



Tesis doctoral:

# **Listeriosis Cerebral en el Modelo Murino: Patogénesis y Prevención**

**Elisabet Frande Cabanes**

Abril, 2017

Directoras:

Dra. Carmen Álvarez Domínguez

Dra. Mónica López Fanarraga

Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina

Universidad de Cantabria (UC)



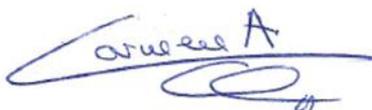
Dña. Carmen Álvarez Domínguez, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y Dña. Mónica López Fanarraga, Doctor in Philosophy, Doctora en Medicina y Cirugía y profesora titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cantabria

CERTIFICAN: que Dña. Elísabet Frande Cabanes ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que lleva por título “Listeriosis Cerebral en el Modelo Murino: Patogénesis y Prevención”

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por la interesada, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 24 de Abril de 2017

Carmen Álvarez Domínguez  
Doctora en Bioquímica y Biología Molecular



Mónica López Fanarraga  
Doctor in Philosophy y Doctora en Medicina y Cirugía





Este trabajo se ha financiado gracias a los proyectos: MINECO: SAF2009-08695 y SAF2012-34203; IDIVAL: INNVAL15/01; ISCIII: CIBER CIB16-NM009 y FIPSE 00-00002755-16



## **Agradecimientos**

*La realización de una tesis doctoral es un camino largo y complicado, donde aprendes y te desarrollas tanto en el ámbito profesional como en el personal. Compartes mucho tiempo con personas, muchas distintas a ti y con las que tienes que aprender a trabajar, a complementarte, puesto que el trabajo científico consta de una parte muy importante de colaboración y trabajo en equipo; además de la imprescindible fase de dedicación personal, sobre todo al final del camino, en la etapa de escritura, donde ya te encuentras tu solo ante el peligro.*

*Es por ello, que al final, termines compartiendo tu camino con bastantes y diferentes personas, con las que llegas a compartir tantos momentos que es casi imposible que no te marquen. Te dejan huella, para bien o para no tan bien a veces.*

*No quisiera olvidarme de nadie, pues ya son muchos los años que han pasado y las personas con las que he tenido el placer de compartir tantos días duros de trabajo y tantos otros, días muy merecidos, de buenas noticias, resultados y celebraciones. Lo primero, agradecer a mis directoras, Carmen Álvarez y Mónica López, porque es gracias a ellas que he tenido la oportunidad de embarcarme en esta gran experiencia que es la realización de una tesis doctoral, sin la oportunidad brindada por Carmen y el apoyo de Mónica esto no hubiera sido posible. Gracias por su paciencia, dedicación, criterio y tesón. Agradecer a Eugenio Carrasco, por los conocimientos que me ha transmitido, por sus consejos, por presionarme y conseguir siempre sacar lo mejor de mí, por apoyarme cuando otros no lo hacían. Ha sido un privilegio contar con su experiencia y profesionalidad. A esos grandes y maravillosos compañeros con lo que he tenido el placer de compartir trabajo y hacer equipo, compartir buenas nuevas y otros momentos algo más duros y quizás no tan buenos, tanto dentro como fuera del laboratorio. Ha sido un verdadero orgullo poder compartir esta experiencia con vosotros. Me gustaría hacer mención especial a las mejores compañeras que se puede tener, formamos un equipo coordinado y que congeniaba la perfección, a mis amigas, a mis compañeras...Estela Rodríguez, Marta Ruíz y Mariaje Lecea. Sólo puedo deciros, gracias compis! Agradecer también, cómo no, pues nunca podría olvidarme de ti, ese compañero que ha estado estos últimos años a mi vera, en todo momento, siempre atento a todo, tan buena persona y buen compañero, al más fiel, Ricardo Calderón.*

*Agradecer también a todas las personas del Departamento de Inmunología del Hospital Marqués de Valdecilla, en la etapa trabajando en el Hospital de Liencres, tanto al propio personal como a los que conforman los grupos de investigación, con vosotros he compartido no sólo espacio en la poyata o en las campanas de extracción de flujo, si no en los descansos, comidas, charlas y celebraciones. Gracias por vuestra amabilidad, predisposición a ayudar y*

*constante apoyo siempre. Ha sido un placer conocerlos y compartir una parte de mi etapa con vosotros. Gracias a Jorge, siempre dispuesto, con una sonrisa en la cara y unas buenas palabras siempre acertadas. Gracias a mis enfermeras favoritas, siempre tan preocupadas y dispuestas. Gracias a Gonzalo Ocejo por tu interés y apoyo, siempre son importantes las palabras bonitas y de ánimo. Gracias a Carol, primero aquí y después en el IDIVAL, dentro y fuera del laboratorio, siempre un gran apoyo, siempre con una palabra de ánimo y esa gran amistad que me llevo. Gracias a Sara, Lorena, David, Iñaki, Felipe... a todos los compañeros de otros grupos que siempre tenían un reactivo que prestarte, un consejo que darte o una buena conversación para compartir. Gracias también a los compañeros que me he ido encontrando en otros grupos de investigación durante mi etapa en el Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), han sido muchos para poder nombrarlos a todos, pero no por ello se resta importancia a ninguno. Gracias.*

*En el transcurso de este camino no sólo te afectan las situaciones y las personas del lugar de trabajo, el desgaste físico y sobre todo emocional es muy alto y el apoyo fuera es imprescindible. Agradecer a esas maravillosas amigas de la universidad, esas personas tan importantes en mi vida, qué sería de mí sin poder compartir todo con ellas, su apoyo y comprensión es inmejorable. Durante la etapa universitaria conoces a gente con la que compartes algo que es imposible de encontrar en otra parte. Gracias a Saioa, Ixtasne y Silvia, no sé en qué lugar del mundo, pero pronto nos reencontraremos. A mi familia, lo más importante en mi vida, mis padres, mis hermanas, mi tata y mi tío (estés donde estés nunca te irás de mi mente, siempre admirándote). Esto va por vosotros. Por todos esos momentos preciados que he tenido que estar lejos, ausente, cuando muchas veces me habréis necesitado ahí. A Rubén, simplemente decir que, sin ti a mi lado, en esta última fase del largo camino recorrido, no sé si lo hubiera podido conseguir o simplemente hubiera perdido la cordura en este encierro final. Gracias por estar siempre ahí, por tus ánimos, por escucharme y por ayudarme a que todo sea un poco menos difícil. Nadie dijo que fuera imposible, pero tampoco que fuera fácil, siempre he sabido que para conseguir algo hay que dar todo lo mejor de sí, trabajar duro, con esfuerzo y tesón. Terminas sacrificando lo más importante, el tiempo, ese tiempo de tu vida que te quitas de estar con la gente que quieres. Por ello, esta tesis va dedicada a todos vosotros, por ese tiempo.*

*Desde bien pequeña, adentrarme en el mundo de la investigación siempre ha sido mi sueño, poco a poco se va cumpliendo y he de agradecer a todas las personas que forman parte de ese compendio de oportunidades que me introducen día a día, cada vez más, en esta forma de vida, mi forma de vida.*

*Ahora, cuando crees que has llegado al final,  
te das cuenta de que esto acaba de comenzar*



## Abreviaturas

<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>actA</b>	Gen que codifica para ActA, una proteína responsable de la polimerización de actina.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>API</b>	Proteína activadora 1, es un factor de transcripción
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico (En inglés, RNA)
<b>BHI</b>	Del inglés, <i>Brain Heart Infusion</i> , infusión de cerebro y corazón, medio de cultivo para bacterias y hongos
<b>BMDM</b>	Del inglés <i>Bone-Marrow-Derived Macrophages</i> , hace referencia a las células macrófagos derivados de médula ósea
<b>BSA</b>	Del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i> , Seroalbúmina bovina
<b>CCL</b>	Ligando de quimiocina CC
<b>CCR</b>	Receptor de quimiocina CC
<b>CD4+</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>CD8+</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>CFU</b>	Del inglés, <i>Colony-Forming Unit</i> , unidades formadoras de colonias
<b>col.</b>	Colaboradores
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>CR3</b>	Receptor del complemento 3
<b>CR4</b>	Receptor del complemento 4
<b>Ctsd</b>	Catepsina D
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DC</b>	Del inglés, <i>Dendritic Cell</i> , célula dendrítica
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido, agente crioprotector
<b>DMEM</b>	Del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , medio de cultivo celular
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético

<b>EEA1</b>	Del inglés, <i>Early Endosome Antigen 1</i> , Proteína efectora de endosoma temprano 1
<b>FACS</b>	Del inglés, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , separación de células activadas por fluorescencia
<b>FBS</b>	Del inglés, <i>Fetal Bovine Serum</i> , suero bovino fetal
<b>FITC</b>	Del inglés, <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i> , isocianato de fluoresceína
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFP</b>	Del inglés, <i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente
<b>GM-CSF</b>	Del inglés, <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>HBE</b>	Buffer HEPES con EDTA
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanolsulfónico
<i>hly</i>	Gen de <i>Listeria monocytogenes</i> que codifica para listeriolisina O
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HRPO</b>	Del inglés, <i>Horse-Radish-Peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>InlA</b>	Internalina A
<b>InlB</b>	Internalina B
<b>IRFs</b>	Del inglés, <i>Interferon-Regulatory Factor</i> , factor de regulación del interferón
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>IMDM</b>	Del inglés, <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> , medio de cultivo celular
<b>LLO</b>	Proteína listeriolisina O
<b>LM</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MCP</b>	Del inglés, <i>Monocyte chemoattractant protein</i> , proteína quimiotáctica de monocito
<b>M-CSF</b>	Del inglés, <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> , Factor estimulador de colonias de macrófagos

<b>MG</b>	Microglía
<b>MHC-II</b>	Del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i> , Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
<b>MØ</b>	Macrófagos
<b>NEAA</b>	Aminoácidos no esenciales
<b>NF-k</b>	Del inglés, <i>Nuclear Factor Factor k</i> , factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN.
<b>NI</b>	No infectado
<b>NKs</b>	Del inglés, <i>Natural Killers</i> , linfocitos citolíticos naturales
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>p60</b>	Proteína formadora del septum
<b>PBS</b>	Del inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , tampón fosfato salino
<b>PC-PLC</b>	Fosfolipasa C dependiente de fosfatidilcolina específica
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares
<b>PNS</b>	Del inglés, <i>Post-Nuclear Supernatant</i> , sobrenadantes postnucleares
<b>prfA</b>	Activador transcripcional de los genes de virulencia
<b>Rab</b>	Proteína Ras del cerebro
<b>RI</b>	Índice de replicación bacteriana
<b>RPMI</b>	Del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> , medio de cultivo celular
<b>SD</b>	Del inglés, <i>Standard Deviation</i> , Desviación estándar
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>SLR</b>	Del inglés, <i>Signal Log Ratio</i>
<b>TLR</b>	Del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i> , receptor de tipo Toll

**TNF** Del inglés, *Tumoral Necrosis Factor Alfa*, factor de necrosis tumoral alfa

**TRITC** Del inglés. *5/6-tetramethyl-rhodamine*

**WT** Del inglés *wild type*, cepa silvestre

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. <i>Listeria monocytogenes</i>. Características generales.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Importancia histórica y actual.....</b>	<b>3</b>
<b>3. Patogenicidad y vía de colonización de <i>Listeria monocytogenes</i> en humanos...4</b>	
3.1. Patogenia de la bacteria	
3.2. Vías de colonización en el ser humano	
<b>4. Ciclo de vida de <i>Listeria monocytogenes</i> y sus factores de virulencia.....</b>	<b>10</b>
4.1. Ciclo de vida de <i>Listeria monocytogenes</i>	
4.2. Factores de virulencia	
<b>5. Inmunidad frente a la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>26</b>
5.1. Inmunidad innata/específica	
5.2. Inmunidad adquirida/específica	
5.3. Inmunidad humoral	
<b>6. Compartimentos intracelulares: Los fagosomas, dónde se destruye <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>32</b>
6.1. Destrucción fagosomal	
6.2. Destrucción citosólica	
6.3. Proteínas de membrana lisosomal	
6.4. Fagosomas con características lisosomales	
<b>7. Las células del sistema inmunológico del sistema nervioso central.     La microglía.....</b>	<b>39</b>
7.1. Sistema nervioso central	
7.2. Reactividad de la microglía	
7.3. Microglía y la respuesta inmune innata	
7.4. Microglía y la respuesta inmune adquirida	
<b>8. Tratamiento y prevención.....</b>	<b>48</b>

<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Soluciones y medios de cultivo.....</b>	<b>51</b>
1.1. Soluciones	
1.2. Medios de cultivo	
<b>2. Cepas bacterianas, líneas celulares y modelo animal.....</b>	<b>53</b>
2.1. Cultivo, crecimiento y conservación de las cepas bacterianas	
2.2. Líneas celulares	
2.2.1. Células de tipo macrófago J774	
2.2.2. Células de microglía murina BV2	
2.2.3. Neuronas HN9	
2.2.4. Para la obtención y diferenciación de macrófagos de médula ósea (BMDMs)	
2.2.5. Obtención de cultivos mixtos de células microgliales (Mixed-MG) y la microglía purificada (MG)	
2.3. Modelo animal	
<b>3. Péptidos, nanopartículas y adyuvantes.....</b>	<b>57</b>
3.1. Péptidos	
3.2. Nanopartículas y adyuvantes	
<b>4. Reactivos y anticuerpos.....</b>	<b>58</b>
4.1. Reactivos	
4.2. Anticuerpos	
<b>5. Equipos empleados.....</b>	<b>59</b>
<b>6. Metodología.....</b>	<b>60</b>
6.1. Ensayos en modelos murinos	
6.1.1. Modelo <i>in vivo</i> murino de listeriosis cerebral neonatal	
6.1.2. Pruebas clínicas en ratones	
6.1.3. Protocolos de vacunación de las ratonas gestantes	

6.1.4. Procesamiento de control como comprobación de la infección en los ensayos con ratones	
6.2. Obtención y ensayos con cultivos celulares de células microgliales mixtas y microglía purificada (MG)	
6.3. Estudios proteómicos	
6.3.1. Obtención y aislamiento de fagosomas y endosomas. Análisis de su composición proteica	
6.3.2. Análisis comparativo de fracciones fagosomal y citosólica	
6.3.3. Western-blot	
6.4. Ensayos de cinéticas de infección	
6.5. Expresión transcripcional de células microgliales	
6.6. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	
6.7. Estudios funcionales	
6.7.1. Medición de la producción de óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
6.7.2. Análisis de citometría de flujo	
6.7.3. Estudios de apoptosis celular	
6.8. Análisis estadístico	
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>1. Determinación de la célula diana en el sistema nervioso central (SNC).....</b>	<b>73</b>
<b>2. Los factores de virulencia de la célula diana y cómo actúan.....</b>	<b>77</b>
2.1. Cinéticas de infección en células microgliales y macrófagos: diferencias en la implicación de la LLO y otros factores de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	
2.2. Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en microglía. Nucleación de los filamentos de actina	
2.3. Localización subcelular de <i>Listeria monocytogenes</i> . Comparación entre microglía y macrófagos	
<b>3. Estudio de la expresión génica post-infección.....</b>	<b>86</b>
3.1. Microarrays y agrupamiento de genes inmunes. Patrones comunes y diferenciales del transcriptoma de macrófagos y microglía	

3.2. Verificación por proteómica. Expresión proteica en fagosomas purificados de macrófagos y microglía	
<b>4. Funciones fagocíticas afectadas relacionadas con el sistema nervioso central (SNC).....</b>	<b>92</b>
4.1. Producción de citocinas	
4.2. Mecanismos microbicidas oxidativos. Producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno	
4.3. Apoptosis neuronal. Análisis de la apoptosis neuronal por factores solubles liberados por microglía	
4.4. La diseminación de la infección a otras células fagocíticas	
4.4.1. Análisis de marcadores de superficie celular	
4.4.2. Apoptosis microglial	
<b>5. Modelo animal: ensayos de infección y vacunación <i>in vivo</i> en ratonas gestantes.....</b>	<b>107</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
<b>1. Discusión.....</b>	<b>118</b>
<b>2. Modelo de infección de <i>Listeria monocytogenes</i> en microglía.....</b>	<b>127</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>128</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>130</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>147</b>
Publicaciones relacionadas	

# **I. INTRODUCCIÓN**



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. *Listeria monocytogenes*. Características generales

*Listeria monocytogenes* es una bacteria gram-positiva, intracelular facultativa y patogénica del ser humano que produce una zoonosis denominada listeriosis, capaz de infectar también a otros animales. La infección por esta bacteria es causante de la listeriosis. Y su nombre viene dado en honor al cirujano inglés Joseph Lister

Se caracteriza por ser una bacteria no esporulada, catalasa positiva, oxidasa negativa y que crece fácilmente en agar sangre, produciendo beta-hemólisis incompleta (*Gray y col., 1966*). La longitud de la bacteria es de 0,5-2  $\mu\text{m}$  y su diámetro de 0,4-0,5  $\mu\text{m}$ . Crece en medios de cultivo sólidos ricos muy dependientes de  $\text{Mg}^{2+}$  y ricos en nutrientes (como *Brain heart infusion*, BHI). Tras 24-48 horas de incubación aerobia a 37°C, forman colonias redondas, translúcidas y de bordes lisos.

Tiene flagelos peritricos, los cuales permiten su movilidad en el medio ambiente a 30°C o menos, pero a 37 °C es inmóvil, puesto que sus flagelos se inactivan. A esa temperatura es a la cual la bacteria invade el organismo para infectar, por lo que recurre a otras estrategias propias, explicadas más adelante, para poder moverse dentro de las células (*Carrasco-Marín y col., 2009*).

Aunque su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30 y 37°C, son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas que varían desde 1°C hasta 43°C. También es capaz de resistir temperaturas de -20°C, que es por lo que es única y por lo que emerge con frecuencia en alimentos pre-cocinados congelados donde escapa a la secuencia de frío y emerge como un patógeno más habitual de lo normal (*Collins y col., 1991; Sallen y col., 1996*). Además, la bacteria es capaz de resistir condiciones ambientales adversas, ya sea alta salinidad (concentraciones de NaCl al 10-20%) o pH extremos (rangos entre pH 5 y pH 9), aunque el crecimiento óptimo se produce a pH neutro o ligeramente alcalino.

Esta capacidad para crecer en un amplio rango de condiciones puede explicar que las bacterias pertenecientes a este género estén ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo algunas de ellas patógenas para los animales y el hombre. Su hábitat es diverso,

pudiéndose aislar de diferentes ambientes como el agua, el suelo, el ensilado, las heces de animales o de distintos alimentos. Su ambiente normal es la materia vegetal en descomposición, comportándose como una bacteria saprófita. Se cree que su principal vector de propagación pudieran ser los rumiantes, debido a su ciclo oral-fecal (*Welshimer y col., 1971; Kampelmacher y col., 1980; Watkins y col., 1981; Rocourt y col., 1985; Fenlon y col., 1999*).

Actualmente el género *Listeria* comprende siete especies diferentes, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria murray*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* y *Listeria grayi* (*Rocourt y col., 1983; Rocourt y col., 1996*); de las cuales *Listeria monocytogenes* es el principal patógeno. Aunque *Listeria ivanovii* no ha sido aislada en casos de listeriosis en la especie humana, si se sabe que es un importante patógeno en animales.

Recientemente, también se han descrito otras dos nuevas especies denominadas *Listeria marthii*, aislada en un lago en EEUU (*Graves y col., 2010*) y *Listeria rocourtiae*, aislada en Austria en preparados de lechuga (*Leclercq y col., 2010*).

La enfermedad causada por la infección de esta bacteria, como se ha mencionado anteriormente, es denominada listeriosis. Ésta se adquiere por ingestión de alimentos contaminados, pudiendo causar septicemia, bactericemia, gastroenteritis, meningitis, meningoencefalitis y abortos.

El riesgo de listeriosis es muy elevado en mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y, en general, en individuos inmunocomprometidos.

Existe también una amplia variedad de especies animales que puede infectarse con *Listeria monocytogenes*, pero la listeriosis clínica veterinaria es esencialmente una enfermedad de rumiantes. Las manifestaciones clínicas principales de la listeriosis animal son similares a las que causa en humanos, como romboencefalitis, septicemias y abortos, e igualmente es una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo el medio ambiente la fuente principal de contaminación de alimentos y el ensilado la fuente más frecuente de transmisión (*Low y Donachie, 1997; Ramaswamy y col., 2007*). La mucosa intestinal es la vía de entrada principal, después de la ingestión oral, en el caso de una listeriosis septicémica/abortiva.

En general, *Listeria monocytogenes* es un patógeno bacteriano con tropismo por el tejido nervioso. En algunos modelos murinos se muestra que la invasión de *Listeria monocytogenes* en el sistema nervioso central (SNC) está facilitada por monocitos infectados que derivan de la médula ósea y se adhieren a las células endoteliales cerebrales activadas. Estos monocitos adheridos se acumulan en los vasos cerebrales e invaden el parénquima cerebral (*Join-Lamber y col., 2005; Oeverman y col., 2010*). Aunque la patogénesis de la listeriosis encefalítica es controvertida, parece que los microorganismos pueden entrar en las terminaciones nerviosas a través de abrasiones de la mucosa bucal, los labios, los orificios de la nariz, la conjuntiva o los dientes y, a continuación, migrar hasta causar una infección del sistema nervioso central (*Roberts y Wiedemann, 2003*).

## **2. Importancia histórica y actual**

La primera vez que se escuchó hablar de *Listeria monocytogenes* fue en 1926, por un brote espontáneo de una infección desconocida provocada en cobayas y conejos en la Universidad de Cambridge (Reino Unido), donde trabajaban Murray y sus colaboradores. El proceso se caracterizaba por una leucocitosis mononuclear (monocitosis) y lesiones necróticas en el hígado, por lo que se propuso el nombre de *Bacterium monocytogenes* para el microorganismo causante del brote (*Murray y col., 1926*). En 1927, Pirie aisló una bacteria a partir de focos necróticos del jerbo a la que denominó en primer lugar *Listerella hepatolytica* (*Pirie y col., 1927*) y fue más tarde, en 1940, cuando el propio Pirie llamó a este microorganismo patógeno con su nombre actual *Listeria monocytogenes* (*Pirie y col., 1940*).

Durante muchos años, el aislamiento de *Listeria monocytogenes* ha sido muy infrecuente, y la epidemiología de la enfermedad una incógnita. Sin embargo, a partir de finales de los años ochenta se empezaron a presentar brotes epidémicos en humanos en diferentes puntos de Europa y Estados Unidos, lo cual permitió asociarlos por primera vez con el consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* (*Piffaretti y col., 1989; Gray y Killinger, 1996*). Desde entonces se produjo un aumento de interés por este patógeno en los países desarrollados. Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de listeriosis humana son los productos elaborados que no

necesitan cocción o recalentamiento antes de su consumo, los productos lácteos y sus derivados, como por ejemplo los quesos no pasteurizados. En rumiantes, el origen de los brotes de listeriosis es también alimentario, en este caso está implicado el ensilado, un alimento elaborado por el hombre, cuya obtención defectuosa puede hacer que alcance un pH próximo al neutro, en lugar del pH ácido necesario para su conservación, permitiendo la rápida proliferación de *Listeria monocytogenes*. Es a partir de las materias primas obtenidas de los animales que consumen estos alimentos, donde se originan la mayoría de las contaminaciones de productos destinados al consumo humano.

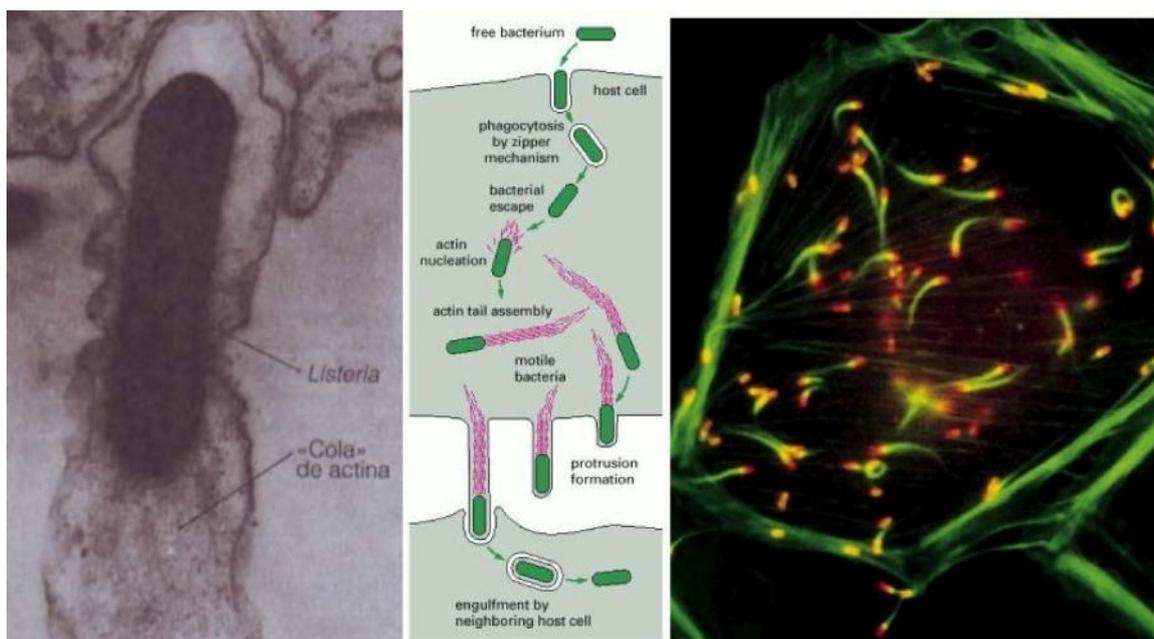
El cambio en los hábitos de alimentación producido en los últimos años, como un mayor consumo de alimentos listos para comer, precocinados, refrigerados o congelados, o los cambios en el sistema de producción primaria de los alimentos, como la modificación de las técnicas de procesado de los alimentos o los sistemas de almacenamiento en frío, han hecho que su incidencia se haya incrementado de 0.1% a 0.56%. *Listeria monocytogenes* se ha convertido en el origen de gran preocupación por parte de la Industria Alimentaria y las Administraciones de Salud Pública (Rocourt y Bille, 1997; Swaminathan, 2001).

Mucho antes del reconocimiento de *Listeria monocytogenes* como contaminante alimentario, esta bacteria era utilizada como modelo de patógeno intracelular por los inmunólogos (Mackness, 1969). La comprensión de los mecanismos celulares del sistema inmune de este microorganismo parásito intracelular ha servido como base para comprender conceptos básicos de su funcionamiento. Como fruto de la investigación básica que estudia este patógeno se ha revelado su aplicación biomédica y ha permitido la utilización de *Listeria monocytogenes* como vector en vacunas frente a diversas patologías. Así, *Listeria monocytogenes* ya ha mostrado ser efectiva en modelos experimentales frente a otros agentes bacterianos (*Salmonella*, *Legionella*), víricos (HIV, CDV) e incluso patologías de origen *a priori* no infeccioso como el carcinoma colorectal, carcinoma renal (Dietrich y col., 1998) o melanoma (Calderón-González y col., 2015; Calderón-González y col., 2016).

### **3. Patogenicidad y vía de colonización de *Listeria monocytogenes* en humanos**

#### **3.1. Patogenia de la bacteria**

*Listeria monocytogenes* es un patógeno facultativo intracelular que puede crecer en diversos tipos celulares como macrófagos, células epiteliales o fibroblastos. Tras la ingesta de alimentos contaminados, puede sobrevivir a la exposición de enzimas proteolíticas, ácidos gástricos y sales biliares. Posteriormente, las bacterias son internalizadas por las células hospedadoras gracias a la interacción de las proteínas de superficie bacteriana (internalinas) con los receptores para glucoproteínas. El microorganismo, gracias a dos enzimas diferentes como son la fosfolipasa C y la toxina bacteriana listeriolisina O (LLO), escapa del fagolisosoma de la célula hospedadora y experimenta una rápida división en el citosol de esta célula. A continuación, al inactivarse sus flagelos a temperatura aproximada de 37°C, y como consecuencia de la expresión de la proteína bacteriana denominada *ActA*, el microorganismo induce la polimerización de microfilamentos de actina que se reorganizan desde un polo de la bacteria formando una larga cola, que va empujando mecánicamente a la bacteria por el córtex celular. Esta capacidad de *Listeria monocytogenes* de polimerización de actina puede incluso generar la protusión de extensiones en la membrana celular, denominadas filópodos, que pueden servir al parásito para infectar a las células adyacentes sin tener que exponerse a las condiciones del medio extracelular. Puesto que los microorganismos pocas veces son extracelulares, los anticuerpos generados por la respuesta específica del hospedador no serían efectivos (**Fig.1**).



**Figural1.** Composición de tres imágenes. (Izquierda) Micrografía electrónica de transmisión que muestra a *Listeria monocytogenes* dentro de un macrófago infectado por la misma y la “cola de actina” de filamentos de actina en la parte posterior de la bacteria. (Central) Esquema del ciclo de infección donde se detalla la formación de la cola de actina. (Derecha) Imagen de microscopía confocal de *Listeria monocytogenes* en movimiento (en rojo la bacteria y en verde la actina).

*Listeria monocytogenes* se introduce en el tracto gastrointestinal, previa ingestión de alimentos contaminados y, una vez en el intestino, crece eficazmente dentro de los enterocitos, siendo posteriormente captada por los fagocitos mononucleares, lo cual permite que parte de su población alcance la circulación sanguínea y se disemine por vía hematológica. La patogenia correspondiente se ha logrado estudiar *in vitro*, debido principalmente a que el bacilo es capaz de reproducirse en el interior de macrófagos y células intestinales indiferenciadas y cultivadas en el laboratorio.

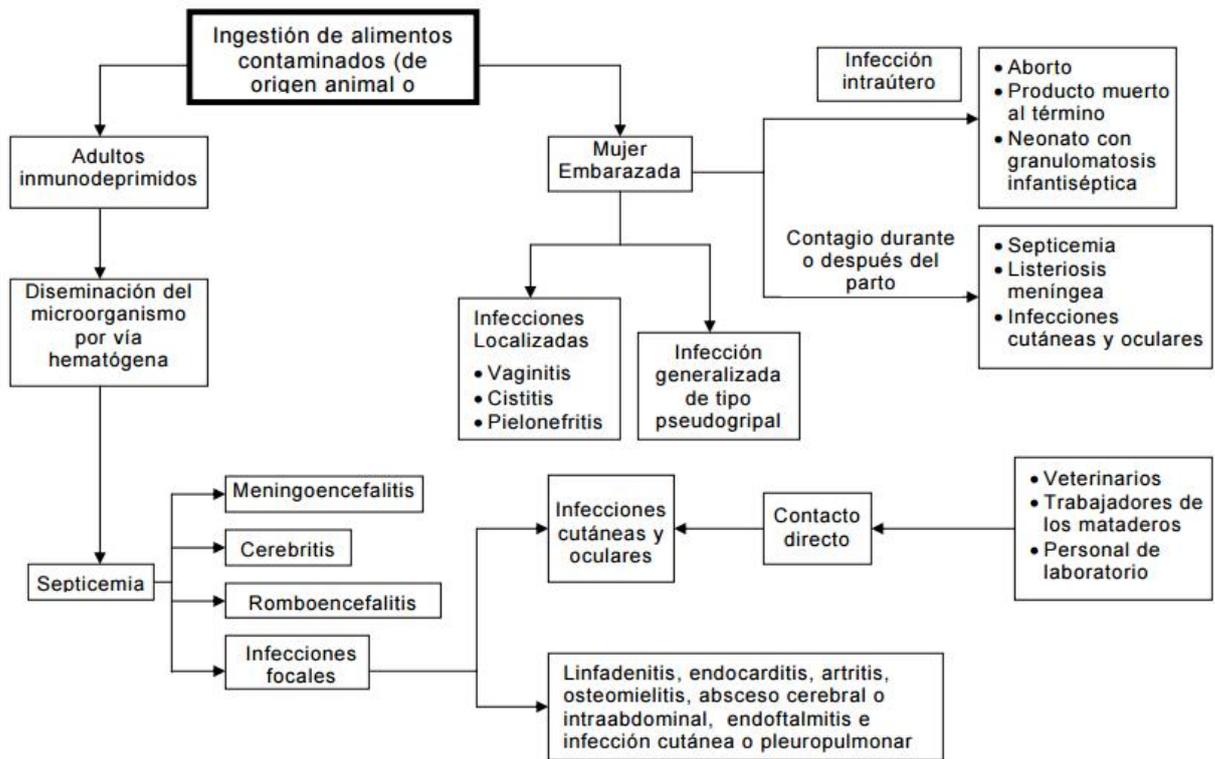
La importancia de la listeriosis en humanos se atribuye a su aparición como un patógeno oportunista, afectando principalmente a las poblaciones de riesgo: ancianos, neonatos (Becroft, 1971), mujeres embarazadas (Bartfield, 2000; DiMaio, 2000), y en general, a personas con alguna inmunosupresión o sometidas a tratamientos inmunosupresores como pacientes de cáncer, de trasplantes, VIH/SIDA, diabetes o alcoholismo. (Graham et al., 2002; Morrith et al., 2002; Nolla-Salas et al., 2002;

Vander et al., 2002), mientras que el resto de la población no suele verse afectada. Además tiene una alta tasa de mortalidad (30%) y periodos de incubación largos, que pueden variar desde unos pocos días hasta incluso tres semanas, los cuales suelen preceder a los síntomas gastrointestinales.

La sintomatología de la listeriosis es consecuencia característica de la habilidad del microorganismo para atravesar la barrera intestinal, la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica durante la infección. La aparición de septicemia ocurre principalmente en individuos inmunosuprimidos y va acompañada generalmente de enteritis, neumonía y, si afecta a mujeres embarazadas implica una bacteriemia que generalmente es causa de aborto.

La colonización del sistema nervioso central es responsable de dos manifestaciones clínicas: meningitis y encefalitis. La meningitis está asociada a la presencia de inflamación meníngea originada por la reacción inmunológica ante la presencia de un patógeno en el espacio subaracnoideo. Es el síndrome infeccioso más importante del sistema nervioso central (SNC). Cuando se pone en compromiso el parénquima adyacente a las meninges, se define la presencia de encefalitis (Paredes-Ballena y col., 2011). La meningitis es propia de la listeriosis neonatal, mientras que la encefalitis está más relacionada con casos de listeriosis en adultos o pacientes inmunosuprimidos (Fig.2).

El paso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria provoca la infección del feto, ocasionando aborto en el primer trimestre de gestación o, si llega a término, la muerte rápida del neonato debido a la septicemia generalizada con la que nace. En los niños recién nacidos el cuadro más severo de infección por este patógeno se conoce con el nombre de “granulomatosis infantiséptica”, que se manifiesta con la aparición de pequeños granulomas ampliamente diseminados por todo el organismo. También se pueden dar casos de infecciones locales, como endocarditis, mastitis, queratoconjuntivitis o miocarditis, sobre todo en personas que tengan una exposición muy directa y constante con la bacteria como es el caso del personal de laboratorio, veterinarios o personal de mataderos (Fig.2).



