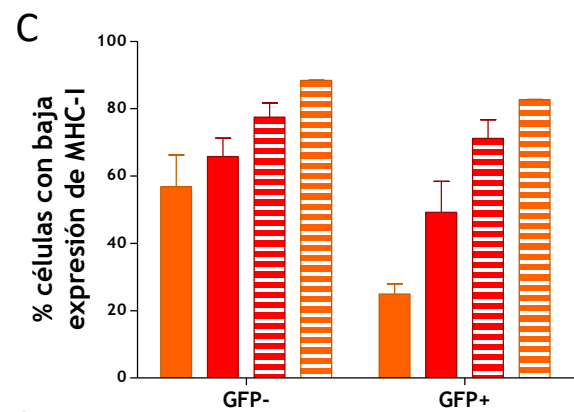
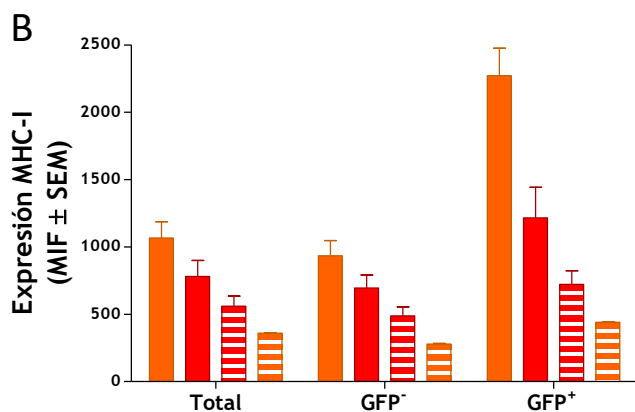
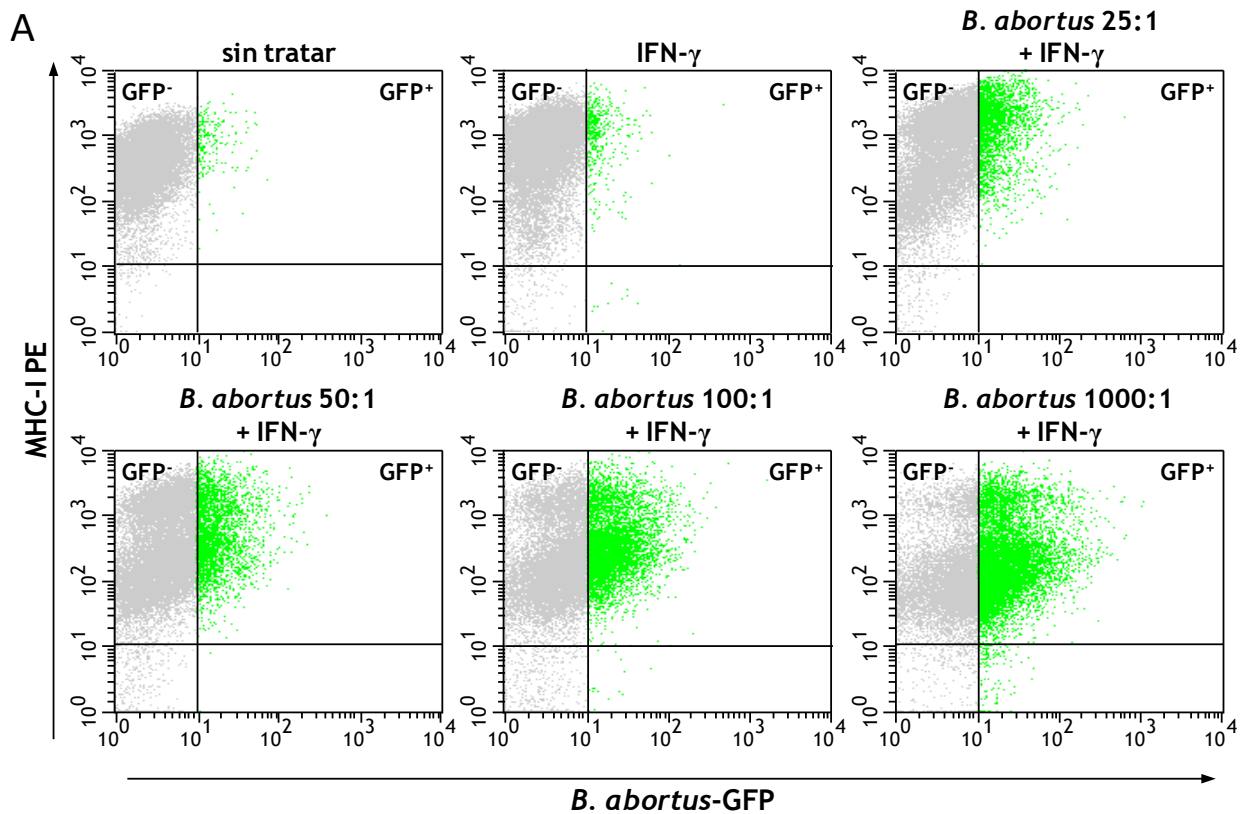


Figura 12. *B. abortus* inhibe la expresión de MHC-I en células infectadas y no-infectadas. *A-D.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus*-GFP en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo utilizando un Ac primario anti-MHC-I (W6/32) seguido de un Ac secundario conjugado a PE. *A.* Gráficos de puntos de MHC-I PE vs. *Ba*-GFP. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. *B.* Cuantificación de la expresión de MHC-I en células totales, GFP⁻ y GFP⁺. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 2 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. *C y D.* Cuantificación de las células con baja (C) o alta (D) expresión de MHC-I en las poblaciones GFP⁻ y GFP⁺. Los valores representan el porcentaje de células con baja o alta expresión de MHC-I y son la media \pm SEM de 2 experimentos.

La vía del receptor de EGF está involucrada en la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus*

Nuestros resultados con HKBA demostraban que la inhibición de MHC-I mediada por *B. abortus* requería que las bacterias estuvieran metabólicamente activas. Este hecho fue especialmente tenido en cuenta al intentar determinar la vía de señalización involucrada en el fenómeno. Es por esto que nos centramos en el estudio de la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) ya que su activación resulta en la inhibición de la expresión de MHC-I en diversas patologías infecciosas [182, 183] y es desencadenada por patógenos metabólicamente activos [184]. Para evaluar si la vía del EGFR podía estar implicada en la inhibición de MHC-I, células THP-1 fueron infectadas en presencia de un Ac bloqueante de la unión de los ligandos al EGFR (cetuximab). A continuación, evaluamos la expresión en superficie de MHC-I y la localización subcelular de estas moléculas mediante citometría de flujo y microscopía confocal respectivamente. La neutralización del EGFR revirtió de manera parcial pero significativa la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus* (Figura 13A). A su vez, el tratamiento con cetuximab fue capaz de revertir la retención intracelular de estas moléculas dentro del aparato de Golgi observada en células infectadas con *B. abortus* (Figura 13D y E). El receptor HER2 no es capaz de unir ninguno de los ligandos de los receptores ErbB de manera directa. Sin embargo, puede formar heterodímeros con el EGFR y de esta manera amplificar su actividad catalítica al aumentar la afinidad con los ligandos y/o el reciclado del receptor y su estabilidad [185-188]. Para caracterizar el rol de HER2 en la inhibición de MHC-I realizamos experimentos en presencia de trastuzumab, un Ac bloqueante de HER2. La neutralización de HER2 también revirtió de manera parcial la inhibición de la expresión en superficie y la retención en Golgi de MHC-I mediada por *B. abortus*, aunque en menor grado (Figura 13B, D y E). Por otra parte, se sabe que los ligandos de la familia de receptores ErbB (TGF- α , EGF y anfiregulina, entre otros) son sintetizados en primer lugar como proteínas transmembrana tipo I que se insertan en la membrana plasmática. Para ser transformados a su forma soluble, proteasas presentes en la superficie celular son las encargadas de clivarlos, entre las cuales TACE/ADAM17 (TNF- α -converting enzyme) es una de las más estudiadas [189-191]. Por lo tanto, otra forma de confirmar la participación de la vía del EGFR es inhibiendo esta enzima que conduce a la generación de ligandos solubles del EGFR. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de GM6001, un inhibidor químico de TACE. La inhibición de TACE revirtió significativamente tanto la inhibición de la expresión en superficie como la retención en Golgi de MHC-I mediadas por *B. abortus* (Figura 13C, D y E). En conjunto, estos resultados demuestran que la vía del EGFR está involucrada en la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus*.

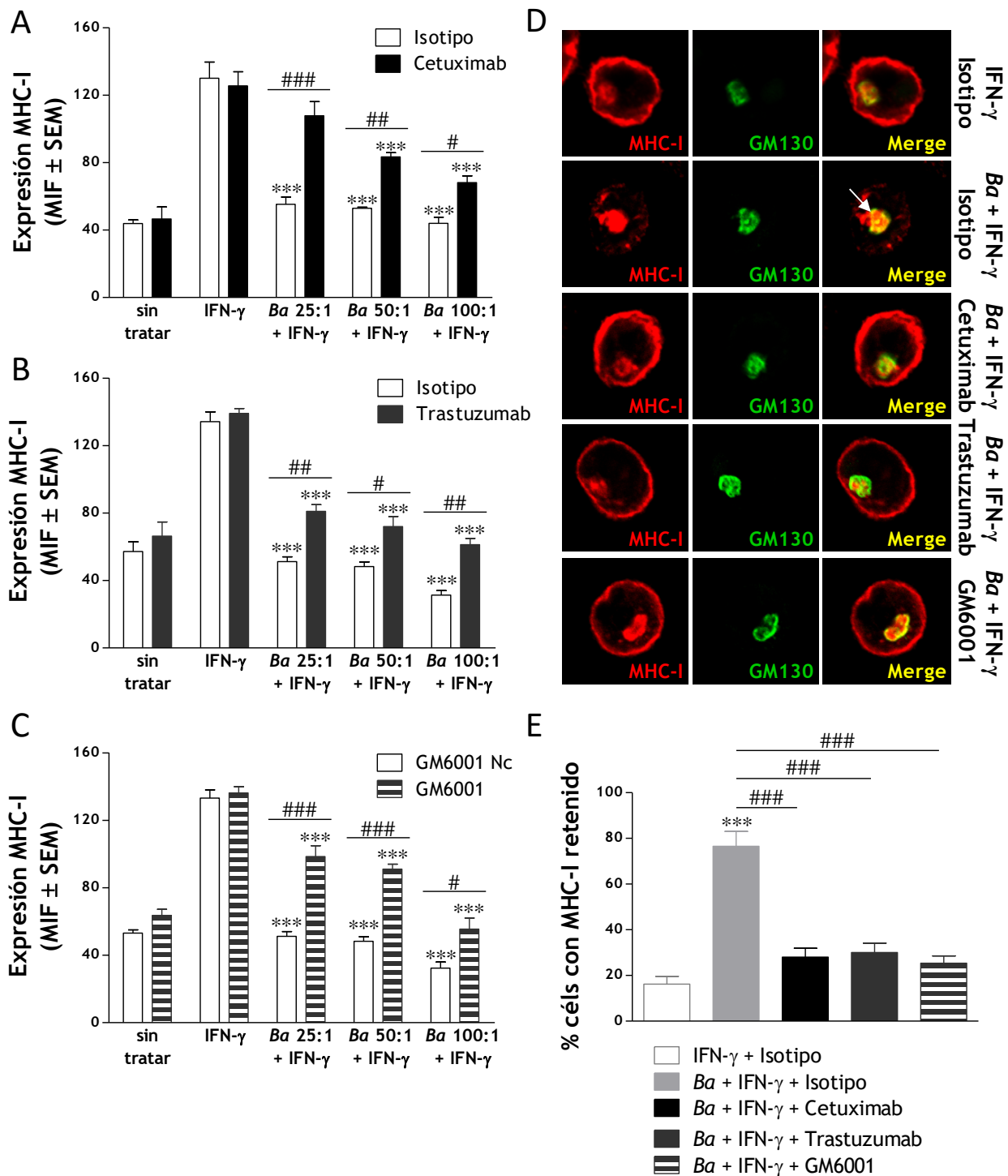


Figura 13. La vía del receptor de EGF está implicada en la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus*. A-C. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* (S2308) en presencia de IFN-γ y un Ac neutralizante del receptor de EGF (cetuximab) (A), un Ac neutralizante de HER2 (trastuzumab) (B), un inhibidor de TACE (GM6001) (C) o su correspondiente isotipo en el caso de cetuximab y trastuzumab o su correspondiente control negativo (Nc) en el caso de GM6001 por 48 h. La expresión de MHC-I fue determinada por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética ± SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. D. Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus* (MOI 100) en presencia de IFN-γ y cetuximab, trastuzumab o GM6001. Como control negativo se muestra representativamente el correspondiente al isotipo de cetuximab. La expresión de MHC-I se determinó utilizando un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). La localización subcelular en aparato de Golgi fue detectada utilizando un Ac específico para GM130 seguido de un Ac secundario conjugado a Alexa 488 (verde). La flecha blanca indica co-localización (marca amarilla). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. E. Cuantificación de la retención de MHC-I. Los valores representan el porcentaje de células con MHC-I retenido ± SEM de 2 experimentos. *** $P < 0,001$ vs. IFN-γ. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ vs. Isotipo o Nc.

Ligandos del EGFR son mediadores solubles involucrados en la regulación negativa de MHC-I mediada por *B. abortus*

Los ligandos de la familia de receptores ErbB pueden ser liberados al medio extracelular y actuar de manera autocrina y/o paracrina o pueden activar a sus receptores directamente cuando están unidos a la membrana plasmática de manera juxtacrina [189]. Nuestros resultados anteriores con el inhibidor de TACE sugerían que ligandos del EGFR eran efectivamente clivados durante la infección con *B. abortus*. Por lo tanto, decidimos evaluar si EGF y TGF- α solubles podían reproducir la inhibición de MHC-I inducida por *B. abortus*. Confirmando nuestros resultados, la exposición de células THP-1 a EGF y TGF- α recombinantes también inhibió la expresión en superficie de MHC-I (Figura 14A y B) reteniendo a las moléculas dentro del aparato de Golgi (Figura 14C y D). Es más, la combinación de EGF y TGF- α fue aún más potente en inducir ambos fenómenos (Figura 14A-D). A continuación evaluamos si sobrenadantes de células infectadas con *B. abortus* eran capaces de inhibir la expresión de MHC-I en células no infectadas. Corroborando nuestros resultados, sobrenadantes de células THP-1 infectadas con las 3 cepas de *Brucella* (*B. abortus* S2308, RB51 y *virB10*) tuvieron esta capacidad y pudieron inhibir la expresión de MHC-I de manera aún más eficiente, indicando que podrían contener una combinación de ligandos de los receptores ErbB (Figura 14E). En conjunto, estos resultados demuestran que sobrenadantes de células infectadas inhiben la expresión de MHC-I en células no infectadas y que ligandos de la familia de receptores ErbB secretados por *B. abortus* podrían ser mediadores solubles implicados en este fenómeno.

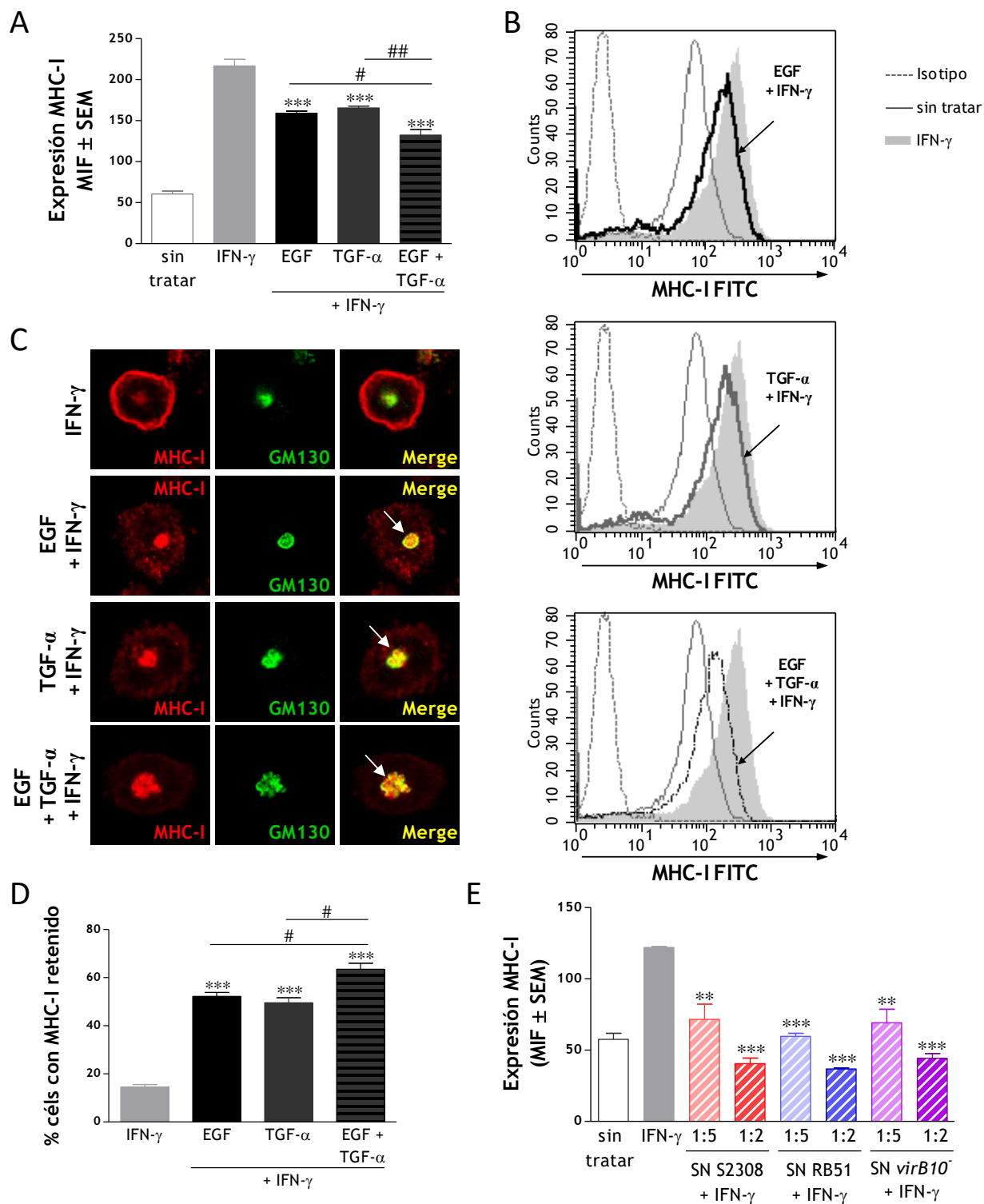


Figura 14. Ligandos del receptor de EGF son mediadores solubles involucrados en la inhibición de la expresión de MHC-I mediada por *B. abortus*. *A* y *B*. Células THP-1 fueron cultivadas en presencia de IFN- γ y EGF (25 ng/ml), TGF- α (50 ng/ml) o la combinación de ambos factores por 48 h. La expresión de MHC-I fue determinada por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. *C*. Microscopías confocales de células THP-1 cultivadas en presencia de IFN- γ y EGF, TGF- α o la combinación de ambos factores. La expresión de MHC-I se determinó utilizando un Ac primario anti-MHC-I humano (W6/32) y un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). La localización subcelular en aparato de Golgi fue detectada utilizando un Ac específico para GM130 seguido de un Ac secundario conjugado a Alexa 488 (verde). Las flechas blancas indican co-localización (marca amarilla). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. *D*. Cuantificación de la retención de MHC-I. Los valores representan el porcentaje de células con MHC-I retenido \pm SEM de 2 experimentos. *E*. Células THP-1 fueron tratadas con diluciones (1:5 y 1:2) de sobrenadantes (SN) de células infectadas con *B. abortus* S2308, RB51 o *virB10* (MOI 100) en presencia de IFN- γ por 48 h y se determinó la expresión de MHC-I por citometría de flujo. MIF, media de intensidad de fluorescencia. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ . # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ vs. EGF o TGF- α según corresponda.

DISCUSIÓN

El control inmune que ejerce el hospedador frente a la brucelosis requiere de un conjunto de células y componentes del sistema inmune, los cuales en conjunto promueven una respuesta compleja contra *Brucella* spp. [90, 162]. Sin embargo, dentro del abanico de recursos defensivos que la inmunidad adaptativa pone en juego, hay dos componentes que son determinantes para contener la infección por *Brucella*. Estos son: (i) el IFN- γ producido por las células T CD8⁺ y CD4⁺, el cual activa la función bactericida de los macrófagos para controlar la infección intracelular por *Brucella* [107, 120], y (ii) las células T CD8⁺ citotóxicas las cuales eliminan a las células blanco infectadas con la bacteria [122, 192]. Es importante destacar que el IFN- γ induce la expresión de las moléculas de MHC-I, como también el procesamiento y la presentación antigénica en los macrófagos [193]. Es más, es sabido que cuando la inmunidad adaptativa entra en juego, los linfocitos T CD8⁺ son uno de los principales actores en la contención de la infección [122, 162]. De acuerdo a esto, *B. abortus* debe poseer una estrategia efectiva para sobrevivir y establecer una infección crónica frente al poderoso desafío de linfocitos T CD8⁺ altamente equipados.

En este Trabajo de Tesis demostramos que la infección con *B. abortus* disminuye la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-I en células de la línea monocítica humana THP-1 y en monocitos humanos de sangre periférica. A su vez, demostramos que la infección con *B. abortus* también es capaz de inhibir la expresión de MHC-I inducida por distintos agonistas para TLRs. Esto no sólo indica que el efecto causado por *B. abortus* ocurre independientemente del estímulo inductor de la expresión de MHC-I, sino que también sugiere que el fenómeno podría ocurrir en ausencia de una producción establecida de IFN- γ , es decir antes de la activación de la respuesta de linfocitos Th1, en las etapas más tempranas de la infección con *B. abortus*. Por otra parte, la inhibición de la expresión de MHC-I no se debe a un efecto deletéreo de las bacterias sobre las células (ej. apoptosis) ni genera una disminución generalizada de la expresión de moléculas en la superficie celular.

