



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**“MECANISMOS IMPLICADOS EN EL DAÑO HEPÁTICO Y LA MODULACIÓN DE LA
RESPUESTA INMUNE DESARROLLADA EN EL HÍGADO FRENTE A LA INFECCIÓN
POR *BRUCELLA SPP*”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Lic. Paula Constanza Arriola Benítez

Directora: Dra. María Victoria Delpino

Consejero de Estudios: Dr. Pablo César Baldi

Lugar de trabajo: Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo.
(INIGEM-CONICET/UBA)

RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias del género *Brucella*. La afección hepática es una manifestación frecuente en los pacientes con brucelosis; sin embargo, los mecanismos implicados en el daño hepático no han sido dilucidados. El objetivo general del presente trabajo fue determinar cuáles son los mecanismos implicados en el daño hepático y en la modulación de la respuesta inmune desarrollada en el hígado frente a la infección por *Brucella abortus*.

Los resultados obtenidos demostraron que *B. abortus* es capaz de invadir y multiplicarse en las células hepáticas estrelladas humanas (LX-2) y que las activa e induce la adquisición de un fenotipo fibrogénico, caracterizado por la deposición de colágeno y la inhibición de la actividad de la metaloproteasa de matriz (MMP)-9 por un mecanismo que implica la secreción de TGF- β 1.

Los estudios de la interacción de las células estrelladas con monocitos y hepatocitos revelaron que los sobrenadantes de los hepatocitos y de los monocitos infectados con *B. abortus* inducen la secreción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por parte de las células LX-2 no infectadas. Sin embargo, cuando los sobrenadantes de los monocitos y de los hepatocitos infectados fueron agregados a las células estrelladas previamente infectadas con *B. abortus*, la infección de las células LX-2 revirtió el efecto inducido por los sobrenadantes de los monocitos y de los hepatocitos infectados con *B. abortus*. La respuesta de las células estrelladas puede ser inflamatoria o fibrogénica de acuerdo a si las células LX-2 están infectadas o no y de su interacción con otros tipos celulares.

La activación de las células LX-2 mediada por *B. abortus* fue dependiente de la presencia de su sistema de secreción de tipo 4 (SST4) y de la proteína efectora BPE005 por un mecanismo que involucra la vía de señalización AMPc/PKA.

La respuesta fibrogénica que se desencadena frente a la infección con *B. abortus* está asociada a la activación de la vía autofágica. La bacteria induce la expresión de los marcadores de autofagia Beclin-1, LC3 II y p62 y al bloquear la vía se revierte el fenotipo fibrogénico adquirido por las células estrelladas, mediante un mecanismo dependiente del SST4 y BPE005, confirmando así la correlación entre fibrosis y autofagia. Luego de la activación de la vía autofágica la infección induce la muerte por apoptosis de las células estrelladas. Ésta podría ser una estrategia para que el depósito de matriz extracelular se produzca de manera controlada y autolimitada, tal como se observa en los pacientes con Brucelosis, en los que el desarrollo de cirrosis es un evento raro.

Estos mecanismos estudiados *in vitro* fueron corroborados *in vivo* utilizando el modelo murino. Los hígados de los ratones infectados con *B. abortus* presentaron simultáneamente focos con infiltrado inflamatorio y regiones de tejido fibrótico, siendo las células estrelladas las principales productoras de TGF- β en respuesta a la infección. A su vez, los hígados de los ratones infectados con *B. abortus* mutante para la proteína BPE005 presentaron menos fibrosis que aquellos provenientes de los infectados con la bacteria *wild type*, demostrando que BPE005 tiene un papel preponderante en la modulación del fenotipo fibrótico.

En conjunto, estos resultados indican que *B. abortus* vía el SST4 y la proteína secretada BPE005 modula a las células LX-2 hacia un fenotipo fibrótico mediante una vía que involucra la activación de la vía autofágica, PKA y AMPc; y que lleva en última instancia a la muerte de las células LX-2 por apoptosis. Todos estos mecanismos contribuyen a explicar al menos en parte los mecanismos involucrados en el daño hepático observado en la brucelosis humana.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora **Victoria**, por haberme guiado durante toda la tesis de manera excelente, por su paciencia y dedicación; porque sin conocerme me dio la oportunidad de ser parte del laboratorio, por confiar en mí, por exigirme y estimularme constantemente, por su asesoramiento científico y sobre todo porque me brindó su amistad, cariño y consejos.

A **Guillermo**, por sus valiosas críticas y sugerencias que me permitieron crecer profesionalmente y avanzar en mi carrera.

A las **chicas del laboratorio SATZ**, Ayelén, Cruz, Ana, Virginia, Lis y Paula, por el gran compañerismo, charlas compartidas, consejos y ayuda, sobre todo por su amistad que me hace disfrutar del día a día en el laboratorio.

Al **Dr. Diego Comerci** y a su grupo de trabajo, por proporcionarnos las mutantes utilizadas en éste trabajo y por su colaboración con los experimentos *in vivo*.

A la **Dra. Silvia Vanzulli**, por su colaboración con los estudios histopatológicos.

A **Romina Scian**, por su generosidad, buena predisposición y paciencia infinita para transmitirme sus conocimientos y enseñarme diferentes técnicas del laboratorio.

A mi **familia**, por su amor y apoyo incondicional, por creer en mí y acompañarme en cada etapa.

A mis **amigas**, porque más que amigas son mis hermanas de la vida, por quererme, apoyarme y estar siempre presentes.

Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en revistas científicas internacionales con referato:

1. **The effector protein BPE005 from *B. abortus* induces collagen deposition and MMP-9 down-modulation via TGF- β 1 in hepatic stellate cells.** Paula Constanza Arriola Benitez, Diego Rey Serantes, Claudia Herrmann, Ayelen Pesce Viglietti, Silvia Vanzulli, Guillermo Giambartolomei, Diego Comerci, and M. Victoria Delpino. *Infection and Immunity*. 2016 Feb; 84(2):598-606.
2. ***Brucella abortus* induces collagen deposition and MMP-9 down-modulation in hepatic stellate cells via TGF- β 1 production.** Paula Constanza Arriola Benitez, Romina Scian, Diego José Comerci, Diego Rey Serantes, Silvia Vanzulli, Carlos Alberto Fossati, Guillermo Hernán Giambartolomei, María Victoria Delpino. *The American Journal of Pathology*. 2013 Dec; 183(6):1918-27.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 1 |
| Introducción general | 3 |
| Brucelosis | 4 |
| Generalidades | 4 |
| Epidemiología | 4 |
| Diagnóstico y tratamiento..... | 6 |
| Fuentes y vías de transmisión | 7 |
| Brucelosis en humanos..... | 7 |
| Brucelosis animal | 7 |
| Manifestaciones clínicas | 8 |
| Brucelosis en humanos..... | 8 |
| Brucelosis animal | 9 |
| Etiología: <i>Brucella</i> spp. | 9 |
| Taxonomía | 9 |
| Composición de la envoltura y estructura antigénica | 11 |
| Biología de <i>Brucella</i> spp. y tráfico intracelular | 13 |
| Ciclo intracelular de <i>Brucella</i> spp | 14 |
| Sistema de Secreción de Tipo 4..... | 16 |
| Respuesta inmune contra <i>Brucella</i> spp. | 18 |
| Inmunidad innata | 18 |
| Células de la inmunidad innata | 19 |
| Citoquinas y quemoquinas de la inmunidad innata..... | 20 |
| Receptores de la inmunidad innata | 20 |
| Inmunidad adaptativa..... | 21 |
| Células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ | 21 |
| Respuesta humoral | 22 |
| Citoquinas..... | 22 |
| El hígado | 24 |
| Anatomía del órgano | 24 |
| Sistema inmune hepático | 25 |
| Células inmunes hematopoyéticas..... | 25 |
| Células inmunes no-hematopoyéticas..... | 26 |
| Resolución de los procesos inflamatorios | 26 |
| Células estrelladas del hígado..... | 27 |
| Brucelosis hepática | 30 |
| Hipótesis y objetivos | 32 |
| Capítulo I | 34 |
| Introducción | 35 |

| | |
|--|-----------|
| Materiales y métodos | 37 |
| Cultivo de bacterias | 37 |
| Cultivo celular | 37 |
| Infección celular | 37 |
| Estimulación con medio condicionado | 38 |
| Evaluación de la muerte celular por apoptosis | 38 |
| Medición de la concentración de citoquinas y de TIMP-1 | 39 |
| Zimografía | 39 |
| Cuantificación de los niveles de MMP-9 | 39 |
| Actividad gelatinolítica en condiciones nativas | 39 |
| Determinación de la deposición de colágeno | 40 |
| Análisis de la expresión de colágeno tipo I y α -SMA | 40 |
| Neutralización de TGF- β 1 | 40 |
| Evaluación de fibrosis hepática en un modelo murino de infección | 41 |
| Detección de TGF- β 1 en cortes de tejido | 41 |
| Análisis estadístico | 42 |
| Resultados | 43 |
| <i>B. abortus</i> infecta y se multiplica intracelularmente en la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2 | 43 |
| La infección con <i>B. abortus</i> no induce la muerte celular por apoptosis de las células estrelladas de hígado | 44 |
| La infección con <i>B. abortus</i> induce la secreción de IL-8, MCP-1, IL-6 y TGF- β 1 y estimula la expresión de α -SMA en las células estrelladas | 45 |
| <i>B. abortus</i> inhibe la secreción de MMP-9 y estimula la producción de TIMP-1 por parte de las células LX-2 | 46 |
| La infección con <i>B. abortus</i> inhibe la actividad neta de las metaloproteasas con actividad gelatinasa secretadas por las células LX-2 | 47 |
| Las células estrelladas depositan colágeno en respuesta a la infección por <i>B. abortus</i> | 48 |
| <i>B. abortus</i> inhibe la producción de MMP-9 por un mecanismo dependiente de TGF- β | 49 |
| Los sobrenadantes de los hepatocitos y de los monocitos infectados inducen la secreción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por parte de las células LX-2 | 50 |
| <i>B. abortus</i> inhibe la producción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de hepatocitos y monocitos infectados con la concomitante secreción de colágeno en las células LX-2 | 52 |
| <i>B. abortus</i> inhibe la secreción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de los monocitos y de los hepatocitos infectados por una vía dependiente de TGF- β en las células LX-2 | 52 |
| El hígado de los ratones infectados con <i>B. abortus</i> presenta niveles elevados de colágeno y TGF- β | 54 |
| Discusión | 56 |
| Capítulo II | 58 |
| Introducción | 59 |
| Materiales y métodos | 61 |
| Cultivo de bacterias | 61 |
| Cultivo celular | 61 |

| | |
|---|-----------|
| Infección celular | 61 |
| Ensayos de transfección | 61 |
| Estimulación con dibutiril-AMPC | 62 |
| Inhibición de la PKA | 62 |
| Evaluación de fibrosis hepática en un modelo murino de infección | 62 |
| Análisis estadístico | 63 |
| Resultados | 64 |
| <i>B. abortus</i> induce un perfil fibrogénico en las células hepáticas estrelladas de un modo dependiente al SST4 VirB. | 64 |
| La proteína BPE005 secretada por el SST4 de <i>B. abortus</i> es responsable del fenotipo fibrogénico inducido frente a la infección en las células hepáticas estrelladas. | 66 |
| La expresión de la proteína BPE005 en las células hepáticas estrelladas simula la respuesta fibrogénica causada por la infección con <i>B. abortus</i> | 69 |
| El B2AMPC restaura la capacidad de las células LX-2 transfectadas con <i>bpe005</i> para producir MMP-9 y no secretar TGF- β | 70 |
| La vía de señalización de PKA está implicada en la respuesta fibrogénica de las células LX-2 frente a la infección con <i>B. abortus</i> | 72 |
| La infección con <i>B. abortus</i> Δ <i>bpe005</i> induce un menor nivel de fibrosis que el inducido por <i>B. abortus</i> WT en el hígado de ratones. | 73 |
| Discusión | 75 |
| Capítulo III | 77 |
| Introducción | 78 |
| Materiales y métodos | 80 |
| Cultivo de bacterias | 80 |
| Cultivo celular | 80 |
| Infección celular | 80 |
| Western blotting | 80 |
| Análisis de la expresión de LC3 y Beclin-1 | 81 |
| Inhibición de la autofagia | 81 |
| Análisis estadístico | 81 |
| Resultados | 82 |
| La infección con <i>B. abortus</i> induce la expresión de LC3 II y Beclin-1 en las células LX-2. | 82 |
| La respuesta fibrogénica de las células LX-2 inducida por <i>B. abortus</i> es dependiente de la activación de la vía autofágica. | 83 |
| <i>B. abortus</i> induce autofagia en las células LX-2 por un mecanismo dependiente de la presencia de un SST4 VirB funcional. | 84 |
| <i>B. abortus</i> induce autofagia en las células LX-2 a través de su proteína efectora BPE005. | 85 |
| <i>B. abortus</i> induce el clivaje de Beclin-1 y la muerte celular por apoptosis de las células estrelladas. | 86 |
| Discusión | 89 |
| Conclusión general | 91 |
| Esquema 1: Modelo representativo de las conclusiones de este trabajo. | 93 |
| Bibliografía | 94 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| Ac/s | Anticuerpo/s |
| Ag/s | Antígeno/s |
| ATCC | de sus siglas en inglés <i>American Type Culture Collection</i> |
| AMPc | Adenosín Monofosfato Cíclico (de sus siglas en inglés <i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>) |
| CICUAL | Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación |
| B2AMPc | Dibutiril-AMPc |
| BSA | Albúmina Sérica Bovina (de sus siglas en inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| DAPI | de sus siglas en inglés <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> |
| DMEM | de sus siglas en inglés <i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (de sus siglas en inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>) |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína (de sus siglas en inglés <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>) |
| h/hs | Hora/s |
| IFN | Interferón |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleuquina |
| IP | Ioduro de Propidio |
| LPS | Lipopolisacarido |
| MCP-1 | Quemoquina quimioattractante de monocitos (de sus siglas en inglés <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>) |
| MEC | Matriz extracelular |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad (de sus siglas en inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>) |
| min | Minutos |
| MMP/s | Metaloproteasa/s de matriz (de sus siglas en inglés <i>Matrix MetalloProteinases</i>) |
| MOI | Multiplicidad de infección (de sus siglas en inglés <i>Multiplicity Of Infection</i>) |
| NK | Células citotóxicas naturales (de sus siglas en inglés <i>Natural Killer</i>) |
| Omp | Proteína de la membrana externa (de sus siglas en inglés <i>Outer Membrane Protein</i>) |

| | |
|---------------|--|
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos (de sus siglas en inglés <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>) |
| PBS | Buffer fosfato salino (de sus siglas en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PFA | Paraformaldehído |
| PMA | forbol-12-miristato-13-acetato (de sus siglas en inglés <i>Phorbol-12-Myristato 13-Acetato</i>) |
| PKA | Proteína quinasa A (de sus siglas en inglés <i>Protein Kinase A</i>) |
| PRR | Receptores de reconocimiento de patrones (de sus siglas en inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>) |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| RPMI | de sus siglas en inglés <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio (de sus siglas en inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | de sus siglas en inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SST4 | Sistema de secreción tipo 4 |
| TGF | Factor de crecimiento transformante (de sus siglas en inglés <i>Transforming Growth Factor</i>) |
| Th1 | Células T- <i>helper</i> 1 |
| TIMP/s | Inhibidor/es tisular/es de metaloproteasas (de sus siglas en inglés <i>Tissue Inhibitors of MetalloProteinases</i>) |
| TLR/s | Receptor/es tipo toll (de sus siglas en inglés <i>Toll Like Receptor</i>) |
| TNF | Factor de necrosis tumoral (de sus siglas en inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>) |
| TUNEL | de sus siglas en inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i> |
| TSA | Agar tripteína de soja (de sus siglas en inglés <i>Tryptic Soy Agar</i>) |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| VCB | Vacuola que Contiene a <i>Brucella</i> |
| WT | Cepa salvaje (de sus siglas en inglés <i>Wild Type</i>) |
| α -SMA | Actina alfa de músculo liso (de sus siglas en inglés <i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>) |

Introducción general

BRUCELOSIS

GENERALIDADES

La Brucelosis es una zoonosis endémica de distribución mundial que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos y la fauna silvestre, es causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella* [1, 2]. 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 de bioterrorismo [3].

Las consecuencias de esta enfermedad en la salud pública y en el sector agropecuario son de gran relevancia. La disminución de la capacidad reproductora y abortos en el ganado, el parto de crías débiles y la contaminación de lácteos y carne, limitan las posibilidades de comercialización internacional, influyen negativamente en la rentabilidad de las explotaciones ganaderas, en la calidad de los productos y en el consumo, provocando de esta manera cuantiosas pérdidas económicas. En la Argentina, a pesar de que el control y erradicación de la brucelosis fue declarado de interés nacional en 1996 (LEY 24.696), la enfermedad es endémica y las pérdidas económicas anuales en el año 2002 se han estimado en US\$ 60.000.000 [4, 5].

EPIDEMIOLOGÍA

La brucelosis es considerada la zoonosis más común a nivel mundial con 500.000 nuevos casos por año y recientemente fue definida por la Organización Mundial de la Salud en el año 2014 como una “zoonosis olvidada y desatendida” [6]. El mapa global de la enfermedad se modifica constantemente debido a razones socioeconómicas, sanitarias y políticas [7]. En la mayoría de los países los casos de brucelosis humana deben ser notificados al sistema de salud local, sin embargo la enfermedad no siempre es informada y los números oficiales sólo constituyen una fracción de la incidencia real de la enfermedad. Por lo tanto, la verdadera incidencia de la brucelosis humana es desconocida [8, 9].

Entre los países declarados libres de brucelosis por la Unión Europea se encuentran Suecia, Dinamarca, Finlandia, Reino Unido, Austria, Países Bajos, Bélgica, Luxemburgo, Noruega y Suiza. Francia representa un buen ejemplo de control exitoso, en el año 1976 fueron reportados 800 casos y para el año 2000 el número de casos disminuyó a 44. Por otro lado, a pesar de los esfuerzos realizados, España es uno de los países con mayor incidencia anual en Europa y constituye un foco endémico [7].

El Medio Oriente ha sido considerado históricamente como zona endémica, de hecho 5 de los 10 países con mayor incidencia de casos de brucelosis humana en el mundo se encuentran en ésta zona, la lista está encabezada por Siria con 1603.4 casos anuales por millón de habitantes seguido por Iraq con una incidencia de 278.4 y Turquía con 262.2 casos anuales por millón de habitantes [7] (Imagen 1).

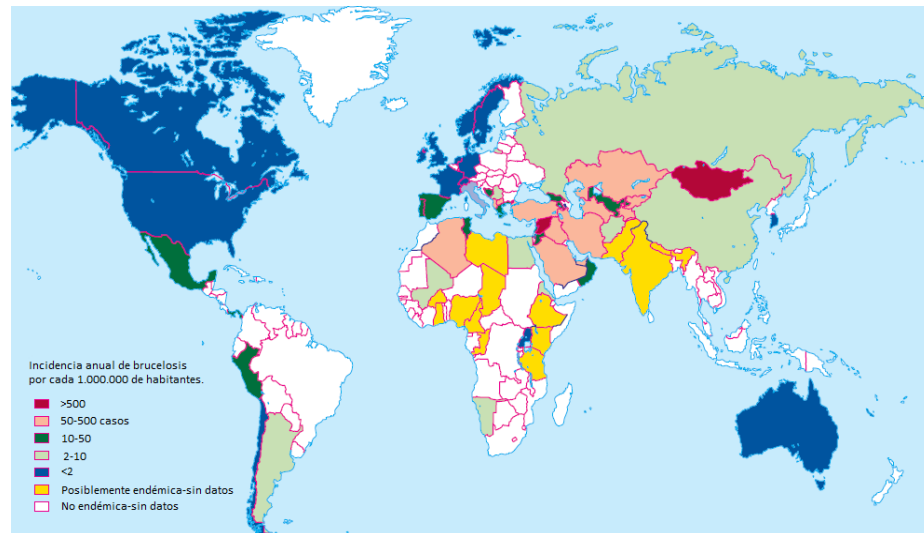


Imagen 1: Mapa global de la incidencia de brucelosis humana, modificado de [7].

En América Latina, la brucelosis ha sido notificada desde el siglo XX y a pesar de los esfuerzos realizados para su control, actualmente es considerada como una de las infecciones zoonóticas más importantes debido a su impacto en la salud pública y en la economía regional. La principal causa de las infecciones en humanos está dada por 3 especies: *B. melitensis*, *B. suis* y por *B. abortus* [10]. Se considera que los países más afectados son México, Argentina, Perú y Brasil [7, 11, 12].

En Argentina, la enfermedad fue descrita por primera vez en 1922, en el año 1930 se realizó el primer aislamiento de una cepa de *B. melitensis* de un paciente infectado y en 1932 la brucelosis fue incluida entre las enfermedades profesionales [4, 13]. Por ser una enfermedad de notificación obligatoria, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública informa semanalmente los casos detectados por provincia y regiones sanitarias. En los años 1992 y 1997 fueron reportados más de 600 casos de brucelosis humana y a partir del año 2002 el número de casos fue disminuyendo hasta valores que actualmente no superan los 300 anuales (Imagen 2) [2, 13]. En este punto es importante remarcar que si bien en nuestro país es una enfermedad de notificación obligatoria, las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas, por lo que se estima que la verdadera incidencia sería de 10 a 25 veces más alta que la indicada [13].

La distribución geográfica de la brucelosis humana está íntimamente relacionada a la brucelosis animal y la industria ganadera. 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* (ganado porcino) y *B. canis* (caninos) [13]. En cuanto a la brucelosis bovina, un estudio realizado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en el año 2014 reveló una prevalencia animal de 0.81% y una prevalencia de predios de 12.4% en establecimientos de cría y mixtos en la zona de mayor producción bovina del país (Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, La Pampa, Salta, San Luis, Santa Fe y Santiago del Estero). La situación epidemiológica de la brucelosis caprina y ovina no es del todo conocida ya que hay escasos trabajos publicados con datos oficiales. En Salta, se detectó una prevalencia de brucelosis caprina del 14,9 %, en el departamento de Malargüe en Mendoza se reportó

una prevalencia del 3,83 % y en Formosa del 12,6% [14-16]. Por otro lado, si bien no hay un relevamiento nacional de brucelosis ovina por *B. ovis*, se estima que la prevalencia varía entre un 4 y un 21% [17].

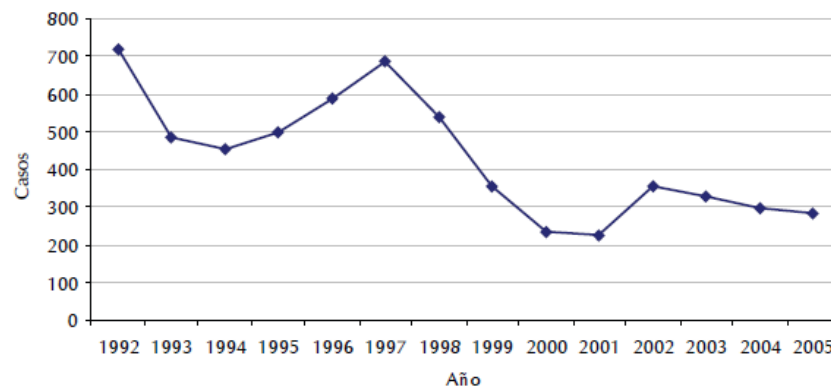


Imagen 2: Casos de brucelosis informados en Argentina durante el período 1992-2005 [13].

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

La brucelosis humana se caracteriza por presentar síntomas diversos e inespecíficos, debido a esto su detección no es sencilla [18]. Por lo tanto, para un diagnóstico eficiente se deben realizar estudios bacteriológicos y serológicos considerando la historia clínica del paciente y sus antecedentes epidemiológicos [2, 8, 19].

El diagnóstico de certeza de la enfermedad en humanos es el aislamiento de la bacteria [19] a partir de médula ósea, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido articular o biopsias [2]. Se considera que el método más adecuado es el mielocultivo ya que la concentración de la bacteria es alta en la médula ósea; sin embargo, su aplicabilidad está limitada por ser una técnica dolorosa e invasiva. Por otro lado, si bien los hemocultivos son de fácil obtención, su sensibilidad es muy variable ya que el porcentaje de casos con cultivo positivo oscila en un rango del 15 al 70% [18].

Entre las pruebas serológicas, la técnica de aglutinación en tubo es la más antigua y la más utilizada para el diagnóstico de la brucelosis en fase aguda por permitir la detección de anticuerpos séricos IgM, IgA e IgG. Por otra parte, la prueba de aglutinación 2-mercaptoetanol y la técnica de fijación del complemento son utilizadas para la detección de anticuerpos IgG que predominan en casos crónicos [2, 8].

Una alternativa a las técnicas convencionales es la PCR (de sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*), es más sensible que el cultivo y más específica que las pruebas serológicas, entre las ventajas cabe destacar que permite el diagnóstico temprano de la enfermedad y la detección de *Brucella* en muestras de diversos orígenes como leche y queso [19, 20].

El tratamiento de los pacientes con brucelosis incluye la combinación de antibióticos con efecto sinérgico, administrados durante varias semanas para reducir la aparición de recaídas. Las combinaciones más usadas son las propuestas por la Organización Mundial de la Salud que contemplan dos opciones; ambas incluyen la doxiciclina durante 6 semanas, combinada con estreptomina durante 2 a 3 semanas,

o rifampicina durante 6 semanas [18]. Si bien ambos esquemas poseen un elevado promedio de curación (mayor al 95%), el tratamiento de elección es doxiciclina/estreptomicina por presentar el índice más bajo de pacientes con recaídas [21].

En la actualidad no existe una vacuna para el control de la brucelosis en humanos, sin embargo se han desarrollado diferentes vacunas para prevenir la enfermedad en el ganado, las más utilizadas provienen de cepas vivas atenuadas. Para inmunizar al ganado bovino se utilizan principalmente las vacunas *B. abortus* cepa 19 (S19) y la cepa rugosa *B. abortus* RB51, para el ganado caprino se emplea la vacuna atenuada Rev-1, derivada de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056. El mayor inconveniente de estas vacunas es que son patógenas para el hombre, pueden causar abortos en animales gestantes y además la S19 y Rev-1 interfieren con la serología utilizada para el diagnóstico de la enfermedad [22, 23].

FUENTES Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Brucelosis en humanos

Los animales domésticos infectados con *Brucella* constituyen la principal fuente de infección para el hombre, principalmente los bovinos, caprinos, porcinos y ovinos. Los perros y animales salvajes (liebres, conejos, zorros, etc) también son reservorios naturales y por lo tanto una fuente de contagio [24].

Es considerada una enfermedad ocupacional ya que afecta a los trabajadores rurales, veterinarios, matarifes y ganaderos; también puede afectar a trabajadores de laboratorio o de servicios de salud. Sin embargo, en las zonas endémicas el peligro de infección no está limitado a las ocupaciones de riesgo [25].

El hombre puede infectarse con *Brucella* por el contacto de la piel erosionada, conjuntiva o mucosa nasal con tejidos de animales infectados o sus productos como sangre, orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados y en especial placentas. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y puede llegar a ser el responsable del 60%-70% de todos los casos registrados. Otra forma de transmisión es la ingesta de alimentos no pasteurizados de origen animal, como leche y sus derivados (quesos, crema, manteca, helados). La bacteria también puede ingresar al organismo por el sistema respiratorio, al inhalar aerosoles contaminados, o por la inoculación directa de material contaminado [2]. Si bien es poco frecuente, otra vía de transmisión es la transplacentaria originada cuando una mujer embarazada contagia al feto a través de la placenta produciendo el aborto o el nacimiento de niños infectados [25].

Brucelosis animal

En el ganado, la principal forma de contagio es por vía digestiva, esta se produce cuando los animales lamen fetos abortados, placentas, terneros recién nacidos o los genitales de otros animales. También es importante la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con secreciones vaginales y leche de hembras enfermas [26]. La infección también puede ocurrir a través las mucosas oculares y nasales [22].

Aunque poco frecuente, otras vías de ingresos de la bacteria son las mucosas: anal, prepucial, mamaria y uterina. Asimismo, la brucelosis puede transmitirse a través de la inseminación artificial y vía congénita, de la madre a las crías y estos animales quedar persistentemente infectados [22]. En bovinos, la brucelosis no es una enfermedad venérea, sin embargo los caninos y porcinos pueden infectarse por vía sexual [26].

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Brucelosis en humanos

La brucelosis es una enfermedad proteiforme y sistémica que no presenta un cuadro clínico característico que permita la detección precoz del infectado. Esto favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva. Si bien la mortalidad por brucelosis es baja, puede dejar secuelas discapacitantes de magnitud variable [21, 27].

La brucelosis puede ser clasificada como aguda, subaguda o crónica en base al tiempo de evolución de la misma [28, 29]. La virulencia y la tendencia a la cronicidad varían entre especies de *Brucella*, siendo *B. abortus* y *B. suis* las de mayor propensión a la cronicidad. Por el contrario, *B. melitensis* produce las infecciones más severas, tanto en humanos como en animales [28]. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares [29]. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la fiebre tifoidea, la tuberculosis y la leptospirosis. El recuento de células en sangre se caracteriza usualmente por una leucopenia moderada y una relativa linfocitosis, junto con una leve anemia y trombocitopenia [18]. La tercera parte de los pacientes presenta tos seca o productiva, el 30% estreñimiento, el 5-10% diarreas. En el 50% de los casos se produce hepatomegalia (ligera o moderada) y esplenomegalia y en el 25% adenopatías. Más del 5% de los pacientes presentan lesiones cutáneas: erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo. La severidad de la enfermedad está dada por las manifestaciones focales o complicaciones que se producen como consecuencia de la localización de la bacteria en un sitio anatómico particular [25].

La brucelosis osteoarticular es la complicación más frecuente, puede presentarse como artritis periférica, sacroileítis, espondilitis, osteomielitis y bursitis [27]. En el sistema genitourinario, la localización más común es en testículo y epidídimo, también puede afectar a los riñones provocando nefritis, oliguria y albuminuria. En la mujer, la infección adquirida durante el embarazo constituye un riesgo de aborto espontáneo [25]. Por otro lado, si bien el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular son localizaciones poco frecuentes de la bacteria, cuando se ven afectados las consecuencias pueden ser severas y permanentes, siendo la complicación cardiovascular la principal causa de mortalidad en pacientes con brucelosis [25]. También se han descrito afecciones oculares como inflamación de la córnea y úvea, queratoconjuntivitis, neuritis óptica, y cataratas [2].

La mayoría de los pacientes con brucelosis, indistintamente de la ruta de infección, experimentan síntomas gastrointestinales que incluyen anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y dolor abdominal [27]. Éstos pacientes pueden presentar manifestaciones clínicas como esplenomegalia, hepatomegalia, hepatitis granulomatosa y en ocasiones abscesos hepáticos, inflamación de la vesícula biliar, del peritoneo y páncreas, obstrucción o perforación intestinal y colitis erosiva [25].

Brucelosis animal

En los animales, después de la infección, las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que conduce al aborto en periodos avanzados de la gestación [22]. También se puede observar infertilidad, retención placentaria, nacimientos prematuros o a término de crías débiles o muertas, camadas pequeñas en el caso de las hembras polítopas (perra y cerda), metritis y disminución de la producción láctea. En general, las hembras adultas no gestantes infectadas son asintomáticas [2]. La infección en los machos puede producir orquitis que cursa con inflamación de las túnicas vaginales y escroto distendido por la presencia de exudado hemorrágico y/o fibrinopurulento. También pueden estar afectados el epidídimo y la vesícula seminal. La afección del sistema reproductivo conduce a la pérdida temporal o permanente de la fertilidad [26]. También puede presentarse hepatomegalia, esplenomegalia, artritis, discoespondilitis, alteración oftalmológica, decaimiento y anorexia en periodos de bacteriemia [2].

ETIOLOGÍA: *BRUCELLA* SPP.

Taxonomía

Las especies del género *Brucella* pertenecen a la clase α -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae [30]. 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 [31]. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está compuesto por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos [32]. La única excepción dentro del género lo constituye la biovariedad 3 de *B. suis* que cuenta con un único cromosoma de gran tamaño [33]. *Brucella* presenta varias características que la diferencian del resto de las bacterias respecto a la virulencia; no cuenta con factores clásicos de virulencia como cápsulas, fimbrias, exotoxinas, exoenzimas incluyendo exoproteasas, citolisinas, formas de resistencia, variaciones antigénicas, plásmidos y fagos lisogénicos [34].

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 [31]. Las primeras nuevas incorporaciones al género correspondieron a especies aisladas de animales marinos: *B. pinnipediae* y *B. ceti* [35]. En 2008 se reportaron otras 2 nuevas especies: *B. microti*, aislada en un primer momento de ratones salvajes [36] y luego encontrada

también en zorros rojos [37] y como contaminante en el suelo [38], y *B. inopinata*, la cual fue aislada de un implante mamario infectado de una mujer de 71 años con síntomas de brucelosis [39, 40]. A su vez, también se aisló la cepa de *B. inopinata* BO2 de un paciente con enfermedad pulmonar crónica y se determinó que tiene una gran similitud a *B. inopinata* [41]. En el año 2014 se estableció una nueva especie aislada a partir de crías nacidas muertas de mandriles, *B. papionis* [42]. La incorporación más reciente es *B. vulpis* aislada de los nódulos linfáticos de zorros rojos en Austria en el año 2016 [43]. 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% [31].

De las especies clásicas de *Brucella* sólo 4 son patógenas para el hombre: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. De ellas, como se mencionó previamente, las tres primeras son responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana [44-46]. 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 [47, 48]. Por otra parte, *B. inopinata* fue aislada de un caso humano si bien no se conoce su reservorio natural ni su ecología (Tabla 1) [39, 40].

Las especies de *Brucella* se clasifican generalmente como lisas o rugosas 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, siendo las cepas lisas más virulentas [49].

| CLASIFICACIÓN | ESPECIE | HOSPEDADOR PREFERENCIAL | NIVEL DE PATOGENICIDAD EN HUMANOS |
|------------------|-----------------------|---------------------------------------|--|
| Especies Lisas | <i>B. melitensis</i> | Caprinos, ovinos, camélidos | Elevada. |
| | <i>B. abortus</i> | Bovinos, camélidos, búfalos, bisontes | Moderada. |
| | <i>B. suis</i> | Porcinos, renos, caribúes, roedores | Moderada. |
| | <i>B. neotomae</i> | Roedores | No reportada |
| | <i>B. pinnipediae</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. |
| | <i>B. vulpis</i> | Zorro rojo | No reportada. |
| Especies Rugosas | <i>B. ovis</i> | Ovinos | No reportada. |
| | <i>B. canis</i> | Caninos | Moderada. |

Tabla 1: Características de las especies del género *Brucella* [46, 50, 51].

Composición de la envoltura y estructura antigénica

Al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, las bacterias del género *Brucella* poseen una envoltura celular formada por una membrana interna y una membrana externa, las cuales delimitan un espacio periplásmico intermedio. Éste espacio contiene componentes solubles y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano [52] (Imagen 3).

La membrana externa de *Brucella* contiene proteínas, fosfolípidos y un LPS, considerado como el principal antígeno en las bacterias Gram negativas [53]. El LPS es una molécula anfipática que consta de una parte exclusivamente polisacáridica dirigida hacia el exterior, y otra parte glucolípídica (lípid A) inserta en la membrana externa y por lo tanto no expuesta a la superficie. La parte polisacáridica 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.

Las bacterias del género *Brucella* poseen un LPS atípico en comparación con el clásico LPS de las enterobacterias como *Escherichia coli* [54]. La estructura básica del lípid 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 (C16:0 a C18:0) e

hidroxilados (3-OH-C12:0 a 29-OH-C30:0). 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 [55]. 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 [56]. Las moléculas de LPS de las especies clásicas de *Brucella* se caracterizan también por su heterogeneidad, no sólo de la cadena O, sino también a nivel del núcleo y del lípido [57]. Asimismo, se describió la presencia de moléculas de LPS atípicas en las nuevas especies de *Brucella* emergentes en particular a nivel de los epítopes antigénicos dominantes A y M [51].

Asociadas al LPS y formando parte de la membrana se encuentran proteínas de la membrana externa (Omps, de sus siglas en inglés *Outer membrane proteins*), muchas de las cuales han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional [58]. Estas proteínas se han dividido en 3 grupos de acuerdo a su peso molecular: grupo 1 (88-94 kDa); grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) [59]. Las Omps del grupo 2 fueron clasificadas como porinas y lipoproteínas que tienen semejanza a la lipoproteína de Braun de *E. coli* [60]. 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” [52]. 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 (Imagen 3) [61]. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas [62, 63].

Además de las diferencias en cuanto a su LPS, existen diferencias sutiles pero notables en cuanto a la membrana externa de las bacterias del género *Brucella* con respecto a las de otras Proteobacterias Gram negativas [64]. 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 membrana externa de *Brucella* tiene la tendencia a generar evaginaciones (*blebs*) espontáneas las cuales contienen componentes de la superficie celular y del espacio periplásmico [65]. A su vez, la membrana externa 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 membrana externa 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 [52]. Las interacciones entre las proteínas de la membrana externa de *Brucella* y los otros componentes de la membrana externa 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 [66]. Por otra

parte, se propuso que una porción de las Omps de *Brucella* podría estar covalentemente anclada a la capa de peptidoglicano [67, 68]. Si bien la inactivación de *Brucella* por calor causa el colapso de la membrana interna, la membrana externa mantiene su morfología intacta lo que sugiere que esta posee una mayor rigidez en comparación a la de otras bacterias Gram negativas [64]. Debido a las características del LPS, sustratos hidrofóbicos fácilmente permean la membrana externa de *Brucella* [60, 69]. Además, su resistencia a los policationes también le confiere resistencia a los sistemas bactericidas independientes del oxígeno de los fagocitos [69, 70].

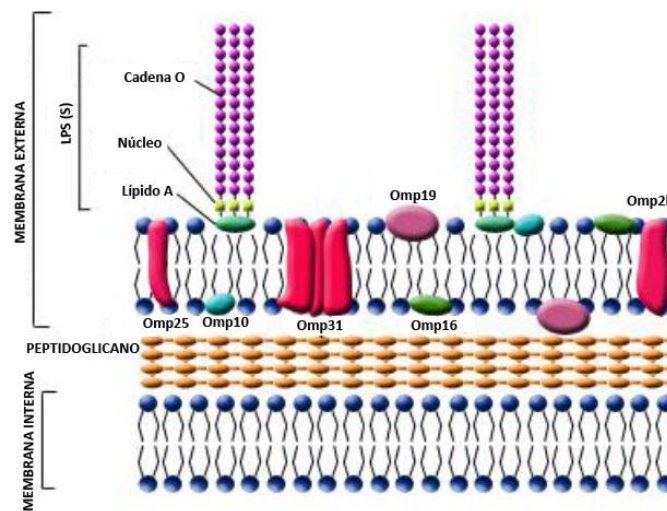


Imagen 3: Esquema representativo de la membrana de las especies lisas de *Brucella* spp.