**Figura2.** Diagrama de la patogenia asociada a la infección por *Listeria monocytogenes*.

### 3.2. Vías de colonización en el ser humano

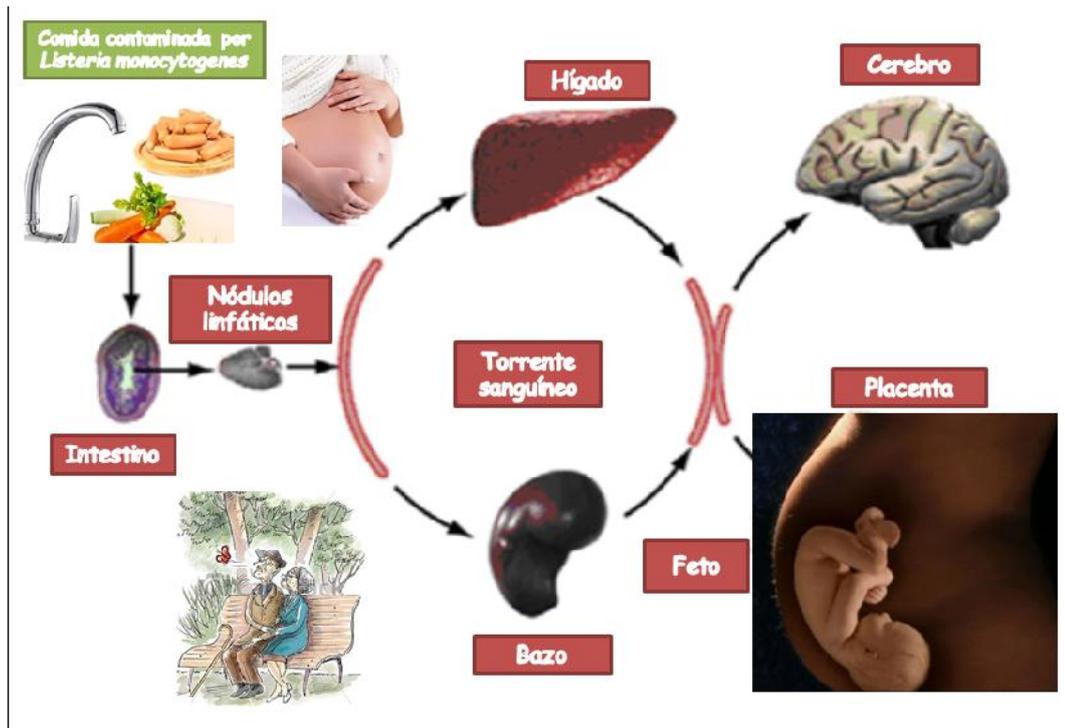
La vía de entrada de la bacteria más común en ser humano es a través de la ingestión de comida contaminada. Una vez que la bacteria ha entrado en el intestino, y ha pasado la barrera intestinal, en la que existe un ambiente muy adverso para la bacteria, ésta coloniza las células epiteliales intestinales y las células M que están ubicadas en las placas de Peyer, accediendo así a la zona basolateral. Posteriormente, el bacilo es englobado por los macrófagos residentes, dentro de los cuales puede sobrevivir y proliferar, antes de cruzar la barrera intestinal y diseminarse, por las vías linfática y sanguínea para pasar a los ganglios mesentéricos, el hígado y el bazo donde continúa su colonización, siendo éstos los órganos diana primarios de la infección. Es en el hígado, dónde más del 90% de las bacterias son eliminadas por células de Kupffer, los macrófagos residentes, gracias a las hidrolasas lisosomales y a los mecanismos oxidativos bactericidas. Más tarde, actuarán los neutrofilos y macrófagos

diferenciados de monocitos sanguíneos, que son atraídos al foco infeccioso debido a la destrucción de los hepatocitos por necrosis o apoptosis (Gregory y col., 1990). Durante las 6 primeras horas post-infección las células de Kupffer podrían participar en la respuesta adquirida y en la secreción de citocinas (Ebe y col., 1999). El sitio de multiplicación de *Listeria monocytogenes* en el hígado son los hepatocitos (Conlan y col., 1992); así el paso de hepatocito a hepatocito conduce a la formación de un foco infeccioso que permite a *Listeria monocytogenes* diseminarse a través del parénquima hepático sin entrar en contacto con los efectores del sistema inmune; lo que explicaría que los anticuerpos no tuvieran importancia en la inmunidad contra *Listeria monocytogenes* (Edelson y col., 1999).

Un porcentaje variable de *Listeria monocytogenes*, dependiendo de la dosis infectiva, es capaz de escapar de los fagosomas de las células de Küpffer y replicarse en su citosol. Desde el hígado, las bacterias llegan al bazo a través del torrente sanguíneo y es en el bazo donde son eliminadas completamente (Vázquez-Boland y col., 2001b) (Fig.3).

La dosis necesaria para que se produzca la infección no ha sido determinada aún con exactitud. Aun así, hay muchos factores que influyen, entre los principales se encuentran la cepa de la bacteria y el estado del sistema inmune del individuo. Si el sistema inmune es incapaz de controlar la infección en el hígado y bazo, *Listeria monocytogenes* podría causar una bacteriemia sintomática y prolongada, que podría llegar hasta la placenta y el cerebro.

El tratamiento de la listeriosis en humanos se realiza generalmente con antimicrobianos, siendo los más utilizados la combinación de ampicilina y aminoglucósidos, aunque también se suele utilizar en algunos casos vancomicina.



**Figura3.** Vía de colonización de *Listeria monocytogenes* en el ser humano. La vía de entrada de la bacteria es a través de la ingestión de comida contaminada. A partir de aquí la bacteria es capaz de cruzar la barrera intestinal y diseminarse a través de los ganglios linfáticos y del torrente sanguíneo hacia órganos como el hígado y el bazo. Si la infección es severa puede incluso llegar a la placenta y al cerebro, infectando el sistema nervioso central. (Figura modificada a partir de original de Cossart P. y Toledo-Arana A. *Microbes Infect.* (2008). 10(9):1041-50.)

#### 4. Ciclo de vida de *Listeria monocytogenes* y sus factores de virulencia

*Listeria monocytogenes*, al comportarse como un patógeno intracelular, puede sobrevivir dentro de los macrófagos e invadir células no fagocíticas como las células epiteliales, células endoteliales o hepatocitos (Gaillard y col., 1987; Kuhn y col., 1988; Dramsi y col., 1995; Drevets y col., 1995; Guzman y col., 1995; Dramsi y col., 1998). La capacidad de *Listeria monocytogenes* para escapar al citoplasma, proliferar y diseminarse a través de las células adyacentes es esencial para el potencial patógeno de la bacteria.

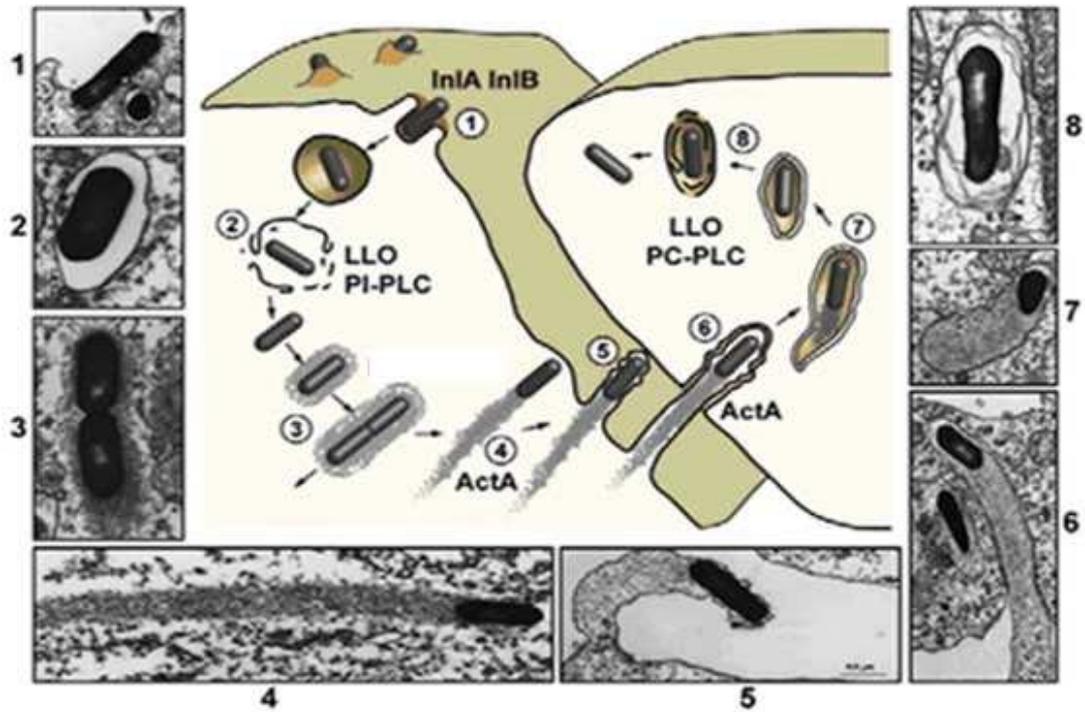
La invasión de *Listeria monocytogenes* en los macrófagos es un proceso que no dirige el patógeno, sino la célula; pero la entrada de *Listeria monocytogenes* en fagocitos no

profesionales es un mecanismo dirigido por la bacteria tras la unión de receptores específicos de superficie celular (Álvarez-Domínguez y col., 1993; Karunasagar y col., 1994; Álvarez-Domínguez y col., 1997a; Dramsi y col., 1998).

#### **4.1. Ciclo de vida de *Listeria monocytogenes***

El ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes* en ambos tipos celulares es similar e implica la acción de diversos factores de virulencia:

(1) en la entrada de la bacteria en la célula intervienen las internalinas, InlA e InlB; la proteína formadora del septum, p60; y la proteína que polimeriza actina, ActA (Álvarez-Domínguez y col., 1997a), a continuación, (2) la bacteria queda englobada en una vacuola que de forma genérica se denomina fagosoma (Gaillard y col., 1987), donde la bacteria queda sometida a un ambiente hostil; (2t) posteriormente, la bacteria modifica dicho fagosoma para crear un ambiente favorable para su supervivencia, lo que se produce en dos etapas: temprana y tardía. En la etapa temprana, la bacteria bloquea la maduración de este fagosoma inactivando al regulador del tráfico fagosomal/endosomal, Rab5, mediante la acción de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, GAPDH, e inhibiendo las interacciones con los lisosomas y secuencialmente después también con los endosomas (Álvarez-Domínguez y col., 1997b; Álvarez-Domínguez y col., 2008). En la etapa posterior o tardía, (2f) la membrana del fagosoma se rompe gracias a la acción conjunta de la LLO, proteína formadora de poros, y de la fosfolipasa PI-PLC en los fagosomas primarios y de LLO y la fosfolipasa PC-PLC en los fagosomas secundarios. (3) Tras la ruptura de la membrana fagosomal, la bacteria escapa al citosol, donde se replica y activa la polimerización de los filamentos de actina a su alrededor gracias a la acción de ActA, formando una estructura denominada “cometa” que le sirve de fuerza motriz propulsora (Gaillard y col., 1987; Portnoy y col., 1988). (4-6) Estas colas de cometa formadas por filamentos de actina, le permite a la bacteria pasar a la célula vecina sin tocar el medio extracelular y continuar el ciclo invadiendo otras células (Dabiri y col., 1990; Mounier y col., 1990; Theriot y col., 1992; Tilney y col., 1993; Theriot y col., 1995; Sechi y col., 1997; Robbins y col., 1999) (**Fig.4**).



**Figura4.** Representación esquemática del ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. Alrededor del esquema del ciclo se observan diversas micrografías obtenidas de microscopía electrónica que representan las fases de infección de *Listeria monocytogenes*.

El ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes* se inicia con su internalización en la célula hospedadora, ya sea por fagocitosis –en el caso de los macrófagos– o por fagocitosis inducida (invasión) en los fagocitos no profesionales. En todo caso, es el propio microorganismo el que promueve su endocitosis, asegura su libertad en el citosol de la célula eucariota, prolifera eficazmente y se desplaza hacia el exterior, para inducir su entrada en las células adyacentes, sin que ello represente su exposición a la acción defensiva de anticuerpos, complemento o células polimorfonucleares (PMNs).

En concreto, los eventos implicados en el proceso infeccioso global, son:

- A. Entrada a las células del hospedador
- B. Escape del fagosoma
- C. Desplazamiento intracitoplásmico.
- D. Diseminación célula a célula

## **A. Entrada a las células del hospedador**

Evidentemente, la forma en que el microorganismo invade las células no fagocíticas, es semejante a la clásica fagocitosis, ya que implica la interacción del ligando del primero con el receptor de las segundas y toda una serie de reestructuraciones en la membrana de la célula “blanco”, las cuales se producen mediante un mecanismo similar al cierre de las cremalleras *zipper*.

### Proteínas de *Listeria monocytogenes* que participan en la internalización. Las internalinas A y B y otros miembros de la familia Inl.

La entrada de *Listeria monocytogenes* en las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido identificar a la internalina A (InlA), proteína de 80 kDa que media la entrada bacilar a las células del epitelio intestinal humano (línea Caco-2) y a algunas otras células epiteliales. El gen *Inla* codifica a la proteína InlA que, a su vez, forma parte de una familia de multigenes llamada *Inl*, a la cual también pertenece el gen que codifica a InlB, molécula proteica de 67 kDa que promueve el ingreso bacteriano a los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y a otras líneas celulares, epiteliales o de fibroblastos, incluidas HeLa, HEP-2, L2 y Vero.

Además de las internalinas mencionadas anteriormente, se han descrito alrededor de 27 Inl en *Listeria monocytogenes* entre las que se puede mencionar InlC, InlC2, InlD y otras proteínas con actividad de autolisina como Auto, Ami y p60 (López y col., 2006). Junto a estas proteínas accesorias se tiene otra proteína LPXTG, la proteína Vip, que se encuentra unida al peptidoglicano y que también es necesaria para el ingreso de *Listeria monocytogenes* a varias líneas celulares epiteliales (Reis y col., 2010; Camejo y col., 2011). Sin embargo, InlA e InlB, siguen siendo los principales factores de virulencia implicados en la invasión celular, en especial en fagocitos no-profesionales (Pizarro-Cerdá y col., 2012). En este proceso de internalización son las modificaciones post-traduccionales que sufren los receptores de las InlA y InlB, E-cadherina y Met, las responsables de la activación de la cascada de señales que conlleva a la polimerización de los filamentos de actina, proceso fundamental para la internalización e invasión de *Listeria monocytogenes*. Además (Veiga y col., 2007), informan de la participación de clatrina en este proceso, hallazgo bastante sorprendente, ya que esta molécula se

relacionaba sólo con la internalización de macromoléculas. Actualmente, se conoce que clatrina actúa como una plataforma para el reclutamiento de proteínas como Dab2, Hip 1R y miosina VI, todas involucradas en el rearreglo de los filamentos de actina. Sin embargo, los eventos moleculares íntimos que se producen entre la endocitosis mediada por clatrina y los rearreglos de actina durante la invasión de *Listeria monocytogenes* no se conocen aún (Mostowy y col., 2012).

### Proteína p60

Esta proteína de 60 kDa se localiza en la superficie bacteriana y, además de resultar trascendental para el crecimiento celular por ser la proteína formadora del septum en su división, también participa en la invasión intestinal por *Listeria monocytogenes*; se trata de una mureína-hidrolasa ajena al gen regulador central de virulencia *prfA* y presente en todas las cepas virulentas. Cuando el gen que codifica para la p60 es afectado, las mutantes con bajos niveles de la proteína son filamentosas y manifiestan una pequeña o nula capacidad para invadir las células hospedadoras (Vera y col., 2013).

### ClpC ATPasa

Ésta pertenece a la familia de proteínas de choque térmico Clp (100 kDa), implicadas en la tolerancia al estrés de varios microorganismos procarióticos y eucarióticos. Su papel en la invasión es el de promover el escape bacteriano del compartimiento fagosómico de los macrófagos pero, además, favorece la invasión *in vivo*

### Las 2 vías de internalización de *Listeria monocytogenes*.

#### ❖ Ingreso mediado por la InlA

Esta vía de internalización también implica al receptor de la InlA: la caderina-E, la cual corresponde a una glicoproteína transmembrana (110 kDa) dependiente de  $Ca^{2+}$ , que se expresa principalmente en los tejidos epiteliales, incluido el tracto digestivo. Dicha proteína sustenta la adhesión célula-célula a través de las interacciones

homofílicas de sus dominios extracelulares, aunque también desempeña un papel crítico en la diferenciación de las células y en el mantenimiento de la cohesión y arquitectura del tejido. Al margen de la InlA, el único ligando heterofílico que reconoce a dicha caderina es la integrina humana E7, que media la adhesión entre los linfocitos intraepiteliales y los enterocitos. En las células epiteliales polarizadas, la caderina-E se localiza principalmente en la membrana basolateral y se concentra en las uniones adherentes; de acuerdo con ello, la entrada bacteriana mediada por la InlA, ocurre fundamentalmente a través de la cara basolateral (posterior) de las células epiteliales. La región extracelular de la caderina-E consta de 5 módulos, en el primero de los cuales se encuentra una secuencia (HAV), necesaria en las interacciones homofílicas. Este mecanismo de entrada sólo es factible en el hombre ya que los roedores, incluido el modelo experimental murino, carecen de caderina-E (Mostowy y col., 2012).

Los estudios recientes indican que la adhesión de *Listeria monocytogenes* a las células epiteliales depende de las repeticiones ricas en leucina (LRRs) de la InlA, las cuales reaccionan con el dominio extracelular de la caderina-E; adicionalmente, el dominio citoplásmico de esta última se asocia a las cateninas, las cuales interactúan con la actina del citoesqueleto. Es decir, la región citoplásmica de la caderina-E no interactúa con la InlA, pero se requiere para la internalización bacilar (Garza-Velasco y col., 2008).

#### ❖ Internalización mediada por la InlB

Otro mecanismo mediante el cual *Listeria monocytogenes* invade las células eucariotas está basado en la interacción de la InlB con su receptor gC1q-R, lo que a su vez, promueve otras reacciones trascendentales en cascada que conducen a la reestructuración de la actina del citoesqueleto.

Cabe destacar que el enlace de la InlB al gC1q-R depende de la presencia de cationes divalentes y que la región N-terminal altamente acídica de este último contiene la diana. De hecho, la entrada de la bacteria a la mayoría de las líneas celulares empleadas *in vitro* no es promovida por la InlA, sino por la InlB.

Una vez se produce la reacción internalina-receptor, sucede lo siguiente:

- Se fosforila la tirosina de tres proteínas de la célula hospedadora: Gab1, Cb1 y Shc, con lo cual éstas activan a la 3-kinasa fosfatidil-inositol (PI-3kinasa); dicha enzima representa una de las proteínas de señalización que promueve la internalización bacteriana.
- La proteína p85 de la PI-3kinasa, interactúa con proteínas tirosín-fosforiladas, lo que activa a las p85-p110, incrementando los niveles de fosfatidilinositol 3,4-difosfato y de fosfatidilinositol 3, 4,5-trifosfato. Ambos fosfoinositidos difunden y actúan como segundos mensajeros y su elevada concentración afecta a la curvatura de la bicapa lipídica membranosa, facilitando la internalización bacteriana (Vera y col., 2013).

## **B. Escape del fagosoma**

Una vez que *Listeria monocytogenes* ha entrado en la célula hospedadora, se lleva a cabo la lisis de la membrana vacuolar o fagosoma, mediante la acción de una potente toxina formadora de poros: la listeriolisina O (LLO), la cual promueve el escape del microorganismo antes de que ocurra la fusión fagolisosomal. Sin embargo, otros factores que participan en el proceso son: la fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) y la ClpC ATPasa, un miembro de la familia Clp-ATPasa de proteínas de estrés que promueve el escape del fagosoma en los macrófagos.

Adicionalmente, *Listeria monocytogenes* produce catalasa y superóxido dismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación fagolisosómica. Una vez realizada la lisis del fagosoma, el microorganismo es liberado al citosol, donde se multiplica con un tiempo de generación de 50 minutos, lo que se considera una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular.

### Listeriolisina O

La LLO es una exoproteína antigénica (60 kDa) codificada por el gen *hly* (“por *hemolysin*”) y perteneciente a una gran familia de citolisinas formadoras de poros activadas por grupos sulfhidrilo, cuyo prototipo es la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*. La LLO se enlaza al colesterol de la membrana celular e inserta y oligomeriza de 20 a 80 monómeros que forman los poros. Sin embargo, la LLO es,

entre las citolisinas, la única producida por una bacteria intracelular y activa a pH bajo, como el que actúa en el interior del fagolisosoma.

Además, esta hemolisina es responsable de la hemólisis tipo  $\beta$  que caracteriza a las colonias de *Listeria monocytogenes* en agar sangre. A este respecto, diversos trabajos han demostrado que las escasas cepas no hemolíticas de este patógeno suelen ser avirulentas debido a que, aunque llegan a ser invasivas, son incapaces de escapar de la vacuola fagocítica, también llamada fagosoma.

Dado que la LLO presenta una actividad máxima a pH 5 y es inactiva a pH 7, origina escasos efectos dañinos sobre la membrana celular cuando la bacteria se encuentra libre en el citosol; su vida media es muy corta en dicho ambiente, ya que se degrada rápidamente al ser fosforilada en tres sitios de su secuencia, secuencia conocida como PEST (por prolina, ácido glutámico, serina y treonina).

Por último, la LLO induce la apoptosis, estimula a diversas quinasas y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas (*Gedde y col., 2000; .Mostowy y col., 2012*).

### **C. Desplazamiento intracitoplásmico**

En términos más prácticos, puede señalarse que este microorganismo también manipula los componentes del citoesqueleto de la célula hospedadora para poder transitar intracelular e intercelularmente.

Esta particular forma de locomoción ha recibido gran atención de la comunidad científica, debido a su similitud con diferentes eventos celulares, tales como la migración de los neutrófilos hacia los sitios de infección o las metástasis de las células cancerígenas. La movilidad de *Listeria monocytogenes* se sustenta en el hecho de que, durante el proceso de internalización, la superficie bacteriana adsorbe varios filamentos cortos de actina (situados originalmente en el córtex de la célula “diana”), merced a la afinidad de ésta por la proteína de *Listeria monocytogenes*, ActA, la cual presenta una distribución polarizada sobre el bacilo; cuando la bacteria se encuentra en el citosol, nuclea microfilamentos de actina en uno de sus polos, esto impulsa a las bacterias y las asemeja a las colas de los cometas. La polimerización de la actina en uno de los polos de microorganismo aporta la fuerza locomotora para que *Listeria monocytogenes* transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3 $\mu$ m/seg. En general, las

colas propulsoras están constituidas por polímeros de actina, que mediante la velocidad de recambio (el efecto que produce el crecimiento de filamentos por un lado y decrecimiento por otro, a la misma velocidad), del microfilamento de actina producen un efecto de propulsión y desplazamiento bacteriano por el córtex celular.

Cabe señalar que la actina es uno de los componentes proteicos más abundantes del citoesqueleto y de las células eucariotas en general (5-15% de la proteína soluble total dependiendo del tipo celular), une  $\text{Ca}^{2+}$  y es una ATPasa que hidroliza 1 molécula de ATP al ensamblar cada monómero al polímero.

### ActA

Esta proteína de la superficie de *Listeria monocytogenes* de 90 kDa y 610 aminoácidos codificada por el gen ActA y consta de tres dominios:

- \_ El dominio N-terminal (de 1 a 234 aminoácidos), es fundamental para la polimerización de la actina en el citosol de la célula hospedera.
- \_ Un dominio central (de 235 a 395 aminoácidos), que no es indispensable, pero actúa como estimulador de la movilidad, debido a que contiene una región con 4 pequeñas repeticiones ricas en prolina, las cuales actúan como sitios de enlace para la proteína VASP.
- \_ El dominio C-terminal hidrofóbico (de 396 a 610 aminoácidos), con el cual la actina reacciona para quedar fija a la superficie bacteriana. ActA comparte similitudes con algunas proteínas eucarióticas relacionadas con la actina del citoesqueleto: su dominio N-terminal presenta secuencias homólogas a la región C-terminal de la vinculina, proteína humana que se asocia a las fibras de tensión y a adherencias focales.

Adicionalmente, el dominio N-terminal de ActA forma homodímeros, lo cual también representa un paso crítico en la polimerización de actina; al parecer, cada dímero se une a otro de actina y, gracias a ello, la cercanía entre los monómeros actínicos estimula el proceso de polimerización.

### ActA y su interacción con proteínas de la célula hospedadora

El hecho de que la ActA predomine en uno de los polos bacterianos y sea muy escasa en el opuesto, determina la dirección del movimiento. Evidentemente, para promover el desplazamiento bacilar, dicha molécula no sólo interactúa con actina, sino con otras proteínas del citoesqueleto hospedador, destacando VASP, profilina y Arp2/Arp3 (proteínas relacionadas con la actina), todas ellas se les ha detectado formando parte de las colas actínicas, cercanas a la superficie de *Listeria monocytogenes*. VASP (46-50 kDa) se enlaza a la región central de ActA y, al mismo tiempo, lo hace a profilina, con lo cual contribuye a una eficaz polimerización de actina; en cuanto a profilina (15 kDa), se une a los monómeros de actina y regula el ensamble de los filamentos actínicos. Por su parte, el complejo Arp2/Arp3 (43 kDa y 50 kDa, respectivamente) se ha localizado, tanto cerca de la superficie bacteriana como a lo largo de la cola de actina y, al parecer, se encarga de llevar a cabo la interconexión de los filamentos, a través de pequeñas ramificaciones. Lógicamente, la continuidad de la polimerización actínica durante el tránsito intracelular de *Listeria monocytogenes* requiere de la despolimerización secuencial de los filamentos para el permanente reciclaje de las subunidades monoméricas. En tales eventos sobresale la participación de otras proteínas del hospedador, sobresaliendo gelsolina, el factor despolimerizador de actina (ADF) y cofilina.

### **D. Diseminación célula a célula**

Incuestionablemente, la adquisición de movilidad asociada a filamentos actínicos tiene como su principal propósito que *Listeria monocytogenes* pueda invadir a otras células del hospedador. Una vez que han proliferado en el citosol de su primera célula “diana”, los bacilos se desplazan hacia la membrana celular de ésta y la “empujan” progresivamente (debido a la polimerización de actina en las colas), provocando que produzca prolongaciones alargadas, llamadas filopodios o protrusiones, desde cuyo interior continúan ejerciendo presión; de esta manera, dichas proyecciones terminan inyectándose en las células adyacentes, con lo cual la bacteria volverá a quedar encerrada dentro de un fagosoma (secundario), esta vez de doble membrana, del cual procederá a escapar y a repetir los eventos que protagonizó anteriormente.

Cabe señalar que, tanto en la formación de las protrusiones como en el propio englobamiento de estas últimas por parte de la célula adyacente, es posible que *ActA* desempeñe alguna función primaria aún desconocida. Sin embargo, el papel indirecto de dicha proteína es incuestionable ya que, durante la formación de las protrusiones, las colas de actina ligadas al microorganismo vuelven a insertarse, vía su región positiva, a la membrana celular de la primera célula diana; en otras palabras, a partir de ese momento y hasta su escape del fagosoma de la célula adyacente, el bacilo se encuentra acoplado a la membrana de la célula eucariota. Además de la *ActA*, tienen gran importancia las proteínas LLO y PlcA, que disuelven en la célula adyacente las membranas fagosomales, ahora doble membrana (*Gedde y col., 2000; Liu y col., 2007; Camejo y col., 2011*) y así la bacteria puede seguir su diseminación intracelular.

*Listeria monocytogenes* es un colonizador facultativo que se adaptó a un amplio rango de temperaturas, lo mismo crece en la nevera o en el suelo a 4°C como en el cuerpo de un hospedador a 37°C. En su hospedador, se adaptó rápidamente al ambiente pobre en oxígeno y se convirtió en patógeno. Esta transición entre la vida saprófita del microorganismo, viviendo de las plantas en descomposición, y la de un patógeno intracelular capaz de causar una grave enfermedad, es la causa de curiosidad de muchos investigadores.

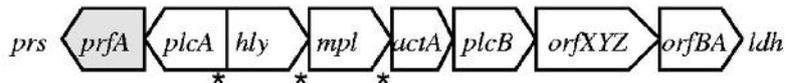
#### **4.2. Factores de virulencia**

Como se ha mencionado anteriormente, ya en 1989, Lewis Tilney y Dan Portnoy descubrieron la causa del movimiento a propulsión de *Listeria monocytogenes* en el interior de la célula. Descubrieron que este movimiento no lo realiza su flagelo. Este orgánulo es el principal propulsor de *Listeria monocytogenes* en el medio ambiente, pero antes de entrar en el organismo hospedador junto con los alimentos contaminados, que se encuentra a unos 37°C aproximadamente, la bacteria se desprende del flagelo, puesto que ya no le hará falta ya que éste se inactiva a esa temperatura.

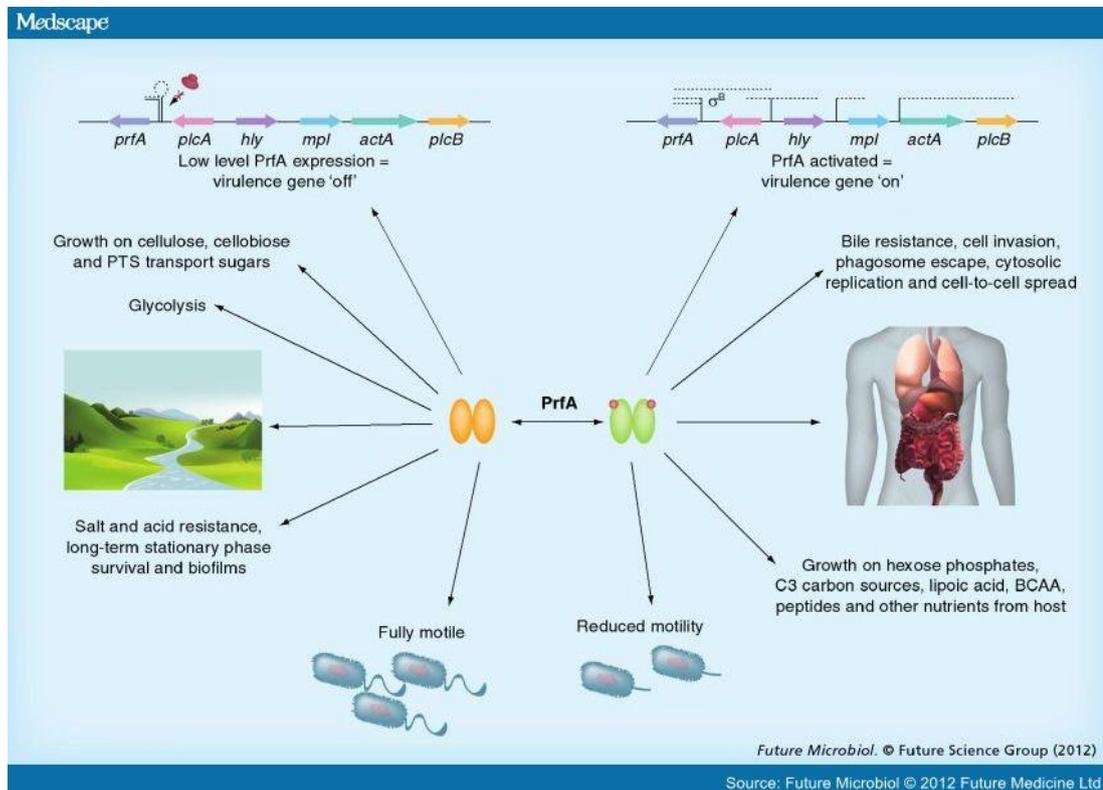
Comparando la velocidad de la polimerización de la actina en la célula hospedadora con la distancia recorrida, los investigadores se imaginaron que la bacteria avanzaba por la célula construyendo, peldaño a peldaño, una especie de escalera de actina.

Este gen que codifica para la proteína que produce esta cola de actina forma parte de un operón, el cuál también contenía el gen de la fosfolipasa. A este gen se le llamó *actA*, gen de Actina A (**Fig.5**).

*L. monocytogenes*



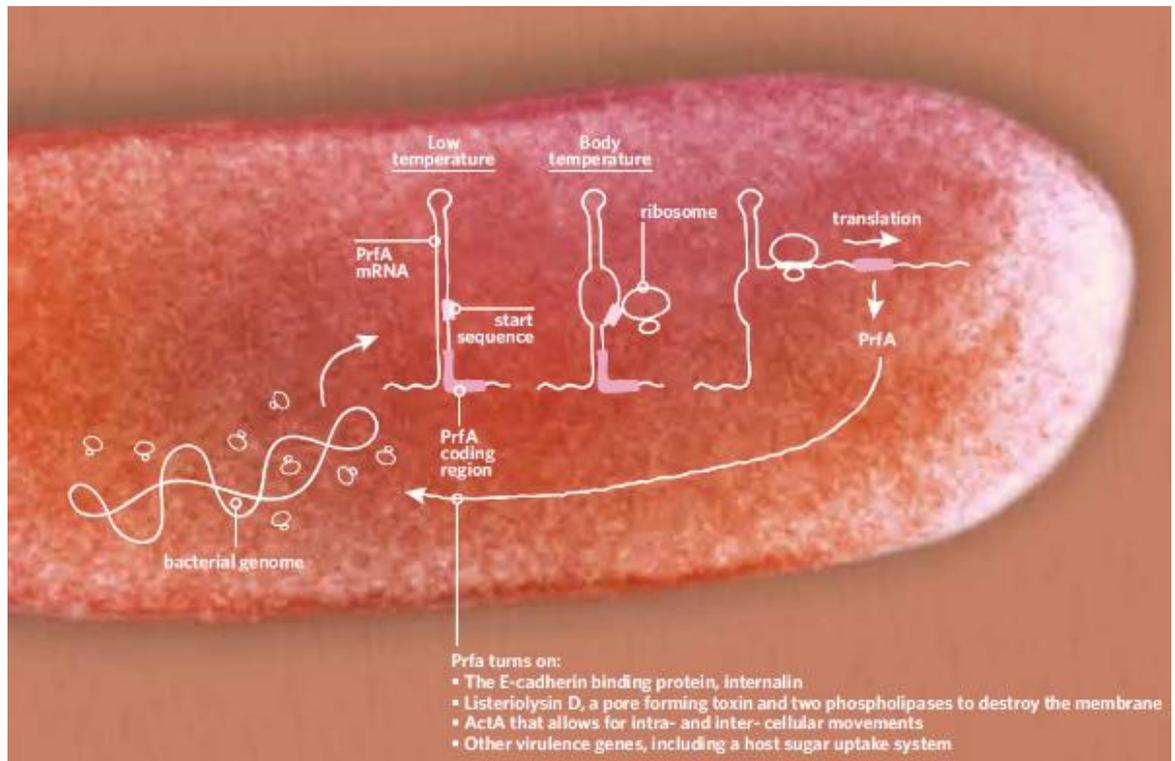
**Figura5.** Esquema del operón *prfA* que codifica para algunos de los factores de virulencia más importantes de *Listeria monocytogenes*.