Cabe destacar que la inhibición de la expresión de MHC-I correlacionó con una disminuida respuesta funcional, la cual involucró reducida citotoxicidad y secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos son considerados críticos en la respuesta protectora frente a patógenos intracelulares como *B. abortus*. La atenuación de este tipo de respuesta celular puede no sólo afectar a nivel del establecimiento de la infección, ya que una disminuida citotoxicidad podría resultar en la persistencia de células infectadas y su consecuente diseminación, sino que también podría estar impactando a nivel de la inducción de memoria y por ende promoviendo la cronicidad. Con respecto a lo primero, resultados de nuestro laboratorio demostraron la habilidad de *B. abortus* de infectar y replicar en una variedad de tipos celulares diferentes al macrófago, como osteoblastos, sinoviocitos, células epiteliales bronquiales, hepatocitos, células endoteliales, astrocitos y microglia, entre otros [58-60, 194-198]. Como cualquier otra célula nucleada de mamíferos, todas estas células expresan moléculas de MHC-I. Más allá de la relevancia de estos nichos celulares alternativos en

la historia natural de la infección por *B. abortus*, si el mecanismo que describimos para la inhibición de la expresión de MHC-I luego de la infección ocurriese en todos estos ambientes celulares, *B. abortus* podría vivir exitosamente durante mucho tiempo en el hospedador evadiendo la vigilancia de las células T CD8⁺ y pasando prácticamente inadvertida. En cuanto a la inducción de memoria y la característica crónica de la enfermedad, Durward *et al.* demostraron que las bacterias del género *Brucella* inhiben activa y persistentemente la muerte por células T CD8⁺ de células blanco portadoras de epitopes específicos de *Brucella* en ratones. Esto es llevado a cabo por una proteína de *Brucella* llamada TcpB, un efector novedoso de la evasión inmune adaptativa, que se propuso que actúa directamente sobre las células T. No solo eso, sino que los autores demostraron que era posible detectar la infección activa por *B. melitensis* en ratones BALB/c hasta un año luego de su inoculación. Por otra parte, encontraron una pobre inducción de memoria en el compartimiento T CD8⁺ y una población poco polifuncional, una característica de agotamiento celular [124]. De este modo, *Brucella* posee al menos dos mecanismos posibles para enfrentar las respuestas de los linfocitos T citotóxicos: (i) disminuyendo la expresión de las moléculas de MHC-I en la superficie de las células e (ii) inhibiendo activamente la función T CD8⁺ a través de la proteína TcpB.

Dado que las células NK son capaces de matar células blanco con reducidos niveles de moléculas de MHC-I, nuestros resultados podrían resultar paradójicos en el sentido que podrían indicar que la disminución de la expresión MHC-I por *B. abortus* podría activar a las células NK, lo cual podría llevar a la eliminación de las bacterias. Sin embargo, aunque ha sido demostrado *in vitro* que las células NK humanas son capaces de matar macrófagos infectados con *B. suis*, esto ocurre independientemente de la inhibición de las moléculas de MHC-I [97]. Por otra parte, los humanos con brucelosis aguda tienen suprimida actividad NK [100], lo cual, junto con los resultados en ratón que muestran que las NK no poseen un rol en el control de la infección [99], apoyarían la noción de que las células NK (como células de la inmunidad innata) tendrían una función irrelevante en el control de microorganismos de replicación lenta como *Brucella* spp., los cuales causan infecciones crónicas [162].

En cuanto al mecanismo molecular de la inhibición de MHC-I, *B. abortus* podría interferir con diversos pasos que llevan a la expresión de las moléculas MHC-I, incluyendo la transcripción/traducción de la cadena pesada de MHC-I, degradación de la misma y transporte del complejo MHC-I-péptido a la superficie celular [199, 200]. Nuestros resultados demuestran que la transcripción del ARNm de MHC-I no sólo no fue disminuida sino que se encuentra significativamente aumentada por la infección con *B. abortus*. A su vez, mediante WB demostramos que los niveles proteicos totales de MHC-I permanecen no alterados en las células infectadas con *B. abortus*. En conjunto, estos resultados demuestran que la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-I en superficie mediada por *B. abortus* no se correlaciona con una disminuida transcripción ni síntesis proteica de estas moléculas, excluyendo así la posibilidad de una transcripción/traducción reducida de la cadena pesada de MHC-I o

una posible degradación de dicha cadena. Más bien, nuestros resultados indican que la inhibición de la expresión en superficie de MHC-I por la infección con *B. abortus* es mediada por la retención intracelular de las moléculas.

Aunque la reducción de la expresión de MHC-I en las células del hospedador es un mecanismo de evasión inmune ampliamente descrito para varios virus [201, 202] y tumores [203], también ha sido caracterizada la regulación de la expresión de las moléculas de MHC-I durante algunas infecciones bacterianas. De hecho, ciertas enterobacterias [204], *Legionella pneumophila* [205], *Chlamydia pneumoniae* [206] y *Mycobacterium avium* [207] promueven la disminución de la expresión de MHC-I. Sin embargo, nuestros resultados muestran un mecanismo novedoso de inhibición de la expresión de MHC-I utilizado por bacterias: la retención intracelular de estas moléculas, una estrategia ampliamente utilizada y muy bien caracterizada en muchas infecciones virales [199, 200, 208, 209].

El modo por el cual *B. abortus* retiene a las moléculas de MHC-I en el interior celular amerita una discusión aparte. Considerando que las bacterias se localizan dentro del RE durante la fase replicativa de su ciclo de vida, la explicación más parsimoniosa quizás sería que *B. abortus* una vez dentro del RE interrumpa de alguna manera el ensamblado de MHC-I, generando moléculas abortivas que no pueden completar su tráfico intracelular hacia la superficie celular. *B. abortus* podría estar provocando estrés dentro del RE y consecuentemente, alterar el cargado de péptidos en las moléculas de MHC-I, generando moléculas inmaduras que podrían quedar retenidas en el RE, como se observa con otros microorganismos [208, 209]. Efectivamente, Smith *et al.* reportaron que la infección con *B. melitensis* induce la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response, UPR), una marca de estrés del RE, a través de la proteína TcpB en macrófagos murinos [210]. Sin embargo, nosotros demostramos que la retención intracelular de MHC-I está confinada al aparato de Golgi. La detección de moléculas de MHC-I dentro del aparato de Golgi con el anticuerpo monoclonal W6/32, el cual reconoce moléculas de MHC-I correctamente plegadas asociadas con β 2-microglobulina (moléculas maduras) [211], indica que las moléculas de MHC-I están ensambladas apropiadamente. Esto sugiere que el arresto en el transporte de MHC-I ocurre luego de la formación del complejo MHC-I-péptido antigénico en el RE y sería en cambio una falla en el transporte celular a través de los compartimentos del aparato de Golgi. Sin embargo, aún persiste el interrogante acerca del mecanismo utilizado por *B. abortus* para evitar que las moléculas de MHC-I salgan del aparato de Golgi y alcancen la membrana plasmática. A este respecto, las bacterias podrían estar utilizando distintos mecanismos:

- (i) Fue descrito que otros patógenos inducen retención intracelular de MHC-I en el aparato de Golgi por alterar la acidificación de dicho compartimiento [200]. A su vez, fue demostrado que dicha falla en la acidificación se debe a la inhibición de las ATPasas vacuolares por proteínas de los patógenos [212]. Si bien *B. abortus* a lo largo de su ciclo de vida nunca transita a través del aparato de Golgi, nosotros especulamos que cuando la bacteria se encuentra en el RE en la fase

replicativa del ciclo, ésta podría secretar proteínas que por interactuar con MHC-I recientemente sintetizadas transitarían a través de retículo y Golgi inhibiendo las ATPasas vacuolares. Esto llevaría a una inadecuada acidificación del aparato de Golgi y a la retención de MHC-I observada en dicho compartimiento.

(ii) Recientemente fue publicado que varios patógenos interfieren con la expresión de MHC-I en superficie por alterar la maquinaria de transporte vesicular y la estructura y función del aparato de Golgi [213]. Es posible, que la retención de MHC-I en el aparato de Golgi observada durante la infección con *B. abortus* se deba al incorrecto funcionamiento de la maquinaria de transporte vesicular a lo largo de los distintos compartimientos del aparato de Golgi (*cis-*, *medial-* y *trans-golgi*), o de Golgi a superficie.

(iii) Fue reportado que la incorrecta acidificación de Golgi interfiere con el tránsito de proteínas a través de dicho compartimento por impedir la correcta glicosilación de las proteínas [208]. Por lo tanto, la infección con *B. abortus* podría afectar el tránsito de MHC-I a la superficie por modificar la acidez de Golgi y por ende la glicosilación de las moléculas MHC-I.

Un hecho que es importante recalcar es que la inhibición de MHC-I mediada por *B. abortus* fue dependiente de la viabilidad bacteriana, tal como fue demostrado por la incapacidad de HKBA de inhibir la expresión de dichas moléculas. Este último resultado nos llevó a pensar que algún aspecto del metabolismo bacteriano, como la virulencia, debía estar involucrado en la inhibición de MHC-I mediada por *B. abortus*. La virulencia de *B. abortus* reside en la habilidad de este microorganismo de ingresar, sobrevivir y replicar dentro de los compartimentos fagocíticos vacuolares de los macrófagos [166, 214]. Una vez dentro del macrófago, *Brucella* habita en un compartimento acidificado que se fusiona con componentes de la vía endosomal/lisosomal temprana y tardía [79, 81]. Allí, la gran mayoría de las bacterias mueren rápidamente. Sin embargo, el establecimiento de una infección persistente depende de la capacidad de la bacteria para formar una vacuola que contiene *Brucella* (BCV), la cual transita del compartimento endocítico al RE [79, 166, 167]. Una vez en el interior de la BCV replicativa, las bacterias son resistentes a nuevos ataques y comienzan a multiplicarse dramáticamente [79, 167]. *Brucella* también inhibe la apoptosis de macrófagos [21, 168], lo que a su vez favorece su supervivencia y la replicación.

Numerosos factores de virulencia fueron descritos en los diversos estadios del ciclo intracelular de *Brucella*, entre los cuales se incluyen el LPS y el sistema de secreción tipo VI VirB [36, 215]. Avances en asignar funciones a estos factores de virulencia demostraron que la cadena O de polisacáridos del LPS inhibe la fagocitosis, protegiendo a la bacteria del fagolisosoma e inhibiendo la apoptosis de la célula del hospedador [21, 70, 216], y que el sistema de secreción tipo VI VirB está involucrado en el control de la maduración de la BCV en una organela permisiva para la replicación [84, 181]. Como consecuencia, fue

reportado que las cepas rugosas de *Brucella* (las cuales tienen un LPS que carece de la cadena O) y cepas de *Brucella* deficientes en el sistema de secreción VirB tienen afectada virulencia respecto de las cepas de *Brucella* lisas virulentas [70, 79, 181]. Esto nos motivó a probar si dichas mutantes eran capaces de modular la expresión de MHC-I. Sorprendentemente, aunque ambas cepas mutantes de *B. abortus* son incapaces de persistir en monocitos por largos períodos de tiempo, ellas no sólo inhiben la expresión en superficie de las moléculas MHC-I sino que también inducen la retención intracelular de dichas moléculas en aparato de Golgi al igual que *B. abortus* wild type.

Estos resultados junto con los que demuestran que HKBA es incapaz de inhibir la expresión de MHC-I indican que el fenómeno requiere que las bacterias se encuentren viables y metabólicamente activas pero es independiente de dos de los factores clave de virulencia de *B. abortus*: el LPS y el sistema de secreción tipo IV VirB de la bacteria. A su vez, esto sugería que el fenómeno debía ser disparado de manera temprana durante la infección. En otras palabras, que el mismo debía ocurrir durante el lapso de tiempo antes de que las bacterias sean eliminadas, y/o mediado por algún producto que se produce de manera temprana en respuesta a la infección. Efectivamente los experimentos de cinética indicaron que la inhibición de MHC-I inducida por *B. abortus* se empieza a visualizar a partir de las 8 h post-infección, y a las 24 y 48 h el fenómeno se acentúa. Más aún, también demostramos que la inhibición de MHC-I ocurre en toda la población celular a pesar de que la capacidad de infección de los monocitos por *B. abortus* es sólo de aproximadamente un 5-10% [79]. En conjunto, estos resultados nos llevaron a pensar en un posible mecanismo indirecto en juego compartido por las 3 cepas y a investigar los potenciales factores o vías involucradas en el fenómeno.

Las bacterias intracelulares comparten múltiples estrategias de evasión inmune con diversos virus y tumores. En particular la disminución de la expresión de moléculas de MHC-I es una estrategia tremendamente explotada por virus y tumores [202, 217-219]. Los mecanismos descritos hasta ahora para lograr este fin son diversos. Recientemente se reportó la importancia de la vía del EGFR en la expresión de CIITA y las moléculas de MHC-I y MHC-II [182, 183]. Pollack *et al.* describieron que la utilización de inhibidores del EGFR es capaz de aumentar la expresión basal e inducida por IFN- γ de MHC-I y MHC-II en queratinocitos humanos primarios y malignos [182]. La asociación entre la vía del EGFR y la expresión de estas moléculas se basaba en la capacidad del IFN- γ de inducir la transactivación del EGFR [220]. Si bien el IFN- γ podría ser en parte responsable de la activación de la vía, múltiples receptores de la familia de los TLRs también son capaces de generar el mismo efecto [191]. Particularmente en el caso de los rinovirus, la activación de la vía del EGFR ha sido relacionada a la señalización a través de TLR3, específicamente por microorganismos metabólicamente activos capaces de replicar [184].

Todos estos antecedentes nos llevaron a pensar que la vía del EGFR podía estar implicada en la disminución de MHC-I mediada por *B. abortus*. Los receptores ErbB pertenecen a una familia de receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa que incluye 4 miembros: el receptor del factor

de crecimiento epidérmico (EGFR; ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) [221]. Nosotros evaluamos la participación de esta vía mediante la utilización de inhibidores para al menos dos de los receptores de la familia, el EGFR y HER2. En ambos casos, logramos la reversión parcial de la inhibición de la expresión de las moléculas de MHC-I en superficie y de su retención intracelular dentro del aparato de Golgi mediadas por *B. abortus*. Asimismo, observamos que la utilización de un inhibidor para la enzima TACE también fue capaz de revertir ambos fenómenos. Este último resultado refuerza la participación de la vía del EGFR dado que TACE es una de las metaloproteasas presentes en la superficie celular encargadas de clivar a los ligandos del receptor de EGF, los cuales son sintetizados primero como proteínas transmembrana [189, 190].

La capacidad de ligandos del EGFR tales como el EGF y TGF- α de atenuar respuestas mediadas por IFN- γ ya ha sido previamente reportada [222]. De manera similar y en línea con nuestros resultados anteriores, el tratamiento exógeno tanto con EGF como con TGF- α recombinantes inhibieron la expresión en superficie de MHC-I, y fueron capaces de inducir la retención dentro del aparato de Golgi al igual que *B. abortus*. La observación de que la combinación de ambos potencia estos fenómenos nos permitió explicar la incrementada eficiencia que tienen los sobrenadantes de infección para inhibir la expresión de MHC-I, ya que los mismos podrían contener una combinación de ligandos del receptor de EGF.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer reporte que describe que una bacteria utiliza la vía del EGFR para inhibir la expresión de MHC-I. Este hallazgo podría llegar a tener una gran relevancia terapéutica si consideramos que inhibidores del EGFR tales como cetuximab y trastuzumab son actualmente empleados en pacientes oncológicos [223]. Si bien los resultados en estos pacientes no siempre son favorables, se podría considerar su utilización en individuos con brucelosis crónica. En estos pacientes, una terapia conjunta con antibióticos podría favorecer la reactivación de la respuesta inmune promoviendo la resolución de la infección.

Entonces en esta primera parte, demostramos que *B. abortus* de manera temprana y, a través de un componente asociado a su viabilidad, genera la activación de la vía del EGFR. Esto a su vez lleva a la retención de las moléculas de MHC-I dentro del aparato de Golgi y la consecuente inhibición de la expresión en superficie de las moléculas de MHC-I. Finalmente, esta inhibición genera una disminución en la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺ citotóxicos evadiendo su vigilancia inmunológica (Figura Modelo MHC-I).

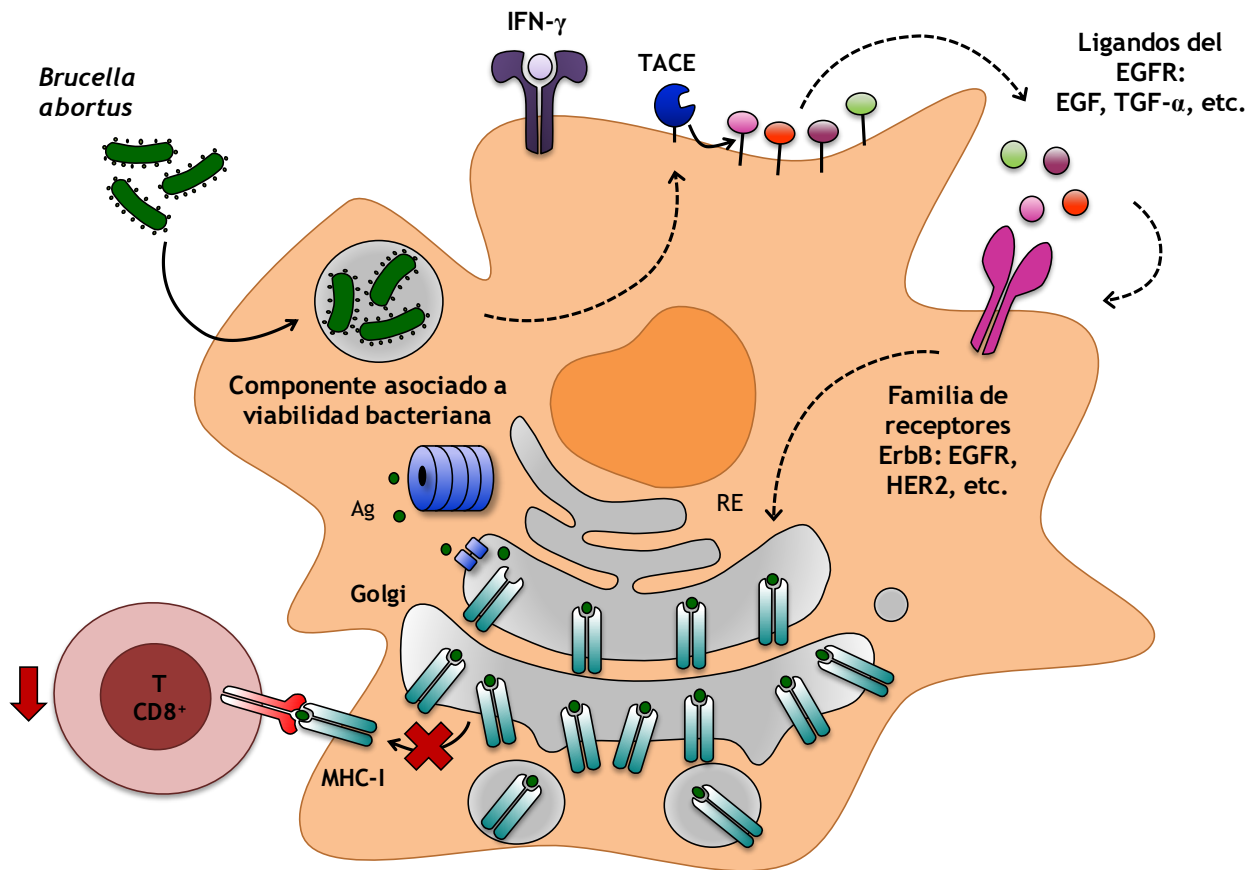


Figura Modelo de MHC-I. Descripción en el texto.

PARTE II

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias.

Bacterias *B. abortus* S2308 y S2308-GFP fueron crecidas en triptona de soja agar, suplementada con extracto de levadura (Merck Millipore). El número de bacterias en los cultivos en fase estacionaria fue determinado por comparación de la densidad óptica a 600 nm con una curva estándar. Todas las manipulaciones con las bacterias vivas se realizaron en el área de bioseguridad de nivel 3 del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, Facultad de Medicina, UBA.

Expresión y purificación de la proteína recombinante Omp19 de B. abortus.

La proteína de membrana externa de *B. abortus* de 19kDa lipidada (L-Omp19) así como la versión no lipidada de la misma (S-Omp19) fueron obtenidas como fue descrito previamente [104]. Para eliminar la contaminación con LPS de *E. coli*, las proteínas recombinantes obtenidas fueron adsorbidas con Sepharosa-Polimixina B (Sigma Aldrich). Ambas proteínas contuvieron una concentración menor a 0,25 U de endotoxina/ μ g de proteína según se determinó por el ensayo de Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (Lonza). La concentración proteica se determinó por el ensayo de BCA (Pierce) utilizando seroalbúmina bovina como estándar. Las proteínas purificadas fueron alicuotadas y conservadas a -70°C hasta el momento de ser utilizadas.

Células.

Las células de la línea monocítica humana THP-1 fueron obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection) y cultivadas en medio estándar compuesto por RPMI 1640 suplementado con 25mM de Buffer HEPES, 2mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Natocor), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Para inducir la maduración las células fueron cultivadas con 0,05 μ M de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (Calbiochem Merck Millipore) por 72 h. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) de sangre humana colectada de individuos adultos sanos del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas. La sangre fue obtenida del descarte de bolsas de donantes voluntarios y los datos de los individuos no fueron recolectados (p. ej. nombre, sexo, etc.), garantizando el carácter anónimo de los donadores. Los monocitos humanos fueron obtenidos luego de la centrifugación de los PBMCs en un gradiente de Percoll (GE Healthcare) y luego resuspendidos en medio estándar. La viabilidad celular se midió por el test de exclusión de azul de tripán y fue mayor al 95% en todos los experimentos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Macrófagos murinos derivados de médula ósea (MO) fueron generados mediante la diferenciación de progenitores de MO utilizando medio condicionado de células L como fuente de M-CSF, como fue previamente descrito [224]. Para realizar la delección condicional de SOCS-3 en los macrófagos, ratones $\text{SOCS3}^{\text{fl/fl}}$ [225] (cedidos por el Dr. Akihiko Yoshimura, Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón) fueron

retrocruzados al background de C57BL/6 por 10 generaciones y luego cruzados con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la Lisozima M (LysMCre) [226] (cedidos por el Dr. Irmgard Förster, Universidad Técnica de Munich, Alemania). MOs provenientes de ratones SOCS3^{fl/fl} positivos o negativos para LysMcre fueron utilizadas para diferenciar macrófagos deficientes en SOCS-3 o controles, respectivamente.

