

## **ACTIVACION DE MACROFAGOS MURINOS INFECTADOS POR *Brucella abortus***

**Jiménez de Bagüés M.P., Terraza A.\*, Dornand J.\***

Unidad de Sanidad Animal. SIA/DGA. Ap 727. 50080 Zaragoza. España.

\* INSERM U431. Université de Montpellier II. Cc 100. Pl. E. Bataillon. 34095 Montpellier. Francia

### **INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

*Brucella* es una bacteria Gram negativa capaz de ser fagocitada por los macrófagos del huésped y de multiplicarse dentro de ellos evadiendo sus mecanismos de defensa. Los factores de virulencia que determinan dichos mecanismos de evasión no son del todo conocidos.

El Lipopolisacárido (LPS) liso (S) de las bacterias pertenecientes al género *Brucella* se considera como un factor de virulencia de dichos microorganismos, si bien, el papel de la cadena O en la virulencia de *Brucella* no está completamente definido. El fenotipo liso sobrevive y se multiplica más eficazmente que el rugoso (R) tanto en animales como en modelos "in vitro". La atenuación de las cepas R puede explicarse por diferentes mecanismos, sin embargo, debido a la posición de la cadena O en la membrana externa se puede pensar en un posible papel modulador de dicha cadena O en la activación del macrófago tras la fagocitosis de *Brucella*.

Los objetivos del siguiente trabajo fueron, por tanto: estudiar la fagocitosis y el desarrollo intracelular de cepas lisas y rugosas de *Brucella abortus* en un modelo "in vitro" y analizar la activación inducida en el macrófago por diferentes cepas lisas y rugosas de *Brucella abortus*.

### **MATERIAL Y METODOS**

**Cepas utilizadas:** *B. abortus* 2308, fenotipo S, *B. abortus* 45/20 y RB51 fenotipo R, *B. suis* GFP (Green Fluorescent Protein) fenotipo S.

**Cultivo celular:** Los macrófagos murinos de la línea celular J774A.1 se cultivaron en medio completo (RPMI con 10% suero fetal bovino) a 37°C en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

**Experimentos de infección:** Se infectaron 10<sup>6</sup> macrófagos con una dosis de 40 bacterias por célula. El número de bacterias intracelulares se determinó transcurridas 1, 5, 24 y 48 horas desde la infección. Tras la lisis celular con Triton X100 la determinación realizó por medio de diluciones seriadas y posterior siembra en placas con Tripticasa Soja Agar (TSA). En los ensayos de coinfección las células se infectaron simultáneamente con una dosis de 40 bacterias/célula de cada cepa utilizada. En dichos ensayos para distinguir *B. suis* GFP de RB51 o de 45/20 se utilizaron placas de TSA suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina, ya que el crecimiento de las cepas R utilizadas está inhibido en ese medio.

**Análisis de MAPKinasas p38 y ERK:** Los macrófagos se infectaron con una dosis de 40 bacterias por célula. Tras lavar con PBS, las proteínas citoplasmáticas se obtuvieron mediante lisis celular, se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las MAPKinasas p38 y ERK se detectaron con anticuerpos anti-fosfo-p38MAPK, anti p38MAPK, anti-fosfo-ERK y anti-ERK según la metodología descrita por Lafont et al 1999.

**Análisis de la expresión de RNAm:** El análisis de la expresión de los RNAm de la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOs) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) de las correspondientes células infectadas con *B. abortus* se realizó por medio de una PCR transcriptasa inversa (RT-PCR) (Gross et al 1998).

**Cuantificación de TNF $\alpha$  y Óxido Nítrico.** La actividad biológica del TNF $\alpha$  liberado se estudió por medio de un ensayo citotóxico realizado en las células de la línea L929 (Caron et al.1994). La cantidad de óxido nítrico (NO) presente en los sobrenadantes de las células infectadas por *B. abortus* se determinó por medio de la reacción de Griess (Gross et al 1998).

**Análisis estadístico.** Los resultados obtenidos se analizaron mediante un test *t* de Student.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La invasividad de las cepas R de *B. abortus* fue significativamente mayor que la observada para la cepa 2308 (S), sin embargo, la virulencia observada en las cepas rugosas a lo largo del experimento fue menor que en la cepa 2308.