**Figura 6.** Esquema representativo de la adaptación de *Listeria monocytogenes* de la vida saprofítica a la vida intracelular patogénica.

Todos los factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* tan sólo se producen a 37°C, temperatura basal de sus hospedadores mamíferos. Por el contrario, los genes de virulencia no se expresan a temperatura ambiente. Por ello se propuso la hipótesis de que un “interruptor” o un factor de transcripción que regula los genes principales de la

virulencia, que podría estar regulado por temperatura. Recientemente, demostraron cómo el sistema de regulación depende de la estructura temperatura-dependiente del ARN mensajero del gen *PrfA* que codifica para el factor transcripcional PrfA (**Fig.5**) (*Vera y col., 2013*). A temperaturas inferiores de 37°C, la secuencia terminal del ARN, se repliega formando una horquilla que hace inaccesible la secuencia de iniciación para que se una el ribosoma y se traduzca *PrfA*. A 37°C el ARN se despliega y *PrfA* puede traducirse, lo que dispara la expresión del conjunto de genes de virulencia del operón PrfA (**Fig.5 y Fig.6**). De este modo, la bacteria pasa de ser inofensiva a ser patógena a través de esta activación/inhibición de *PrfA*. A este elemento de ARN que actúa al principio de la transcripción se le denominó termosensor. Pero este termosensor no se comportaba como la mayoría de los ARNs pequeños, sino que se parecía a los elementos ribointerruptores, que forman una horquilla dentro de los ARNs mensajeros e inhiben su traducción.



**Figura 7** Diagrama del funcionamiento: activación/inhibición del operón PrfA.

El gen *prfA* funciona como interruptor principal de los genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* (Drevers y col., 1995). A temperaturas bajas (izquierda de la imagen anterior) (**Fig.7**), cuando la bacteria vive en materia vegetal en descomposición, la secuencia de iniciación del ARN mensajero de PrfA está plegada en forma de horquilla. Cuando la temperatura sube a 37°C, la temperatura del cuerpo (centro de la imagen anterior), la horquilla se abre y queda accesible la secuencia de iniciación a la que se une el ribosoma iniciando la traducción del mensajero del gen (derecha de la imagen anterior).

Tampoco se ha logrado identificar las moléculas de superficie que median la interacción “célula hospedadora–célula hospedadora” durante el proceso que engloba a la protrusión, ni si aquella incluye algún proceso activo o pasivo dependiente de la célula que actuará como receptora de bacterias.

Por el contrario, recientemente se han reconocido 3 factores de virulencia bacterianos implicados en la lisis de la vacuola de doble membrana: dos fosfolipasas (la lecitinasa PlcB y la PI-PLC o fosfolipasaA) y una metaloproteasa (Mpl).

#### Lecitinasa o fosfolipasaB

También conocida como fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PCPLC), exoproteína codificada por el gen *plcB* que, en su forma activa, provoca la destrucción de la vacuola de doble membrana mediante la hidrólisis de los lípidos de la membrana, como la fosfatidilcolina (PC). Su actividad óptima se produce de pH 5.5 a pH 7 y puede actuar sobre un amplio rango de sustratos, particularmente sobre la PC, pero también se puede unir a una gran variedad de fosfolípidos, incluidos la esfingomiélin, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina y a los liposomas. Esta lecitinasa o fosfolipasaB es secretada como un precursor inactivo (proPC-PLC) de 33 kDa, a partir del cual, por una escisión proteolítica en su región N-terminal, se genera la forma activa. Dicha activación puede ocurrir por dos mecanismos: el primero depende precisamente de la Mpl, dependiente de zinc, en tanto que, el segundo, es mediado por una proteasa de cisteína.

### Fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) o fosfolipasaA

A diferencia del mecanismo de formación de poros utilizado por la citolisina LLO, esta enzima (33 kDa) afecta a la membrana celular de las células hospedadoras hidrolizando el lípido de membrana, fosfatidilinositol (PI). Está codificada por el gen *plcA*, que desempeña un papel importante en el escape del bacilo, de las vacuolas de doble-membrana, de los fagosomas secundarios, en la célula vecina tras el paso de la bacteria de célula a célula. Su actividad catalítica es necesaria en otras numerosas funciones intracelulares de *Listeria monocytogenes*.

Para facilitar el proceso invasivo, algunos patógenos intracelulares producen factores de virulencia. En *Listeria monocytogenes* (ver sección anterior de factores de virulencia), los factores de virulencia se pueden clasificar en: i) factores de entrada; ii) factores fagosomales y iii) factores citosólicos. La adhesión y entrada de *Listeria monocytogenes* en la célula está dirigida por la acción de proteínas expresadas en la superficie de la bacteria como las internalinas, la proteína formadora del septum, p60 e incluso ActA (*Lecuit y col., 2000; Khelef y col., 2006; Pizarro-Cerdá y col., 2006; Camejo y col., 2011*).

Como se ha mencionado anteriormente, otro factor de virulencia de entrada presente en todas las especies del género *Listeria* es la proteína de superficie p60, codificada por el gen *iap*. Se ha relacionado el defecto en la producción de la p60 con una disminución de la virulencia de la bacteria, además de existir una relación con una reducción en la invasividad, particularmente en experimentos realizados con fibroblastos.

Resulta extremadamente difícil determinar el papel preciso que tiene la p60 en la virulencia ya que debido a su actividad mureina hidrolasa es esencial para la viabilidad celular, y los mutantes del gen *iap* son letales, ya que las bacterias pierden la capacidad de invasión (*Wuenscher y col., 1993*). Algunos autores sugieren que la p60 media la respuesta inmune innata a través de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B) e induciendo la producción de citocinas proinflamatorias (*Sashinami y col., 2010*)

Al traspasar la membrana plasmática *Listeria monocytogenes* queda incluida en vesículas fagocíticas (vacuola o fagosoma primario). Esta vacuola se fusiona con los

endosomas que contienen algunas enzimas proteolíticas y un pH ligeramente ácido. Posteriormente, estos fagosomas de *Listeria monocytogenes* también pueden interactuar con los lisosomas pero en un porcentaje muy bajo y de forma ineficaz. No obstante a estas vacuolas tras la fusión con endosomas y algún lisosoma se les ha denominado genéricamente, “fagolisosomas”, aunque su nombre correcto debería de ser “fagoendosomas”. Estos “fagolisosomas” son capaces de degradar un número significativo de bacterias, antes de que las bacterias viables restantes logren escapar al citosol.

En la etapa fagosomal temprana, la bacteria bloquea la maduración del fagosoma y las interacciones con los lisosomas; en esta inhibición participa la GAPDH(lmo2459) que inactiva al regulador del tráfico endosomal-lisosomal, Rab5a.

Las condiciones adversas en el interior del “fagolisosoma” no permiten la multiplicación de *Listeria monocytogenes*, pero inducen la secreción de otro factor de virulencia, del que se ha hablado anteriormente, la LLO. Ésta actúa tras la acción de la GAPDH(lmo2459), en la etapa fagosomal tardía y mediante dos acciones secuenciales. Primero, LLO se inserta y oligomeriza en las membranas fagosomales, lo que impide las interacciones con los lisosomas (Henry y col., 2006) y posteriormente, al ser una proteína formadora de poros y con la ayuda de otro factor de virulencia, la fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol, PI-PLC y codificada por el gen *plcB*, rompen la membrana fagosomal y la bacteria escapa al citosol, donde se replica. Existen evidencias de que en bacterias que carecen del gen de la LLO, denominadas *LLO*, la bacteria disminuye notablemente su capacidad invasiva y no es capaz de reproducirse, al no poder escapar del fagosoma (Glomski y col., 2003).

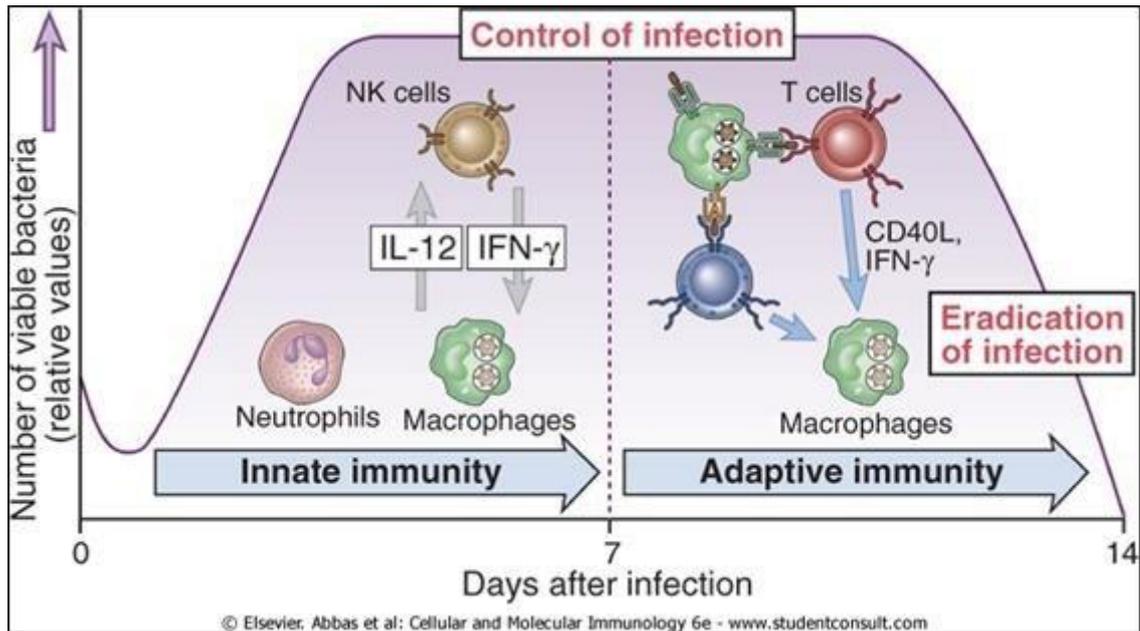
Como ya se ha mencionado, a la etapa fagosomal, prosigue la etapa citosólica, donde *Listeria monocytogenes* polimeriza filamentos de actina a su alrededor gracias a la acción de la proteína ActA, que interviene en la interacción de *Listeria monocytogenes* con la célula hospedadora, permitiendo el paso de la bacteria dentro de la célula infectada a otras células, y constituyendo posiblemente un ligando en el reconocimiento específico de los receptores de proteoglicanos de heparán sulfato de la célula eucariota (Alvarez-Dominguez y col., 1997). ActA está codificada por el gen *actA* y aquellas cepas bacterianas deficientes en ActA, en adelante denominadas *ActA*, presentan una menor capacidad de invadir las células vecinas debido al bloqueo en la diseminación de

célula a célula. Este filopodio, al tomar contacto con la célula vecina, es fagocitado, quedando la bacteria incluida en los fagosomas de la célula vecina lo que se denomina, vacuola ó fagosoma secundario/a y tras lo cual se reinicia un nuevo ciclo infeccioso. Estas vacuolas secundarias poseen una doble membrana y requieren la acción conjunta de la LLO, PI-PLC y otra fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina, PC-PLC, para disolver la membrana y poder escapar al citosol (Goebel y col., 1997; Bannam y col., 1999).

## **5. Inmunidad frente a la infección por *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* ha sido esencial para la comprensión de los mecanismos celulares del sistema inmune, como se indica en la sección anterior dedicada a la listeriosis experimental. Pero además, la utilización de *Listeria monocytogenes* en el modelo de infección murino ha servido para desvelar la importancia de los macrófagos activados en la defensa frente a patógenos intracelulares o la función del linfocito T en la activación del macrófago y la inmunidad celular (North y col., 1973; Valencia-Ortega y col., 2000)

La inmunidad frente a la infección por *Listeria monocytogenes* puede ser dividida en dos fases. La primera inespecífica o innata, mediada principalmente por células del sistema mononuclear fagocítico, neutrófilos y células asesinas naturales o NKs, y la segunda , una fase de inmunidad adquirida necesaria para la resolución completa de la infección mediada principalmente por linfocitos T específicos (**Fig.8**).



**Figura 8.** Esquema representativo del control de la infección por la respuesta inmunitaria.

### 5.1. Inmunidad innata/inespecífica

La respuesta inmune innata es esencial para la supervivencia de las células infectadas, e implica una interacción coordinada entre diversos tipos de células y la producción de numerosas citocinas. Este tipo de respuesta ha sido muy estudiada en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) que carecen de células B y T, lo cual permite el estudio de la respuesta innata frente a la infección con *Listeria monocytogenes* antes del desarrollo de la inmunidad celular. Estos ratones son muy resistentes a la infección en los primeros estadios, sin embargo son incapaces de detener la infección a largo plazo (Edelson y Unanue, 2000).

Después de producirse la infección con *Listeria monocytogenes*, la bacteria coloniza las células epiteliales del intestino y pasa a la zona basolateral de estas células donde los fagocitos (por ejemplo, macrófagos, células dendríticas y polimorfonucleares) disparan la generación de una respuesta inmune, con la secreción primaria de linfocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- e IL-12 (Fig.8).

Estas linfocinas activan la producción de IFN- por linfocitos T citotóxicos y células NKs, primera línea de defensa frente a la infección, lo que a su vez activa a los

macrófagos y permite el aclaramiento definitivo de la bacteria de forma intracelular en dichos macrófagos activados. Aquellas bacterias que no hayan podido ser eliminadas, pasan al hígado y al bazo. Tanto IFN- $\gamma$  como TNF- $\alpha$ , son dos citocinas esenciales en la defensa contra la infección por *Listeria monocytogenes*, lo que se ha demostrado en estudios con ratones deficientes en estas citocinas o de sus receptores, lo que provoca que estos ratones rápidamente sucumban a la infección. Es más, directamente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  promueven señales de activación en los macrófagos que aclaran intracelularmente a la bacteria, aunque los mecanismos bactericidas que ambas citocinas inducen en estas células sean distintos (Rothe y col., 1993).

Durante las etapas tempranas de la colonización hepática, los granulocitos polimorfonucleares son reclutados en los sitios de infección, en respuesta a la liberación de sustancias quimiotácticas por parte de los hepatocitos. Los neutrófilos desempeñan un papel clave en el control inicial de *Listeria monocytogenes*, ya que aparecen en los sitios de infección en las primeras 24 horas y destruyen la bacteria en los hepatocitos infectados, limitando de forma importante su multiplicación. La importancia de los neutrófilos fue demostrada por varios investigadores mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reducían su número durante la infección (Rogers y Unanue, 1993; Czuprynski y col., 1994). Los ratones con menor número de neutrófilos tienen una infección letal temprana, con grandes focos de bacterias en el parénquima hepático.

Rogers y col. demostraron que en la infección de los hepatocitos por *Listeria monocytogenes*, tanto *in vitro* como *in vivo*, se producía apoptosis de los hepatocitos y liberación de factores quimiotácticos por parte de los neutrófilos (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Rogers y col., 1996). Los neutrófilos migran al hígado y eliminan a los hepatocitos apoptóticos mediante la liberación de proteasas de los gránulos secretores, permitiendo la exposición extracelular de las bacterias y destruyendo las bacterias liberadas a través de la fagocitosis, lo que previene al mismo tiempo su diseminación a través del parénquima hepático.

Algunos trabajos muestran como la eliminación inicial de *Listeria monocytogenes* en el hígado no es trabajo único de los neutrófilos, sino que las células de Kupffer o macrófagos hepáticos, desempeñan también un papel destacado. Estas células liberan IL-1 y TNF- $\alpha$ , las cuales activarán en cierta manera a los nuevos macrófagos, derivados de monocitos sanguíneos que son capaces de matar intracelularmente a *Listeria monocytogenes*. Los macrófagos llegan al foco infeccioso inducidos por factores

quimiotácticos y citocinas tales como, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , factor estimulador de colonias e interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6 e IL-12) o la expresión de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, CD54).

La reacción inflamatoria se organiza dando lugar a la formación de granulomas que constituyen la lesión característica de la listeriosis murina y que forman una auténtica barrera física que frena la progresión del foco infeccioso. Así, las células de Kupffer pueden inhibir la proliferación de *Listeria monocytogenes* en el hígado directamente fagocitando y matando a los microorganismos, o indirectamente mediante la promoción de la respuesta biológica de otras poblaciones celulares, como promover la actividad antimicrobiana de los neutrófilos o la actividad de las células NKs (Essani y col., 1995). Además, los hepatocitos juegan también un papel importante en la regulación de la infección, ya que producen en su citosol niveles altos de NO en respuesta a TNF- $\alpha$  lo que elimina directamente un gran número de bacterias.

Aquellas bacterias que no han sido destruidas en el hígado pasan al bazo, donde se va a lograr su eliminación total en la mayoría de los casos, ya que este órgano tiene un potencial listericida tanto específico como inespecífico. Las bacterias son captadas inicialmente por neutrófilos y macrófagos situados en la zona marginal de la pulpa blanca del bazo y en menor medida por los de la pulpa roja (Conlan y col., 1996). Hacia el tercer día post-infección, se produce un incremento en la capacidad listericida de este órgano, lo que coincide con una afluencia masiva de macrófagos y neutrófilos (Kratz y Kurlander, 1998). Estos macrófagos, en las etapas tempranas de la infección, activarán a su vez a células NKs que liberan IFN- $\gamma$ , la citocina clave en el desarrollo de la listeriosis. Este hecho se demostró administrando anticuerpos que neutralizaban la acción del IFN- $\gamma$  lo que provocó la incapacitación de dichos ratones para controlar una infección subletal con *Listeria monocytogenes* (Nakane y col., 1990; Dunn y North, 1991). El IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos e induce citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-12, lo cual determina una respuesta TH1 característica de la listeriosis y aumenta la capacidad listericida de estos macrófagos, que logran la eliminación total de las bacterias. La IL-12 actúa como una de las principales citocinas que participan en la comunicación entre la inmunidad innata y adquirida (Unanue y col., 1997), ya que actúa sobre los linfocitos CD4, y sinérgicamente junto con IL-1 y TNF- $\alpha$  activan a las células NKs y a los linfocitos CD8 para liberar más IFN- $\gamma$ , retroalimentando el sistema hasta la completa eliminación de las bacterias.

## 5.2. Inmunidad adquirida/específica

La respuesta inmune innata frente a *Listeria monocytogenes* es necesaria para el control inicial de la infección, sin embargo el desarrollo de la inmunidad celular mediada por células T es crítico para eliminar completamente a la bacteria (*Emmerling y col., 1997*). Las células T memoria son también necesarias para la protección frente a una nueva infección con la bacteria. Tanto los linfocitos T cooperadores (CD4+) como los citotóxicos (CD8+) son fundamentales para lograr una resistencia eficaz contra la infección por *Listeria monocytogenes* (*Sasaki y col., 1990*). El reconocimiento y presentación antigénica por parte de las células T es un paso crítico para el aclaramiento de *Listeria monocytogenes* y también para establecer una protección frente a la bacteria. La inmunidad mediada por linfocitos T cooperadores depende de la presentación de antígenos por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y la de los linfocitos T citotóxicos por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), ambos MHC son necesarios para la inmunidad adquirida frente a *Listeria monocytogenes* debido a que este microorganismo está presente durante la infección, tanto en los fagosomas como en el citosol de las células presentadoras de antígeno, bien sean macrófagos o células dendríticas. Esto se ha puesto de manifiesto gracias a la descripción de epítomos dominantes capaces de transferir inmunidad frente a listeriosis. Hasta la fecha, se han descrito una serie de antígenos presentados bien en el contexto del MHC-I que activarían a linfocitos T citotóxicos, o bien presentados en el contexto del MHC-II que activarían a linfocitos T cooperadores (*Geginat y col., 2001*). También se han descrito una serie de péptidos liberados por *Listeria monocytogenes* en las células infectadas que son presentados a las moléculas de H2-M3, que son moléculas pertenecientes al MHC-I no clásico. Estos péptidos son hidrofóbicos y formilados e inician su secuencia con una metionina N-formilada.

Los antígenos de *Listeria monocytogenes* pueden ser presentados de diferentes formas según el tipo de célula infectada. Cuando *Listeria monocytogenes* se encuentra en el citosol de casi cualquier tipo de célula adherente, las proteínas secretadas por la bacteria serán degradadas por el proteasoma. Estos péptidos serán transportados al retículo endoplásmico, cargados en las moléculas MHC de clase I y presentados a la superficie celular por los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, las bacterias que son destruidas en los lisosomas van a ser presentadas a través de la molécula MHC de clase II a los

linfocitos T cooperadores. Los péptidos generados en los lisosomas también pueden ser transportados a través del retículo endoplásmico y ser presentados por el MHC de clase I a través de un proceso denominado presentación cruzada (*Heath y col., 2001*).

El papel de los linfocitos T cooperadores en el control de la infección por *Listeria monocytogenes* es menos conocido que el de los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T cooperadores también responden a la infección frente a *Listeria monocytogenes* confiriendo inmunidad protectora, aunque por mecanismos diferentes a los utilizados por linfocitos T citotóxicos para proporcionar inmunidad a largo plazo. Estudios realizados con ratones deficientes en el MHC-I o MHC-II sugieren que los linfocitos T citotóxicos son probablemente las células efectoras principales y críticas en la defensa contra la infección por *Listeria monocytogenes* (*Gregory y Liu, 2000*). Sin embargo, puesto que tanto los linfocitos T cooperadores como los citotóxicos son los responsables de la producción de IFN- durante la infección, ambos hipotéticamente podrían transferir inmunidad frente a *Listeria monocytogenes* (*Nakane y col., 1991*).

### **5.3. Inmunidad humoral**

La inmunidad de tipo humoral no es predominante en el establecimiento de la resistencia a la infección por *Listeria monocytogenes*, lo cual se demostró con el hecho de que no fuera posible conferir una inmunidad de tipo pasivo mediante el empleo de suero hiperinmune (*Miki y Mackaness, 1964*). *Listeria monocytogenes* se disemina de célula a célula eludiendo el contacto con el medio extracelular, y esta estrategia explicaría el por qué los anticuerpos prácticamente no intervienen ni en la eliminación de este patógeno tras la infección, ni en la protección frente a infecciones secundarias por *Listeria monocytogenes*, siendo la respuesta inmunitaria de tipo celular, estrictamente dependiente de células T cooperadores y citotóxicos, la única eficaz.

## 6. Compartimentos intracelulares: Los fagosomas, dónde se destruye *Listeria monocytogenes*

La fagocitosis es un mecanismo de la respuesta inmune innata en el que las células fagocíticas son capaces de detectar antígenos extraños. Dicho proceso se desencadena cuando las moléculas de la pared del microorganismo interactúan con receptores de la membrana de la célula hospedadora. El patógeno es secuestrado por la membrana plasmática encapsulado en los fagosomas primarios (Duclos y col., 2000; Marshall y col., 2001). Algunos patógenos intracelulares utilizan este mecanismo como vía de entrada a la célula para su replicación en otro compartimento, de tal manera que una vez dentro de la vesícula son capaces de lisarla y liberarse al citoplasma, como *Listeria monocytogenes*, o favorecen la fusión con el lisosoma soportando el pH ácido y las enzimas hidrolíticas del fagolisosoma, como algún parásito intracelular, por ejemplo *Leishmania major* (Via y col., 1997).

### 6.1. Destrucción fagosomal

Los principales mecanismos descritos hasta la fecha que participan en la destrucción fagosomal de *Listeria monocytogenes* son dos: (A) los mecanismos no oxidativos, denominados también lisosomales y (B) los mecanismos oxidativos.

#### A. Los mecanismos no oxidativos ó lisosomales

Estos se refieren al proceso de maduración fagosomal, es decir, a la modificación que sufren los fagosomas (o endosomas) y posteriormente con los lisosomas. Gracias a la maduración fagosomal, los fagosomas adquieren proteínas enzimáticas que reducen el pH fagosomal, como el complejo multienzimático de la protón ATPasa, H<sup>+</sup>-ATPasa, enzimas lisosomales hidrolíticas, como la familia de las catepsinas y proteínas lisosomales de membrana que colaboran en los procesos de fusión e interacción con los lisosomas, como las de las familias LAMP y LIMP (Duclos y col., 2000).

Pero además, de enzimas lisosomales, reguladores del pH, hidrolasas y proteínas de membrana; los fagosomas también adquieren otras proteínas reguladoras endosomales denominadas GTPasas de la familia Rab; las cuales juegan un papel relevante como

reguladoras del proceso de maduración fagosomal. Se trata de proteínas de bajo peso molecular de 25 kDa que se unen a fosfonucleótidos de guanosina (GTP) y presentan dos estados conformacionales, un estado activo, caracterizado por la unión a GTP y un estado inactivo de unión a GDP. Para pasar de un estado inactivo a otro activo, las Rabs requieren de proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina (en inglés *GEFs*, de *GTP-exchange factors*) y una vez realizada la función tienen que volver a la forma inactiva o GDP, gracias a la acción de proteínas de activación de GTPasas (en inglés *GAPs*, de *GTPase activating protein*) que favorecen la hidrólisis de GTP (*Moisenovich y col., 2004*). En su estado inactivo, las Rabs se unen a las membranas donde se transforman en su estado activo y regulan la unión de otras proteínas efectoras y favorecen así la fusión entre distintos compartimentos (*Via y col., 1997; Simpson y col., 2004*). Rab5 y Rab7 son las GTPasas implicadas en distintos estadios de este proceso de maduración fagosomal, de tal manera que la función Rab5, da paso a la función de Rab7 (*McBride y col., 1999*). Rab5 es la primera proteína que se une a la membrana plasmática y a la membrana de endosomas tempranos en su forma inactiva o GDP transportada por la proteína GDI (Proteína inhibidora de la disociación guanidil) desde el citosol, donde se sintetiza e isoprenila para poderse anclar en las membranas. Una vez en la membrana se produce el intercambio GDP por GTP en la que participa Rabex-5, proteína de intercambio de nucleótidos de guanina o GEF. Rab5-GTP favorece la fusión entre endosomas tempranos así como entre endosomas y fagosomas. En este proceso participa también la proteína efectora de endosoma temprano 1 (EEA1), capaz de unirse sólo a la forma activa de Rab5 unida a GTP. EEA1 es capaz de unirse a dos moléculas Rab5 de distintos compartimentos, cooperando con la fusión entre membranas (*Vieira y col., 2003; Dinneen y Ceresa, 2004; Su y col., 2006*).

Estos mecanismos no oxidativos están presentes en todos los macrófagos, activados o no, aunque son más potentes tras la activación de los macrófagos mediante citocinas pro-inflamatorias, siendo la citocina inductora más importante, el IFN- $\gamma$ . En macrófagos no activados, *Listeria monocytogenes* logra escapar del fagosoma y replicarse en el citosol. Para ello utiliza la estrategia de reclutar e inhibir la función de Rab5a así como bloquear las interacciones con los lisosomas y secuencialmente también con los endosomas. Los estudios que nos permitieron descubrir parte de esta estrategia se realizaron con bacterias deficientes en LLO vivas, las cuales eran incapaces de

escapar del compartimento vacuolar y se compararon con los resultados obtenidos con bacterias inactivadas por calor (en inglés *heat killed Listeria monocytogenes* o *HKLM*). Los fagosomas que contienen *HKLM*, acumulan marcadores endosomales tardíos y lisosomales, luego eran fagosomas maduros y degradativos. Mientras que los fagosomas que contienen bacteria deficiente en LLO pero viva, no maduran y acumulan Rab5 (Álvarez-Domínguez y col., 1997b). Esta estrategia se correlaciona con un aumento de la viabilidad dentro del fagosoma y un bloqueo de la función de Rab5 .

También se ha descrito que el factor de virulencia GAPDH(lmo2459) interviene en esta etapa e inactiva a Rab5 (Álvarez-Domínguez y col., 2008).

Pero además, esta estrategia también evita el transporte de hidrolasas lisosomales al fagosoma, tales como catepsina-D; lo que se podía interpretar como una forma de evadir la destrucción intracelular (Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Prada-Delgado y col., 2006). En este sentido, el grupo de la Dra. Carmen Álvarez-Domínguez ha investigado esta hipótesis utilizando macrófagos de ratones deficientes en las dos catepsinas fagosomales, catepsina-D y catepsina-L. Estos estudios revelaron que la catepsina-D tiene capacidad listericida dentro de los fagosomas. Esta acción listericida es enzimática y se localiza en el undecapéptido conservado de LLO, que contiene también el sitio de unión a las membranas fagosomales. Estos estudios localizaron dicho sitio de corte enzimático entre los aminoácidos 491-W-W-492. La inactivación de LLO por la catepsina-D afecta a su capacidad para escapar del fagosoma. Por ello, la bacteria dirige su acción a evitar la presencia fagosomal de catepsina-D (Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marin y col., 2009). Sin embargo, en macrófagos activados por IFN- $\gamma$ , ni la GAPDH(lmo2459) logra inhibir a Rab5a que logra activarse a su conformación Rab5a-GTP, ni el bloqueo en el transporte de catepsina-D al fagosoma es eficaz; por lo que LLO es degradada enzimáticamente por catepsina-D y la bacteria no puede escapar del fagosoma siendo eliminada (Prada-Delgado y col., 2001; Carrasco-Marín y col., 2009).

## **B. Los mecanismos oxidativos**

Estos mecanismos son inducidos tras la translocación a la membrana fagosomal de un complejo multienzimático conocido como la NADPH-oxidasa u oxidasa fagosomal (*phox* en inglés). Los productos de la acción de la *phox*, como el anión superóxido  $O_2^-$  que origina otros dos radicales como el peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ , y el radical

hidroxilo  $\text{OH}^-$ , tienen capacidad listericida por sí mismos. Para que se induzca la actividad de la *phox* en la membrana, se requiere de la acción de un regulador que se transloca a los fagosomas y en su forma activa induce un cambio conformacional en la *phox*, activándola. Este regulador es una GTPasa de la familia Rho, Rac-GTP. El grupo de la doctora Carmen Álvarez Domínguez describió que la activación de Rac2 GTP en los fagosomas que contenían el patógeno *Listeria monocytogenes*, necesita de Rab5a-GTP en dichos fagosomas, ya que la inhibición de la expresión de Rab5a bloqueaba este proceso en los macrófagos. Esta activación de la *phox* aumentaba significativamente la actividad listericida dentro de los fagosomas (Prada-Delgado y col., 2001). Esto se produce tanto en macrófagos en reposo, como en macrófagos activados por  $\text{IFN-}\gamma$ , señal que incrementa en al menos 100 veces, la actividad de la *phox*.

Los mecanismos oxidativos incluyen, por una parte, la producción de  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{OH}^-$  en los fagosomas; por parte de la NADPH-oxidasa fagosomal o *phox*, como hemos visto en el apartado anterior, y por otra parte, la producción de óxido nítrico, NO, por parte de la nitrato sintasa inducible o iNOS.

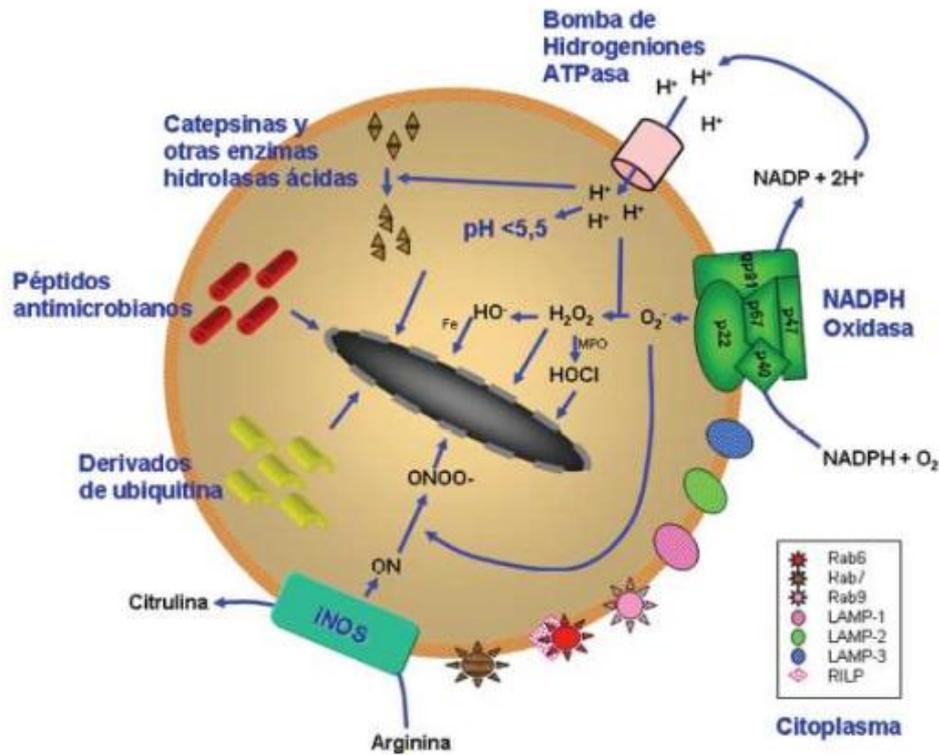
## 6.2. Destrucción citosólica

La iNOS se localiza en la membrana fagosomal, pero los productos de su reacción se vierten en el citosol. Estos mecanismos oxidativos están controlados por la inducción de ciertas citocinas como  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-6 o  $\text{TNF-}\alpha$ , que promueven la producción de  $\text{NO}_2$  en el citosol, mientras que el  $\text{IFN-}\gamma$  y la IL-6 favorecen el aumento de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fagosomales. La activación de los macrófagos mediante el  $\text{IFN-}\gamma$  va a provocar un aumento de la fagocitosis, lo cual va a prevenir parcialmente el escape de *Listeria monocytogenes* al citosol, desencadenando a su vez la producción de radicales tóxicos, como son los intermediarios reactivos de oxígeno (en inglés ROI, de *reactive oxygen intermediates*) o los intermediarios reactivos de nitrógeno (en inglés RNI, de *reactive nitrogen intermediates*), que conducen a la eliminación del microorganismo. Así lo demuestran experimentos realizados con ratones deficientes en la iNOS (del inglés *inducible nitric oxide synthase*), los cuales tienen disminuida la resistencia frente a la infección con *Listeria monocytogenes* (Fig.9) (Shiloh y col., 1999).

Por otra parte el TNF- $\alpha$  es otra citocina esencial en la defensa contra la infección con *Listeria monocytogenes*, y los ratones que carecen de esta citocina o su receptor van a sucumbir rápidamente a la infección. Se sabe que los macrófagos infectados con *Listeria monocytogenes* es la principal fuente de TNF- $\alpha$  e iNOS durante la infección *in vivo*, y un estudio sobre la caracterización de la respuesta inmune innata de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* deficientes en el receptor de quimiocina 2 (en inglés CCR2, de *chemokine receptor type 2*) indican que la respuesta es más compleja. Los monocitos circulantes expresan el receptor de quimiocinas CCR2 que se une al ligando de quimiocina 2 (en inglés CCL2 *chemokine ligand 2*), una quimiocina que es producida por los macrófagos que han internalizado *Listeria monocytogenes*.