Biología de *Brucella* spp. y tráfico intracelular

Mecanismos de invasión celular

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. 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 [44, 71, 72]. 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 *in vitro* otros tipos celulares como células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, linfocitos B y T y células gliales del sistema nervioso [73-79].

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) [80]. *Brucella* sobrevive

y replica dentro de células fagocíticas no-profesionales por hasta 72 hs *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 [72, 81].

En cuanto a las células macrofágicas, *Brucella* ingresa a ellas a través de sitios en la membrana celular ricos en colesterol conocidos como microdominios lipídicos (*lipid rafts*) [82]. Este mecanismo de entrada a través de los microdominios lipídicos pareciera ser clave para la supervivencia de las bacterias en los macrófagos infectados, ya que su interrupción farmacológica lleva a una fagocitosis independiente de los mismos y a la posterior eliminación de todas las bacterias fagocitadas [82].

Por otro lado, se han propuesto dos receptores a través de los cuales los macrófagos internalizan a *Brucella*. Uno de ellos es 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 de *B. abortus* [83]. Sin embargo, el rol de este último receptor en la entrada de la bacteria no se extendería a todas las especies de *Brucella* ya que en otro estudio se demostró que no participaba en la ingreso de *B. suis* [84]. Por otro lado, tanto en células epiteliales como en macrófagos se ha demostrado que *Brucella* se une a receptores de superficie que contienen ácido siálico y residuos sulfatados [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 los microdominios lipídicos. 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 [85]. La opsonización permite el ingreso de más bacterias dentro de las células pero a la vez, disminuye su capacidad de crecimiento intracelular [86, 87].

Ciclo intracelular de *Brucella* spp

Una vez dentro de las células macrofágicas, estos microorganismos residen en una vacuola denominada vacuola conteniendo a *Brucella* (VCB), la cual interactúa con las vías endocítica y secretorias para asegurar la supervivencia bacteriana. La VCB recién formada interactúa con endosomas tempranos y adquiere marcadores como el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) y la proteína de unión a GTP Rab5 (VCBe) [88-90]. 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 [91] (Imagen 4).

La VCB 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 VCB son importantes para la correcta maduración del compartimiento replicativo [92]. La disminución del pH del VCB 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 4 (SST4), el cual está codificado por el operón *VirB* [93, 94]. 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 [93, 95, 96].

Después de su paso por el endosoma tardío, la VCB se asocia al retículo endoplasmático (RE) rugoso y la replicación de las bacterias tiene lugar en VCBs que contienen una única bacteria y sus membranas cargadas de ribosomas (VCBr) [90]. El VCB es capaz de interceptar vesículas membranosas que trafican hacia el aparato de Golgi, provenientes de los sitios de salida del RE [97, 98]. La captación de membranas y componentes del RE por parte del VCB se acompaña de una fuerte reorganización tanto estructural como funcional del RE [90] (Imagen 4).

Por último, a las 48 horas post-infección, el VCB adquiere características autofágicas y vuelve a entrar en la vía endocítica para completar su ciclo de vida intracelular (VCBa). En esta etapa, el VCB vuelve a ser positivo para el marcador LAMP-1, envuelve a varias bacterias a la vez y posee múltiples membranas. La formación de las VCBa requiere de las proteínas de iniciación de la autofagia: Beclin1, ULK1 y Atg14L pero no de las proteínas implicadas en la etapa de elongación (Atg5, Atg7, LC3B, Atg16L, Atg4B). La formación de este VCB autofágico sería necesaria para promover la liberación de las bacterias y contribuir a la infección de células adyacentes (Imagen 4) [99].

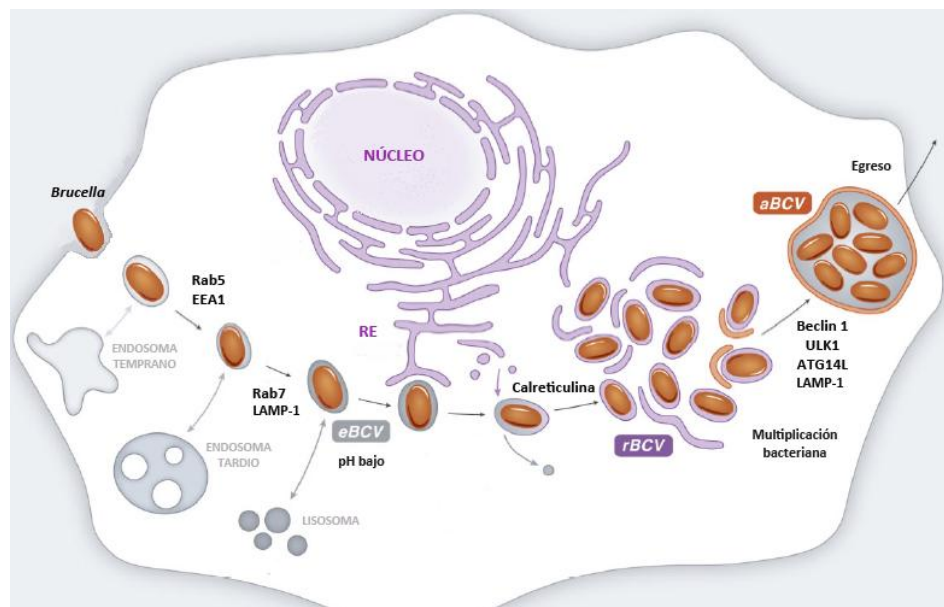


Imagen 4: Modelo del tráfico intracelular de *Brucella*. Modificado de [100].

Sistema de Secreción de Tipo 4

Tráfico intracelular de la bacteria y respuesta inmune del hospedador

El SST4 es un factor de virulencia de gran relevancia para algunas bacterias Gram negativas patógenas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* y las del género *Brucella* [101, 102]. Estos sistemas conforman complejos multiproteicos que atraviesan la envoltura celular de las bacterias y participan en la transferencia de material génico y en la exportación al medio extracelular o a la célula hospedadora de sustratos proteicos [103, 104].

Este aparato de secreción es imprescindible para la supervivencia y virulencia de *Brucella*, está implicado en el tráfico intracelular de la VCB y en el control de la respuesta inmune del hospedador [93, 105, 106]. La integridad del sistema de secreción es fundamental. Se encuentra constituido por 12 proteínas, denominadas VirB1 a VirB12, siendo los componentes VirB2-VirB6 y VirB8-11 imprescindibles para su función [87, 90, 96, 102, 107-110]. En cuanto a la organización génica, el aparato está codificado por el operón *virB* que se localiza en el cromosoma II y está constituido por 12 marcos abiertos de lectura (*virB1 a virB12*) [94]; el operón *virB* está regulado por un único promotor corriente arriba de *virB1* y se encuentra conservado entre las diferentes especies de *Brucella* [103].

Se ha demostrado que el SST4 es esencial para la multiplicación intracelular de *Brucella* en células epiteliales humanas (células HeLa), en macrófagos murinos derivados de médula ósea, en diferentes líneas de células monocíticas y en hepatocitos [75, 90, 96, 105, 111-113]. Si bien *in vitro* la mutante *virB* es eliminada intracelularmente luego de 24 hs, en experimentos *in vivo*, realizados tanto en modelo murino como en hospedadores naturales (caprinos y bovinos), se ha demostrado que el SST4 no es necesario para la colonización sistémica inicial pero sí lo es para la persistencia crónica [81, 87, 105, 114-117]. En particular, al infectar ratones con la mutante *virB* se puso en evidencia que su capacidad de colonización es la misma a la de la bacteria *wild type* (WT), es capaz de diseminarse a diferentes sitios como nódulos linfáticos, hígado y bazo; no obstante, su número comienza a declinar luego del día 5 post-infección poniendo en evidencia que el sistema es fundamental para la persistencia de la infección [87, 118].

El mecanismo por el cual el SST4 contribuye a la supervivencia y multiplicación de la bacteria se basa en la manipulación del tráfico intracelular para establecer el nicho replicativo en el RE y evadir la degradación lisosomal [119]. Las bacterias deficientes en el SST4 son capaces de invadir a la célula hospedadora y pueden interactuar con los endosomas tempranos y tardíos, la VCB que la contiene adquiere los marcadores EEA1 y LAMP-1 respectivamente [90, 95]. No obstante, a diferencia de *Brucella* WT, la VCB que contiene a la mutante no excluye a LAMP-1 y permanece positiva para dicho marcador, por lo tanto son un blanco para los lisosomas y eventualmente las bacterias son degradadas [90, 95, 111]. En consecuencia, la mutante *virB* no completa el ciclo intracelular, no logra escapar de los endosomas tardíos para alcanzar el RE, multiplicarse y utilizar las vacuolas autofágicas para sobrevivir [99, 106].

Con el objetivo de estudiar el papel del SST4 en la modulación de la respuesta inmune del hospedador y en la persistencia crónica de la infección, Roux y colaboradores analizaron la expresión génica de

esplenocitos de ratones durante la infección con *Brucella*. De esta forma demostraron que a diferencia de *Brucella* WT, que estimula la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamación, la infección con la mutante *virB* no es capaz de inducir cambios en el perfil transcriptómico de los genes asociados a la inmunidad [120]. Asimismo, se ha demostrado que el SST4 contribuye a la polarización de la respuesta inmune del hospedador hacia un perfil Th1, ya que los ratones infectados con la mutante *virB* presentan niveles séricos más bajos de IgG2a, interferón gamma (IFN- γ) y de Interleuquina (IL)-12p40 respecto de los infectados con la bacteria WT [121]. Además, se ha descrito que el SST4 es esencial para la completa activación del inflammasoma y la consecuente producción de IL-1 β en macrófagos murinos [122].

Sustratos del SST4 de *Brucella*

Los sustratos que son translocados por el SST4 son denominados “efectores” debido a que son capaces de modular la respuesta de las células infectadas [103]. Hasta el momento se han identificado sólo 15 efectores que son transportados de forma dependiente del sistema VirB de *Brucella* [103, 119]. En la mayoría de los casos, la estructura, función y blanco molecular de estos sustratos es ampliamente desconocida [119]. Al realizar un análisis de los genes coregulados por VjbR, el regulador del operón *virB*, se identificaron los primeros sustratos VceA y VceC. El efector VceC contiene una región rica en prolina capaz de unirse a una chaperona del RE (Bip/Grp78), además se ha descrito que VceC activa la respuesta a proteínas desplegadas, causa estrés del RE e induce una respuesta inflamatoria durante la infección [123].

RicA (de sus siglas en inglés *Rab2 Interacting Conserved protein A*) es una proteína de 175 aminoácidos capaz de unirse a GDP-Rab2, una GTPasa necesaria para el tráfico intracelular de la bacteria. Aunque la depleción de RicA no modifica la capacidad de *Brucella* de ingresar y sobrevivir en células HeLa, las mutantes inducen un reclutamiento menor de Rab2 en la VCB y excluyen más rápidamente a LAMP-1, mostrando una cinética del tráfico intracelular alterado y una mayor proliferación bacteriana que *Brucella* WT [103, 124].

Además, se han identificado dos proteínas de *Brucella* que contienen dominios TIR y son secretadas por el SST4 a la célula hospedadora donde participan en el control de la respuesta inflamatoria al inhibir la señalización de los TLRs (de sus siglas en inglés *Toll like receptors*). La proteína BtpA (también denominada Btp1 y TcpB) fue la primera en ser descubierta y ha sido intensamente estudiada [117, 125, 126]. Se ha demostrado que BtpA inhibe la maduración de las células dendríticas, la activación de NF- κ B inducida por MAL así como también la señalización de TLR2 y TLR4 [117, 127-130], sin embargo el mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado. En este sentido, trabajos recientes demostraron que BtpA interactúa con MAL, MyD88 y TLR4 y sugieren que BtpA estaría compitiendo con MAL por la unión con TLR4 [125, 129-131] y no con MyD88 como fue sugerido por otros autores [117]. Además de BtpA, *Brucella* posee una segunda proteína con dominio TIR denominada BtpB. *In vitro*, BtpB es un inhibidor potente de TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 y en conjunto con BtpA participa en el control de la maduración de las células dendríticas [132].

Las proteínas efectoras BPE123, BPE275, BPE005 y BPE043 fueron identificadas por Marchesini y colaboradores a través de análisis bioinformático y ensayos con el sistema reportero de la adenilato ciclasa (CyaA) [133]. Estos sustratos se encuentran conservados entre las diferentes especies de *Brucella* y hasta el momento su función es desconocida. El efector BPE005 es una proteína de 143 aminoácidos que contiene un dominio de unión a nucleótido monofosfato cíclico (NMPC) y se especula, por lo tanto, que es una proteína de unión a nucleótidos cíclicos y que podría actuar como una subunidad reguladora de quinasas dependientes de NMPC, funcionar como subunidad regulatoria de algún complejo proteico o podría actuar secuestrando NMPC. Por otro lado, BPE275 es un miembro de la familia romboide, un grupo de serina proteasas, mientras que BPE123 presenta un motivo dimérico “*coiled-coil*”, una estructura implicada en las interacciones proteína-proteína que participa en varios procesos celulares. Respecto de BPE043, su estructura predicha indica que posee 2 dominios transmembrana y 4 de apolipoproteína [133].

Asimismo se identificaron 5 proteínas efectoras que son transportadas por el SST4 de *Brucella* llamadas BspA, BspB, BspC, BspF y BspE (del inglés *Brucella secreted proteins*) utilizando un estrategia similar a la empleada por Marchesini y colaboradores [134]. A través de la expresión ectópica se ha puesto en evidencia que estos efectores presentan diferentes patrones de localización intracelular: BspA y BspB se localizan en el RE, BspC en el aparato de Golgi, BspE forma vesículas discretas ubicadas predominantemente en el área perinuclear mientras que BspF se encuentra en el citoplasma y en la membrana plasmática. En cuanto a su función, BspA, BspB y BspF inhiben la secreción proteica durante la infección y contribuyen a la biogénesis de la VCB, a la replicación de *Brucella* en macrófagos y a la persistencia crónica de la bacteria en el hígado de ratones infectados [134].

Hasta el momento, el último sustrato dependiente del SST4 de *Brucella* en ser descrito es SepA. Esta proteína es secretada por el complejo VirB en un proceso de dos etapas que involucra un intermediario en el espacio periplasmático. La mutante deficiente de SepA presenta alterada la multiplicación intracelular debido a su capacidad reducida de evitar la fusión con los lisosomas, sin embargo son más invasivas que la bacteria WT [135].

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), 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 proinflamatorios (IL-12, IL-23, etc) y expresar determinadas moléculas coestimuladoras (CD80/CD86, CD40, etc) [136].

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 células dendríticas, los neutrófilos y el complemento participan con distintos roles en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo [137].

Células de la inmunidad innata

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 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 [138, 139].

Por su parte, las células dendríticas humanas y murinas son susceptibles a la infección por *Brucella* [127, 140, 141]. A su vez, en nuestro laboratorio demostramos que la infección con *B. abortus* induce la expresión de las moléculas CD86, CD80, CCR7, CD83, CD40 y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, 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 [142].

En cuanto a las células NK, *in vitro* se demostró que el cocultivo de estas células con macrófagos infectados con *B. suis* activa a las NK para producir IFN- γ y TNF- α y destruir a dichos macrófagos [143]. Las células NK también parecen ser importantes para la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos [144]. 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 [145] como así tampoco en humanos, donde se describió una disminuida actividad citotóxica por parte de células NK en pacientes con brucelosis aguda [146].

Finalmente, en nuestro laboratorio demostramos que *B. abortus* es capaz de activar neutrófilos humanos y prolongar su supervivencia *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 [147]. 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 [148] 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 [149].

Citoquinas y quemoquinas 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 [86, 150]. Macrófagos activados por TNF- α son capaces de inhibir la replicación *in vitro* de *Brucella* [86] y además, esta citoquina junto con la IL-12 están directamente involucradas en la resistencia a la brucelosis murina [151, 152]. 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 los esplenocitos provenientes de ratones depletados de IL-12 tienen una menor capacidad de generar el estallido respiratorio [151]. Asimismo, también ha sido reportada la secreción de IL-6, IL-1 β e IL-10 durante las primeras etapas de la infección [150, 153, 154]. Más allá de dichas citoquinas, tanto macrófagos como células dendríticas 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 [155, 156].

Receptores de la inmunidad innata

La primera línea 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 TLRs, receptores transmembrana que censan diversos productos microbianos [157]. 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* [158, 159]. A pesar de esto, la señalización a través de este receptor contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células inmunes innatas [142, 147, 150, 160]. En contraste, se demostró el requerimiento de TLR9 para la eliminación de *B. abortus* en ratones infectados ejerciendo un papel fundamental en el control de la infección [161]. 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 [158], 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 [159]. Por último, los 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* [159, 161, 162]. Los ratones MyD88-/- presentan defectos en la maduración de las células dendríticas y ausencia de producción de IL-12 y TNF- α por los macrófagos y células dendríticas en respuesta a *Brucella* [161]. 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 [163] como de los IFN de tipo I y el receptor IFN- α BR [164] 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 [139].

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 [165-168]; segundo, la citotoxicidad T CD8⁺ y $\gamma\delta$ puede destruir al macrófago infectado [169-173]; y por último, los isotipos de anticuerpos de tipo Th1 como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan su fagocitosis [174, 175].

Células T CD4⁺ y CD8⁺

Los antígenos de *B. abortus* son capaces de ser presentados por MHC-I y II, y de esta manera activar tanto a células T CD4⁺ como T CD8⁺ [169, 176, 177]. La mayoría de los estudios señala a las células T CD4⁺ como las principales productoras de IFN- γ [153, 154, 165], aunque también hay producción de esta citoquina por parte de linfocitos T CD8⁺, $\gamma\delta$ y células NK [178].

La infección con *B. abortus* genera una poderosa inducción hacia el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 [139, 179]. 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 los 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 [151, 165, 167]. Más aún, los 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 [180-183] así como una asociación entre determinados polimorfismos o mutaciones genéticas que afectan a este tipo de respuesta y una mayor susceptibilidad a la brucelosis [184].

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 [169-171]. 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 [185].

A pesar de las vigorosas respuestas T CD4⁺ y CD8⁺ generadas por *B. abortus*, esta bacteria utiliza distintas estrategias para evadir la vigilancia inmunológica y persistir dentro de las células de su hospedador por muchos años, estableciendo una infección crónica. Se demostró que *B. abortus* por contacto directo 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 la apoptosis de linfocitos T [79]. Además, la infección de monocitos/macrófagos humanos con *B. abortus* es capaz de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II, MHC-I y del receptor de tipo I para la porción Fc de IgG (Fc γ RI o CD64).

[186-188]. Como consecuencia, los macrófagos infectados presentan disminuida capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y disminuida fagocitosis restringida al FcγRI.

Las células T γδ también cumplirían una importante función en la inmunidad frente a *Brucella*. El número de células T Vγ9Vδ2 aumenta en sangre periférica de pacientes con brucelosis aguda y declina luego de un tratamiento exitoso [189, 190]. Por otra parte, ratones deficientes en células T γδ 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 [172]. Asimismo, células T γδ activadas por antígenos no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares debido a que secretan TNF-α e IFN-γ activan las funciones bactericidas del macrófago. Estudios *in vitro* sugieren que las células T Vγ9Vδ2 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 [191, 192].

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 que suelen permanecer detectables en el suero durante años. Estos anticuerpos están dirigidos contra varios componentes del microorganismo, pero especialmente contra los antígenos superficiales, particularmente el LPS [193]. Desde el punto de vista clínico, la detección de anticuerpos dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, y seguimiento de la infección. En ratones se observó un cierto nivel de protección conferido por anticuerpos contra la cadena O del LPS de *Brucella* [194-196]. No obstante, si bien la opsonización de las bacterias por anticuerpos 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 [85]. Asimismo, un estudio reciente demostró que células B murinas pueden establecerse como un nicho intracelular para *B. abortus* opsonizadas por IgM o el complemento [78].

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 coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos profesionales, la estimulación de la citotoxicidad por parte de células T citotóxicas y la potenciación de la muerte de los macrófagos infectados [169]. Como ya fue mencionado previamente, 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* [166]. 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 los ratones infectados [197, 198]. 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 [91]. La producción temprana durante la infección de una citoquina inmunomoduladora como IL-10 podría explicar en parte este fenómeno [199].

EL HÍGADO

El hígado es un sitio anatómico e inmunológicamente único en el cuál la sangre rica en antígenos proveniente del tracto gastrointestinal es capturada en una red de sinusoides y monitoreada por las células presentadoras de antígeno y linfocitos. La organización estructural del órgano tiene una gran implicancia en su función inmune, facilitando la presentación directa o indirecta de los linfocitos, modulando la respuesta inmune contra patógenos hepatotróficos y contribuyendo a algunas de las propiedades inmunológicas únicas de este órgano como su capacidad de tolerancia antigénica [200].

ANATOMÍA DEL ÓRGANO

El hígado es el segundo órgano más grande del cuerpo, pesa aproximadamente 1.5 kg en el adulto y está ubicado por debajo del diafragma, ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho y parte de la región epigástrica de la cavidad abdominopélvica [201]. Se encuentra completamente cubierto por el peritoneo visceral y por una capa densa de tejido conectivo llamada cápsula de Glisson. Está compuesto principalmente por células epiteliales especializadas poliédricas, los hepatocitos (que representan el 80% de la población celular del tejido); además contiene células endoteliales de los sinusoides, células del epitelio biliar, células estrelladas, y células inmunes como macrófagos (células de Kupffer), células dendríticas y linfocitos [202].

El parénquima hepático está organizado en lobulillos hepáticos, es decir láminas fenestradas de hepatocitos dispuestos de forma radiada en torno a una vena central; en los ángulos de los lobulillo se encuentra el espacio porta o tríadas constituidas por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar [201]. Entre las láminas de hepatocitos se encuentran los sinusoides hepáticos, por dónde circula la sangre de forma centrípeta desde la triada hacia la vena central (**Imagen 5A**) [202]; a su vez, entre la pared de los sinusoides y la lámina de hepatocitos existe un estrecho espacio perisinusoidal denominado espacio de Disse dónde se encuentran las células hepáticas estrelladas inmersas en una matriz extracelular (MEC) laxa (**Imagen 5B**) [202].

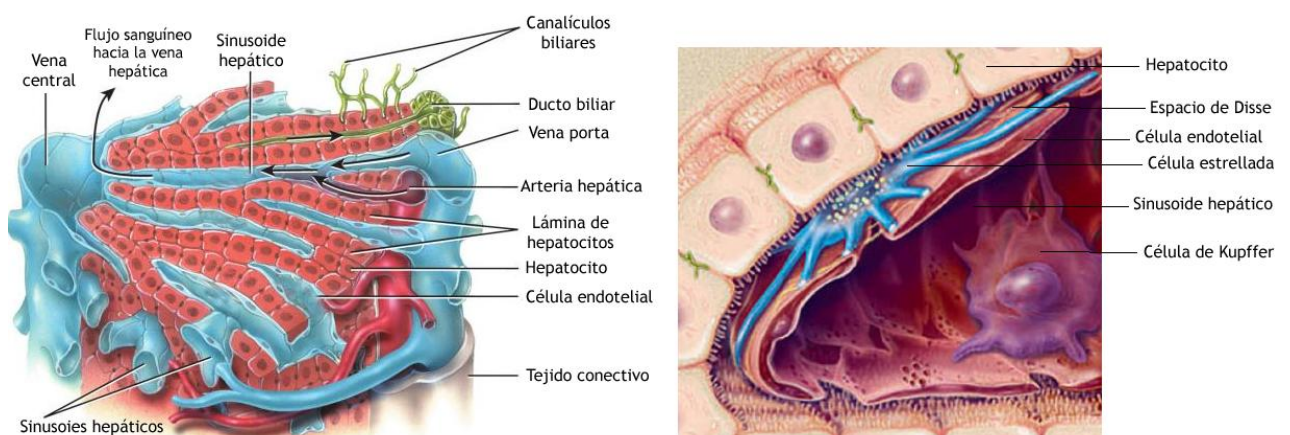


Imagen 5: (A) Organización estructural del Hígado. Modificado de [201]. (B) Localización de las células hepáticas estrelladas en el espacio de Disse. Modificado de [203].

SISTEMA INMUNE HEPÁTICO

El hígado tiene un suministro sanguíneo único, proveniente tanto de la circulación sistémica como del intestino, por lo tanto las células hepáticas están constantemente expuestas a productos microbianos y antígenos derivados del tracto gastrointestinal [204, 205]. En consecuencia, el hígado posee un sistema inmune altamente organizado y con características distintivas, como por ejemplo una gran abundancia de células NK y células *natural killer T* (NKT) así como también de macrófagos residentes [206]. Además de las células inmunes tradicionales, existen múltiples poblaciones celulares no-hematopoyéticas como las endoteliales de los sinusoides, los hepatocitos y células estrelladas que tienen un papel activo en la respuesta inmune del órgano [205].

Células inmunes hematopoyéticas

En condiciones fisiológicas el hígado contiene la población de macrófagos más abundantes del organismo, de hecho representan el 80-90% de la totalidad de macrófagos [207]. Las células de Kupffer tienen receptores de PAMPs, receptores del complemento y receptores Fc mediante los cuales pueden responder incrementando su capacidad fagocítica y produciendo citoquinas proinflamatorias [208-211]. Tienen un papel esencial en la regulación inmune, en la reparación del tejido y la regeneración hepática y son capaces de responder frente al estímulo con citoquinas o de los TLRs, receptores tipo RIG y receptores NOD [212-214]. Debido a la localización estratégica de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos, éstas puedan interactuar con los hepatocitos, con las células estrelladas y las endoteliales así como también con otras células inmunes [200].

La población de células dendríticas en el hígado en condiciones no patológicas incluye tanto a las mieloides como a las células dendríticas plasmocitoides [205]. Fenotípicamente son descritas como inmaduras aunque en determinadas situaciones pueden inducir una robusta respuesta de las células T [215]. Además, en el hígado normal existe una población de células supresoras que se caracteriza por producir citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [216, 217]. Por otro lado, los granulocitos, como neutrófilos, no se encuentran en el hígado normal pero sí en condiciones inflamatorias [218].

En el hígado humano hay aproximadamente 10^{10} linfocitos, los cuales incluyen a las células NK, NKT y células T CD4⁺ y T CD8⁺ [219]. Las células NK están localizadas en los sinusoides hepáticos en estrecha proximidad con las células no parenquimáticas y constituyen la población linfocitaria predominante del hígado; comprenden más del 50% del total de linfocitos en el hígado normal [220]. En condiciones patológicas se produce un incremento significativo de la población celular, las NK periféricas que ingresan al hígado adquieren características específicas y únicas, como un nivel de citotoxicidad mayor respecto de las NK periféricas [204, 221].

De la misma forma que las NK, las células NKT se localizan en los sinusoides hepáticos y son más abundantes en el hígado que en cualquier otro órgano [222]. Dada su capacidad de liberar rápidamente grandes cantidades de IFN- γ e IL-4, las células NKT tienen un papel preponderante en la polarización de la respuesta adaptativa local y sistémica hacia un perfil proinflamatorio o antiinflamatorio frente al daño

hepático [200]. Además, las células NKT tienen una función crítica frente a las infecciones en el hígado, se ha demostrado que ratones deficientes en células NKT son más susceptibles a ciertos virus y bacterias así como la activación de las NKT con un ligando sintético resulta en la producción de IFN- γ y en el control de la multiplicación del virus de la hepatitis B en un modelo murino [223-226].

La población de linfocitos de la inmunidad adaptativa comprende a las células T restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad CD4⁺ y CD8⁺ y células B [205]. El hígado está particularmente enriquecido en células T CD8⁺, células T activadas y de memoria [227, 228]. Las células B representan el 8% de la población linfoide en condiciones fisiológicas [219]. Ha sido demostrado que subpoblaciones específicas de los linfocitos B, como los B CD5⁺, pueden expandirse durante infecciones con virus hepatotrópicos [229, 230].

Células inmunes no-hematopoyéticas

Además de las células inmunes, las células no hematopoyéticas del hígado tienen un papel crítico en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune innata local y sistémica [205]. Las células endoteliales de los sinusoides, los hepatocitos y células estrelladas expresan un amplio repertorio de receptores de reconocimiento de patrones [213, 231, 232]. La expresión de TLRs, receptores de carbohidratos y receptores scavenger por parte de células no inmunes complementa la detección y la eliminación de los antígenos y toxinas provenientes del sistema porta y regula la producción de mediadores inflamatorios por parte de éstas células [205]. Además, las células endoteliales de los sinusoides, los hepatocitos y células estrelladas son capaces de procesar y presentar antígenos y se ha demostrado que están implicadas en los mecanismos de inmunotolerancia [220, 233, 234].

RESOLUCIÓN DE LOS PROCESOS INFLAMATORIOS

El hígado es un órgano donde predomina un microambiente con características tolerogénicas, en estas condiciones el sistema inmune hepático debe ser capaz de responder rápida y controladamente frente a células tumorales y microorganismos patogénicos [205]. Un amplio espectro de patógenos han sido implicados en diferentes formas de infecciones hepáticas así como también, microorganismos sistémicos pueden afectar al hígado durante el curso de la infección [235]. Una respuesta inmune local es esencial para detectar y eliminar a éstos patógenos hepatotróficos. Parte de la respuesta inmune que se desencadena en respuesta al daño tisular incluye a la reparación del tejido dañado y a la fibrosis, la cual es precedida en la mayor parte de los casos por inflamación [236].

El desarrollo de la fibrosis hepática es un proceso dinámico que provoca la interrupción de las funciones hepáticas con disfunción del órgano debido a la excesiva producción de proteínas de la MEC [236-238]. Generalmente, se produce como una respuesta a la lesión hepatocelular crónica, provocada por el abuso de bebidas alcohólicas, infecciones crónicas, enfermedades biliares y afecciones congénitas metabólicas, entre otras, y puede llegar a conducir a largo plazo al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular [239]. Sin embargo, la fibrosis no siempre es patológica, en ocasiones es un fenómeno autolimitado, esencial para la reparación y restauración de la homeostasis tisular frente al daño [236].

Protege a los hepatocitos que sobrevivieron a la injuria reduciendo las señales pro-apoptóticas e incrementando la resistencia hacia un rango de toxinas [240].

Los miofibroblastos son los reguladores maestros de la respuesta fibrogénica debido a su capacidad de producir componentes de la MEC, de ser altamente proliferativos, migratorios, contráctiles, inmunomoduladores y con capacidad fagocítica. Los miofibroblastos del hígado derivan casi exclusivamente de las células hepáticas estrelladas quiescentes, mientras que la contribución de los fibrocitos o células mesenquimales derivadas de la médula ósea es mínima [236, 241, 242].

CÉLULAS ESTRELLADAS DEL HÍGADO

Las células estrelladas representan un tipo celular muy versátil que posee un papel preponderante en la fibrogénesis y en la remodelación de la MEC; además participan en el desarrollo y diferenciación del hígado, en la regeneración, en la respuesta a xenobióticos, inmunoregulación y en el control del flujo sanguíneo. Debido al amplio espectro de intermediarios moleculares que son capaces de producir y secretar, particularmente luego de ser activadas, las células estrelladas están implicadas en diversas patologías hepáticas [243].

Están localizadas en el espacio subendotelial (espacio de Disse), entre la superficie basolateral de los hepatocitos y la cara antiluminal de las células endoteliales y se encuentran tanto en la zona centrolobulillar como en el área porta donde son más abundantes [243, 244]. En condiciones fisiológicas, representan una población celular reducida, constituyendo entre el 5-8% de la población celular total [243]. Estructuralmente se caracterizan por poseer un RE moderadamente desarrollado, un aparato de Golgi pequeño y procesos citoplasmáticos largos que rodean a los sinusoides en el espacio de Disse [243]. En condiciones fisiológicas, son la principal fuente de almacenamiento de retinoides en el hígado, contienen “gotas” citoplasmáticas con vitamina A en forma de retinil-palmitato [244]. Las células estrelladas constituyen una población heterogénea y con gran plasticidad en el hígado adulto, pueden contener una cantidad variable de vitamina A y diferentes combinaciones de filamentos intracelulares dependiendo de su ubicación en el lóbulo hepático, la especie animal en estudio, si el órgano es normal o está dañado y la naturaleza de la injuria [244].

Frente al daño hepático, las células estrelladas se activan, es decir que del estado de reposo en el que se encuentran en condiciones normales se diferencian a miofibroblastos caracterizados por la pérdida de las gotas lipídicas, por un aumento en la proliferación y migración, por la secreción de proteínas de MEC y por la producción de mediadores proinflamatorios y profibrogénicos como TGF- β [236]. Las células activadas expresan marcadores de células mesenquimáticas como actina- α de músculo liso (α -SMA) y pierden los marcadores neurales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que poseen en estado quiescente [236]. Una vez activadas, se perpetúan por un bucle de retroalimentación positiva en el que participan los receptores de TGF- β , el receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y los de angiotensina II [245, 246]. En particular, TGF- β promueve la supervivencia de las células hepáticas estrelladas activadas a través de la activación de las quinasas de adhesión focal y de AKT [247].

La autofagia es una vía de degradación intracelular por la cual organelas y proteínas son encerradas en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, posteriormente ésta se fusiona con los lisosomas dando como resultado la degradación del contenido luminal y el reciclado de las macromoléculas resultantes [248]. Recientemente, se ha demostrado que un factor esencial para la activación de las células estrelladas es la inducción de la vía autofágica [249-251]. Thoen y colaboradores demostraron que el flujo autofágico se encuentra incrementado durante la activación de las células estrelladas en cultivos primarios murinos y que al bloquear la vía con bafilomicina A1, cloroquina o 3-metiladenina la proliferación, la expresión génica de α -SMA, colágeno de tipo I y PDGFr- β es inhibida, indicando la ausencia de activación [251-253]. Por otro lado, en los trabajos publicados por Hernández-Gea y colaboradores se puso en evidencia que la autofagia está involucrada en la hidrólisis de las gotas lipídicas ya que al inhibir la vía, mediante inhibidores farmacológicos o utilizando ratones knockdown Atg5 y Atg7, no solo observaron una reducción de la fibrosis hepática sino que además demostraron que se incrementa el contenido lipídico en las células estrelladas [249, 250]. Por lo tanto, la activación de la autofagia proveería de la energía necesaria para la iniciación y perpetuación de las células hepáticas estrelladas activadas y fibrogénicas a través de la degradación de las gotas lipídicas (lipofagia) [249].

La proliferación de las células estrelladas ocurre principalmente en respuesta a PDGF (de sus siglas en inglés *platelet derived growth factor*), el mitógeno más potente de estas células, además otros factores mitogénicos que actúan sobre las células estrelladas son el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento epitelial, TGF- α , factor de crecimiento de queratinocitos y el factor de crecimiento de fibroblastos básico [254-260]. Las células activadas pueden migrar a los focos inflamatorios en respuesta a PDGF, MCP-1 y CXCL3, en contraste, la adenosina inhibe la quimiotaxis y conlleva a la inmovilización de las células una vez que alcanzaron el sitio dañado [261-265].

Durante la fibrosis hepática hay un desbalance entre la producción de proteínas de matriz y su degradación y en consecuencia hay una acumulación excesiva de MEC [238, 239]. El principal componente de la matriz fibrótica es el colágeno de tipo I y este es producido principalmente por las células hepáticas estrelladas [244]. Por otro lado, un elemento crítico en la remodelación de la matriz son las MMPs (de sus siglas en inglés *matrix metalloproteinases*) una familia de endopeptidasas dependientes de Zn^{+2} y Ca^{+2} que degradan proteínas de la MEC. Hasta el momento se conocen al menos 23 MMPs en humanos, las cuales se encuentran clasificadas según su especificidad de sustrato en colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -18), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas (MMP-3, -10, -11 y -17), matrilisinas (MMP-7 y -26), MMPs de unión a membrana (MT-MMPs, MMP-14, -15, -16, -17, -24 y -25) que pueden degradar gelatina, fibronectina y laminina, y otras MMPs que no pueden ser incluidas en ninguna de las clases mencionadas [173, 266-269]. En el hígado, las células estrelladas son la principal fuente de MMP-2, MMP-9, MMP-13 y estromelinas [270-276]. La regulación de la actividad de las MMPs se encuentra estrictamente regulada en diferentes niveles, uno de los cuales implica la inactivación por parte de inhibidores endógenos, los TIMPs (de sus siglas en inglés, *tissue inhibitor of metalloproteinases*). Los TIMPs son una familia de 4 proteínas secretadas (TIMP-1 a TIMP-4) que se unen no covalentemente al dominio catalítico de las MMPs inhibiendo su actividad [277]. Las células estrelladas son capaces de producir TIMP-1 y TIMP-2 durante el

daño hepático inhibiendo la actividad de las colagenasas y reduciendo la degradación de la MEC [239, 278].

Las células estrelladas secretan TGF- β en respuesta a la injuria hepática, la citoquina más importante durante la fibrogénesis. La misma actúa de forma autocrina y paracrina, siendo su acción autocrina la más relevante. TGF- β es liberado al medio extracelular asociado de manera no covalente con el péptido asociado a la latencia (LAP) formando un complejo biológicamente inactivo con la proteína de unión a TGF- β (LTBP) [279, 280]. Una vez liberado, el complejo puede ser clivado por proteasas como plasmina, MMP-2, MMP-9 y trombospondina [281]. Luego del clivaje, la citoquina activa es capaz de unirse al receptor TGFR2, el cual recluta a TGFR1 que activa la vía de señalización de Smad y de éste modo induce la transcripción de moléculas profibróticas como α -SMA, colágeno tipo I y TIMP, estimulando la deposición de MEC [282].

BRUCELOSIS HEPÁTICA

El hígado desempeña un rol preponderante en la respuesta inmune innata, siendo la primer línea de defensa contra microorganismos y toxinas que ingresan por vía oral, cruzan la barrera intestinal y llegan al hígado por la vena porta [220]. Debido a que una de las principales rutas de ingreso de *Brucella* en el hombre es precisamente la vía oral y que en el hígado hay una gran población de macrófagos (nicho preferencial de *Brucella*) éste órgano podría estar implicado en todos los casos de brucelosis [283-285]. En algún momento durante el curso de la enfermedad, la mayoría de los pacientes con brucelosis desarrollan lesiones inflamatorias en el parénquima hepático descritas como áreas focalizadas de inflamación celular con mínima necrosis de células hepáticas y granulomas con células gigantes. Además, se considera que en los casos donde no hay evidencias de disfunción hepática, la hepatitis no debe ser calificada como una complicación si no como parte del curso normal de la enfermedad [284, 286].