En el análisis de la expresión de RNAm del TNF $\alpha$  y de la iNOs, (enzima implicado en la producción de óxido nítrico) se encontró una mayor expresión de iNOs en las células infectadas por cepas R de *B. abortus* que en aquellas infectadas por la cepa lisa 2308. TNF $\alpha$  y NO son moléculas implicadas en la defensa del macrófago frente a patógenos. Respecto a la expresión del RNAm del TNF $\alpha$ , se observó que si bien las células infectadas por *B. abortus* 2308 mostraron cierto nivel de expresión de este gen, éste fue menor que el observado en las células infectadas por las cepas R de *Brucella abortus*.

Para determinar si dicha expresión de RNAm esta relacionada con la inducción de las correspondientes proteínas se determinó la cantidad de NO y TNF $\alpha$  liberada por los macrófagos infectados por *B. abortus*. Se encontraron niveles de NO significativamente más altos en los sobrenadantes de células infectadas por cepas R de *B. abortus* que en los de células infectadas por la cepa S 2308. Respecto al TNF $\alpha$  se observaron niveles significativamente más altos en los sobrenadantes de los macrófagos infectados por las cepas R.

Para determinar si la virulencia de la cepa lisa estaba asociada a la incapacidad de dichas bacterias para producir factores como NO y TNF $\alpha$ , se llevó a cabo la infección simultánea de *B. suis* GFP con *B. abortus* 45/20 o RB51. La fagocitosis de la cepa lisa no se vió afectada por la presencia de *B. abortus* 45/20 o RB51. Sin embargo, a las 48h postinfección el número de *B. suis* GFP fue significativamente menor en los macrófagos infectados simultáneamente con cepas S y R que en los macrófagos infectados solamente con la cepa lisa. Además, los productos NO y TNF $\alpha$  se acumularon en los sobrenadantes de las células coinfectadas mientras que no se hallaron en los provenientes de células infectadas sólo con la cepa lisa. Esta acumulación fué similar a la observada en los sobrenadantes de células infectadas únicamente con *B. abortus* 45/20 o RB51.

Uno de los mecanismos por los que *Brucella* puede regular la producción de estas moléculas que afectan al patógeno es la modulación de la señalización celular. Dicha señalización conlleva la activación del macrófago por medio de la fosforilación de las MAPKinasas p38 y ERK. Ambas proteínas estan relacionadas con la regulación de la transcripción de los genes de IL-1, TNF $\alpha$  e iNOs (Blumenthal et al 2002). Cuando se estudió la fosforilación de las MAPKinasas p38 y ERK tras la fagocitosis de *B.*

*abortus* se encontró que la fosforilación de dichas proteínas era inhibida por la cepa *B. abortus* 2308.

*B. abortus* 2308 es, por tanto, incapaz de activar los macrófagos para producir factores implicados en la defensa del mismo, como son el NO y el TNF $\alpha$ .

Debido a la relación entre la fosforilación de p38 y ERK y la producción de NO y TNF $\alpha$  en los macrófagos infectados por *B. melitensis* y *B. suis*, nuestros resultados apuntan la posibilidad de que el Lipopolisacárido liso de *B. abortus* sea un factor de virulencia que afecte a la señalización celular y por tanto a los mecanismos de defensa que de ella se derivan.

La regulación de algunas de las vías de activación del macrófago infectado por *Brucella* debería considerarse como un nuevo factor de virulencia de este patógeno.

## BIBLIOGRAFIA

**Blumenthal et al** 2002. Control of Mycobacterial Replication in Human Macrophages: Roles of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Infect. Immun.* 70: 4961-4967

**Caron et al** 1994. Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect. Immun.* 62: 5267-5274.

**Gross et al** 1998. Expression and Bactericidal Activity of Nitric Oxide Synthase in *Brucella suis*-Infected Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 66: 1309-1316.

**Lafont et al** 1999. Evidence for a p21 ras/Raf-1/MEK-1/ERK-2-indépendant pathway in stimulation of IL-2 gene transcription in human primary T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* : 274:25743