Aquellos ratones que carecen de CCR2 muestran mayor susceptibilidad frente a la infección con *Listeria monocytogenes*, y tienen menores niveles de iNOS y TNF- $\alpha$  en el bazo durante los 2 primeros días post infección.

Sin embargo, en el bazo de los ratones de genotipo silvestre hay una población de células dendríticas que produce niveles elevados de iNOS y TNF- $\alpha$ , esta población de células dendríticas están ausentes en los ratones infectados deficientes en CCR2, lo cual indica que estas células dendríticas productoras de iNOS y TNF- $\alpha$  (conocidas como TipDCs) son esenciales para el control del crecimiento de las bacterias *in vivo* (Pamer, 2004).



**Figura 9.** Mecanismos microbicidas. En la figura se ilustra un fagolisosoma con los principales mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno que se activan en fagocitos mononucleares para la destrucción de los agentes fagocitados

### 6.3. Proteínas de la membrana lisosomal

Los lisosomas son orgánulos ubicuos encargados de la digestión celular. Contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas, que son las encargadas de digerir los sustratos recibidos a través de la endocitosis, la fagocitosis o la autofagia. Se conocen un número cada vez mayor de enfermedades que se caracterizan por defectos en la biogénesis de los lisosomas. Para el funcionamiento de los lisosomas son esenciales dos tipos de proteínas: hidrolasas lisosomales (también conocidas como hidrolasas ácidas) y las proteínas lisosomales de membrana. Se conocen unas 50 hidrolasas lisosomales encargadas de la degradación de sustratos y responsables de la capacidad catabólica del lisosoma, entre ellas cabe destacar el papel de las catepsinas. Además están involucradas en el procesamiento antigénico, la degradación de la matriz extracelular y

el inicio de la apoptosis (Conus y Simon, 2008). Los lisosomas de mamíferos contienen aproximadamente unas 25 proteínas lisosomales de membrana (Lübke y col., 2009).

Las proteínas lisosomales de membrana residen principalmente en la membranas lisosomales y endosomales y tienen diversas funciones, incluyendo entre ellas la edificación del lumen lisosomal, importación de proteínas procedentes del citosol, el secuestro de hidrolasas ácidas, el mantenimiento de un ambiente ácido, fusión de membranas y el transporte de los productos de la degradación del lumen del lisosoma al citoplasma (Eskelinen y col., 2003). La membrana lisosomal contiene varias proteínas que están altamente N-glicosiladas, y cuya función es aún bastante desconocida. Las proteínas más abundantes dentro de las proteínas lisosomales de membrana son las proteínas asociadas a la membrana del lisosoma 1 y 2 (LAMP-1 y LAMP-2), proteínas integrales de la membrana del lisosoma 1 y 2 (LIMP-1 y LIMP-2), esta última también conocida como SCARB2, y la tetraspanina CD63.

En este sentido, la proteína LIMP-2/Lgp85/SCARB2 (*cd36l2* gen del ratón) pertenece a la familia del CD36, que incluye varios receptores “basura” o *scavenger* como SB-I/SB-II, trombospondin-1 (en inglés TSP-1, de *Thrombospondin1*) o CLA -1. Algunos de estos miembros de la familia CD36 como TSP-1 participan en la adherencia de bacterias gram-positivas a las células, incluyendo *Listeria monocytogenes* (Crombie y Silverstain, 1998). Además, recientemente, un miembro ortólogo de CD36 en *Drosophila* participa en la fagocitosis de *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium* spp. en células SL2, tipo macrófago (Agaisse y col., 2005; Philips y col., 2005).

Esta familia de genes están evolutivamente muy conservados e incluyen moléculas de adhesión celular, receptores de lípidos en la superficie celular y proteínas lisosomales de membrana. Se localizan principalmente en el límite de las membranas de lisosomas y endosomas tardíos. Por lo tanto, las proteínas lisosomales podrían desempeñar funciones únicas en la fagocitosis, diferentes a las realizadas en endocitosis, como podría ser participar en la inmunidad innata frente a los patógenos intracelulares.

#### **6.4. Fagosomas con características lisosomales**

Los fagosomas son los compartimentos intracelulares encargados de la destrucción de *Listeria monocytogenes*. La maduración del fagosoma es un paso esencial en la eliminación de *Listeria monocytogenes*. Se sabe que en los macrófagos

inactivados, la bacteria perfora la membrana fagosomal y se escapa al citosol. En los macrófagos activados por el IFN- *Listeria monocytogenes* es internalizada dentro de los fagosomas y es en este compartimento donde es eliminada (Portnoy y col., 1989). Dentro de los fagosomas los microorganismos utilizan diversas estrategias para sobrevivir y proliferar. Por ejemplo, *Coxiella burnetti* y *Leishmania* son capaces de sobrevivir en fagosomas acidificados, mientras que *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* y *Toxoplasma gondii* pueden sobrevivir y proliferar en los compartimentos vacuolares que no maduran a fagolisosomas. Por el contrario, *Trypanosoma cruzi*, *Shigella flexneri* y *Listeria monocytogenes* lisan las membranas fagosomales y escapan hacia el citoplasma.

## **7. Las células del sistema inmunológico del sistema nervioso central.**

### **La microglía**

Cualquier ser vivo intenta sobrevivir constantemente. Para ello necesita preservar su integridad biológica ante agresiones, principalmente externas. Lo cual es un quehacer continuo. Un agente extraño que invada al organismo puede considerarse un potencial peligro. Y ante ello, como defensa, los organismos disponen del sistema inmune. Su misión es combatir los agentes infecciosos.

Las células y moléculas del sistema inmune llegan a la mayoría de los tejidos a través de la corriente sanguínea, penetrando en los tejidos a través de las paredes de los capilares sanguíneos. Similarmente, el sistema nervioso central (SNC) también penetra en la mayoría de los tejidos, pero ambos sistemas se evitan uno al otro mediante la barrera hematoencefálica, la cual impide que los linfocitos se pongan en contacto con las neuronas. La razón de ello estriba en que los linfocitos pueden segregar una serie de citocinas, capaces de destruir las neuronas. A consecuencia de esta premisa, muchos investigadores pensaron que el sistema nervioso carecía de protección inmunitaria. Sin embargo, hoy en día es bien conocida la importancia que tiene el sistema inmunitario en el correcto funcionamiento del sistema nervioso, y las graves consecuencias para el organismo que pueden tener lesiones e infecciones de este órgano.

## 7.1. Sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) ha sido considerado durante mucho tiempo como un órgano inmunológicamente aislado del sistema inmune periférico, debido a la presencia de una barrera hematoencefálica y a la ausencia de vasos linfáticos (*Perry, V.H., 1998*) y, por otra parte, al hecho de que injertos de piel, inoculación de virus o bacterias y antígenos introducidos directamente en el parénquima nervioso no inducen una respuesta inmune (*Medawar y col., 1948; Barker y col., 1977; Matyszak y col., 1998; Stevenson y col., 1997*).

Sin embargo, a lo largo de los últimos años, numerosos estudios han ido demostrando que el SNC no sólo es inmunocompetente sino que además interacciona activamente con las células del sistema inmune periférico (*Becher y col., 2000; Aloisi y col., 2001; Steinman y col., 2004*) que pueden ser reclutadas al interior del parénquima nervioso (*Ransohoff y col., 2003; Engelhardt y col., 2005; Engelhardt, 2006*). También se ha demostrado la presencia de macrófagos y células dendríticas, claves en el inicio de las respuestas inmunitarias, en lugares estratégicos como las meninges, plexos coroideos o el espacio perivascular (*Bechmann y col., 1999; McMenamin, 1999; Williams y col., 2001*). Por todo ello, actualmente se considera al SNC como un sistema inmune privilegiado y no aislado (*Carson y col., 2006; Galea y col., 2007*).

Las células que presentan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmune y en el control de las respuestas inmunes que tienen lugar en el SNC son las células de la microglía (**Fig.10**) (*Aloisi, 2001; Carson, 2002; Graeber y col., 2010*).

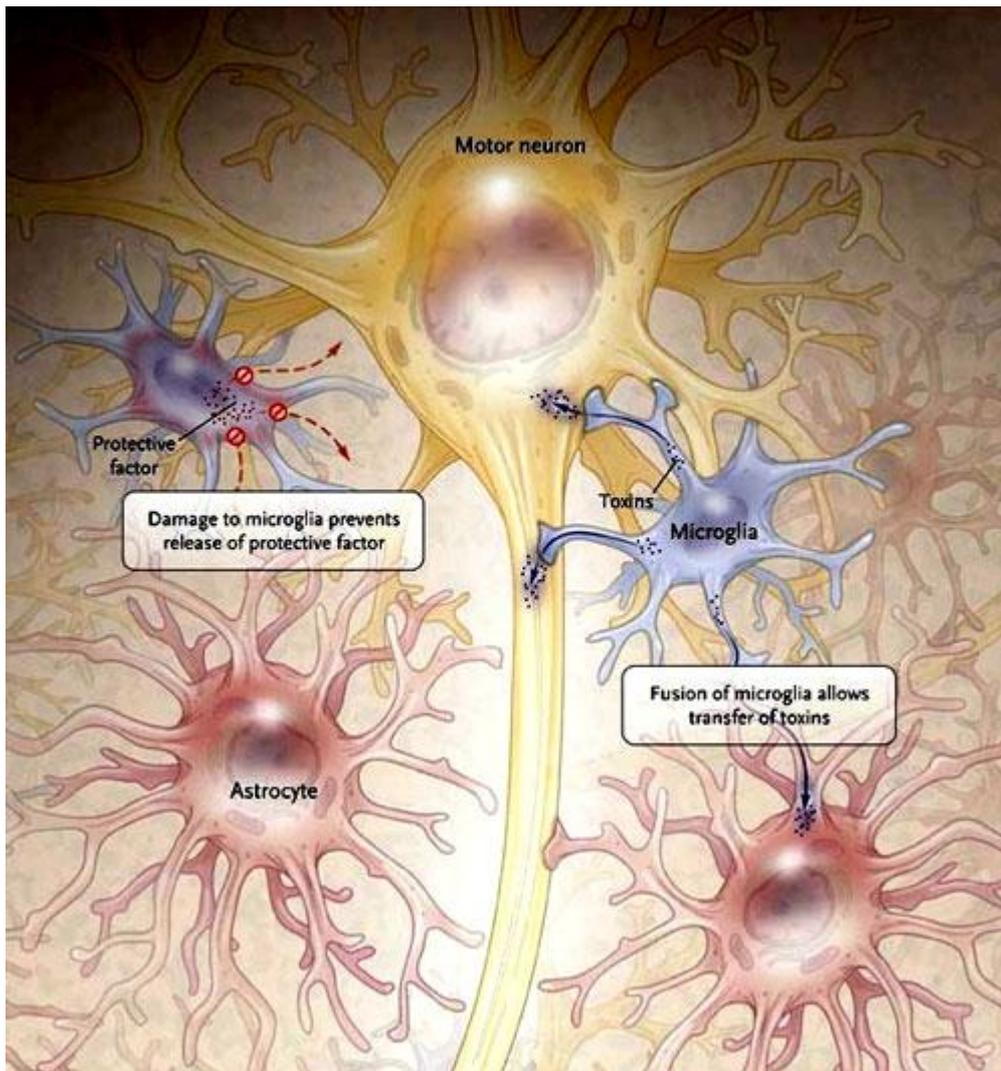


Figura 10. Imagen de células de microglía interactuando con otras células de la glía y neuronas.

## 7.2. Reactividad de la microglía

Las células de microglía son consideradas como las células inmunitarias residentes del sistema nervioso central (SNC) (Kreutzberg, 1996; Aloisi, 2001; Carson, 2002). Hoy en día se considera que existen al menos dos tipos de microglía en el SNC de un adulto sano. La quiescente o ramificada, en inglés “*resting microglia*”, que se encuentra distribuida por todo el parénquima nervioso, en áreas de la sustancia blanca y de la sustancia gris. Existen también células de microglía perivascular, “macrófagos perivasculares” las cuales constituyen una población minoritaria de células, dentro del SNC, localizadas tanto en el espacio perivascular como en el de Virchow-Robins,

espacios situados por debajo de la membrana basal de las células endoteliales (*Williams y col., 2001*).

La microglía quiescente representa una población de células estables con una baja tasa de recambio (*Lawson y col., 1992*), una morfología ramificada y con expresión basal muy baja de CD45 y ausencia de MHC-clase II (*Santambrogio y col., 2001*). Sin embargo, las células de microglía/macrófagos perivasculares es más elevada (*Bechmann y col., 2001*), no presentan las prolongaciones características de la microglía quiescente y expresan CD45, MHC-clase II y ED2 de manera constitutiva (*Dijkstra y col., 1994*). Debido a esta expresión y a su localización estratégica, estas células perivasculares parecen jugar un papel importante durante la respuesta a procesos inmunológicos.

En condiciones basales, las células de microglía supervisan de manera constante el parénquima nervioso (*Davalos y col., 2005; Nimmerjahn y col., 2005*) y son capaces de reaccionar rápidamente cuando la homeostasis se ve perturbada como consecuencia de una gran variedad de situaciones incluyendo lesiones, neurotoxicidad, infecciones, etc (*Garden y col., 2006; Dheen y col., 2007; Hanisch y col., 2007; Graeber y col., 2010*). Este proceso de activación de la microglía conlleva un cambio fenotípico y de activación génica caracterizado por cambios morfológicos, por el aumento, disminución o expresión de *novos* de numerosas moléculas de superficie y por la secreción de un amplio número de sustancias como citocinas, quimiocinas y factores tróficos (*Raivich y col., 2004; Chew y col., 2006; Dheen y col., 2007; Hanisch y col., 2007; Ransohoff y col., 2009*). Esta gran variedad de cambios, unido al hecho de que hoy en día se sugiere que existen diferentes subpoblaciones de microglía dentro del sistema nervioso central (SNC) (*Carson y col., 2007*) hace que la reactividad microglial no pueda considerarse como un evento uniforme, sino más bien como un proceso heterogéneo que, dependiendo del tipo de señal activadora y del ambiente en el cuál se produce esta activación, presenta diferentes evoluciones.

La función que tiene la microglía en el cerebro, tanto en estado normal como después de una lesión aguda, ha sido ampliamente estudiada. Aun así, el papel específico que juegan estas células en la respuesta inmune dentro del SNC, la comunicación que se establece entre ellas y las células involucradas en esta respuesta, son aspectos que suscitan todavía muchos interrogantes.

### 7.3. Microglía y la respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata, tal y como nos la describen en cualquier bibliografía básica de inmunología, se basa en la existencia de un conjunto de elementos, tanto barreras físicas como células específicas (neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales o NK, del inglés *natural killer*, etc.) cuya principal función es proteger al individuo frente a la presencia de patógenos invasores o células dañadas (*Abbas y col., 2010*). Esta respuesta es antígeno-independiente, muy rápida y es inducida por la activación de una serie de receptores, presentes en la membrana de estas células inmunitarias, que reconocen una gran variedad de motivos estructurales altamente conservados en los microorganismos, comúnmente denominados PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) o presentes en las células dañadas denominados ACAMPS (*apoptotic cell-associated molecular patterns*) (*Akira y col., 2006*). Algunos de los receptores más conocidos actualmente son:

- 1) Receptores “toll-like” (TLRs), un grupo de receptores transmembrana localizados en la membrana celular o en la membrana del endosoma. Tras la unión con su ligando, activan cascadas de señalización intracelular específicas que resultan en la activación de una serie de factores de transcripción como NF-kappa (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*), AP1 e IRFs (*Interferon-regulatory factor*), los cuales en último término promueven la secreción de diferentes moléculas pro-inflamatorias.
- 2) Receptores del complemento, como CR3 y CR4. Estos receptores se encuentran en la membrana de varios tipos celulares, incluyendo neutrófilos y macrófagos. La unión de estos receptores con sus ligandos induce la fagocitosis de elementos opsonizados por moléculas del complemento, principalmente C3bi.
- 3) Receptor de manosa, un tipo de lectina que se localiza en la membrana celular y reconoce polisacáridos complejos expresados frecuentemente por patógenos. Se encuentra en células dendríticas, macrófagos y algunos tipos de células endoteliales (*Linehan y col., 1999; Linehan, 2005*) y su función, igual que en el

caso de los receptores del complemento, está relacionada con la fagocitosis (Linehan y col., 2000).

- 4) Receptores basureros o *scavenger*: SR-A, SR-BI, CD36 son un grupo de receptores expresados en macrófagos, cuyas funciones están relacionadas con la adhesión celular, la endocitosis y la señalización celular.
- 5) Receptores Fc, los cuales reconocen el fragmento constante de las inmunoglobulinas y median la fagocitosis de productos opsonizados.

Las células de microglía, en condiciones normales, expresan niveles bajos/moderados de CR3 (Akiyama y col., 1990), receptores Fc (Okun y col., 2009) y TLRs (Olson y col., 2004) pero no muestran expresión del receptor de manosa (Linehan y col., 1999) o receptores “scavenger” (Bell y col., 1994), los cuales están restringidos a poblaciones específicas de macrófagos situados en los plexos coroideos de los ventrículos cerebrales y las meninges (Bell y col., 1994; Galea y col., 2005). Sin embargo, tras su activación, las células de microglía pueden aumentar o expresar *de novo* una gran variedad de receptores (Aloisi, 2001; Husemann y col., 2002; Carpentier y col., 2008; Lehnardt, 2010). En algunas ocasiones, las variaciones en estos receptores se manifiestan ante la presencia de algún tipo de patógeno: por ejemplo, la administración del lipopolisacárido bacteriano, LPS, induce un aumento en la expresión del receptor CD14 (Nadeau y col., 2000) y de TLR-4 (Lehnardt y col., 2002); la infección con el virus del herpes simple tipo 1 induce el aumento de TLR-2 (Aravalli y col., 2005); la infección con el virus del Este del Nilo induce TLR-3 (Cheeran y col., 2005) y la presencia de abscesos cerebrales mediados por *S. aureus* induce expresión de TLR-2 (Kielian y col., 2002). La inducción de estos receptores se produce también en situaciones de neurodegeneración en las que no hay evidencias de la presencia de ningún tipo de patógeno.

La microglía también participa en estos tipos de respuesta inmune innata con la secreción de un amplio número de mediadores inflamatorios como citocinas, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, quimiocinas y prostanoïdes (Aloisi, 2001). La secreción de estos mediadores induce la migración y activación del resto de células de la

respuesta inmune tanto innata (neutrófilos, células NK, macrófagos) como de la adquirida (linfocitos T y linfocitos B).

#### **7.4. Microglía y la respuesta inmune adquirida**

Comparando con la respuesta inmune innata, la adquirida es una respuesta más tardía y es antígeno-dependiente. Los linfocitos constituyen el principal tipo celular asociado a este tipo de respuestas. Existen dos tipos principales de linfocitos, los linfocitos B, los cuales reconocen el antígeno soluble y son productores de anticuerpos; y los linfocitos T, reconocen el antígeno procesado y los cuales se encargan de la respuesta celular.

Estos linfocitos T se dividen a su vez en dos tipos: Los linfocitos T citotóxicos (CD8+), cuya función consiste en destruir de forma directa mediante la secreción de moléculas como la perforina y granzima, a células infectadas o dañadas; y los linfocitos T cooperadores o en inglés *T-helper* (CD4+), que son los encargados de regular la activación de otros tipos de células inmunes, principalmente macrófagos y linfocitos B, a través de la secreción de una gran variedad de citocinas. Dado que estos linfocitos T son incapaces de reconocer los antígenos de manera soluble, necesitan la ayuda de un tipo de células especializadas, las células presentadoras de antígenos (CPA), las cuales mediante un proceso denominado presentación antigénica, captan, procesan y presentan en su superficie antígenos de patógenos, virus y otras estructuras extrañas permitiendo su reconocimiento por parte de estos linfocitos T. Este proceso consiste en dos señales, la primera deriva de la unión entre receptor de linfocitos T (TCR) y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se encuentran en la membrana de las CPAs y llevan acomplejado el antígeno: MHC de clase II en el caso de linfocitos T cooperadores. La segunda señal, la señal de co-estimulación, se produce tras la unión de receptores como B7.1 (CD80) o B7.2 (CD86) en la membrana de la CPA y sus co-receptores en linfocitos (*Lanzavecchia, 1997*). Las células dendríticas (DCs del inglés, *dendritic cells*) constituyen el grupo de CPA profesionales en la periferia. Sin embargo, en el sistema nervioso central (SNC) la presencia de estas células está restringida a lugares específicos como los plexos coroideos y las meninges (*McMenamin, 1999; McMenamin y col., 2003*).

Las células de microglía aquí son consideradas las principales células presentadoras de antígeno (CPA) dentro del SNC (*Aloisi, 2001; Raivich y col., 2004*). Aunque en situaciones basales estas células de microglía, en la mayor parte de los casos, no muestran expresión de MHC-clase I, ni MHC-clase II (*Kreutzberg, 1996; Perry, 1998*). Sin embargo, no todos los estudios han caracterizado la expresión de moléculas co-estimuladoras en estas células de la microglía. Se han descrito expresiones *de novo* de algunas moléculas tras lesión (*Rutkowski y col., 2004*) y aumento de otras tras una infección (*Issazadeh y col., 1998; Mack y col., 2003*).

Por otro lado, la infiltración de linfocitos, principalmente T, en el sistema nervioso central (SNC) ha sido descrita en diferentes tipos de patologías (*Rezai-Zadeh y col., 2009*) tales como infecciones víricas (*Petito y col., 2003*), enfermedades neurodegenerativas (*Holmoy, 2008*), lesiones agudas (*Raivich y col., 1998*) o procesos autoinmunes (*Dittel, 2008*). Esta infiltración linfocitaria se ha relacionado en algunas ocasiones con una función protectora, como en el caso de la infección del virus del Este del Nilo (*Glass y col., 2005*) o la esclerosis lateral amiotrófica (*Beers y col., 2008*), mientras que en otras situaciones esta infiltración contribuye al aumento de la patología. Este sería el caso, por ejemplo, de la infección por el virus VIH (*virus de inmunodeficiencia humana- SIDA*) (*Petito y col., 2003*) o en modelos de autoinmunidad (*Dittel, 2008*).

Como está descrito anteriormente, existen dos tipos de linfocitos T, citotóxicos y cooperadores. Estos últimos a su vez se dividen en diferentes subtipos. Hasta hace unos años esta subdivisión era en Th1, linfocitos capaces de secretar citocinas proinflamatorias como interferón- (IFN- ) o factor de necrosis tumoral- (TNF- ) y por otro lado los linfocitos Th2, encargados de producir citocinas antiinflamatorias como la interleucina-4 (IL-4) e IL-10. Sin embargo, en los últimos años, numerosos estudios han demostrado que además de Th1 y Th2, existen otros subtipos de linfocitos T cooperadores con funciones y patrones de secreción de citocinas muy variados (*Reinhardt y col., 2006; Dittel, 2008; Takatori y col., 2008*). Uno de estos subtipos son los linfocitos Th17 (*Harrington y col., 2006*). Estos linfocitos secretan normalmente citocinas proinflamatorias como IL-17A e IL-17F y han sido descritos especialmente en relación a procesos de autoinmunidad. No obstante, recientemente también se ha descrito su capacidad, en algunas circunstancias, de producir citocinas antiinflamatorias

como IL-10 e IL-21 (*Harrington y col., 2005; Weaver y col., 2006; Bettelli y col., 2007; McGeachy y col., 2007; Aranami y col., 2008*). La polarización y diferenciación de linfocitos *naïve* hacia estos linfocitos Th17 depende de la presencia en el ambiente de dos citocinas específicas: factor de crecimiento transformante- (TGF- ) e IL-6 (*Bettelli y col., 2006; Mangan y col., 2006*). Es interesante señalar que TGF- es también una de las citocinas clave en la diferenciación de otro subtipo de linfocitos T, los T reguladores (T-regs) (*Marie y col., 2005*). Los linfocitos T-regs (T-reguladores) son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa suprimiendo la activación del sistema inmune. Su principal función es el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y de la tolerancia frente autoantígenos (*Bluestone y col., 2005*).

Dentro de los linfocitos T-regs existen dos subtipos, los naturales y los inducibles (*Horwitz y col., 2008; Curotto y col., 2009*). Los naturales se generan en el timo durante el proceso de maduración de los linfocitos T y son los encargados del mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Por el contrario, los inducibles se producen en órganos linfoides periféricos tras la estimulación de linfocitos CD4+ con la citocina TGF- . Dada su capacidad para suprimir la respuesta inmune, la participación de estos linfocitos T-regs en la evolución de las respuestas inmunes adquiridas en el sistema nervioso central (SNC) ha generado un gran interés en los últimos años. Muchos aspectos relacionados con la función y el papel que juegan estas células en la regulación de la respuesta inmune adquirida dentro del SNC, así como su regulación por parte de las células residentes del SNC, especialmente la microglía, están aún por determinar.

El descubrimiento de todos estos subtipos de linfocitos ha hecho que el escenario de la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC) se haya complicado bastante. Además, añadir que recientemente se ha demostrado la presencia de algunos subtipos de células dendríticas infiltradas en el parénquima nervioso en modelos experimentales (*Santambrogio y col., 2001; Santambrogio y col., 2006*). En conjunto, todo esto sugiere que la respuesta inmune adquirida dentro del sistema nervioso central no sólo va depender de la mayor o menor presencia de linfocitos y de las células presentadoras de antígeno (CPAs), sino que también va a estar directamente relacionado con los tipos específicos de linfocitos y el fenotipo de la CPA en cada caso. Por lo tanto, va a ser clave establecer qué papel juega la microglía activada en el control de la respuesta inmune adquirida para poder entender los mecanismos subyacentes a la conexión que se

establece entre estos dos sistemas tan complejos como son el sistema nervioso central y el sistema inmunitario.

## **8. Tratamiento y prevención**

Partimos de la premisa de que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo de distribución universal, relativamente resistente a factores ambientales extremos como las altas y bajas temperaturas, la sequedad, el pH de 3,6-9,5 y altas concentraciones de NaCl por ejemplo. Esta alta ubicuidad hace que los principales reservorios sean varios como el suelo, el forraje, el agua, los silos o el tracto gastrointestinal de diversidad de animales, todo aquello donde prevelezcan aguas estancadas o materia orgánica en descomposición. Es relativamente fácil que variedad de animales, incluido el hombre, se puedan infectar de diversas maneras por este patógeno. Esto unido a que su diagnóstico clínico es difícil puesto que los principales síntomas en personas sanas (no así en personas de riesgo como inmunocomprometidos, ancianos o embarazadas) son muy similares a los de un catarro común o una gripe. Por ello debe investigarse siempre ante la presencia de factores de riesgo (*Cossart y col., 2008*).

La incidencia de la enfermedad que produce este microorganismo patógeno, la listeriosis, es normalmente baja, 0,3 casos por 100.000 habitantes en Europa, habiendo aumentado notablemente desde 2002, sobre todo de la meningitis (20-30%).

En la listeriosis cerebral, como ya se ha mencionado anteriormente, el diagnóstico es complicado. Las características celulares del líquido cefalorraquídeo son tan variables que no se puede definir un patrón. El diagnóstico definitivo requiere un aislamiento de *Listeria monocytogenes* en la sangre, el líquido cefalorraquídeo, líquido articular, la placenta u otros líquidos o tejidos habitualmente estériles. Aunque la tinción de Gram del líquido cefalorraquídeo es poco sensible y específica por lo que tiene poca sensibilidad y también puede confundirse con otros microorganismos como estreptococos o enterococos (*Murray y col., 2009*). Y el cultivo del líquido cefalorraquídeo también es poco sensible en la romboencefalitis, la cerebritis y el absceso (*Sanchez-Artola y col., 2010*).

## 8.1. Tratamiento

Las dificultades de tratamiento no derivan de mecanismos de resistencia adquirida sino de las propias características de la bacteria (persistencia y tolerancia) y de los enfermos (inmunodeprimidos o debilitados por alguna otra patología).

Además, un tratamiento inicial inadecuado de la meningitis por *Listeria monocytogenes*, por ejemplo, se asocia en algunos estudios a un aumento de la mortalidad, por lo que la pauta empírica en pacientes de riesgo inmunodeprimidos o ancianos debe incluir cobertura frente a este patógeno.

La mayoría de los antibióticos, incluyendo las penicilinas, son bacteriostáticos frente a *Listeria monocytogenes*. Los aminoglucósidos, glucopeptidos y cotrimoxazol resultan bactericidas (López y col., 2007; Suarez y col., 2007).

Cotrimoxazol y meropenem probablemente sean superiores a la combinación estándar de ampicilina con gentamicina. No se pueden establecer las mejores pautas, dosis y duración de forma incuestionable debido a la ausencia de estudios comparativos. Requiere terapia muy prolongada. La duración apropiada del tratamiento, como en la mayoría de las infecciones, no está definida. Se recomienda mantenerlo 3 semanas en las meningitis, 4-6 semanas en las endocarditis, más de 6 semanas en las romboencefalitis y abscesos cerebrales e incluso 3-6 meses en los pacientes inmunocomprometidos dada la frecuencia de recurrencia que se ha descrito en algunos casos (Mylonakis y col., 1998).

Estas complicaciones de diagnóstico y tratamiento, la actual tendencia de aumento en la incidencia de la enfermedad en los últimos años, sobre todo en población de riesgo, y la inexistencia actual de prevención por medio de vacunas, hacen de gran interés e importancia el estudio más exhaustivo de la listeriosis, sobre todo de la listeriosis cerebral la cual tiene los efectos más graves.



## **II. OBJETIVOS**



## **II. OBJETIVOS**

El objetivo principal es analizar la respuesta inmune en el sistema nervioso central tras una infección con *Listeria monocytogenes* y estudiar el papel que tienen las células de la microglía, que son los macrófagos especializados del cerebro. Por ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1. Determinar en la listeriosis cerebral cuál o cuáles son las células diana del patógeno en el sistema nervioso central (SNC)**
  
- 2. Analizar los factores de virulencia en las células diana y examinar su patrón de actuación**
  
- 3. Analizar la variación inducida por *Listeria monocytogenes* en la expresión génica de sus células diana en el sistema nervioso central (SNC) y su verificación proteica.**
  
- 4. Estudiar las funciones fagocíticas afectadas por la infección de *Listeria monocytogenes* relacionadas con el sistema nervioso central (SNC)**
  
- 5. Preparar una vacuna eficaz en listeriosis cerebral**



# **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. Soluciones y medios de cultivo**

##### **1.1. Soluciones**

- J **HBE:** Es un tampón de homogenización. 250 mM de sacarosa, 0,5 mM de EGTA y 20 mM de HEPES-KOH, pH 7,2 y se filtra para su esterilización.
  
- J **HBSS:** Del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*, es una solución salina rica en iones bicarbonato. CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM, KCl 5,33 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,41 mM, NaCl 138 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, 5,6 mM de glucosa y 0,03 mM de rojo fenol (indicador de pH).
  
- J **PBS:** Del inglés *Phosphate-Buffered Saline*, es una solución salina isotónica. NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM. Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza en el autoclave.
  
- J **PBST:** Solución de PBS con Tween-20 al 0,02%
  
- J **PBS-Triton:** Solución de PBS con Tritón-X-100 al 0,1%. Se ajusta el pH a 7,4
  
- J **TBS:** Tampón salino Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y con NaCl 150 mM.
  
- J **TBST:** Tampón salino Tris-HCl 50 mM a pH 7,5; con NaCl 150 mM y detergente Tween-20 al 0,05%.
  
- J **Tripsina:** Enzima en solución que se utiliza para despegar células adherentes de las placas o botellas de cultivo (Gibco)

Las soluciones y los medios de cultivo, excepto el PBS, se esterilizan por filtración utilizando jarras de filtración por vacío.

## **1.2. Medios de cultivo**

- ) **BHI:** Del inglés *Brain-Heart Infusion*, es un medio de cultivo de alto valor nutritivo que se emplea para el crecimiento de gran diversidad de microorganismos de crecimiento difícil en medios más sencillos. Su composición es la siguiente: 7,7 g de cerebro de ternero, 9,8 g de corazón de buey, 10 g de proteasa de peptona, 2 g dextrosa, 5 g de NaCl y 2,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se disuelve en 1 litro de agua ultrapura (Milli-Q) y se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos (pH 7,4).
  
- ) **BHI Agar:** Medio de cultivo sólido compuesto por BHI y agar al 1,5%.
  
- ) **Agar sangre:** Medio de cultivo que combina un agar base, nutritivo, con 5% de sangre ovina. Se usa sobre todo para ver la capacidad hemolítica de microorganismos patógenos. Observando halos hemolíticos alrededor de las colonias se puede determinar el tipo de hemólisis que posee la bacteria: *Alfa*-hemólisis: halos verdosos (reducción hemoglobina de los eritrocitos a metahemoglobina), *Beta*-hemólisis: halos incoloros (hemólisis total) y *Gamma*-hemólisis: inexistencia de halos (sin hemólisis). Composición (g/L): 10 g peptona de caseína, 5 g peptona de carne, 3 g extracto de levadura, 3 g extracto de corazón, 5 g NaCl, 1 g almidón de maíz, 15 g de agar bacteriológico y 50 mL de sangre de cordero con un pH 7,2.
  
- ) **DMEM:** Del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, es un medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de células eucariotas. Se compone de la mezcla clásica de DMEM que incluye 4,5 g/L de glucosa y rojo fenol (Gibco). Cuando nos referimos a medio complementado es porque se le añaden: 5ml aminoácidos no esenciales, 5ml HEPES (añadir para ajustar pH cuando sea necesario), 0,584g/L L-glutamina, 5 mL piruvato sódico.
  
- ) **RPMI:** Del inglés *Roswell Park Memorial Institute Medium*, es un medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de células eucariotas. Se utiliza la variante

RPMI-1640, que es una mezcla compleja de sales, aminoácidos, vitaminas, 2 g/L de glucosa, 0,3 L-glutamina y rojo fenol (indicador pH) (Hyclone).

- ) **IMDM:** Del inglés Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Hyclone). Es un medio de cultivo para células eucariotas. En este estudio se utiliza exclusivamente para el cultivo de neuronas.
- ) **FBS:** Suero bovino fetal (Hyclone). Inactivado por calor, a 55°C durante 1 hora.

## **2. Cepas bacterianas, líneas celulares y modelo animal**

### **2.1. Cultivo, crecimiento y conservación de las cepas bacterianas**

Se utilizan varias cepas de *Listeria monocytogenes*: la cepa silvestre de un aislado clínico 10403S (LM<sup>WT</sup>), la cepa deficiente en el gen *hly*, el cuál codifica para la proteína LLO, mutante DPL-2161 (LM<sup>LLO</sup>), la cepa deficiente en los genes *plcA* y *plcB* mutante DPL-1936 y la deficiente en el gen *actA* mutante DPL-1942; todas ellas cedidas por el doctor Daniel A. Portnoy (UCLA-Berkeley, EEUU) (*Portnoy y col., 1988*). La GFP-LM<sup>LLO</sup> derivada de 10403S, cedida por el doctor Darren E. Higgins (Harvard Medical School, Boston, EEUU). Las cepas GFP-LM<sup>WT</sup> y GFP-LM<sup>ActA</sup> derivadas de la cepa silvestre comercial EGD, cedidas por el doctor Marc Lecuit (Institut Pasteur, París, Francia).