La manifestación más común hallada en los pacientes con daño hepático es el agrandamiento patológico del órgano; en general la hepatomegalia es leve o moderada y ha sido descrita en el 30-65% de los casos [285, 287, 288]. Asimismo, los pacientes con brucelosis pueden exhibir alteraciones no específicas en las pruebas de funcionalidad hepática, como niveles elevados de transaminasas y de fosfatasas alcalinas séricas [285, 288, 289]. Otro parámetro que puede verse alterado en el curso de la brucelosis es el nivel de bilirrubina en sangre, los pacientes pueden adquirir una coloración amarillenta en la piel y mucosas debido al incremento de los valores fisiológicos de dicho pigmento; de acuerdo a los valores de bilirrubina considerados para definir ictericia, los casos pueden alcanzar el 24% [285, 288, 290, 291].

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, gran parte de los pacientes que cursan la enfermedad desarrollan granulomas hepáticos indistinguibles de aquellos encontrados en otras enfermedades como sarcoidosis, tuberculosis e histoplasmosis; aunque en ocasiones pueden ser más pequeños y menos definidos [283, 285, 288, 292-295]. En un trabajo realizado por Cervantes y colaboradores [288], se ha demostrado que el 90% de las biopsias de hígado, de pacientes con afección hepática, presentaban hepatitis reactiva no específica; también detectaron granulomas en el 70% de los casos, estos fueron descritos como simples o múltiples, de localización principalmente lobular, compuestos de linfocitos, histiocitos, células epitelioides y en ocasiones de células multinucleadas. En concordancia con estos resultados, Akritidis y colaboradores [285], han reportado que todos los pacientes con daño hepático, en los cuales se realizaron biopsias, presentaban granulomas con características similares a las encontradas por Cervantes y colaboradores (**Imagen 6A y B**); además, muchos exhibían infiltrado inflamatorio, y la mitad de ellos presentaban necrosis moderada y localizada del parénquima hepático.

Es importante tener en cuenta que existe gran discrepancia en la literatura respecto de la apariencia y características histológicas del hígado en la brucelosis humana. Esto puede deberse a que no siempre se reporta cuál es la especie de *Brucella* infectante y a que muchos estudios son retrospectivos y no poseen una confirmación bacteriológica; además hay que considerar que no siempre es posible realizar biopsias del órgano y que no existe un consenso sobre el criterio para definir granulomas [284].

La presencia de granulomas estaría asociada al desarrollo de fibrosis periférica [285, 287] y si bien hay algunos reportes sobre la relación causal entre cirrosis y la infección con *Brucella*, algunos autores consideran que es improbable que la infección pueda generar suficiente tejido fibrótico como para provocar cirrosis. Hasta el momento, la correlación entre brucelosis y cirrosis no ha sido comprobada y solo hay 5 casos reportados con una posible asociación [285, 288].

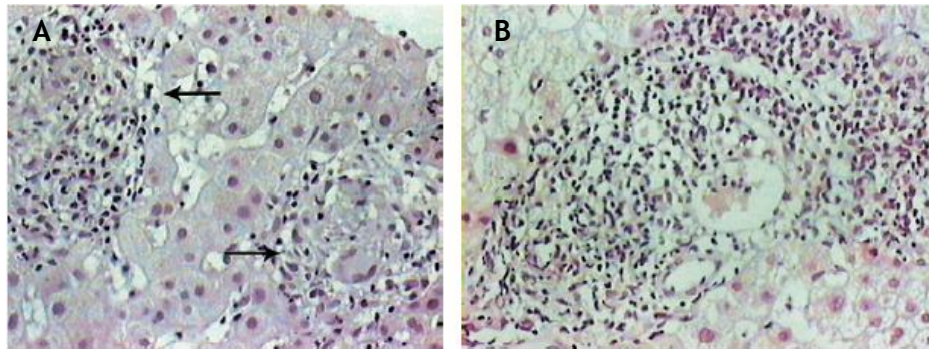


Imagen 6: Biopsia hepática. (A) Granulomas epiteloideos con localización intraparenquimática. (B) Infiltrado linfocitario en el área porta. Tinción con Hematoxilina-eosina, 200X [285].

En los casos más severos, el tejido hepático se ve alterado por la formación de abscesos supurativos; generalmente ésta complicación es detectada en pacientes adultos que tuvieron brucelosis aguda no diagnosticada o sin tratar [296]. Los abscesos son definidos como lesiones con un diámetro mayor a 5 cm, calcificados irregularmente, con presentación clínica subaguda o crónica [287]. Son el resultado de la necrosis caseosa y calcificación del tejido granulomatoso inducida por la persistencia de *Brucella* en los macrófagos, algunos autores los denominan “Brucelomas” [283, 297]. En un estudio realizado por Ariza y colaboradores [298], que consistió en el análisis por tomografía computada de 985 pacientes afectados con brucelosis, encontraron que 14 de ellos presentaban lesiones localizadas en el hígado, con calcificación central o periférica. Por otro lado, Morata y colaboradores estudiaron a 805 pacientes y determinaron que 7 de ellos habían desarrollado abscesos hepáticos; éstas lesiones tenían un diámetro en el rango de 6 a 15 cm, de bordes poco definidos, algunos presentaban cavitaciones, calcificaciones y pus [287].

Clásicamente la formación de abscesos supurativos ha sido asociada a la infección con *B. suis* [299, 300], no obstante también se han descrito casos de abscesos hepáticos causados por *B. melitensis* [289, 301-303], en cuanto a *B. abortus*, conlleva a la formación de granulomas pero no caseosos. [300]. El tratamiento de elección para los pacientes con abscesos supurativos consiste en la combinación de un régimen adecuado de antibióticos durante varios meses sumando al drenaje percutáneo de los abscesos caseosos [299, 304-306]; en general se produce una evolución favorable de los pacientes aunque hay casos dónde no es posible hacer un seguimiento luego del tratamiento y no se puede descartar la posibilidad de una recaída futura [306-308].

Si bien la afección hepática durante el curso de la brucelosis ha sido descrita a nivel clínico y existen numerosos estudios histopatológicos, hasta el momento no han sido completamente dilucidados los mecanismos inmunes implicados en la generación del daño hepático causado por la infección con *Brucella* spp. [75, 309]. Allí radica la importancia de este trabajo.

Hipótesis y Objetivos

La afección hepática en los pacientes con brucelosis activa es muy frecuente, se manifiesta como hepatomegalia y hepatitis granulomatosa caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio y necrosis del parénquima hepático, pudiendo provocar en los casos más graves el desarrollo de abscesos supurativos. A pesar de que se han realizado numerosas descripciones bioquímicas e histopatológicas del hígado de pacientes con brucelosis los mecanismos celulares y moleculares implicados en las lesiones hepáticas causadas por *Brucella* spp. no han sido completamente dilucidados aún.

Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo de tesis es **determinar cuáles son los mecanismos implicados en el daño hepático y en la modulación de la respuesta inmune desarrollada en el hígado frente a la infección por *Brucella abortus***. Sostenemos que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la brucelosis en estadios iniciales de la infección, y que la modulación de la respuesta inmune generada es primordial para el establecimiento crónico de la enfermedad. La **hipótesis de trabajo** a ser analizada es que *B. abortus* puede causar inflamación y esta inflamación causar daño hepático mediante diversos mecanismos. El daño ocasionado puede inducir la generación de tejido fibrótico debido a las alteraciones ocasionadas en las células estructurales e inmunes presentes en el hígado.

Para poner a prueba nuestra hipótesis, formulamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Investigar si *B. abortus* es capaz de activar e inducir una respuesta fibrogénica por parte de las células estrelladas de hígado. En particular, analizar la producción de colágeno de tipo I, metaloproteasas de matriz y de citoquinas profibrogénicas frente a la infección.
2. Estudiar la interacción entre las células estrelladas de hígado con los hepatocitos y los monocitos/macrófagos en el contexto de la infección con *B. abortus*.
3. Estudiar si el SST4 codificado por el operón *virB* de *Brucella* está implicado en los fenómenos de fibrogénesis desencadenados por la bacteria.
4. Determinar si la adquisición de un fenotipo fibrótico por parte de las células hepáticas estrelladas infectadas por *B. abortus* involucra la activación de la vía autofágica.

Capítulo I:

“*B. abortus* induce la deposición de colágeno e inhibe la producción de MMP-9 por parte de las células hepáticas estrelladas por un mecanismo dependiente a TGF- β ”

INTRODUCCIÓN

La fibrosis es una respuesta dinámica y altamente coordinada que se desencadena frente a la injuria tisular, puede ser autolimitada y homeostática siendo esencial para la reparación del tejido dañado, o descontrolada y excesiva afectando las funciones del órgano [236, 310]. La persistencia de un estímulo infeccioso, como la infección por *Brucella*, y la consecuente respuesta inflamatoria pueden conllevar al desarrollo de fibrosis debido a las alteraciones en las células inmunes y estructurales [310].

La fibrosis hepática se produce por la acumulación de proteínas de la MEC, especialmente colágeno de tipo I, así como también de otros componentes como proteoglicanos, fibronectina y laminina [311]. Esta acumulación es consecuencia del desequilibrio entre la producción de los componentes de la MEC y su degradación [312]. Las MMPs son las principales enzimas implicadas en la degradación de la MEC, son endopeptidasas dependientes de Zn^{+2} y Ca^{+2} y están categorizadas en 5 grupos de acuerdo a su especificidad de sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas y MMPs de unión a membrana) [313]. La actividad proteolítica de las MMPs está rigurosamente regulada por los TIMPs, los cuales se unen de forma no covalente a las MMPs impidiendo su actividad [314-317]. Por lo tanto, la capacidad de degradar matriz depende del balance entre los niveles de MMPs y la disponibilidad de los TIMPs extracelulares siendo este un evento crítico en la remodelación de la MEC [238, 318].

Los miofibroblastos profibrogénicos, derivados casi exclusivamente de las células estrelladas de hígado quiescentes, tienen un papel central en la fibrosis hepática [242]. Estas células son los reguladores maestros de la respuesta fibrogénica debido a que frente al daño tisular se activan y adquieren capacidad proliferativa, migratoria, contráctil, inmunomodulatoria, fagocítica y de producir componentes de la MEC [236]. Las células estrelladas activadas producen las citoquinas profibrogénicas IL-6 y TGF- β , siendo esta última la citoquina más importante en la fibrogénesis y actúa tanto de forma autocrina como paracrina sobre las células estrelladas induciendo su activación y la expresión de colágeno de tipo I, α -SMA y de los TIMPs [319-321].

Durante el curso de la brucelosis, gran parte de los pacientes desarrollan lesiones inflamatorias en el parénquima hepático que consisten en áreas focalizadas de inflamación celular, necrosis de células hepáticas, infiltrado inflamatorio y granulomas con células gigantes [283, 285, 288]. Hasta el momento no han sido completamente dilucidados los mecanismos que generan el daño hepático observado en los pacientes. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostramos que *B. abortus* es capaz de infectar y multiplicar en una línea humana de hepatocitos, las células más abundantes del hígado. Los hepatocitos infectados con *B. abortus* tendrían un papel preponderante en el reclutamiento de monocitos y neutrófilos al sitio de infección, generando de esta forma un microambiente inflamatorio caracterizado por la producción de citoquinas y MMPs [75].

Como ha sido mencionado, la producción de factores fibrogénicos por parte de las células estrelladas de hígado activadas puede contribuir a la resolución del proceso inflamatorio. En este contexto nos propusimos investigar si *B. abortus* es capaz de activar y de inducir una respuesta fibrogénica por parte

de las células estrelladas de hígado. En particular, analizar la producción de colágeno de tipo I, MMPs y de citoquinas profibrogénicas frente a la infección. Además, nos plantemos estudiar la interacción entre las células estrelladas de hígado con los hepatocitos y los monocitos/macrófagos en el contexto de la infección con *B. abortus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de bacterias

B. abortus S2308 (*B. abortus*) fue crecida durante 18 hs en 10 ml de medio tripteína de soja en agitación constante de 150 rpm a 37°C. Las bacterias se centrifugaron por 15 min a 6000g a 4°C y fueron lavadas dos veces en 10 ml de buffer fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*). La concentración de bacterias en cultivo fue estimada comparando la densidad óptica a 600 nm con una curva estándar. Para preparar los inóculos, los cultivos fueron diluidos en PBS a la concentración deseada en base a la densidad óptica medida. La concentración precisa fue determinada por recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de agar tripteína de soja (TSA, de sus siglas en inglés *Tryptic Soy Agar*). La manipulación de las bacterias viables fue realizada en instalaciones con un nivel de bioseguridad 3, localizados en el Instituto de investigaciones biológicas en retrovirus y SIDA (INBIRS), CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, gracias a un convenio de colaboración establecido con el Dr. Horacio Salomón.

Cultivo celular

La línea celular inmortalizada de células estrelladas de hígado humano LX-2 fue gentilmente cedida por el Dr. Scott L. Friedman (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY). Esta línea celular conserva las principales características de las células estrelladas de hígado: expresa α -SMA, vimentina, GFAP, PDGFr-B, proliferan en respuesta a PDGF y expresan colágeno de tipo I en respuesta a TGF- β [322]. Las células LX-2 fueron cultivadas en DMEM (de sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con 2 mM de L-glutamina (Gibco), 5% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 100U de penicilina/ml (Sigma-Aldrich), y 100 μ g de streptomycin/ml (Gibco) (medio completo).

Para estudiar la interacción con hepatocitos y monocitos, utilizamos las líneas celulares de hepatoma humano HepG2 y la línea celular monocítica humana THP-1, ambas fueron obtenidas de ATCC (de sus siglas en inglés *American Type Culture Collection*). Las células HepG2 fueron cultivadas en DMEM suplementado con 2 mM L-glutamina, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin y las THP-1 en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con SFB al 10%, aminoácidos y antibióticos como se describió previamente. Para inducir la maduración las células THP-1, estas fueron cultivadas con 0,05 μ M de 1,25-dihidroxitamina D3 (Calbiochem Merck Millipore) por 72 hs. Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Infección celular

Las células LX-2 fueron cultivadas durante 24 hs en placas de 24 pocillos a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo y las THP-1 y HepG2 a una densidad de 5x10⁵ células/pocillo en medio completo sin antibióticos y fueron infectadas con *B. abortus* a las multiplicidades de infección (MOI, de sus siglas en inglés *Multiplicity Of Infection*) 100, 250, 500 y 1000 en el caso de las células estrelladas y a MOI 100

para los monocitos y hepatocitos. Una vez dispensada la suspensión de bacterias, las placas fueron centrifugadas durante 10 min a 1000g y luego incubadas por 2 hs a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células fueron lavadas con medio y luego incubadas en DMEM suplementado con SFB a las concentraciones indicadas para cada tipo celular, 100 µg/ml de gentamicina (Gibco) y 50 µg/ml de estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares.

Para evaluar la actividad de las MMPs en los sobrenadantes de cultivo, las células fueron incubadas en medio sin SFB (el SFB contiene α2-macroglobulina, un inhibidor de las MMPs [267, 323]) y suplementado con 0,01% de albúmina sérica bovina (BSA, de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*, Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), 0,1 % de glucosa (Baker Analyzed), 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares. Este medio de cultivo permitió el crecimiento sostenido de las células así como también la producción de citoquinas en los mismos niveles que utilizando el medio con SFB.

Para evaluar la replicación intracelular de *B. abortus*, las células infectadas fueron lavadas y lisadas a distintos tiempos post-infección (2, 4, 6, 24 y 48hs) con 0,2% (vol/vol) de tritón X-100. El número de bacterias viables intracelulares fue determinado mediante el recuento de UFC/ml a partir de diluciones seriadas al décimo en placas de TSA. Los sobrenadantes de los cultivos infectados fueron recolectados a las 24 hs post-infección para ser utilizados como medio condicionado o para medir la producción de citoquinas y quemoquinas.

Estimulación con medio condicionado

Los sobrenadantes de cultivos de los monocitos y de los hepatocitos infectados fueron recolectados a las 24 hs post-infección, esterilizados mediante un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22 µm y utilizados para estimular a las células estrelladas. Los sobrenadantes fueron empleados en dilución 1/2, 1/5 y 1/10 en medio completo. Luego de las 24 hs, los sobrenadantes de cultivo de las células estrelladas estimuladas fueron recolectados para medir MMPs y TGF-β1, por otro lado los cultivos fueron teñidos con Rojo sirio a los 7 días para evaluar la deposición de colágeno.

Evaluación de la muerte celular por apoptosis

Las células estrelladas fueron infectados con *B. abortus* a MOI 1000. Luego de 24 hs, el porcentaje de células apoptóticas fue evaluado por tinción con Anexina V-FITC (ImmunoTools) y con Ioduro de propidio, el análisis se realizó por citometría de flujo. La apoptosis también fue analizada por microscopía de fluorescencia luego de marcar las células con la técnica de TUNEL (de sus siglas en inglés *Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*) utilizando el kit fluorescein-FragEL DNA fragmentation detection kit (Calbiochem) o con el colorante nuclear Hoechst 33342. Como control positivo de apoptosis se utilizó paraformaldehído (PFA) al 4% o 200 µM de peróxido de hidrógeno.

Medición de la concentración de citoquinas y de TIMP-1

Las citoquinas humanas IL-6, TNF- α y TGF- β 1, las quemoquinas IL-8 y MCP-1 (BD Pharmingen) y TIMP-1 (Invitrogen) fueron medidas en los sobrenadantes de cultivo obtenidos a las 24 hs post-infección mediante ELISA sándwich, usando anticuerpos monoclonales específicos según las instrucciones del fabricante. Además, en extractos de hígado de ratones infectados con *B. abortus* se midió la citoquina de ratón TGF- β 1 por ELISA (BD Biosciences).

Zimografía

La actividad gelatinolítica de las MMPs fue evaluada mediante el método de Hibbs et. al [324]. La técnica consistió en la siembra de 20 μ l de sobrenadante de cultivo mezclado con 5 μ l de buffer de siembra [0,25 M tris (pH 6,8), 50% de glicerol, 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), y Azul de Bromofenol] en un gel de SDS-PAGE (de sus siglas en inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 10% conteniendo 1 mg de gelatina (Sigma-Aldrich)/ml. Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con 500 mM tris-HCl (pH 7,5)- 2,5% tritón X-100 durante 45 min en agitación, luego con 500 mM tris-HCl (pH 7,5)- 2,5% tritón X-100- 5 mM CaCl₂- 10 mM ZnCl₂ por 45 min y por último con 50 mM tris-HCl (pH 7,5) 10 mM CaCl₂ -200 mM NaCl durante 24 hs a 37°C. La incubación con estos buffers permite la desnaturalización/renaturalización de las MMPs promoviendo su actividad. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie y decolorados con 10% de ácido acético y 25% de isopropanol. Las bandas sin teñir indicaron la presencia de actividad gelatinolítica, y la identificación de la enzima involucrada (MMP-9 ó MMP-2) se determinó por comparación con un marcador de peso molecular. La identidad de la MMP candidata fue confirmada mediante un ensayo de ELISA como se explica a continuación.

Cuantificación de los niveles de MMP-9

La concentración de MMP-9 presente en los sobrenadantes de cultivo fue determinada mediante ELISA de sándwich utilizando anticuerpos monoclonales según las instrucciones del fabricante (R&D Systems).

Actividad gelatinolítica en condiciones nativas

La actividad gelatinolítica en los sobrenadantes de cultivo en condiciones nativas fue medida con el kit EnzChek gelatinasa/colagenasa (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El kit contiene gelatina DQ conjugada con altas concentraciones de fluoresceína inactiva. Cuando éste sustrato es digerido por gelatinasas o colagenasas se producen péptidos fluorescentes, por lo tanto el incremento de la fluorescencia es proporcional a la actividad proteolítica. Como enzima control se utilizó la colagenasa purificada de *Clostridium histolyticum* que provee el kit. Las placas fueron leídas en un lector de fluorescencia (Victor3; Perkin-Elmer, Waltham, MA). Para medir la actividad gelatinolítica en ausencia de inhibidores, los sobrenadantes de cultivo fueron tratados con ditiotreitól (DTT) 2 mM durante 20 min y luego con Iodoacetamida 5 mM durante 10 min. El DTT reduce los puentes disulfuro de los TIMPs y la

iodoacetamida los alquila impidiendo que se vuelvan a formar, de esta forma los TIMPs pierden su estructura y no pueden interactuar con el sitio activo de las MMPs [325].

Determinación de la deposición de colágeno

La deposición de colágeno fue evaluada en cultivos de LX-2 a los 7 días post-infección mediante tinción con Rojo Sirio, un colorante aniónico que posee alta afinidad por las fibras de colágeno [326]. Las células estrelladas cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos infectadas o estimuladas con medio condicionado fueron lavadas 3 veces con PBS y fijadas durante 1 h utilizando solución de Bouin, preparado al momento de uso mezclando 15 ml de ácido pícrico acuoso saturado, 5 ml de formaldehído 35% y 1 ml de ácido acético glacial. Las células fijadas se lavaron 3 veces con exceso de agua destilada y se secaron por unos minutos. Se agregó 1 ml de Rojo Sirio 0,1% (Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente durante 18 hs con agitación suave. Las células teñidas fueron lavadas con 0,01 N de ácido clorhídrico para remover el colorante no unido. Los cubreobjetos fueron montados en PBS-glicerina (9:1 [vol/vol]) y fueron analizados por microscopía de luz blanca. Para un análisis cuantitativo el colorante unido fue disuelto en 200 µl de NaOH 0,1 N durante 30 min en agitación. La solución fue transferida a placas de microtitulación y se midió la densidad óptica (DO) con un lector de placas (Metertech) a 550 nm contra el blanco hidróxido de sodio 0,1 N.

Análisis de la expresión de colágeno tipo I y α -SMA

Para determinar la expresión de colágeno tipo I y α -SMA se realizó inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células estrelladas fueron sembradas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 24 pocillos. Los cultivos de LX-2 infectados fueron fijados con 4% de PFA por 10 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con PBS y permeabilizados con 0,3% de tritón X-100 durante 10 min. Luego se realizó el bloqueo con solución de BSA al 1% por 1 h. Las células fueron incubadas durante 18 hs a 4°C con anticuerpos anti- α -SMA de conejo (Thermo Fisher Scientific Inc.) o anti-colágeno-I de ratón (Thermo Fisher Scientific Inc.) diluidos en PBS-tween 20 al 0,1%. Posteriormente las células fueron incubadas por 4 hs a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo conjugado con rodamina (Santa Cruz Biotechnology) o anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen). La tinción de los núcleos se realizó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, de sus siglas en inglés *4',6-diamidino-2-phenylindole*) por 30 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron montados en PBS-glicerina [9:1 (vol/vol)] y fueron analizados en un microscopio de fluorescencia.

Neutralización de TGF-B1

Los ensayos de neutralización fueron llevados a cabo con un anticuerpo bloqueante contra TGF-B (anti-TGF-B, clon 50716, Abcam Inc.) o su control de isotipo (clon 11711, R&D Systems). En los experimentos de bloqueo, las células fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de anticuerpo anti-TGF-B o su control de isotipo a concentración final de 20 µg/ml en un volumen final de 0,5 ml.

Evaluación de fibrosis hepática en un modelo murino de infección

Para los ensayos se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 5×10^5 UFC en 200 μ l de PBS de *B. abortus* o con vehículo (PBS). Los animales fueron sacrificados a las 4, 8 y 12 semanas post-infección. Para determinar los niveles de UFC, TGF- β 1 (ELISA) y de colágeno (tinción con Rojo Sirio) en el hígado de los ratones se obtuvieron extractos de tejido. Para ello, un lóbulo del hígado de cada ratón fue extraído, colocado en 1 ml de PBS a 4 °C y procesado con un homogeneizador de tejido. Se realizaron diluciones seriadas de alícuotas de los extractos en PBS estéril las cuales fueron sembradas en placas de TSA para determinar las UFC, los extractos restantes fueron centrifugados a 2000g por 20 min a 4 °C, los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -70 °C hasta ser analizados.

La evaluación histológica se realizó a partir de hígados de ratones sacrificados luego de 12 semanas post-infección. Los lóbulos extraídos fueron fijados y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Masson y Sirius Red. La tinción con tricrómico de Masson se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Brevemente, los cortes fueron fijados en solución de Bouin, teñidos en solución de hematoxilina férrica de Weigert, luego en solución de fucsina ácida-escarlata de Beibrich y por último con azul de anilina. Los cortes fueron deshidratados en etanol y aclarado con xileno. Entre cada tinción se realizaron lavados. Las fibras de colágeno se distinguieron en azul, el citoplasma rosa y en rojo la fibras musculares. Para la tinción con Rojo Sirio los cortes fueron incubados por 30 min en 0,1% de Rojo Sirio f3b con 0,1% de ácido pícrico y verde rápido (Sigma-Aldrich). Después de dos lavados con agua destilada, los cortes fueron deshidratados mediante alcohol anhidro y montados.

Los animales infectados fueron mantenidos y manipulados en instalaciones con un nivel de bioseguridad 3, localizados en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín (IIB-UNSAM). Los protocolos de trabajo utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina), expediente n° 0068651/2014.

Detección de TGF- β 1 en cortes de tejido

En los cortes de tejido obtenidos como se explicó anteriormente se analizó la producción de TGF- β 1 por inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales anti-TGF- β 1 murino elaborados en conejo (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:200 en PBS-BSA al 2%. La actividad peroxidasa del tejido se inhibió con 0,3% de peróxido de hidrógeno en metanol, se permeabilizó con 0,25% de Tritón X-100 y luego los cortes fueron incubados con anticuerpo primario durante 18 hs a 4 °C en cámara húmeda. La reacción fue amplificada utilizando el kit comercial EnVision+ sistema HRP (Dako) y los núcleos fueron teñidos con hematoxilina.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Tukey, usando el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos están presentados como la media \pm error estándar (SEM).

RESULTADOS

Las células hepáticas estrelladas tienen un papel fundamental en la remodelación fisiológica de la MEC y en la reparación del tejido hepático dañado, manteniendo la homeostasis del órgano. La persistencia de un estímulo infeccioso puede mediar la generación de tejido fibrótico debido a las alteraciones ocasionadas en las células estructurales e inmunes presentes en el hígado. Nuestra hipótesis es que la infección por *B. abortus* podría inducir inflamación con el consecuente daño hepático y activar a las células estrelladas induciendo la secreción de colágeno de tipo I y citoquinas profibrogénicas como IL-6 y TGF- β y de este modo contribuir a la resolución del proceso inflamatorio. Para investigar esta hipótesis, estudiamos la respuesta de las células estrelladas de hígado frente a la infección con *B. abortus* usando como modelo la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2. Además, estudiamos la interacción entre las células estrelladas y los hepatocitos (las células más abundantes del hígado) y los monocitos que podrían ser atraídos al sitio de infección.

***B. abortus* infecta y se multiplica intracelularmente en la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2.**

En primer lugar evaluamos la capacidad de *B. abortus* de invadir y multiplicarse en las células hepáticas estrelladas LX-2. Para ello las células fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. A distintos tiempos post-infección las células fueron lisadas para determinar el número de bacterias viables intracelulares mediante el recuento de UFC en placas de TSA. Los ensayos de infección demuestran que la bacteria es internalizada y puede multiplicarse en las células LX-2. Como control, infectamos en paralelo una línea de monocitos/macrófagos humanos (THP-1) ya que había sido demostrado que *B. abortus* puede infectar y multiplicarse en éstas células [79]. A todos los tiempos evaluados (2, 4, 6, 24 y 48 hs) el número de UFC fue más elevado en los monocitos THP-1 respecto de las células estrelladas LX-2 (Figura 1). Este resultado es consistente ya que *B. abortus* se multiplica preferencialmente en macrófagos [327].

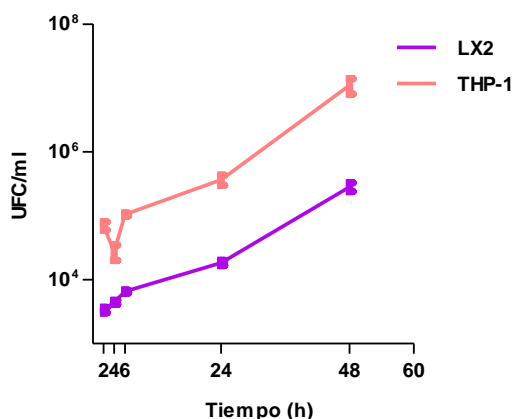


Figura 1: *B. abortus* infecta y replica en la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2. Las células LX-2 y los monocitos THP-1 fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100) durante 2 hs, luego fueron incubadas en medio de cultivo con antibiótico para eliminar a las bacterias extracelulares y a 2, 4, 6, 24 y 48 hs post-infección se determinaron las UFC en cada tipo celular.

La infección con *B. abortus* no induce la muerte celular por apoptosis de las células estrelladas de hígado.

Para determinar si *B. abortus* afecta la viabilidad de las células estrelladas LX-2, las células fueron infectadas a MOI 1000 (la más alta que fue utilizada en nuestros experimentos) durante 2 hs, luego de haber realizado un lavado con el objetivo de eliminar las bacterias que no fueron internalizadas, los cultivos fueron incubados en medio con antibióticos. A las 24 hs post-infección las células fueron teñidas con Anexina V-FITC/Ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Los resultados fueron corroborados mediante la técnica de TUNEL y por tinción de los núcleos con Hoechst 33342 y posterior evaluación por microscopía de fluorescencia. Las células fueron tratadas con PFA al 4% o 200 μ M de peróxido de hidrógeno como control positivo. Los resultados indicaron que la infección de las LX-2 con *Brucella* no induce apoptosis ya que no observamos diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de células apoptóticas entre las células infectadas y los controles sin infectar mediante tinción con Anexina V-FITC/Ioduro de propidio (Figura 2A y B), con TUNEL (Figura 2C y D) y Hoechst 33342 (Figura 2E y F). Estos resultados son consistentes con una respuesta fibrogénica ya que la muerte de las células estrelladas implicaría una modulación negativa de la principal población celular responsable de la producción de proteínas de MEC impidiendo que el tejido hepático sea reparado [328-330].

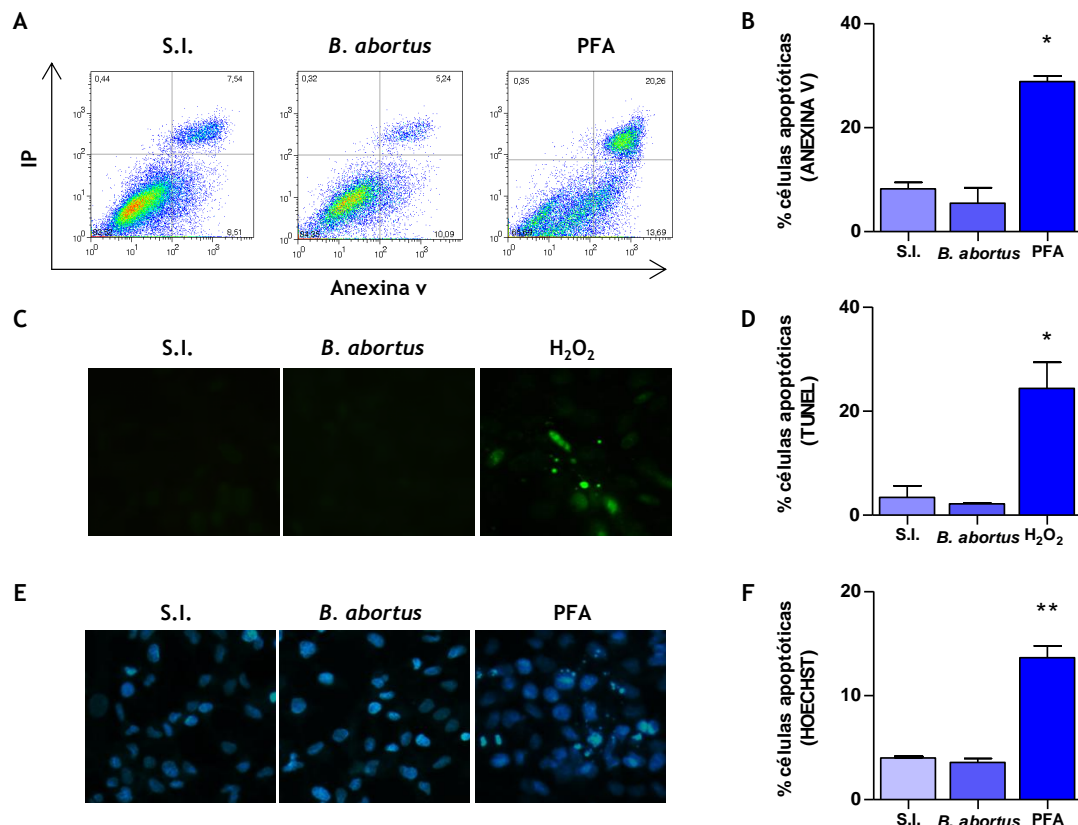


Figura 2: *B. abortus* no induce apoptosis de las células estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 1000 o fueron tratadas con 200 μ M de H₂O₂ o paraformaldehído al 4% como control positivo. Luego de 24 hs, las células fueron teñidas con Anexina V-FITC/Ioduro de propidio (IP) y analizadas por citometría de flujo (A), teñidas con TUNEL (C) o con Hoechst 33342 (E) y evaluadas por microscopía de fluorescencia. La cuantificación de células apoptóticas fue realizada calculando el porcentaje de células positivas para Anexina V-FITC (B), TUNEL (D) y Hoechst 33342 (F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus el control sin infectar (S.I.).

La infección con *B. abortus* induce la secreción de IL-8, MCP-1, IL-6 y TGF- β 1 y estimula la expresión de α -SMA en las células estrelladas.

Teniendo en cuenta que las células estrelladas participan en la respuesta inmune y son una fuente importante de citoquinas y quemoquinas en el hígado, nos propusimos caracterizar la respuesta inmunológica de las células estrelladas frente a la infección con *B. abortus*. Como se muestra en la **Figura 3**, la infección de las células LX-2 indujo la secreción significativa de las quemoquinas IL-8 y MCP-1 (**Figura 3A y B**) y de las citoquinas profibrogénicas IL-6 y TGF- β 1 (**Figura 3C y D**) en forma dependiente de la MOI utilizada. Por otro lado, la infección no indujo niveles detectables de TNF- α (no mostrado).

La secreción de citoquinas profibrogénicas (IL-6 y TGF- β 1) en respuesta a la infección nos estaría indicando que *B. abortus* modularía a las células estrelladas hacia un perfil fibrótico. Por lo tanto, decidimos evaluar si la infección con *B. abortus* induce la expresión de otro marcador de diferenciación y activación de las células estrelladas hacia un fenotipo fibrogénico, la proteína α -SMA. Para ello, las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* y luego de 72 hs analizamos la producción de α -SMA utilizando anticuerpos específicos por microscopía de fluorescencia. Como control positivo utilizamos LPS de *E. coli* a una concentración de 1 μ g/ml. Nuestros resultados indican que la infección con *B. abortus* induce la expresión α -SMA de un modo dependiente de la MOI utilizada (**Figura 3E**).

En conjunto, los resultados hasta aquí obtenidos, indican que la infección por *B. abortus* induce la activación de las células LX-2 hacia un perfil fibrogénico.

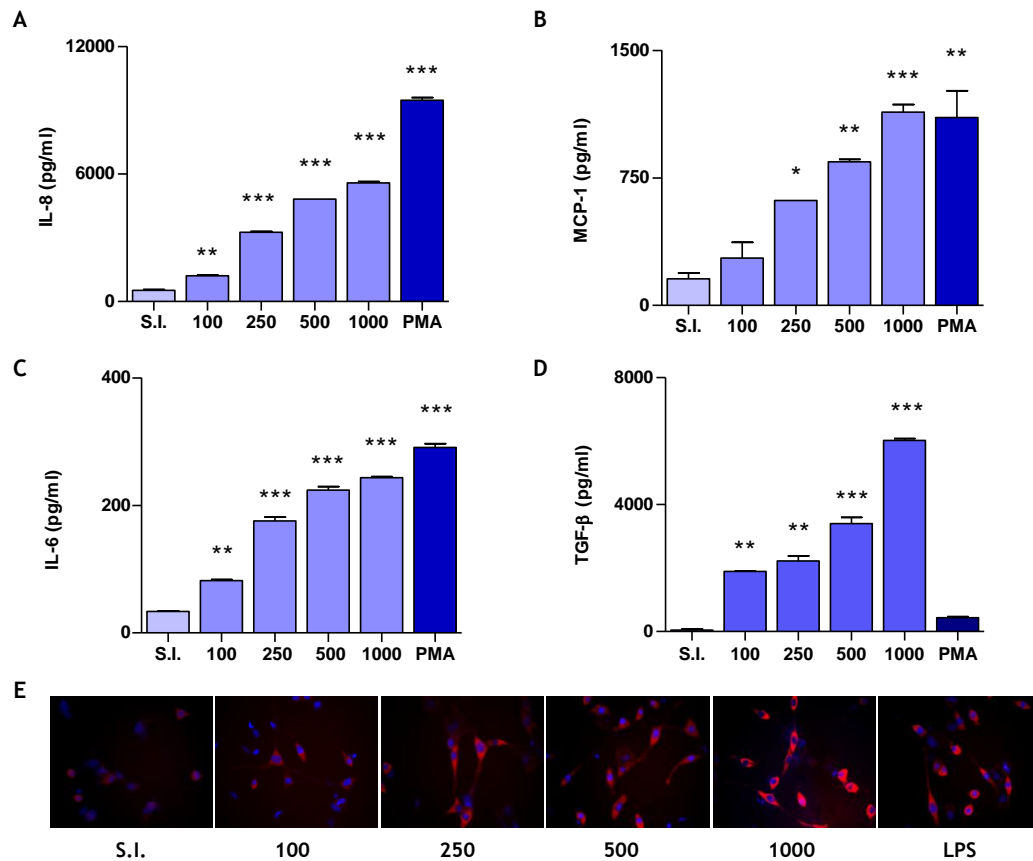


Figura 3: La infección con *B. abortus* induce la secreción de IL-8, MCP-1, IL-6 y TGF-β1 y la expresión de α-SMA en las células estrelladas. Se analizó por ELISA la producción de las quemoquinas IL-8 y MCP-1 (A y B) y de las citoquinas IL-6 y TGF-β1 (C y D) en sobrenadantes de células estrelladas infectadas con *B. abortus* a distintas MOI. Las células estrelladas fueron infectadas con *B. abortus* o tratadas con LPS de *E. coli* como control positivo y a las 72 hs post-infección determinamos la expresión de α-SMA mediante tinción con anticuerpos específicos anti-α-SMA (α-SMA), los núcleos fueron teñidos con DAPI (núcleos) y el análisis fue realizado por microscopía de fluorescencia (E). Las células fueron tratadas con PMA como control positivo. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

B. abortus inhibe la secreción de MMP-9 y estimula la producción de TIMP-1 por parte de las células LX-2.

Las MMPs y sus inhibidores específicos, los TIMPs, junto a la deposición de colágeno, están implicados en el desarrollo de fibrosis hepática y en la formación de granulomas [331]. Por lo tanto, nos preguntamos si la infección con *B. abortus* podría modular la expresión de éstas moléculas. Para determinar si *B. abortus* era capaz de modificar la secreción de MMPs por parte de las células estrelladas, analizamos en los sobrenadantes de cultivo de las células LX-2 infectadas la presencia de MMPs por zimografía (usando como matriz gelatina) y su presencia fue confirmada y cuantificada por ELISA. Como se muestra en la **Figura 4A y B**, la infección con *B. abortus* inhibió la secreción de MMP-9 de un modo dependiente de la MOI utilizada.