Infecciones in vitro.

Células THP-1 o monocitos humanos ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron infectados con *B. abortus* a distintas multiplicidades de infección (MOI) por 2 h en medio sin antibiótico en presencia de 150 U/ml de IFN- γ (Endogen). Posteriormente, se lavaron las células extensivamente para remover las bacterias no internalizadas y se incubaron en medio suplementado con IFN- γ , 100 μ g/ml de gentamicina y 50 μ g/ml de estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares que pudieran haber quedado por 4, 24 o 48 h adicionales.

Citometría de flujo.

Células THP-1 o monocitos humanos ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron infectados con diferentes MOI (10: 1, 25:1, 50:1 y 100:1) de *B. abortus* S2308 o *B. abortus* S2308-GFP o fueron incubados con distintas concentraciones de L-Omp19 (100, 500 y 1000 ng/ml), S-Omp19 (1000 ng/ml) o IL-6 recombinante humana (0,1 y 10 ng/ml) (eBioscience) en presencia de IFN- γ por 24 o 48 h. Para determinar la expresión en superficie, las células luego fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo (Ac) monoclonal anti-HLA-DR humano (clon L243; BD Pharmingen) o un Ac anti-CD74 humano (clon By2; SantaCruz Biotechnology) conjugados a FITC, o un Ac anti-HLA-DR humano (clon Tü36; Molecular Probes Life Technologies) conjugado a PE o sus respectivos controles de isotipo. Alternativamente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y permeabilizadas con saponina al 0,1% previo a la marcación con los distintos Ac para determinar la expresión total. Para determinar la expresión intracelular, las células fueron infectadas con *B. abortus* por 4 o 24 h, lavadas y marcadas con un Ac anti-STAT1 fosforilado (Tyr701) humano conjugado a PE (clone KIKSI0803; eBioscience) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de la marcación, las células fueron lavadas y analizadas con un citómetro de flujo FACSCalibur® (BD Biosciences) y los datos procesados con el software CellQuest (BD Biosciences). En los experimentos con macrófagos murinos, macrófagos derivados de MO de ratones deficientes en SOCS-3 o ratones control fueron incubados con L-Omp19 (200 y 500 ng/ml) en presencia de 10 ng/ml de IFN- γ murino recombinante por 48 h. Para determinar la expresión en superficie de MHC-II, las células fueron marcadas con un Ac anti-IA/IE (clon M5/114.15.2; eBiosciences) conjugado a APC y luego analizadas con un citómetro de flujo FACSCanto II® (BD Biosciences) y los datos procesados con el software FACSDiva (BD Biosciences).

Western Blot.

Células THP-1 (1×10^6 células/ml) fueron infectadas con diferentes MOI (10:1, 25:1, 50:1 y 100:1) de *B. abortus* S2308 en presencia de IFN- γ . A las 48 h las células fueron lavadas y lisadas por incubación en 0,2 ml de buffer frío conteniendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 1% de SDS, 1% de Tritón X-100, 1% de deoxicolato de sodio, 100 μ g/ml de gentamicina, 50 μ g/ml de estreptomicina, 0,2% de azida y un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) por 2 h a -70°C . Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C . La concentración proteica fue determinada utilizando el ensayo de BCA (Thermo Scientific Pierce). Cantidades iguales de proteína (20 μ g) de cada tratamiento fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 10%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham GE Healthcare) por 1 h a 300 mA y se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS 0,05 % de Tween-20 durante una noche a 4°C . Luego, se incubó la membrana con un Ac policlonal anti-MHC-II humano (dilución 1:20) (clon L243; purificado del sobrenadante de cultivo de un hibridoma murino), un Ac anti-Catepsina S humana hecho en ratón (dilución 1:100) (clon B-12; Santa Cruz Biotechnology), un Ac anti-IRF-1 humano hecho en ratón (dilución 1:200) (clon 13H3A44; Biolegend) o un Ac anti-STAT1 fosforilado (Tyr701) humano hecho en conejo (dilución 1:1000) (clon D4A7; Cell Signaling Technology) durante una noche. Se lavaron las membranas 3 veces con TBS 0,05% de Tween-20 y se las incubó por 1 h con un Ac secundario anti-IgG de ratón o de conejo hecho en cabra conjugado a HRP (Santa Cruz Biotechnology). La inmunoreactividad luego fue detectada utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific Pierce). Las bandas proteicas fueron visualizadas utilizando placas radiográficas Kodak Medical X-Ray General Purpose Film. Para los controles de carga interna, se removieron los Ac (stripping) incubando las membranas en buffer conteniendo 1,5% de Glicina, 0,1% de SDS y 1% de Tween-20 a pH 2,2 por 10 min dos veces. Luego, se volvieron a revelar utilizando un Ac anti- β -actina hecho en ratón (dilución 1:2000) (clon AC-15; Sigma-Aldrich). Los resultados de Western Blot fueron obtenidos por análisis densitométrico de las bandas utilizando el software Image J.

Microscopía confocal.

Células THP-1 ($0,2 \times 10^6$ células/pocillo) fueron incubadas en un portaobjetos con pocillos (chamber slide) con 10 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich) por 24 h para promover su adherencia. Luego, las células fueron infectadas con *B. abortus* S2308 o *B. abortus* S2308-GFP (MOI 100:1) en presencia de IFN- γ por 48 h, fijadas con PFA al 2%, permeabilizadas con 0,1% de saponina e incubadas con un Ac monoclonal primario anti-HLA-DR humano (clon L243; purificado del sobrenadante de cultivo de un hibridoma murino) y luego con un Ac secundario anti-IgG2a de ratón conjugado a Alexa 546 (Molecular Probes Life Technologies). Luego de la marcación los portaobjetos fueron montados con PolyMount (Polysciences) y analizados utilizando

un microscopio confocal FV-1000 con un objetivo de inmersión en aceite de Plano Apocromático 60X NA1.42 (Olympus).

Extracción de ARNm y PCR en tiempo real.

Células THP-1 o monocitos humanos (1×10^6 células/ml) fueron infectados con *B. abortus* S2308 (MOI 100) o incubados con L-Omp19 (1000 ng/ml), S-Omp19 (1000 ng/ml) o IL-6 recombinante humana (0,1 y 10 ng/ml) (eBioscience) en presencia de IFN- γ por 24 o 48 h. Se extrajo el ARN total utilizando el kit comercial Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) y luego 1 μ g de ARN fue sometido a transcripción reversa utilizando la enzima ImpromII (Promega). Se realizó el análisis de PCR con el sistema de detección Mx3000P (Stratagene) utilizando SYBR Green como fluorocromo de unión a ADN. Los sets de primers utilizados para la amplificación fueron los siguientes: GAPDH sense 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3', GAPDH antisense 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'; HLA-DRA sense 5'-AGACAAGTTCACCCACCCAG-3', HLA-DRA antisense 5'-AGCATCAAACCTCCAGTGCT-3'; CIITA sense 5'-CCGACACAGACACCATCAAC-3', CIITA antisense 5'-TTTTCTGCCCAACTTCTGCT-3'; Cathepsin S sense 5'-TTATGGCAGAGAAGATGTCC-3', Cathepsin S antisense 5'-AAGAGGGAAAGCTAGCAATC-3'; SOCS-1 sense 5'-CTTCCGCACATTCCGTTCG-3', SOCS-1 antisense 5'-GGCTGCCATCCAGGTGAAAG-3'; SOCS-3 sense 5'-CTACTGAACCCTCCTCCG-3', SOCS-3 antisense 5'-TCTCATAGGAGTCCAGG-3'. El protocolo de amplificación para GAPDH, HLA-DRA, CIITA y Catepsina S fue de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos. Para SOCS-1 fue de 40 ciclos de 95°C por 60 segundos, 68°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos. Para SOCS-3 fue de 40 ciclos de 95°C por 60 segundos, 58°C por 60 segundos y 72°C por 45 segundos. Todos los sets de primers produjeron una única banda y del tamaño en pares de bases esperado. La expresión relativa fue normalizada utilizando a GAPDH como gen house-keeping. El fold change fue calculado mediante el método de $\Delta\Delta$ CT y utilizando la condición sin tratar como calibrador. En los experimentos con macrófagos murinos, macrófagos derivados de MO de ratones deficientes en SOCS-3 o ratones control fueron incubados con L-Omp19 (200 y 500 ng/ml) en presencia de 10 ng/ml de IFN- γ murino recombinante por 24 h. El ARN total se extrajo utilizando Trifast (Peqlab) y se generó el ADNc utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para el análisis de PCR en tiempo real, se seleccionaron primers y sondas para *Hprt*, *Socs3*, *lab1* y *C2ta* de la biblioteca Universal de Sondas (Roche) las cuales están disponibles a pedido. *Hprt* fue usado como control house-keeping y el fold change fue calculado mediante el método de $\Delta\Delta$ CT y utilizando la condición sin tratar como calibrador.

Neutralización de IL-6.

Células THP-1 ($0,5 \times 10^6$ células/ml) fueron tratadas con L-Omp19 (100 ng/ml) en presencia de IFN- γ y un Ac monoclonal bloqueante anti-IL-6 humana (clon MQ2-13A5; eBioscience) o su correspondiente isotipo

a una concentración de 40µg/ml por 48 h. Las células luego fueron marcadas para citometría de flujo o se extrajo el ARN para realizar PCR en tiempo real como fue previamente descrito.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de la varianza de uno o dos factores (ANOVA) con un *post-hoc* test de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.00.

RESULTADOS

***Brucella abortus* disminuye la expresión en superficie e intracelular de las moléculas de MHC-II maduras inducida por IFN- γ**

Previamente demostramos que la infección con *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-II maduras en superficie de células monocíticas humanas [176]. Con el objetivo de corroborar este fenómeno e investigar si no solo se extendía a la superficie celular, infectamos células THP-1 con diferentes MOI de *B. abortus* (10:1, 25:1, 50:1 y 100:1) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavamos las células para remover a las bacterias no internalizadas y luego mantuvimos la infección en presencia de IFN- γ por 48 h adicionales. A continuación, la expresión total y en superficie de las moléculas de MHC-II fue evaluada por citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal L243, el cual reconoce únicamente moléculas de MHC-II maduras. Para determinar las moléculas de MHC-II asociadas a la membrana celular marcamos células fijadas y no permeabilizadas, mientras que para evaluar la cantidad total de moléculas de MHC-II utilizamos células fijadas y permeabilizadas con saponina. Confirmando nuestros resultados previos, la infección con *B. abortus* inhibió la expresión inducida por IFN- γ en superficie de las moléculas de MHC-II maduras de manera dosis dependiente (Figura 15A y B). Pudimos detectar una disminución significativa de la expresión de MHC-II en cultivos infectados con 25 bacterias/célula o más. Asimismo, la infección con *B. abortus* fue capaz de reducir los niveles totales de expresión de MHC-II maduras (Figura 15C y D).

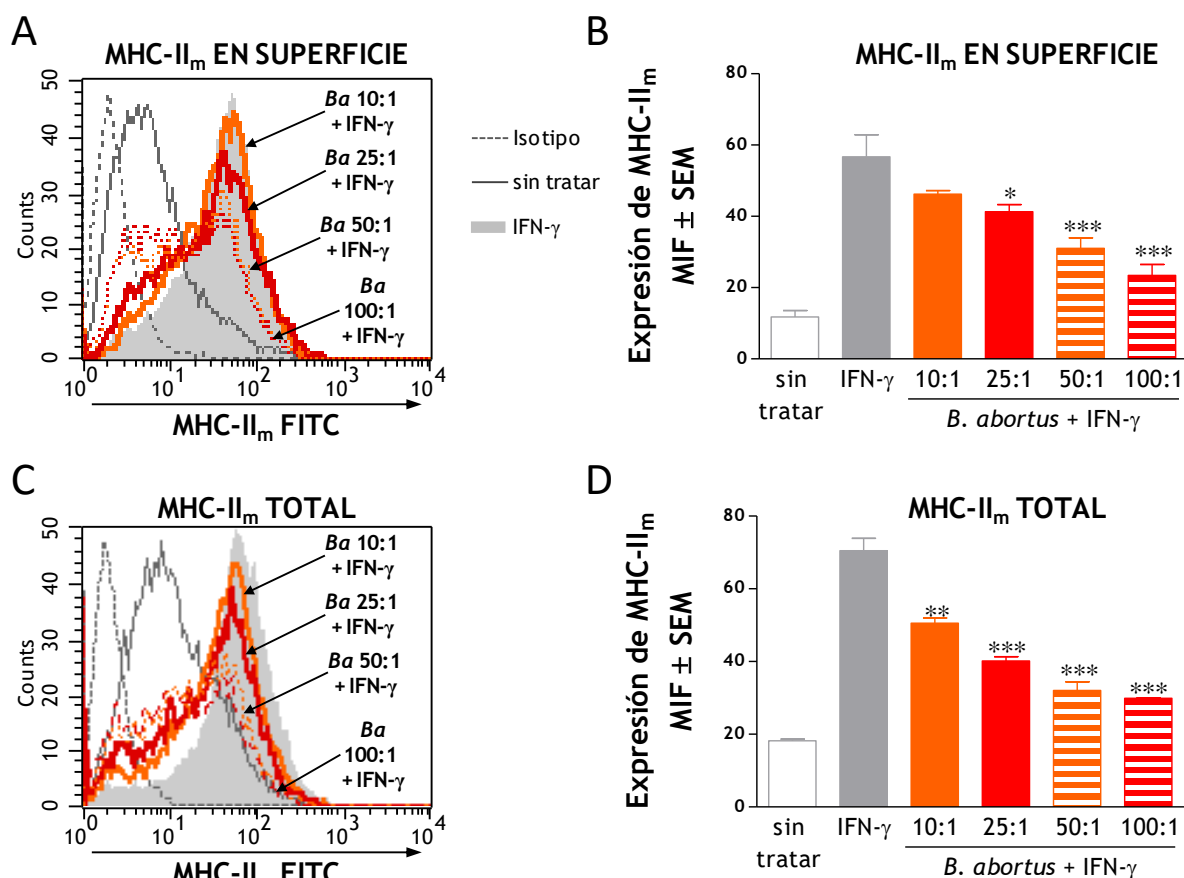
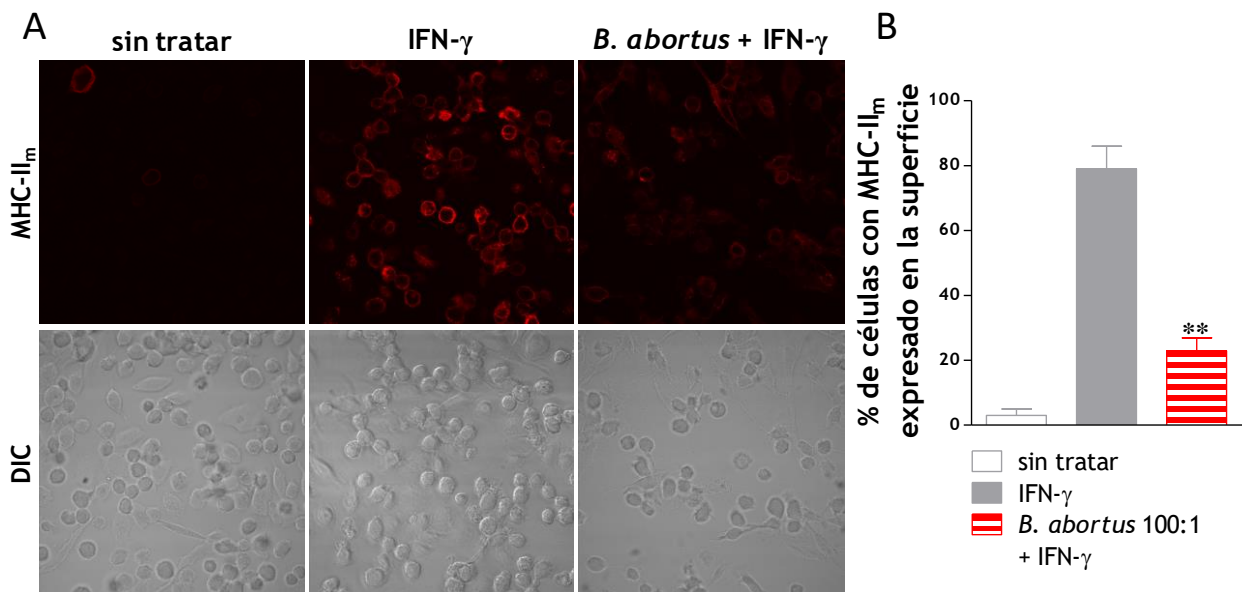


Figura 15. La infección con *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de moléculas de MHC-II maduras. A-D. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-II maduras (MHC-II_m) por citometría de flujo. La expresión de MHC-II_m en superficie fue determinada en células no-permeabilizadas (A y B) y la expresión total de MHC-II_m fue determinada en células permeabilizadas con saponina (C y D). Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 5 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ .

Estos resultados fueron confirmados utilizando microscopía confocal. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de IFN- γ y la expresión de MHC-II maduras fue evaluada marcando con un Ac primario específico anti-HLA-DR humano (clon L243) seguido de un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). Luego de 48 h de cultivo pudimos observar que las células tratadas sólo con IFN- γ presentaban marcación de MHC-II maduras confinada predominantemente a la membrana celular. Sin embargo, monocitos infectados con *B. abortus* mostraron una drástica reducción en la expresión de MHC-II (Figura 16A y B). Visto en detalle y utilizando células infectadas con *B. abortus*-GFP, observamos que la infección causaba la pérdida de expresión de moléculas de MHC-II maduras tanto en la superficie como en el interior celular (Figura 16C). También evaluamos la expresión de las moléculas de MHC-II en lisados totales mediante Western blot. La expresión proteica total de MHC-II maduras aumentó en presencia de IFN- γ . Sin embargo, este incremento fue inhibido significativamente por la infección con *B. abortus* de manera dosis dependiente (Figura 16D y E). En conjunto estos resultados demuestran que la infección con *B. abortus* disminuye la expresión en superficie e intracelular de las moléculas de MHC-II maduras inducida por IFN- γ .



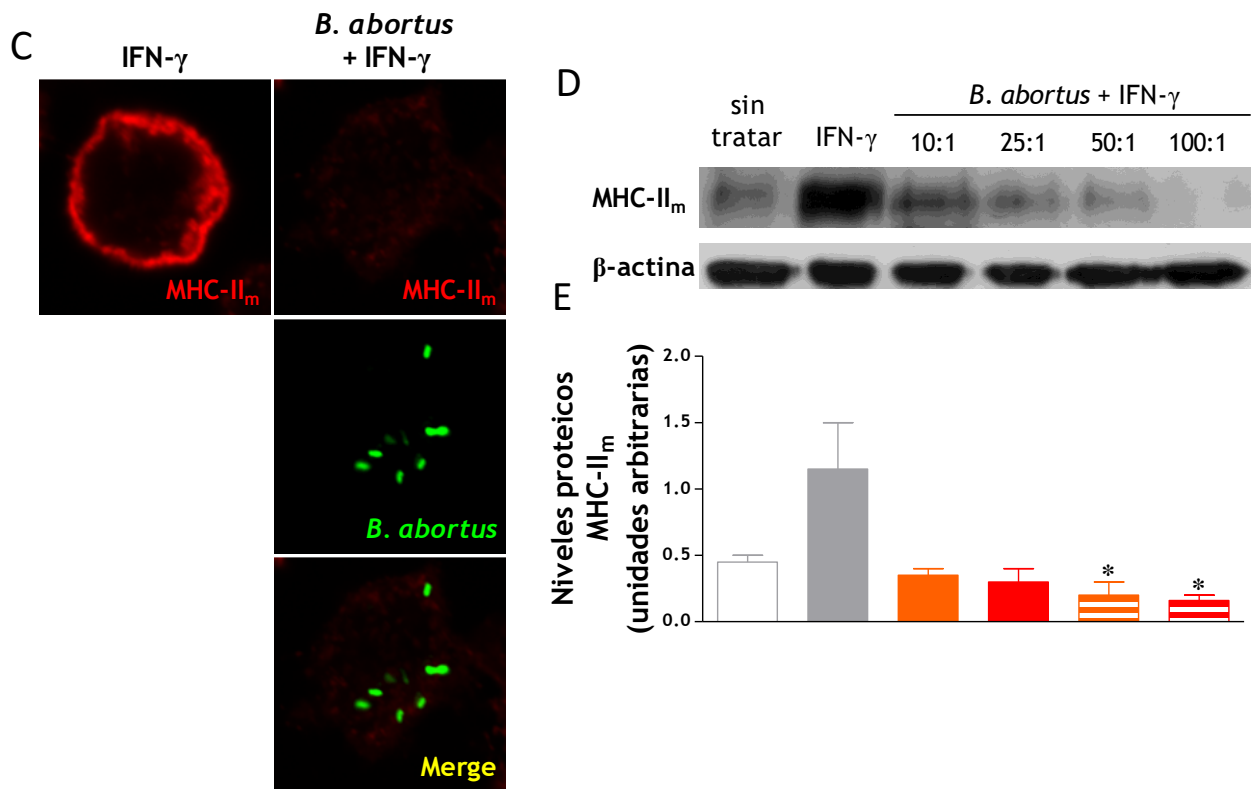


Figura 16. La infección con *B. abortus* disminuye los niveles proteicos de MHC-II maduras. *A* y *C*. Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus* (*A*) o *B. abortus*-GFP (*C*) (MOI 100) en presencia de IFN- γ , y luego marcadas con un Ac primario anti-MHC-II humano (L243) y un Ac secundario conjugado a Alexa 546 (rojo). DIC, contraste de interferencia diferencial. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. *B*. Cuantificación de la expresión de MHC-II maduras (MHC-II_m). Los valores representan el porcentaje de células con MHC-II_m expresado en superficie \pm SEM de 2 experimentos. *D*. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se obtuvieron extractos celulares totales y se determinó la expresión de MHC-II_m por Western Blot. β -actina fue utilizado como control de carga. *E*. Análisis densitométrico de los niveles proteicos de MHC-II_m de 2 experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ .

La inhibición de la expresión de moléculas de MHC-II maduras mediada por *B. abortus* no es debida a una acumulación de moléculas inmaduras

La disminución de la expresión en superficie de moléculas de MHC-II maduras mediada por *B. abortus* podría ser el resultado de una maduración y transporte a la membrana celular anormales [227, 228], por lo que especulamos que este fenómeno podría llevar a la acumulación de moléculas inmaduras. A su vez, la acumulación de moléculas de MHC-II inmaduras podría deberse a la inhibición de Catepsina S, la principal proteasa involucrada en los pasos tardíos del clivaje de la cadena invariante. Para determinar esto, evaluamos la expresión de moléculas de MHC-II asociadas a la cadena invariante (moléculas inmaduras) en células THP-1 infectadas con *B. abortus*. Las células fueron tratadas tal como fue descrito anteriormente y la expresión total y en superficie de moléculas de MHC-II fue evaluada por citometría de flujo utilizando un Ac anti-cadena invariante (CD74), el cual sólo reconoce moléculas inmaduras. La infección con *B. abortus* inhibió la expresión en superficie de las moléculas de MHC-II inmaduras inducida por IFN- γ (Figura 17A y B). Asimismo, la infección fue capaz de reducir la expresión total de moléculas inmaduras (Figura 17C y D).

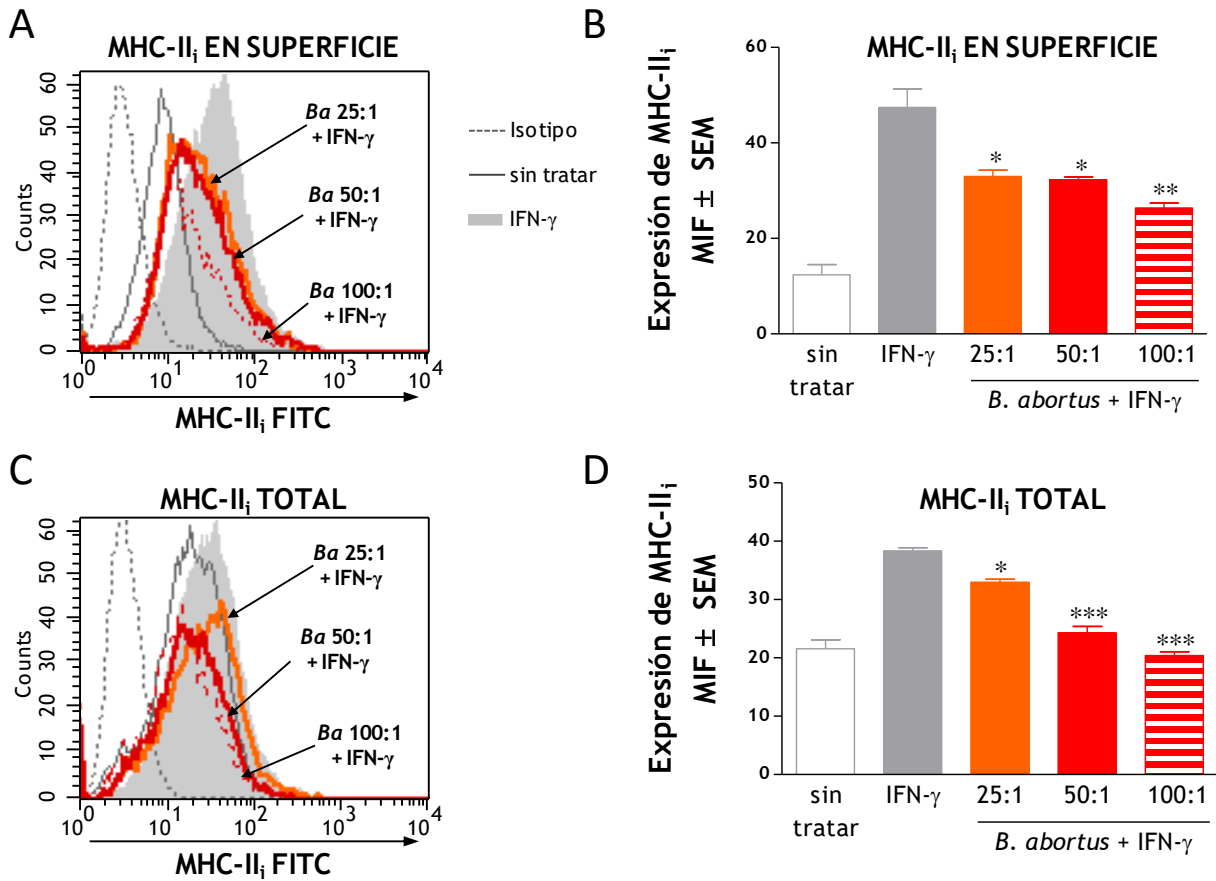


Figura 17. La inhibición de la expresión de moléculas de MHC-II maduras mediada por *B. abortus* no se debe a una acumulación de moléculas de MHC-II inmaduras. A-D. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-II inmaduras (MHC-II_i) por citometría de flujo. La expresión de MHC-II_i en superficie fue determinada en células no-permeabilizadas (A y B) y la expresión total de MHC-II_i fue determinada en células permeabilizadas con saponina (C y D). Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ .

Además, confirmamos que la infección con *B. abortus* es capaz de inhibir la expresión en superficie (Figura 18A y B) y total (Figura 18C y D) de ambas subpoblaciones de moléculas de MHC-II (maduras e inmaduras) utilizando un Ac que reconoce ambos tipos de moléculas (clon Tü36).

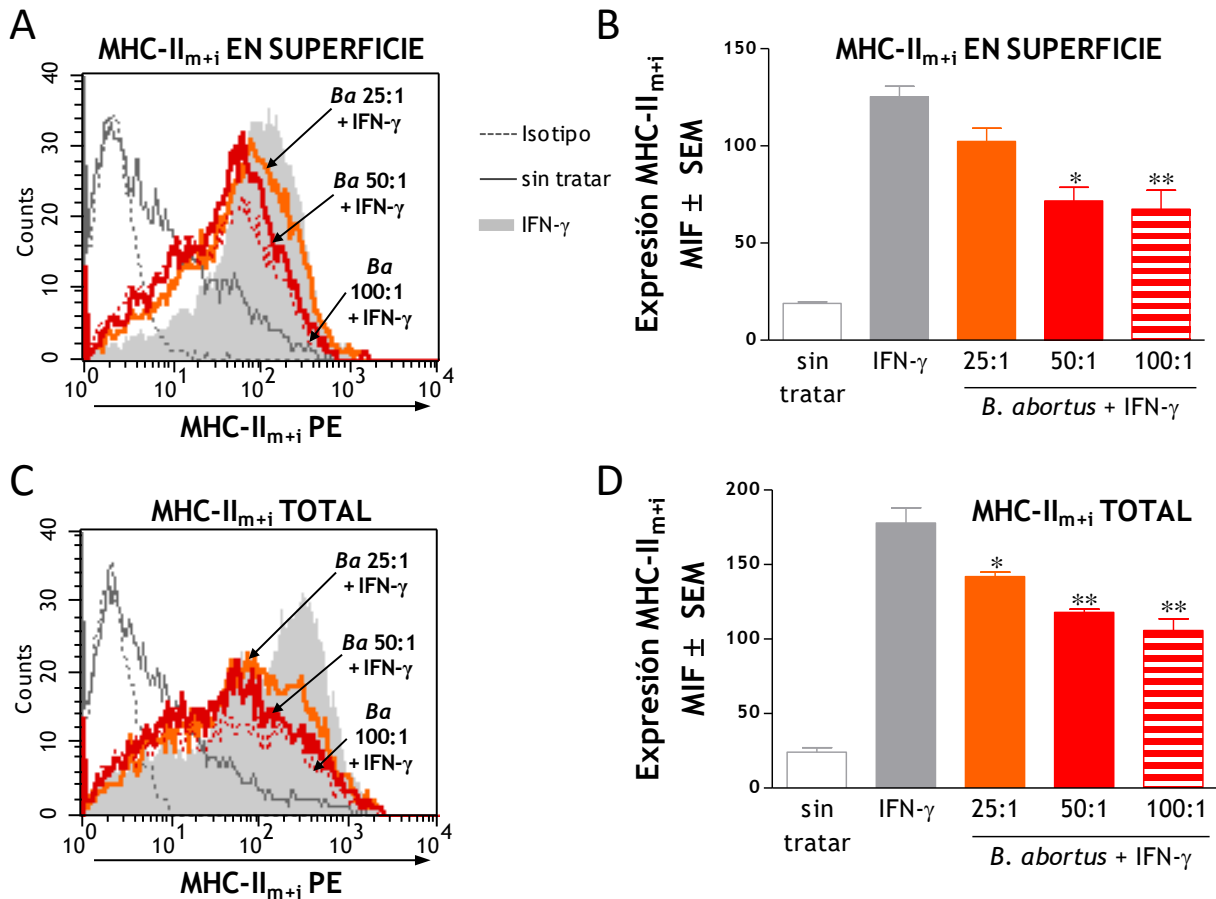


Figura 18. *B. abortus* inhibe la expresión de moléculas de MHC-II maduras e inmaduras. *A-D.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-II maduras e inmaduras (MHC-II_{m+i}) por citometría de flujo. La expresión de MHC-II_{m+i} en superficie fue determinada en células no-permeabilizadas (A y B) y la expresión total de MHC-II_{m+i} fue determinada en células permeabilizadas con saponina (C y D). Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ .

Corroborando estos resultados, la expresión de Cathepsina S no se vio modificada en células infectadas con *B. abortus* respecto de células tratadas sólo con IFN- γ , lo cual fue determinado mediante Western Blot (Figura 19A y B) y PCR en tiempo real (Figura 19C). En conjunto, estos resultados indican que la atenuada expresión en superficie de moléculas de MHC-II no es debida a la inhibición de la expresión de Cathepsina S en células infectadas y la subsecuente acumulación intracelular de moléculas de MHC-II inmaduras. Por el contrario, *B. abortus* no sólo fue capaz de reducir la expresión de moléculas de MHC-II maduras, sino que también inhibió la expresión de las moléculas de MHC-II inmaduras asociadas a la cadena invariante.

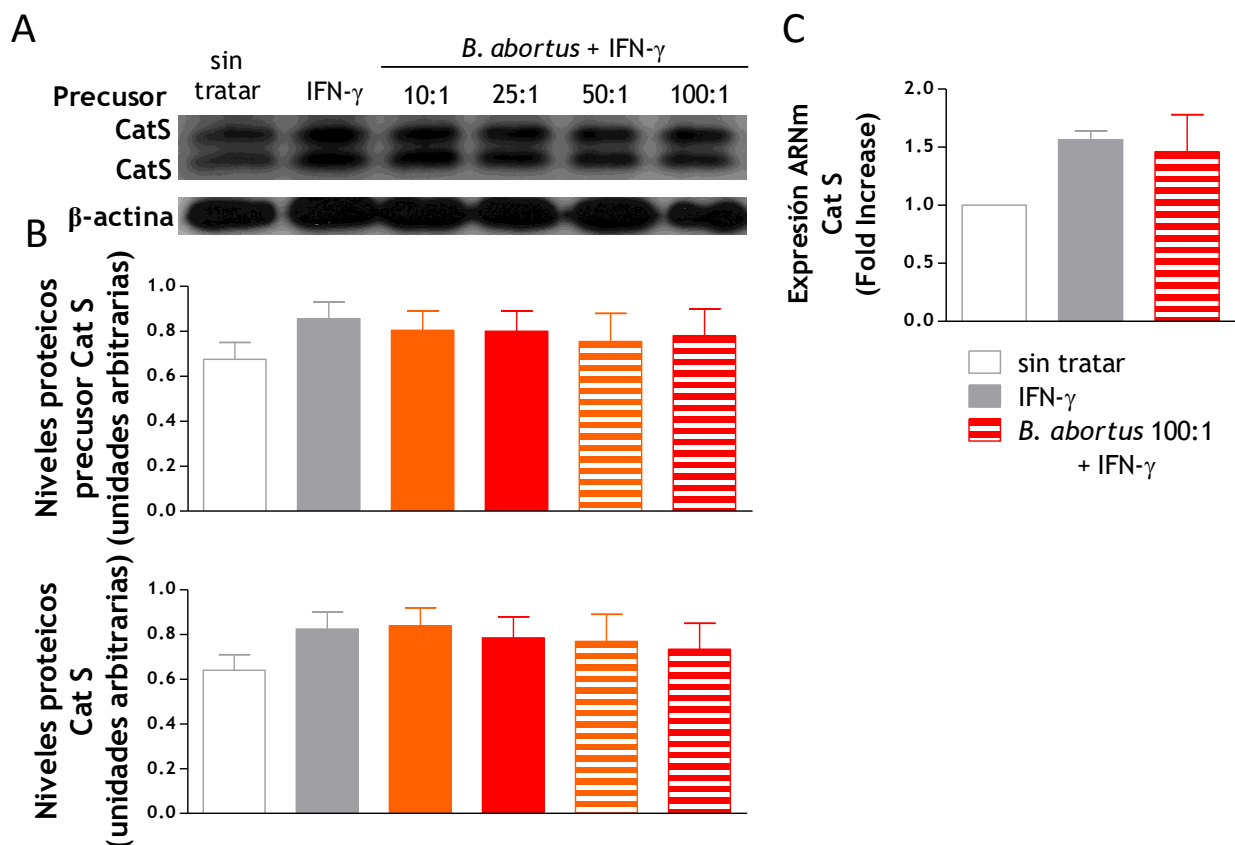


Figura 19. La infección con *B. abortus* no afecta la transcripción ni la expresión de Catepsina S. *A-C.* Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. *A.* Se obtuvieron extractos celulares totales y se determinó la expresión de Catepsina S (Cat S) y su precursor por Western Blot. β -actina fue utilizado como control de carga. *B.* Análisis densitométrico de los niveles proteicos de Cat S y su precursor de 2 experimentos independientes. *C.* Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de Cat S mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos.

La disminución en los niveles proteicos totales de MHC-II inducida por la infección con *B. abortus* correlaciona con una disminución en la transcripción de HLA-DR y CIITA

La inhibición de la expresión de moléculas de MHC-II maduras e inmaduras mediada por *B. abortus* podría deberse a un aumento en su clivaje al medio extracelular, un aumento en su degradación y/o una disminuida producción de moléculas. Para dilucidar esto, primero evaluamos si la expresión de MHC-II estaba afectada a nivel transcripcional. Para esto, medimos los niveles de expresión del ARNm de HLA-DR (cadena α ; HLA-DRA) mediante PCR en tiempo real bajo las mismas condiciones en las cuales evaluamos la expresión de MHC-II por citometría de flujo. Como era de esperar, el IFN- γ indujo un aumento en la expresión del ARNm de HLA-DR (Figura 20A). Por su parte, la infección con *B. abortus* inhibió este aumento en la transcripción de HLA-DR inducido por IFN- γ luego de 48 h (Figura 20A). Teniendo en cuenta que el transactivador de clase II (CIITA) es el factor de transcripción maestro de la expresión de los genes de MHC-II, luego evaluamos si la disminuida síntesis del ARNm de HLA-DR

mediada por *B. abortus* correlacionaba con una reducida transcripción de CIITA. Como se observa en la Figura 20B, el IFN- γ indujo un incremento en la expresión del ARNm de CIITA mientras que la infección con *B. abortus* fue capaz de inhibir este incremento luego de 48 h.

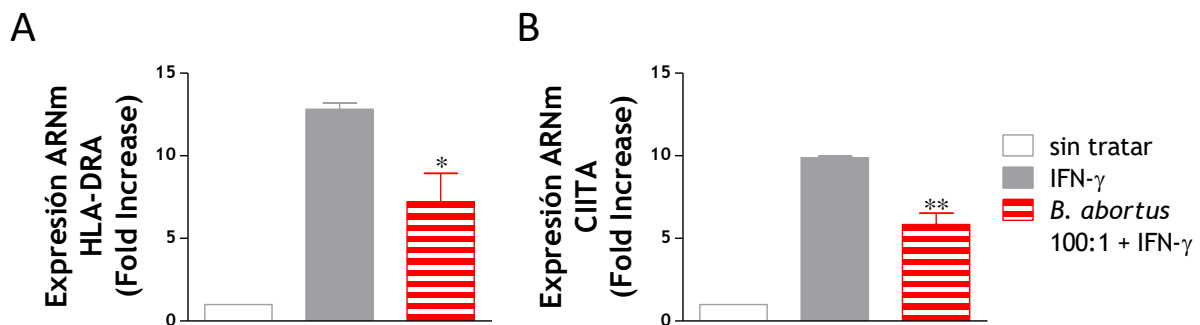


Figura 20. La disminución en los niveles proteicos de MHC-II inducida por *B. abortus* correlaciona con una disminución en la expresión de los ARNm de HLA-DR y CIITA. A y B. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* (MOI 100) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-DRA (A) y CIITA (B) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ .

También evaluamos si la inhibición de la expresión de MHC-II mediada por la infección con *B. abortus* podía extenderse a monocitos humanos. Para esto, infectamos monocitos purificados de sangre periférica humana con *B. abortus* en presencia de IFN- γ como fue descrito anteriormente y determinamos la expresión de MHC-II mediante citometría de flujo y la expresión de los transcritos de HLA-DR y CIITA por PCR en tiempo real. La infección con *B. abortus* disminuyó la expresión en superficie de MHC-II (Figura 21A y B) e inhibió la transcripción de HLA-DR y CIITA (Figura 21C y D) en monocitos humanos purificados. Podemos concluir entonces que la inhibición de la transcripción de CIITA podría representar el mecanismo principal por el cual se observa una disminución en la expresión en superficie de MHC-II en monocitos humanos infectados con *B. abortus*.

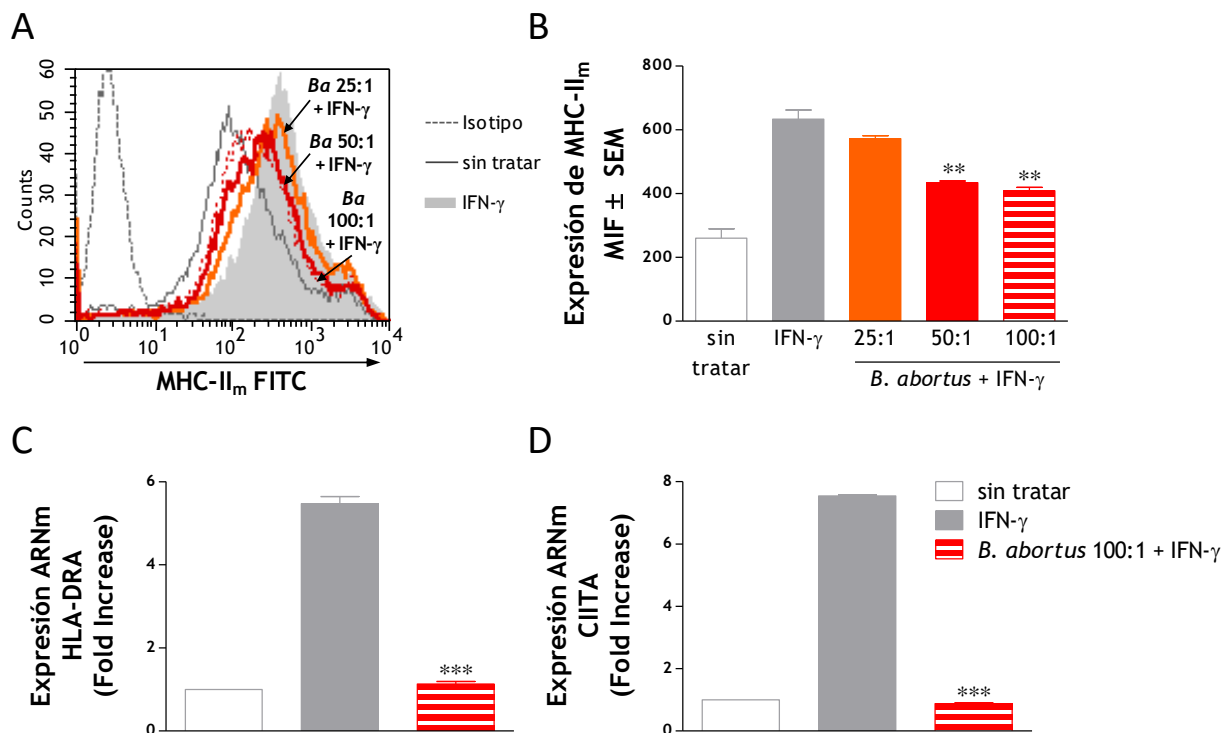


Figura 21. La infección con *B. abortus* inhibe la expresión en superficie de MHC-II y los ARNm de HLA-DR y CIITA en monocitos de sangre periférica. *A y B.* Monocitos humanos purificados de sangre periférica fueron infectados con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavados, e incubados con IFN- γ por 24 h. Se determinó la expresión de MHC-II maduras (MHC-II_m) por citometría de flujo. Las barras en el panel B representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. *C y D.* Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-DR (C) y CIITA (D) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ .

Las lipoproteínas de *B. abortus* son el componente bacteriano involucrado en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II

Previamente habíamos demostrado que las lipoproteínas de *B. abortus* eran capaces de inhibir la expresión en superficie de las moléculas de MHC-II y la presentación antigénica en monocitos humanos [176]. Por lo tanto, decidimos evaluar si las lipoproteínas de *B. abortus* podrían ser el componente estructural involucrado en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II observados en la infección con *B. abortus*. Para evaluar esta hipótesis, utilizamos a L-Omp19 recombinante como modelo de lipoproteína de *Brucella*. Estimulamos células THP-1 con L-Omp19 en presencia de IFN- γ por 48 h y evaluamos la expresión en superficie de MHC-II mediante citometría de flujo y la expresión de los ARNm de HLA-DR y CIITA mediante PCR en tiempo real. Cuando las células fueron tratadas con L-Omp19 observamos una reducción significativa y dosis dependiente de la expresión en superficie de MHC-II (Figura 22A y C). A su vez, L-Omp19 inhibió significativamente la expresión de los transcritos de HLA-DR y CIITA (Figura 22D y E). El mecanismo de regulación negativa de MHC-II inducido por L-Omp19 fue dependiente de la lipidación de la lipoproteína, ya que S-Omp19, una versión sin lipidar de Omp-19, no fue capaz de reproducir dicho fenómeno (Figura 22B-E). Estos resultados indican que las lipoproteínas de

B. abortus son el componente bacteriano involucrado en los mecanismos regulatorios que explican la disminuida expresión de las moléculas de MHC-II en la superficie celular.