Todas las cepas de *Listeria monocytogenes* fueron cultivadas en medio BHI con 100 µg/mL de streptomina a 37°C en agitación.

Las cepas bacterianas de *Listeria monocytogenes* se conservan a -80°C en una mezcla de BHI/glicerol (50% de BHI al 1,5% (p/v) y 50% de glicerol al 87% (v/v)).

**Tabla1:** Las diversas cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas.

<b>Bacteria</b>	<b>Características</b>	<b>Función principal del gen deletado</b>
LM <sup>WT</sup> /10403S	Cepa silvestre de <i>Listeria monocytogenes</i>	Fenotipo silvestre completo sin deletaciones
LM <sup>LLO</sup> /2161	Cepa deficiente en el gen <i>hly</i> que codifica para LLO	Implicada en crear poros en la membrana del fagosoma y provocar su ruptura.
LM <sup>ActA</sup> /1942	Cepa deficiente en el gen <i>actA</i> que codifica para ActA	Encargada de la formación de la cola de actina que forma la bacteria para moverse por el citoplasma.
LM <sup>PlcA PlcB</sup> /1936	Cepa deficiente en los genes <i>plcA</i> que codifica para la fosfolipasa A (PlcA) y el gen <i>plcB</i> en fosfolipasaB (PlcB)	Implicada en ayudar en la ruptura final de la membrana del fagosoma.

## **2.2. Líneas celulares**

### 2.2.1. Células de tipo macrófago J774

Obtenidas del doctor Philip D. Stahl (Departamento de Biología Celular y Fisiología. Universidad de Washington. St. Louis. MO. EEUU), fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM con 10% Suero bovino fetal FBS, 10 mM L-glutamina, 100 mM aminoácidos no esenciales, 50 µg/mL gentamicina y 50 µg/mL vancomicina.

### 2.2.2. Células de microglía murina BV2

Fueron cedidas por la doctora Jennifer Pocock (Institute of Neurology, University College London, Reino Unido) y fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI con 20% FBS, 10 mM L-glutamina, 100 mM aminoácidos no esenciales, 50 µg/mL gentamicina y 50 µg/mL vancomicina.

### 2.2.3. Neuronas HN9

Estas neuronas murinas de hipocampo de ratón fueron cedidas por la doctora Mercedes García-Gil (Universidad de Pisa, Italia). Fueron cultivadas en el medio de cultivo IMDM (Hyclone).

### 2.2.4. Para la obtención y diferenciación de macrófagos de médula ósea (BMDMs)

Los macrófagos de médula ósea de ratón (*Bone Marrow-Derived Macrophages* BMDM) se obtienen de los fémures de ratones hembras consanguíneas, cepa C57BL/6, de 6-12 semanas de edad. Se obtienen a partir de células de médula ósea, que son extraídas de los fémures de los ratones por canulación de estos fémures con medio de cultivo DMEM y una jeringa de aguja fina, para obtener el máximo número de células. Estas células se cultivan a una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  células/mL en placas de cultivos de 6 pocillos en DMEM y suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS), 1 mM glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales (NEAA), 50  $\mu$ g/mL de gentamicina y 30  $\mu$ g/mL de vancomicina. También se añaden 20ng/mL del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) para su diferenciación a macrófagos y se incuban a 37°C en ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> durante 7-10 días. Posteriormente, se recogen todas las células adherentes e incuban en PBS frío durante 20 minutos para despegarlas suavemente con ayuda de un *scraper* o raspador celular (*Del Cerro-Vadillo y col., 2006*).

### 2.2.5. Obtención de cultivos mixtos de células microgliales (Mixed-MG) y la microglía primaria purificada (MG)

Los procedimientos para la obtención de los cultivos microgliales se han descrito previamente y de forma detallada en (*López-Fanarraga y col., 2007; Ribes y col., 2010; Scheffel y col., 2012; Frande-Cabanes y col., 2014*). Se utilizaron crías de C57BL/6 recién nacidas (1-6 días edad) para obtener el cerebelo y a partir de ahí los cultivos mixtos de microglía, los cuales se cultivaron durante 3-4 semanas como se ha descrito previamente (*López-Fanarraga y col., 2007*).

Posteriormente, de una parte de estos cultivos se aislaron y purificaron las células de microglía para los cultivos primarios de microglía purificada.

Los cultivos primarios de neuronas se realizan a partir de cerebelo postnatal de ratones de 2 días de edad. Las células se crecen en suspensión en medio de IMDM.

La conservación de las líneas celulares: se conservaron a -80°C en una mezcla constituida por 90% FBS suero bovino fetal y 10% de DMSO (agente crio-protector)

### **2.3. Modelo animal**

**C57BL/6:** Cepa murina congénica. Los animales se obtuvieron de la empresa Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Francia) y del Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria, siendo estabulados en las instalaciones de este último bajo la supervisión y cuidados del personal autorizado.

**Declaración ética:** Todos los experimentos ejecutados en animales se llevaron a cabo estrictamente con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Ministerio de Ciencia, Investigación e Innovación. Se han realizado de acuerdo al RD 1201/2005 y al Real Decreto 53/2013 de la legislación española (B.O.E., 2013) y a la Directiva 2010/63/UE de la europea (D.O.E., 2010). La cirugía se realizó bajo anestesia con pentobarbital sódico y evitando siempre en la medida de lo posible el sufrimiento innecesario del animal en cualquier procedimiento. Los protocolos empleados han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria (Permisos 2009/12, 2012/06 y PI-01-17).

### **3. Péptidos, nanopartículas y adyuvantes**

#### **3.1. Péptidos**

Se utilizaron los péptidos LLO<sub>189-201</sub> y GAPDH<sub>1-22</sub>, lo cuales fueron sintetizados en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid, España) pasando después por HPLC y espectrometría de masas utilizando un espectofotómetro MALDI-TOF Reflex<sup>TM</sup> IV. Pureza obtenida de los péptidos 95% después del HPLC.

#### **3.2. Nanopartículas y adyuvantes**

Para obtener GNPs portadores de péptidos GAPDH (GNP- GAPDH<sub>1-22</sub>), se añadió a una solución acuosa de tetracloroaurico (Strem Chemicals) (0,025 M, 1 eq.) una solución de una mezcla de glucosa al 90% y péptido GAPSH 1 10% de los ligando de terminación tiol (0,012 M, 6eq.) en MeOH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (3:3:1). El procedimiento detallado se describió previamente en (*Calderón-González y col., 2016*). La distribución de tamaños de las nanopartículas de oro se evaluó a partir de varias micrografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (JEM-2100F, JEOL Ltd, Tokyo, Japón), obteniendo el siguiente diámetro promedio y número de átomos de oro: 2,1 ±0,5 nm. La presencia de glucosa y ligandos peptídicos se confirmó por H NMR y la cantidad de péptido GAPDH en los GNPs se determinó por NMR (qNMR) en un espectofotómetro Bruker AVANCE 500 MHz (Bruker Corp, Billerica, MA, USA). Se disolvieron 0,234 mg de GNP en D<sub>2</sub>O al 99,9% (200 µL) y se añadieron 80 µL de esta solución a 40 µL de una sal sódica de ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico-2,2,3,3-d<sub>4</sub> al 0,05% (TSP-d<sub>4</sub>) en D<sub>2</sub>O como patrón interno. La carga de péptidos fue de 10,6 µg/ 0,234mg GNPs y GNP- GAPDH<sub>1-22</sub>. DIO-1 es una molécula diana de TLR2/4 que puede ser usada como adyuvante (*Ovejero-Guisasola y Fresno-Escudero*) y Advax, una inulina formulada adyuvante previamente descrita en *Rodríguez-Del Río y col., 2015*).

## **4. Reactivos y anticuerpos**

### **4.1. Reactivos**

Los reactivos empleados para citometría de flujo, FACS, o microscopía confocal fueron TRITC-faloidina (Sigma) y DAPI (Molecular Probes, Invitrogen). El yoduro de propidio (PI) y anexina V, para observar los porcentajes de muerte celular en los diversos estadios de la apoptosis.

Otros reactivos utilizados en los estudios funcionales fueron: LPS (L65259, de Sigma-Aldrich) usado a 2nM, HRPO y reactivo de Griess (Sigma) usado para la medición de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el kit de CBA para medir citocinas pro-inflamatorias murinas (BD-Lifesciences), y M-CSF recombinante murino (Sigma). Los suplementos añadidos a los medios de cultivo son de (Hyclone). Y las IL-6 e IL-12 de (Sigma).

### **4.2. Anticuerpos**

Los anticuerpos (Ac) utilizados para FACS o análisis confocal fueron frente a: CD14, CD45, CD11b, CD11c, IA<sup>d</sup>, IA<sup>b</sup>, F4/80 y conjugados con varios fluoróforos (BD-Lifesciences); el anticuerpo anti- $\alpha$ -3-tubulina de ratón específico de neurona (TuJ-1) (Sigma) y el anticuerpo secundario utilizado fue IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa 647 (Molecular Probes, Invitrogen).

Los anticuerpos para western blot fueron: anti-Rab5 de ratón (4F11) (regalo de la doctora Chryslen De Souza-Schorey, EE.UU.), anti-JAK1 de ratón, anti-Socs3 de ratón, anti-NF $\kappa$ B de ratón (PharMingen), anti-Scarb2/LIMP-2 de conejo (R & D Technologies), anti-Smpd1 de cabra (un regalo del doctor Olaf Uttermöhlen, Alemania), anti-Rab5c de conejo (regalo del doctor Marino Zerial, Alemania), anti-TLR-2 de ratón (regalo del doctor Manuel Fresno, CBMSO, España), anti-Pi3Kp110 de conejo (Santa Cruz Biotechnologies) y anti ratón  $\alpha$ -tubulina y anti ratón  $\alpha$ -actina (aportados por la doctora Mónica López-Fanarraga, UC, España)

Otros anticuerpos utilizados en los estudios funcionales fueron anti-TNF (Sigma) y anti-IFN (Sigma), usados a 1 $\mu$ g/mL. El reactivo secundario estreptoavidina (en inglés *Streptoavidin*) con anticuerpos biotinilados (BD-Lifesciences).

## **5. Equipos empleados**

**Citómetro de flujo:** Todos los estudios de citometría de flujo, FACS, se realizaron en la Unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). El equipo empleado fue un FACSCanto™ (BD Biosciences) equipado con láseres azul (488nm), violeta (407nm) y rojo (633 nm), utilizando el software BD FACSDiva™.

**Separador magnético:** Se empleó un separador magnético autoMACS® Pro (Miltenyi Biotec) situado en la Unidad de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL).

**Nanodrop:** Aparato para medir las concentraciones de proteínas o materiales genéticos (ADN o ARN) a partir de muestras de 2-3 µL. Todos los estudios de comprobación de cantidad o calidad de muestras tanto proteicas como de material genético se realizaron con este aparato. Perteneciente al grupo de investigación de señalización celular y dianas terapéuticas en cáncer del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL).

**Microscopía confocal:** Los experimentos de microscopía fueron realizados en la Unidad de Microscopía Láser del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL). Se utilizó un microscopio confocal Nikon® A1R empleando un objetivo PlanApo 100x (A.N.= 1,4), equipado con diodos violeta (405 nm) y amarillo (561 nm) y un láser de argón (488 nm). Las imágenes adquiridas fueron tratadas mediante el software NIS-Elements de la empresa Nikon®.

## **6. Metodología**

### **6.1. Ensayos en modelos murinos**

#### 6.1.1. Modelo *in vivo* murino de listeriosis cerebral neonatal

Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de 8-12 semanas de edad, que fueron apareadas con un macho de la misma cepa y después se comprobó la presencia de tapón vaginal (evidencia que indica el primer día embrionario del embarazo). A los 16 días de gestación se inoculó a estas hembras gestantes, por vía intravenosa en la zona lateral de la cola con 100  $\mu$ L de solución salina con una concentración de bacterias ( $3 \times 10^3$  CFU/mL) de las cepas GFP-LM<sup>WT</sup>, GFP-LM<sup>LLO</sup>, GFP-LM<sup>ActA</sup>, LM<sup>WT</sup>, LM<sup>LLO</sup> y LM<sup>ActA</sup> o en los controles (hembras gestantes no infectadas (NI)) que se inocularon con 100  $\mu$ L de solución salina. Todos los animales eran examinados a diario. Tres neonatos P4 (día 4 postparto) nacidos de madres NI, LM<sup>LLO</sup> o LM<sup>ActA</sup> ( $3 \pm 0,5$ ) y los dos P4 nacidos de madres infectadas con LM<sup>WT</sup> ( $2 \pm 0,5$ ) fueron sacrificados para obtener cerebelo para la preparación de cultivos mixtos de microglía y su posterior aislamiento de cultivos primarios microgliales para la cuantificación de CFU/mL, análisis de marcadores de superficie celular mediante FACS y cuantificación de citocinas. Madres NI e infectadas con LM<sup>WT</sup> fueron sangradas para la cuantificación de citocinas y sacrificadas para la obtención de bazo e hígados para evaluar las bacterias viables, CFU/mL y analizar las poblaciones celulares por FACS. La microglía purificada de neonatos P4 se cultiva *in vitro* y los sobrenadantes se filtran y guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para después realizar el análisis de citocinas mediante un kit de CBA pro-inflamatorio (BD Life Sciences) (Frade-Cabanes y col., 2014; Calderón-González y col., 2014). Las muestras fueron analizadas por triplicado y los resultados se muestran como la media  $\pm$  DE de tres experimentos por separado.

### 6.1.2. Pruebas clínicas en ratones

Las pruebas clínicas se realizaron a las crías nacidas de madres gestantes no infectadas y otras infectadas con las diferentes cepas bacterianas. Se realizaron varias pruebas métricas del estado de salud: peso (mg x 10), longitud en mm, ensayo de movimiento colocando a las crías en un papel métrico de 10 cm y registrando los cm de movimiento después de 5 minutos (unidades en cm) y la prueba de la piel, contando bajo la lupa en 1mm<sup>2</sup> de piel, el número de bulbos negros (nº de bulbos capilar/mm de piel). La piel también se observó para el aspecto general de la cría. Todos los resultados son la media  $\pm$  DE de tres experimentos diferentes.

### 6.1.3. Protocolos de vacunación de las ratonas gestantes

Ratones hembra gestantes C57BL/6 se vacunaron (n=5) o no vacunaron (n=5) al día 9 de gestación (E9), vía intravenosa a través de la zona lateral de la cola, con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> formulado con el adyuvante DIO-1 (5  $\mu$ g de nanopartículas y 2  $\mu$ g de DIO-1/ ratón). A continuación, a los 16 días de gestación (E16) a todos los ratones, vacunados y no vacunados (NV), se les inoculó por vía intravenosa 100  $\mu$ L de *LM*<sup>WT</sup> o *LM*<sup>ActA</sup> en solución salina (1 x 10<sup>4</sup> CFU/mL), denominadas gestantes infectadas NV-*LM*<sup>WT</sup> o NV-*LM*<sup>ActA</sup>. También se conservó un grupo control de gestantes no vacunadas (NV) (n=5) a las cuales se inocularon 100  $\mu$ L de solución salina (Control-NI) y otro grupo de vacunados con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> y no infectados (n=5). Todos los animales fueron examinados diariamente. En el día de gestación 20 (E20) se detectó 3  $\pm$ 0,5 crías nacidas de ratonas gestantes infectadas con *LM*<sup>WT</sup>, 4  $\pm$ 0,5 crías nacidas de gestantes infectadas con *LM*<sup>ActA</sup> y NV, mientras que 8  $\pm$ 1 crías nacidas de ratonas control y ratonas vacunadas con GNP- GAPDH<sub>1-22</sub> infectadas o no con *LM*<sup>WT</sup> o *LM*<sup>ActA</sup>. Se realizaron tres experimentos independientes y los resultados fueron la media  $\pm$  DE. Cuatro días después del nacimiento, las crías P4 (día 4 postnatal) de las ratonas gestantes NV o vacunadas con GNP- GAPDH<sub>1-22</sub> y de ratonas gestantes infectadas con *LM*<sup>WT</sup> o *LM*<sup>ActA</sup> fueron sacrificadas para cuantificar CFU/mL viables en cerebros y en hígados enteros. Otro conjunto de estos neonatos P4 se utilizaron para la preparación de cultivos de microglía y medición de citocinas y CFU/mL viables en estas células.

#### 6.1.4. Procesamiento de control como comprobación de la infección en los ensayos con ratones

La siembra de bacterias de los distintos órganos de los ratones infectados, la siembra de los lavados peritoneales o el análisis de citocinas del suero de sangre obtenido de los ratones infectados o no infectados en los diversos ensayos, sirve de control para confirmar el correcto proceso de infección (o no infección en el caso de los controles (NI)) del animal.

Los bazos e hígados obtenidos en la disección durante los ensayos con animales de experimentación son procesados para análisis de bacterias viables, CFU y mediante citometría de flujo, FACS. Así, se comprueba que, tras el ensayo de infección del animal, estos órganos han sido infectados (presencia de *Listeria monocytogenes*). Para su procesamiento, estos órganos son homogenizados de forma mecánica y lisados durante 30 segundos con agua MilliQ, procedimiento que lisa los eritrocitos exclusivamente dejando intactas al resto de células esplénicas. Estas muestras se recogen y centrifugan en PBS a 800 x g, se recogen los sedimentos que se resuspenden en HBSS o PBS y se siembran en placas de cultivo BHI agar para estimar el número de bacterias viables mediante un recuento de CFU/mL.

Para el análisis de la susceptibilidad a la infección, los ratones se inoculan con una dosis sub-letal de *LM*<sup>WT</sup> (LD<sub>50</sub> en la cepa C57BL/6 es 1 x 10<sup>4</sup>/ratón) y tras 3 días post-infección, se sacrifican los ratones y obtienen bazos e hígados de cada ratón. Tras homogenización de órganos y lisis celular, se siembran en placas de agar sangre o BHI para el conteo de bacterias viables (CFU/mL).

## **6.2. Obtención y ensayos con cultivos celulares de células microgliales mixtas y microglía purificada (MG)**

Se realizaron cultivos mixtos de células microgliales como se describe (*López-Fanarraga y col., 2007*). Se obtuvieron los cultivos de las células de microglía mixtas a partir de cerebelo de neonatos de ratón al día postnatal 1-6 y se cultivaron estas células durante 3-4 semanas. Los cultivos se establecieron hasta la diferenciación neuronal completa y, a continuación, se infectaron con las bacterias GFP-*LM*<sup>WT</sup> (1 x 10<sup>5</sup> - 1 x 10<sup>6</sup> CFU/mL) durante diferentes períodos de tiempo, de 30 a 120 minutos antes de la

fijación. Para visualizar la infección por *Listeria monocytogenes* se fijaron con p-formaldehído, se realizó una tinción de inmunofluorescencia y después, estas muestras, se observaron por microscopía confocal multicanal.

Los cultivos de microglía purificada (MG) fueron aislados y purificados por separación magnética (autoMACS® Pro (Miltenyi Biotec)) a partir de cultivos de microglía mixta de cerebelo de crías de ratón P4-P7 (4-7 días de edad). Las células de microglía se homogenizan y se lavan con HBSS, se resuspenden en PBS con seroalbúmina bovina (0,5%) y EDTA (2 nM), se incuban durante 15 minutos a 4°C con el anticuerpo específico CD11b, que es un marcador poblacional característico de la microglía, que está unido a unas nanopartículas magnéticas y al pasar por el separador magnético se puede conseguir separar la microglía de manera específica del resto de tipos celulares. Estas células de microglía purificadas, se mezclan por agitación durante 30 minutos, y se replantan en placas de 24 pocillos o placas de 96 pocillos para los diferentes ensayos: microscopía confocal y FACS. El análisis por FACS de la calidad de la purificación de células MG indica que el 90% de las células MG obtenidas eran doblemente positivas para los marcadores CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> y sólo el 80-85% de las células eran doblemente positivas para los marcadores de activación F4/80<sup>+</sup>IA<sup>b+</sup>. Estas células de microglía purificada (MG), también se utilizaron para ensayos de cinéticas de infección, utilizando placas de 96 pocillos, una por cada tiempo de infección y para realizar las mediciones de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la recolección de sobrenadantes para el análisis de citosinas; así como para la preparación del medio acondicionado para los estudios de apoptosis neuronal.

Para los ensayos de proteínas de sobrenadantes post-nucleares (PNS), se utilizaron 2 x 10<sup>8</sup> de microglía purificada que se infectará o no (NI) con las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* durante 20 minutos y una proporción de infección 10:1 (bacterias: células). Las células se lavaron 3 veces con tampón HBE antes de la homogeneización como se describe en (Chao y col., 1992; Del Cerro-Vadillo y col., 2006). Se obtuvieron 0,15 mg/mL de proteína en PNS de microglía purificada.

### **6.3. Estudios proteómicos**

#### 6.3.1. Obtención y aislamiento de fagosomas y endosomas. Análisis de su composición proteica

Las líneas celulares BV2 y J774 se infectaron con las cepas de *Listeria monocytogenes* ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$  o  $LM^{plcA\ plcB}$ ) durante 20 minutos con una proporción de infección de 10:1 (bacterias: células). Posteriormente, se recogen utilizando un raspador celular y se realizan dos lavados (con HBSS y centrifugando 5 min a 800 x g) y después se homogenizan los sedimentos celulares con HBE. Mediante centrifugación se recogen las fracciones post-nucleares que son los sobrenadantes de la centrifugación (PNS). Las fracciones fagosómicas se aíslan a partir de los PNS (del inglés *post-nuclear supernatant*, sobrenadantes postnucleares). Los PNS se dividen en alícuotas de 100  $\mu$ L, se congelan directamente en nitrógeno líquido donde se almacenan hasta su utilización. Para el aislamiento fagosomal, se descongelan las alícuotas de PNS. El procedimiento para el aislamiento fagosomal consiste en someter una alícuota de 100  $\mu$ L de PNS, a un gradiente discontinuo de sacarosa de 8,8-20-40% y centrifugar a 1.400 x g. Los fagosomas se recuperan de la interfase 8,8-20%. La pureza de los orgánulos es monitorizada por un análisis bioquímico, como previamente ha sido descrito, para evaluar la contaminación con otros componentes celulares (*Prada-Delgado y col., 2001; Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2009; Carrasco-Marín y col., 2011*) La cantidad de contaminación con ARN en los fagosomas, se estimó en todas las preparaciones fagosómicas usando Tri-reagent para el aislamiento del ARN, ADN y proteína de la misma muestra (Molecular Research Center, Inc. OH, USA). A continuación, se midió la cantidad de ARN y proteína utilizando un equipo Nanodrop y se hicieron geles de agarosa para comprobar las dos formas del ARN ribosomal, el pequeño de aproximadamente una banda de 2 Kb en geles de agarosa y el grande de aproximadamente una banda de 5 Kb. Se estimó la viabilidad de *Listeria monocytogenes* en las preparaciones fagosomales después del contaje de CFU/mL en placas de agar sangre y seleccionando sólo aquellas preparaciones fagosómicas con número de viables de 500 CFU/mL (aproximadamente 30  $\mu$ g de proteínas fagosomales)

para western-blot. La integridad fagosomal y la citotoxicidad también se comprueban como se describe previamente (Carrasco-Marín y col., 2009).

Los endosomas formados en células BV2 y J774 no infectadas (NI) se obtuvieron como se describe en (Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Rodríguez-Del Río y col., 2011). Las células microgliales BV2 y los macrófagos J774 no infectados (NI) se homogeneizaron en tampón HBE, para obtener fracciones post-nucleares, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para obtener posteriormente las fracciones endosomales, los PNS descongelados se diluyen rápidamente a razón de  $\frac{1}{2}$  en HBE, se centrifugan a  $37.000 \times g$  durante 1 minuto y los sobrenadantes resultantes se centrifugan a una velocidad de  $50.000 \times g$  durante 5 minutos, los sedimentos obtenidos se corresponden con la fracción endosomal enriquecida. La pureza de estos orgánulos fue monitorizada mediante pruebas bioquímicas de forma similar a los fagosomas, y como se ha descrito con anterioridad (Prada-Delgado y col., 2001; Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2009; Rodríguez-Del Río y col., 2011). En los estudios de western-blot, estas fracciones endosomales se cuantificaron para proteína mediante un Nanodrop y se cargaron  $30 \mu\text{g}$  de ellas por carril en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se usaron como vesículas control (CONT) para estandarizar los niveles basales en el análisis de la composición proteica de los fagosomas, al provenir de los mismos tipos celulares que los fagosomas, tal y como se había descrito anteriormente (Rodríguez-Del Río y col., 2001).

### 6.3.2. Análisis comparativo de fracciones fagosomal y citosólica

Se cultivaron macrófagos J774 y microglía BV2 a razón de  $2 \times 10^8$  células/pocillo en las placas de cultivo. Las células fueron infectadas con las cepas de *Listeria monocytogenes* en una proporción de infección de 10:1 (bacterias: células) durante 20 minutos. El aislamiento de los fagosomas se realizó como se describió anteriormente y, después, se separaron las fracciones fagosomales y citosólicas mediante centrifugación, a una velocidad de  $35.000 \times g$  durante 5 minutos. Los sedimentos obtenidos corresponden a los fagosomas (fracciones fagosomales), mientras que los sobrenadantes corresponden al citosol (fracciones citosólicas). Los fagosomas se aislaron a partir de alícuotas de PNS. Además, se utilizó un PNS adicional, para estimar

el porcentaje total de *Listeria monocytogenes* internalizada y expresado como CFU/mL. Los porcentajes de bacterias viables en las fracciones fagosómicas y citosólicas se calcularon de la manera descrita (*Carrasco-Marín y col., 2009; Carrasco-Marín y col., 2011*) y según el siguiente cálculo de proporción:  $(\text{PNS} - \text{n}^\circ \text{ de fagosomas} / \text{PNS}) \times 100$ . Los resultados se expresan como porcentajes de CFU/mL internalizada total en PNS (media  $\pm$  DE).

### 6.3.3 Western-blot

Después de la purificación de los fagosomas, obtenidos a partir de las diversas condiciones según el tipo celular J774 o BV2 e infectados con las diversas cepas de *Listeria monocytogenes*, se utilizaron parte de estas muestras para examinar su composición proteica mediante western-blot. Se cargan geles de SDS-PAGE al 10% con 30 $\mu$ g por carril de proteínas fagosómicas purificadas de cada muestra y cada condición y se separaron en dichos geles, para posteriormente, realizar una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (1,5 h, 200 V, 120 mA, 90 min), después se añade una solución de bloqueo que se basa en BSA (Del inglés *Bovine serum albumin*) en PBS durante 30 minutos para bloquear todos los sitios sin proteína en la membrana. Posteriormente, se procede a realizar varios lavados para eliminar la solución de bloqueo con PBST (PBS-Tween20) y se añaden los anticuerpos primarios diluidos en PBS con azida sódica y se incuban entre 30-60 minutos o toda la noche a 4°C y en oscuridad, dependiendo del anticuerpo. Posteriormente, se realizaron varios lavados y se incubaron con los anticuerpos secundarios, también diluidos en PBS con azida sódica durante 1-2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se retiraron los anticuerpos, se lavaron las membranas y escanearon para analizar los resultados. Se ha utilizado el anticuerpo Rab5c como un control de carga en todos los experimentos de western-blot, ya que los niveles de esta proteína no son modificados por la infección de *Listeria monocytogenes* (*Rodríguez-Del Río y col., 2011; Carrasco-Marín y col., 2012*).

Se utilizaron como control también, las muestras de fracciones endosomales de las que se cargaron 30 $\mu$ g por carril de estas fracciones que se usaron como vesículas control (CONT) para estandarizar los niveles basales en el análisis de la composición proteica de los fagosomas (*Rodríguez-Del Río y col., 2001*).

#### **6.4 Ensayos de cinéticas de infección**

Se infectan las líneas celulares (BV2 y J774), cultivos mixtos de microglía (Mixed-MG), BMDMs y microglía primaria purificada (MG). (Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Álvarez-Domínguez y col, 2000; Prada-Delgado y col, 2001; Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2009; Carrasco-Marín y col., 2011).

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a razón de  $1 \times 10^6$  células/mL y se infectaron con las cepas de *Listeria monocytogenes* en una proporción de 10:1 (bacterias: células) durante 15 minutos. Posteriormente, se incubaron durante 45 minutos en medio de cultivo DMEM con 30  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares que aún no hayan conseguido ser internalizadas como se informa en (Carrasco-Marín y col., 2009; Frande-Cabanes y col., 2014). Tras estas incubaciones y a partir de aquí, se considera el tiempo 0, después se dejarán otras placas con células infectadas con las diversas cepas de LM a diferentes tiempos de infección (4, 8 y 16 horas) en DMEM sin antibiótico. Para parar la infección a cada tiempo, se añade una alícuota de PBS y se congela y conserva a  $-80^\circ\text{C}$  la placa correspondiente. Posteriormente, se descongelan las placas, ayudando así a la lisis celular, se añade PBS-tritón al 0,01-0,05% durante 5 minutos para terminar de lisar las células y liberar las posibles bacterias que contengan. De estas muestras, se hace una batería de diluciones hasta aproximadamente un rango de  $1 \times 10^{-7}$ , y se siembran en placas de agar sangre, por duplicado cada dilución de cada condición a cada tiempo de infección. Para después hacer contaje de las CFU/mL y estimar el n° de bacterias viables por mL en cada tiempo de infección y por cada condición. El experimento se realiza por triplicado y se calcula la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Las cuantificaciones de CFU/mL a las 16 horas y las CFU/mL a las 0 horas, se expresan como una fracción (CFU/mL a 16 horas/CFU/mL a 0 horas)  $\pm$  DE de los triplicados y se representaron como se describe (Álvarez-Domínguez y col., 2000; Prada-Delgado y col., 2001; Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2012) y se consideraron estas fracciones calculadas como índices de replicación bacteriana (RI).

### **6.5. Expresión transcripcional de células microgliales**

Se cultivaron células de microglía (MG) y células BV2 ( $1 \times 10^6$  células/pocillos) en placas de 6 pocillos y después fueron infectadas o no (NI) con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  o  $LM^{ActA}$ ) a una proporción de infección de 10:1 (bacterias: células) durante 20 minutos a 37 °C, seguido de una incubación de 45 minutos en presencia de gentamicina (20 µg/mL) y, seguido de una incubación de 16 horas en DMEM con 5 % de suero (FBS). Las muestras no infectadas (NI) corresponden a los controles y proporcionan los niveles basales ya que se cultivaron a la misma concentración celular y se trataron en las mismas condiciones. A continuación, se realizó una extracción de ARN total de las células NI e infectadas con cada cepa usando el kit Qiagen (kit de aislamiento de ARN total de RNeasy, QIAGEN, P/N 74104). Se analizó la cantidad de ARN celular total, su integridad y calidad y su variación que oscilaba entre 26-31 µg totales de todas las muestras. Se analizaron la integridad del ARN en geles de agarosa al 1% y las dos formas de ARN ribosómico, el de 28S y el de 18S que si no han sido degradados tienen una proporción 2:1, respectivamente. La calidad del ARN se estimó en un valor cercano a 2.0 de la relación A260/280 nm y la concentración se calculó con la suposición de que 1 OD corresponde a 40 µg/mL de ARN medido a una absorbancia de A<sub>260nm</sub>. A partir de estas muestras de ARN aislado se realizaron los microarrays diferenciales utilizando el chip de Affimetrix, GeneChip MOE430A2.0, que evalúa 22.626 genes de ratón y que aplica un software de GCOS 1.3 Affimetrix® (Progenika S.A, Bilbao, España).

Los valores de los resultados obtenidos de los microarrays diferenciales se expresan como SLR (Del inglés *Signal Log Ratio*) que corresponde al log<sub>2</sub> del valor del cambio (FC, del inglés *Fold Change*) de la versión anterior del software de Affimetrix. Por lo tanto, un valor  $SLR \geq 0,3$  corresponde a genes inducidos y a valores  $\geq 1,2$  FC; mientras que valores  $SLR \leq -0,3$  corresponde a genes y valores  $-1,2$  FC. Toda la información de la ontología genética (Affimetrix NetAffx Analysis Center, Progenika SA) y el análisis de microarrays se depositaron en NCBI's Gene Expression Omnibus (Álvarez C, 2011), accesible a través de GEO Series con el número de acceso GSE32505 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE32505>).

## **6.6. Inmunofluorescencia y microscopía confocal**

Las células utilizadas para microscopía confocal se crecen sobre cubreobjetos circulares de vidrio y se fijan en paraformaldehído al 3% (dilución en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Si se quieren conservar, siempre en oscuridad a temperatura 4°C. Después se permeabilizan con PBS-Triton al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden los anticuerpos marcados con el fluoróforo y se incuban entre 30-60 minutos, dependiendo del anticuerpo y a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente, los cubreobjetos se ponen sobre un portaobjetos y se fijan mediante medio de montaje, para su observación mediante microscopía confocal.

En este estudio, las células utilizadas para inmunocitoquímica se fijaron en paraformaldehído al 3%. La actina se marcó con el fluorocromo TRITC-faloidina. Las células de microglía activadas se marcaron con el anticuerpo F4/80-PE. La cuantificación de las cepas de *Listeria monocytogenes* marcadas con FITC que colocalizaron con actina (TRITC-faloidina) se realizó como se ha descrito en (Carrasco-Marín y col., 2011). Las imágenes de las muestras se obtuvieron utilizando un equipo de microscopía confocal Nikon A1R. La observación y obtención de imágenes a microscopía confocal se describe en (Frande-Cabanes y col., 2014; Calderón-González y col., 2014).

## **6.7. Estudios funcionales**

### 6.7.1 .Medición de la producción de óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se cultivaron células macrófagos J774, células microgliales BV2, BMDMs y células microgliales primarias purificadas (MG) en una cantidad de  $2 \times 10^6$  células /mL en placas multipocillos. A continuación, se infectaron durante 1 hora con  $2 \times 10^7$  CFU/mL de *Listeria monocytogenes*. A través de estos ensayos se obtuvieron medidas de la de producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según está descrito (Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Álvarez-Domínguez y col., 2000) utilizando el reactivo de Griess y una curva patrón de nitrito de sodio. Se mide la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el producto HRPO (peroxidasa de rábano del inglés, *Horse-Radish-Peroxidase*) dependiente de la

conversión de rojo de fenol por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un compuesto con una mayor absorbancia a 600nm (Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Álvarez-Domínguez y col., 2000). Los resultados se expresaron como nano moles (nmol) de NO o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10<sup>6</sup> células. Las muestras se realizaron por triplicado y los resultados son la media ± DE de tres experimentos independientes.