A continuación decidimos estudiar si la infección podría modular la secreción de TIMP-1 (inhibidor natural de MMP-9). Para ello analizamos por ELISA la presencia de TIMP-1 en los sobrenadantes de cultivo

de las células LX-2 infectadas. Los resultados obtenidos demostraron que las células infectadas secretan significativamente más TIMP-1 ($p < 0.001$) que los controles sin infectar (Figura 4C).

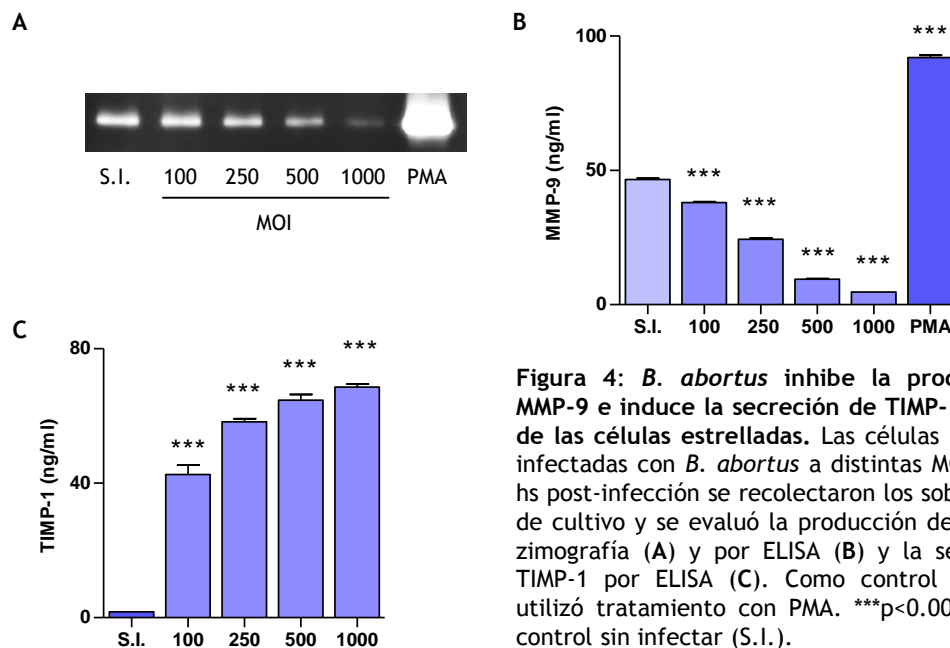


Figura 4: *B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 e induce la secreción de TIMP-1 por parte de las células estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* a distintas MOI, a las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de MMP-9 por zimografía (A) y por ELISA (B) y la secreción de TIMP-1 por ELISA (C). Como control positivo se utilizó tratamiento con PMA. *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

La infección con *B. abortus* inhibe la actividad neta de las metaloproteasas con actividad gelatinasa secretadas por las células LX-2.

Nuestros resultados demostraron que *B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 e induce la de TIMP-1. *In vivo*, la actividad de las MMPs es contrarrestada por los TIMPs. Como durante la electroforesis los complejos MMP-TIMP se disocian, decidimos corroborar si la actividad gelatinolítica neta de las MMPs también disminuye en respuesta a la infección, realizando un ensayo en fase fluida [332-336]. Para esto incubamos los sobrenadantes de cultivo provenientes de las células estrelladas infectadas con *B. abortus* con un conjugado de gelatina-FITC que no fluoresce cuando la molécula está íntegra, pero sí los péptidos resultantes cuando la misma es degradada por la acción de proteasas. Como se observa en la Figura 5, los sobrenadantes de las células LX-2 sin infectar inducen la degradación de la gelatina con el consecuente incremento en la fluorescencia, mientras que los sobrenadantes de las células infectadas con *B. abortus* lo hicieron de una forma significativamente menor ($p < 0.001$) respecto del control sin infectar. Para corroborar el papel que desempeñan los TIMPs en este mecanismo, realizamos el mismo ensayo pero con sobrenadantes de cultivo tratados con DTT y con Iodoacetamida con el objetivo de separar los complejos MMP-TIMP. El DTT reduce los puentes disulfuro de los TIMPs y la Iodoacetamida los alquila impidiendo que se vuelvan a formar; de esta forma los TIMPs pierden su estructura y no pueden interactuar con el sitio activo de las MMPs [325]. La disociación de los TIMPs, nos permite observar la actividad total de las MMPs, y corroborando los resultados ya obtenidos por zimografía observamos que la actividad gelatinasa de los sobrenadantes de cultivo disminuye a medida que se incrementa la MOI (Figura 5). Esto confirma que la infección por *B. abortus* induce una reducción en la actividad de las

MMPs con actividad gelatinasa, y al mismo tiempo los TIMPs contribuirían también a la inhibición de dicha actividad.

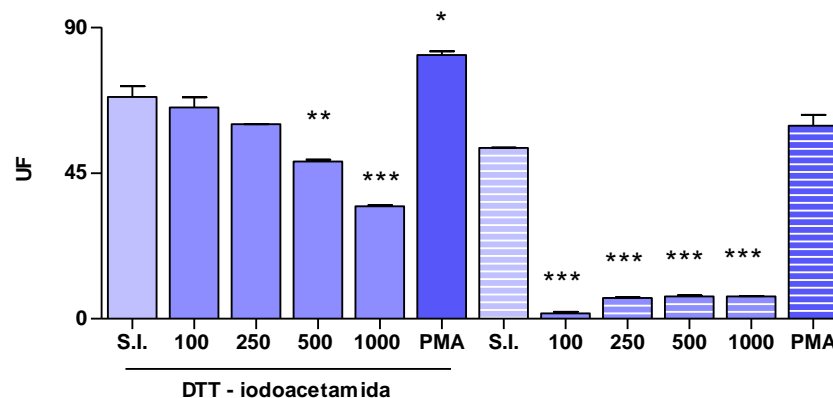


Figura 5: La infección con *B. abortus* inhibe la actividad gelatinolítica neta. La actividad gelatinolítica fue evaluada en los sobrenadantes de las células LX-2 infectadas con *B. abortus* tratados o no con DTT-iodoacetamida. Los sobrenadantes fueron incubados con un conjugado gelatina-FITC que no fluoresce cuando la molécula está íntegra, pero sí cuando la misma es degradada por la acción de proteasas. Se midió la fluorescencia emitida en un fluorómetro. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UF). Como control positivo se utilizó PMA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

Las células estrelladas depositan colágeno en respuesta a la infección por *B. abortus*.

La fibrosis es un proceso caracterizado por la acumulación de proteínas de la MEC como proteoglicanos, fibronectina, laminina y esencialmente fibras de colágeno tipo I [311]. Las células estrelladas de hígado constituyen el principal tipo celular involucrado en la producción de proteínas de la MEC durante la fibrogenesis [312]. Nos propusimos evaluar entonces si la infección con *B. abortus* era capaz de inducir la deposición de colágeno por parte de las células LX-2. Para alcanzar este objetivo, infectamos a las células estrelladas a distintas MOI, luego de 7, 14 y 30 días realizamos la tinción de las monocapas celulares con Rojo Sirio, un colorante aniónico con fuerte afinidad por las fibras de colágeno. Como se puede observar en la **Figura 6A y B**, tanto las células sin infectar como las infectadas depositan progresivamente más colágeno con el tiempo. Sin embargo, las células LX-2 infectadas depositan significativamente ($p < 0.001$) más colágeno que las células sin infectar a los 7, 14 y 30 días post-infección. Para corroborar que la infección por *B. abortus* induce mayor deposición de colágeno tipo I, infectamos a las células LX-2 y luego de 7 días realizamos una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-colágeno tipo I. Confirmando los resultados obtenidos por tinción con Rojo Sirio, demostramos que la infección con *B. abortus* induce la producción de colágeno de tipo I por parte de las células estrelladas (**Figura 6C**). Los resultados obtenidos indican que *B. abortus* activa a las células hepáticas estrelladas induciendo la deposición de colágeno. Esto podría generar cambios progresivos en la MEC contribuyendo a la fibrogenesis.

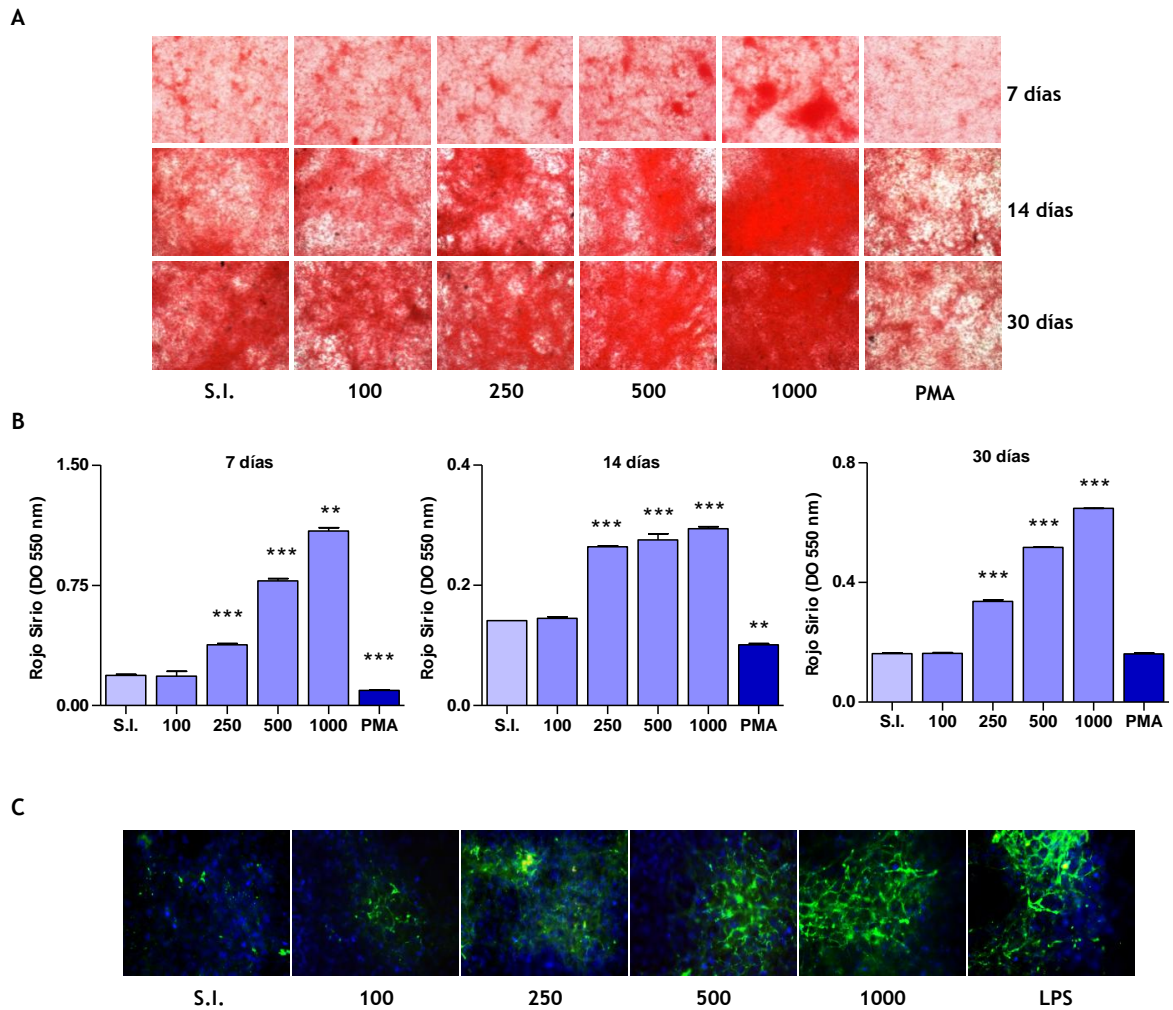


Figura 6: Las células estrelladas infectadas con *B. abortus* depositan significativamente más colágeno que las células no infectadas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* a diferentes MOI y a los 7, 14 y 30 días post-infección se evaluó la deposición de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio (A). El colorante unido fue cuantificado mediante su disolución y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (B). La expresión de colágeno tipo I fue analizada a los 7 días post-infección, se utilizaron anticuerpos específicos anti-colágeno tipo I (colágeno tipo-I), los núcleos fueron teñidos con DAPI (núcleos) y se realizó el análisis mediante microscopía de fluorescencia (C). Como control positivo se utilizó PMA o LPS de *E. coli*. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

***B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 por un mecanismo dependiente de TGF- β .**

TGF- β es la principal citoquina involucrada en la fibrosis hepática, es producida por distintos tipos celulares, entre ellos las células estrelladas [244, 282]. Dado que hemos demostrado que las células estrelladas infectadas con *B. abortus* secretan TGF- β 1, nos preguntamos si ésta citoquina estaría implicada en la inhibición de MMP-9 observada. Para ello infectamos a las células LX-2 en presencia o no de un de anticuerpo neutralizante anti-TGF- β o de su control de isotipo, luego de 24 hs recolectamos los sobrenadantes de cultivo y evaluamos la presencia de MMP-9 por zimografía. En presencia del anticuerpo neutralizante de TGF- β , *B. abortus* no fue capaz de inhibir la producción de MMP-9, mientras que el control de isotipo no tuvo efecto (Figura 7). Estos resultados indican que TGF- β tiene un papel muy importante en los mecanismos fibrogénicos desencadenados por *B. abortus*.

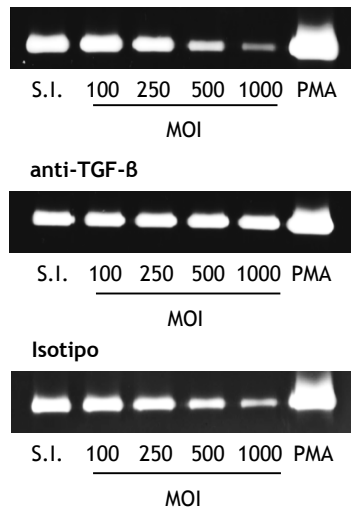


Figura 7: La inhibición de MMP-9 por *B. abortus* en la células estrelladas es dependiente de TGF-β. La producción de MMP-9 se evaluó en los sobrenadantes de las células LX-2 infectadas en presencia o no de un anticuerpo neutralizantes anti-TGF-β o su control de isotipo. Como control positivo se utilizó PMA.

Los sobrenadantes de los hepatocitos y de los monocitos infectados inducen la secreción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por parte de las células LX-2.

El hígado es un órgano complejo en el cual diversos tipos celulares (residentes e infiltrantes) participan en una intrincada red de interacciones. Dado que las células estrelladas infectadas con *B. abortus* secretan factores quimioattractantes que potencialmente podrían atraer monocitos al sitio de infección, decidimos estudiar la interacción entre las células estrelladas y los monocitos en el contexto de la infección con *B. abortus*. Para ello, nuevamente utilizamos como modelo la línea celular de monocitos humanos THP-1 y analizamos el efecto de las citoquinas secretadas por las THP-1 infectadas sobre la producción de MMP-9 por parte de las células LX-2. Para cumplir con este objetivo, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de los monocitos infectados con *B. abortus* a las 24 hs post-infección para posteriormente estimular a las células estrelladas durante 24 hs. La actividad de MMP-9 fue evaluada por zimografía y la producción cuantificada por ELISA. Los resultados obtenidos indicaron que el estímulo de las células LX-2 con los sobrenadantes de los monocitos infectados con *B. abortus* inducen la secreción de niveles significativos de MMP-9 ($p < 0.001$) en forma dosis dependiente. Sin embargo, no observamos ningún efecto cuando las células estrelladas fueron estimuladas con los sobrenadantes de monocitos no infectados (Figura 8A y C). La infección por *B. abortus* induce la secreción de MMP-9 por parte de las células THP-1. Sin embargo, los niveles solo son detectables por zimografía a las 48 hs post-infección y no a las 24 hs que es el tiempo al que se realizaron estos ensayos [337].

Teniendo en cuenta que en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio fue demostrado que *B. abortus* puede infectar e inducir la producción de citoquinas por parte de hepatocitos [75] y que, dada su localización en el hígado, están en íntimo contacto con las células estrelladas, nos planteamos evaluar si los sobrenadantes de los hepatocitos infectados, utilizando como modelo la línea celular humana HepG2, inducen la producción de MMP-9 por parte de las células LX-2. Como se muestra en la Figura 8B y D, los sobrenadantes de cultivo de hepatocitos infectados inducen de manera dosis dependiente la producción de MMP-9 por parte de las células estrelladas. Los sobrenadantes de hepatocitos no infectados

no modificaron los niveles basales de MMP-9. Por otro lado, la infección de los hepatocitos por *B. abortus* no induce la secreción de MMP-9 [75]. En concordancia con el incremento en la producción de MMP-9, demostramos que las células estrelladas estimuladas con los sobrenadantes de cultivo de monocitos y hepatocitos infectados con *B. abortus* depositan significativamente menos colágeno que los controles sin tratamientos ($p < 0.001$) (Figura 8E y F).

Estos resultados indican que los monocitos y hepatocitos infectados inducen la producción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por las células LX-2.

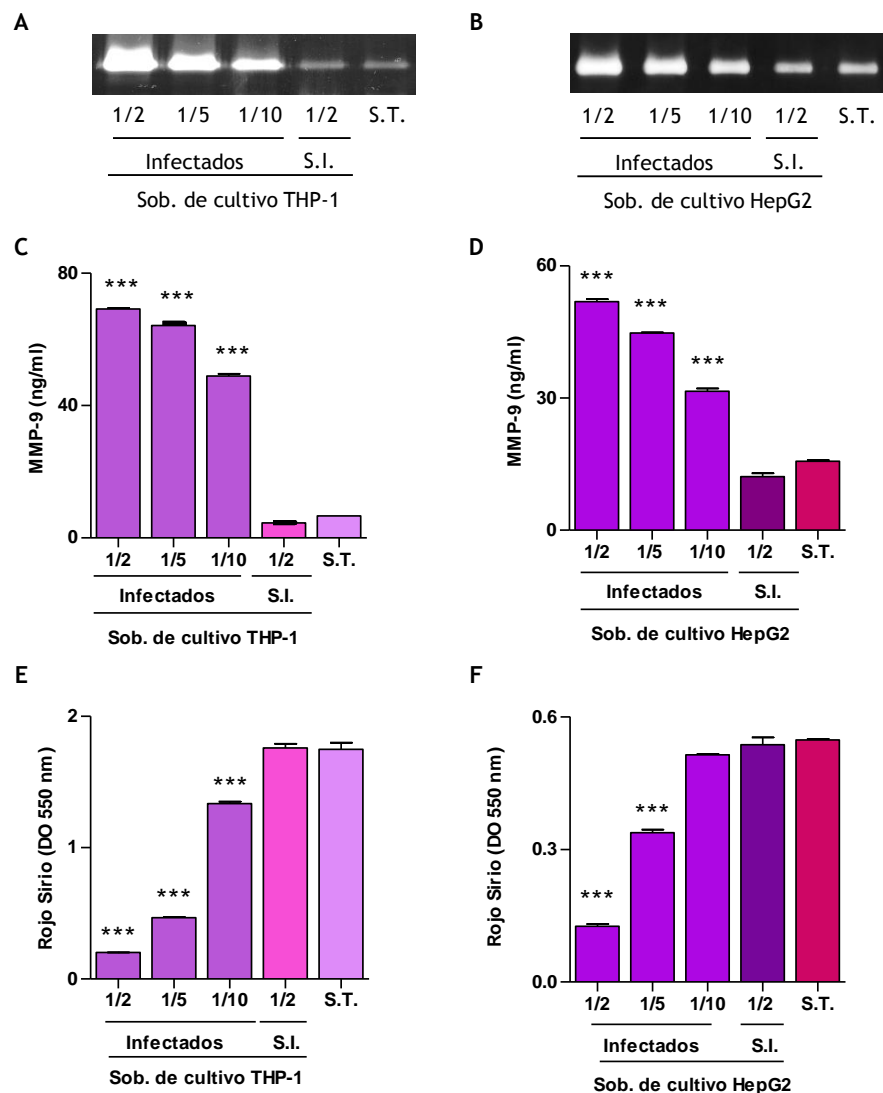


Figura 8: Los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados con *B. abortus* inducen la producción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por parte de las células estrelladas. Las células LX-2 fueron estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos THP-1 o de hepatocitos HepG2 infectados con *B. abortus* (adicionado en las proporciones 1/2, 1/5 y 1/10) o sobrenadantes sin infectar (S.I.). Luego de 24 hs, la producción de MMP-9 fue analizada por zimografía (A y B) y por ELISA (C y D). La deposición de colágeno fue evaluada a los 7 días post-estimulación por tinción con Rojo Sirio y cuantificación mediante la lectura de la densidad óptica a 550 nm (E y F). Como control positivo se utilizó PMA. *** $p < 0.001$ versus el control sin tratar (S.T.).

***B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de hepatocitos y monocitos infectados con la concomitante secreción de colágeno en las células LX-2.**

Nuestros resultados indican que la infección con *B. abortus* inhibe la producción basal de MMP-9 y estimula la deposición de colágeno por parte de las células LX-2. Por lo tanto, decidimos estudiar si la infección era capaz de inhibir la secreción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de los monocitos y de los hepatocitos infectados con la concomitante inducción de la deposición de colágeno. Para ello, las células LX-2 fueron infectadas a distintas MOI en presencia o no de sobrenadantes de cultivo de monocitos o hepatocitos infectados con *B. abortus* (en dilución 1/2). Luego de 24 hs se determinaron los niveles de MMP-9 por zimografía y a los 7 días se evaluó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio. Como se muestra en la **Figura 9A y B**, *B. abortus* inhibe la actividad de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados. Además, la infección indujo la deposición de colágeno en presencia de los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados (**Figura 9C y D**).

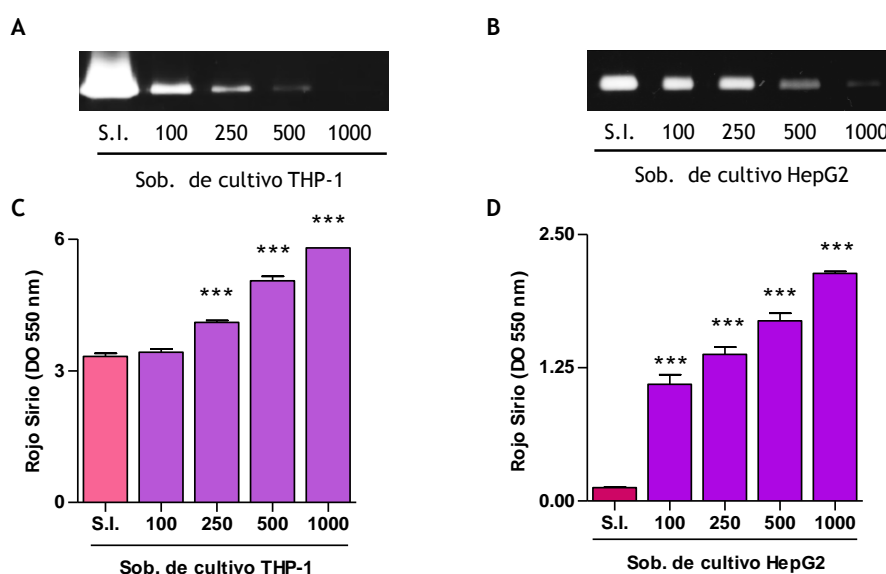


Figura 9: Las células estrelladas infectadas con *B. abortus* y estimuladas con sobrenadantes de hepatocitos y monocitos infectados presentan inhibición en la secreción de MMP-9 con concomitante deposición de colágeno. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* y estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos THP-1 o de hepatocitos HepG2 infectados (adicionado en la proporción 1/2). Luego de 24 hs, la producción de MMP-9 fue analizada por zimografía (A y B). La deposición de colágeno fue evaluada luego de 7 días por tinción con Rojo Sirio y cuantificación mediante la lectura de la densidad óptica a 550 nm (C y D). ***p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

***B. abortus* inhibe la secreción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de los monocitos y de los hepatocitos infectados por una vía dependiente de TGF- β en las células LX-2.**

Previamente demostramos que la infección con *B. abortus* inhibe la producción basal de MMP-9 por parte de las células estrelladas de un modo dependiente de la presencia de TGF- β . Por lo tanto, decidimos estudiar si esta citoquina estaría modulando la inhibición de la producción de MMP-9 por las células estrelladas cuando son infectadas y estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos y hepatocitos infectados.

En primer lugar decidimos determinar si las células LX-2 infectadas y tratadas con sobrenadantes de monocitos o hepatocitos también infectados con *B. abortus* secretaban TGF- β 1. Nuestros resultados indicaron que las células estrelladas secretan TGF- β 1 en respuesta a la infección en presencia de sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados con *B. abortus*. Sin embargo, no detectamos TGF- β 1 en los sobrenadantes de las células LX-2 sin infectar, que fueron estimuladas con sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados con *B. abortus* (Figura 10A y B).

A continuación nos preguntamos si TGF- β estaría implicada en la inhibición de MMP-9 observada cuando las células LX-2 son infectadas en presencia de los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados. Para ello, las células estrelladas fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 1000 y estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos o hepatocitos en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β o de su control de isotipo. Como se muestra en la Figura 10C y D, cuando el ensayo se realiza en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β se revierte el efecto inhibitorio sobre la actividad de MMP-9. El control de isotipo no tuvo efecto.

Estos resultados indican que la infección con *B. abortus* de las células LX-2 inhibe la secreción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados por una vía donde TGF- β es la principal citoquina implicada.

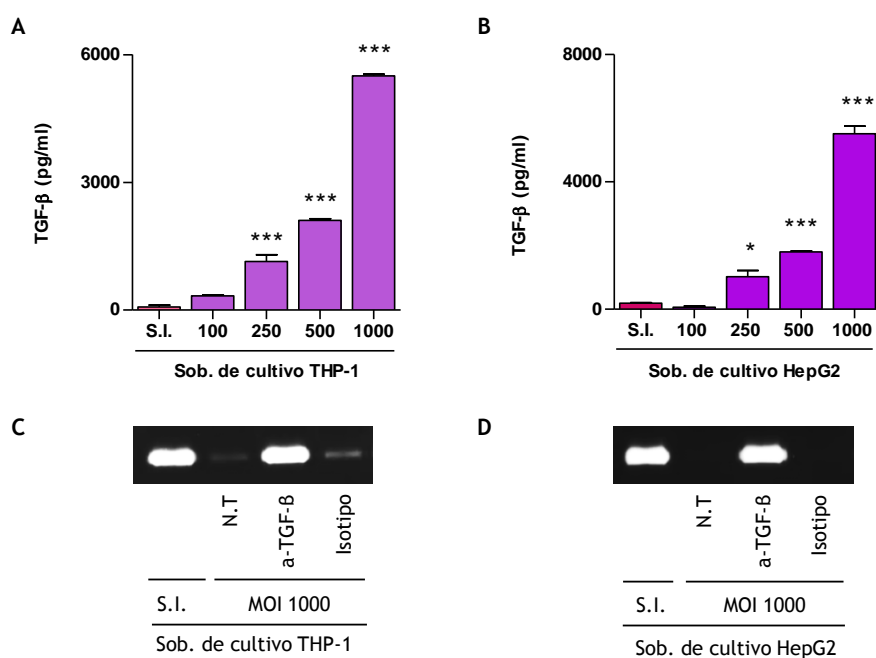


Figura 10: La neutralización de TGF- β revierte el efecto inhibitorio de *B. abortus* sobre las células LX-2 estimuladas con sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* y estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos THP-1 o de hepatocitos HepG2 infectados (adicionado en la proporción 1/2). Luego de 24 hs, la producción de TGF- β 1 fue analizada por ELISA (A y B). Las células estrelladas fueron infectadas a MOI 1000 con *B. abortus* y estimuladas con sobrenadantes de cultivo de monocitos o de hepatocitos infectados en presencia o no (N.T.) de un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β o de su control de isotipo. Después de 24 hs, la producción de MMP-9 fue evaluada por zimografía (C y D). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

El hígado de los ratones infectados con *B. abortus* presenta niveles elevados de colágeno y TGF- β .

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*, nuestra hipótesis es que *B. abortus* podía estimular o inhibir la diferenciación de las células estrelladas hacia un fenotipo fibrogénico dependiendo de las interacciones celulares y de si las células se encuentran infectadas o no. Para determinar la relevancia *in vivo* de nuestra hipótesis infectamos ratones con *B. abortus* por la vía intraperitoneal. A distintos tiempos post-infección los animales fueron sacrificados y los hígados fueron extraídos para el análisis histopatológico.

El hígado de los ratones infectados con *B. abortus* presenta zonas de tejido con deposición de colágeno intraparenquimatoso, como lo demuestra la tinción de los cortes histológicos con Rojo Sirio (colágeno teñido de rojo) y con Tricrómico de Masson (colágeno teñido de azul) (**Figura 11A**). Asimismo, corroborando los resultados obtenidos del análisis histopatológico, los niveles de colágeno cuantificados por tinción con Rojo Sirio están significativamente incrementados en el hígado de los ratones infectados con *B. abortus* respecto de los ratones controles inoculados con PBS (vehículo) (**Figura 11B**). Este incremento se correlaciona con los altos niveles de TGF- β detectados en los extractos de hígado de los ratones infectados, especialmente a las 8 semanas post-infección (**Figura 11C**). Además, al teñir TGF- β por inmunohistoquímica, pusimos en evidencia que las principales células productoras de ésta citoquina en respuesta a la infección son las células estrelladas del hígado (**Figura 11A**). Por otro lado, los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de los hígados de los ratones infectados exhibieron infiltrado inflamatorio linfocitario. En cambio no se observó reclutamiento de células inmunes en el hígado de los ratones no infectados (**Figura 11A**).

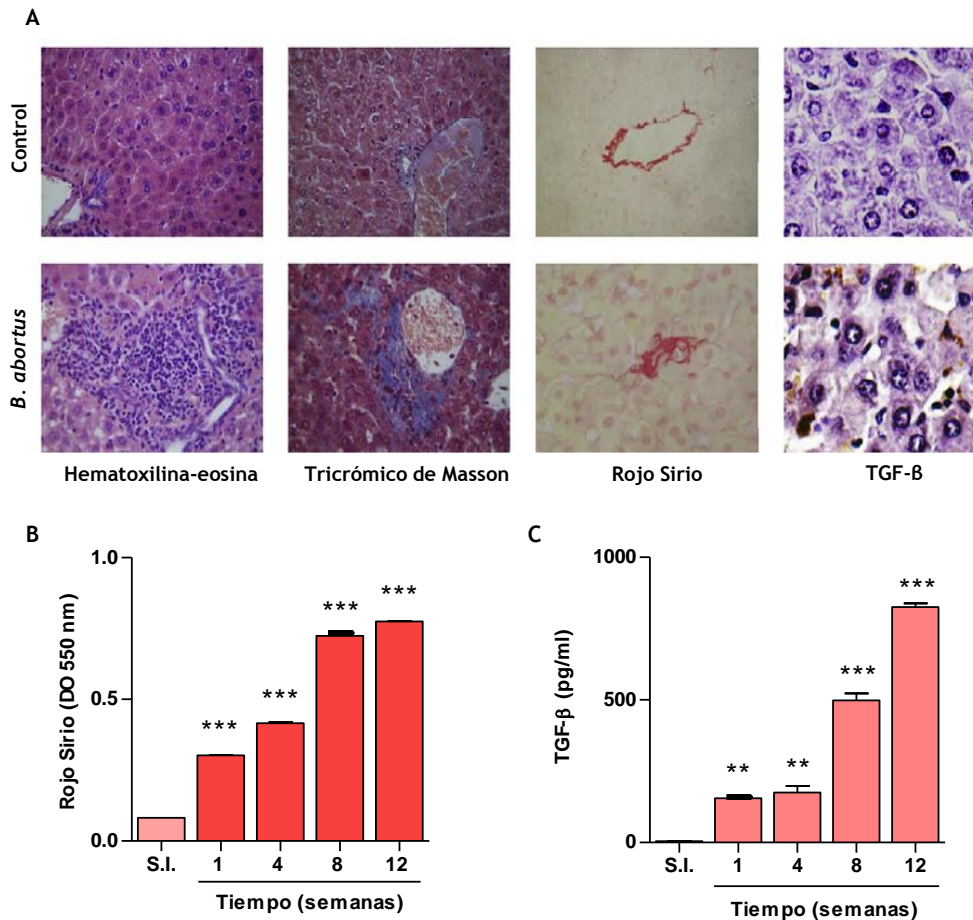


Figura 11: *B. abortus* induce la deposición de colágeno y la secreción de TGF- β en el hígado de los ratones infectados. (A) Fotografías representativas del análisis histológico de cortes de hígados provenientes de ratones infectados o controles sin infectar mediante tinción con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, Rojo Sirio y tinción por inmunohistoquímica de TGF- β . (B) Cuantificación de los niveles de colágeno en extractos de hígados a 1, 4, 8 y 12 semanas post-infección mediante Rojo Sirio. (C) Determinación de TGF- β por ELISA en extractos de hígados a 1, 4, 8 y 12 semanas post-infección. ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).**

DISCUSIÓN

En los pacientes con brucelosis activa, el hígado es frecuentemente afectado por lesiones histopatológicas como granulomas, infiltrado inflamatorio y necrosis del parénquima [285]. Aunque existen numerosos estudios que se han focalizado en la histopatología hepática en la brucelosis hasta el momento no existe un consenso sobre el origen de dichas afecciones. En el presente capítulo evaluamos potenciales mecanismos inmunológicos que podrían mediar el daño hepático ocasionado por *B. abortus*.

El daño permanente y la persistencia de un estímulo infeccioso, como la infección por *B. abortus*, pueden conllevar al desarrollo de fibrosis debido a las alteraciones que pueden provocar en una variedad de células inmunes y estructurales [310]. La fibrosis hepática está caracterizada por la deposición de proteínas de la MEC, principalmente de las fibras de colágeno de tipo I cuya expresión está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional [338-340]. Distintas poblaciones celulares han sido descritas con potencial fibrogénico en el hígado, entre ellas los fibroblastos, células mesenquimales derivadas de la médula ósea e incluso hepatocitos y células del epitelio biliar. Sin embargo, las células hepáticas estrelladas son reconocidas como las principales células implicadas en la fibrosis hepática [341, 342]. Este tipo celular es capaz de producir TGF- β , la citoquina profibrogénica más importante, capaz de actuar tanto de forma autocrina como paracrina [244].

En el presente trabajo demostramos que las células hepáticas estrelladas (LX-2) infectadas con *B. abortus* expresan α -SMA, un marcador de activación, y producen colágeno y TGF- β 1. En concordancia con estos resultados, la infección con *B. abortus* inhibe los niveles basales e inducidos de MMP-9 y este fenómeno fue dependiente de la secreción de TGF- β 1. Una manifestación frecuente en los pacientes con brucelosis es que presentan niveles elevados de transaminasas y de fosfatasas alcalinas séricas [25]. Ha sido descrito que existe una correlación entre los niveles séricos de alanina y aspartato aminotransferasa y los de TGF- β 1 [343]. Por otro lado, se ha demostrado que la concentración en el plasma de TGF- β 1 correlaciona con el grado de insuficiencia hepática y podría ser un indicador de la progresión de fibrosis en el hígado [344, 345].

Además, en el presente capítulo demostramos que las células estrelladas infectadas con *B. abortus* no sólo estarían contribuyendo a la deposición de colágeno sino que también estarían mediando el reclutamiento de células inflamatorias al foco infeccioso. En este sentido, demostramos que las células LX-2 responden a la infección con *B. abortus* produciendo niveles significativos de IL-8 y MCP-1, potentes quimioattractantes de neutrófilos y monocitos respectivamente. El reclutamiento de monocitos/macrófagos es particularmente relevante dado que constituyen el nicho replicativo preferencial de la bacteria [346]. Por lo tanto, los macrófagos (los residentes del órgano y los que son atraídos al sitio de infección) podrían contribuir al daño hepático no solo por constituir el nicho replicativo de la bacteria sino también al favorecer los procesos inflamatorios.

Por otra parte, un trabajo reciente permitió comprender la complejidad y dinámica del microambiente celular durante el curso de la infección con *Brucella* en el hígado al evidenciar que las

células dendríticas son efectores inmunes y reservorios celulares durante la infección crónica en el órgano [347]. Considerando esto, podría resultar que las células estrelladas no constituyan el nicho replicativo o un reservorio en el hígado para la bacteria, pero esto no descartaría la posibilidad de que sean infectadas de forma transitoria, estimuladas por antígenos de la bacteria o por las citoquinas presentes en el microambiente inflamatorio generado por la infección. Diferentes estudios han identificado las vías de señalización de los TLRs implicadas en la respuesta inmune frente a la infección por *Brucella* [150, 348, 349]. Un estudio reciente reveló el papel de los receptores no-TLRs en la inmunidad innata en el contexto de la infección con *Brucella*, la cual resulta en la activación de una respuesta inflamatoria aguda que es mediada parcialmente por la maquinaria citosólica llamada inflamasoma [349]. Esta respuesta inflamatoria aguda es esencial para el desarrollo de fibrosis en diferentes órganos, como pulmón, hígado y piel [350].