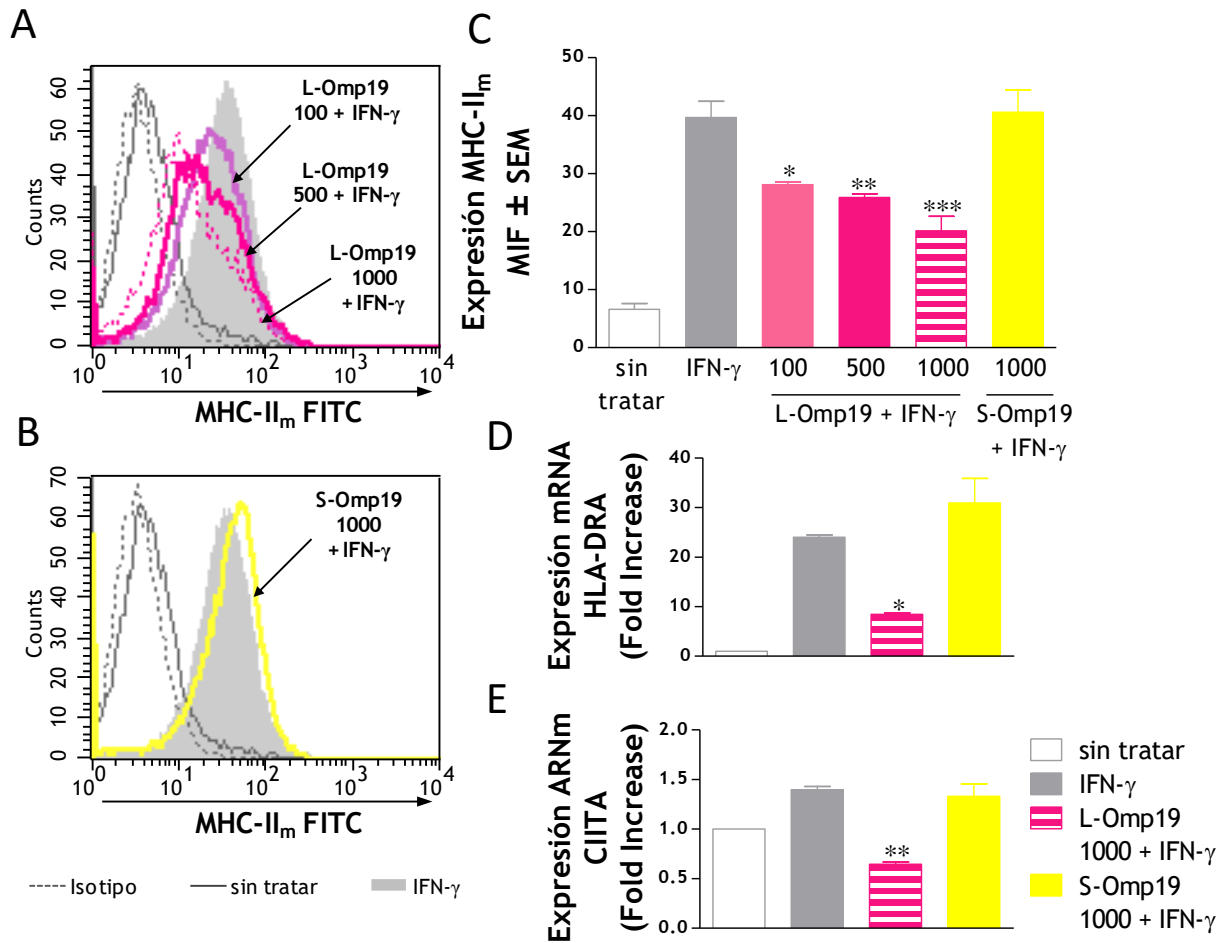


Figura 22. Las lipoproteínas de *B. abortus* son el componente bacteriano involucrado en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II. **A-C.** Células THP-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones (100, 500 y 1000 ng/ml) de L-Omp19 (A y C) o S-Omp19 (1000 ng/ml) (B y C) en presencia de IFN-γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-II maduras (MHC-II_m) por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética ± SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. **D y E.** Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-DRA (D) y CIITA (E) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH ± SEM de 3 experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN-γ.

La IL-6 participa en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II

En resultados previos también demostramos que la inhibición de la expresión de MHC-II inducida por la infección con *B. abortus* y sus lipoproteínas era mediada por IL-6 [176]. Es por esto que a continuación investigamos la contribución de esta citoquina en la disminución de la transcripción de HLA-DR y CIITA. Para esto, células THP-1 fueron incubadas con IL-6 recombinante en presencia de IFN-γ por 48 h, y determinamos la expresión en superficie de MHC-II y la expresión de los ARNm de HLA-DR y CIITA tal como fue descriptivo previamente. La IL-6 disminuyó la expresión en superficie de MHC-II (Figura 23A y B) y también fue capaz de inhibir la transcripción de los ARNm de HLA-DR y CIITA de manera significativa (Figura 23C y D). A su vez, incubamos células THP-1 con L-Omp19 más IFN-γ por 48 h en presencia o ausencia de un Ac neutralizante para IL-6 o su correspondiente isotipo. Luego, evaluamos

los niveles de ARNm de HLA-DR y CIITA por PCR en tiempo real. La neutralización de IL-6 resultó en una reversión significativa de la inhibición de los transcritos de HLA-DR y CIITA inducida por L-Omp19 (Figura 23E y F). Por lo tanto, estos resultados indican que la inhibición de los ARNm de HLA-DR y CIITA y la consecuente inhibición de las moléculas de MHC-II en la superficie celular inducidos por las lipoproteínas de *B. abortus* están mediados por la secreción de IL-6.

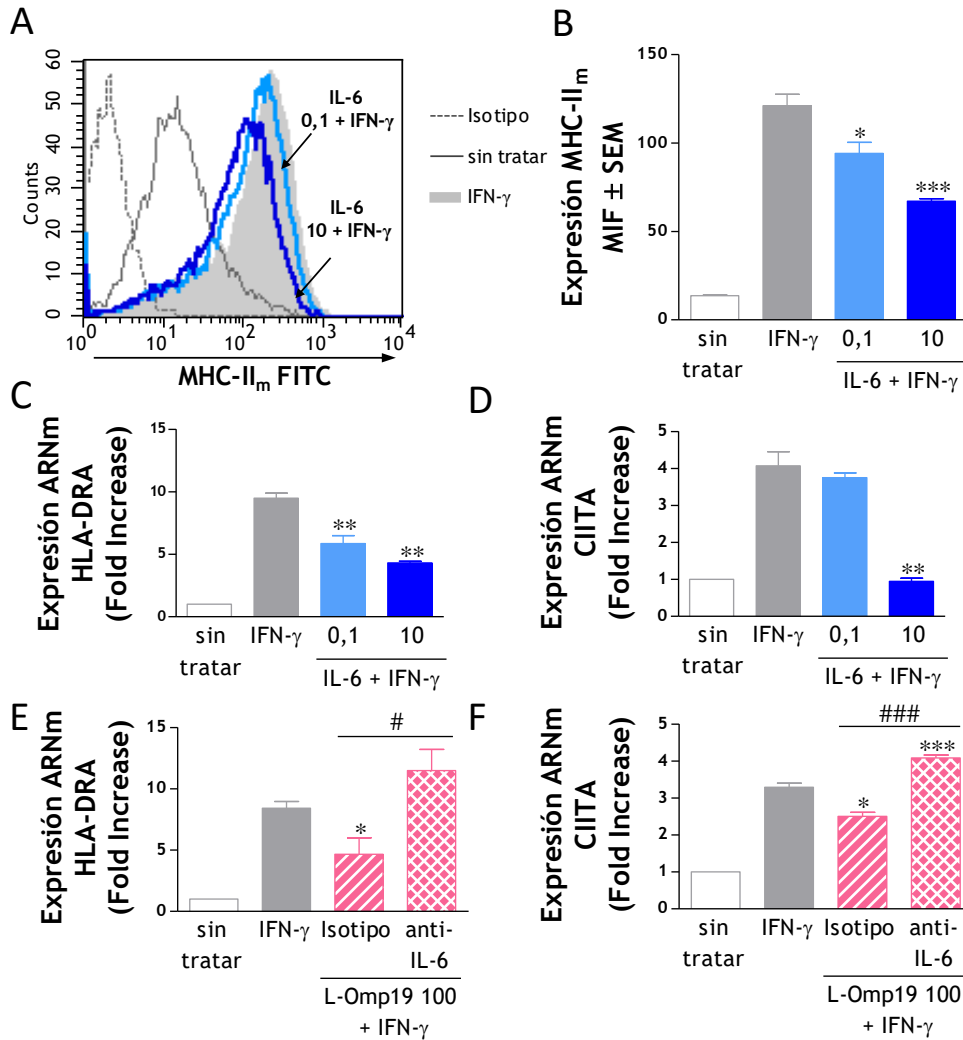


Figura 23. La IL-6 participa en los mecanismos de regulación negativa de MHC-II. *A-D.* Células THP-1 fueron tratadas con diferentes concentraciones (0,1 y 10 ng/ml) de IL-6 en presencia de IFN- γ por 48 h. *A y B.* Se determinó la expresión de MHC-II maduras (MHC-II_m) por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 3 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. *C y D.* Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-DRA (C) y CIITA (D) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. *E y F.* Células THP-1 fueron tratadas con L-Omp19 (100 ng/ml) en presencia de IFN- γ y un Ac anti-IL-6 o su correspondiente isotipo por 48 h. Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de HLA-DRA (E) y CIITA (F) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ . # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ vs. isotipo.

***B. abortus* y sus lipoproteínas inducen la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 a través de la secreción de IL-6 pero no previenen la fosforilación de STAT1**

Las proteínas SOCS han sido descritas como capaces de inhibir la señalización de distintas citoquinas [229-231]. Entre ellas, SOCS-1 y SOCS-3 tienen la habilidad de interferir con la señalización del IFN- γ [232, 233] y, en particular, se ha reportado que son responsables de la atenuación de la expresión inducida por IFN- γ de CIITA en ciertos sistemas biológicos [234, 235]. Además, varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el LPS y los motivos CpG del ADN bacteriano pueden inducir la expresión de proteínas SOCS [236, 237]. Es por esto que evaluamos el efecto de la infección con *B. abortus* y la L-Omp19 en la expresión de SOCS-1 y SOCS-3. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* o tratadas con L-Omp19 en presencia de IFN- γ por 48 h, y luego evaluamos la expresión de los ARNm de SOCS-1 y SOCS-3 por PCR en tiempo real. Tanto la infección con *B. abortus* como el tratamiento con L-Omp19, pero no S-Omp19, fueron capaces de inducir significativamente la expresión de los transcritos de SOCS-1 y SOCS-3 (Figura 24A-D). Teniendo en cuenta que la IL-6 contribuye a los mecanismos de regulación negativa de MHC-II y que también ha sido reportado que la IL-6 aumenta la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 [238, 239], investigamos el rol de IL-6 en la inducción mediada por las lipoproteínas de *B. abortus* de estos dos reguladores negativos. Para esto, células THP-1 fueron cultivadas con L-Omp19 más IFN- γ por 48 h en presencia o ausencia de un Ac neutralizante para IL-6 o su correspondiente isotipo. Los niveles de expresión de los ARNm de SOCS-1 y SOCS-3 luego fueron evaluados por PCR en tiempo real. La neutralización de IL-6 resultó en una reversión significativa de la inducción mediada por L-Omp19 de los ARNm de SOCS-1 y SOCS-3 (Figura 24E y F).

El mecanismo más conocido por el cual SOCS-1 y SOCS-3 son capaces de inhibir la señalización de IFN- γ es través del bloqueo de la fosforilación mediada por las proteínas JAK de STAT1 [231]. Por lo tanto, evaluamos si la inducción de SOCS-1 y SOCS-3 mediada por *B. abortus* correlacionaba con una disminución de la fosforilación de STAT1. Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 4 y 24 h, y la fosforilación de STAT1 fue evaluada por citometría de flujo (Figura 25A-D) y por Western Blot en lisados celulares totales (Figura 25E y F). El tratamiento con IFN- γ indujo la fosforilación de STAT1 tanto a las 4 como a las 24 h pero esta inducción no fue inhibida por la infección con *B. abortus* en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 25A-F).

En conjunto, estos resultados demuestran que la infección por *B. abortus* y sus lipoproteínas, mediante la secreción de IL-6, inducen la transcripción de SOCS-1 y SOCS-3 pero no previenen la fosforilación de STAT1.

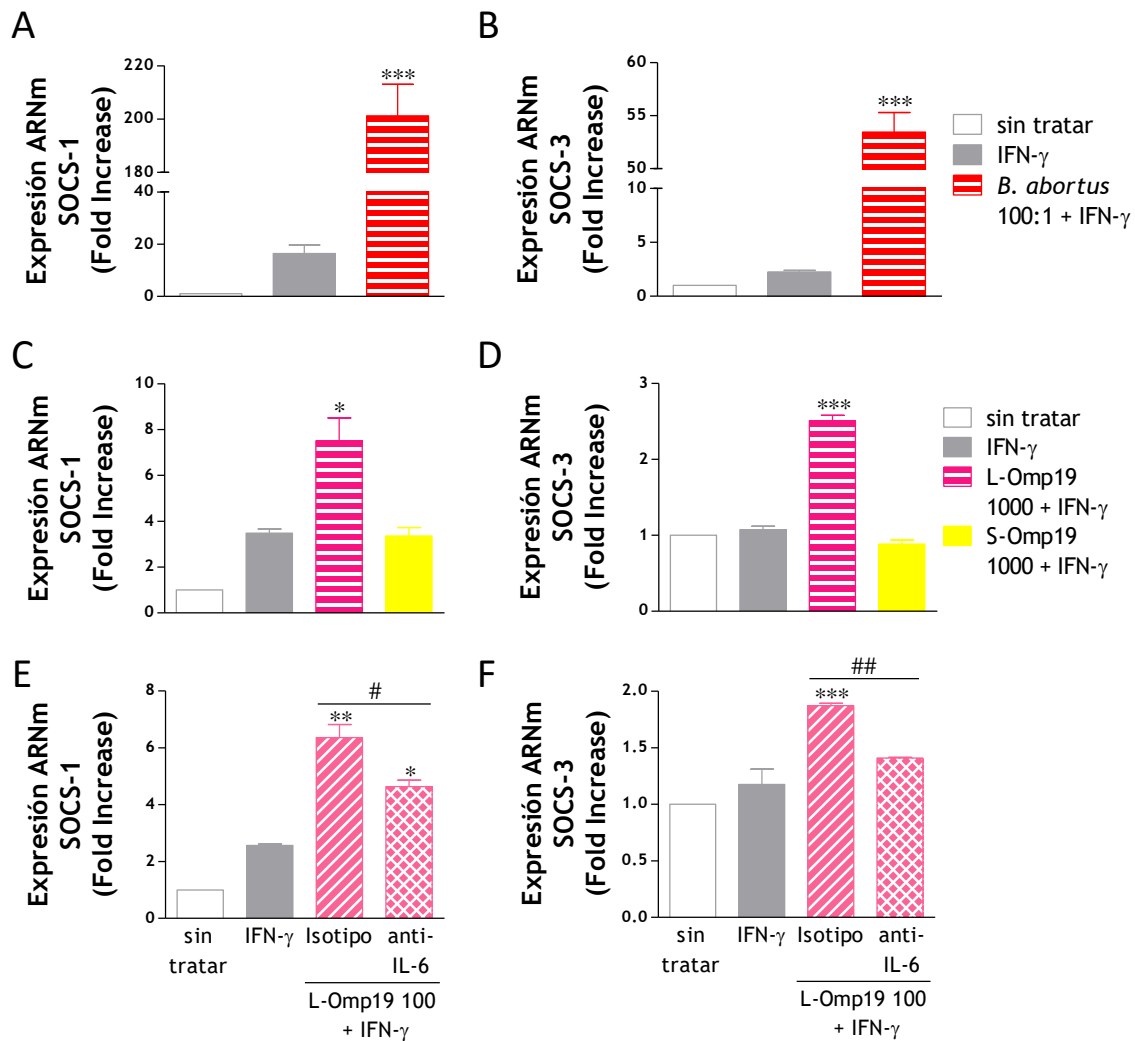


Figura 24. La infección con *B. abortus* induce la transcripción de SOCS-1 y SOCS-3, reguladores negativos de la señalización del IFN- γ , a través de la secreción de IL-6. A y B. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* (MOI 100) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 48 h. C y D. Células THP-1 fueron tratadas con L-Omp19 o S-Omp19 (1000 ng/ml) en presencia de IFN- γ por 48 h. E y F. Células THP-1 fueron tratadas con L-Omp19 (100 ng/ml) en presencia de IFN- γ y un Ac anti-IL-6 o su correspondiente isotipo por 48 h. Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de SOCS-1 (A, C y E) y SOCS-3 (B, D y F) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a GAPDH \pm SEM de 3 experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN- γ . # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ vs. isotipo.

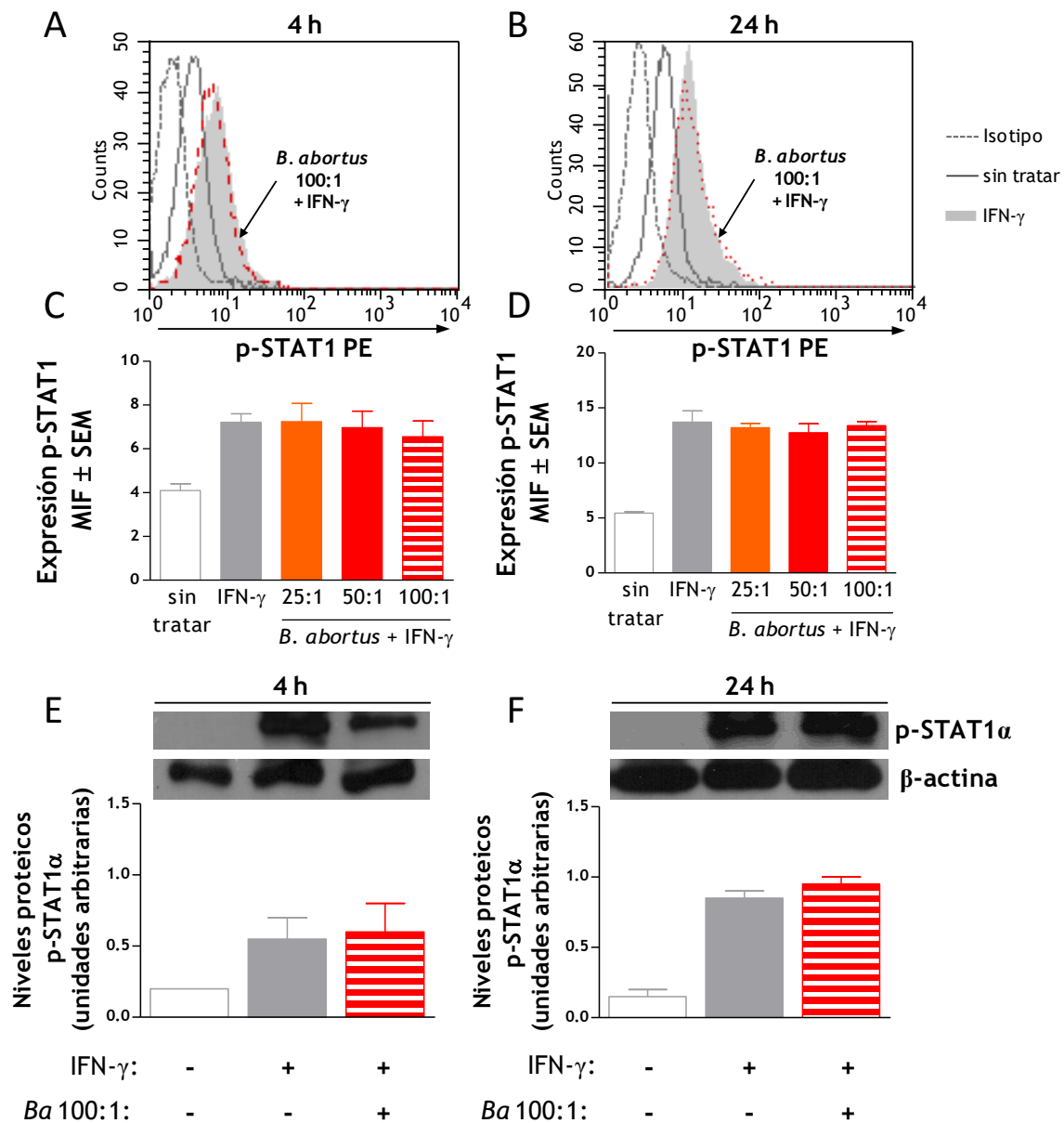


Figura 25. La infección con *B. abortus* no modifica la fosforilación de STAT1. Células THP-1 fueron infectadas con diferentes MOI de *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 4 y 24 h. A-D. Se determinó la expresión de STAT1 fosforilado (p-STAT1) por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética \pm SEM de 5 experimentos. MIF, media de intensidad de fluorescencia. E y F. Se obtuvieron extractos celulares totales y se determinó la expresión de p-STAT1 α por Western Blot. β -actina fue utilizado como control de carga. Las barras corresponden al análisis densitométrico y representan la media aritmética \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Las lipoproteínas de *B. abortus* inhiben la expresión de MHC-II a través de un mecanismo independiente de SOCS-3

Con el fin de determinar si la inhibición de la expresión de MHC-II mediada por las lipoproteínas de *B. abortus* dependía de la expresión de SOCS-3, evaluamos el fenómeno en macrófagos derivados de médula ósea (MO) de ratones carentes de esta proteína. En primer lugar, demostramos que L-Omp19 era capaz de inhibir la expresión en superficie inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-II (Figura 26A) y la transcripción de los ARNm de MHC-II y CIITA (Figura 26B y C) en macrófagos derivados de MO de

ratones wild type (WT). Por otra parte, L-Omp19 fue capaz de inducir la expresión de SOCS-3 en macrófagos murinos control, mientras que esta expresión se encontró fuertemente reducida en macrófagos obtenidos de ratones SOCS3^{fl/fl}; LysMcre, indicando que la delección de *Soxs3* mediada por Cre resultó eficiente (Figura 26D). Sin embargo, L-Omp19 también inhibió la expresión de las moléculas de MHC-II en superficie (Figura 26A) y los ARNm de MHC-II y CIITA (Figura 26B y C) en macrófagos derivados de MO de ratones deficientes en SOCS-3 de la misma manera que en macrófagos murinos control. Este último resultado nos indica que la inhibición de la expresión de MHC-II mediada por las lipoproteínas de *B. abortus* es independiente de SOCS-3.