#### 6.7.2. Análisis de citometría de flujo

Después de la infección con diferentes mutantes de *Listeria monocytogenes* se midió la producción de citocinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos de células J774, células BV2, BMDMs o microglía primaria purificada mediante un kit pro-inflamatorio CBA de la compañía Becton Dickinson (Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2009; Carrasco-Marín y col., 2011). Las células macrofágicas J774, las células microgliales BV2, los BMDMs y las células microgliales primarias purificadas, se incubaron en placas de 96 pocillos (análisis de citocinas) o de 6 pocillos (estudio de marcadores de superficie a una densidad de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL con medio solo o con medio que contenía 2 x 10<sup>7</sup> CFU/mL de *Listeria monocytogenes* durante 1 hora sin antibióticos y seguido de 24 horas de incubación en medio completo. Se centrifugaron las células y se recogió la mitad del volumen del sobrenadante. Se almacenó a -80°C hasta que se analizaron para estimar la concentración de las citocinas mediante FACS. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados corresponden a la media ± DE de dos experimentos separados. También se utilizó FACS para la evaluación de marcadores de superficie celular en células macrófagos J774, células microgliales BV2, BMDM o microglía primaria purificada (MG): CD45-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD14-FITC, F4/80-PE, IA<sup>d</sup>-APC (MHC-II de células macrófagos J774) o IA<sup>b</sup>-APC (MHC-II de células microgliales BV2, BMDMs y microglía primaria) y CD11b-APC.

### 6.7.3. Estudios de apoptosis celular

Para los experimentos de apoptosis neuronal a partir de sobrenadantes de microglía primaria purificada (MG), BMDM, J774 o células BV2, cada uno de estos tipos celulares fueron infectados con  $LM^{WT}$  durante 1 hora y se incubaron en medio de cultivo completo con gentamicina, para eliminar las bacterias extracelulares. Se recogieron los sobrenadantes y se filtraron por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, las neuronas se cultivaron junto con una dilución 1/10 de estos sobrenadantes durante 16 horas en su medio habitual. A continuación, las neuronas se marcaron con Hoechst el ADN de los núcleos y la tubulina con un anticuerpo específico (anti-  $\beta$ -tubulina) y los núcleos apoptóticos se contaron bajo un microscopio óptico, examinando 50 campos por cada condición. Los resultados se expresan como porcentajes  $\pm$  DE de triplicados ( $P < 0,05$ ) y el análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Plot 8.0. Las neuronas murinas del hipocampo HN9 se utilizaron para el análisis de apoptosis, después de la incubación de estas neuronas con una dilución 1/10 de medio acondicionado durante 16 horas. Se examinó la apoptosis de las células HN9 por análisis FACS después de marcar el ADN con DAPI (Molecular Probes).

Para la medida de apoptosis de las células BV2, éstas son lavadas con HBSS y PBS tras varias centrifugaciones de 5 minutos a 800 x g. Después son resuspendidas en PBS con 2,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Para medir la apoptosis se incuban las células con yoduro de propidio (IP), un agente intercalante que se une a los ácidos nucleicos, y con anexina V en una proporción 1:100. Esta proteína se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido de la membrana celular que en condiciones normales únicamente se encuentra en la capa interna de la membrana, pero que cuando la célula sufre apoptosis queda expuesta a la superficie celular y se puede unir a la anexina. Así, teniendo esto en cuenta y sabiendo que las membranas celulares no son permeables a estos compuestos, el análisis por citometría de flujo (FACS) permite estudiar la apoptosis de una población celular utilizando la anexina V conjugada con un fluorocromo y el yoduro de propidio (IP) (que tiene fluorescencia propia, con un máximo de emisión de 617 nm). Para poder observar las distintas etapas de apoptosis celular.

El marcaje de fluorescencia, microscopía confocal y estudios de apoptosis de neuronas HN9 se realizaron según (*Carrasco-Marín y col., 2011*).

### **6.8. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba “T de Student”,  $P \leq 0,05$  fue considerado significativo utilizando GraphPad para la presentación gráfica. La prueba de ANOVA fue aplicada para los análisis de citocinas siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA).

## **IV. RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

### 1. Determinación de la célula diana en el sistema nervioso central (SNC)

Estudios precedentes (*Lorber, 1997; Moragas y col., 2010*) describen el especial tropismo de *Listeria monocytogenes* por el sistema nervioso central (SNC).

La manifestación clínica más habitual en el adulto es la meningitis, siendo la romboencefalitis y el absceso cerebral infrecuentes, pero de peor pronóstico. La forma de presentación de este patógeno es muy variable y a menudo se confunde con otros síntomas clínicos más prevalentes que provocan una demora en el diagnóstico inicial de la enfermedad y por lo tanto en su tratamiento.

Todo esto hace que ésta sea una de las complicaciones más graves de la infección por *Listeria monocytogenes* en humanos. Por ello y porque es una de las partes del ciclo de infección menos conocidas, se procedió a su estudio.

Anteriormente, se habían descrito algunas células como posibles dianas potenciales de *Listeria monocytogenes* en el cerebro, como por ejemplo las células epiteliales del plexo coroideo, las células endoteliales, los macrófagos, la microglía o las neuronas (*Schlüter y col., 1999*).

Por lo cual, lo primero que se quiso examinar, fue a qué células del cerebro afectaba la infección y cuál o cuáles eran las dianas principales de este patógeno.

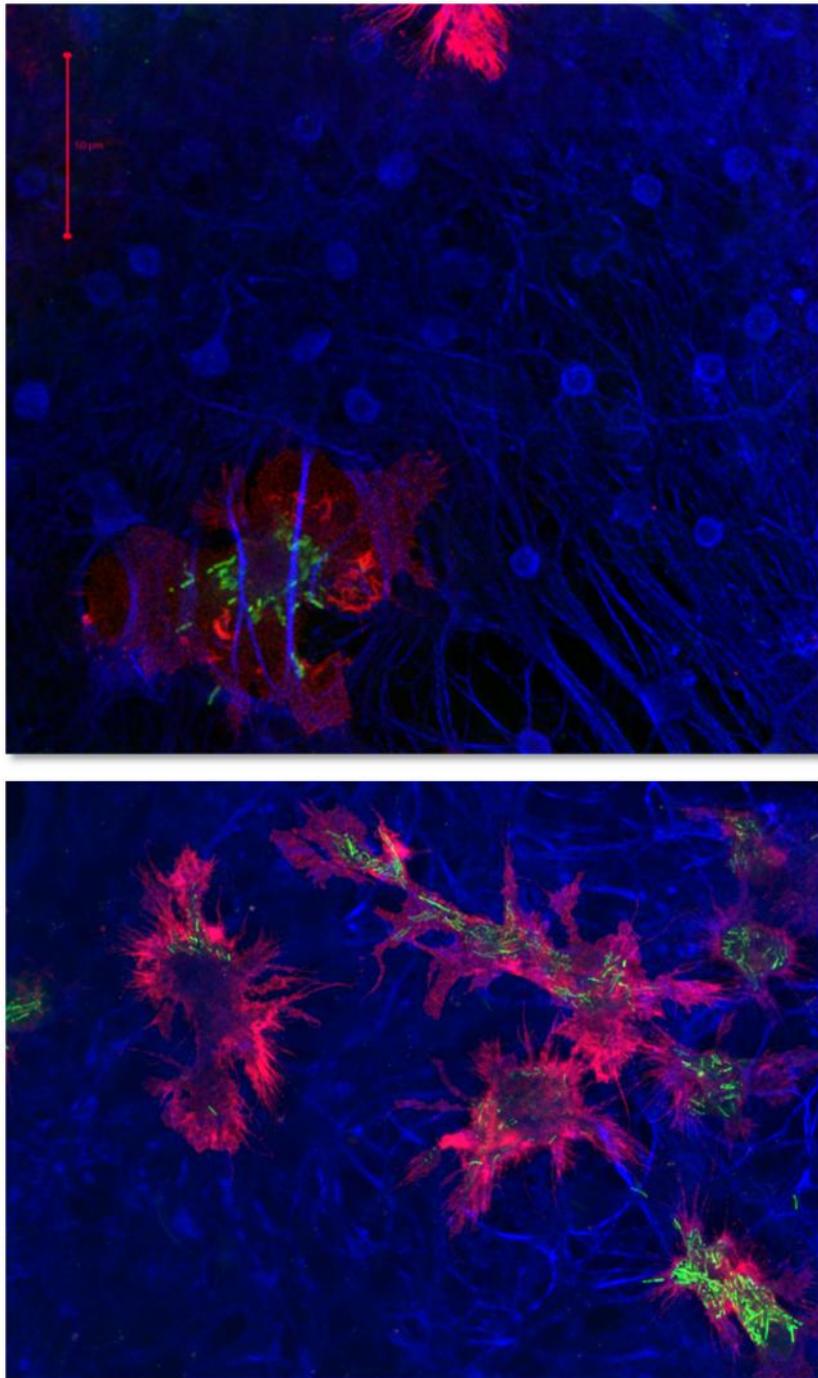
En primer lugar, se estudiaron dos tipos celulares del sistema nervioso central (SNC) por su relevancia en relación con este patógeno previamente descrito (*Dramsai y col., 1998*) y utilizando un modelo de infección *in vitro* de cultivos primarios de neuronas murinas procedentes de hipocampo de cerebro de ratón. Estos cultivos primarios se obtenían de ratones neonatos de 1-2 días de edad y contenían 95% neuronas, 2% de células de microglía y el resto, otros tipos de células gliales (*López-Fanarraga y col., 2007*).

Estos cultivos se infectaron con cepas de *Listeria monocytogenes* modificadas genéticamente para que expresen la proteína fluorescente GFP, GFP-*Listeria*, lo que se observa como fluorescencia verde (color verde en las Figuras). Se añadió a las muestras

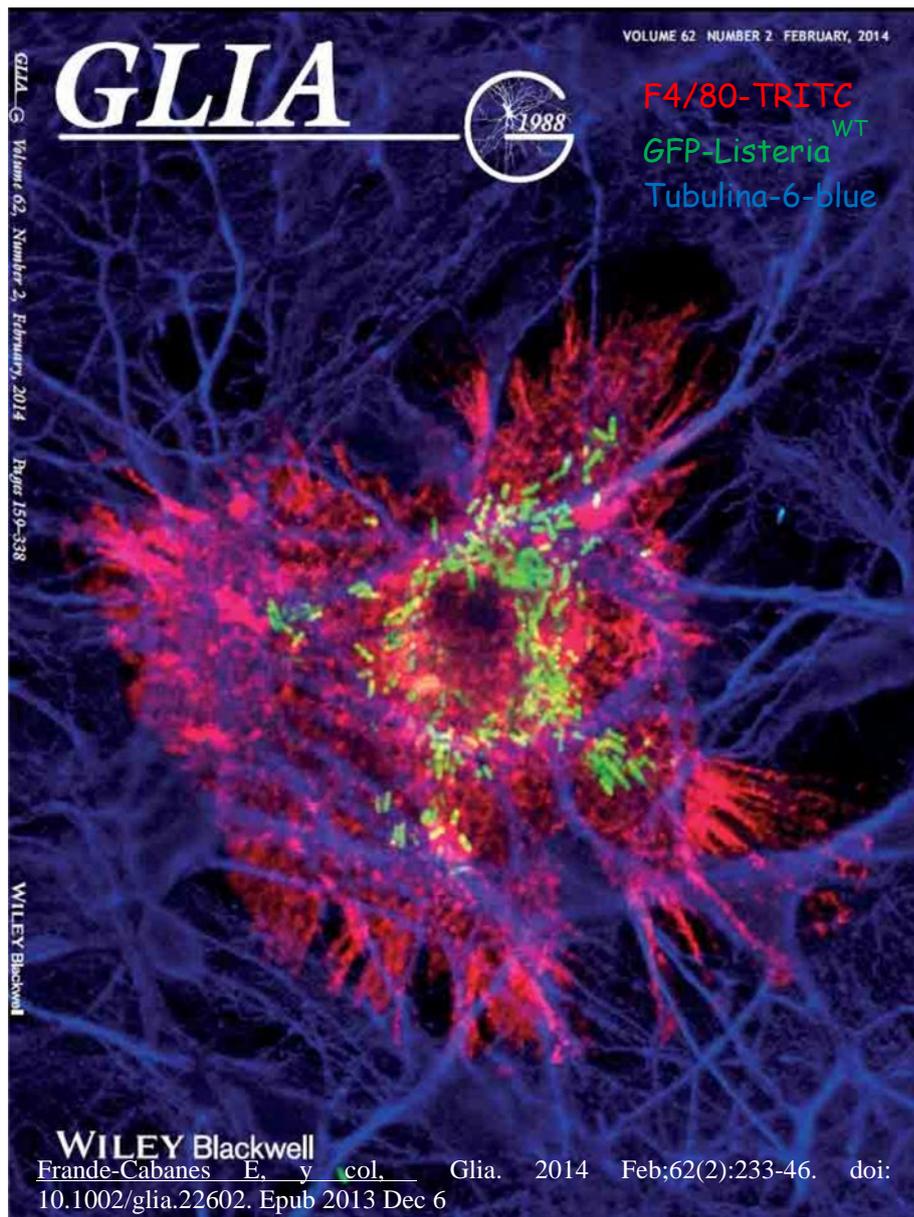
como marcador de neuronas *anti-tubulina* 3 que se observa como fluorescencia azul (color azul en las Figuras) y para macrófagos, se utilizó un marcador de activación específico, *F4/80*, que se detecta con un anticuerpo conjugado al fluorocromo, *TRITC* (del inglés, *5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate*) que se observa como fluorescencia roja (color rojo en las figuras) mediante microscopía confocal.

Este sistema de cultivo mixto nos permitió analizar las interacciones entre estas dos poblaciones celulares. Como se muestra en (**Fig.11 y Fig.12**),  $LM^{WT}$  cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* (canal verde) infecta de manera efectiva a la microglía primaria (canal rojo) y está prácticamente ausente en las neuronas (canal azul). A partir de las imágenes obtenidas de microscopía confocal, se concluye que no se puede encontrar ninguna bacteria fuera de la microglía.

La cuantificación de los porcentajes de microglía infectada en 10 experimentos diferentes realizados por triplicado, mostró que el 99% de la microglía estaba infectada por *Listeria monocytogenes* mientras que apenas el 0,01% de las neuronas contenía bacterias (*Frande-Cabanes y col., 2014*). Esto sugiere que *Listeria monocytogenes* invade principalmente las células de microglía, mientras que no infecta neuronas.



**Figura 11.** Imágenes de microscopía confocal de cultivos mixtos de células murinas de hipocampo infectados con GFP-LM. Las células microgliales están marcadas con F4/80 (canal rojo) y fueron infectadas con GFP-LM (canal verde) mientras que las neuronas, que se marcaron con el anticuerpo antitubulina  $\beta$  3 (canal azul), no mostraron bacterias intracelulares. Las barras de escala se corresponden con 50  $\mu$ m.



**Figura 12.** Imagen de microscopía confocal de la infección de GFP-LM a un cultivo mixto murino, portada de la revista *Glia* en Febrero de 2014. (Frande-Cabanes y col., 2014).

Por lo tanto, se concluye que la microglía es la célula diana del patógeno en el sistema nervioso central (SNC).

## 2. Los factores de virulencia de la célula diana y cómo actúan

### 2.1. Cinéticas de infección en células microgliales y macrófagos: diferencias en la implicación de la LLO y otros factores de virulencia de *Listeria monocytogenes*

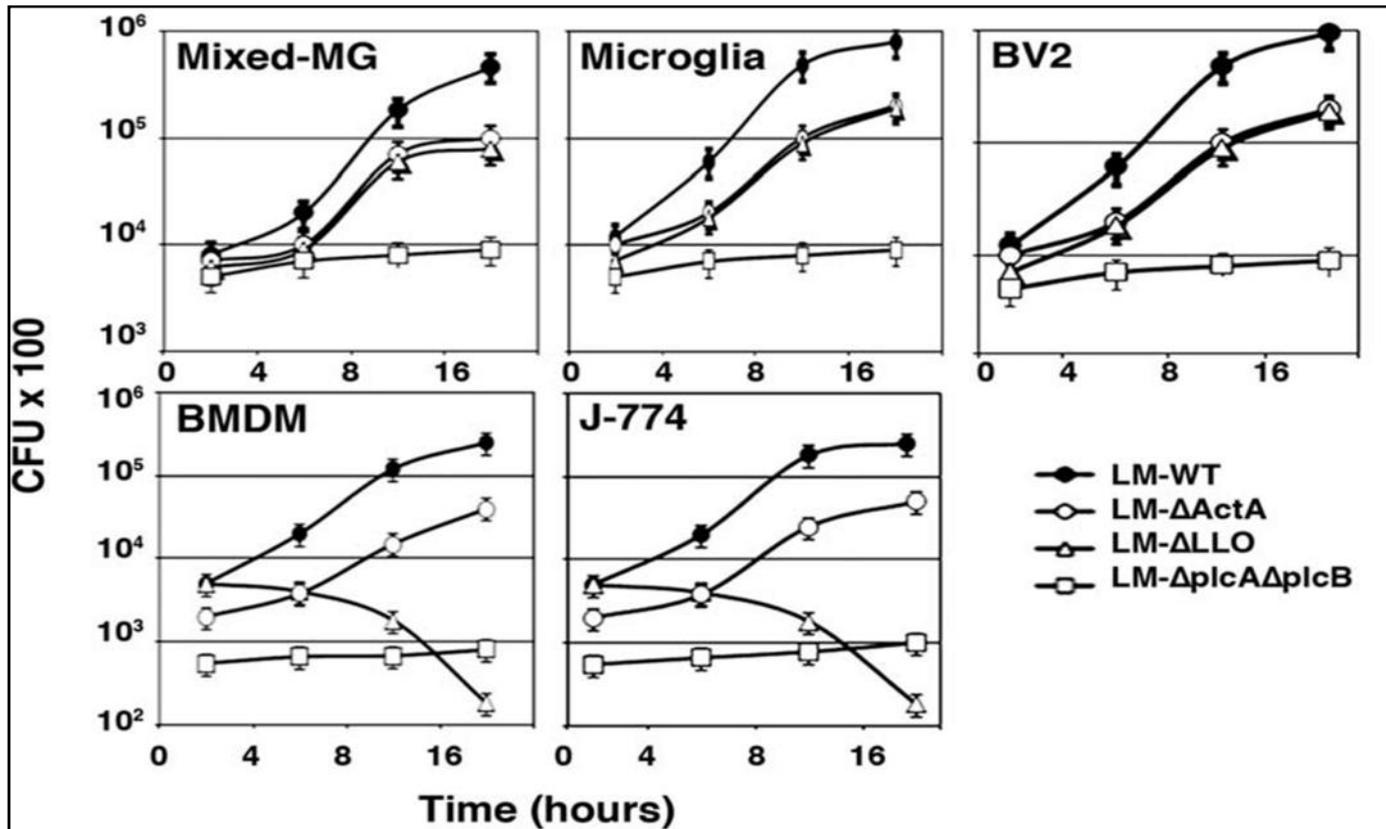
Existen estudios detallados de los factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y de diversas cepas mutantes de este patógeno, todos ellos de gran relevancia e implicados en el proceso de infección en macrófagos (*Prada-Delgado y col., 2001*). Por ello, y en comparación, se estudió la infección con *Listeria monocytogenes* de fenotipo salvaje y de varias cepas mutantes en células de la microglía, como la línea celular BV2, y en las células macrofágicas de la línea celular J774. Esta última línea celular, descrita y caracterizada en detalle por el grupo de la doctora Carmen Álvarez-Domínguez (*Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Del Cerro-Vadillo y col., 2006*).

A continuación, se realizaron análisis de cinéticas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* infectando, por una parte, cultivos de microglía: cultivos mixtos de hipocampo (Mixed-MG), células de microglía purificadas y la línea celular de microglía, BV2. Por otra parte, también se infectaron macrófagos, tanto macrófagos diferenciados de células de médula ósea (BMDM) (*Carrasco-Marín y col., 2011; Carrasco-Marín y col., 2012*), como la línea celular macrofágica, J774 (**Fig.13**).

Para la infección, se utilizaron varias cepas de *Listeria monocytogenes*, la cepa silvestre  $LM^{WT}$  y otras cepas mutantes de *Listeria monocytogenes* deficientes en genes implicados en etapas relevantes del ciclo de infección de este patógeno como la cepa mutante deficiente en el gen que codifica para ActA ( $LM^{ActA}$ ), la deficiente en el gen que codifica para LLO ( $LM^{LLO}$ ) y la deficiente en los genes que codifican para las fosfolipasas PlcA y PlcB ( $LM^{plcA\ plcB}$ ).

Se hizo recuento de las unidades formadoras de colonias o CFUs (del inglés, *Colony Forming Units*) obtenidas a distintos tiempos de infección. En el análisis de la cinética de  $LM^{WT}$  en cultivos mixtos de microglía (Mixed-MG), microglía purificada o BV2, se observó un crecimiento exponencial característico a las 4-8 horas, al cuál,

seguía una fase de crecimiento estacionario o meseta a las 16 horas postinfección, y que es similar a la cinética de infección de  $LM^{WT}$  en macrófagos de médula ósea (BMDM) y en la línea macrofágica, J774 (**Fig.10**) (Álvarez-Domínguez y Stahl, 1999; Prada-Delgado y col., 2001; Carrasco-Marín y col., 2009, Carrasco-Marín y col., 2011; Del Cerro-Vadillo y col., 2006).

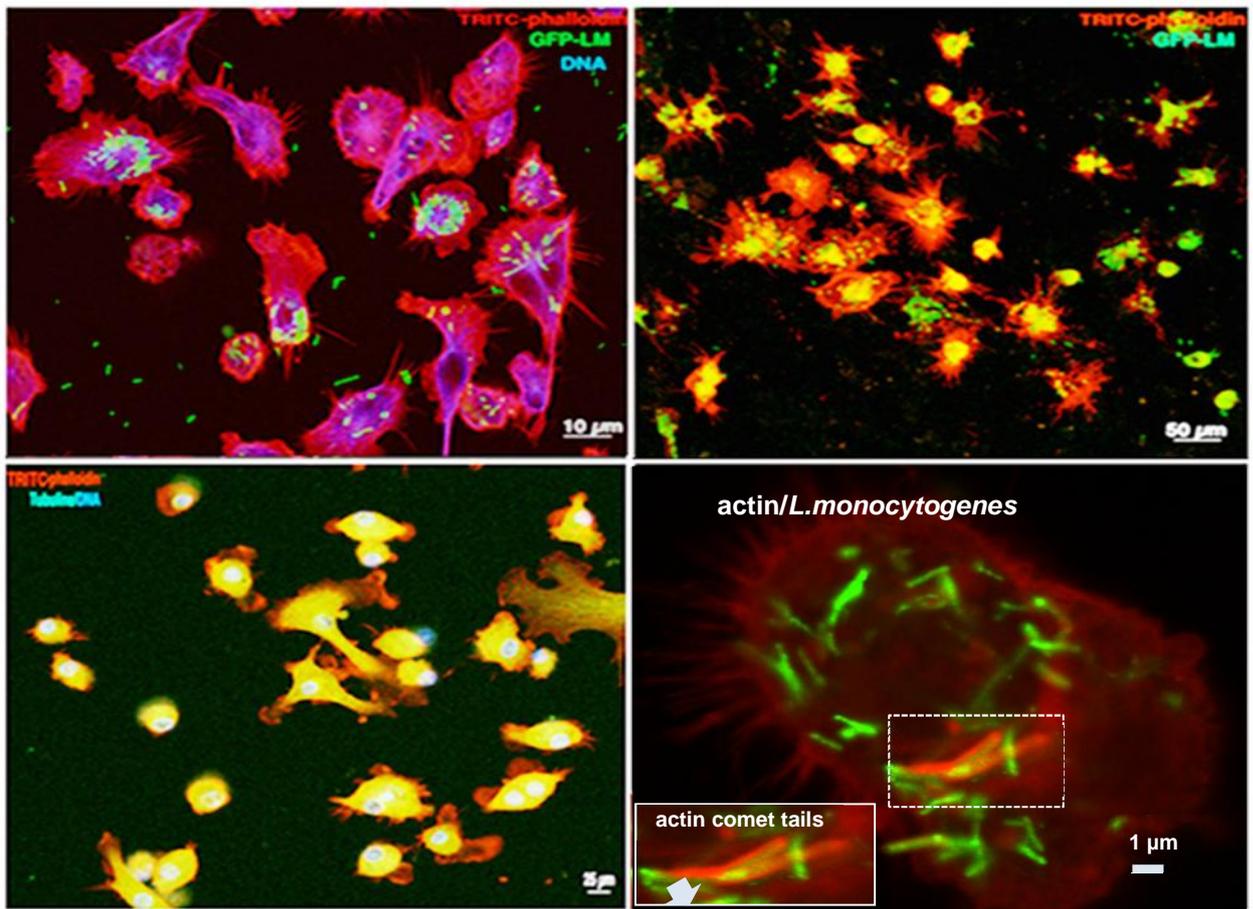


**Figura 13.** Cinéticas de infección de cultivos mixtos de microglía murina, microglía purificada, BV2, BMDM y células J-774 infectadas con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$ , y  $LM^{plcA\ plcB}$ ). Los resultados son expresados en CFU (media  $\pm$  DE); obtenidos de muestras por triplicado de tres experimentos independientes (las principales diferencias se observan entre los resultados de  $LM^{WT}$  and  $LM^{LLO}$  y  $LM^{plcA\ plcB}$ ,  $P < 0.05$ ).

Podemos concluir que las cinéticas de infección de *Listeria monocytogenes* de la cepa con fenotipo silvestre son similares en macrófagos ( $M\emptyset$ ) y en microglía (MG), presentando un crecimiento exponencial hasta las 8 horas y después una fase estacionaria a tiempos más largos. Por otra parte, mientras que el crecimiento en los macrófagos está controlado por el factor de virulencia LLO, ya que su deficiencia hace

que esta cepa deficiente no crezca y sea degradada, en la microglía, este factor de virulencia no parece importante para el crecimiento, como se observa en la (*Fig.13*), ya que crece con una cinética similar a la cepa de fenotipo silvestre, aunque detectándose un menor número de bacterias, al igual que con las bacterias deficientes en *ActA*. Se puede afirmar que en la microglía el crecimiento de *Listeria monocytogenes* no está controlado por la LLO, por lo que, en comparación con los macrófagos, los factores de virulencia que participan son distintos.

## 2.2. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en microglía. Nucleación de los filamentos de actina



**Figura 14.** Imágenes de microscopía confocal de microglía primaria purificada aislada de cultivos mixtos de microglía, con tinción de filamentos de actina con TRITC-faloidina (canal rojo) y núcleos teñidos con Hoeschst. Se infectó con GFP-LM<sup>WT</sup> (canal verde). Las barras de escala son 10 μm para la imagen superior izquierda, 50 μm para la imagen superior derecha y 25 μm para las imágenes inferiores. La co-

localización de GFP-LM<sup>WT</sup> y actina (fluorescencia amarilla) muestra las colas de cometa de actina de *Listeria monocytogenes* en el citosol (imagen marcada con flecha).

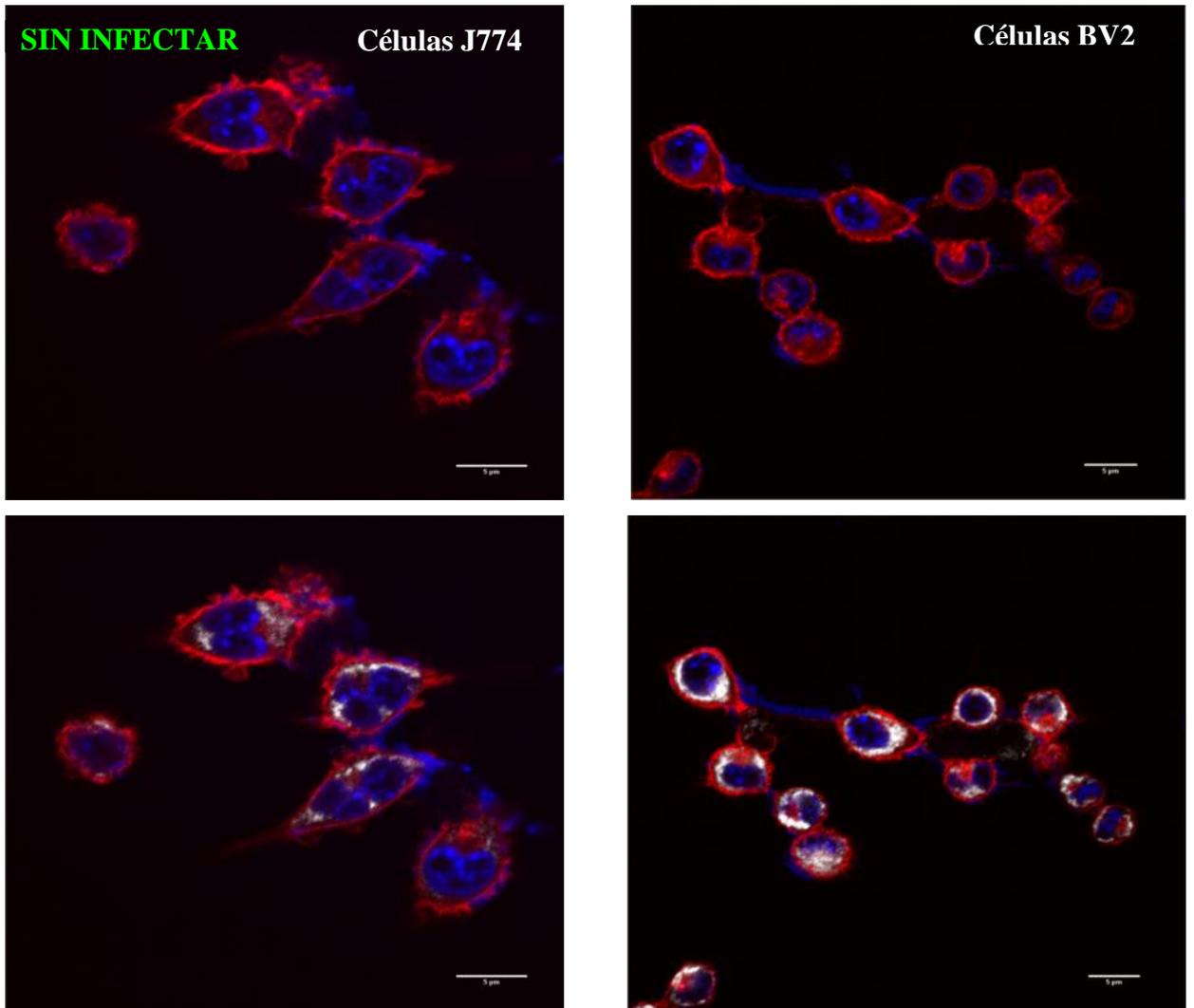
En la imagen inferior izquierda de la (**Fig.14**) se observa una preparación de microglía mediante microscopía confocal, donde se observan los filamentos de actina con una tinción con TRITC-faloidina (canal rojo) que colocalizan con los microtubulos al realizar una tinción de la tubulina (canal verde). La co-localización intracelular de actina y tubulina es una característica de la microglía, mientras que en las neuronas no co-localizan filamentos de actina y microtúbulos.

La microglía primaria purificada infectada con LM<sup>WT</sup> presenta un alto número de bacterias en el citosol (imágenes superiores **Fig.14**), filamentos de actina nucleados (imagen inferior derecha **Fig.14**) y donde además las cepas LM<sup>WT</sup>, LM<sup>LLO</sup> y LM<sup>ActA</sup> presentan crecimiento exponencial (**Fig.13**). Este crecimiento exponencial de *Listeria monocytogenes* se produce en el citosol y es similar tanto en macrófagos como en la microglía, lo que se observa por la nucleación de los filamentos actina, detallado en la imagen inferior derecha de la (**Fig.14**).