Nuestros resultados demostraron que los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inducen la secreción de MMP-9 e inhiben la deposición de colágeno por parte de las células LX-2. Sin embargo, este fenómeno fue inhibido cuando las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* al mismo tiempo que fueron tratadas con los sobrenadantes de los macrófagos infectados, en este caso observamos inhibición de MMP-9 e inducción de la secreción de colágeno y de TGF- β 1. Además, el mismo fenómeno se observó cuando se usaron sobrenadantes provenientes de hepatocitos infectados con *B. abortus*. Estos resultados ponen en evidencia la complejidad del microambiente inflamatorio y de cómo la infección con la bacteria y la interacción entre los distintos tipos celulares son determinantes del tipo de respuesta de las células estrelladas.

Los resultados de este trabajo en conjunto con los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio [75], tienen correlación con los obtenidos en los experimentos *in vivo*, utilizando un modelo murino. Mediante el análisis histológico pusimos en evidencia que el hígado de los ratones infectados con *B. abortus* presentaron simultáneamente focos con infiltrado inflamatorio y regiones de tejido fibrótico. Asimismo, pusimos en evidencia que las principales células productoras de TGF- β en respuesta a la infección son las células estrelladas hígado.

En conjunto, los resultados de este capítulo proporcionan una potencial explicación al mecanismo de fibrosis hepática inducida por las células estrelladas infectadas con *B. abortus*, caracterizado por la deposición de colágeno y la inhibición de MMP-9 por una vía dependiente de la producción de TGF- β 1. Además, al estudiar la interacción con hepatocitos y macrófagos se puso en evidencia que la respuesta de las células estrelladas puede ser inflamatoria o fibrogénica de acuerdo a si están infectadas o no y de su interacción con otros tipos celulares.

Capítulo II:

“La proteína BPE005 de *B. abortus* induce la deposición de colágeno e inhibe la producción de MMP-9 por parte de las células hepáticas estrelladas por un mecanismo dependiente a TGF- β ”

INTRODUCCIÓN

El SST4 es un complejo multiproteico utilizado por las bacterias para translocar nucleoproteínas y moléculas efectoras hacia la célula hospedadora, generalmente por un mecanismo dependiente del contacto [351]. El SST4 es un factor de virulencia crucial para la supervivencia y multiplicación de *Brucella*; se ha demostrado que las bacterias mutantes en este sistema pierden la capacidad de evadir la interacción de las VCBs con los lisosomas y por lo tanto son incapaces de sobrevivir y multiplicarse en macrófagos, células epiteliales y en un modelo murino de infección [93, 94, 111, 114].

En las bacterias del género *Brucella* el SST4 se encuentra codificado por el operón *virB*, el cual está compuesto por 12 marcos abiertos de lectura (*virB1-virB12*) y un promotor corriente arriba de *virB1* [94]. Durante la infección de los macrófagos, la expresión es rápidamente activada después de la internalización alcanzando su máxima actividad luego de 5 hs post-infección [352]. Cuando el compartimento replicativo se establece y se inicia la multiplicación bacteriana el operón es reprimido. Su expresión está altamente regulada dentro de las células hospedadoras siendo la acidificación de los fagosomas y la interacción de las VCBs con la vía endocítica señales determinantes para la inducción del mismo [36, 103].

A pesar de que ha sido ampliamente descrito el papel del SST4 en el ciclo intracelular de *Brucella* y que se han identificado algunos de los efectores secretados por este sistema, aún no han sido dilucidados los mecanismos a nivel molecular y las vías de señalización que dichos sustratos modulan. Hasta el momento se han descrito solo 15 efectores que son inyectados a la célula hospedadora de manera dependiente al SST4 [103], entre los cuales se encuentran las proteínas BPEs (de sus siglas en inglés *B. abortus putative effectors*) [133].

Se ha demostrado que las moléculas efectoras translocadas por los SST4 son capaces de modular múltiples cascadas de señalización en las células hospedadoras. Por ejemplo, *H. pylori* a través de su SST4 *cag* inyecta el efector CagA, que está implicado en la disrupción de las uniones celulares, en producir modificaciones en el citoesqueleto y en las respuestas anti-apoptóticas, proinflamatorias y en la proliferación de la célula infectada [353]. Por otro lado *L. pneumophila* secreta efectores mediante su sistema Dot/Icm que alteran el tráfico vesicular y modulan la muerte por apoptosis de las células que infectan [354, 355].

En el caso de *Brucella*, se ha demostrado que el SST4 codificado por el operón *virB* está involucrado en la modulación de la respuesta inmune durante la infección. En este sentido, se ha demostrado utilizando el modelo murino, que el SST4 está implicado en la estimulación de la respuesta inmune inflamatoria contribuyendo a la polarización hacia un perfil Th1 [120-122]. Además, se ha descrito que el SST4 es esencial para la completa activación del inflammasoma y la consecuente producción de IL-18 en macrófagos murinos [122].

En este contexto que indica que el SST4 VirB de *Brucella* está implicado en la modulación de la respuesta inmune durante la infección nos propusimos estudiar si el SST4 y/o sus proteínas efectoras

están implicados en los fenómenos de fibrogénesis desencadenados por la bacteria que fueron descritos en el capítulo I. Para alcanzar este objetivo investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* y de sus mutantes isogénicas en la respuesta fibrogénica (producción de MMP-9, deposición de colágeno y secreción de TGF- β) de las células hepáticas estrelladas, utilizando nuevamente como modelo la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de bacterias

Los cultivos de *B. abortus* S2308 (*B. abortus* WT), sus mutantes isogénicas *B. abortus virB10* ($\Delta virB10$), *B. abortus bpe005* ($\Delta bpe005$), *B. abortus bpe275* ($\Delta bpe275$), *B. abortus bpe123* ($\Delta bpe123$), las mutantes complementadas y la cepa rugosa *B. abortus* RB51 se realizaron como ha sido descrito previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo I. Las mutantes empleadas en este trabajo de tesis fueron cedidas gentilmente por el Dr. Diego Comerci (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín-IIB-UNSAM).

Cultivo celular

Las células estrelladas LX-2 fueron cultivadas como ha sido descrito previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Infección celular

Las células LX-2 fueron cultivadas durante 24 hs en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en medio completo sin antibióticos y fueron infectadas con *B. abortus* WT, sus mutantes isogénicas $\Delta virB10$, $\Delta bpe005$, $\Delta bpe275$, $\Delta bpe123$, las mutantes complementadas o la cepa rugosa RB51 a diferentes MOI: 100, 250, 500 y 1000. Siguiendo el procedimiento ya descrito, se determinó la replicación intracelular y la deposición de colágeno. Por otro lado, los sobrenadantes de los cultivos infectados fueron recolectados a las 24 hs post-infección para medir la producción de MMPs, citoquinas y quemoquinas, utilizando la metodología ya descrita.

Ensayos de transfección

Las células estrelladas fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ y transfectadas con el plásmido de expresión eucariota codificante para la proteína BPE005 o con el plásmido pRSV-PKI, un vector de expresión eucariota del inhibidor competitivo de la proteína quinasa A (PKA, de sus siglas en inglés *Protein Kinase A*). Se realizó la transfección del ADN plasmídico a una concentración de 2 mg/ml durante 5 hs con Lipoafectamina 2000 (Invitrogen) en medio Opti-MEM (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de 24 hs se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para evaluar la producción de MMPs y de TGF- β , se renovó el medio de cultivo y luego de 5 días se cuantificó la deposición de colágeno.

La eficiencia del procedimiento fue evaluada mediante la transfección de las células con el plásmido pcDNA3-myc y posterior evaluación de la expresión de myc por inmunofluorescencia. Se realizó la marcación de myc con un anticuerpo anti-c-myc (Santa Cruz Biotechnology) diluido en PBS-tween 20 0,01% por 30 min a temperatura ambiente y con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (Santa

Cruz Biotechnology). Se utilizó DAPI para teñir los núcleos durante 30 min a temperatura ambiente. Los preparados fueron montados y analizados en el microscopio de fluorescencia. Se realizó el análisis de células positivas para myc con el software ImageJ.

Estimulación con dibutiril-AMPC

Los cultivos de células LX-2 fueron transfectados o no con el plásmido BPE005 o con el plásmido control pcDNA3-myc en presencia o no de 0,1 μ M de dibutiril-AMPC (B2AMPC, Sigma-Aldrich), un análogo del adenosin monofosfatos cíclico (AMPC) capaz de ingresar a las células. Luego de 24 hs, se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo y se analizó la producción de MMPs y TGF-B1. Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de infección en presencia de B2AMPC, las células LX-2 fueron infectadas o no con *B. abortus* WT o con la mutante $\Delta bpe005$ y estimuladas con distintas concentraciones de B2AMPC: 0,01 μ M, 0,1 μ M o 1 μ M. A las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de MMPs.

Inhibición de la PKA

Para inhibir a la PKA se utilizaron dos estrategias diferentes, una consistió en la transfección de las células con el plásmido pRSV-PKI como se explicó anteriormente y la otra utilizando el inhibidor farmacológico KT5720, un inhibidor competitivo y específico de PKA. Las células LX-2 fueron cultivadas durante 24 hs en placas de 24 pocillos a una densidad de 5x10⁴ células/pocillo, luego fueron infectadas o no con *B. abortus* o la mutante $\Delta bpe005$ en presencia de 2 μ M de KT5720 en un volumen final de 0,5 ml.

Evaluación de fibrosis hepática en un modelo murino de infección

Para los ensayos se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 5x10⁵ UFC de *B. abortus* WT, $\Delta bpe005$ o con vehículo (PBS). Los animales fueron sacrificados a las 4 y 12 semanas post-infección. Para determinar los niveles de UFC, TGF-B1 (ELISA) y de colágeno (tinción con Rojo Sirio) en el hígado de los ratones se obtuvieron extractos de tejido. Para ello, un lóbulo del hígado de cada ratón fue extraído, colocado en 1 ml de PBS frío y procesado con un homogeneizador de tejido. Se realizaron diluciones seriadas de alícuotas de los extractos en PBS estéril las cuales fueron sembradas en placas de TSA para determinar las UFC, los extractos restantes fueron centrifugados a 2000g por 20 min a 4°C, los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -70°C hasta ser analizados.

La evaluación histológica se realizó a partir de hígados de ratones sacrificados luego de 4 semanas post-infección. Los lóbulos extraídos fueron fijados y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos con tricrómico de Masson. La tinción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Las áreas de colágeno positivas fueron visualizadas por microscopía y cuantificadas utilizando el software Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.).

Los animales infectados fueron mantenidos y manipulados en instalaciones con un nivel de bioseguridad 3, localizados en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín (IIB-UNSAM). Los protocolos de trabajo utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina), expediente n° 0068651/2014.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Tukey, usando el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos están presentados como la media \pm error estándar (SEM).

RESULTADOS

La infección con *B. abortus* induce una respuesta fibrogénica por parte de las células hepáticas estrelladas, caracterizada por la inhibición de la secreción de MMP-9 y la inducción de la deposición de colágeno por un mecanismo dependiente de la secreción de TGF- β . Sin embargo, los mecanismos moleculares utilizados por *Brucella* para desencadenar esta respuesta no han sido dilucidados aún.

El SST4 es un complejo multiproteico utilizado por las bacterias para translocar efectores a través de la envoltura celular hacia la célula hospedadora [351]. Estas moléculas, pueden modular varios procesos celulares en la célula hospedadora, incluyendo apoptosis, tráfico vesicular y ubiquitinación [354, 355]. Ha sido demostrado que el SST4 de *Brucella*, codificado por el operón *virB*, está implicado en la modulación de la respuesta inmune durante la infección [120-122]. Nos propusimos investigar entonces si el efecto de la infección con *B. abortus* en la activación de las células estrelladas es dependiente de la presencia del SST4 VirB. Para alcanzar este objetivo investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* y de sus mutantes isogénicas en la respuesta fibrogénica (producción de MMP-9, deposición de colágeno y secreción de TGF- β) de las células hepáticas estrelladas, utilizando nuevamente como modelo la línea de células estrelladas de hígado humano LX-2.

***B. abortus* induce un perfil fibrogénico en las células hepáticas estrelladas de un modo dependiente al SST4 VirB.**

El SST4 de *Brucella* ha sido implicado en la modulación de numerosas respuestas inmunes durante la infección con *B. abortus* y, además, es un factor de virulencia imprescindible para la supervivencia intracelular de *Bucella* en distintos tipos celulares [90, 111, 114]. Por lo tanto, en primer lugar, decidimos evaluar la relevancia del SST4 en la multiplicación de la bacteria en las células hepáticas estrelladas. Para esto las células fueron infectadas con *B. abortus* WT y con una mutante para el SST4 ($\Delta virB10$) a MOI 100 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. A distintos tiempos post-infección las células fueron lisadas para determinar el número de bacterias viables intracelulares mediante el recuento de UFC en placas de TSA.

En concordancia a lo ya descrito en otros tipos celulares tanto *B. abortus* WT como la mutante $\Delta virB10$ fueron capaces de infectar a las células LX-2. Sin embargo, sólo *B. abortus* WT pudo sobrevivir intracelularmente y multiplicarse, generando una infección estable (**Figura 12**). Esto indica que la multiplicación de *B. abortus* en las células hepáticas estrelladas, al igual que ocurre en otros tipos celulares [74, 75, 90, 111], depende de la presencia de un SST4 funcional. El mismo fenómeno fue observado cuando infectamos a las células LX-2 con la cepa rugosa RB51 (mutante para el LPS de *B. abortus*), las bacterias no fueron capaces de multiplicarse en éstas células (**Figura 12**), y éste resultado condice con lo reportado para otros tipos celulares [356].

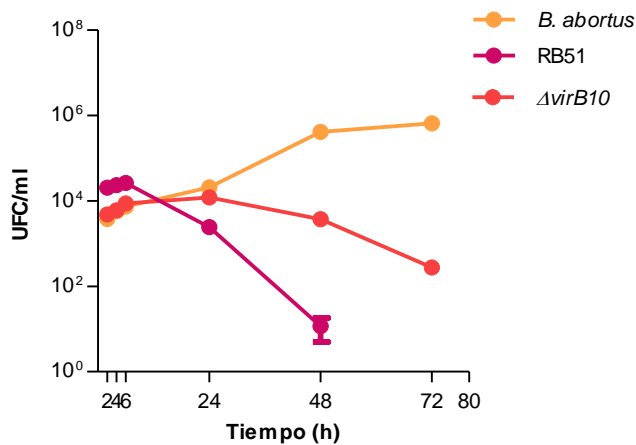


Figura 12: Las mutantes $\Delta virB10$ y RB51 de *B. abortus* no se multiplican intracelularmente en la línea de células estrelladas de hígado LX-2. Las células estrelladas fueron infectadas (MOI 100) con *B. abortus* WT (*B. abortus*) y con las mutantes $\Delta virB10$ y RB51 durante 2 hs, luego los cultivos fueron incubados en medio con antibióticos para eliminar las bacterias extracelulares y a 2, 4, 6, 24, 48 y 72 hs post-infección se determinaron las UFC.

A continuación nos preguntamos si la multiplicación intracelular de la bacteria era esencial para que *B. abortus* sea capaz de inducir un fenotipo fibrogénico. Para ello, infectamos a las células LX-2 con *B. abortus* WT y con las mutantes $\Delta virB10$ y RB51 y a las 24 hs post-infección recolectamos los sobrenadantes de cultivo para evaluar la actividad de MMP-9 por zimografía y la secreción de TGF- β 1 por ELISA, además cuantificamos la deposición de colágeno a los 7 días post-infección por tinción con rojo sirio.

La infección con *B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 mediante un mecanismo dependiente de la presencia de un SST4 funcional, dado que cuando infectamos a las células LX-2 con la mutante $\Delta virB10$ no observamos diferencias en la actividad de MMP-9 respecto de los controles sin infectar. Por otro lado, la mutante RB51 inhibió la producción de MMP-9 del mismo modo que *B. abortus* WT, esto indica que el fenómeno no depende de la multiplicación intracelular de la bacteria (**Figura 13A**). En concordancia a éstos resultados, la infección con *B. abortus* WT y la cepa rugosa RB51 indujeron un aumento significativo de los niveles de colágeno y de TGF- β 1 respecto de los controles sin infectar; sin embargo, la mutante $\Delta virB10$ no fue capaz de modificar los niveles basales de dichos factores (**Figura 13B y C**). Esto indica que la inducción de la deposición de colágeno y la secreción de TGF- β 1 también fueron moduladas por la presencia de un SST4 funcional y no por la multiplicación bacteriana.

También evaluamos la producción de citoquinas, quemoquinas y TIMP-1 por parte de las células LX-2 frente a la infección con las mutantes RB51 y $\Delta virB10$. Como se muestra en la **Figura 13**, las dos cepas mutantes fueron capaces de inducir la expresión de la citoquina IL-6, las quemoquinas IL-8 y MCP-1 y de TIMP-1. Sin embargo, las células infectadas con la mutante $\Delta virB10$ secretaron todos los factores evaluados en una concentración menor respecto de las infectadas con *B. abortus* WT. (**Figura 13D, E, F y G**). Estos resultados indican que si bien la secreción de TGF- β 1, la principal citoquina fibrogénica, es modulada por el SST4 de *B. abortus*, éste sistema no está implicado en la secreción de IL-6, y las quemoquinas IL-8 y MCP-1 (atractantes de neutrófilos y monocitos respectivamente).

En conjunto estos resultados demuestran que *B. abortus* utiliza su SST4 para inhibir la producción de MMP-9 e inducir la deposición de colágeno y la producción de TGF- β 1, generando así una respuesta fibrogénica.

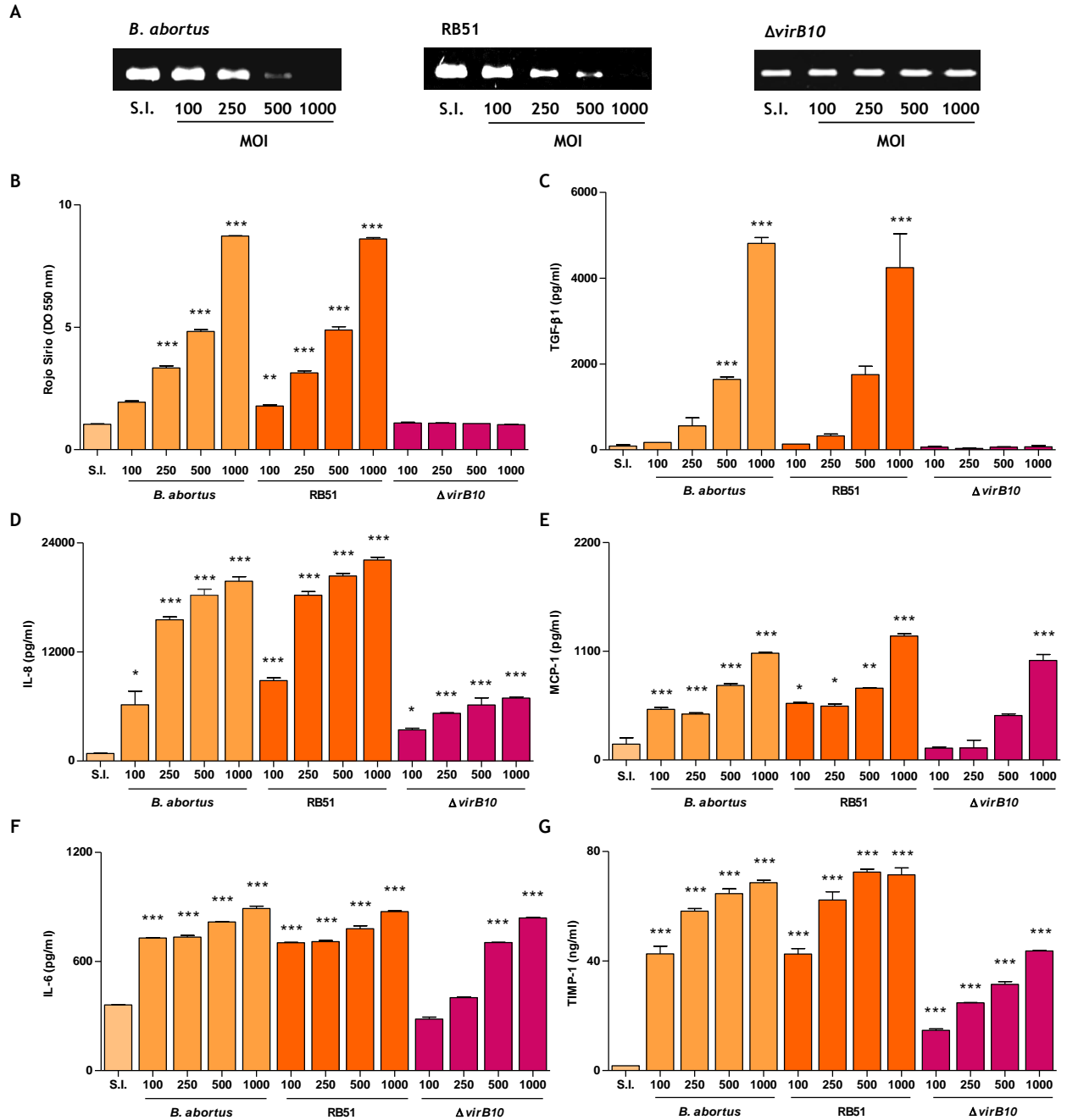


Figura 13: La infección con la mutante $\Delta virB10$ no induce una respuesta fibrogénica por parte de las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas a distintas MOI con *B. abortus* WT (*B. abortus*) y con las mutantes RB51 y $\Delta virB10$, a las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de MMP-9 por zimografía (A). Luego de 7 días, se cuantificó la deposición de colágeno mediante la tinción con Rojo Sirio y posterior lectura de la densidad óptica del colorante unido disuelto (DO) a 550 nm (B). La producción de TGF- β 1 (C), las quemoquinas IL-8 y MCP-1 (D y E), la citoquina IL-6 (F) y del inhibidor de metaloproteasas TIMP-1 (G) fue determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo obtenidos a las 24 hs post-infección. **p<0.01, ***p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

La proteína BPE005 secretada por el SST4 de *B. abortus* es responsable del fenotipo fibrogénico inducido frente a la infección en las células hepáticas estrelladas.

Recientemente han sido identificadas las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275, las cuales son translocadas por el SST4 en la célula hospedadora durante la infección con *B. abortus* [133]. Dado que el

SST4 tiene un papel fundamental en la inducción de la respuesta fibrogénica por parte de las células hepáticas estrelladas nos propusimos investigar la relevancia de los sustratos BPE005, BPE123 y BPE275 en dicho fenómeno. En un principio evaluamos si la multiplicación de *B. abortus* en las células LX-2 era dependiente de las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275. Para ello, las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT y las mutantes isogénicas *bpe005*, *bpe123* y *bpe275* y las UFC fueron determinadas a distintos tiempos post-infección. Como se muestra en la **Figura 14**, las 3 mutantes fueron capaces de infectar y multiplicarse intracelularmente en las células hepáticas estrelladas del mismo modo que la cepa WT, indicando que la multiplicación de la bacteria es independiente de la presencia de estas proteínas.

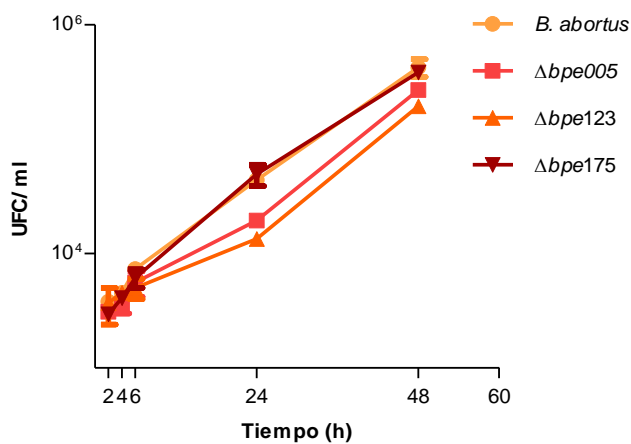


Figura 14: Las mutantes de *B. abortus* $\Delta bpe005$, $\Delta bpe123$ y $\Delta bpe275$ infectan y se multiplican intracelularmente en la línea de células estrelladas de hígado LX-2. Las células LX-2 fueron infectadas (MOI 100) con *B. abortus* WT (*B. abortus*) y sus mutantes $\Delta bpe005$, $\Delta bpe123$ y $\Delta bpe275$ durante 2 hs, luego los cultivos fueron incubados en medio con antibióticos para eliminar las bacterias extracelulares y a las 2, 4, 6, 24 y 48 hs post-infección se realizó el recuento de las UFCs.

A continuación, para establecer el potencial fibrogénico de las proteínas efectoras, infectamos a las células LX-2 con *B. abortus* WT y con sus mutantes isogénicas $\Delta bpe005$, $\Delta bpe123$ y $\Delta bpe275$ y analizamos la producción de MMP-9, la deposición de colágeno y la secreción de TGF- β . Las mutantes $\Delta bpe123$ y $\Delta bpe275$ inhibieron la producción de MMP-9 e indujeron la deposición de colágeno y la secreción de TGF- β 1 de igual forma que la bacteria WT. En contraste, cuando infectamos a las células hepáticas estrelladas con la mutante $\Delta bpe005$ observamos la misma respuesta que la generada por la mutante $\Delta virB10$ (**Figura 15**). Asimismo, corroborando estos resultados, al complementar a la mutante $\Delta bpe005$ con un plásmido de expresión BPE005 (simple o múltiple copia) se restaura el fenotipo, es decir, la bacteria complementada se comporta como *B. abortus* WT y es capaz de inducir una respuesta fibrogénica por parte de las células LX-2 (**Figura 16**). En conjunto estos resultados indican que la proteína BPE005 secretada por el SST4 de *B. abortus* está implicada en la inducción de la respuesta fibrogénica por parte de las células estrelladas. Sin embargo los efectores proteicos BPE123 y BPE275 no participan en éste fenómeno.

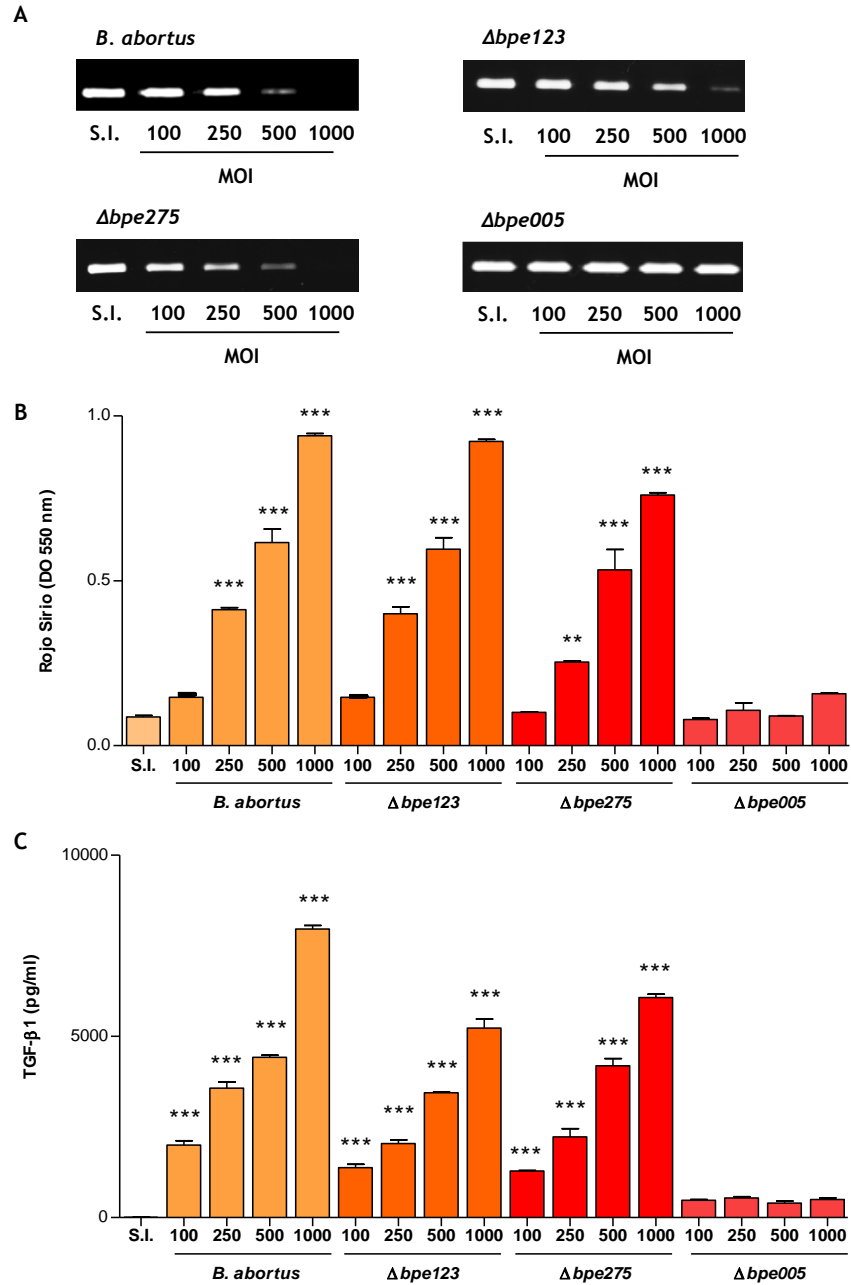


Figura 15: La infección con la mutante $\Delta bpe005$ no inhibe la producción de MMP-9, no induce la deposición de colágeno así como tampoco la secreción de TGF- β 1 en las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas a distintas MOI con *B. abortus* WT (*B. abortus*) y con las mutantes $\Delta bpe123$, $\Delta bpe275$ y $\Delta bpe005$, a las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de MMP-9 por zimografía (A). Luego de 7 días, los cultivos fueron teñidos con Rojo Sirio para evaluar la deposición de colágeno y se cuantificó a través de la disolución del colorante unido con posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (B). La secreción de TGF- β 1 fue analizada por ELISA en los sobrenadantes obtenidos a las 24 hs post-infección (C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

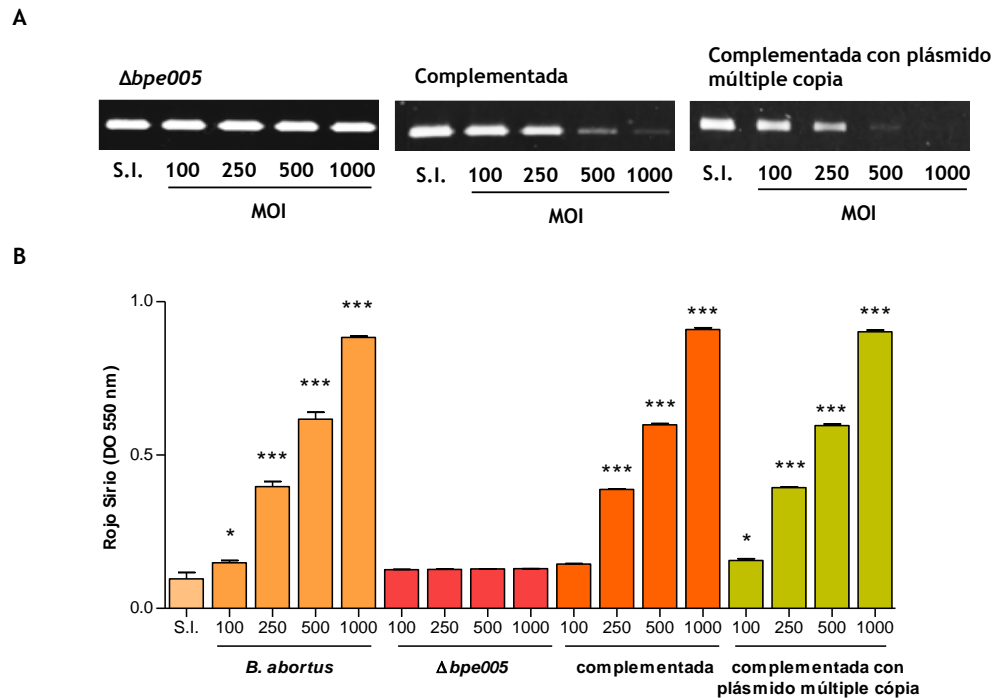


Figura 16: La mutante $\Delta bpe005$ complementada con el gen codificante para la proteína BPE005 inhibe la producción de MMP-9 e induce la deposición de colágeno por parte de las células LX-2. Las células estrelladas fueron infectadas a distintas MOI con *B. abortus* WT (*B. abortus*), la mutante $\Delta bpe005$ o con $\Delta bpe005$ complementada con el gen de simple o múltiple copia codificante para la proteína BPE005. Luego de 24 hs, se analizó por zimografía la producción de MMP-9 (A) y a los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (B). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

La expresión de la proteína BPE005 en las células hepáticas estrelladas simula la respuesta fibrogénica causada por la infección con *B. abortus*.

Posteriormente, con el objetivo de corroborar el papel de la proteína BPE005 en los fenómenos fibrogénicos observados, las células LX-2 fueron transfectadas con un plásmido de expresión eucariota codificante para la proteína BPE005 y luego se analizó la actividad de MMP-9, la secreción de TGF- β y la deposición de colágeno. Corroborando nuestros resultados previos, la expresión de BPE005 en las células LX-2 fue capaz de inhibir la producción de MMP-9 (Figura 17A), de inducir la deposición de colágeno (Figura 17B) y de aumentar la secreción de TGF- β (Figura 17C). Las células LX-2 fueron transfectadas con una eficiencia mayor al 70%, esto lo pusimos en evidencia utilizando un plásmido pcDNA3-c-myc a modo de control, las células que contenían el plásmido fueron reveladas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-c-myc (Figura 17D). Este plásmido control, no tuvo efecto en la modulación del fenotipo de las células LX-2.

Estos resultados demuestran que la expresión de BPE005 en las células estrelladas puede desencadenar una respuesta fibrogénica de manera similar a la infección con *B. abortus* WT.

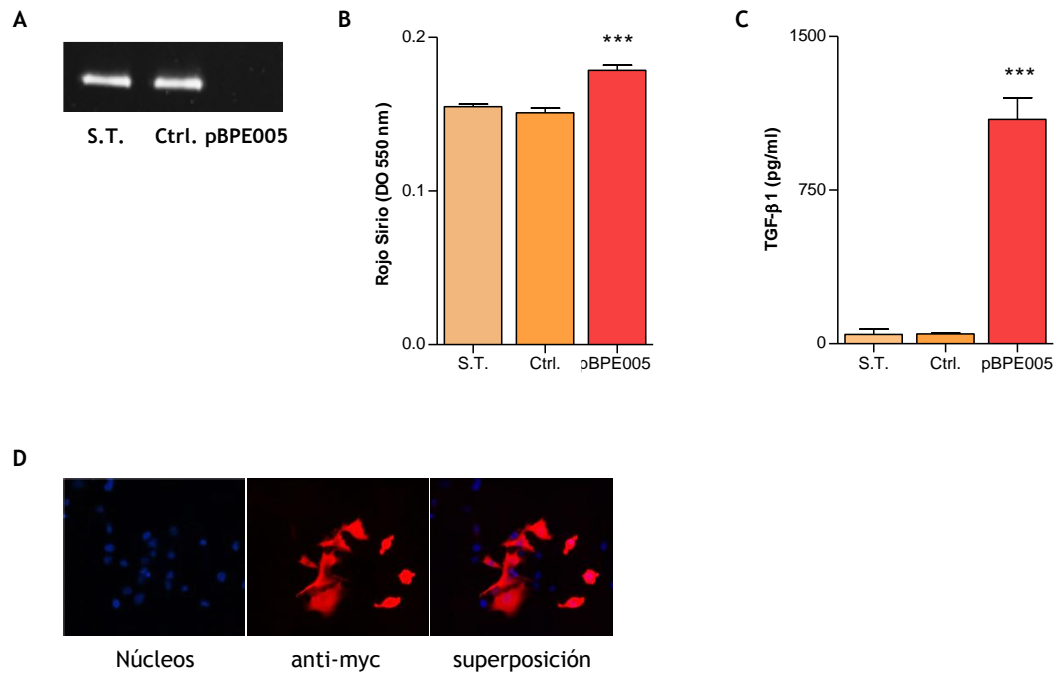


Figura 17: La proteína BPE005 inhibe la producción de MMP-9, induce la deposición de colágeno y la secreción de TGF-β1 en las células estrelladas. Las células LX-2 fueron transfectadas con el plásmido de expresión eucariota BPE005 (pBPE005) o con el plásmido pcDNA3-c-myc como control (Ctrl.). (A) La producción de MMP-9 fue evaluada por zimografía en los sobrenadantes obtenidos 48 hs luego de la transfección. (B) A los 5 días post-transfección se realizó la cuantificación de la deposición de colágeno por Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm. (C) Los niveles de TGF-β1 fueron cuantificados por ELISA en los sobrenadantes obtenidos 24 hs luego de la transfección. (D) Para evaluar la eficiencia de la transfección se realizó inmunofluorescencia mediante la marcación de c-myc con un anticuerpo específico (c-myc) y de los núcleos con DAPI (núcleo). *** $p < 0.001$ versus el control sin transfectar (S.T.).

El B2AMPc restaura la capacidad de las células LX-2 transfectadas con *bpe005* para producir MMP-9 y no secretar TGF-B.

La proteína BPE005 contiene un dominio de unión a nucleótidos monofosfato cíclicos y aunque su función es desconocida, su estructura sugiere que podría estar implicada en la vía de señalización del AMPc en la célula hospedadora [133]. En estudios previos se ha demostrado que la vía de AMPc/PKA participa en la regulación de MMP-9, TGF-β y en la secreción de colágeno [357, 358]. Es por esto que decidimos investigar si la proteína BPE005 era capaz de interferir con ésta vía de señalización, alterando la disponibilidad del AMPc, y de esta forma modular la respuesta de las células LX-2. De acuerdo a nuestra hipótesis, la adición de AMPc exógeno debería revertir el efecto inducido por BPE005. Para evaluar esto, las células estrelladas fueron transfectadas con el plásmido de expresión eucariota codificante para BPE005 en presencia o ausencia de B2AMPc un análogo del AMPc capaz de ingresar a las células, y luego se analizó la respuesta fibrogénica. El tratamiento con B2AMPc logró revertir la inhibición de MMP-9 (Figura 18A) y la secreción de TGF-β (Figura 18B) inducida por la expresión de BPE005 en las células LX-2. El plásmido control (pcDNA3-c-myc) no tuvo efecto.