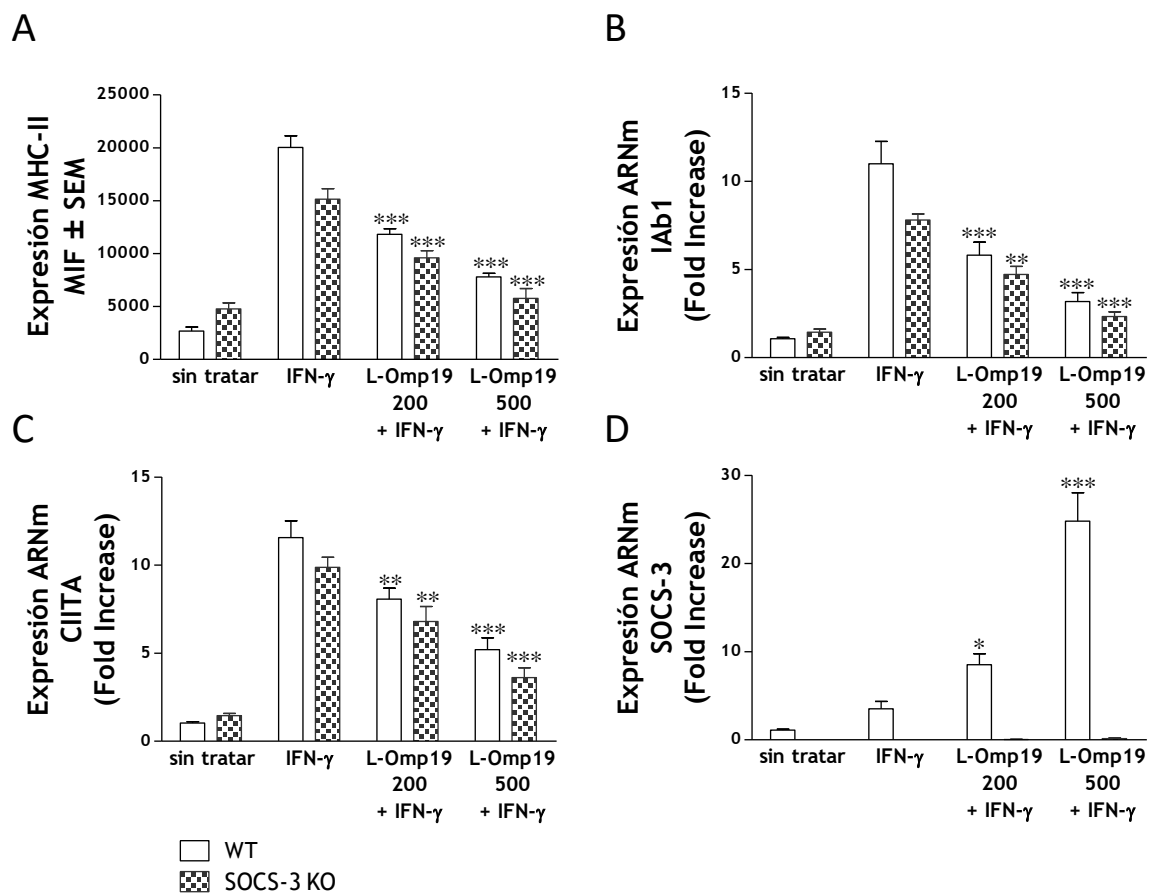


Figura 26. La inhibición de la expresión de MHC-II mediada por las lipoproteínas de *B. abortus* es independiente de SOCS-3. **A.** Macrófagos derivados de MO de ratones SOCS3^{fl/fl} que expresan LysMCre ("SOCS-3 KO") o no ("WT") fueron tratados con L-Omp19 (200 y 500 ng/ml) en presencia de IFN-γ por 48 h. Se determinó la expresión de MHC-II por citometría de flujo. Las barras representan la media aritmética ± SEM de 4 ratones con dos réplicas biológicas por ratón. MIF, media de intensidad de fluorescencia. **B-D.** Macrófagos derivados de MO de ratones SOCS-3 KO o WT fueron tratados con L-Omp19 (200 y 500 ng/ml) en presencia de IFN-γ por 24 h. Se extrajo el ARN total y se lo sometió a transcripción reversa. Se determinó la expresión del ARNm de MHC-II (IAb1) (B), CIITA (C) y SOCS-3 (D) mediante PCR en tiempo real. Las barras indican la media aritmética de la expresión normalizada a *hprt* ± SEM de 4 ratones. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. IFN-γ WT o IFN-γ SOCS-3 KO respectivamente.

***B. abortus* inhibe la expresión de IRF-1, un factor crítico para la inducción de CIITA**

Luego de la fosforilación en tirosina, STAT1 es transportado al núcleo donde se une a secuencias GAS presentes en las regiones promotoras de los genes de CIITA e IRF-1, entre otros [240-243]. Además de una secuencia GAS, el promotor tipo IV de CIITA contiene un sitio de unión a IRF-1 y es necesario que

ambos sitios estén ocupados para obtener la activación máxima de este transactivador [234]. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de *B. abortus* de modular la inducción de IRF-1 mediada por IFN- γ . Para esto, células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de IFN- γ por 4 y 24 h y luego determinamos la expresión de IRF-1 en lisados celulares totales mediante Western Blot. La infección con *B. abortus* inhibió de manera significativa la expresión de IRF-1 inducida por IFN- γ tanto a las 4 h (Figura 27A) como a las 24 h (Figura 27B). En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de la expresión de IRF-1 contribuye a la disminución de la expresión de CIITA y la consecuente regulación negativa de las moléculas de MHC-II mediada por *B. abortus*.

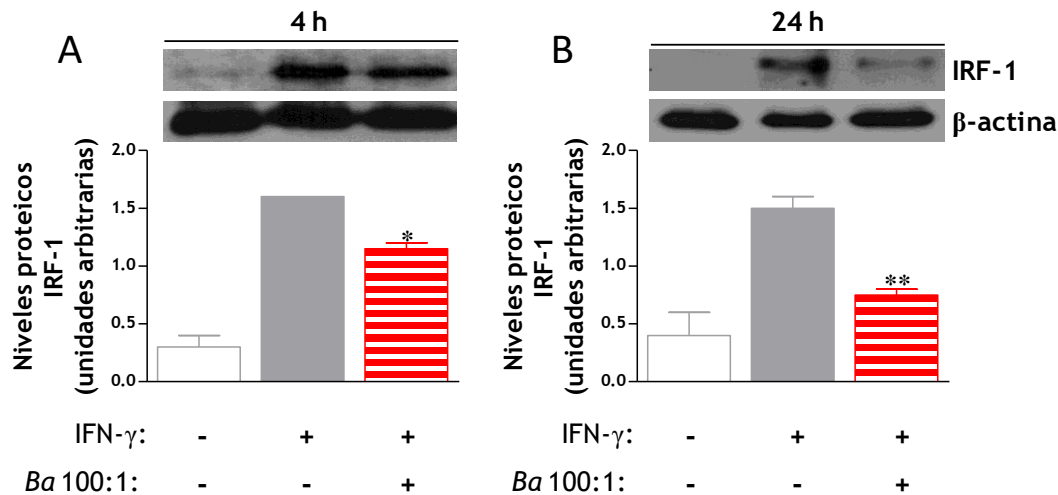


Figura 27. La infección con *B. abortus* inhibe la expresión de IRF-1. A y B. Células THP-1 fueron infectadas con *B. abortus* (100:1) en presencia de IFN- γ por 2 h, lavadas, e incubadas con IFN- γ por 4 y 24 h. Se obtuvieron extractos celulares totales y se determinó la expresión de IRF-1 por Western Blot. β -actina fue utilizado como control de carga. Las barras corresponden al análisis densitométrico y representan la media aritmética \pm SEM de 2 experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. IFN- γ .

DISCUSIÓN

Brucella es un patógeno hábil que dispone de diversas estrategias para evadir al sistema inmune y persistir crónicamente en el hospedador [215, 244]. Una de las estrategias más efectivas que utiliza la bacteria es esconderse dentro de los macrófagos que infecta de manera de pasar inadvertida frente al reconocimiento de los linfocitos T [168, 215]. En este sentido, en nuestro laboratorio previamente demostramos que la infección de monocitos humanos con *B. abortus* disminuye la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de MHC-II en superficie como así también la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ [176]. Sin embargo, los mecanismos involucrados en dicho fenómeno no habían sido aún dilucidados. En este Trabajo de Tesis demostramos que *B. abortus* y sus lipoproteínas, a través de la secreción de IL-6, inducen la expresión de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3 pero no afectan la fosforilación de STAT1. A su vez, observamos que el mecanismo por el cual las lipoproteínas de *B. abortus* inhiben la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II es independiente de SOCS-3. Sin embargo, *B. abortus* inhibe el aumento mediado por IFN- γ de IRF-1, un factor crítico para la inducción de CIITA, y esto contribuiría a la disminución de la transcripción de CIITA y a la consecuente reducción del ARNm, niveles proteicos y expresión en superficie de MHC-II en monocitos humanos.

La inhibición de la expresión en superficie de las moléculas de MHC-II y de la presentación antigénica es una estrategia empleada por varios patógenos para evadir la vigilancia inmunológica y persistir en el hospedador [245, 246]. Sin embargo, los mecanismos implicados en dicho fenómeno difieren de un microorganismo a otro e incluso se han descrito varios mecanismos para un mismo microorganismo. En este contexto, se ha reportado que la disminución de la expresión de MHC-II en fagocitos mononucleares infectados con *Mycobacterium tuberculosis* está relacionada con el secuestro intracelular de heterodímeros de clase II inmaduros [227] y que la ureasa de *Mycobacterium bovis* BCG atenúa el tránsito celular de MHC-II a la superficie del macrófago [228]. Asimismo, posteriormente fue reportado que la disminuida expresión en superficie de MHC-II mediada por *M. bovis* BCG se debía a la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de Catepsina S en las células infectadas y la subsecuente acumulación intracelular de dímeros de clase II $\alpha\beta$ asociados con el sustrato de Catepsina S, el fragmento li p10 [228]. Estos descubrimientos nos llevaron a pensar que la inhibición de la expresión en superficie e intracelular de las moléculas de MHC-II maduras podía ser el resultado de un proceso de maduración defectivo mediado por *B. abortus*. En otras palabras, nos preguntamos si la inhibición de las moléculas maduras de MHC-II mediada por *B. abortus* podía deberse a una acumulación de las moléculas de MHC-II inmaduras. Nuestros resultados demuestran que la atenuada expresión en superficie de las moléculas de MHC-II maduras no se debe a la inhibición de la expresión de Catepsina S en las células infectadas y la subsecuente acumulación intracelular de moléculas de MHC-II inmaduras. Por el contrario, *B. abortus* no solo es capaz de reducir la expresión de moléculas de MHC-II maduras; también inhibe la expresión de moléculas de MHC-II inmaduras asociadas a la cadena invariante.

Habiendo descartado un defecto en el proceso de maduración de las moléculas MHC-II, decidimos evaluar qué estaba ocurriendo a nivel transcripcional. Nuestros resultados demuestran que en las células infectadas con *B. abortus* se reduce significativamente la expresión del ARNm de MHC-II. Asimismo, observamos también una disminuida transcripción de CIITA, el factor de transcripción maestro involucrado en la expresión de las moléculas de MHC-II. Por lo tanto, la reducción de los niveles de proteína total de MHC-II observada durante la infección con *B. abortus* correlaciona con una transcripción disminuida de los ARNm de HLA-DR y CIITA.

CIITA no sólo actúa como un factor maestro para la expresión constitutiva e inducible de todos los genes de MHC-II y sus genes accesorios (los cuales codifican para la cadena invariante, HLA-DO y HLA-DM) [155, 247, 248], sino que también tiene un rol en la regulación de la transcripción de los genes de MHC-I [249-251]. Esto podría sugerir que *B. abortus* también sería capaz de inhibir la transcripción de genes para MHC-I. Sin embargo, en la primera parte de esta tesis demostramos que aunque *B. abortus* también inhibe la expresión en la superficie celular inducida por IFN- γ de MHC-I en macrófagos humanos, esta reducción no se debe a una transcripción disminuida del ARNm de MHC-I y una consecuente inhibición de la síntesis proteica de MHC-I ([252] y resultados no publicados). Por el contrario, la disminución de la expresión en superficie de MHC-I se debe al secuestro intracelular de las moléculas de MHC-I ya sintetizadas en el aparato de Golgi [252]. Esto puede parecer paradójico si CIITA fuese el único factor de transcripción que regula la transcripción de los genes de MHC. Sin embargo, la regulación transcripcional de los genes de MHC presenta varias diferencias. Mientras que los promotores de los genes de MHC-II contienen solo un módulo SXY (compuesto por las regiones W/S, X1, X2 e Y), los promotores de los genes de MHC-I y β 2-microglobulina no sólo tienen este módulo sino también otros elementos regulatorios en *cis*, el enhancer A (que contiene sitios de unión a NF- κ B) y el elemento de respuesta al estímulo con IFN- γ (ISRE) [154]. Esto hace a los genes de MHC-II totalmente dependientes del módulo promotor regulatorio SXY y sus factores de interacción, mientras que la expresión de los genes de MHC-I también depende de los elementos adicionales que actúan en *cis* anteriormente descritos [250]. El transactivador CIITA interactúa con los factores ensamblados sobre el módulo SXY en los promotores de MHC-II, MHC-I y *B2M* [156, 253]. Sin embargo, mientras el reclutamiento de CIITA es esencial para la expresión de MHC-II, esta proteína tiene un rol auxiliar en la expresión de genes MHC-I, en particular en la activación inducida por IFN- γ de los genes de MHC-I [249]. Varias observaciones sugieren que el papel de CIITA en la regulación de la expresión de MHC-I parece variar. Por un lado, existen evidencias de que los promotores de MHC-I son activados por CIITA *in vitro* [249, 250, 254] y que la actividad del promotor de MHC-I se ve perjudicada en una línea de células B deficientes en CIITA [251]. Por otro lado, fue observado que los ratones deficientes en CIITA no tienen una reducción en la expresión de MHC-I [248, 255-257]. Además, la expresión de CIITA se encuentra mayoritariamente restringida a APCs profesionales, mientras que los genes MHC-I se expresan constitutivamente en todas

las células nucleadas del organismo. Estas evidencias llevaron recientemente a la identificación del factor de transcripción de NLRC5, el cual es un miembro de la familia de los receptores tipo NOD (NLR), como un transactivador específico de los genes de MHC-I tanto en humanos como ratones [154, 258, 259]. Ahora, se hace evidente que dos proteínas NLR, NLRC5 y CIITA, son necesarias para la transactivación de los genes de MHC-I y MHC-II, respectivamente. Por lo tanto, la existencia del transactivador NLRC5 sumado a las secuencias regulatorias adicionales presentes en los promotores de MHC-I permiten explicar por qué la disminución de la transcripción de CIITA mediada por *B. abortus* no disminuye la expresión del ARNm de MHC-I.

Un tema que merece discusión es como *B. abortus* disminuye la expresión de CIITA. Teniendo en cuenta que la infección con *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de CIITA, una hipótesis posible es que *B. abortus* induce este fenómeno a través de la inducción de ciertas proteínas que actúan regulando negativamente la vía de señalización del IFN- γ . En este sentido, se ha reportado que dos miembros de la familia de proteínas SOCS (SOCS-1 y SOCS-3) actúan como reguladores negativos de la señalización por IFN- γ [232, 233, 260]. En particular, fue reportado que SOCS-1 disminuye la expresión inducida por IFN- γ de CIITA y MHC-II en macrófagos [234]. En otro estudio utilizando células tiroideas fue demostrado que la tirotropina (TSH) suprime la expresión de MHC-II mediada por IFN- γ a través de la inhibición de la expresión de CIITA, y estos efectos inhibitorios fueron causados principalmente por la inducción de la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 [235]. Teniendo en cuenta estas evidencias, nosotros investigamos la capacidad de *B. abortus* para inducir dichas proteínas SOCS. Nuestros resultados indican que *B. abortus* y sus lipoproteínas inducen la expresión tanto de SOCS-1 como SOCS-3. No sólo eso, sino que demuestran que la inducción de SOCS-1 y SOCS-3 es mediada a través de la secreción de IL-6, una citoquina que ha sido implicada en el aumento de la transcripción de estas proteínas [238, 239].

La inhibición de la vía de señalización del IFN- γ , por impedir la activación de STAT1, podría ser otra explicación para la inhibición mediada por *B. abortus* de la expresión inducida por IFN- γ de CIITA y MHC-II. De hecho, se ha reportado que SOCS-1 y SOCS-3 son capaces de inhibir la fosforilación mediada por las proteínas JAK de STAT1 y de esta manera prevenir la señalización por IFN- γ [231]. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que *B. abortus*, a pesar de aumentar la expresión de SOCS-1 y SOCS-3, no altera la fosforilación inducida por IFN- γ de STAT1. La ausencia de inhibición de la activación de STAT1 va de la mano de un estudio en donde se investigó los trastornos mediados por *Brucella suis* en las respuestas inducidas por IFN- γ donde se investigó cómo la infección con *B. suis* afectaba las respuestas inducidas por IFN- γ [261]. Para dilucidar esto, los autores evaluaron la señalización desencadenada por IFN- γ en macrófagos infectados con *B. suis*. Ellos no observaron cambios en la fosforilación de STAT1 (ni en tirosina ni en serina), ni en la dimerización de STAT1 fosforilado (p-STAT1) y translocación de p-STAT1 al núcleo; ni en la unión de p-STAT1 a GAS, una secuencia mínima de ADN de respuesta a IFN- γ [261]. Sin embargo, demostraron que la asociación mediada por IFN- γ de p-STAT1 con los transactivadores CBP

(proteína de unión a CREB)/P300 fue marcadamente reducida en macrófagos infectados con *B. suis*, demostrando que p-STAT1 fue incapaz de reclutar normalmente estos transactivadores [261]. Este fue el mecanismo postulado para la inhibición de la expresión inducida por IFN- γ de CD64 mediado por *B. suis* [261]. A su vez, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la expresión de CD64 inducida por IFN- γ también es inhibida por *B. abortus* [177]. Por lo tanto, la disrupción de la unión STAT1-CBP/P300 también podría explicar la inhibición de la expresión de MHC-II ya que la misma podría llevar a una disminuida transcripción de CIITA.

La inhibición mediada por *B. abortus* de la expresión inducida por IFN- γ de CIITA podría a su vez ser explicada por la inducción de reguladores negativos o por la represión de reguladores positivos que se unen a las secuencias promotoras presentes en el gen de CIITA. En línea con esto, IRF-1 (factor de transcripción activado por IFN- γ) se une al elemento ISRE presente en el promotor tipo IV de CIITA y es crucial para su regulación transcripcional [234]. Nuestros resultados demuestran que *B. abortus* inhibe significativamente la expresión de IRF-1 y que este fenómeno podría contribuir a la disminución en la expresión de CIITA y la consecuente inhibición de las moléculas de MHC-II mediado por *B. abortus*. En concordancia con estos resultados, se reportó que la lipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II al prevenir la inducción del ARNm de IRF-1 y el consecuente aumento de CIITA [262]. Este estudio también demostró que la lipoproteína de 19-kDa de *M. tuberculosis* induce la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 pero no inhibe la fosforilación inducida por IFN- γ de STAT1 [262].

La ausencia de inhibición de la fosforilación de STAT1 a pesar de la fuerte inducción de SOCS-1 y SOCS-3 puede parecer paradójica si consideramos que estas proteínas típicamente inhiben la señalización del IFN- γ al bloquear la actividad de las proteínas JAK [231]. Sin embargo, este no es el único modo de acción reportado para la inhibición mediada por SOCS-1 y SOCS-3 de la señalización de IFN- γ . En efecto, recientemente se describió que una importante inducción de SOCS-1 fue acompañada por un aumento en la fosforilación de STAT1 en macrófagos infectados con *Streptococcus* del Grupo A [263]. Además, se demostró que STAT1 era capaz de inducir directamente a SOCS-1 y que este fenómeno podría ser un mecanismo directo y novedoso de retroalimentación negativa para bloquear la expresión de citoquinas durante infecciones bacterianas y evadir la inmunidad del hospedador [263]. En este contexto, no parece extraño que la inducción de SOCS-1 y SOCS-3 no prevenga la fosforilación de STAT1. A su vez, sugiere que la inducción de estas proteínas podría estar actuando a otros niveles como la asociación de STAT1 con otros factores como CBP/P300 y/o la inhibición de la expresión de IRF-1 que observamos durante la infección con *B. abortus*. De todas formas, nuestros experimentos utilizando macrófagos deficientes en SOCS-3 demuestran que la inhibición de MHC-II mediada por las lipoproteínas de *B. abortus* es independiente de dicha proteína, y sugieren que este fenómeno podría estar mediado a través de la inducción de SOCS- 1.