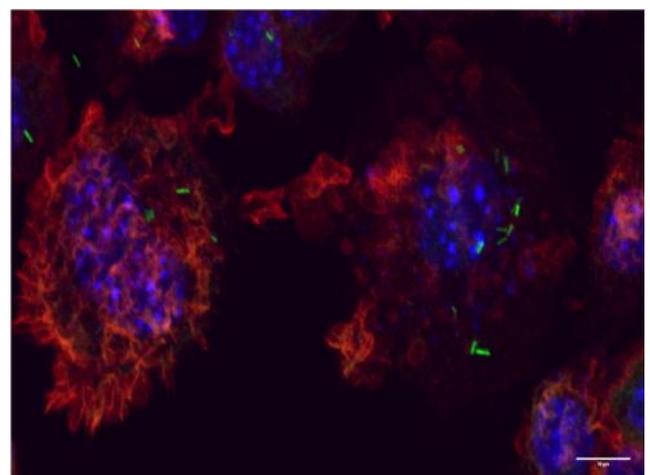
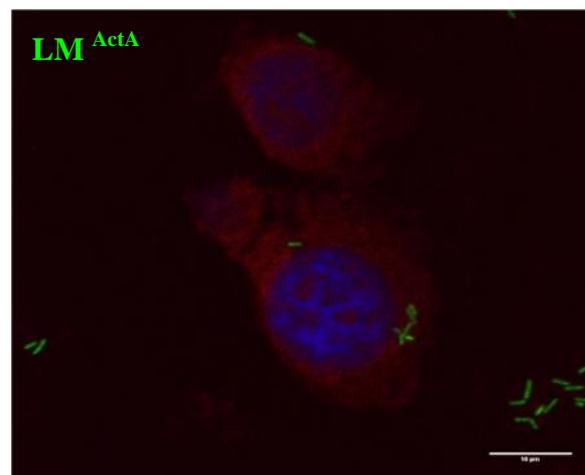
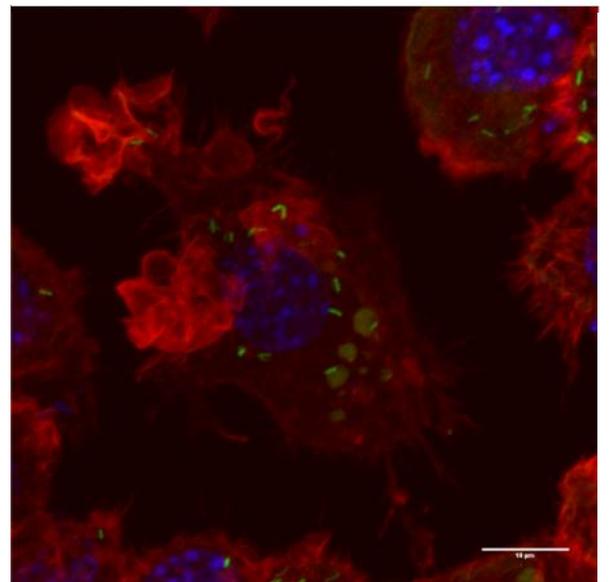
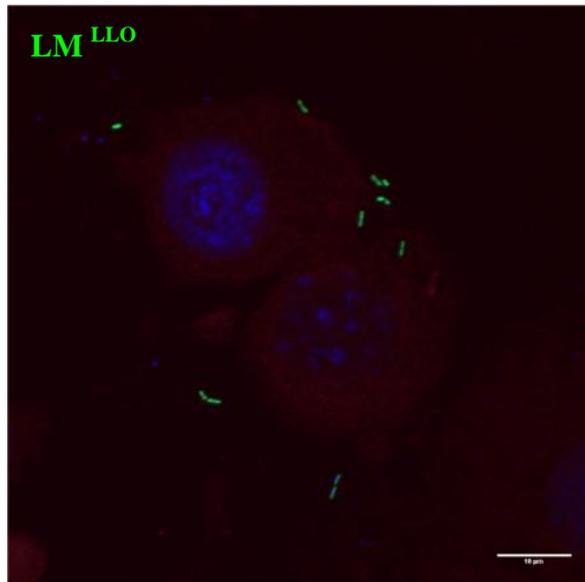
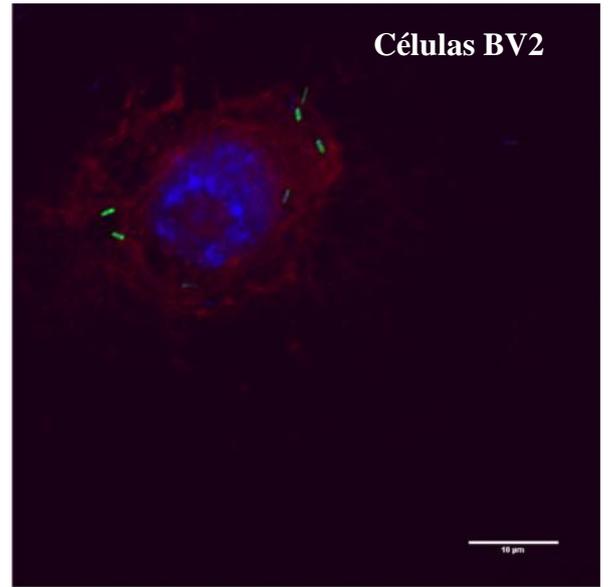
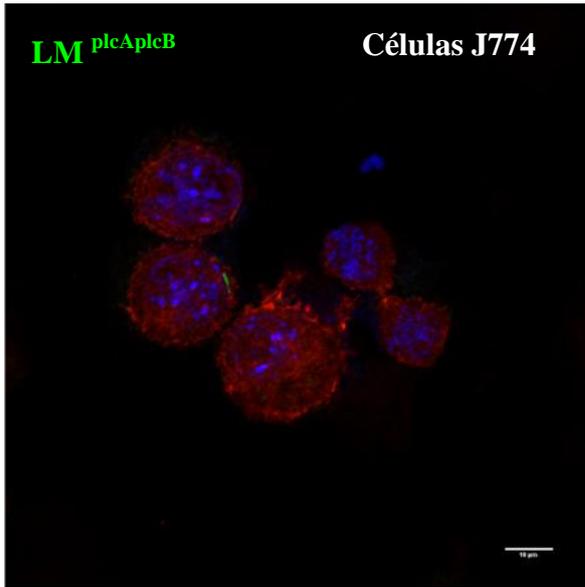
Como complemento a las cinéticas de infección (**Fig.13**), se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de muestras de cultivos de las líneas celulares BV2 y J774 para comparar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y sus cepas mutantes, con los crecimientos observados en la microglía y los macrófagos purificados de hipocampo y médula ósea murina, respectivamente y poder verificar, si existen diferencias entre los factores de virulencia implicados en la infección de *Listeria monocytogenes* en microglía y en macrófagos. Para ello, se marcaron las distintas mutantes de *Listeria monocytogenes* con FITC (Del inglés, *Fluorescein IsoTioCyanate*, isocianato de fluoresceína) (canal verde), el citoesqueleto de las células del cultivo con TRITC-faloidina (canal rojo) y los núcleos celulares con Hoechst (canal infrarrojo que se detecta como color azul). Algunas de las muestras, las muestras control con células sin infectar, se incubaron con un anticuerpo específico para un marcador de la activación de macrófagos como son las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II o IA en ratón), que es característico de cada tipo celular, así las células de microglía (BV2) son IA<sup>b</sup> mientras que las células macrofágicas (J774) son IA<sup>d</sup>, estos anticuerpos anti-IA se observan en otro canal mediante microscopía confocal (canal azul, en la figura en color

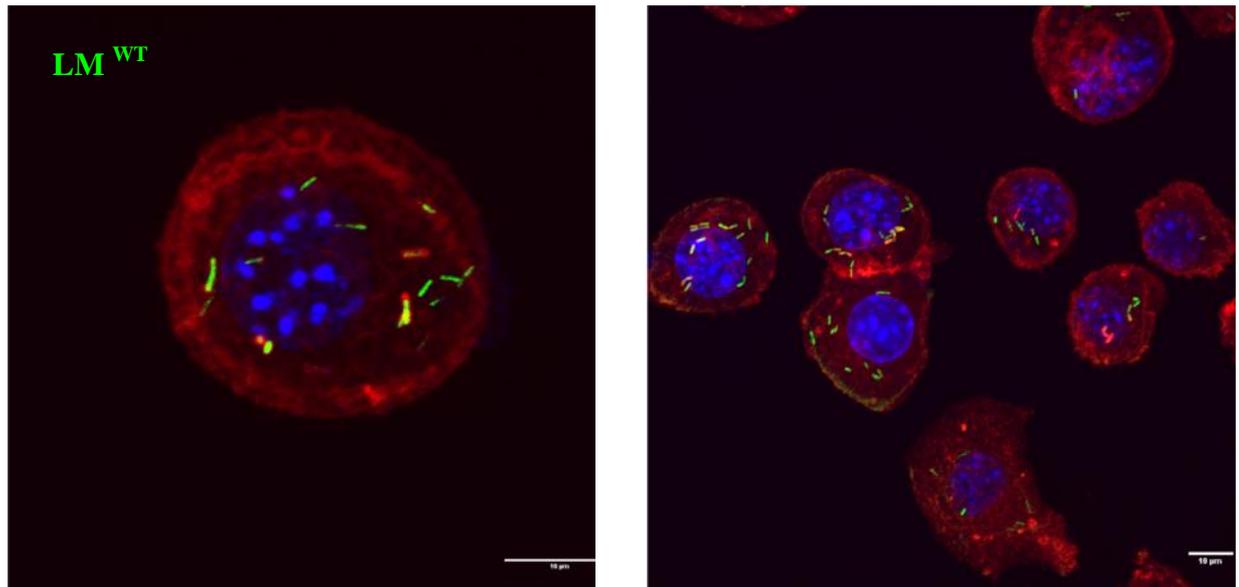
blanco). Los resultados obtenidos se muestran en la (**Fig.15**), donde se observa: (i) que se caracterizan correctamente los tipos celulares, macrófagos J774 y microglía BV2 controles (sin infectar) con sus marcadores específicos correspondientes de MHC-II (**Fig.15A**); (ii) que no hay grandes alteraciones en los filamentos de actina entre ambos tipos celulares infectados o no; (iii) las células BV2 son más sensibles a una infección con la cepa patogénica de *Listeria monocytogenes*,  $LM^{WT}$ , que las J-774 (**Fig.15B**); (iv) la mutante  $LM^{plcAplcB}$  no puede escapar de los fagosomas secundarios en los J774; mientras que en las BV2 si logra escapar e infectar a otras células; (v) la mutante  $LM^{ActA}$  que en condiciones normales (como se observa en J774 y descritas en bibliografía mencionado anteriormente), presenta números de infección intracelular bajos al infectar sólo a las células en las etapas iniciales, no nuclea filamentos de actina y carece de movilidad en el citosol. Esta cepa  $LM^{ActA}$  en las células BV2, presenta gran cantidad de bacterias, similar a las mutantes  $LM^{LLO}$  pero en menor cantidad que la cepa de fenotipo silvestre  $LM^{WT}$ ; (vi) la mutante  $LM^{LLO}$  presenta cierto crecimiento fagosomal en las células de la microglía BV2, lo que no ocurre en los macrófagos J-774.

En conclusión, todos estos datos indican que la infección en las células de la microglía es diferente al patrón de infección en los macrófagos y que el factor de virulencia LLO juega un papel distinto, al no ser decisivo para que la bacteria escape de los fagosomas y por lo tanto, no es relevante para su crecimiento intracelular en la microglía, a pesar de ser necesario en los macrófagos (*Join-Lambert y col., 2005; Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Carrasco-Marín y col., 2009; Carrasco-Marín y col., 2012*).



**Figura 15. A)** Imagen de microscopía confocal de células control (sin infectar): macrófagos J774 y microglía BV2 marcadas con Hoechst (canal infrarrojo que se ve en color azul), los filamentos de actina marcados con TRITC-faloidina (canal rojo) y anticuerpo específico de clase II específico y característico de cada tipo celular, anti-IA<sup>b</sup> (BV2) y anti-IA<sup>d</sup> (J774) con streptoavidina (canal azul que se ve en color blanco). Las barras de escala se corresponden con 5 µm





**Figura 15. B)** Imagen de microscopía confocal de infección de células J774 y BV2 marcadas con Hoechst (canal infrarrojo que se ve en color azul) y los filamentos de actina marcados con TRITC-faloidina (canal rojo) tras 90 minutos: sin infectar e infectados con LM<sup>WT</sup>-FITC y las mutantes LM<sup>pclApc1B</sup>-FITC, LM<sup>ActA</sup>-FITC y LM<sup>LLO</sup>-FITC (canal verde). Las barras de escala se corresponden con 10 μm

### 2.3. Localización sub-celular de *Listeria monocytogenes*. Comparación entre microglía y macrófagos

A continuación, se examinó la distribución intracelular de la bacteria en la microglía comparada con los macrófagos. Para ver la localización sub-celular de las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en macrófagos y microglía, se utilizó una técnica ya descrita en células J774 que cuantifica las bacterias viables en fracciones aisladas y purificadas fagosómicas y citosólicas por separado (Carrasco-Marín y col., 1999; Carrasco-Marín y col., 2011; Carrasco-Marín y col., 2012). Para ello, aislamos primero las dos fracciones sub-celulares donde se localizan estas bacterias: la fracción fagosomal y la fracción citosólica; y posteriormente, para ver su capacidad microbicida, se cuantifican las CFU/mL en dichas fracciones. Como tipo celular de microglía (MG) se utilizaron BV2 y como macrófagos (MØ) se utilizaron J774.

Los resultados obtenidos se pueden ver en la siguiente tabla (**Tabla2**).

**Tabla 2.** Tabla que recoge los datos de porcentajes de fracciones fagosomales, fracciones citosólicas y CFU/mL intrafagosomales (CFUs en la Tabla), resultado de la infección durante 2 h de las células BV2 y J774 con  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$  y  $LM^{plcA\ plcB}$  con una proporción de infección (10:1).

	(% Fracción Fagosomal)		(% Fracción Citosólica)		CFUs Intrafagosomales	
	BV-2 (MG)	J-774 (MØ)	BV-2 (MG)	J-774 (MØ)	BV-2 (MG)	J-774 (MØ)
$LM^{WT}$	20 ± 1	30 ± 3	80 ± 6	70 ± 6	80 ± 1	20 ± 1
$LM^{LLO}$	38 ± 5	100 ± 5	62 ± 4	0 ± 0,5	75 ± 2	7 ± 0.5
$LM^{ActA}$	20 ± 3	30 ± 3	88 ± 6	70 ± 2	77 ± 2	6 ± 0.4
$LM^{plcA\ plcB}$	90 ± 4	75 ± 4	10 ± 4	25 ± 0,5	10 ± 1	5 ± 0.2

En las células de microglía BV2, las cepas de *Listeria monocytogenes*  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  y  $LM^{ActA}$  mostraron una localización citosólica dominante con sólo el 20-38% de las bacterias localizadas en la fracción fagosomal (**Tabla2**), mientras que la cepa mutante  $LM^{plcA\ plcB}$  mostró una distribución fagosomal dominante.

En comparación, en las células macrófagicas J774, las cepas  $LM^{WT}$  y  $LM^{ActA}$  también mostraron una localización dominante en el citosol, en este caso con un 30%. Y al igual que en microglía, la cepa  $LM^{plcA\ plcB}$  también mostró una distribución mayor en la fracción fagosomal con un 75%. Sin embargo, encontramos claras diferencias en la distribución de la cepa mutante en la listeriolisina O ( $LM^{LLO}$ ).

La localización sub-celular de bacterias deficientes en LLO en macrófagos es un 100% en los fagosomas; mientras que en la microglía, la distribución en fagosomas es menor del 40% y aproximadamente el 60% se localiza en el citosol.

Por otra parte, también se puede observar en los resultados recogidos en la (**Tabla 2**), que el recuento de CFU/mL intrafagosomales en microglía (BV2) es mucho mayor que en los macrófagos (J774). En conjunto, se podría decir que las células de la

microglía son menos microbicidas que los macrófagos, puesto que las CFU/mL citosólicas son muy altas, mientras que las intrafagosomales muy bajas en la microglía; lo que indica que los fagosomas destruyen pocas bacterias que logran escapar al citosol en números altos. Esto se detecta mejor con las bacterias mutantes en LLO, *LM<sup>LLO</sup>*, que en los macrófagos no pueden escapar al citosol, mientras que en la microglía sí. Esto último nos lleva a pensar que los fagosomas de la microglía son distintos a los de los macrófagos.

### **3. Estudio de la expresión génica post-infección**

En macrófagos, solamente *Listeria monocytogenes* citosólica induce respuestas transcripcionales correspondientes a la respuesta inmune innata (*McCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2007; Carrasco-Marín y col., 2011*). Por ello, para estudiar el transcriptoma que induce este patógeno en la microglía, comparamos la expresión génica tras la infección de células macrofágicas (J774) y de microglía (BV2) con distintas cepas de *Listeria monocytogenes* capaces de crecer en el citosol. En un principio, se realiza un análisis transcripcional diferencial de ARN de las células infectadas frente a las no infectadas, para seleccionar los genes específicos de la infección por este patógeno. Posteriormente, se aplica otro análisis diferencial entre las distintas bacterias mutantes para escoger aquellos genes específicos de cada mutación. Más tarde, se aplicarán agrupamientos selectivos referentes a la respuesta inmune y se verifican todos estos análisis transcripcionales con estudios proteómicos.

#### **3.1. Microarrays y agrupamiento de genes inmunes. Patrones comunes y diferenciales del transcriptoma de macrófagos y microglía tras la infección**

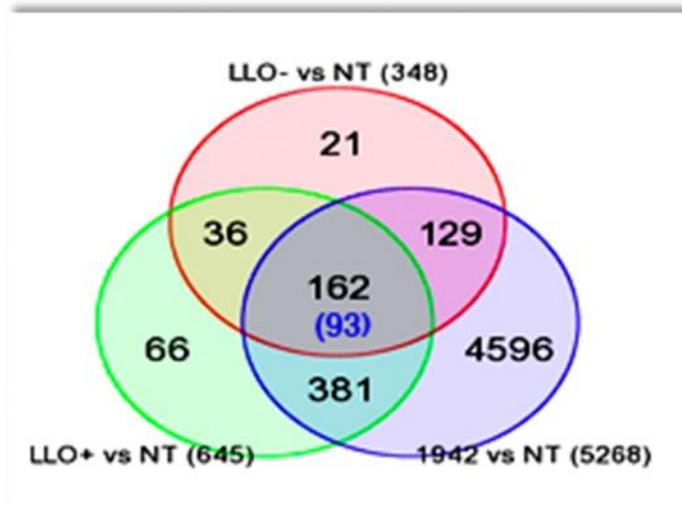
En este estudio se analizaron las respuestas transcripcionales inducidas por cepas de *Listeria monocytogenes* de crecimiento citosólico en células de microglía BV2 y después se contrastaron con las respuestas inducidas en macrófagos (J774). Nos

centramos en los grupos funcionales conocidos e involucrados en la inmunidad innata de macrófagos.

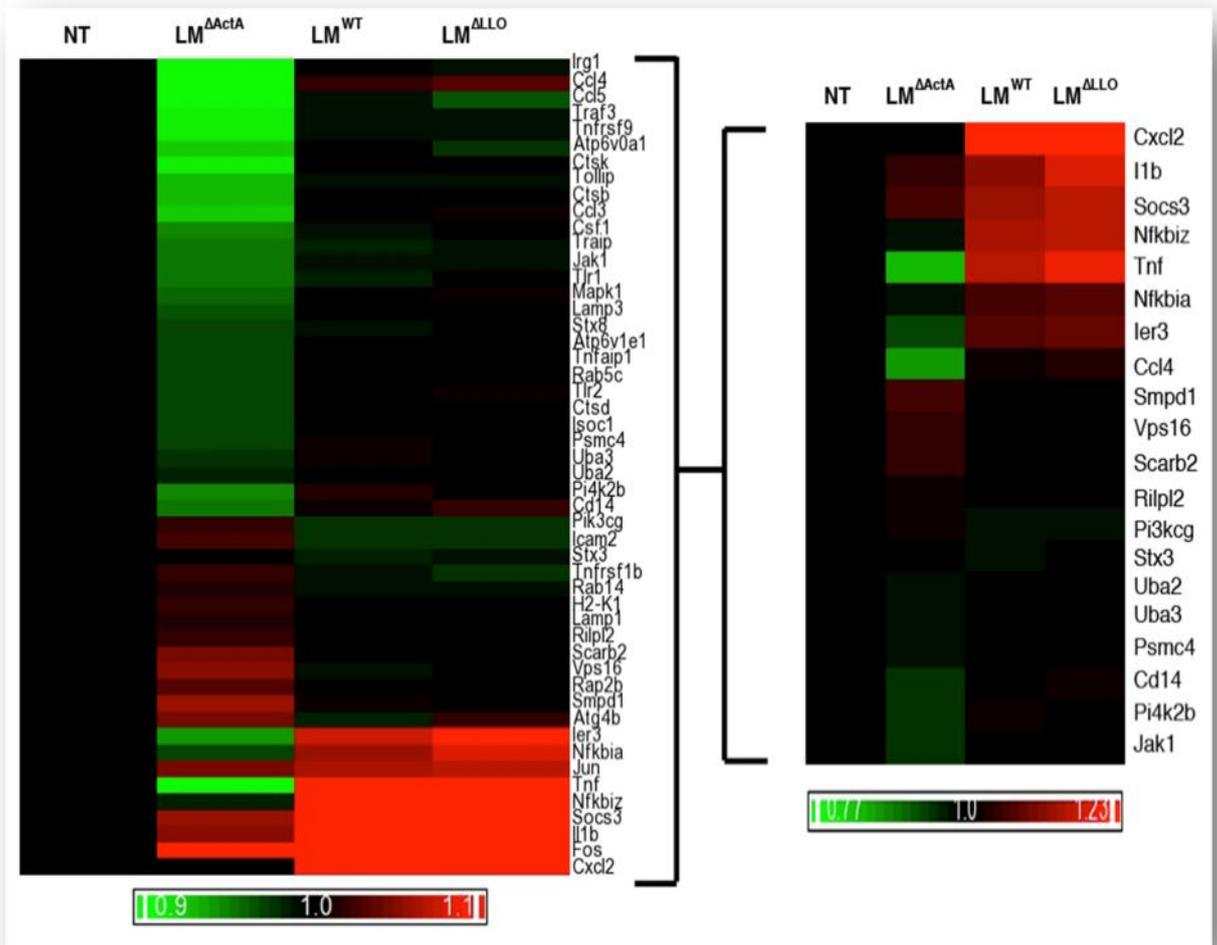
En lo que se centró el análisis transcripcional fue en la expresión diferencial de los genes incluidos en el chip de genes de Affimetrix (GeneChip MOE430A2.0) en células BV2 que previamente habían sido infectadas con cepas de *Listeria monocytogenes* con crecimiento citosólico ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  y  $LM^{ActA}$ ) en comparación con los niveles basales de las células no infectadas (NT). Utilizamos células BV2 basándonos en una estrategia previamente descrita para células J774 infectadas con cepas de *Listeria monocytogenes*, esta estrategia combina el análisis transcripcional y la composición proteica de la plataforma fagosomal (Carrasco-Marín y col., 2012).

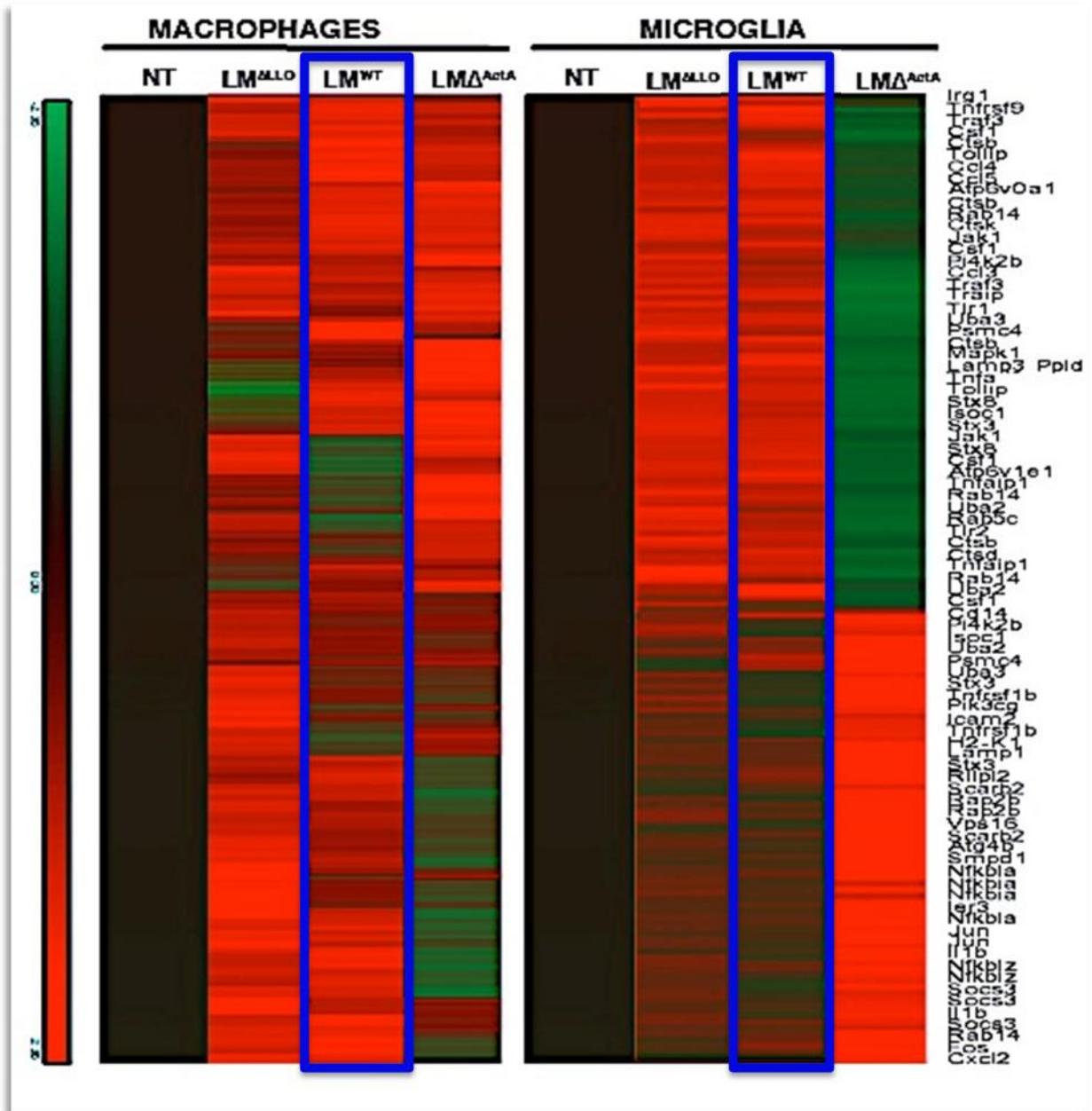
Estos datos transcripcionales se analizaron utilizando una aproximación enfocada a las agrupaciones funcionales involucradas en la inmunidad innata de los macrófagos (panel inferior **Fig.17**) (McCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2007; Leber y col., 2008; Carrasco-Marín y col., 2011). Una ampliación más detallada del análisis bioinformático de las respuestas transcripcionales se describe en la publicación principal (Frande-Cabanes y col., 2014).

De los genes compartidos entre las distintas cepas mutantes de *Listeria monocytogenes* (**Fig.16**), se seleccionaron los 20 genes de mayor expresión en microglía (panel superior de **Fig.17**), ya sean reprimidos (cajas verdes) o inducidos (cajas rojas), clasificándolos en dos patrones transcripcionales: un patrón común a los macrófagos y un patrón específico para la respuesta inmune de la microglía (**Fig.17**).



**Figura 16.** El diagrama representa el número de genes expresado diferencialmente y en común de los análisis transcriptómicos diferenciales de LLO- ( $LM^{LLO}$ ) frente a NT (sin infección), LLO+ ( $LM^{WT}$ ) frente a NT y cepa 1942 ( $LM^{ActA}$ ) frente a NT. Hay 162 genes que corresponden a un programa de expresión común a todas las muestras, con 41 genes inducidos y 51 genes reprimidos.





**Figura 17.** Panel superior: se usaron células BV2 no infectadas (NT) e infectadas con  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  y  $LM^{ActA}$ , para aislar ARN y obtener microarrays diferenciales. En el mapa de calor se presentan los 20 genes de mayor expresión diferencial (de los 162 obtenidos y 93 de ellos implicados en respuesta inmune), que representan el grupo de inmunidad innata de *Listeria monocytogenes* (Frade-Cabanes y col., 2014). Los genes reprimidos se muestran en color verde y los inducidos en color rojo. Las zonas en color negro corresponden a genes expresados de forma no diferenciada. En el panel inferior: se muestra un mapa de calor comparativo entre resultados en células BV2 y células J774 donde se recogen los genes más representativos de los dos patrones obtenidos: uno común entre microglía BV2 y macrófagos J774 y otro específico de microglía.

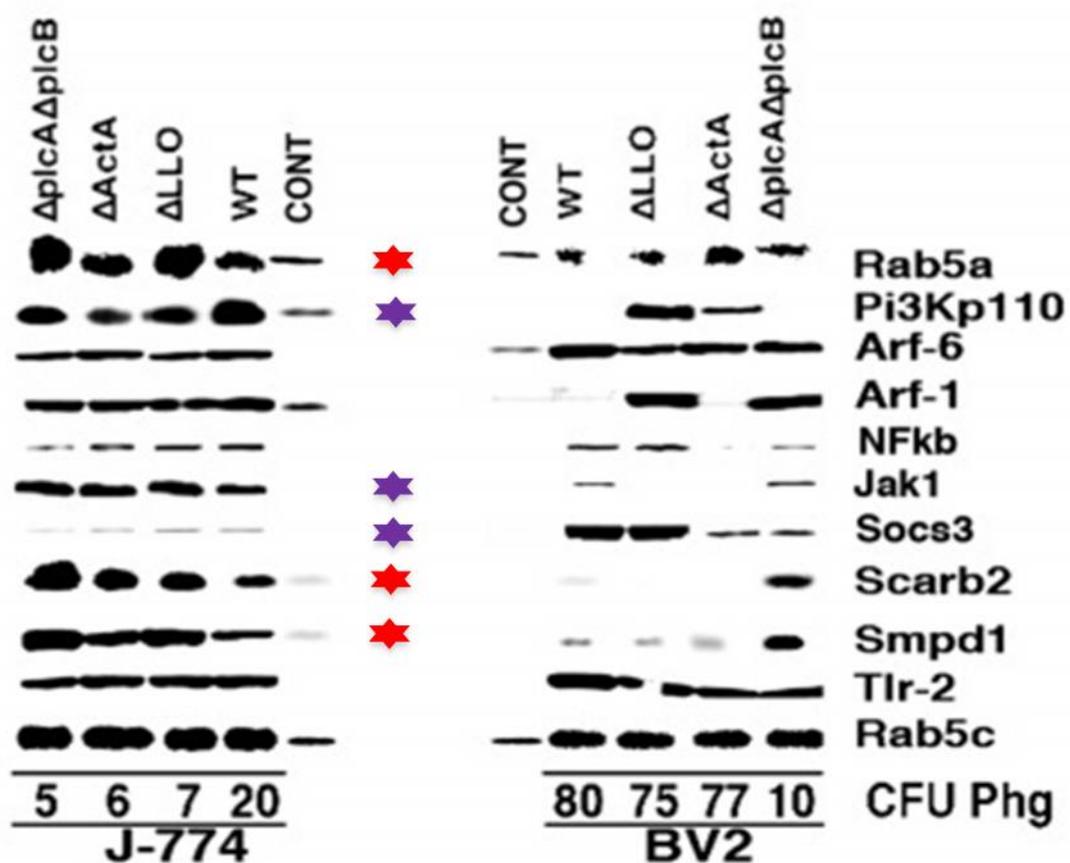
Se observaron claramente dos patrones transcripcionales en la microglía. El primero, un patrón de expresión génica, común al transcriptoma de los macrófagos y que implica la inducción en las vías de señalización: TLR, NF $\kappa$ B y TNF. (McCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2007; Leber y col., 2008; Carrasco-Marín y col., 2012; Scheffel y col., 2012). El gen *actA* de *Listeria monocytogenes* parecía ser responsable de la expresión de los genes de citocinas y quimiocinas: *cxcl2*, *ccl4* y *tnf*, el gen del factor transcripcional *nf* y el gen de la molécula asociada al TLR-2, *cd14* (panel superior **Fig.17**). El gen *hly* participa mínimamente en este patrón transcripcional reprimiendo el gen *pi3kcg* que inactivaría a la quinasa, Pi3K. El otro patrón que se detectó, era un patrón específico de la microglía y que estaba regulado por el gen *actA*, siendo un patrón de represión que incluía varias vías de señalización: los genes reguladores del tráfico fagosomal *rab14* (4) (Carrasco-Marín y col., 2012), genes lisomales implicados en autofagia y en degradación (*atg4b*, *smpd1*, *vps16*, *scarb2*, *rilp1*). El gen *hly* bacteriano podría estar implicado en la represión de la vía de señalización del IFN tipo I, como los genes *ccl5* o *jak1* y en la hiperinducción del regulador negativo del IFN, el gen *socs3*.

### **3.2. Verificación por proteómica. Expresión proteica en fagosomas purificados de macrófagos y microglía**

Tras los estudios transcripcionales, se procedió a la comprobación de los resultados obtenidos con arrays transcripcionales, a través de un estudio detallado de la expresión proteica de fagosomas purificados. Estos fagosomas fueron obtenidos mediante un protocolo ya descrito anteriormente (Carrasco y col., 2012). En este estudio, se infectan las células de microglía BV2 con las diversas cepas de *Listeria monocytogenes*, y se comparan con células macrófagos J774. Tras homogeneizar las células de forma hipotónica, se purifican los fagosomas mediante centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa. Para estandarizar todos los datos, se mide la concentración proteica, cargándose por carril la misma concentración de proteínas que

corresponden a igual número de bacterias viables (30 µg/carril o 500 CFU/mL) y que analizan mediante *Western Blot* (**Fig.18**).

La justificación de este estudio, posterior al estudio genómico transcripcional, se debe a que son las proteínas quienes realizan las funciones celulares, afianzando los resultados que se han obtenidos con el estudio genómico.



**Figura 18.** Imagen del análisis proteico y funcional de fagosomas, y endosomas como controles basales. En la figura se muestran los western-blot (30 µg/pocillo) de fagosomas aislados de J774 y BV2 que contenían  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$  o  $LM^{plcA\ plcB}$  y de los controles basales de endosomas procedentes de BV2 y J774 (CONT). Se muestran los resultados de varias proteínas relevantes como NFκB, JAK1 o SOCS3 así como marcadores lisosómicos como SCARB2 y SMPD1. Los números de CFU/mL (CFU Phg en la figura) reflejan la cantidad de bacterias vivas dentro de los fagosomas utilizados en el western-blot.

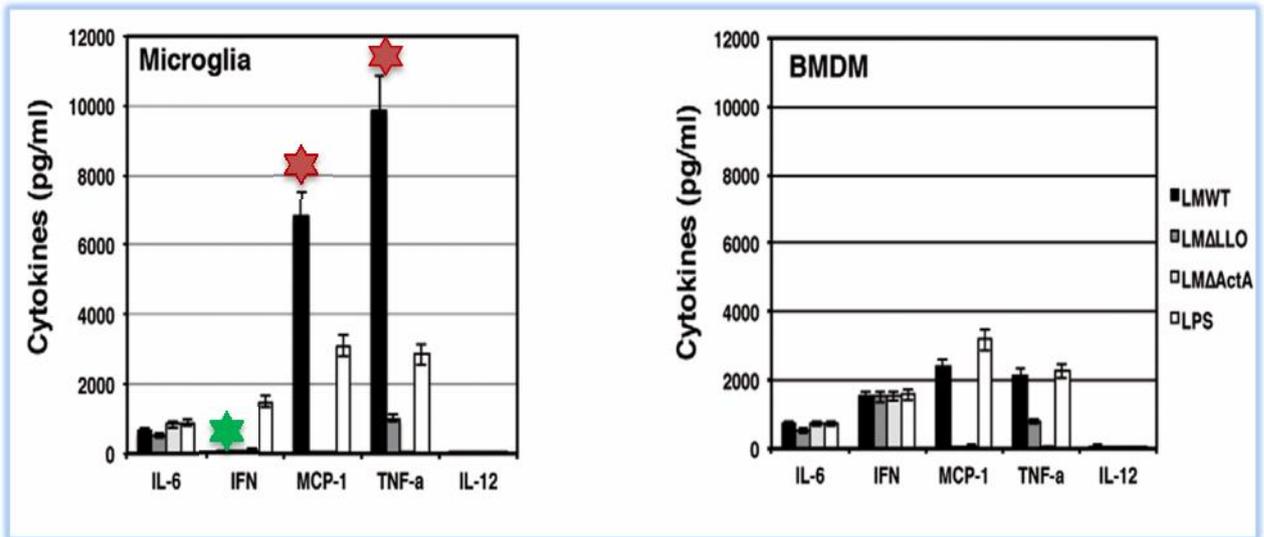
El estudio de la composición proteica de los fagosomas nos ha permitido confirmar la mayoría de los resultados de la transcripción. Se concluye que los fagosomas de la microglía, no son plataformas de la respuesta inmune innata para controlar la viabilidad de las bacterias y su número, como en los macrófagos. De hecho, los CFU/mL intrafagosomales obtenidos fueron más altos que en los fagosomas de los macrófagos. Lo que indica que los fagosomas de microglía no son microbicidas, sino plataformas inmunes que presentan una disociación en las vías de TNF- e IFN tipo I. Encontramos claras diferencias en la vía del IFN entre microglía y macrófagos, así en la microglía, los componentes de esta vía están disminuidos como son JAK1 y PI3K al estar en gran cantidad el represor de la vía SOCS3. Además, los componentes de la vía degradativa también están en bajas cantidades, como RAB5a, SCARB2 o SMPD1.