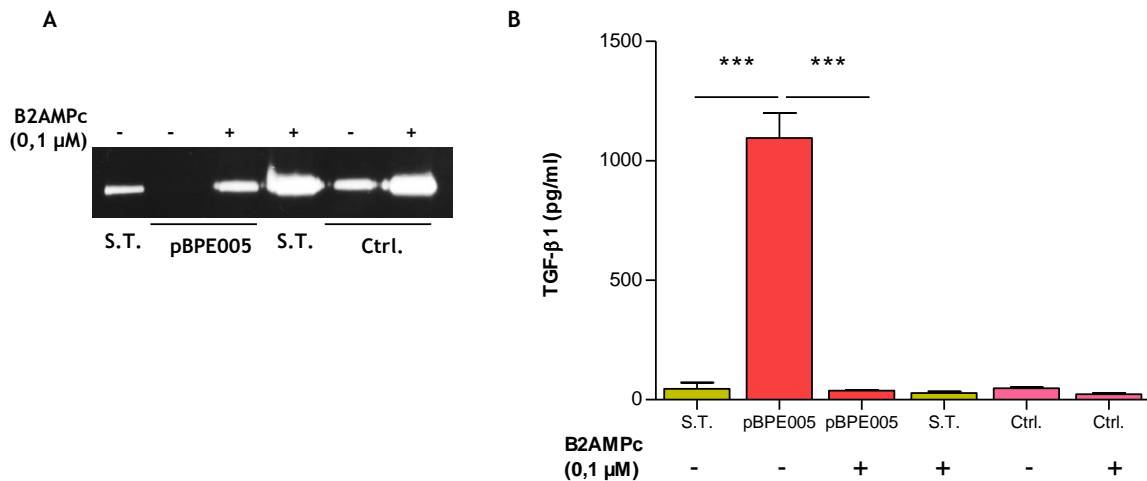


Figura 18: El B2AMPc revierte la inhibición de MMP-9 y la secreción de TGF-β1 en las células estrelladas transfectadas con el plásmido BPE005. Las células LX-2 fueron transfectadas con el plásmido de expresión eucariota BPE005 (pBPE005) o con el plásmido pcDNA3-c-myc como control (Ctrl.) en presencia o no de B2AMPc, a las 24 hs post-transfección se evaluó la secreción de MMP-9 por zimografía (A) y la secreción de TGF-β1 por ELISA (B). ***p<0.001 versus el control no transfectado sin tratar (S.T./-) o versus el control transfectado con tratamiento (pBPE005/+).

A continuación nos planteamos confirmar nuestros resultados en el contexto de la infección con *B. abortus*. Para esto, las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT o con la mutante $\Delta bpe005$ en presencia de distintas concentraciones de B2AMPc. Como se muestra en la Figura 19A, B y C, el tratamiento con B2AMPc revirtió el efecto inhibitorio de *B. abortus* WT sobre la producción de MMP-9 de forma dependiente a la dosis empleada. Por otro lado, el tratamiento con B2AMPc de las células infectadas con la mutante $\Delta bpe005$ no modificó la actividad de MMP-9 con respecto a las células tratadas sin infectar. Además, para descartar un posible efecto del B2AMPc sobre la viabilidad y la multiplicación de las bacterias intracelulares, realizamos el recuento de UFC a partir de los lisados de los cultivos de LX-2 infectados y tratados o no con B2AMPc. No detectamos diferencias significativas en el recuento de las UFC entre los cultivos tratados y los controles sin tratar (Figura 19D). En conjunto éstos resultados demuestran que el AMPc está involucrado en el mecanismo por el cual *B. abortus* modula la respuesta fibrogénica de las células LX-2.

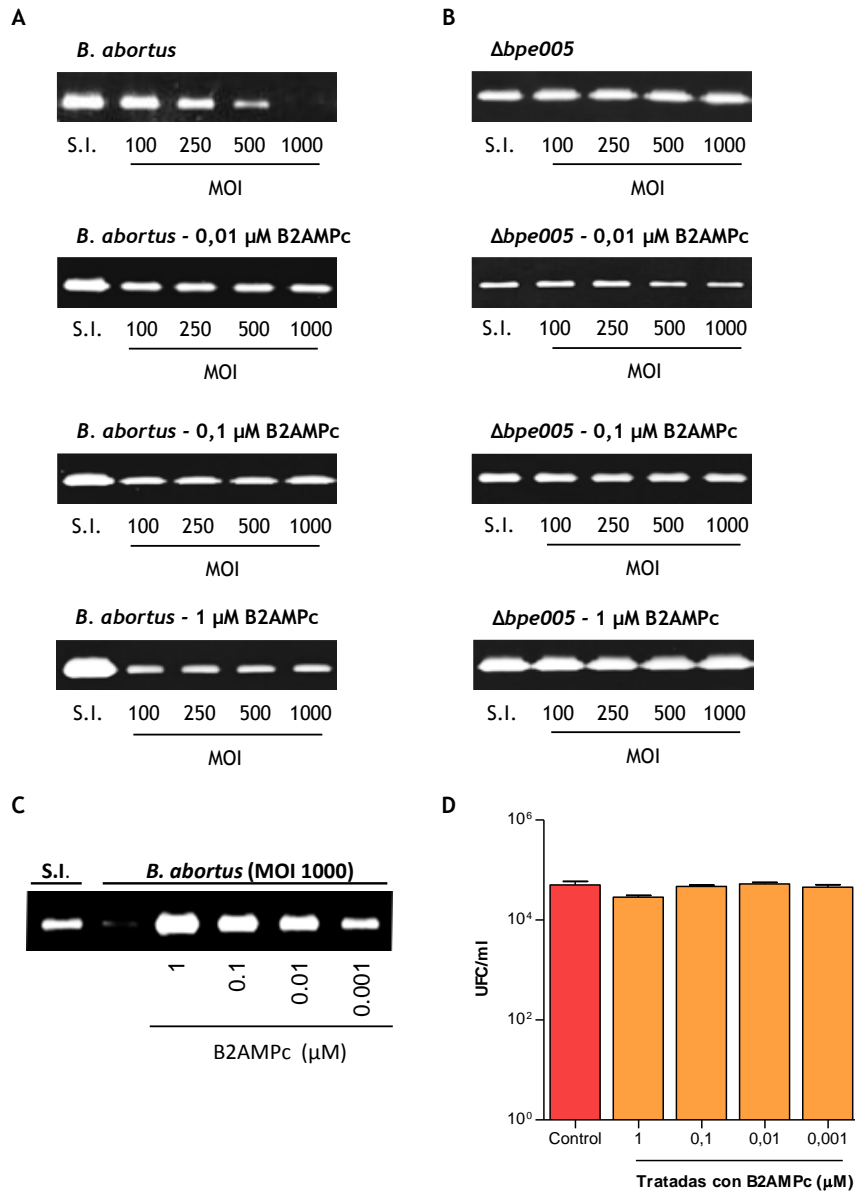


Figura 19: B2AMPc revierte la inhibición de MMP-9 en las células estrelladas infectadas con *B. abortus*. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*) (A) o la mutante $\Delta bpe005$ (B) en presencia o no de B2AMPc a distintas concentraciones (1 μ M, 0,1 μ M o 0,01 μ M) y a las 24 hs se realizó zimografía para determinar la producción de MMP-9 en los sobrenadantes de cultivo. Las células estrelladas fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 1000 en presencia o no de B2AMPc (1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M o 0,001 μ M), después de 24 hs se obtuvieron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de MMP-9 por zimografía (C). Para determinar si el B2AMPc afecta la viabilidad bacteriana, los cultivos tratados o no fueron lisados y se realizó el recuento de las UFC (D).

La vía de señalización de PKA está implicada en la respuesta fibrogénica de las células LX-2 frente a la infección con *B. abortus*.

La acción del AMPc en las células eucariotas ocurre principalmente a través de la activación de PKA y ésta proteína quinasa modula la expresión y función de diferentes blancos proteicos [359, 360]. En consecuencia, llevamos a cabo experimentos para determinar si PKA estaba involucrada en el desarrollo del perfil fibrogénico de las células estrelladas en respuesta a la infección con *B. abortus*. Con este objetivo, las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT o la mutante $\Delta bpe005$ en presencia o no

de KT5720 (inhibidor de PKA) y se analizó la producción de MMP-9 y de TGF- β . Nuestros resultados demostraron que al inhibir PKA, la inhibición de la secreción de MMP-9 provocada por *B. abortus* fue aún más pronunciada (Figura 20A). Por otro lado, el tratamiento con KT5720 indujo la inhibición de la secreción de MMP-9 en las células LX-2 infectadas con la mutante $\Delta bpe005$. En concordancia a éstos resultados, KT5720 indujo la secreción de TGF- β tanto en las células LX-2 infectadas con *B. abortus* como en las infectadas con la mutante $\Delta bpe005$ (Figura 20B). A continuación, para corroborar éstos resultados, las células estrelladas fueron infectadas con *B. abortus* WT o la mutante $\Delta bpe005$, y luego transfectadas con el plásmido pRSV-PKI (un vector de expresión eucariota del inhibidor competitivo de PKA [361]) o con el plásmido control pcDNA3-c-myc. De la misma forma que KT5720, la transfección con PKI indujo la inhibición de la actividad de MMP-9 en las células LX-2 infectadas con $\Delta bpe005$. Asimismo, PKI aumentó la inhibición de MMP-9 en las células LX-2 infectadas con *B. abortus* (Figura 20C). En conclusión, éstos resultados demuestran que la vía de señalización celular AMPc/PKA está implicada en la modulación de la respuesta de las células estrelladas de hígado frente a la infección con *B. abortus*.

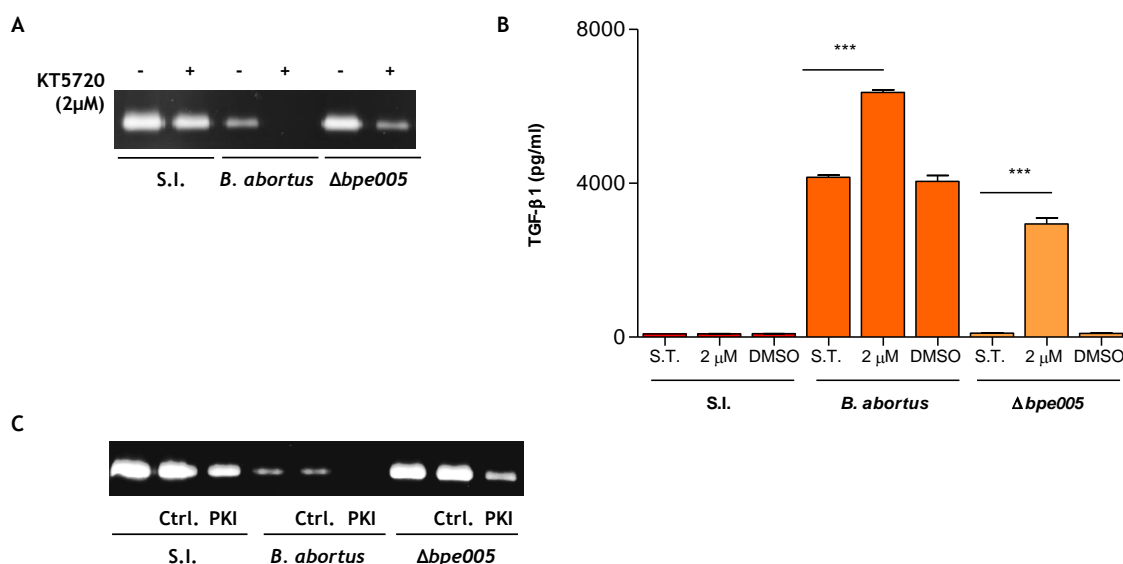


Figura 20: PKA está implicada en la modulación de las células LX-2 durante la infección con *B. abortus*. Las células estrelladas fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*) o su mutante isogénica $\Delta bpe005$ en presencia o no de KT5720 2 μ M (inhibidor de PKA) y 24 hs post-infección, se determinó la producción de MMP-9 por zimografía (A) y de TGF- β 1 por ELISA en los sobrenadantes de cultivo (B). Las células LX-2 infectadas con *B. abortus* o sin infectar fueron transfectadas con el plásmido pRSV-PKI (PKI) o con el plásmido control pcDNA3-c-myc (ctrl.), luego de 24 hs se determinó la producción de MMP-9 por zimografía en los sobrenadantes de cultivo (C). ***p<0.001 versus el control sin tratar (S.T.).

La infección con *B. abortus* $\Delta bpe005$ induce un menor nivel de fibrosis que el inducido por *B. abortus* WT en el hígado de ratones.

Con el objetivo de evaluar la relevancia *in vivo* de nuestros resultados, infectamos ratones BALB/c con *B. abortus* WT o con la mutante $\Delta bpe005$ por vía intraperitoneal. A las 4 y 12 semanas post-infección los animales fueron sacrificados y los hígados fueron extraídos para el análisis histopatológico, para determinar las UFC, y cuantificar la producción de colágeno y TGF- β a partir de los extractos del órgano.

La tinción de los cortes histológicos con tricrómico de Masson (colágeno teñido de azul) nos permitió poner en evidencia que el hígado de los ratones infectados con la mutante *Δbpe005* presentaron un porcentaje significativamente menor de tejido con deposición de colágeno respecto de aquellos infectados con *B. abortus* WT (Figura 21A y B). En concordancia, los niveles de colágeno cuantificados por tinción con Rojo Sirio y la concentración de TGF-β evaluada por ELISA fueron significativamente menores en los extractos de hígado de los ratones infectados con la mutante *Δbpe005* respecto de los ratones infectados con *B. abortus* WT (Figura 21C y D). La diferencia en los niveles de fibrosis no fue debida a una multiplicación reducida de la mutante *Δbpe005* ya que, como se muestra en la Figura 21E, los niveles de UFC recuperados a las 4 semanas post-infección fueron similares entre los ratones infectados con *B. abortus* WT y aquellos infectados con la mutante *Δbpe005*. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la proteína BPE005 translocada por el SST4 de *B. abortus* tiene un papel fundamental durante la infección con *B. abortus*, en particular, demostramos que BPE005 está implicada en la fibrosis hepática desencadenada por la infección con *B. abortus*.

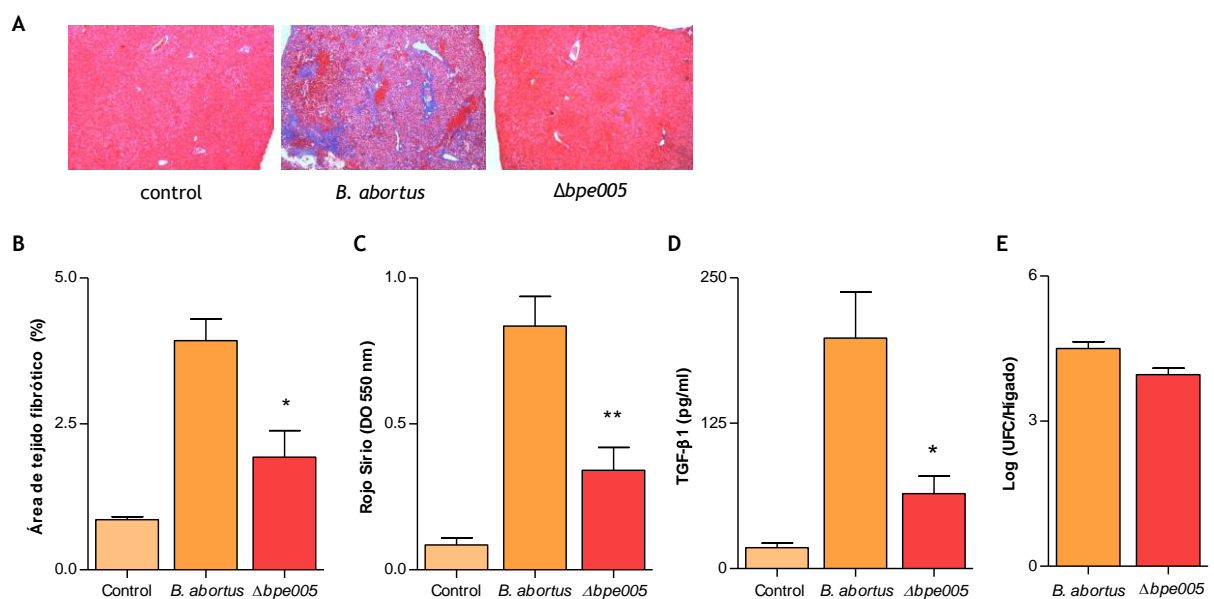


Figura 21: La mutante *Δbpe005* induce un menor nivel de fibrosis que *B. abortus* en hígado. (A) Fotografías representativas de las tinciones con Tricrómico de Masson de secciones de tejido hepático de ratones infectados con *B. abortus* WT (*B. abortus*) o la mutante *Δbpe005* o controles sin infectar. (B) Las áreas de tejido con depósito de colágeno fueron cuantificadas con el Software Image pro-plus 6.0, los niveles de colágeno fueron determinados por tinción con Rojo Sirio (C) y la secreción de TGF-β1 fue medida por ELISA (D) en extractos de hígados obtenidos 4 semanas post-infección. (E) Se realizó el recuento de UFCs en hígado de ratones infectados con *B. abortus* o la mutante *Δbpe005* a las 4 semanas post-infección. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus infectados con *B. abortus*.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo describimos los mecanismos moleculares y los componentes que utiliza *B. abortus* para inducir la adquisición de un fenotipo fibrogénico por parte de las células hepáticas estrelladas. Éstas últimas son las principales células involucradas en el desarrollo de fibrosis hepática [236, 242, 243].

Como mencionamos, el hígado está afectado frecuentemente en los pacientes con brucelosis activa. En el hígado de los pacientes, se han observado diferentes patrones histológicos, los más comunes son, formación de granuloma con infiltrado inflamatorio y necrosis del parénquima [283-285, 288]. La persistencia de un estímulo infeccioso, puede inducir fibrosis hepática debido a que su presencia podría inducir alteraciones en una gran variedad de células inmunes y estructurales, dando lugar a un fenotipo patológico caracterizado por la deposición de matriz extracelular [310].

Durante las infecciones bacterianas, la fibrosis podría contribuir a la persistencia de las bacterias debido a que reduce la penetración de los antibióticos, disminuye el ingreso de mediadores inmunes en el foco infeccioso y favorece la formación de los granulomas [362, 363]. La estructura compacta de los granulomas previene exitosamente la diseminación de los microorganismos, sin embargo también podrían constituir un reservorio de bacterias viables. Por otro lado, considerando que las MMPs tienen una función activa en las enfermedades infecciosas al orquestar el reclutamiento de células de la inmunidad innata y al regular sus funciones efectoras [364], la inhibición de MMP-9 causada por *B. abortus* en las células estrelladas podría contribuir entonces a disminuir parcialmente la respuesta inmune favoreciendo la cronicidad de la infección.

En éste capítulo demostramos que la capacidad de *B. abortus* de activar a las células hepáticas estrelladas es dependiente de la presencia de un SST4 y de su proteína secretada BPE005. Las bacterias utilizan el SST4 para el intercambio genético y para inyectar moléculas efectoras en las células eucariotas blanco. En *Brucella* este sistema es un factor de virulencia clave para la multiplicación intracelular de la bacteria [90]. Recientemente se ha demostrado que las bacterias del género *Brucella* son capaces de modular las vías secretorias de la célula hospedadora mediante múltiples efectores del SST4 [134], nosotros demostramos que BPE005 inhibe la secreción de MMP-9 y modula la expresión de TGF- β y la deposición de colágeno. Estos resultados sugieren que BPE005 podría tener un rol específico en la modulación de estas moléculas; sin embargo, no evaluamos otros mecanismos moleculares que podrían estar implicados como, por ejemplo, alteraciones en la expresión génica.

Como fue demostrado por otros autores, *Brucella* puede usar el SST4 para translocar proteínas efectoras en el citosol del hospedador o incluso ácidos nucleicos para activar el inflamasoma [122]. La activación del inflamasoma NLRP3 en hepatocitos y células del hígado no parenquimatosas resulta en la inducción de señales proinflamatorias y en la muerte por piroptosis de los hepatocitos [365]. En consecuencia, el SST4 de *Brucella* podría estar implicado en la modulación de la respuesta inmune en el hígado a través de la activación del inflamasoma con la concomitante inducción de fibrosis para reparar

el daño tisular. Esta respuesta podría contribuir a la supervivencia de la bacteria por una alterada respuesta inflamatoria que podría provocar una disminuida eliminación de la bacteria y el establecimiento de la enfermedad crónica.

Como fue previamente demostrado en otros tipos celulares [366-368], la modulación de la deposición de colágeno y la secreción de MMPs en las células estrelladas implica la vía de señalización del AMPc/PKA. El AMPc es un segundo mensajero de gran relevancia para varias hormonas y neuropéptidos, algunos de los cuales modulan la composición de la MEC [366-368]. La acción del AMPc en células eucariotas es mediada principalmente por PKA, siendo ésta proteína la que media los cambios en la expresión y función de las proteínas [359, 360]. Recientemente, se ha postulado que la vía AMPc/PKA podría estar involucrada en la proliferación y en la activación de células estrelladas de rata [369-372]. El AMPc inhibe la síntesis de colágeno inducida por TGF- β en fibroblastos y de hecho, algunos estudios han revelado que el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, con inhibidores de fosfodiesterasa como pentoxifilina, inhibe el crecimiento de los fibroblastos y la deposición de colágeno inducida por suero o citoquinas [373-375]. En concordancia, ha sido demostrado que, los agentes capaces de elevar la concentración de AMPc podrían ser utilizados como potenciales terapias antifibrogénicas por un mecanismo dependiente de TGF- β [376]. La habilidad de TGF- β de estimular la producción de MEC por fibroblastos está ampliamente descrita [377, 378].

En este trabajo, demostramos que el SST4 y el efector BPE005 tienen un papel fundamental en la modulación de la fibrosis al realizar experimentos con la mutante *bpe005* y con células transfectadas con plásmidos codificantes para la proteína BPE005. La proteína BPE005 contiene un dominio de unión a nucleótido monofosfato cíclico; aunque se desconoce su función, su estructura sugiere que podría estar implicado en la vía de señalización del AMPc en la célula hospedadora impidiendo la interacción entre AMPc y PKA. En concordancia, la respuesta fue dependiente de la presencia de AMPc ya que el tratamiento con B2AMPc revirtió el efecto inhibitorio de *B. abortus* sobre la producción de MMP-9 de forma dependiente a la dosis empleada. Al mismo tiempo al tratar a las células estrelladas con el inhibidor de PKA, KT5720 o al transfectarlas con el plásmido pRSV-PKI se puso en evidencia la participación de PKA debido a que al bloquearla, la inhibición de MMP-9 provocada por *B. abortus* fue aún más pronunciada

Los resultados histológicos corroboraron la función de BPE005 en la modulación del fenotipo fibrótico durante la infección con *B. abortus*, confirmando la relevancia de los hallazgos *in vitro*. En conjunto estos resultados indican que *B. abortus* desencadena una respuesta fibrogénica por parte de las células hepáticas estrelladas caracterizada por la inhibición de MMP-9, la concomitante producción de colágeno y la secreción de TGF- β por una vía dependiente del SST4 y de su proteína efectora BPE005 por un mecanismo que involucra a AMPc y PKA.

En resumen, estos resultados indican que la infección por *B. abortus* de las LX-2 induce un fenotipo fibrótico caracterizado por la inhibición de la secreción de MMP-9, la deposición de colágeno y la secreción de TGF- β mediante un mecanismo que involucra el SST4 y su proteína secretada BPE005 a través de un mecanismo que involucra la vía de señalización AMPc/PKA. .

Capítulo III:

“*B. abortus* induce una respuesta fibrogénica por parte de las células estrelladas a través de la activación de la vía autofágica”

INTRODUCCIÓN

La autofagia es un proceso catabólico esencial para mantener la homeostasis celular que está conservado evolutivamente en las células eucariotas. La vía autofágica tiene un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación, supervivencia y en la homeostasis celular y es crítica en la respuesta al estrés provocado por la privación de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia, altas temperaturas y las infecciones por patógenos [248, 379-381]. Asimismo está involucrada en la remoción de organelas y proteínas innecesarias o dañadas para mantener la homeostasis intracelular [382, 383]. El material citoplasmático es capturado en una estructura vesicular de doble membrana (autofagosoma) que posteriormente sufre un proceso de maduración al fusionarse con los lisosomas (autofagolisosomas) y tanto la membrana interna como el contenido luminal de las vesículas es degradado por las enzimas hidrolíticas lisosomales [379, 384-388].

La autofagia es un mecanismo dinámico que puede dividirse en diferentes etapas secuenciales: selección y reconocimiento del material a ser degradado, formación del autofagosoma, fusión con lisosomas, degradación del contenido y liberación de las macromoléculas originadas [383]; se encuentra altamente regulado por una familia de proteínas denominadas Atg (de sus siglas en inglés *autophagy-related*), las cuales están organizadas funcionalmente en complejos macromoleculares y participan en las distintas etapas del proceso [382, 383, 389].

En condiciones fisiológicas hay un nivel basal de autofagia, por lo tanto es necesario un mecanismo eficiente para inducir su activación frente a condiciones de estrés celular [384]. El principal modulador de la vía es la serina/treonina proteína quinasa TOR que regula negativamente al complejo de iniciación conformado por ULKs-Atg13-FIP200 [383, 390]. Con respecto al material a ser degradado, la autofagia puede clasificarse en no selectiva, cuando los componentes citoplasmáticos son secuestrados por el autofagosoma de forma inespecífica, y en autofagia selectiva, que consiste en la degradación de sustratos específicos como organelas, gotas lipídicas y proteínas ubiquitinadas [383, 384, 391]. En este último caso, p62 tiene un papel fundamental ya que se une a proteínas poli o mono ubiquitinadas mediante su dominio de asociación a ubiquitina y por otro lado interactúa con LC3; por lo tanto, p62 es constitutivamente degradada y vincula los blancos proteicos ubiquitinados con la autofagia para su degradación [392-395].

La formación del autofagosoma comienza con la membrana de aislamiento o fagóforo que se origina principalmente del RE, es la fase más compleja del proceso y requiere el reclutamiento de múltiples proteínas Atg y una precisa coordinación entre ellas [383, 396]. La nucleación de la membrana de aislamiento inicial está llevada a cabo por el complejo de fosfatidilinositol-3 quinasa de clase III (PI3K) compuesto por la PI3K Vps15, Atg14 y Beclin-1 [397-399]. Éste complejo genera fosfatidilinositol-3-fosfato, el cual promueve la nucleación del autofagosoma y en conjunto con otras proteínas Atg que son atraídas al autofagosoma en formación, reclutan a dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina [390, 400, 401]. Uno de ellos es el de Atg12-Atg5-Atg16 y consiste en la conjugación covalente de Atg12 y Atg5 mediante la actividad de Atg7 y Atg10 que actúan como enzimas E1 y E2 respectivamente; luego Atg12-Atg5 interactúa con Atg16 y se acoplan a la membrana del autofagosoma en formación [402, 403]. El

segundo sistema implica la conjugación de fosfatidiletanolamida a LC3 por la acción consecutiva de la proteasa Atg4, de la enzima de tipo E1 Atg7 y la de tipo E2 Atg3. La conjugación lipídica conlleva a la conversión de LC3 soluble (LC3 I) a la forma asociada a la membrana del autofagosoma (LC3 II). LC3 II es ampliamente utilizado como marcador de autofagia porque su lipidación y reclutamiento específico a la membrana de los autofagosomas provee un cambio en su distribución e incrementa su movilidad electroforética respecto de LC3 I [402, 404].

Además de las funciones fisiológicas, la autofagia está implicada en la fisiopatología de numerosas enfermedades en el hombre incluyendo la fibrosis hepática [379, 380, 405, 406]. En estudios recientes ha sido demostrado que la autofagia promueve la fibrogénesis hepática ya que tiene un papel preponderante en la activación de las células estrelladas de hígado induciendo la síntesis de colágeno tipo I [250, 251, 405, 407].

El flujo autofágico se encuentra incrementado durante la activación de las células estrelladas en cultivos primarios murinos ya que al bloquear la vía con bafilomicina A1, cloroquina o 3-metiladenina la proliferación, la expresión génica de α -SMA, colágeno de tipo I y PDGFr-B es inhibida, indicando la inhibición de la activación [251-253]. Por otro lado, los resultados obtenidos por Hernández-Gea y colaboradores pusieron en evidencia, mediante el uso de inhibidores farmacológicos o utilizando ratones knockdown Atg5 y Atg7, que no solo está reducida la fibrosis hepática sino que además se incrementa el contenido lipídico en las células estrelladas [249, 250]. Por lo tanto, la activación de la autofagia proveería de la energía necesaria para la iniciación y perpetuación de las células hepáticas estrelladas activadas y fibrogénicas a través de la degradación de las gotas lipídicas (lipofagia) [249].

Considerando que, como se ha descrito en los capítulos previos, la infección con *B. abortus* induce la activación de las células hepáticas estrelladas con la concomitante respuesta fibrogénica nos propusimos determinar si la adquisición del fenotipo fibrótico por parte de las células LX-2 infectadas involucra la activación de la vía autofágica. Para alcanzar este objetivo investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* en la expresión de 3 marcadores de autofagia: Beclin-1, LC3 I/LC3 II y P62; además decidimos evaluar la relación entre la vía autofágica y la respuesta fibrogénica de las células hepáticas estrelladas utilizando dos inhibidores de la vía (bafilomicina A1 y cloroquina) y analizando la producción de MMP-9, deposición de colágeno y secreción de TGF- β por parte de las células LX-2 en el contexto de la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de bacterias

Los cultivos de *B. abortus* WT, sus mutantes isogénicas $\Delta virB10$ y $\Delta bpe005$ se realizaron como ha sido descrito previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Cultivo celular

Las células estrelladas LX-2 fueron cultivadas como ha sido descrito previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Infección celular

Las células LX-2 fueron cultivadas durante 24 hs en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en medio completo sin antibióticos y fueron infectadas con *B. abortus* o sus mutantes isogénicas $\Delta virB10$ o $\Delta bpe005$ a diferentes MOI: 100, 250, 500 y 1000 como ha sido descrito previamente en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Western blotting

Las células LX-2 (6×10^5 células) fueron infectadas con *B. abortus*, $\Delta virB10$ o $\Delta bpe005$ a MOI 100 y 1000. A las 24 o 48 hs 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, 0,2% de azida y una combinación de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. La concentración proteica fue determinada utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA, Thermo Scientific Pierce). Cantidades iguales de proteína (30 μg) de cada tratamiento fueron resueltas en un gel SDS-PAGE. 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 al 5% de leche en TBS 0,05 % de tween 20 durante 18 hs a 4°C.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-LC3B (sc-28266, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-Beclin-1 (sc-10086, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-P62 (clon 864807, R&D systems) o anticuerpo anti-B actina (clon C4, Santa Cruz Biotechnology) durante 18 hs a 4°C. Se lavó la membrana 3 veces con una solución 0,05% de tween 20 en buffer Tris salino (TBS, de sus siglas en inglés *Tris-Buffered Saline*) y se la incubó por 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG especie específico conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Luego, la inmunoreactividad fue detectada por quimioluminiscencia 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 (National Institutes of Health).

Análisis de la expresión de LC3 y Beclin-1

La expresión de LC3 y BECN-1 se realizó por Western blotting, como se describió previamente, y por inmunofluorescencia. Para realizar la inmunofluorescencia, las células estrelladas fueron sembradas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 24 pocillos. Los cultivos de LX-2 infectados fueron fijados con 4% de PFA en PBS por 10 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con PBS y permeabilizados con 0,3% de tritón X-100 durante 10 min. Luego se realizó el bloqueo con una solución al 1% de BSA por 1 h. Las células fueron incubadas durante 18 hs a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-LC3B (sc-28266, Santa Cruz Biotechnology) o con un anticuerpo anti-Beclin-1 (sc-10086, Santa Cruz Biotechnology) diluidos en PBS-tween 20 0,1%. Posteriormente las células fueron incubadas por 4 hs a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) o anti-cabra Alexa Fluor 488 (molecular probes, Life Technologies). La tinción de los núcleos se realizó con DAPI por 30 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron montados en PBS-glicerina [9:1 (vol/vol)] y fueron analizados en un microscopio de fluorescencia. El recuento de células positivas para la proteína de interés se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health).

Inhibición de la autofagia

Para evaluar el papel de la autofagia en la respuesta fibrogénica, las células LX-2 (5×10^4 células/pocillo) fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 en presencia o no de los inhibidores bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich) o cloroquina (Sigma-Aldrich); ambos actúan inhibiendo la maduración de los autofagosomas a autolisosomas [404, 408]. La bafilomicina A1 fue empleada a una concentración de 200 nM y la cloroquina a 50 μM en un volumen final de 0,5 ml. Luego de 24 hs, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para analizar la producción de MMPs por zimografía, la secreción de TGF- β 1 por ELISA y deposición de colágeno mediante tinción con rojo sirio siguiendo la metodología ya descrita en la sección de materiales y métodos del capítulo I.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Tukey, usando el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos están presentados como la media \pm error estándar (SEM).

RESULTADOS

La autofagia es una vía de catabolismo celular inducida en respuesta al estrés y es esencial para mantener la homeostasis celular [405]. Está implicada en la fibrosis hepática ya que tiene un papel preponderante en la activación de las células estrelladas de hígado [250, 251, 405, 407].

Teniendo en cuenta que la infección con *B. abortus* induce la activación de las células hepáticas estrelladas con la concomitante respuesta fibrogénica nos planteamos evaluar si la adquisición del fenotipo fibrótico por parte de las células LX-2 infectadas involucra la activación de la vía autofágica. Para alcanzar este objetivo investigamos el efecto de la infección con *B. abortus* en la expresión de 3 marcadores de autofagia: Beclin-1, LC3 I/LC3 II y P62 por Western blotting; además decidimos evaluar la relación entre la vía autofágica y la respuesta fibrogénica de las células hepáticas estrelladas utilizando dos inhibidores de la vía (bafilomicina A1 y cloroquina) y analizando la producción de MMP-9, deposición de colágeno y secreción de TGF- β por parte de las células LX-2 en el contexto de la infección.

La infección con *B. abortus* induce la expresión de LC3 II y Beclin-1 en las células LX-2.

La autofagia está implicada en la activación de las células estrelladas de hígado [249-251] y, como ha sido descrito en los capítulos I y II, la infección con *B. abortus* induce la activación de las células LX-2 hacia un fenotipo fibrogénico, es por esto que decidimos evaluar si la bacteria además es capaz de activar la vía autofágica. Para alcanzar este objetivo, analizamos la expresión de LC3 II (forma lipidada de LC3 I), cuyo nivel se correlaciona al número de autofagosomas por estar asociado específicamente a su membrana y no a otras estructuras vesiculares [409, 410]; también analizamos la presencia de Beclin-1, proteína clave en el ensamblaje del autofagosoma [397], y p62 que se une a las proteínas poliubiquitinadas que van a ser degradadas por esta vía [411, 412].

Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. Luego de 24 hs, se obtuvieron extractos celulares totales y se realizó Western blotting para analizar la expresión de LC3 II (16 kDa), Beclin-1 (60 kDa) y p62 (62 kDa). Como se muestra en la **Figura 22**, la infección con la bacteria indujo la expresión de LC3 II (**Figura 22A y B**) y de Beclin-1 (**Figura 22A y C**), además las células infectadas presentaron niveles más bajos de p62 respecto de los controles sin infectar (**Figura 22A y D**). Estos resultados indican que *B. abortus* activa la vía autofágica en las células hepáticas estrelladas LX-2.

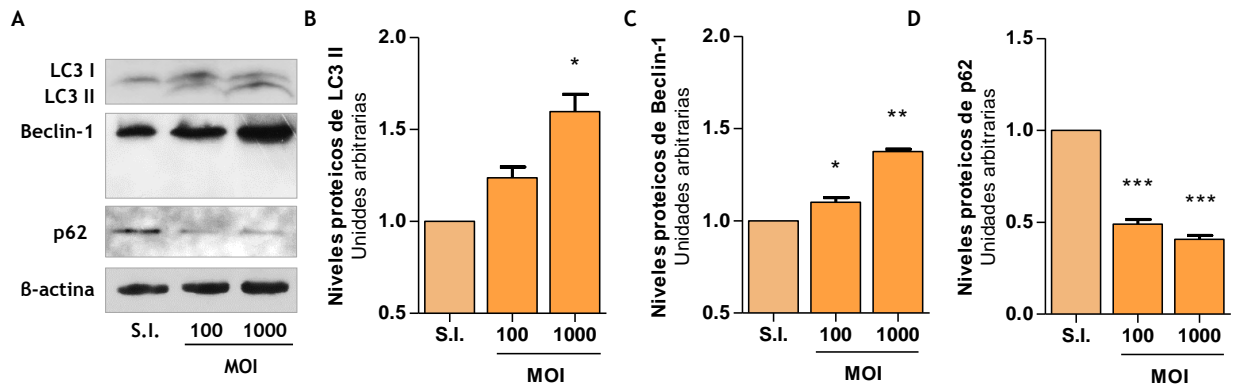


Figura 22: La infección con *B. abortus* induce autofagia en las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 con *B. abortus*, a las 24 hs post-infección se obtuvieron extractos celulares totales y se evaluó la expresión de LC3 II (16 kDa), Beclin-1 (60 kDa) y p62 (62 kDa) por Western blotting, como control de carga se utilizó B-actina (A). Análisis densitométrico de los niveles proteicos de LC3 II (B), Beclin-1 (C) y p62 (D) de 2 experimentos independientes mediante el software ImageJ.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

La respuesta fibrogénica de las células LX-2 inducida por *B. abortus* es dependiente de la activación de la vía autofágica.

Considerando que la autofagia está implicada en la fisiopatología de la fibrosis hepática [249, 251] y que nuestros resultados demostraron que *B. abortus* induce una respuesta fibrogénica por parte de las células hepáticas estrelladas, mediante la inhibición de MMP-9 y la inducción de la producción de colágeno por un mecanismo dependiente de TGF- β 1, decidimos evaluar si esta respuesta requiere la activación de la vía autofágica. Para ello, las células LX-2 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 en presencia o no de bafilomicina A1 o cloroquina, dos compuestos que inhiben la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas, y a las 24 hs post-infección recolectamos los sobrenadantes de cultivo para evaluar la actividad de MMP-9 por zimografía y la secreción de TGF- β 1 por ELISA, además cuantificamos la deposición de colágeno a los 7 días post-infección por tinción con Rojo Sirio de las monocapas celulares.

En presencia de bafilomicina A1 o de cloroquina la infección con *B. abortus* no es capaz de inhibir la producción de MMP-9 (Figura 23A) ni de inducir la deposición de colágeno (Figura 23B) y tampoco la de TGF- β 1 (Figura 23C) en las células LX-2. Estos resultados indican que la activación de la vía autofágica es esencial para que se induzca la respuesta fibrogénica de las células hepáticas estrelladas frente a la infección con *B. abortus*.