A la luz de los resultados mostrados en este Trabajo de Tesis, ahora tenemos una mejor comprensión de los mecanismos empleados por *B. abortus* para disminuir la expresión en superficie de MHC-II. *B. abortus* a través de sus lipoproteínas y vía TLR-2 induce la secreción de IL-6 [176]. Esta citoquina participa en la inducción de la transcripción de SOCS-1 y SOCS-3 pero el aumento de estas dos proteínas no interfiere con la fosforilación de STAT1. Las lipoproteínas de *B. abortus* a través de un mecanismo independiente de SOCS-3, pero posiblemente mediado a través de la inducción de SOCS-1, podrían interferir con uno o varios pasos de la vía de señalización del IFN- γ . En particular, *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ del factor regulador IRF-1 contribuyendo a la disminuida transcripción del ARNm de CIITA, lo que a su vez resulta en una reducida expresión de los transcritos de MHC-II. Dicha inhibición de la transcripción de los genes de MHC-II lleva a una menor expresión de moléculas de MHC-II tanto inmaduras como maduras, y a una consecuente reducción de la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ (Figura Modelo MHC-II)

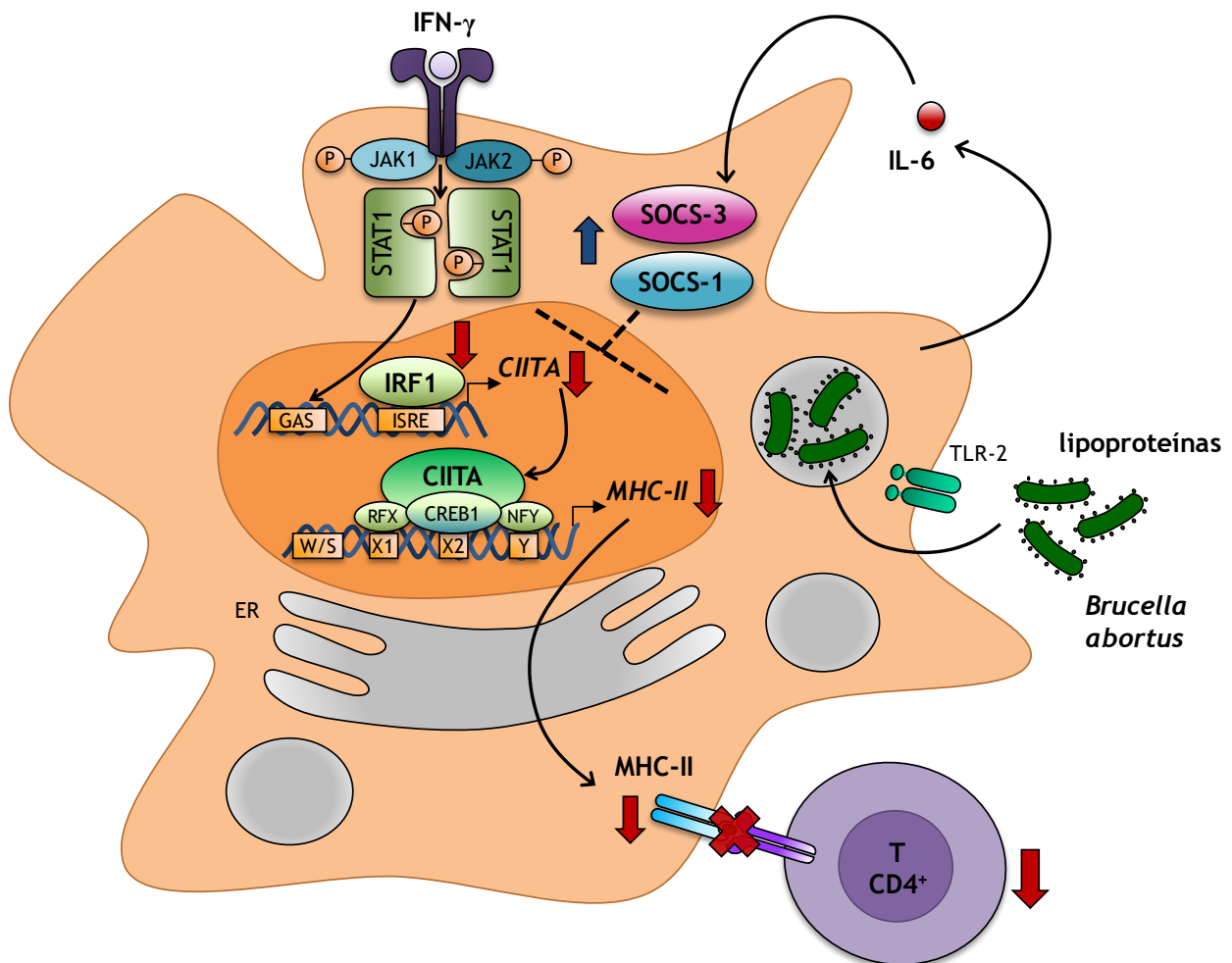


Figura Modelo de MHC-II. Descripción en el texto.

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo de tesis demostramos que *B. abortus* es capaz de inhibir la expresión de las moléculas tanto de MHC-I como de MHC-II y de esta manera, disminuir la presentación antigénica a linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ respectivamente. Sin embargo, estas bacterias no utilizan un único mecanismo para disminuir la expresión en superficie de estas moléculas, una característica remarcable para esta bacteria cuyo objetivo final es generar una infección crónica. *B. abortus* parece emplear estrategias muy diferentes para reducir específicamente la expresión en superficie de MHC-I o MHC-II (Figura 1): retención intracelular en el aparato de Golgi de moléculas ya sintetizadas como un mecanismo específico para moléculas de MHC-I (ver el modelo de MHC-I en la Discusión de la Parte I) e inhibición de la transcripción y la síntesis proteica para las moléculas de MHC-II (ver el modelo de MHC-II en la Discusión de la Parte II).

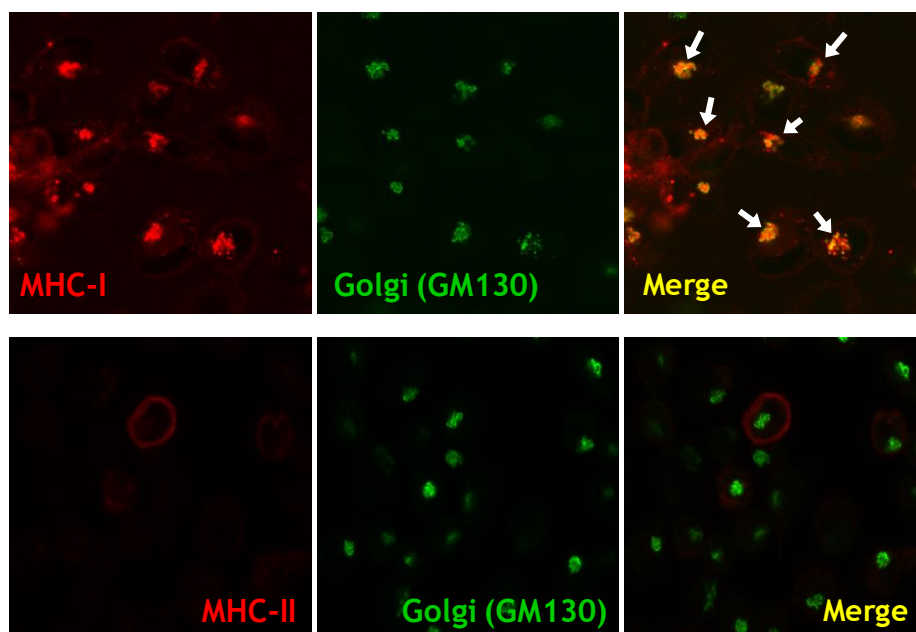


Figura 1. Microscopías confocales de células THP-1 infectadas con *B. abortus* en presencia de IFN- γ , marcadas diferencialmente para MHC-I y MHC-II y para aparato de Golgi. Las flechas blancas indican co-localización.

Ambas estrategias se encuentran resumidas en la siguiente tabla (Tabla 1):

	MHC-I	MHC-II
Componente bacteriano	Componente asociado a viabilidad: ?	Componente estructural: Lipoproteínas de la membrana externa de <i>B. abortus</i>
Factor/es soluble/s	Agonistas del EGFR	IL-6
Mecanismo molecular	Retención en aparato de Golgi	Inhibición de la transcripción de CIITA

Tabla 1. Estrategias para la inhibición de la expresión de las moléculas de MHC mediadas por *B. abortus*.

La disminución de la presentación antigénica a través de la inhibición de la expresión de las moléculas de MHC es una estrategia de evasión inmune ampliamente utilizada por distintos patógenos [264]. A este respecto, la inhibición de la expresión de MHC-II es un mecanismo que ha sido descrito

para una gran variedad de microorganismos, entre ellos, virus, bacterias intra y extracelulares, parásitos protozoarios y multicelulares, etc [262, 265-267]. Bacterias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Francisella tularensis* y *Salmonella* spp. son todas capaces de alterar la expresión de las moléculas de MHC-II mediante diversos mecanismos [245, 268-270]. Por el contrario, la capacidad de inhibir la expresión de las moléculas de MHC-I pertenece casi exclusivamente a los virus. Hasta el momento, sólo unas pocas bacterias han demostrado esta habilidad, entre ellas *Chlamydia trachomatis* y *Listeria monocytogenes* [206, 271]. Las razones por las cuales se dan estas diferencias entre cada microorganismo no han sido dilucidadas. Sin embargo, las características intrínsecas de cada patógeno, su ciclo de vida intracelular y el tipo de respuesta inmune que logran generar probablemente tengan mucho que ver en las estrategias de evasión inmune que desarrolla cada uno.

En los últimos años, la capacidad del sistema inmune de distinguir entre patógenos viables metabólicamente activos o muertos ha cobrado mucha relevancia dado que el tipo de respuesta que se monta frente a unos u otros difiere notablemente [272, 273]. En particular, se ha notado que ciertos receptores de la inmunidad innata tales como RIG-I reconocen y responden específicamente a determinadas propiedades funcionales que se encuentran únicamente en bacterias patogénicas viables, tales como la secreción de ácidos nucleicos bacterianos hacia el citosol de las células infectadas [274]. En nuestro caso, nosotros observamos que la respuesta frente a *B. abortus* en monocitos humanos también es capaz de reconocer entre bacterias vivas o muertas ya que la inhibición de la expresión de MHC-I sólo ocurre en células infectadas con bacterias vivas. Es probable que exista algún metabolito cuya expresión depende de la viabilidad bacteriana que este provocando el reconocimiento diferencial en este caso. En este sentido, las diferencias entre los mecanismos de inhibición de las MHC por parte de *B. abortus*, en un caso mediante la inhibición de la transcripción de los genes de MHC-II mientras que el otro basado en la retención intracelular de moléculas de MHC-I ya sintetizadas, no resulta tan extraño considerando que es probable que los receptores que guían ambas vías no sean los mismos. En efecto, previamente demostramos que la inhibición de la expresión de MHC-II mediada por *B. abortus* es a través de TLR2, mediante el reconocimiento de un componente estructural de las bacterias tal como las lipoproteínas de la membrana externa [176]. Nuestros resultados con HKBA, no sólo descartan la participación de algún componente estructural de la bacteria sino que indican que el TLR2 no estaría involucrado en el caso de MHC-I.

Finalmente, el empleo de múltiples estrategias de evasión le darían a *B. abortus* una mayor versatilidad para mantener una continua inhibición de la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y de ese modo persistir crónicamente en el hospedador, evadiendo la respuesta inmune adaptativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Young, EJ. Human brucellosis. Rev Infect Dis. **1983**. 5(5): p. 821-42.
2. Moral, M. Diagnóstico de brucelosis: Guía para el equipo de salud N°12. **2013**, Buenos Aires. Dirección de Epidemiología-Ministerio de Salud de la Nación Argentina
3. Seleem, MN; et al. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol. **2010**. 140(3-4): p. 392-8.
4. Samartino, LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. **2002**. 90(-4): p. 71-80.
5. Moreno, E; et al. Brucella evolution and taxonomy. Vet Microbiol. **2002**. 90(1-4): p. 209-27.
6. Whatmore, AM. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol. **2009**. 9(6): p. 1168-84.
7. Michaux-Charachon, S; et al. Genome structure and phylogeny in the genus Brucella. J Bacteriol. **1997**. 179(10): p. 3244-9.
8. Jumas-Bilak, E; et al. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella. Mol Microbiol. **1998**. 27(1): p. 99-106.
9. Foster, G; et al. 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. **2007**. 57(Pt 11): p. 2688-93.
10. Scholz, HC; et al. Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. Int J Syst Evol Microbiol. **2008**. 58(Pt 2): p. 375-82.
11. Scholz, HC; et al. Isolation of Brucella microti from mandibular lymph nodes of red foxes, Vulpes vulpes, in lower Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. **2009**. 9(2): p. 153-6.
12. Scholz, HC; et al. Isolation of Brucella microti from soil. Emerg Infect Dis. **2008**. 14(8): p. 1316-7.
13. De, BK; et al. Novel Brucella strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. J Clin Microbiol. **2008**. 46(1): p. 43-9.
14. Scholz, HC; et al. Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. **2010**. 60(Pt 4): p. 801-8.
15. Tiller, RV; et al. Identification of an unusual Brucella strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. BMC Microbiol. **2010**. 10: p. 23.
16. Whatmore, AM; et al. Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). Int J Syst Evol Microbiol. **2014**. 64(Pt 12): p. 4120-8.
17. Franco, MP; et al. Human brucellosis. Lancet Infect Dis. **2007**. 7(12): p. 775-86.
18. Pappas, G. The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats. Int J Antimicrob Agents. **2010**. 36 Suppl 1: p. S8-11.
19. Brew, SD; et al. Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal. Vet Rec. **1999**. 144(17): p. 483.
20. Sohn, AH; et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp. Emerg Infect Dis. **2003**. 9(4): p. 485-8.

21. Fernandez-Prada, CM; et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. Infect Immun. **2003**. 71(4): p. 2110-9.
22. Wattam, AR; et al. Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway. MBio. **2012**. 3(5): p. e00246-11.
23. Zygmunt, MS; et al. Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. Clin Vaccine Immunol. **2012**. 19(9): p. 1370-3.
24. Pappas, G; et al. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. **2006**. 6(2): p. 91-9.
25. Park, MY; et al. A sporadic outbreak of human brucellosis in Korea. J Korean Med Sci. **2005**. 20(6): p. 941-6.
26. Wang, Y; et al. Human brucellosis, a heterogeneously distributed, delayed, and misdiagnosed disease in china. Clin Infect Dis. **2012**. 56(5): p. 750-1.
27. Mailles, A; et al. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. Euro Surveill. **2012**. 17(30).
28. Abriata, G; et al. Boletín Epidemiológico Periódico N°33: Edición Especial Brucelosis. **2005**, Buenos Aires. Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación Argentina.
29. Young, EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis. **1995**. 21(2): p. 283-9; quiz 290.
30. Pappas, G; et al. *Brucella* as a biological weapon. Cell Mol Life Sci. **2006**. 63(19-20): p. 2229-36.
31. Vigeant, P; et al. Human to human transmission of *Brucella melitensis*. Can J Infect Dis. **1995**. 6(3): p. 153-5.
- 32.
33. Corbel, MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. **1997**. 3(2): p. 213-21.
34. Moriyon, I; et al. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Int Microbiol. **1998**. 1(1): p. 19-26.
35. Beveridge, TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J Bacteriol. **1999**. 181(16): p. 4725-33.
36. Lapaque, N; et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Curr Opin Microbiol. **2005**. 8(1): p. 60-6.
37. Qureshi, N; et al. Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. Journal of Endotoxin Research. **1994**. 1: p. 137-148.
38. Cardoso, PG; et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microb Cell Fact. **2006**. 5: p. 13.
39. Freer, E; et al. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. Res Microbiol. **1995**. 146(7): p. 569-78.

40. Barquero-Calvo, E; et al. Brucella abortus Induces the Premature Death of Human Neutrophils through the Action of Its Lipopolysaccharide. PLoS Pathog. **2015**. 11(5): p. e1004853.
41. Cloeckeaert, A; et al. Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future. Vet Microbiol. **2002**. 90(1-4): p. 229-47.
42. Winter, AJ. Outer membrane proteins of Brucella. Ann Inst Pasteur Microbiol. **1987**. 138(1): p. 87-9.
43. Douglas, JT; et al. Porins of Brucella species. Infect Immun. **1984**. 44(1): p. 16-21.
44. Bae, JE; et al. 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. **2002**. 88(2): p. 189-202.
45. Winter, AJ; et al. 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. **1983**. 42(3): p. 1159-67.
46. Bowden, RA; et al. 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. **1998**. 47(1): p. 39-48.
47. Goolab, S; et al. Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in Brucella. Front Microbiol. **2015**. 6: p. 1189.
48. Zhou, L; et al. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. **1998**. 163(2): p. 223-8.
49. Dubray, G; et al. [Structure and constituents of Brucella. Characterization and biological properties of the fractions]. Dev Biol Stand. **1976**. 31: p. 68-91.
50. Roest, HP; et al. Isolation and characterization of ropA homologous genes from Rhizobium leguminosarum biovars viciae and trifolii. J Bacteriol. **1995**. 177(17): p. 4985-91.
51. Vizcaino, N; et al. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of Brucella spp.: identification of a 1.7-kb inversion in Brucella cetaceae and of a 15.1-kb genomic island, absent from Brucella ovis, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. Microbes Infect. **2004**. 6(9): p. 821-34.
52. Martinez de Tejada, G; et al. The outer membranes of Brucella spp. are not barriers to hydrophobic permeants. J Bacteriol. **1993**. 175(16): p. 5273-5.
53. Hancock, RE; et al. Outer membrane proteins of Pseudomonas. Mol Microbiol. **1990**. 4(7): p. 1069-75.
54. Martinez de Tejada, G; et al. The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect Immun. **1995**. 63(8): p. 3054-61.
55. Adams, LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. Vet Microbiol. **2002**. 90(1-4): p. 553-61.
56. de Figueiredo, P; et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions. Am J Pathol. **2015**. 185(6): p. 1505-17.

57. Castaneda-Roldan, EI; et al. Adherence of Brucella to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. Cell Microbiol. **2004**. 6(5): p. 435-45.
58. Delpino, MV; et al. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp. Infect Immun. **2009**. 77(3): p. 984-95.
59. Delpino, MV; et al. Brucella-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses. J Hepatol. **2010**. 53(1): p. 145-54.
60. Garcia Samartino, C; et al. Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis. Am J Pathol. **2010**. 176(3): p. 1323-38.
61. Detilleux, PG; et al. Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun. **1990**. 58(7): p. 2320-8.
62. Arriola Benitez, PC; et al. Brucella abortus induces collagen deposition and MMP-9 down-modulation in hepatic stellate cells via TGF-beta1 production. Am J Pathol. **2013**. 183(6): p. 1918-27.
63. Goenka, R; et al. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium Brucella abortus. J Infect Dis. **2012**. 206(1): p. 91-8.
64. Velasquez, LN; et al. Brucella abortus induces apoptosis of human T lymphocytes. Microbes Infect. **2012**. 14(7-8): p. 639-50.
65. Rossetti, CA; et al. Transcriptome analysis of HeLa cells response to Brucella melitensis infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the Brucella pathogenesis. Microbes Infect. **2012**. 14(9): p. 756-67.
66. Rossetti, CA; et al. Systems biology analysis of Brucella infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. PLoS One. **2013**. 8(12): p. e81719.
67. Watarai, M; et al. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to Brucella abortus infection of mice. Infect Immun. **2002**. 70(9): p. 4818-25.
68. Watarai, M. Interaction between Brucella abortus and cellular prion protein in lipid raft microdomains. Microbes Infect. **2004**. 6(1): p. 93-100.
69. Fontes, P; et al. Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with Brucella suis. Infect Immun. **2005**. 73(10): p. 6229-36.
70. Porte, F; et al. Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. Infect Immun. **2003**. 71(3): p. 1481-90.
71. Rittig, MG; et al. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. J Leukoc Biol. **2003**. 74(6): p. 1045-55.
72. Pei, J; et al. Brucella abortus rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. Infect Immun. **2004**. 72(1): p. 440-50.

73. Martin-Martin, AI; et al. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. Microbes Infect. **2010**. 12(3): p. 246-51.
74. Bellaire, BH; et al. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. Infect Immun. **2005**. 73(6): p. 3702-13.
75. Caron, E; et al. Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect Immun. **1994**. 62(12): p. 5267-74.
76. Rolan, HG; et al. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* virB mutant colonization. Infect Immun. **2007**. 75(6): p. 2965-73.
77. Pizarro-Cerda, J; et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect Immun. **1998**. 66(12): p. 5711-24.
78. Chaves-Olarte, E; et al. Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. Cell Microbiol. **2002**. 4(10): p. 663-76.
79. Celli, J; et al. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med. **2003**. 198(4): p. 545-56.
80. Jiang, X; et al. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. Infect Immun. **1993**. 61(1): p. 124-34.
81. Starr, T; et al. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. Traffic. **2008**. 9(5): p. 678-94.
82. O'Callaghan, D; et al. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol Microbiol. **1999**. 33(6): p. 1210-20.
83. Boschioli, ML; et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. **2002**. 99(3): p. 1544-9.
84. Delrue, RM; et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. Cell Microbiol. **2001**. 3(7): p. 487-97.
85. den Hartigh, AB; et al. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. J Bacteriol. **2008**. 190(13): p. 4427-36.
86. Celli, J; et al. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. Proc Natl Acad Sci U S A. **2005**. 102(5): p. 1673-8.
87. Fugier, E; et al. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for *Brucella* replication. PLoS Pathog. **2009**. 5(6): p. e1000487.
88. Starr, T; et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. Cell Host Microbe. **2012**. 11(1): p. 33-45.

89. Fainboim, L; et al. Introducción a la Inmunología Humana. 6 ed. **2011**, Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
90. Golding, B; et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* **2001**. 3(1): p. 43-8.
91. Jiang, X; et al. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.* **1993**. 151(2): p. 309-19.
92. Dorneles, EM; et al. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine.* **2015**. 33(31): p. 3659-66.
93. Billard, E; et al. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun.* **2005**. 73(12): p. 8418-24.
94. Salcedo, SP; et al. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein *Btp1*. *PLoS Pathog.* **2008**. 4(2): p. e21.
95. Papadopoulos, A; et al. *Brucella* discriminates between mouse dendritic cell subsets upon in vitro infection. *Virulence.* **2015**. 7(1): p. 33-44.
96. Zwerdling, A; et al. *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* **2008**. 10(12-13): p. 1346-54.
97. Dornand, J; et al. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism. *Infect Immun.* **2004**. 72(4): p. 2303-11.
98. Gao, N; et al. Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*. *Innate Immun.* **2011**. 17(2): p. 152-63.
99. Fernandes, DM; et al. Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infect Immun.* **1995**. 63(10): p. 4029-33.
100. Salmeron, I; et al. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin Infect Dis.* **1992**. 15(5): p. 764-70.
101. Zwerdling, A; et al. *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes Infect.* **2009**. 11(6-7): p. 689-97.
102. Barquero-Calvo, E; et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One.* **2007**. 2(7): p. e631.
103. Barquero-Calvo, E; et al. Neutrophils exert a suppressive effect on *Th1* responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathog.* **2013**. 9(2): p. e1003167.
104. Giambartolomei, GH; et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol.* **2004**. 173(7): p. 4635-42.
105. Zhan, Y; et al. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* **1995**. 63(4): p. 1387-90.