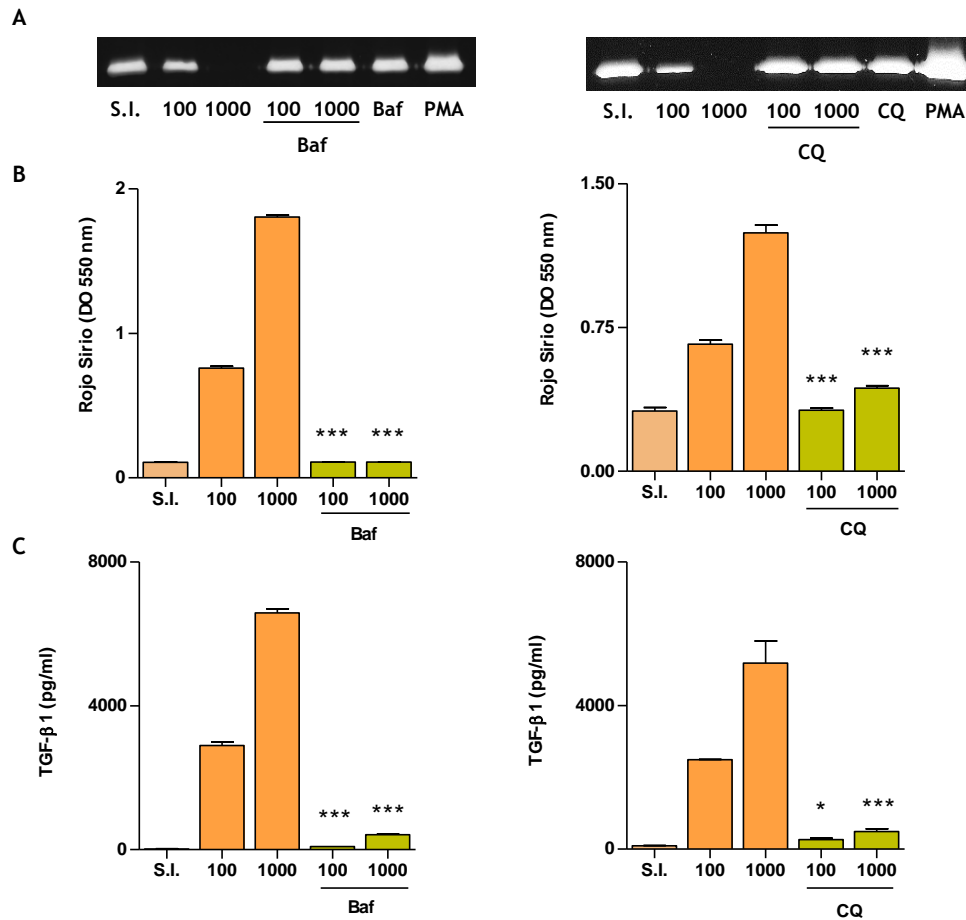


Figura 23: *B. abortus* inhibe la producción de MMP-9 e induce la secreción de colágeno y de TGF-β por un mecanismo dependiente a la activación de la autofagia en las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 con *B. abortus* en presencia o no de los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 (Baf) o cloroquina (CQ) y a las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de MMP-9 por zimografía (A). A los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (B). La secreción de TGF-β1 fue analizada por ELISA en los sobrenadantes obtenidos a las 24 hs post-infección (C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus los controles sin tratar (100 y 1000).

***B. abortus* induce autofagia en las células LX-2 por un mecanismo dependiente de la presencia de un SST4 VirB funcional.**

El SST4 de *Brucella*, codificado por el operón *virB*, es esencial para la supervivencia y multiplicación intracelular de la bacteria y para la modulación de la respuesta inmune durante la infección [103, 111]. Además, como se ha descrito en el capítulo II, el SST4 de *B. abortus* está involucrado en la inducción de un fenotipo fibrótico en las células estrelladas LX-2. Por lo tanto, nos preguntamos si este sistema también estaba implicado en la activación de la vía autofágica en las células estrelladas.

Los cultivos de LX-2 fueron infectados con *B. abortus* WT o con la mutante deficiente en el SST4, $\Delta virB10$ y a las 24 hs post-infección se analizó la expresión, mediante la detección con anticuerpos específicos, de LC3 y Beclin-1 por microscopia de fluorescencia y posteriormente se realizó la cuantificación de las células positivas para LC3 o Beclin-1 con el software ImageJ. Como se muestra en la **Figura 24**, las células infectadas con la mutante $\Delta virB10$ expresan niveles de LC3 (**Figura 24A y B**) y Beclin-1 (**Figura 24A y C**) que no difieren significativamente de los controles sin infectar. Estos resultados

demuestran que *B. abortus* induce autofagia en las células LX-2 de forma dependiente de la presencia de un SST4 funcional.

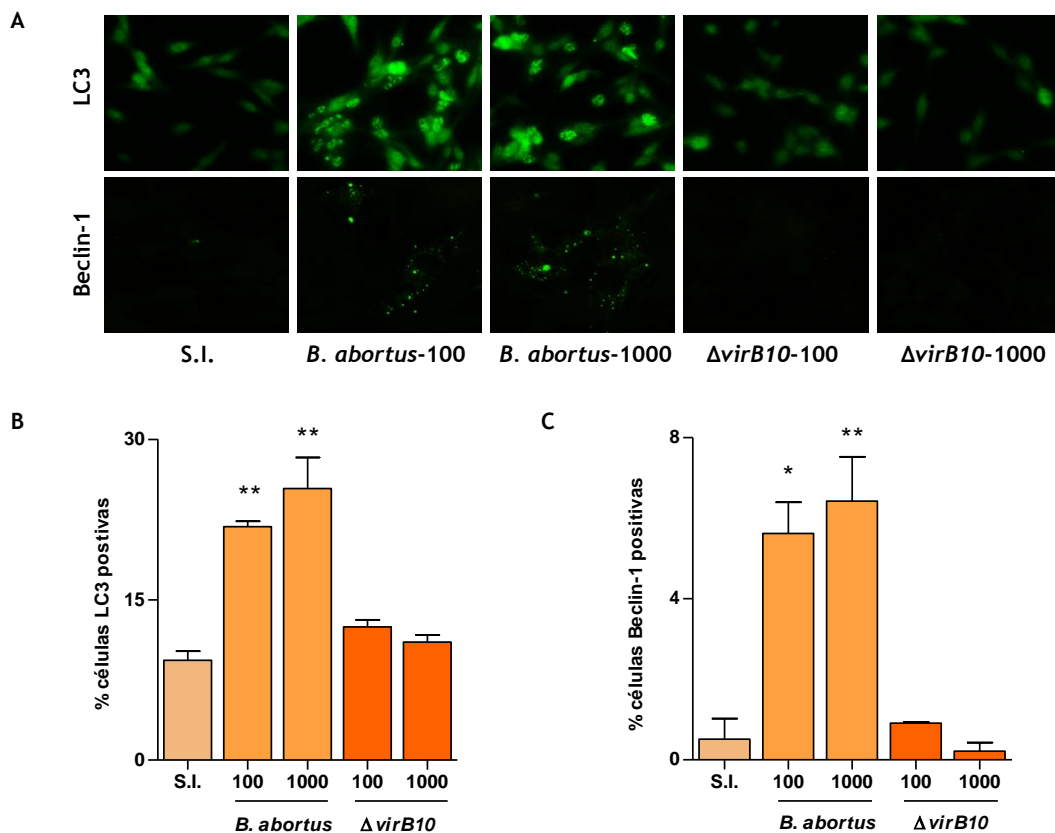


Figura 24: La infección con la mutante $\Delta virB10$ no induce autofagia en las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*) o con la mutante $\Delta virB10$ a MOI 100 y 1000 y a las 24 hs post-infección se determinó la expresión de LC3 y Beclin-1 mediante la tinción con anticuerpos específicos anti-LC3 o anti-Beclin-1 respectivamente y posterior análisis por microscopia de fluorescencia (A). El recuento de células positivas para LC3 o Beclin-1 se realizó utilizando el software ImageJ a partir de 2 experimentos independientes (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus el control sin infectar (S.I.).

***B. abortus* induce autofagia en las células LX-2 a través de su proteína efectora BPE005.**

Dado que el SST4 está involucrado en la inducción de autofagia y que la proteína BPE005 secretada por el SST4 de *B. abortus* es la responsable de generar el fenotipo fibrogénico en las células hepáticas estrelladas, nos planteamos evaluar si éste efector también participa de la inducción de la vía autofágica. Para alcanzar este objetivo evaluamos la expresión de LC3 II, la única proteína asociada a los autofagosomas, en lisados totales de células LX-2 infectadas con *B. abortus* WT, la mutantes $\Delta virB10$, la mutante $\Delta bpe005$ o $\Delta bpe005$ complementada con el gen codificante para BPE005 a MOI 1000. Como se muestra en la **Figura 25A y B** la mutante $\Delta bpe005$, del mismo modo que la mutante $\Delta virB10$, no indujo la expresión de LC3 II por parte de las células LX-2. Asimismo, corroborando estos resultados, al complementar a la mutante $\Delta bpe005$ con un plásmido de expresión BPE005 se restaura el fenotipo, es decir, la bacteria complementada se comporta como *B. abortus* WT y es capaz de inducir un aumento significativo de los niveles proteicos de LC3 II respecto del control sin infectar. Estos resultados indican

que la proteína efectora BPE005 está implicada en la activación de la vía autofágica en las células estrelladas LX-2.

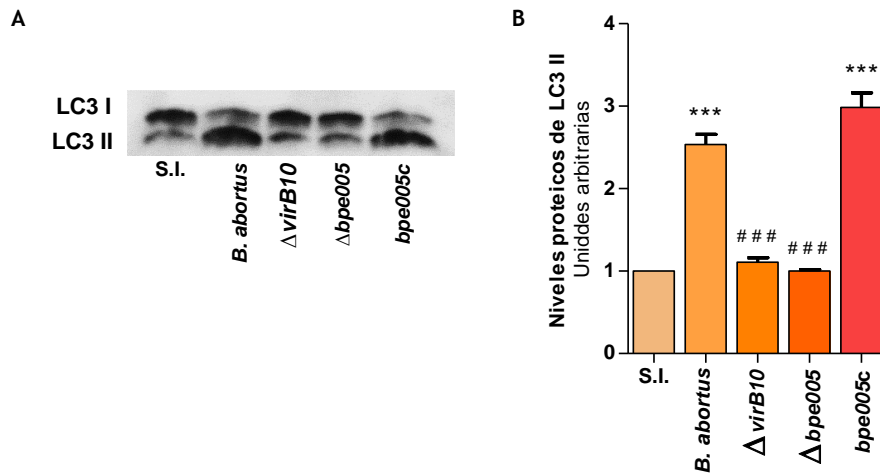


Figura 25: La proteína efectora BPE005 de *B. abortus* está implicada en la activación de la vía autofágica en las células estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*), la mutante $\Delta virB10$, la mutante $\Delta bpe005$ o con $\Delta bpe005$ complementada con el gen de simple copia codificante para la proteína BPE005 (*bpe005c*) a MOI 1000 y a las 24 hs post-infección se obtuvieron lisados celulares totales para determinar la expresión de LC3 II por Western blotting (A), los niveles proteicos obtenidos fueron analizados por densitometría mediante el software ImageJ (B). ***p<0.001, versus el control sin infectar (S.I.); ### p<0.001, versus infección con *B. abortus* WT.

B. abortus induce el clivaje de Beclin-1 y la muerte celular por apoptosis de las células estrelladas.

B. abortus es capaz de inducir la activación de las células estrelladas y la concomitante fibrogénesis. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido una correlación entre la cirrosis hepática y la infección con *Brucella* [285, 288]. Durante la infección con *Brucella* podría existir un balance entre los efectos fibrogénicos y los antifibrogénicos, en consecuencia el depósito de MEC se produciría de forma controlada y autolimitada. En este sentido, la muerte por apoptosis de las células hepáticas estrelladas y por lo tanto, la reducción del número de la principal población celular que contribuye a la fibrogénesis, podría ser un mecanismo de gran relevancia que podría limitar la fibrosis hepática [329, 413].

Beclin-1 es un regulador dual de la autofagia y de la apoptosis. Como se mencionó, Beclin-1 tiene un papel central en la autofagia actuando como una plataforma para el ensamblaje de los componentes del complejo de iniciación [414]. Por otro lado, se ha demostrado que Beclin-1 puede ser clivado por caspasas y los fragmentos generados por el clivaje adquieren nuevas funciones como la de amplificar la apoptosis mediada por mitocondria [415]. Nuestros resultados demostraron que a las 48 hs post-infección *B. abortus* induce la expresión de LC3 II (Figura 26A y B), la degradación de p62 (Figura 26A y C), y el clivaje de Beclin-1 (Figura 26A, D y E) en las células LX-2.

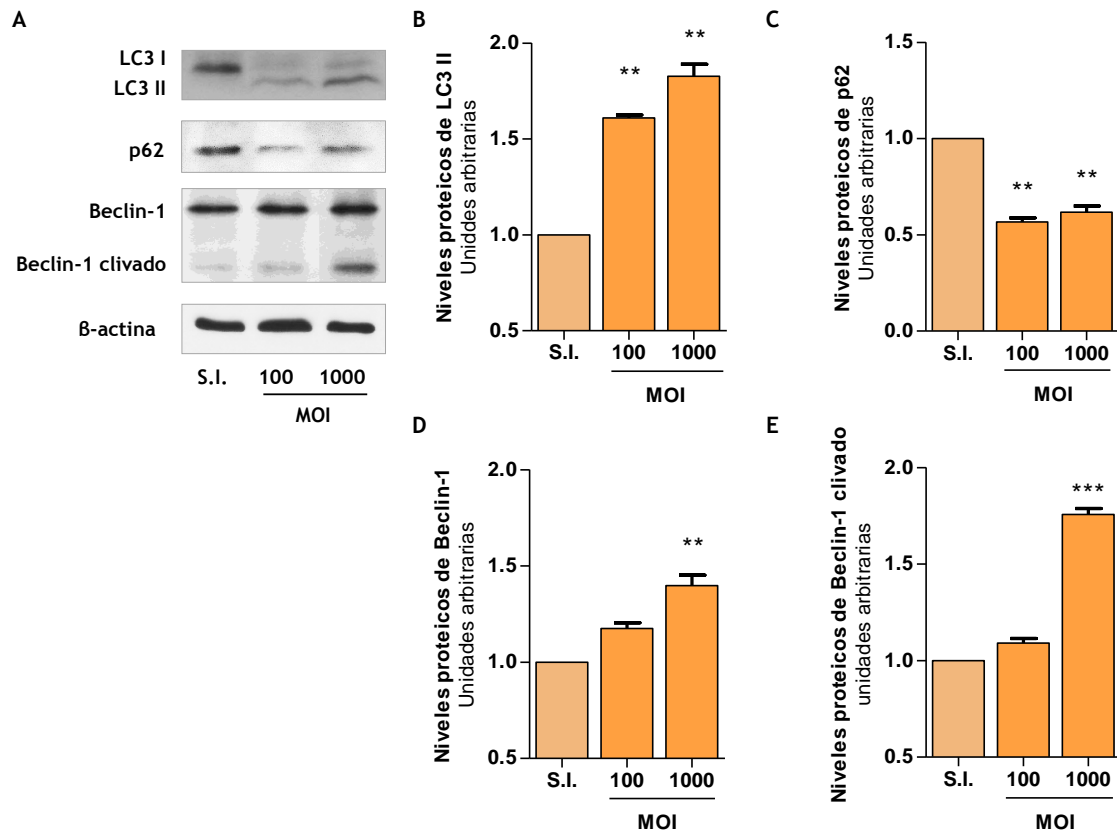


Figura 26: *B. abortus* induce el clivaje de Beclin-1 en las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 y a las 48 hs post-infección se obtuvieron extractos celulares totales y se evaluó la expresión de LC3 II (16 kDa), p62 (62 kDa) y Beclin-1 (60 kDa) por Western blotting, como control de carga se utilizó β -actina (A). Análisis densitométrico de los niveles proteicos de LC3 II (B), p62 (C) y Beclin-1 (D) y Beclin-1 clivado (E) de 2 experimentos independientes mediante el software ImageJ. **p<0.01, ***p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

Considerando que Caspasa-3 que es uno de los principales efectores de la vía apoptótica es capaz de clivar a Beclin-1 [410], decidimos analizar si la infección con la bacteria era capaz de inducir la muerte por apoptosis de las células estrelladas a las 48 hs post-infección. Para ello, las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* y a las 48 hs post-infección se determinó la presencia de células apoptóticas mediante ensayo de TUNEL, tinción con anticuerpos específicos anti-caspasa-3 clivada y por tinción de los núcleos con Hoechst 33342. Mediante las 3 técnicas utilizadas se evidenció que *B. abortus* tiene un efecto pro-apoptótico sobre las células LX-2 ya que el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos infectados fue significativamente mayor al de los controles sin infectar (Figura 27). Además, al infectar a las células con la mutante $\Delta virB10$ demostramos que la apoptosis depende de la presencia de un SST4 funcional, ya que el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos infectados con la mutante $\Delta virB10$ no difirió significativamente de los controles sin infectar (Figura 27).

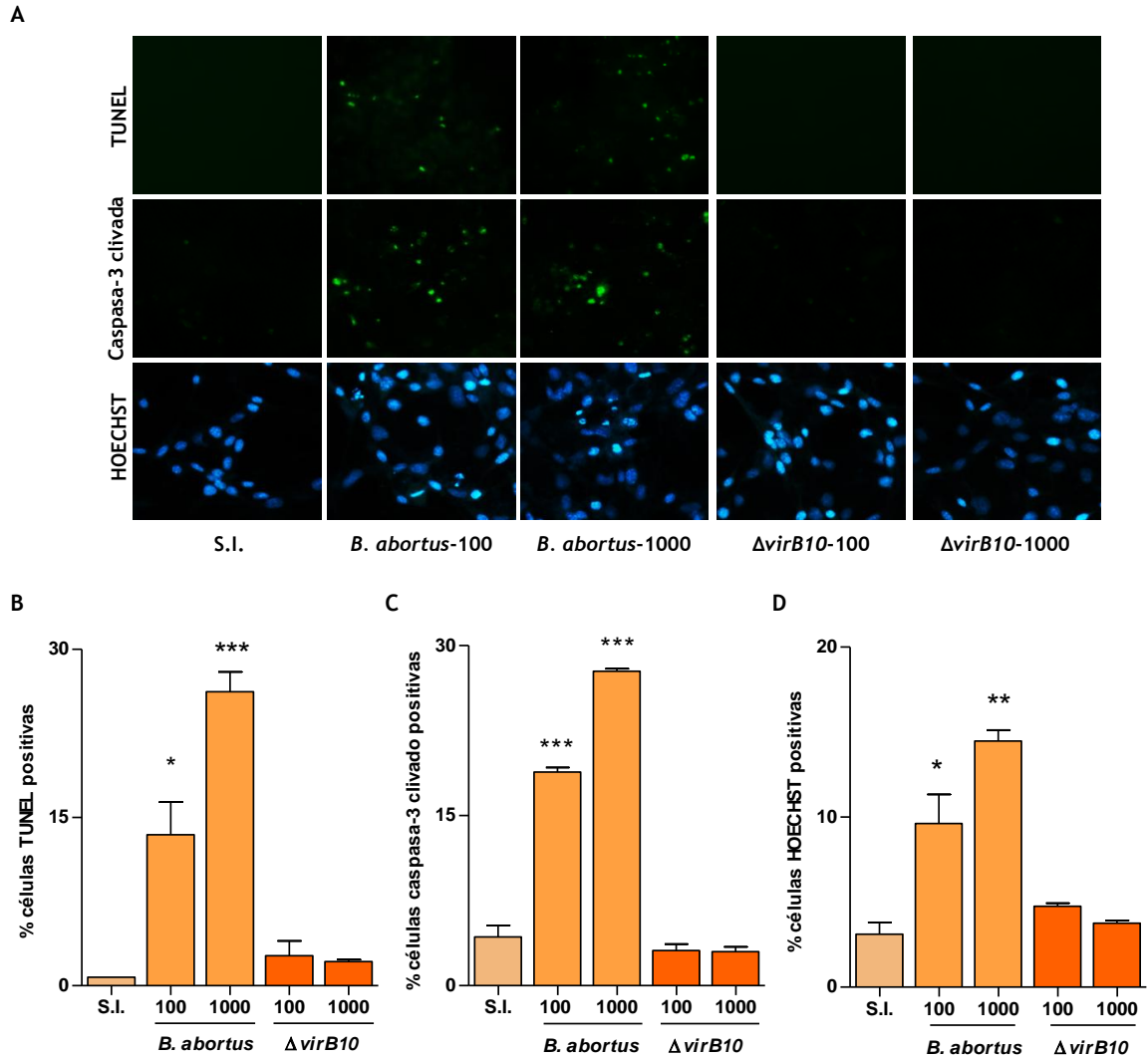


Figura 27: *B. abortus* induce la muerte celular por apoptosis de las células hepáticas estrelladas. Las células LX-2 fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*) o con la mutante $\Delta virB10$ a MOI 100 y 1000 y a las 48 hs post-infección se determinó la presencia de células apoptóticas por la técnica de TUNEL, tinción con anticuerpos específicos anti-caspasa-3 clivada y HOECHST 33342 (A). Cuantificación de células apoptóticas teñidas con TUNEL (B), caspasa-3 clivada (C) y con HOECHST33342 (D) de 2 experimentos independientes mediante el software ImageJ. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

DISCUSIÓN

El daño hepático crónico causado por la persistencia de un estímulo infeccioso puede inducir fibrosis como una respuesta compensatoria para reparar el tejido dañado, dando lugar a un fenotipo caracterizado por la deposición de MEC. Cuando la fibrosis se desarrolla de forma descontrolada y excesiva puede progresar a cirrosis con la consecuente falla hepática e hipertensión portal afectando así las funciones del órgano [236, 310]. La autofagia ha sido implicada en diferentes patologías hepáticas y, en particular, en la activación de las células hepáticas estrelladas induciendo la síntesis de colágeno de tipo I con la concomitante fibrogénesis [249-253].

En el caso de la brucelosis humana, ha sido informada una posible relación entre cirrosis y la infección por *Brucella* [285]. Sin embargo, la presencia de cirrosis hepática es discutible, debido a que en los estudios realizados la hepatitis viral no fue excluida como posible causa por los autores [416, 417]. Asimismo, no se ha observado el desarrollo de cirrosis durante la infección por *Brucella* en modelos animales, indicando que a pesar de la habilidad de *Brucella* de inducir un fenotipo fibrótico en las células hepáticas estrelladas, otros factores podrían estar involucrados para reducir los altos niveles de fibrosis necesarios para inducir cirrosis hepática.

La fibrosis hepática es un proceso potencialmente reversible cuando el estímulo que provoca el daño es removido [338, 418-421]. La reversión del fenotipo fibrótico y la concomitante resolución de la fibrosis desempeñan un papel importante en la patogénesis de la fibrosis hepática y puede ocurrir tanto por mecanismos que inhiben la activación así como por aquellos que aceleran la reducción de la población de células hepáticas estrelladas por apoptosis [278, 330, 413]. En un modelo de recuperación espontánea de fibrosis inducida por tetracloruro de carbono en ratas, se demostró que durante el proceso de reversión hay una disminución del número de células estrelladas y que dicha reducción es mediada por la muerte celular por apoptosis [330, 422, 423]. Asimismo, al inducir la apoptosis de las células estrelladas con gliotoxina en ratas con fibrosis hepática se reduce la deposición de colágeno y en consecuencia la resolución de la fibrosis se ve favorecida [328, 424].

En el presente trabajo de tesis demostramos que *Brucella* induce fibrosis caracterizada por la producción de colágeno y la inhibición de MMP-9 por un mecanismo dependiente de la secreción de TGF- β y relacionada con la inducción de autofagia en las células hepáticas estrelladas.

B. abortus induce autofagia en las células LX-2 ya que la infección indujo la expresión de Beclin-1, una proteína central en la etapa de nucleación, y de LC3 II que es la única proteína que se encuentra en la membrana de los autofagosomas ya formados y por lo tanto es ampliamente utilizado como marcador de autofagia [425, 426]. Además del incremento en el número de autofagosomas, las células infectadas presentaron niveles más bajos de p62 respecto de los controles sin infectar demostrando que hay un aumento del flujo autofágico en las células LX-2.

Por otro lado, demostramos que la autofagia está implicada en el fenotipo fibrogénico de las células hepáticas estrelladas ya que al bloquear la vía con bafilomicina A1 o cloroquina se revierte la respuesta

desencadenada por la infección: en presencia de los inhibidores la bacteria no es capaz de inducir la producción de colágeno ni de TGF- β así como tampoco de inhibir la secreción de MMP-9. En concordancia a estos resultados, ha sido demostrado que al inhibir el flujo autofágico en cultivos primarios de células hepáticas estrelladas la activación celular es inhibida, dado que se reduce la producción de colágeno, la expresión de α -SMA, la tasa de proliferación y no se detecta la pérdida de gotas lipídicas características del proceso de transdiferenciación; el fenómeno fue reproducido al inhibir la vía en una etapa tardía con bafilomicina A1 y cloroquina así como al bloquear la fase inicial con 3-metiladenina [250, 251].

En el capítulo II demostramos que la respuesta fibrogénica desencadenada por *B. abortus* es dependiente de su SST4 y de la proteína efectora BPE005. Por lo tanto, decidimos evaluar si este sistema y su proteína secretada también estaban implicadas en la activación de la vía autofágica. Los marcadores de autofagia evaluados no fueron inducidos por la mutante $\Delta virB10$ ni por la mutante $\Delta bpe005$; confirmando de esta forma la correlación entre fibrosis y autofagia en nuestro modelo de infección. Sin embargo y como se mencionó previamente, a pesar de la capacidad de *B. abortus* de inducir la activación de las células estrelladas y la concomitante fibrogénesis, hasta el momento no se ha establecido una correlación entre cirrosis hepática y la infección con *Brucella*, incluso algunos autores consideran que es improbable que la infección pueda generar suficiente tejido fibrótico como para provocar cirrosis [285, 288].

En este sentido, los resultados que obtuvimos y que fueron descritos en el capítulo I indican que existe un balance entre inflamación y fibrosis ya que la respuesta de las células estrelladas puede ser inflamatoria o fibrogénica de acuerdo a si están infectadas o no y de su interacción con otros tipos celulares. Por otro lado, la reducción del número de células activadas es un evento crítico en la resolución de la fibrosis y esto ocurre principalmente por 3 mecanismos: senescencia, apoptosis y reversión hacia un fenotipo inactivado similar al de las células quiescentes [236, 427-430]. En particular, la muerte por apoptosis es un mecanismo clave, siendo las células activadas más susceptibles que las quiescentes [428]. Nuestros resultados demuestran que *B. abortus* induce la muerte celular por apoptosis de las células estrelladas LX-2. En consecuencia, la infección podría modular la fibrosis reduciendo el número de la principal población de células fibrogénicas del hígado, de esta forma el depósito de MEC se produciría de manera controlada y autolimitada y por lo tanto la fibrosis no conduciría al desarrollo de cirrosis hepática.

En conjunto estos resultados indican que luego de la infección de las células estrelladas de hígado, *B. abortus* activa la vía autofágica y desencadena una respuesta profibrogénica; por otro lado, esta respuesta es modulada por otros tipos celulares presentes en el hígado, y además la bacteria induce luego la apoptosis de las células estrelladas. Estos mecanismos contribuirían a modular el desarrollo de fibrosis en el hígado.

Conclusión general

CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo de tesis demostramos que *B. abortus* es capaz de invadir y multiplicarse en la línea de células hepáticas estrelladas humanas LX-2. La infección induce la expresión de α -SMA en las células estrelladas, las activa y provoca la adquisición de un fenotipo fibrogénico caracterizado por la producción de colágeno, la secreción de TIMP-1 y la inhibición de MMP-9 por un mecanismo que implica la secreción de TGF- β 1, la principal citoquina profibrogénica. Además, las células estrelladas producen las quemoquinas IL-8 y MCP-1 frente a la infección, lo que contribuiría al reclutamiento de monocitos y neutrófilos al foco infeccioso favoreciendo el proceso inflamatorio.

Los estudios de interacción de las células estrelladas con monocitos y hepatocitos revelaron que los sobrenadantes de hepatocitos y monocitos infectados con *B. abortus* tienen un efecto antifibrogénico sobre las células LX-2 no infectadas, induciendo la secreción de MMP-9 e inhibiendo la deposición de colágeno. Sin embargo, cuando los sobrenadantes de monocitos y hepatocitos infectados fueron utilizados para estimular a las células LX-2 infectadas, la bacteria inhibió la producción de MMP-9 inducida por los sobrenadantes por una vía que involucra la secreción de TGF- β 1, y estimuló además la deposición de colágeno por parte de las células estrelladas. Estos resultados indican que la respuesta de las células estrelladas puede ser inflamatoria o fibrogénica de acuerdo a su estado de infección y de las interacciones con otros tipos celulares.

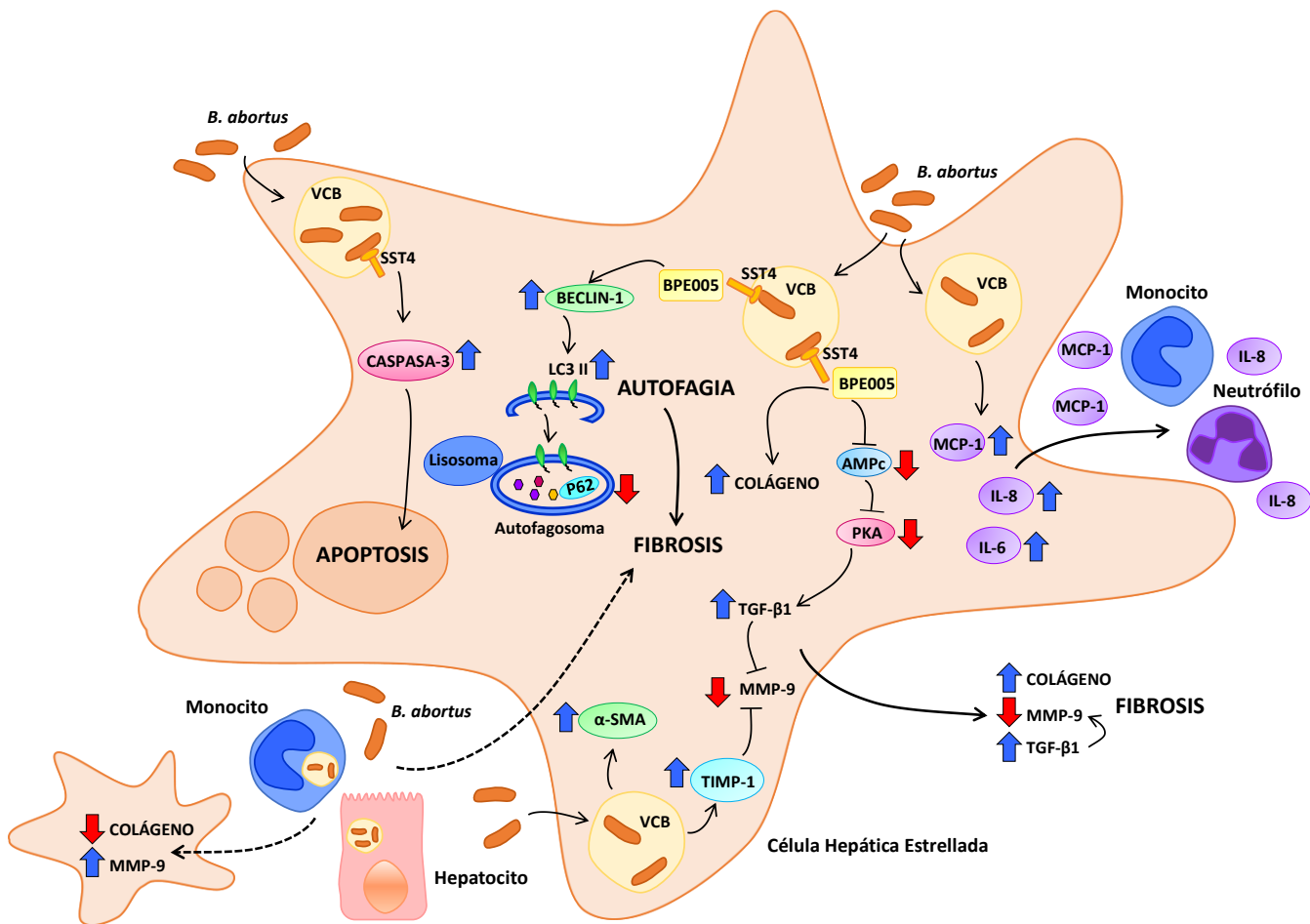
Por otro lado, describimos la vía molecular y los componentes estructurales que utiliza *B. abortus* para inducir la adquisición de un fenotipo fibrogénico por parte de las células hepáticas estrelladas. Demostramos que la activación de las células LX-2 mediada por la infección por *B. abortus* es dependiente de la presencia de un SST4 funcional y de la proteína efectora BPE005 por un mecanismo que involucra la vía de señalización AMPc/PKA.

Además la respuesta fibrogénica que se desencadena frente a la infección con *B. abortus* está asociada a la activación de la vía autofágica. En este sentido demostramos que la bacteria induce la expresión de los marcadores de autofagia Beclin-1, LC3 II y p62 y que al bloquear la vía (bafilomicina A1 y cloroquina) se revierte el fenotipo fibrogénico adquirido por las células estrelladas. Asimismo demostramos que tanto el SST4 como el efector BPE005 contribuyen a la inducción de la vía autofágica, confirmando así la correlación entre fibrosis y autofagia. Luego de la activación de la vía autofágica y la modulación del fenotipo de las células estrelladas hacia un perfil fibrogénico, la infección induce finalmente la muerte por apoptosis de las células estrelladas.

Los resultados de este trabajo tienen correlación con los obtenidos en los experimentos *in vivo*, utilizando un modelo murino de infección. Mediante el análisis histológico pusimos en evidencia que los hígados de los ratones infectados con *B. abortus* presentaron simultáneamente focos con infiltrado inflamatorio y regiones de tejido fibrótico y que las principales células productoras de TGF- β en respuesta a la infección son las células estrelladas de hígado. Asimismo, los resultados histológicos corroboraron la función de BPE005 en la modulación del fenotipo fibrótico durante la infección con *B. abortus*,

confirmando la relevancia de los hallazgos *in vitro* ya que la infección con *B. abortus* $\Delta bpe005$ indujo un menor nivel de fibrosis que el inducido por *B. abortus* WT en el hígado de ratones.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis demuestran que *B. abortus* vía el SST4 y la proteína secretada BPE005 modula a las células LX-2 hacia un fenotipo fibrótico mediante un mecanismo que involucra la activación de la vía autofágica, AMPc y PKA y que lleva en última instancia a la muerte de las células LX-2 por apoptosis. Todos estos mecanismos contribuyen a explicar al menos en parte los factores involucrados en el daño hepático observado en la brucelosis humana.



Esquema 1: Modelo representativo de las conclusiones de este trabajo.

Bibliografía

1. Young, E.J., *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*, D.d.E.-M.d.S.d.l.N. Argentina, Editor. 2013: Buenos Aires.
3. Kaufmann, A.F., M.I. Meltzer, and G.P. Schmid, *The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?* Emerg Infect Dis, 1997. **3**(2): p. 83-94.
4. Samartino, L.E., *Brucellosis in Argentina*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 71-80.
5. agroalimentaria, S.n.d.s.y.c., *Plan nacional de control y erradicación de la brucelosis y tuberculosis bovina - etapa 1998 -2001* G.y.P. Secretaría de Agricultura, Editor. 1999: Buenos Aires.
6. (WHO), W.H.O., *The control of neglected zoonotic diseases (NZDs)*. 2014: Genenva.
7. Pappas, G., et al., *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 91-9.
8. Seleem, M.N., S.M. Boyle, and N. Sriranganathan, *Brucellosis: a re-emerging zoonosis*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 392-8.
9. Dean, A.S., et al., *Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(10): p. e1865.
10. Lucero, N.E., et al., *Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(4): p. 496-503.
11. Poester, F.P., V.S. Goncalves, and A.P. Lage, *Brucellosis in Brazil*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 55-62.
12. de Alencar Mota, A.L., et al., *Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil*. Acta Trop, 2016. **164**: p. 226-232.
13. Abriata, G., et al., *Boletín epidemiológico periódico n°33: Edición especial Brucelosis*, D.d.E.-M.d.S.d.l. Nación, Editor. 2005: Buenos Aires, Argentina.
14. Russo, A.M., et al., *[Epidemiology of caprine and ovine brucellosis in Formosa province, Argentina]*. Rev Argent Microbiol, 2016.
15. Robles, C., et al., *Encuesta serológica sobre Brucelosis en caprinos de la provincia de Mendoza*. Revista Veterinaria Argentina, 2006. **24**(233): p. 172-185.
16. Benitez, E.N., E.A. Salem, and N. Fortuna, *Brucellosis caprina y humana en el departamento de Rivadavia, provincia de Salta, Argentina*. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 1980. **88**(5): p. 432-439.
17. López, G., et al., *Brucelosis ovina en Argentina*. Revista Veterinaria Argentina, 2010. **269**(27).
18. Pappas, G., et al., *Brucellosis*. N Engl J Med, 2005. **352**(22): p. 2325-36.
19. Al Dahouk, S., et al., *Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp.* Clin Lab, 2003. **49**(9-10): p. 487-505.
20. Bricker, B.J., *PCR as a diagnostic tool for brucellosis*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 435-46.

21. Carrillo, C. and E. Gotuzzo, *Brucellosis*. Revista de Medicina Experimental, 1997. 14(1).
22. Robles, C., *Brucelosis Caprina*, I.N.d.T.A.C.R.P. Norte., Editor. 2009: uenos Aires Argentina.
23. Yang, X., et al., *Progress in Brucella vaccine development*. Frontiers in Biology, 2013. 8(1): p. 60-77.
24. Galinska, E.M. and J. Zagorski, *Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms*. Ann Agric Environ Med, 2013. 20(2): p. 233-8.
25. Madkour, M.M., *Madkour's Brucellosis. Brucellosis: Overview. (2° Edition)*. 2001, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
26. Sanitaria., D.d.P., *Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la republica argentina*, S.N.d.S.y.C.A.D.d.P. Sanitaria., Editor. 2014: Buenos Aires Argentina.
27. Young, E.J., *An overview of human brucellosis*. Clin Infect Dis, 1995. 21(2): p. 283-9; quiz 290.
28. Serre, A., *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects*, in *Immunology and pathophysiology of human brucellosis*, E.J. Young and M.J. Corbel, Editors. 1989, CRC, Press, Inc.
29. Lulu, A.R., et al., *Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases*. Q J Med, 1988. 66(249): p. 39-54.
30. Moreno, E., A. Cloeckart, and I. Moriyon, *Brucella evolution and taxonomy*. Vet Microbiol, 2002. 90(1-4): p. 209-27.
31. Whatmore, A.M., *Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens*. Infect Genet Evol, 2009. 9(6): p. 1168-84.
32. Michaux-Charachon, S., et al., *Genome structure and phylogeny in the genus Brucella*. J Bacteriol, 1997. 179(10): p. 3244-9.
33. Jumas-Bilak, E., et al., *Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella*. Mol Microbiol, 1998. 27(1): p. 99-106.
34. Moreno, E. and I. Moriyon, *Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(1): p. 1-3.
35. 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.
36. Scholz, H.C., 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.
37. Scholz, H.C., 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.
38. Scholz, H.C., et al., *Isolation of Brucella microti from soil*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(8): p. 1316-7.
39. De, B.K., et al., *Novel Brucella strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection*. J Clin Microbiol, 2008. 46(1): p. 43-9.
40. Scholz, H.C., et al., *Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. 60(Pt 4): p. 801-8.