- 106.** Zhan, Y; et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. Infect Immun. **1996**. 64(7): p. 2782-6.
- 107.** Zhan, Y; et al. Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts. Immunology. **1993**. 80(3): p. 458-64.
- 108.** Zhan, Y; et al. Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro. Infect Immun. **1995**. 63(2): p. 720-3.
- 109.** Zaitseva, M; et al. Human peripheral blood T cells, monocytes, and macrophages secrete macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta following stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*. Infect Immun. **2001**. 69(6): p. 3817-26.
- 110.** Kawai, T; et al. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. **2011**. 34(5): p. 637-50.
- 111.** Campos, MA; et al. Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. Infect Immun. **2004**. 72(1): p. 176-86.
- 112.** Weiss, DS; et al. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. Infect Immun. **2005**. 73(8): p. 5137-43.
- 113.** Huang, LY; et al. 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. **2003**. 171(3): p. 1441-6.
- 114.** Macedo, GC; et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. J Immunol. **2008**. 180(2): p. 1080-7.
- 115.** Copin, R; et al. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. J Immunol. **2007**. 178(8): p. 5182-91.
- 116.** Oliveira, FS; et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and -2 play no role in controlling *Brucella abortus* infection in mice. Clin Dev Immunol. **2012**. 2012: p. 861426.
- 117.** de Almeida, LA; et al. MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to *Brucella abortus* infection. PLoS One. **2011**. 6(8): p. e23135.
- 118.** Zhan, Y; et al. Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. Infect Immun. **1993**. 61(11): p. 4899-901.
- 119.** Fernandes, DM; et al. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. FEMS Immunol Med Microbiol. **1996**. 16(3-4): p. 193-203.
- 120.** Murphy, EA; et al. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology. **2001**. 103(4): p. 511-8.
- 121.** Brandao, AP; et al. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice. Clin Dev Immunol. **2011**. 2012: p. 589494.

- 122.** Oliveira, SC; et al. 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. **1995**. 25(9): p. 2551-7.
- 123.** Durward, MA; et al. Discordant Brucella melitensis antigens yield cognate CD8+ T cells in vivo. Infect Immun. **2010**. 78(1): p. 168-76.
- 124.** Durward, M; et al. Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis. PLoS One. **2012**. 7(4): p. e34925.
- 125.** Skyberg, JA; et al. Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections. PLoS One. **2011**. 6(7): p. e21978.
- 126.** Ni, M; et al. Full restoration of Brucella-infected dendritic cell functionality through Vgamma9Vdelta2 T helper type 1 crosstalk. PLoS One. **2012**. 7(8): p. e43613.
- 127.** Winter, AJ; et al. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of Brucella abortus infection in mice. Infect Immun. **1989**. 57(11): p. 3438-44.
- 128.** Elzer, PH; et al. 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. **1994**. 82(4): p. 651-8.
- 129.** Splitter, GA; et al. Brucella abortus regulates bovine macrophage-T-cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression. Infect Immun. **1989**. 57(4): p. 1151-7.
- 130.** Escola, JM; et al. The O-chain of Brucella abortus lipopolysaccharide induces SDS-resistant MHC class II molecules in mouse B cells. Biochem Biophys Res Commun. **1994**. 203(2): p. 1230-6.
- 131.** Zaitseva, MB; et al. Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated Brucella abortus. Infect Immun. **1995**. 63(7): p. 2720-8.
- 132.** Skendros, P; et al. Immunity to brucellosis. Rev Sci Tech. **2013**. 32(1): p. 137-47.
- 133.** Giambartolomei, GH; et al. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. J Infect Dis. **2002**. 186(2): p. 252-9.
- 134.** Akbulut, HH; et al. Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis. FEMS Immunol Med Microbiol. **2005**. 45(2): p. 253-8.
- 135.** Rafiei, A; et al. Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. J Infect. **2006**. 53(5): p. 315-24.
- 136.** Rodriguez-Zapata, M; et al. Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function. Infect Immun. **2010**. 78(7): p. 3272-9.
- 137.** Skendros, P; et al. Cell-mediated immunity in human brucellosis. Microbes Infect. **2011**. 13(2): p. 134-42.

- 138.** Martirosyan, A; et al. In vivo identification and characterization of CD4(+) cytotoxic T cells induced by virulent *Brucella abortus* infection. PLoS One. **2013.** 8(12): p. e82508.
- 139.** Bertotto, A; et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. Eur J Immunol. **1993.** 23(5): p. 1177-80.
- 140.** Kilic, SS; et al. Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis. Clin Exp Med. **2009.** 9(2): p. 101-4.
- 141.** Ottonnes, F; et al. 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. **2000.** 165(12): p. 7133-9.
- 142.** Dudal, S; et al. Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. J Immunol. **2006.** 177(8): p. 5533-9.
- 143.** Diaz, R; et al. Surface antigens of smooth brucellae. J Bacteriol. **1968.** 96(4): p. 893-901.
- 144.**
- 145.** Montaraz, JA; et al. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. Infect Immun. **1986.** 51(3): p. 961-3.
- 146.** Cloeckert, A; et al. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. J Med Microbiol. **1991.** 34(3): p. 175-80.
- 147.** Jimenez de Bagues, MP; et al. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. Infect Immun. **1994.** 62(11): p. 4990-6.
- 148.** Ho, M; et al. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. J Infect Dis. **1982.** 146(3): p. 381-7.
- 149.** Fernandes, DM; et al. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. Infect Immun. **1995.** 63(3): p. 1130-3.
- 150.** Klein, C; et al. Major histocompatibility complex class II deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. J Pediatr. **1993.** 123(6): p. 921-8.
- 151.** Mach, B; et al. MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation. Immunol Rev. **1994.** 138: p. 207-21.
- 152.** Wraith, DC; et al. T cell recognition as the target for immune intervention in autoimmune disease. Cell. **1989.** 57(5): p. 709-15.
- 153.** Acha-Orbea, H; et al. The role of class II molecules in development of insulin-dependent diabetes mellitus in mice, rats and humans. Curr Top Microbiol Immunol. **1990.** 156: p. 103-19.
- 154.** Kobayashi, KS; et al. NLR5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. Nat Rev Immunol. **2012.** 12(12): p. 813-20.
- 155.** Ting, JP; et al. Genetic control of MHC class II expression. Cell. **2002.** 109 Suppl: p. S21-33.

156. LeibundGut-Landmann, S; et al. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. Eur J Immunol. **2004**. 34(6): p. 1513-25.
157. Neefjes, J; et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol. **2011**. 11(12): p. 823-36.
158. Donaldson, JG; et al. Intracellular assembly and trafficking of MHC class I molecules. Traffic. **2009**. 10(12): p. 1745-52.
159. Roche, PA; et al. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol. **2015**. 15(4): p. 203-16.
160. Plataniias, LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol. **2005**. 5(5): p. 375-86.
161. Schroder, K; et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. **2004**. 75(2): p. 163-89.
162. Baldwin, CL; et al. Host immune responses to the intracellular bacteria Brucella: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? Crit Rev Immunol. **2006**. 26(5): p. 407-42.
163. Yingst, S; et al. T cell immunity to brucellosis. Crit Rev Microbiol. **2003**. 29(4): p. 313-31.
164. Kaufmann, SH. Immunity to intracellular microbial pathogens. Immunol Today. **1995**. 16(7): p. 338-42.
165. Hoffmann, EM; et al. Failure of Brucella abortus lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. Vet Immunol Immunopathol. **1983**. 5(1): p. 65-76.
166. Gorvel, JP; et al. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol. **2002**. 90(1-4): p. 281-97.
167. Roop, RM, 2nd; et al. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. Mol Microbiol. **2004**. 52(3): p. 621-30.
168. Gross, A; et al. In vitro Brucella suis infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. Infect Immun. **2000**. 68(1): p. 342-51.
169. Renoux, M; et al. Brucellosis, immunodepression, and levamisole. Lancet. **1977**. 1(8007): p. 372.
170. Thornes, RD. Acquired immune suppression in chronic brucellosis. Ir Med J. **1983**. 76(5): p. 225.
171. Boura, P; et al. Effect of bacterial extracts on the immunologic profile in chronic relapsing brucellosis patients. Int J Immunopathol Pharmacol. **1999**. 12(2): p. 103-111.
172. Skendros, P; et al. Diminished percentage of CD4+ T-lymphocytes expressing interleukine-2 receptor alpha in chronic brucellosis. J Infect. **2007**. 54(2): p. 192-7.
173. Forestier, C; et al. Brucella abortus lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. J Immunol. **2000**. 165(9): p. 5202-10.
174. Spera, JM; et al. A B lymphocyte mitogen is a Brucella abortus virulence factor required for persistent infection. Proc Natl Acad Sci U S A. **2006**. 103(44): p. 16514-9.

175. Spera, JM; et al. A Brucella virulence factor targets macrophages to trigger B-cell proliferation. J Biol Chem. **2013**. 288(28): p. 20208-16.
176. Barrionuevo, P; et al. Brucella abortus inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. Infect Immun. **2008**. 76(1): p. 250-62.
177. Barrionuevo, P; et al. Brucella abortus inhibits IFN-gamma-induced FcγRI expression and FcγRI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages. Microbes Infect. **2011**. 13(3): p. 239-50.
178. Siddiqui, S; et al. TLR engagement prior to virus infection influences MHC-I antigen presentation in an epitope-dependent manner as a result of nitric oxide release. J Leukoc Biol. **2010**. 89(3): p. 457-68.
179. Kuchtey, J; et al. Enhancement of dendritic cell antigen cross-presentation by CpG DNA involves type I IFN and stabilization of class I MHC mRNA. J Immunol. **2005**. 175(4): p. 2244-51.
180. Kukutsch, NA; et al. Formation and kinetics of MHC class I-ovalbumin peptide complexes on immature and mature murine dendritic cells. J Invest Dermatol. **2000**. 115(3): p. 449-53.
181. Comerici, DJ; et al. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. Cell Microbiol. **2001**. 3(3): p. 159-68.
182. Pollack, BP; et al. Epidermal growth factor receptor inhibition augments the expression of MHC class I and II genes. Clin Cancer Res. **2011**. 17(13): p. 4400-13.
183. Pollack, BP. EGFR inhibitors, MHC expression and immune responses : Can EGFR inhibitors be used as immune response modifiers? Oncoimmunology. **2012**. 1(1): p. 71-74.
184. Zhu, L; et al. Rhinovirus-induced major airway mucin production involves a novel TLR3-EGFR-dependent pathway. Am J Respir Cell Mol Biol. **2009**. 40(5): p. 610-9.
185. Graus-Porta, D; et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. Embo J. **1997**. 16(7): p. 1647-55.
186. Pinkas-Kramarski, R; et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. Embo J. **1996**. 15(10): p. 2452-67.
187. Wang, LM; et al. ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4. Proc Natl Acad Sci U S A. **1998**. 95(12): p. 6809-14.
188. Worthylake, R; et al. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. J Biol Chem. **1999**. 274(13): p. 8865-74.
189. Singh, AB; et al. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. Cell Signal. **2005**. 17(10): p. 1183-93.
190. Lee, DC; et al. TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. Ann N Y Acad Sci. **2003**. 995: p. 22-38.

- 191.** Koff, JL; et al. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **2008.** 294(6): p. L1068-75.
- 192.** He, Y; et al. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with Brucella abortus RB51. Infect Immun. **2001.** 69(9): p. 5502-8.
- 193.** Zhou, F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. Int Rev Immunol. **2009.** 28(3-4): p. 239-60.
- 194.** Ferrero, MC; et al. Smooth Brucella strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. Microbes Infect. **2009.** 11(4): p. 476-83.
- 195.** Ferrero, MC; et al. Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection. Microbes Infect. **2011.** 13(10): p. 852-61.
- 196.** Scian, R; et al. Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by Brucella abortus infection through production and induction of matrix metalloproteinases. Infect Immun. **2011.** 79(9): p. 3619-32.
- 197.** Scian, R; et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with Brucella abortus. Infect Immun. **2011.** 79(1): p. 192-202.
- 198.** Scian, R; et al. Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation. Infect Immun. **2012.** 80(7): p. 2333-45.
- 199.** Ashrafi, GH; et al. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. Oncogene. **2002.** 21(2): p. 248-59.
- 200.** Marchetti, B; et al. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. Oncogene. **2002.** 21(51): p. 7808-16.
- 201.** Ploegh, HL. Viral strategies of immune evasion. Science. **1998.** 280(5361): p. 248-53.
- 202.** Hansen, TH; et al. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. Nat Rev Immunol. **2009.** 9(7): p. 503-13.
- 203.** Rodriguez, T; et al. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. BMC Cancer. **2007.** 7: p. 34.
- 204.** Kirveskari, J; et al. Enterobacterial infection modulates major histocompatibility complex class I expression on mononuclear cells. Immunology. **1999.** 97(3): p. 420-8.
- 205.** Neumeister, B; et al. Legionella pneumophila down-regulates MHC class I expression of human monocytic host cells and thereby inhibits T cell activation. Cell Mol Life Sci. **2005.** 62(5): p. 578-88.
- 206.** Ibane, JA; et al. Chlamydia trachomatis immune evasion via downregulation of MHC class I surface expression involves direct and indirect mechanisms. Infect Dis Obstet Gynecol. **2011.** 2011: p. 420905.

- 207.** Weiss, DJ; et al. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis or Mycobacterium avium subsp. avium. Infect Immun. **2001**. 69(2): p. 1002-8.
- 208.** Andersson, M; et al. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. Cell. **1985**. 43(1): p. 215-22.
- 209.** Hill, AB; et al. HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2. J Immunol. **1994**. 152(6): p. 2736-41.
- 210.** Smith, JA; et al. Brucella induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. PLoS Pathog. **2013**. 9(12): p. e1003785.
- 211.** Shields, MJ; et al. Mapping of the monoclonal antibody W6/32: sensitivity to the amino terminus of beta2-microglobulin. Tissue Antigens. **1998**. 51(5): p. 567-70.
- 212.** Goldstein, DJ; et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases. Nature. **1991**. 352(6333): p. 347-9.
- 213.** Rohde, J; et al. Orf virus interferes with MHC class I surface expression by targeting vesicular transport and Golgi. BMC Vet Res. **2012**. 8: p. 114.
- 214.** Kohler, S; et al. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella? Trends Microbiol. **2003**. 11(5): p. 215-9.
- 215.** Celli, J. Surviving inside a macrophage: the many ways of Brucella. Res Microbiol. **2006**. 157(2): p. 93-8.
- 216.** Porte, F; et al. Early acidification of phagosomes containing Brucella suis is essential for intracellular survival in murine macrophages. Infect Immun. **1999**. 67(8): p. 4041-7.
- 217.** Hewitt, EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. Immunology. **2003**. 110(2): p. 163-9.
- 218.** Garcia-Lora, A; et al. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. J Cell Physiol. **2003**. 195(3): p. 346-55.
- 219.** Seliger, B; et al. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. Int J Cancer. **2006**. 118(1): p. 129-38.
- 220.** Burova, E; et al. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. **2007**. 581(7): p. 1475-80.
- 221.** Olayioye, MA; et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. Embo J. **2000**. 19(13): p. 3159-67.
- 222.** Mitra, RS; et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha decrease gamma interferon receptors and induction of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on cultured keratinocytes. J Cell Physiol. **1992**. 150(2): p. 264-8.

- 223.** Henricks, LM; *et al.* *The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology.* Cancer Treat Rev. **2015.** 41(10): p. 859-67.
- 224.** Hammer, M; *et al.* *Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10.* Eur J Immunol. **2005.** 35(10): p. 2991-3001.
- 225.** Yasukawa, H; *et al.* *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.* Nat Immunol. **2003.** 4(6): p. 551-6.
- 226.** Clausen, BE; *et al.* *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice.* Transgenic Res. **1999.** 8(4): p. 265-77.
- 227.** Hmama, Z; *et al.* *Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with Mycobacterium tuberculosis is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers.* J Immunol. **1998.** 161(9): p. 4882-93.
- 228.** Sendide, K; *et al.* *Mycobacterium bovis BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface.* Infect Immun. **2004.** 72(7): p. 4200-9.
- 229.** Starr, R; *et al.* *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature. **1997.** 387(6636): p. 917-21.
- 230.** Yasukawa, H; *et al.* *Negative regulation of cytokine signaling pathways.* Annu Rev Immunol. **2000.** 18: p. 143-64.
- 231.** Alexander, WS. *Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system.* Nat Rev Immunol. **2002.** 2(6): p. 410-6.
- 232.** Alexander, WS; *et al.* *SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine.* Cell. **1999.** 98(5): p. 597-608.
- 233.** Marine, JC; *et al.* *SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality.* Cell. **1999.** 98(5): p. 609-16.
- 234.** O'Keefe, GM; *et al.* *IFN-gamma regulation of class II transactivator promoter IV in macrophages and microglia: involvement of the suppressors of cytokine signaling-1 protein.* J Immunol. **2001.** 166(4): p. 2260-9.
- 235.** Kim, H; *et al.* *Thyrotropin-mediated repression of class II trans-activator expression in thyroid cells: involvement of STAT3 and suppressor of cytokine signaling.* J Immunol. **2003.** 171(2): p. 616-27.
- 236.** Dalpke, AH; *et al.* *Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs.* J Immunol. **2001.** 166(12): p. 7082-9.
- 237.** Stoiber, D; *et al.* *Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma.* J Immunol. **1999.** 163(5): p. 2640-7.

- 238.** Kolliputi, N; et al. IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via suppressor of cytokine signaling-1-induced apoptosis signal-regulating kinase-1 degradation. Am J Respir Cell Mol Biol. **2009.** 40(3): p. 314-24.
- 239.** Minogue, AM; et al. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1beta in a JAK2-dependent manner. J Neuroinflammation. **2012.** 9: p. 126.
- 240.** Greenlund, AC; et al. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). Embo J. **1994.** 13(7): p. 1591-600.
- 241.** Shuai, K; et al. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. Science. **1993.** 261(5129): p. 1744-6.
- 242.** Muhlethaler-Mottet, A; et al. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. Embo J. **1997.** 16(10): p. 2851-60.
- 243.** Pine, R; et al. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. Embo J. **1994.** 13(1): p. 158-67.
- 244.** Letesson, JJ; et al. Fun stories about Brucella: the "furtive nasty bug". Vet Microbiol. **2002.** 90(1-4): p. 317-28.
- 245.** Prados-Rosales, R; et al. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. J Clin Invest. **2011.**
- 246.** Harding, CV; et al. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. **2010.** 8(4): p. 296-307.
- 247.** Steimle, V; et al. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). Cell. **1993.** 75(1): p. 135-46.
- 248.** Chang, CH; et al. Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. Immunity. **1996.** 4(2): p. 167-78.
- 249.** Gobin, SJ; et al. Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. Immunity. **1997.** 6(5): p. 601-11.
- 250.** Gobin, SJ; et al. The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. Immunity. **1998.** 9(4): p. 531-41.
- 251.** Gobin, SJ; et al. The MHC-specific enhanceosome and its role in MHC class I and beta(2)-microglobulin gene transactivation. J Immunol. **2001.** 167(9): p. 5175-84.
- 252.** Barrionuevo, P; et al. Brucella abortus induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses. Cell Microbiol. **2013.** 15(4): p. 487-502.

- 253.** Masternak, K; *et al.* CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. Genes Dev. **2000.** 14(9): p. 1156-66.
- 254.** Martin, BK; *et al.* Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA. Immunity. **1997.** 6(5): p. 591-600.
- 255.** Williams, GS; *et al.* Mice lacking the transcription factor CIITA--a second look. Int Immunol. **1998.** 10(12): p. 1957-67.
- 256.** Itoh-Lindstrom, Y; *et al.* Reduced IL-4-, lipopolysaccharide-, and IFN-gamma-induced MHC class II expression in mice lacking class II transactivator due to targeted deletion of the GTP-binding domain. J Immunol. **1999.** 163(5): p. 2425-31.
- 257.** Robbins, GR; *et al.* Regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) by nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins. J Biol Chem. **2012.** 287(29): p. 24294-303.
- 258.** Meissner, TB; *et al.* NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. Proc Natl Acad Sci U S A. **2010.** 107(31): p. 13794-9.
- 259.** Yao, Y; *et al.* NLRC5 regulates MHC class I antigen presentation in host defense against intracellular pathogens. Cell Res. **2012.** 22(5): p. 836-47.
- 260.** Karlsen, AE; *et al.* Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) protects beta -cells against interleukin-1beta - and interferon-gamma -mediated toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. **2001.** 98(21): p. 12191-6.
- 261.** Bouhet, S; *et al.* The IFN-gamma-induced STAT1-CBP/P300 association, required for a normal response to the cytokine, is disrupted in Brucella-infected macrophages. Microb Pathog. **2009.** 46(2): p. 88-97.
- 262.** Tobian, AA; *et al.* Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. J Immunol. **2003.** 171(3): p. 1413-22.
- 263.** Wu, J; *et al.* A MyD88-JAK1-STAT1 complex directly induces SOCS-1 expression in macrophages infected with Group A Streptococcus. Cell Mol Immunol. **2014.** 12(3): p. 373-83.
- 264.** De Lerma Barbaro, A; *et al.* MHC immunoevasins: protecting the pathogen reservoir in infection. Tissue Antigens. **2005.** 66(1): p. 2-8.
- 265.** Tortorella, D; *et al.* Viral subversion of the immune system. Annu Rev Immunol. **2000.** 18: p. 861-926.
- 266.** Hegde, NR; *et al.* Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. Trends Immunol. **2003.** 24(5): p. 278-85.
- 267.** Manoury, B; *et al.* Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite Brugia malayi, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. Curr Biol. **2001.** 11(6): p. 447-51.
- 268.** Woolard, MD; *et al.* Francisella tularensis-infected macrophages release prostaglandin E2 that blocks T cell proliferation and promotes a Th2-like response. J Immunol. **2007.** 178(4): p. 2065-74.

- 269.** Hunt, D; et al. Francisella tularensis elicits IL-10 via a PGE(2)-inducible factor, to drive macrophage MARCH1 expression and class II down-regulation. PLoS One. **2012**. 7(5): p. e37330.
- 270.** Lapaque, N; et al. Salmonella regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens. Proc Natl Acad Sci U S A. **2009**. 106(33): p. 14052-7.
- 271.** Schuller, S; et al. Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in Listeria monocytogenes-infected murine macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol. **1998**. 20(4): p. 289-99.
- 272.** Sander, LE; et al. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. Nature. **2011**. 474(7351): p. 385-9.
- 273.** Abdullah, Z; et al. Scaling of immune responses against intracellular bacterial infection. Embo J. **2014**. 33(20): p. 2283-94.
- 274.** Abdullah, Z; et al. RIG-I detects infection with live Listeria by sensing secreted bacterial nucleic acids. Embo J. **2012**. 31(21): p. 4153-64.