41. Tiller, R.V., 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.
42. Whatmore, A.M., et al., *Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.)*. Int J Syst Evol Microbiol, 2014. **64**(Pt 12): p. 4120-8.
43. Scholz, H.C., et al., *Brucella vulpis sp. nov., a novel Brucella species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes) in Austria*. Int J Syst Evol Microbiol, 2016.
44. Bedord, C.J., J.M. Young, and B.M. Wagner, *Anthralin inhibition of mouse epidermal arachidonic acid lipooxygenase in vitro*. J Invest Dermatol, 1983. **81**(6): p. 566-71.
45. Franco, M.P., et al., *Human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(12): p. 775-86.
46. Pappas, G., *The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36** Suppl 1: p. S8-11.
47. Brew, S.D., et al., *Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal*. Vet Rec, 1999. **144**(17): p. 483.
48. Sohn, A.H., et al., *Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp.* Emerg Infect Dis, 2003. **9**(4): p. 485-8.
49. Fernandez-Prada, C.M., 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.
50. Wattam, A.R., et al., *Comparative genomics of early-diverging Brucella strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway*. MBio, 2012. **3**(5): p. e00246-11.
51. Zygmunt, M.S., et al., *Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging Brucella species*. Clin Vaccine Immunol, 2012. **19**(9): p. 1370-3.
52. Moriyon, I. and I. Lopez-Goni, *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis*. Int Microbiol, 1998. **1**(1): p. 19-26.
53. Beveridge, T.J., *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. J Bacteriol, 1999. **181**(16): p. 4725-33.
54. Lapaque, N., et al., *Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 60-6.
55. Qureshi, N.K., et al., *Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of Brucella abortus*. Journal of Endotoxin Research, 1994. **1**(3): p. 137-148.
56. Cardoso, P.G., et al., *Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system*. Microb Cell Fact, 2006. **5**: p. 13.
57. Freer, E., et al., *Heterogeneity of Brucella abortus lipopolysaccharides*. Res Microbiol, 1995. **146**(7): p. 569-78.
58. Cloeckert, A., et al., *Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 229-47.
59. Winter, A.J., *Outer membrane proteins of Brucella*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987. **138**(1): p. 87-9.
60. Douglas, J.T., et al., *Porins of Brucella species*. Infect Immun, 1984. **44**(1): p. 16-21.

61. Bae, J.E., G.G. Schurig, and T.E. Toth, *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.
62. Winter, A.J., 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.
63. Bowden, R.A., 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.
64. Goolab, S., et al., *Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in Brucella.* Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1189.
65. Zhou, L., et al., *On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria.* FEMS Microbiol Lett, 1998. **163**(2): p. 223-8.
66. Dubray, G. and M. Plommet, *[Structure and constituents of Brucella. Characterization and biological properties of the fractions].* Dev Biol Stand, 1976. **31**: p. 68-91.
67. Roest, H.P., et al., *Isolation and characterization of ropA homologous genes from Rhizobium leguminosarum biovars viciae and trifolii.* J Bacteriol, 1995. **177**(17): p. 4985-91.
68. 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.
69. Martinez de Tejada, G. and I. Moriyon, *The outer membranes of Brucella spp. are not barriers to hydrophobic permeants.* J Bacteriol, 1993. **175**(16): p. 5273-5.
70. Hancock, R.E., R. Siehnel, and N. Martin, *Outer membrane proteins of Pseudomonas.* Mol Microbiol, 1990. **4**(7): p. 1069-75.
71. Adams, L.G., *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.
72. de Figueiredo, P., et al., *Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions.* Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1505-17.
73. Castaneda-Roldan, E.I., 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.
74. Delpino, M.V., C.A. Fossati, and P.C. Baldi, *Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp.* Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 984-95.
75. Delpino, M.V., et al., *Brucella-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses.* J Hepatol, 2010. **53**(1): p. 145-54.
76. 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.
77. Detilleux, P.G., B.L. Deyoe, and N.F. Cheville, *Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro.* Infect Immun, 1990. **58**(7): p. 2320-8.

78. Goenka, R., et al., *B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium Brucella abortus*. J Infect Dis, 2012. **206**(1): p. 91-8.
79. Velasquez, L.N., et al., *Brucella abortus induces apoptosis of human T lymphocytes*. Microbes Infect, 2012. **14**(7-8): p. 639-50.
80. Rossetti, C.A., K.L. Drake, and L.G. Adams, *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.
81. Rossetti, C.A., 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.
82. Watarai, M., et al., *Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to Brucella abortus infection of mice*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4818-25.
83. Watarai, M., *Interaction between Brucella abortus and cellular prion protein in lipid raft microdomains*. Microbes Infect, 2004. **6**(1): p. 93-100.
84. 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.
85. Bellaire, B.H., R.M. Roop, 2nd, and J.A. Cardelli, *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.
86. 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.
87. Rolan, H.G. and R.M. Tsois, *Mice lacking components of adaptive immunity show increased Brucella abortus virB mutant colonization*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 2965-73.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. Jiang, X. and C.L. Baldwin, *Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus*. Infect Immun, 1993. **61**(1): p. 124-34.
92. Starr, T., et al., *Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment*. Traffic, 2008. **9**(5): p. 678-94.
93. 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.
94. Boschiroli, M.L., 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.
95. Delrue, R.M., et al., *Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking*. Cell Microbiol, 2001. **3**(7): p. 487-97.

96. den Hartigh, A.B., 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.
97. Celli, J., S.P. Salcedo, and J.P. Gorvel, *Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1673-8.
98. 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.
99. 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.
100. Celli, J., *The changing nature of the Brucella-containing vacuole*. Cell Microbiol, 2015. **17**(7): p. 951-8.
101. Burns, D.L., *Type IV transporters of pathogenic bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(1): p. 29-34.
102. Fronzes, R., et al., *Structure of a type IV secretion system core complex*. Science, 2009. **323**(5911): p. 266-8.
103. Lacerda, T.L., S.P. Salcedo, and J.P. Gorvel, *Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(1): p. 45-51.
104. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. Trends Microbiol, 2000. **8**(8): p. 354-60.
105. Sieira, R., et al., *A homologue of an operon required for DNA transfer in Agrobacterium is required in Brucella abortus for virulence and intracellular multiplication*. J Bacteriol, 2000. **182**(17): p. 4849-55.
106. de Jong, M.F., H.G. Rolan, and R.M. Tsolis, *Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella*. Cell Microbiol, 2010. **12**(9): p. 1195-202.
107. den Hartigh, A.B., et al., *Differential requirements for VirB1 and VirB2 during Brucella abortus infection*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5143-9.
108. Guzman-Verri, C., et al., *The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12375-80.
109. Trokter, M., et al., *Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems*. Curr Opin Struct Biol, 2014. **27**: p. 16-23.
110. Lee, J.J., et al., *Interplay between clathrin and Rab5 controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of Brucella abortus within HeLa cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 28049-57.
111. Comerci, D.J., 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.
112. Kim, S., et al., *Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of Brucella abortus deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3020-7.

113. Sun, Y.H., et al., *virB-Mediated survival of Brucella abortus in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4826-32.
114. Hong, P.C., R.M. Tsolis, and T.A. Ficht, *Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4102-7.
115. Kahl-McDonagh, M.M., et al., *Evaluation of novel Brucella melitensis unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis*. Vaccine, 2006. **24**(24): p. 5169-77.
116. Zygmunt, M.S., et al., *Identification of Brucella melitensis 16M genes required for bacterial survival in the caprine host*. Microbes Infect, 2006. **8**(14-15): p. 2849-54.
117. Radhakrishnan, G.K., et al., *Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9892-8.
118. Paixao, T.A., et al., *Establishment of systemic Brucella melitensis infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4197-208.
119. Ke, Y., et al., *Type IV secretion system of Brucella spp. and its effectors*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 72.
120. Roux, C.M., et al., *Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice*. Cell Microbiol, 2007. **9**(7): p. 1851-69.
121. Rolan, H.G. and R.M. Tsolis, *Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to Brucella abortus infection*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3207-13.
122. Gomes, M.T., et al., *Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to Brucella abortus infection*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3629-38.
123. de Jong, M.F., et al., *Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system*. Mol Microbiol, 2008. **70**(6): p. 1378-96.
124. de Barsy, M., et al., *Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2*. Cell Microbiol, 2011. **13**(7): p. 1044-58.
125. Sengupta, D., et al., *Subversion of innate immune responses by Brucella through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 956-64.
126. Radhakrishnan, G.K. and G.A. Splitter, *Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from Brucella melitensis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **397**(1): p. 59-63.
127. Salcedo, S.P., et al., *Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e21.
128. Cirl, C., et al., *Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 399-406.
129. Snyder, G.A., et al., *Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the Brucella protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 669-79.

130. Alaidarous, M., et al., *Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by Brucella Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 654-68.
131. Li, W., et al., *Brucella TIR-like protein TcpB/Btp1 specifically targets the host adaptor protein MAL/TIRAP to promote infection*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **477**(3): p. 509-14.
132. Salcedo, S.P., et al., *BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 28.
133. Marchesini, M.I., et al., *In search of Brucella abortus type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system*. Cell Microbiol, 2011. **13**(8): p. 1261-74.
134. Myeni, S., et al., *Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003556.
135. Dohmer, P.H., et al., *Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival*. Cell Microbiol, 2014. **16**(3): p. 396-410.
136. Fainboim, L. and J. Geffner, *Introducción a la Inmunología Humana*. 6 ed. 2011, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana
137. Golding, B., et al., *Immunity and protection against Brucella abortus*. Microbes Infect, 2001. **3**(1): p. 43-8.
138. 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.
139. Dorneles, E.M., et al., *Immune response triggered by Brucella abortus following infection or vaccination*. Vaccine, 2015. **33**(31): p. 3659-66.
140. 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.
141. Papadopoulos, A., et al., *Brucella discriminates between mouse dendritic cell subsets upon in vitro infection*. Virulence, 2016. **7**(1): p. 33-44.
142. Zwerdling, A., et al., *Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus*. Microbes Infect, 2008. **10**(12-13): p. 1346-54.
143. 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.
144. 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.
145. Fernandes, D.M., R. Benson, and C.L. Baldwin, *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.
146. Salmeron, I., et al., *Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(5): p. 764-70.
147. Zwerdling, A., et al., *Brucella abortus activates human neutrophils*. Microbes Infect, 2009. **11**(6-7): p. 689-97.

148. 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.
149. 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.
150. Giambartolomei, G.H., 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.
151. Zhan, Y. and C. Cheers, *Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to Brucella abortus infection*. *Infect Immun*, 1995. **63**(4): p. 1387-90.
152. Zhan, Y., Z. Liu, and C. Cheers, *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.
153. Zhan, Y., A. Kelso, and C. Cheers, *Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts*. *Immunology*, 1993. **80**(3): p. 458-64.
154. Zhan, Y. and C. Cheers, *Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro*. *Infect Immun*, 1995. **63**(2): p. 720-3.
155. Rittig, M.G., 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.
156. 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.
157. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 637-50.
158. Campos, M.A., 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.
159. Weiss, D.S., 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.
160. Huang, L.Y., 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.
161. Macedo, G.C., 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.
162. 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.
163. Oliveira, F.S., 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.
164. de Almeida, L.A., 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.

165. Zhan, Y. and C. Cheers, *Endogenous gamma interferon mediates resistance to Brucella abortus infection*. Infect Immun, 1993. **61**(11): p. 4899-901.
166. Murphy, E.A., 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.
167. Brandao, A.P., 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, 2012. **2012**: p. 589494.
168. Fernandes, D.M., 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.
169. Oliveira, S.C. and G.A. Splitter, *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.
170. Durward, M.A., et al., *Discordant Brucella melitensis antigens yield cognate CD8+ T cells in vivo*. Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 168-76.
171. 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.
172. Skyberg, J.A., et al., *Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21978.
173. Sbardella, D., et al., *Human matrix metalloproteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(2): p. 119-208.
174. Winter, A.J., et al., *Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of Brucella abortus infection in mice*. Infect Immun, 1989. **57**(11): p. 3438-44.
175. Elzer, P.H., 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.
176. Splitter, G.A. and K.M. Everlith, *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.
177. Escola, J.M., 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.
178. Zaitseva, M.B., 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.
179. Skendros, P. and P. Boura, *Immunity to brucellosis*. Rev Sci Tech, 2013. **32**(1): p. 137-47.
180. Giambartolomei, G.H., 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.
181. Akbulut, H.H., 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.

182. 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.
183. Rodríguez-Zapata, M., et al., *Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function*. infection and immunity, 2010. **78**(7): p. 3272-9.
184. Skendros, P., G. Pappas, and P. Boura, *Cell-mediated immunity in human brucellosis*. Microbes Infect, 2011. **13**(2): p. 134-42.
185. 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.
186. 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.
187. Barrionuevo, P., et al., *Brucella abortus inhibits IFN-gamma-induced FcgammaRI expression and FcgammaRI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages*. Microbes Infect, 2011. **13**(3): p. 239-50.
188. 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.
189. 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.
190. Kilic, S.S., et al., *Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis*. Clin Exp Med, 2009. **9**(2): p. 101-4.
191. Ottones, 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.
192. 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.
193. Diaz, R., et al., *Surface antigens of smooth brucellae*. J Bacteriol, 1968. **96**(4): p. 893-901.
194. Montaraz, J.A., et al., *Protection against Brucella abortus in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies*. Infect Immun, 1986. **51**(3): p. 961-3.
195. 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.
196. Jimenez de Bagues, M.P., 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.
197. Ho, M. and C. Cheers, *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.
198. Skyberg, J.A., et al., *IFN-gamma-deficient mice develop IL-1-dependent cutaneous and musculoskeletal inflammation during experimental brucellosis*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(2): p. 375-87.

199. Fernandes, D.M. and C.L. Baldwin, *Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 1130-3.
200. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
201. Tortora, G.J. and B.H. Derrickson, *The digestive system.*, in *Principles of Anatomy and Physiology*, R. Bonnie, Editor. 2008, Wiley Publisher: United State of America.
202. Kuntz, E. and H.-D. Kuntz, *Hepatology: Textbook and Atlas*. 3 ed., Germany: Springer.
203. Friedman, S.L. and M.J.P. Arthur, *Reversing hepatic fibrosis*. Science & Medicine, 2002. **8**(4): p. 194-205.
204. Heymann, F. and F. Tacke, *Immunology in the liver--from homeostasis to disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016. **13**(2): p. 88-110.
205. Robinson, M.W., C. Harmon, and C. O'Farrelly, *Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(3): p. 267-76.
206. Tacke, F. and H.W. Zimmermann, *Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis*. J Hepatol, 2014. **60**(5): p. 1090-6.
207. Knolle, P.A. and G. Gerken, *Local control of the immune response in the liver*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 21-34.
208. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
209. Su, G.L., et al., *Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 932-6.
210. Schieferdecker, H.L., et al., *Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(3): p. 469-81.
211. van Egmond, M., et al., *FcalphaRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity*. Nat Med, 2000. **6**(6): p. 680-5.
212. Elsegood, C.L., et al., *Kupffer cell-monocyte communication is essential for initiating murine liver progenitor cell-mediated liver regeneration*. Hepatology, 2015. **62**(4): p. 1272-84.
213. Wu, J., et al., *Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific*. Immunology, 2010. **129**(3): p. 363-74.
214. Miura, K., et al., *Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 577-89.
215. Thomson, A.W. and P.A. Knolle, *Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 753-66.
216. Chen, S., et al., *Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(1): p. 134-42.
217. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.

218. Gregory, S.H., A.J. Sagnimeni, and E.J. Wing, *Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2514-20.
219. Norris, S., et al., *Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes*. J Hepatol, 1998. **28**(1): p. 84-90.
220. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 147-63.
221. Ishiyama, K., et al., *Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans*. Hepatology, 2006. **43**(2): p. 362-72.
222. Gao, B., S. Radaeva, and O. Park, *Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 513-28.
223. Grubor-Bauk, B., et al., *Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1430-4.
224. Behar, S.M., et al., *Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1973-80.
225. Kumar, H., et al., *Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, Borrelia burgdorferi*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4797-801.
226. Kakimi, K., et al., *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 921-30.
227. O'Farrelly, C. and I.N. Crispe, *Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system*. Immunol Today, 1999. **20**(9): p. 394-8.
228. Pruvot, F.R., et al., *Characterization, quantification, and localization of passenger T lymphocytes and NK cells in human liver before transplantation*. Transpl Int, 1995. **8**(4): p. 273-9.
229. Racanelli, V., et al., *Molecular characterization of B cell clonal expansions in the liver of chronically hepatitis C virus-infected patients*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 21-9.
230. Curry, M.P., et al., *Expansion of innate CD5pos B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver*. J Hepatol, 2003. **38**(5): p. 642-50.
231. Jenne, C.N. and P. Kubes, *Immune surveillance by the liver*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
232. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 322-35.
233. Yang, L., et al., *Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers*. Lab Invest, 2007. **87**(9): p. 927-37.
234. Winau, F., et al., *Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses*. Immunity, 2007. **26**(1): p. 117-29.
235. Wisplinghoff, H. and D.L. Appleton, *Bacterial infections of the liver*, in *Coparative hepatitis*, O.P. Weber, U., Editor. 2008, Springer: Switzerland. p. 143-160.
236. Pellicoro, A., et al., *Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 181-94.

237. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
238. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
239. Xu, R., Z. Zhang, and F.S. Wang, *Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(4): p. 296-301.
240. Bourbonnais, E., et al., *Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 130-139 e4.
241. Friedman, S.L., et al., *Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8681-5.
242. Brenner, D.A., et al., *Origin of myofibroblasts in liver fibrosis*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(Suppl 1): p. S17.
243. Atzori, L., G. Poli, and A. Perra, *Hepatic stellate cell: a star cell in the liver*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(8-9): p. 1639-42.
244. Friedman, S.L., *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*. Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 125-72.
245. Bonner, J.C., *Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(4): p. 255-73.
246. Oakley, F., et al., *Angiotensin II activates I kappaB kinase phosphorylation of RelA at Ser 536 to promote myofibroblast survival and liver fibrosis*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2334-2344 e1.
247. Horowitz, J.C., et al., *Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts*. Cell Signal, 2007. **19**(4): p. 761-71.
248. Klionsky, D.J., *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 7-18.
249. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Autophagy fuels tissue fibrogenesis*. Autophagy, 2012. **8**(5): p. 849-50.
250. Hernandez-Gea, V., et al., *Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 938-46.
251. Thoen, L.F., et al., *A role for autophagy during hepatic stellate cell activation*. J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1353-60.
252. Hsu, C.C. and R.F. Schwabe, *Autophagy and hepatic stellate cell activation - partners in crime?* J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1176-7.
253. Thoen, L.F., E.L. Guimaraes, and L.A. Grunsven, *Autophagy: a new player in hepatic stellate cell activation*. Autophagy, 2012. **8**(1): p. 126-8.
254. Marra, F., et al., *Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury*. Hepatology, 1998. **27**(2): p. 462-71.
255. Borkham-Kamphorst, E., et al., *Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis*. J Hepatol, 2007. **46**(6): p. 1064-74.

256. Pinzani, M., *PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells*. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. d1720-6.
257. Yoshiji, H., et al., *Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis*. *Gut*, 2003. **52**(9): p. 1347-54.
258. Marra, F., et al., *Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury*. *Hepatology*, 1995. **22**(3): p. 780-7.
259. Steiling, H., et al., *Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(4): p. 1233-41.
260. Yu, C., et al., *Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(4): p. 1653-62.
261. Bonacchi, A., et al., *Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 9945-54.
262. Ikeda, K., et al., *In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation*. *Hepatology*, 1999. **29**(6): p. 1760-7.
263. Hashmi, A.Z., et al., *Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **292**(1): p. G395-401.
264. Kinnman, N., et al., *PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury*. *Lab Invest*, 2000. **80**(5): p. 697-707.
265. Marra, F., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells*. *Hepatology*, 1999. **29**(1): p. 140-8.
266. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(3): p. 207-14.
267. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 562-73.
268. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
269. Peng, W.J., et al., *Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis*. *J Clin Immunol*, 2012. **32**(6): p. 1409-14.
270. Arthur, M.J., et al., *Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity*. *Biochem J*, 1992. **287** (Pt 3): p. 701-7.
271. Milani, S., et al., *Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver*. *Am J Pathol*, 1994. **144**(3): p. 528-37.
272. Han, Y.P., et al., *A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12928-39.
273. Schaefer, B., et al., *Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(6): p. 1771-80.

274. Vyas, S.K., et al., *Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture*. Gastroenterology, 1995. **109**(3): p. 889-98.
275. Han, Y.P., *Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21 Suppl 3**: p. S88-91.
276. Han, Y.P., et al., *Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4820-8.
277. Ariza, J., et al., *Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations*. PLoS Med, 2007. **4**(12): p. e317.
278. Murphy, F.R., et al., *Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11069-76.
279. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *TGF-beta: the master regulator of fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(6): p. 325-38.
280. Robertson, I.B., et al., *Latent TGF-beta-binding proteins*. Matrix Biol, 2015. **47**: p. 44-53.
281. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
282. Dooley, S., et al., *Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells*. FEBS Lett, 2001. **502**(1-2): p. 4-10.
283. Albayrak, A. and F. Albayrak, *Hepatic granulomas associated with brucellosis: Hepatic granulomas and brucellosis*. Hepat Mon, 2011. **11**(1): p. 1-2.
284. Young, E.J., et al., *Liver histology of acute brucellosis caused by Brucella melitensis*. Hum Pathol, 2014. **45**(10): p. 2023-8.
285. Akritidis, N., et al., *The liver in brucellosis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(9): p. 1109-12.
286. Spink, W.W., *The nature of Brucellosis*. 1956: p. 185-186.
287. Colmenero Jde, D., et al., *Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002. **42**(3): p. 159-67.
288. Cervantes, F., et al., *Liver disease in brucellosis. A clinical and pathological study of 40 cases*. Postgrad Med J, 1982. **58**(680): p. 346-50.
289. Colmenero, J.D., et al., *Complications associated with Brucella melitensis infection: a study of 530 cases*. Medicine (Baltimore), 1996. **75**(4): p. 195-211.
290. Pappas, G., et al., *Jaundice of unknown origin: Remember zoonoses!* Scand J Gastroenterol, 2006. **41**(4): p. 505-8.
291. Crosby, E., et al., *Hematologic changes in brucellosis*. J Infect Dis, 1984. **150**(3): p. 419-24.
292. Young, E.J., *Brucella species. Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed, ed. G.L. Mandell, J.E. Bennet, and R. Dolin. 2000, Philadelphia, USA: Elsevier. 2386-2393.

293. Ledro, D., et al., *The presence of granulomas due to Brucella melitensis in hepatitis*. J Infect Dis, 1983. 147(3): p. 606-7.
294. Park, K.W., et al., *Fatal systemic infection with multifocal liver and lung nodules caused by Brucella abortus*. Am J Trop Med Hyg, 2007. 77(6): p. 1120-3.
295. Jordans, H.G. and K.D. DeBruin, *Granulomas in Brucella melitensis infection*. Ann Intern Med, 1980. 92(2 Pt 1): p. 264-5.
296. Fernandez Fernandez, M.A., et al., *Brucellosis infection presenting with cholestasis*. Int J Infect Dis, 2010. 14 Suppl 3: p. e322-4.
297. Chourmouzi, D., et al., *Brucella liver abscess; imaging approach, differential diagnosis, and therapeutic management: a case report*. Cases J, 2009. 2: p. 7143.
298. Ariza, J., et al., *Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis*. Clin Infect Dis, 2001. 32(7): p. 1024-33.
299. Naveau, S., et al., *Brucellosis hepatic abscesses and pregnancy*. Gastroenterology, 1983. 84(6): p. 1643.
300. Williams, R.K. and K. Crossley, *Acute and chronic hepatic involvement of brucellosis*. Gastroenterology, 1982. 83(2): p. 455-8.
301. Gottlieb, J.S., *Undulant fever. An unusual case with necropsy*. New England Journal of Medicine, 1936(215): p. 781-783.
302. Collazos, J., et al., *Hepatic abscess, osteomyelitis and monoclonal gammopathy in chronic brucellosis*. Revista Clínica Española, 1984(174): p. 131-133.
303. Ladero, J.M., et al., *Abscesos hepáticos caseificantes múltiples por brucellas*. Revista Clínica Española, 1979. 4: p. 152-311.
304. Giorgio, A., et al., *Pyogenic liver abscesses: 13 years of experience in percutaneous needle aspiration with US guidance*. Radiology, 1995. 195(1): p. 122-4.
305. Canga, E., et al., *Abscesos hepáticos brucelares: curación tras tratamiento médico*. Gastroenterología y Hepatología, 1986. 9: p. 418-419.
306. Davion, T., et al., *Hepatic brucellosis (pseudotumoral brucellar caseous necrosis of the liver). Study of a case and review of the literature*. Gastroenterol Clin Biol, 1987. 11(5): p. 424-8.
307. Vargas, V., et al., *Brucellar hepatic abscess*. J Clin Gastroenterol, 1991. 13(4): p. 477-8.
308. Ventura, G., et al., *An unusual complication of brucellosis; hepatic abscess*. European Journal of Internal Medicine, 1992. 3: p. 269-273.
309. Yingst, S.L., et al., *A rhesus macaque (Macaca mulatta) model of aerosol-exposure brucellosis (Brucella suis): pathology and diagnostic implications*. J Med Microbiol, 2010. 59(Pt 6): p. 724-30.
310. Meneghin, A. and C.M. Hogaboam, *Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis*. J Clin Invest, 2007. 117(3): p. 530-8.
311. Gutierrez-Ruiz, M.C., G. Robles-Diaz, and D. Kershenovich, *Emerging concepts in inflammation and fibrosis*. Arch Med Res, 2002. 33(6): p. 595-9.

312. Kershenovich Stalnikowitz, D. and A.B. Weissbrod, *Liver fibrosis and inflammation. A review.* Ann Hepatol, 2003. **2**(4): p. 159-63.
313. Duarte, S., et al., *Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis.* Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 147-56.
314. Greene, J., et al., *Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4.* J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30375-80.
315. Willenbrock, F. and G. Murphy, *Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(6 Pt 2): p. S165-70.
316. Docherty, A.J., et al., *Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity.* Nature, 1985. **318**(6041): p. 66-9.
317. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases and the development of cancer.* Chem Biol, 1996. **3**(11): p. 895-904.
318. Arthur, M.J., *Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G245-9.
319. Bissell, D.M., D. Roulot, and J. George, *Transforming growth factor beta and the liver.* Hepatology, 2001. **34**(5): p. 859-67.
320. Verrecchia, F., M.L. Chu, and A. Mauviel, *Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17058-62.
321. Gressner, A.M., et al., *Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis.* Front Biosci, 2002. **7**: p. d793-807.
322. Xu, L., et al., *Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis.* Gut, 2005. **54**(1): p. 142-51.
323. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 712-23.
324. Hibbs, M.S., et al., *Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase.* J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2493-500.
325. Rajabi, M.R., et al., *Elevated tissue levels of collagenase during dilation of uterine cervix in human parturition.* Am J Obstet Gynecol, 1988. **159**(4): p. 971-6.
326. Tullberg-Reinert, H. and G. Jundt, *In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate.* Histochem Cell Biol, 1999. **112**(4): p. 271-6.
327. von Bargen, K., J.P. Gorvel, and S.P. Salcedo, *Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle.* FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 533-62.
328. Wright, M.C., et al., *Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats.* Gastroenterology, 2001. **121**(3): p. 685-98.
329. Mehal, W. and A. Imaeda, *Cell death and fibrogenesis.* Semin Liver Dis, 2010. **30**(3): p. 226-31.
330. Iredale, J.P., et al., *Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors.* J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 538-49.

331. Flamm, S.L., *Granulomatous liver disease*. Clin Liver Dis, 2012. **16**(2): p. 387-96.
332. Masure, S., et al., *Human hepatoma cells produce an 85 kDa gelatinase regulated by phorbol 12-myristate 13-acetate*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1054**(3): p. 317-25.
333. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(6): p. 375-536.
334. Kleiner, D.E. and W.G. Stetler-Stevenson, *Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases*. Anal Biochem, 1994. **218**(2): p. 325-9.
335. Kupai, K., et al., *Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010. **61**(2): p. 205-9.
336. Ikeda, M., et al., *Inhibition of gelatinolytic activity in tumor tissues by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor: application of film in situ zymography*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3290-6.
337. 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.
338. Arthur, M.J., *Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C*. Gastroenterology, 2002. **122**(5): p. 1525-8.
339. Issa, R., et al., *Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1795-808.
340. Pares, A., et al., *Histological course of alcoholic hepatitis. Influence of abstinence, sex and extent of hepatic damage*. J Hepatol, 1986. **2**(1): p. 33-42.
341. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
342. Liu, Y., et al., *IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF-beta-independent Smad signaling*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2814-23.
343. Flisiak, R., et al., *Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1--possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(47): p. 1369-72.
344. Flisiak, R. and D. Prokopowicz, *Transforming growth factor-beta1 as a surrogate marker of hepatic dysfunction in chronic liver diseases*. Clin Chem Lab Med, 2000. **38**(11): p. 1129-31.
345. Flisiak, R., B. Pytel-Krolczuk, and D. Prokopowicz, *Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis*. Cytokine, 2000. **12**(6): p. 677-81.
346. Roop, R.M., 2nd, et al., *Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche*. Mol Microbiol, 2004. **52**(3): p. 621-30.
347. Copin, R., et al., *In situ microscopy analysis reveals local innate immune response developed around Brucella infected cells in resistant and susceptible mice*. PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002575.
348. Oliveira, S.C., et al., *The role of innate immune receptors in the control of Brucella abortus infection: toll-like receptors and beyond*. Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 1005-9.

349. Oliveira, F.S., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 is essential for initial host control of Brucella abortus infection*. Infect Immun, 2011. **79**(11): p. 4688-95.
350. Ouyang, X., A. Ghani, and W.Z. Mehal, *Inflammasome biology in fibrogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 979-88.
351. Zechner, E.L., S. Lang, and J.F. Schildbach, *Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1592): p. 1073-87.
352. Sieira, R., et al., *Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon*. Mol Microbiol, 2004. **54**(3): p. 808-22.
353. Backert, S., N. Tegtmeyer, and M. Selbach, *The versatility of Helicobacter pylori CagA effector protein functions: The master key hypothesis*. Helicobacter, 2010. **15**(3): p. 163-76.
354. Franco, I.S., H.A. Shuman, and X. Charpentier, *The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors*. Cell Microbiol, 2009. **11**(10): p. 1435-43.
355. Ninio, S. and C.R. Roy, *Effector proteins translocated by Legionella pneumophila: strength in numbers*. Trends Microbiol, 2007. **15**(8): p. 372-80.
356. Ferrero, M.C., C.A. Fossati, and P.C. Baldi, *Smooth Brucella strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death*. Microbes Infect, 2009. **11**(4): p. 476-83.
357. Leask, A. and D.J. Abraham, *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 816-27.
358. Vaday, G.G., et al., *Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 613-21.
359. Zamboni, A.C., et al., *Gene expression patterns define key transcriptional events in cell-cycle regulation by cAMP and protein kinase A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8561-6.
360. Cohen, P., *Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(4): p. 309-15.
361. Westwick, J.K., et al., *Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6030-4.
362. Monack, D.M., A. Mueller, and S. Falkow, *Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(9): p. 747-65.
363. Adams, D.O., *The granulomatous inflammatory response. A review*. Am J Pathol, 1976. **84**(1): p. 164-92.
364. Elkington, P.T., C.M. O'Kane, and J.S. Friedland, *The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 12-20.
365. Wree, A., et al., *NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(10): p. 1069-82.
366. Lee, S.Y., et al., *Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by the cyclic-AMP system in lipopolysaccharide-stimulated rat primary astrocytes*. Neurochem Res, 2008. **33**(11): p. 2324-34.

367. Lee, C.W., et al., *TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **292**(3): p. L799-812.
368. Liu, X., et al., *cAMP inhibits transforming growth factor-beta-stimulated collagen synthesis via inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad signaling in cardiac fibroblasts*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(6): p. 1992-2003.
369. Schiller, M., et al., *Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-beta/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(1): p. 409-21.
370. Swaney, J.S., et al., *Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(2): p. 437-42.
371. Mallat, A., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27300-5.
372. Ikeda, N., et al., *Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell: In vitro study*. *Hepatology*, 2012. **42**(1): p. 91-102.
373. Berman, B. and M.R. Duncan, *Pentoxifylline inhibits normal human dermal fibroblast in vitro proliferation, collagen, glycosaminoglycan, and fibronectin production, and increases collagenase activity*. *J Invest Dermatol*, 1989. **92**(4): p. 605-10.
374. Berman, B., et al., *Pentoxifylline inhibits certain constitutive and tumor necrosis factor-alpha-induced activities of human normal dermal fibroblasts*. *J Invest Dermatol*, 1992. **98**(5): p. 706-12.
375. Preaux, A.M., et al., *Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells*. *Hepatology*, 1997. **26**(2): p. 315-22.
376. Duncan, M.R., et al., *Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP*. *FASEB J*, 1999. **13**(13): p. 1774-86.
377. Igotz, R.A. and J. Massague, *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(9): p. 4337-45.
378. Raghow, R., et al., *Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(4): p. 1285-8.
379. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 27-42.
380. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. *Nature*, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
381. Ravikumar, B., et al., *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(4): p. 1383-435.
382. Lamb, C.A., T. Yoshimori, and S.A. Tooze, *The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(12): p. 759-74.

383. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
384. Kuma, A. and N. Mizushima, *Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(7): p. 683-90.
385. Rubinsztein, D.C., *The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 780-6.
386. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
387. Cecconi, F. and B. Levine, *The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death*. Dev Cell, 2008. **15**(3): p. 344-57.
388. Deretic, V., *Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 53-62.
389. Cuervo, A.M. and F. Macian, *Autophagy, nutrition and immunology*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(1): p. 2-13.
390. Choi, A.M., S.W. Ryter, and B. Levine, *Autophagy in human health and disease*. N Engl J Med, 2013. **368**(19): p. 1845-6.
391. Flores-Toro, J.A., et al., *Autophagy in the liver: cell's cannibalism and beyond*. Arch Pharm Res, 2016.
392. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
393. Pohl, C. and S. Jentsch, *Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 65-70.
394. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
395. Noda, N.N., et al., *Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy*. Genes Cells, 2008. **13**(12): p. 1211-8.
396. Hohfeld, J., *Autophagy: Press and Push for Destruction*. Curr Biol, 2016. **26**(15): p. R703-5.
397. He, C. and B. Levine, *The Beclin 1 interactome*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 140-9.
398. Gallagher, L.E., L.E. Williamson, and E.Y. Chan, *Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms*. Cells, 2016. **5**(2).
399. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-41.
400. Suzuki, K., et al., *The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 5971-81.
401. Suzuki, K., et al., *Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization*. Genes Cells, 2007. **12**(2): p. 209-18.
402. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 741-52.

403. Mizushima, N., et al., *Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1679-88.
404. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
405. Mao, Y.Q. and X.M. Fan, *Autophagy: A new therapeutic target for liver fibrosis*. World J Hepatol, 2015. **7**(16): p. 1982-6.
406. Rautou, P.E., et al., *Autophagy in liver diseases*. J Hepatol, 2010. **53**(6): p. 1123-34.
407. Nwosu, Z.C., et al., *Evolving Insights on Metabolism, Autophagy, and Epigenetics in Liver Myofibroblasts*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 191.
408. Yamamoto, A., et al., *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
409. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
410. Luo, S. and D.C. Rubinsztein, *Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL*. Cell Death Differ, 2010. **17**(2): p. 268-77.
411. Micsenyi, M.C., et al., *Lysosomal membrane permeability stimulates protein aggregate formation in neurons of a lysosomal disease*. J Neurosci, 2013. **33**(26): p. 10815-27.
412. Rusten, T.E. and H. Stenmark, *p62, an autophagy hero or culprit?* Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 207-9.
413. Elsharkawy, A.M., F. Oakley, and D.A. Mann, *The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis*. Apoptosis, 2005. **10**(5): p. 927-39.
414. Wirawan, E., et al., *Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e18.
415. Djavaheri-Mergny, M., M.C. Maiuri, and G. Kroemer, *Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1*. Oncogene, 2010. **29**(12): p. 1717-9.
416. Mc, C.N. and C.W. Eisele, *Brucella hepatitis leading to cirrhosis of the liver*. AMA Arch Intern Med, 1951. **88**(6): p. 793-802.
417. Spink, W.W., *Brucellosis; epidemiology, clinical manifestations, diagnosis*. Semin Int, 1956. **5**(2): p. 15-7.
418. Preaux, A.M., et al., *Apoptosis of human hepatic myofibroblasts promotes activation of matrix metalloproteinase-2*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 615-22.
419. Abdel-Aziz, G., et al., *Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat*. Am J Pathol, 1990. **137**(6): p. 1333-42.
420. Dufour, J.F., R. DeLellis, and M.M. Kaplan, *Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis*. Ann Intern Med, 1997. **127**(11): p. 981-5.
421. Lee, Y.A., M.C. Wallace, and S.L. Friedman, *Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story*. Gut, 2015. **64**(5): p. 830-41.

422. Saile, B., et al., *CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair.* Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1265-72.
423. De Bleser, P.J., et al., *Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver.* Hepatology, 1997. **26**(4): p. 905-12.
424. Dekel, R., et al., *Gliotoxin ameliorates development of fibrosis and cirrhosis in a thioacetamide rat model.* Dig Dis Sci, 2003. **48**(8): p. 1642-7.
425. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.* EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
426. Mizushima, N., *Methods for monitoring autophagy.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2491-502.
427. Krizhanovsky, V., et al., *Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis.* Cell, 2008. **134**(4): p. 657-67.
428. Kisseleva, T., et al., *Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9448-53.
429. Troeger, J.S., et al., *Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice.* Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 1073-83 e22.
430. Panebianco, C., et al., *Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings.* Clin Exp Med, 2016.