#### **4. Funciones fagocíticas afectadas relacionadas con el sistema nervioso central (SNC)**

##### **4.1. Producción de citocinas**

A continuación, se procedió a medir la producción de citocinas proinflamatorias características de la listeriosis murina tanto en macrófagos como en microglía (IL-6, IFN, MCP-1, TNF- , IL-12). Se midieron en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y en microglía primaria y purificada. El análisis de citocinas pro-inflamatorias se realizó en los sobrenadantes del cultivo celular de macrófagos y microglía infectados con diferentes mutantes de *Listeria monocytogenes* y cepa de fenotipo silvestre ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$ ), utilizando el kit CBA (Becton Dickinson) y con una proporción de infección de 10:1 (bacteria: célula). También se incluyeron muestras incubadas con LPS (10 ng/mL) como control positivo ya que estimula la producción de citocinas en niveles muy altos. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos a las 24 horas de infección, tras el tratamiento con 50 µg/mL de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Para su almacenamiento, estos sobrenadantes se filtraron previamente antes de ser congelados y almacenados a -80°C. El análisis de citocinas se realiza

mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se expresaron como una concentración de citocinas (pg/mL media  $\pm$  DE,  $P < 0,05$ ).



**Figura 19.** Gráficos que representan los niveles de citocinas obtenidos a partir de: (izq.) microglía primaria y purificada y (dcha.) macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Ambos tipos celulares se infectaron con diferentes mutantes de *Listeria monocytogenes* en una proporción (10:1) durante 1 h. También se incluyeron muestras incubadas con LPS (10 ng/mL). Los sobrenadantes del cultivo se recogieron tras 24 h de infección en un medio que contenía 5  $\mu$ g/mL de gentamicina. Se analizaron los niveles de citocinas pro-inflamatorias (MCP-1, TNF- , IFN, IL-6 e IL-12) y los resultados se expresan como la concentración de citocinas (pg/mL media  $\pm$  DE,  $p < 0,05$ ).

Dos señales de la respuesta inmune innata controlan la infección por *Listeria monocytogenes*, los genes regulados por TNF y los genes regulados por IFN (McCaffrey y col., 2004; Leab y col., 2008; Carrasco-Marín t col., 2012). En nuestro experimento, observamos diferencias en la producción de citocinas pro-inflamatorias entre la microglía purificada y los macrófagos de médula ósea (BMDM). En primer lugar, se observó que, después de la infección por *Listeria monocytogenes*, la microglía primaria purificada produjo niveles 10 veces superiores de TNF- y niveles de la quimocina MCP-1 que eran 3,5 veces más altos que los de BMDM (Fig.19).

La infección con *LM<sup>ActA</sup>* no indujo la producción de dichas citocinas/quimocinas en la microglía, en comparación con su producción en macrófagos. Por lo tanto, el gen *actA*

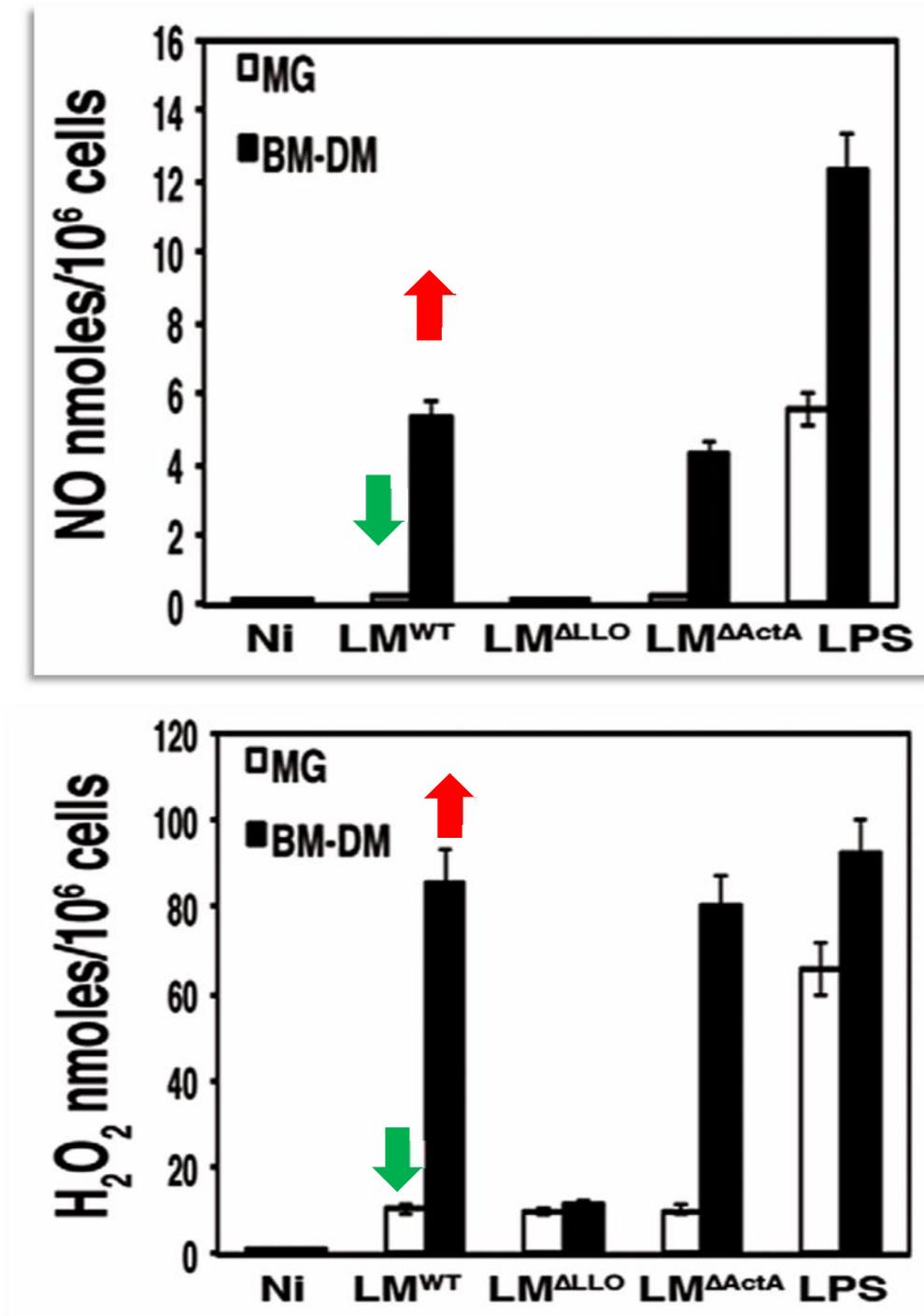
de *Listeria monocytogenes* podría estar implicado en la microglía, en la producción de TNF- .

Otras citocinas pro-inflamatorias, como las interleucinas IL-6 e IL-12, se produjeron en niveles similares en la microglía y en los macrófagos infectados con las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*,  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  o  $LM^{ActA}$ . La producción de IFN fue indetectable en la microglía infectada con cualquiera de las cepas de *Listeria monocytogenes*  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  o  $LM^{ActA}$ ; mientras que su producción en macrófagos BMDM fue significativa y similar a la que induce el lipopolisacárido (LPS) en microglía y BMDM, el cual es utilizado como control positivo de producción de citocinas (barras blancas en la **Fig.19**) (Hanisck, 2002; Ribes y col., 2013). La producción de citocinas con microglía purificada del hipocampo y de los BMDM fue similar a la obtenida usando células BV2 y J774 (Frande-Cabanes y col., 2014). En conclusión, podemos decir, que *Listeria monocytogenes* en la microglía induce una respuesta mediada por TNF- y bloquea la respuesta mediada por IFN tipo I.

#### **4.2. Mecanismos microbicidas oxidativos. Producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno**

Dentro de las funciones fagocíticas nos encontramos los mecanismos listericidas oxidativos: la producción de óxido nítrico, NO, y la producción de peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En macrófagos, los genes regulados por el IFN controlan la producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la señalización por TNF- $\alpha$  controla solamente la producción de NO (Jun y col., 1993; MacMicking y col., 1997; Cohen y col., 2000; Prada-Delgado y col., 2001; Carrasco-Marín y col., 2012). NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son los principales mecanismos microbicidas que actúan en los macrófagos (MacMicking y col., 1997; Álvarez-Domínguez y col., 2000) y en la microglía (Block y col., 2007; Ribes y col., 2010) para destruir a los patógenos, por lo tanto, se comparó la producción de estos compuestos tóxicos en ambos tipos de células.



**Figura 20.** Gráficas que representan: (gráfica superior), la producción de óxido nítrico NO de BMDM (barras negras) y de la microglía primaria purificada (barras blancas) e infectadas con *LM<sup>WT</sup>*, *LM<sup>ActA</sup>* y *LM<sup>LLO</sup>*, que se detecta en los sobrenadantes celulares. Los resultados se expresan como nano moles de NO producidos por 10<sup>6</sup> células (media ± DE, p<0,05) obtenidas con muestras por triplicado. La gráfica inferior, muestra la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los BMDM (barras negras) y en la microglía primaria purificada (barras blancas) infectadas con *LM<sup>WT</sup>*, *LM<sup>ActA</sup>* y *LM<sup>LLO</sup>* y detectados en los sobrenadantes celulares. Los resultados se expresan como nano moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidos por 10<sup>6</sup> células (media ± DE, P <0,05).

La microglía purificada primaria infectada con la cepa silvestre  $LM^{WT}$ , produjo niveles de NO más bajos que los BMDM ( $P < 0,05$ ), mientras que la infección de la microglía con  $LM^{LLO}$  o  $LM^{ActA}$ , causó niveles aún más bajos ( $P < 0,05$ ) (Figura 3C). Por el contrario, los BMDM infectados con las cepas de crecimiento citosólico en macrófagos,  $LM^{WT}$  o  $LM^{ActA}$  obtuvieron una alta producción de NO; y la cepa  $LM^{LLO}$  produjo niveles bajos de NO como se esperaba, ya que no presenta crecimiento citosólico en dichas células (MacMicking y col., 1991; Juny col., 1993; Cohen y col., 2000; Boldrick y col., 2002; Myers y col., 2003; Corr y O'Neil, 2010).

Por otra parte, la producción de  $H_2O_2$  fue muy baja en la microglía infectada con cualquiera de las cepas de *Listeria monocytogenes*, mientras que los macrófagos mostraron niveles altos (Fig.20). La adición de un ligando de TLR4 como el lipopolisacárido (LPS), indujo niveles altos de NO y  $H_2O_2$  en la microglía y en los BMDM (barras de LPS en las dos gráficas de la Fig.20) (Ribes y col., 2013). Las líneas celulares BV2 y J774, mostraron resultados similares a los de la microglía purificada y los BMDM (Frände-Cabanes y col., 2014).

Se puede concluir, que las vías de señalización del TNF- $\alpha$  y del IFN que regulan la producción de NO y  $H_2O_2$  están dissociadas en la microglía infectada con *Listeria monocytogenes*, aunque no en la microglía en reposo o activada por otra señal positiva como el LPS (Hanisch, 2002). Sin embargo, también es posible que los fagosomas de la microglía, no estén preparados para producir suficiente  $H_2O_2$ .

En resumen, los macrófagos BMDM tras la infección de *Listeria monocytogenes* aumentan su producción de óxido nítrico NO y peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , mientras que la microglía, tras la infección de *Listeria monocytogenes* disminuye su producción. Estos resultados se explican porque en la microglía, *Listeria monocytogenes* no dispara los mecanismos microbicidas oxidativos clásicos como son el óxido nítrico y el peróxido de hidrógeno que son regulados por la señalización inducida por el IFN tipo I. Y sabemos también que, el óxido nítrico es muy neurotóxico. ¿Intenta ser esto un mecanismo protector para proteger a las neuronas? Es muy probable, ya que la microglía primaria purificada produce niveles muy bajos de compuestos neurotóxicos y microbicidas.

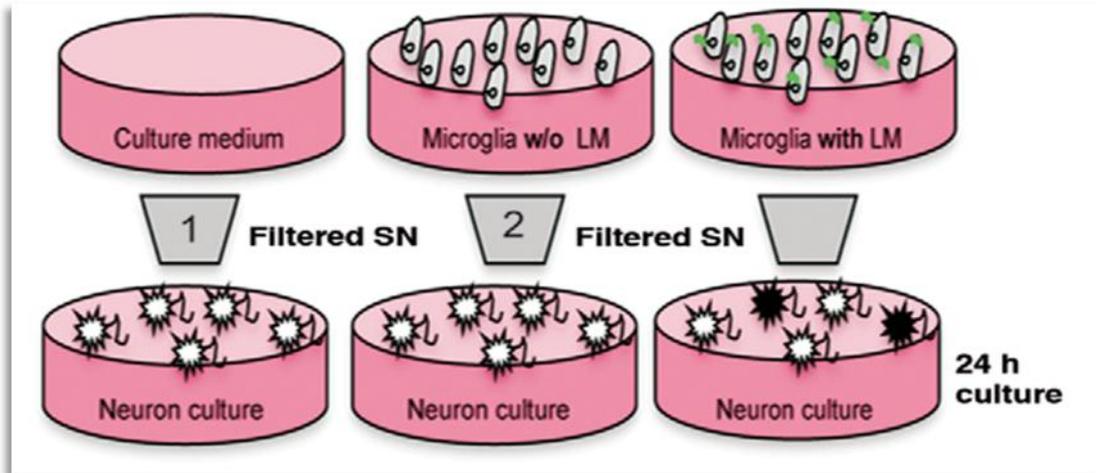
#### **4.3. Apoptosis neuronal. Análisis de la apoptosis neuronal por factores solubles liberados por microglía**

La listeriosis humana se caracteriza por ser una patología centrada en la colonización del sistema nervioso central (SNC) por parte del patógeno y donde se cree que la citocina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  juega un papel esencial.

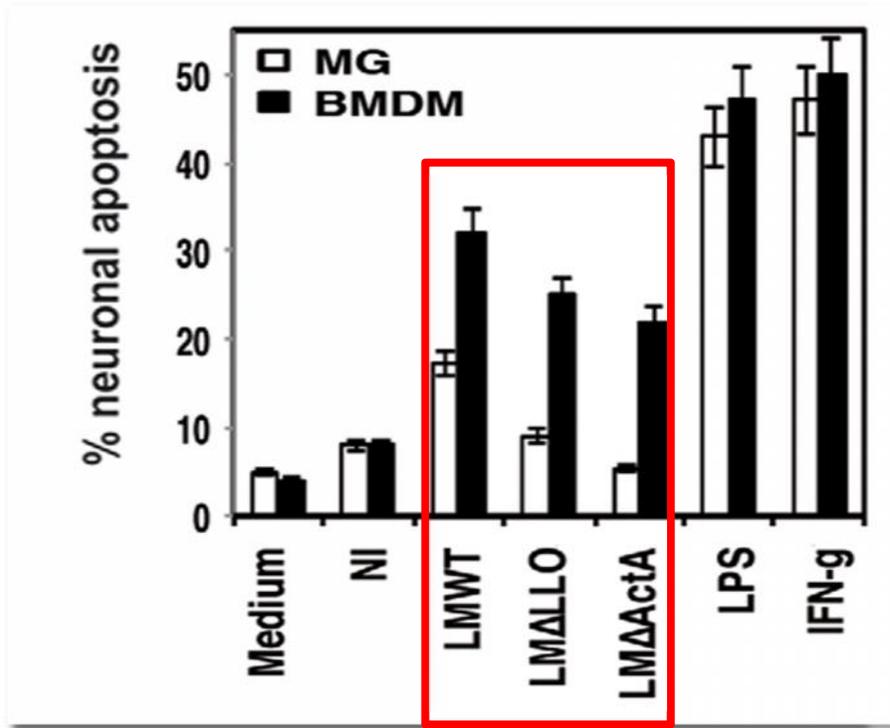
Por ello, y para explorar si la microglía infectada inducía apoptosis neuronal o preservaba la viabilidad de las neuronas de alrededor, ideamos un modelo de listeriosis humana *in vitro*, realizando cultivos primarios de neuronas de hipocampo procedentes de cerebro de embriones murinos, de acuerdo con los protocolos descritos en (López-Fanarraga y col., 2007). Estos cultivos mixtos de neuronas y glía se infectaron con el patógeno donde se observó que solamente las células de la microglía, los macrófagos residentes del sistema nervioso central, se infectaban con la bacteria. Mientras que las neuronas, no presentaban bacterias en su interior (descrito en el primer apartado de resultados) (**Fig.11 y Fig12.**). Sin embargo, estas neuronas sufrían cierta apoptosis, por lo que esto sugería que alguna sustancia secretada por la microglía al medio de cultivo, inducía muerte neuronal programada; siendo las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y/o TNF- $\alpha$ , los dos candidatos más posibles que además son producidas por la microglía tras la infección del patógeno.

Por lo tanto, probamos la hipótesis de que la estrategia microglial después de la infección por *Listeria monocytogenes* se centra en reducir los daños neuronales. Para ello, se examinó directamente la apoptosis neuronal mediada por los productos liberados por la microglía infectada con *Listeria monocytogenes* (**Fig.21 y Fig.23**). Se infectó la microglía primaria purificada con las diferentes cepas mutantes de *Listeria monocytogenes* o con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  y se recogieron y filtraron los sobrenadantes celulares para eliminar bacterias (López-Fanarraga y col., 2007). Las neuronas aisladas del hipocampo se co-incubaron con una dilución 1/10 de los sobrenadantes durante 16 horas. Para estimar la apoptosis, se cuantificó la fragmentación nuclear mediante el uso de microscopía confocal (**Fig.22**) o alternativamente, se cuantificó la apoptosis de las neuronas HN9 murinas utilizando un compuesto de unión al ADN denominado DAPI que analizamos mediante citometría de flujo (Frände-Cabanes y col., 2014). Se incluyeron además, dos controles negativos,

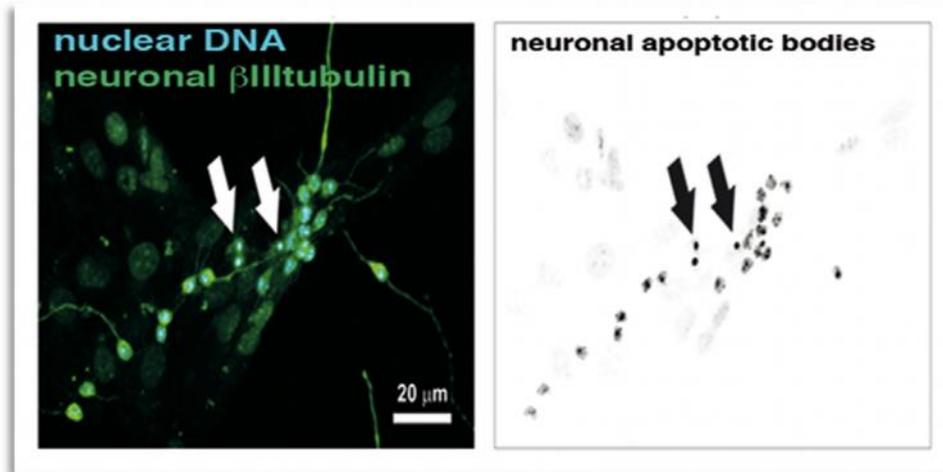
consistentes en medio de cultivo solo o medios celulares de la microglía control sin infectar o de los BMDM sin infectar (barras NI en la **Fig.23**).



**Figura 21.** Diagrama del experimento de microglía primaria purificada y neuronas aisladas. La microglía primaria y purificada, se infectó con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* durante 1 hora, seguido de una incubación durante la noche con medio de cultivo completo con gentamicina, que mata a las bacterias extracelulares. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y filtraron utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Las neuronas aisladas se cultivaron junto con una dilución 1/10 de estos sobrenadantes durante 16 horas.



**Figura 22.** La gráfica muestra el porcentaje de apoptosis neuronal medido después del experimento de la figura anterior (Fig.18) en cada una de las condiciones. Los resultados se expresan como porcentajes (media  $\pm$  DE) (media  $\pm$  DE,  $P < 0,05$ ) obtenidos con muestras en triplicado.



**Figura 23.** En esta figura, los cuerpos apoptóticos de las neuronas se pueden apreciar después de la tinción y de su recuento utilizando un microscopio óptico. El ADN aparece marcado en color azul y las neuronas se detectan mediante la  $\beta$ -3-tubulina, en color verde.

Se observó que la apoptosis de las neuronas primarias tras incubarlas con el sobrenadante filtrado de la microglía infectada con la cepa silvestre,  $LM^{WT}$ , era tres veces mayor que el control sin infectar (barras blancas en la **Fig.22**). Además, si se incubaban estos sobrenadantes con un anticuerpo anti-TNF o si se incubaban con el sobrenadante de la microglía infectada con la cepa  $LM^{ActA}$ , no se detectaba apoptosis, lo que sugería que tanto la citocina TNF- $\alpha$  como el gen *actA* eran responsables de la inducción de esta apoptosis en la microglía (barras anti-TNF /  $LM^{ActA}$  en la **Fig.22**). Sin embargo, la apoptosis neuronal alcanzaba niveles tan altos como el 45-47% de las neuronas totales, si se incubaban con sobrenadantes de la microglía activada con IFN- $\gamma$  o con LPS, ambos controles positivos de inducción de apoptosis (IFN- $\gamma$  y barras LPS en la **Fig.22**). Por otro lado, los sobrenadantes de los macrófagos BMDM infectados con cepas silvestres de *Listeria monocytogenes* (barras negras en la **Fig.22**) inducían un porcentaje de apoptosis del 26-38%, el cuál era mayor que el que inducía la microglía, con las mismas cepas silvestres y que era sólo un 17% máximo. Estos resultados eran similares a los obtenidos con las líneas celulares, BV2 y J774, descrito en el suplemento de la publicación (Frande-Cabanes y col., 2014).

En conclusión, los macrófagos infectados con *Listeria monocytogenes* inducen una alta proporción de apoptosis neuronal (40%), mientras que la microglía infectada con este patógeno sólo induce un 20% de apoptosis, lo que sugiere que existe un mecanismo protector para evitar una muerte neuronal exagerada. El mecanismo que utiliza la microglía, para no activar la muerte neuronal, implica controlar su propia activación, mediante el bloqueo de la señalización mediada por el IFN tipo I que controla los mecanismos bactericidas oxidativos, es decir, la liberación de radicales de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, los cuales no se producen y evitan así, la apoptosis neuronal.

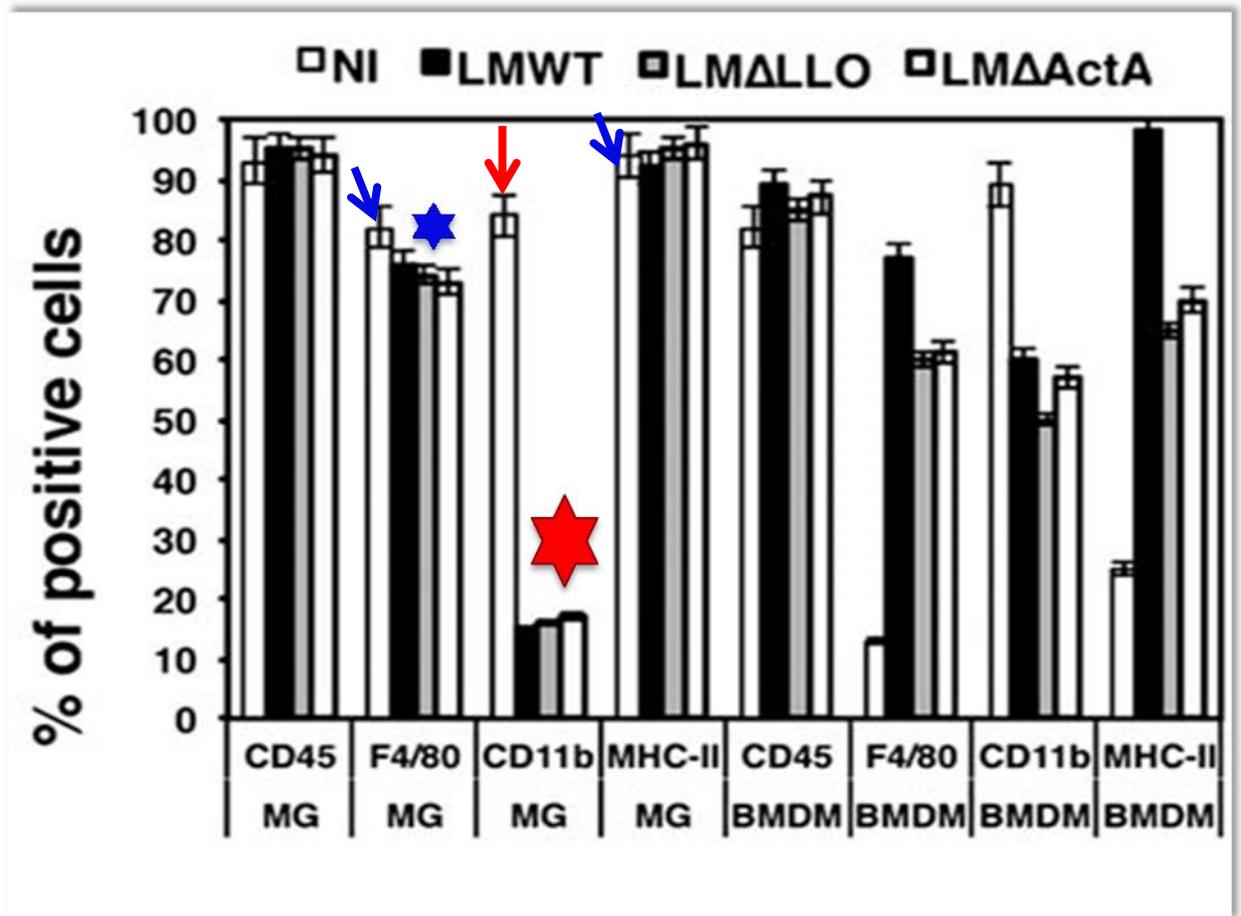
En resumen, estos resultados indicaron que los altos niveles de TNF inducidos en la microglía después de la infección por *Listeria monocytogenes*, son regulados por el gen *actA* del patógeno, que induce una apoptosis neuronal limitada en comparación con la apoptosis inducida por otros estímulos clásicos, tales como LPS o IFN- $\gamma$ . En definitiva, la microglía controla su activación, para evitar la apoptosis neuronal que se suele inducir en los fagocitos, cuando se produce una infección por *Listeria monocytogenes*.

#### 4.4. La diseminación de la infección a otras células fagocíticas

##### 4.4.1 Análisis de marcadores de superficie celular

A continuación, se analizaron los marcadores de superficie celular, para verificar si la infección las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*, producía una modificación de la expresión de marcadores de la superficie celular de la microglía, en comparación con los macrófagos.

Todas las preparaciones de la microglía se marcaron con una serie de anticuerpos que detectaban las siguientes moléculas mediante citometría de flujo, FACS: CD11b, F4/80, IA<sup>b</sup> (MHC-II en ratones C57BL/6) o CD45. Antes de la infección por *Listeria monocytogenes* (barras NI en la **Fig.24**), el 90% de las células de microglía eran CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> positivas, reflejando su origen mielomonocítico y su pureza (Scheffel y col., 2012; Greter y Merad, 2013). Curiosamente, la microglía disminuyó significativamente su expresión en el marcador CD11b después de la infección por *Listeria monocytogenes* y no modificó la expresión ni del marcador de activación de macrófagos, F4/80, ni del marcador de moléculas MHC de clase II de microglía, IA<sup>b</sup> (MG barras en la **Fig.24**). Las preparaciones de macrófagos BMDM eran CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> positivas y se transformaron también en F4/80<sup>+</sup>IA<sup>b+</sup> positivas, sólo después de la infección por *Listeria monocytogenes* (barras de BMDM en la **Fig.24**).



**Figura 24.** Gráfico representativo de los resultados obtenidos con la microglía primaria purificada y los macrófagos BMDM infectados con diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en proporciones (10:1, bacterias: células) y con otras muestras control de microglía y BMDM que no se infectan (NI). Las células se incuban en superficie con los siguientes anticuerpos marcados con FITC o PE: CD45-FITC, CD14-FITC, F4 / 80-PE, y anti-IA<sup>b</sup>-APC (para la microglía) o anti-IA<sup>d</sup>-APC (para los BMDM). Las muestras se analizan utilizando citometría de flujo (FACSCanto) y los resultados se muestran en porcentajes de células positivas para cada anticuerpo. Los resultados se expresan como la media ± DE de los triplicados ( $P < 0,05$ ).

La expresión de las integrinas como el CD11b, refleja la migración de las células inflamatorias a los sitios de infección para interactuar con otras células inflamatorias, al igual que las moléculas de histocompatibilidad de clase II, IA en ratón.

Vamos a introducir primero el concepto de los tipos de macrófagos: M0 (macrófagos no inflamatorios en su producción de citocinas, con una expresión de CD11b<sup>bajo</sup>, F4/80<sup>medio</sup>, y que no inducen apoptosis); M1 (macrófagos pro-inflamatorios

en su producción de citocinas, con una expresión CD11b<sup>medio</sup>, F4/80<sup>bajo</sup>, y con baja capacidad de inducir apoptosis), M2 (macrófagos anti-inflamatorios en su producción de citocinas, con una expresión CD11b<sup>alto</sup>, F4/80<sup>alto</sup>, y con alta capacidad de inducir apoptosis) y Mres (macrófagos resolutivos, con una expresión CD11b<sup>bajo</sup>, F4/80<sup>medio</sup>, y que no inducen apoptosis) (London y col., 2013).

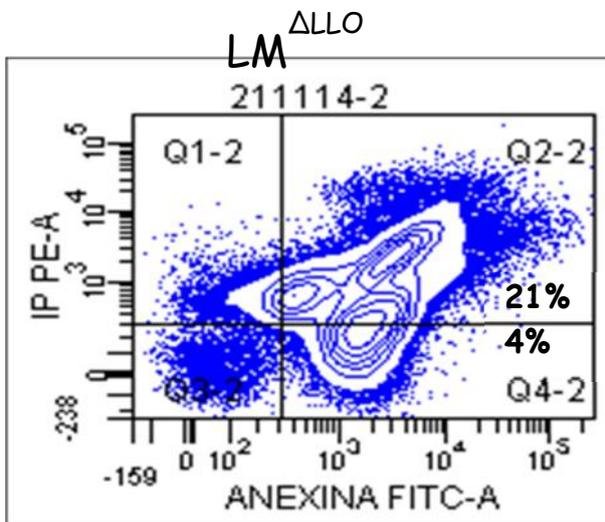
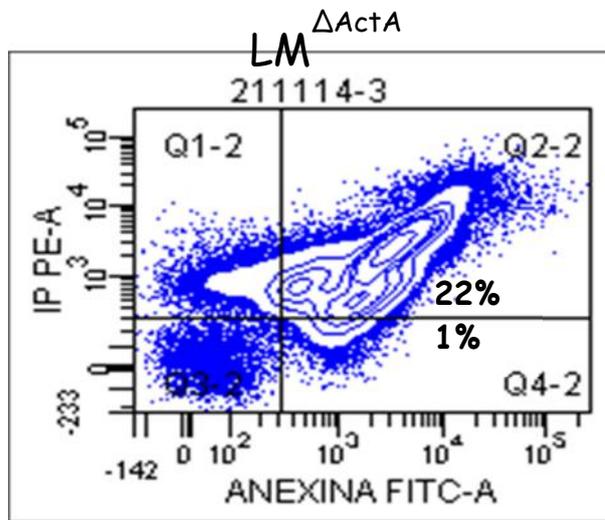
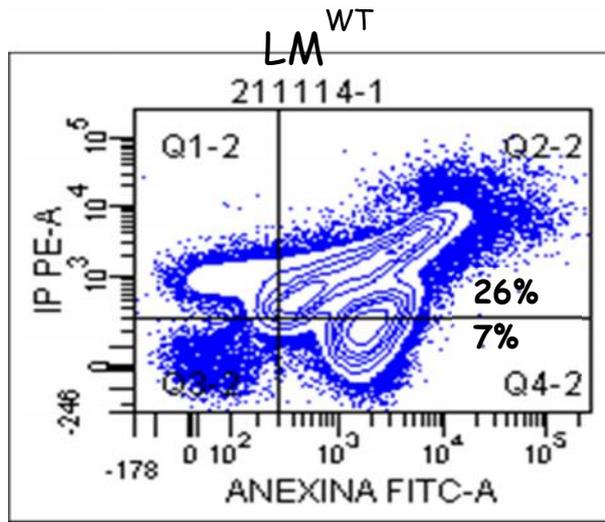
Nuestro análisis de la microglía indicó que presentaban altos niveles de expresión de F4/80 y MHC-II y disminuyendo los niveles de expresión de CD11b después de la infección con *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, los macrófagos aumentaron sus niveles de expresión de F4/80 y MHC-II, mientras que la expresión de CD11b permaneció inalterada. En resumen, los resultados indicaban:

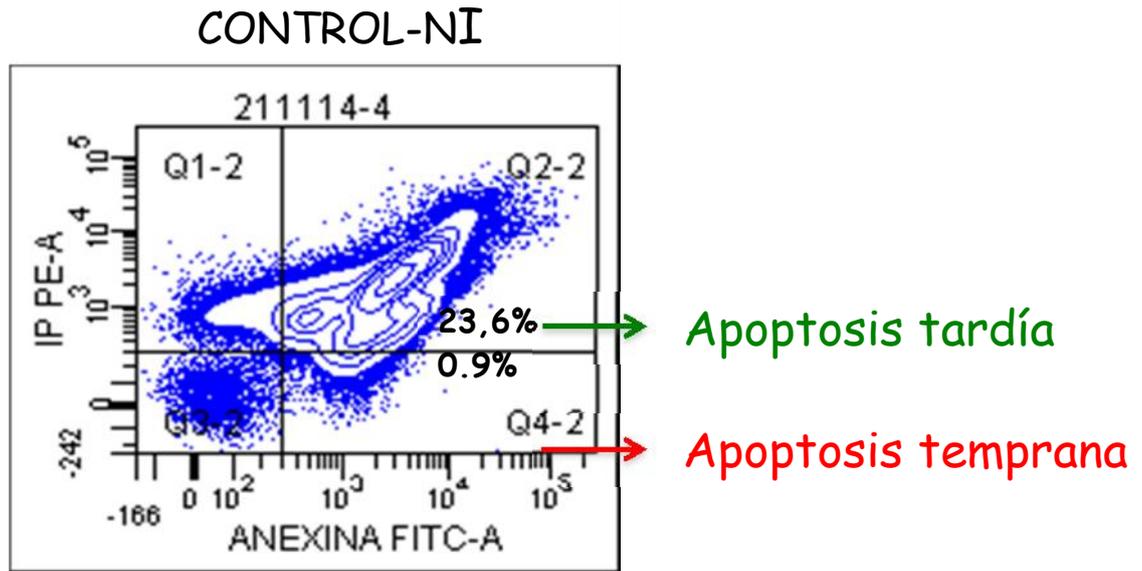
- Microglía con una expresión MHC-II<sup>alto</sup>, F4/80<sup>alto</sup>, **CD11b<sup>alto</sup>** → se asemejaba a una macrófago tipo M2, anti-inflamatorio y con alta capacidad de apoptosis.
- Microglía infectada por *Listeria monocytogenes* con una expresión de F4/80<sup>alto</sup>, **CD11b<sup>bajo</sup>** → se asemejaba a macrófagos de tipo M0-M1, pro-inflamatorios, y con baja capacidad de apoptosis o nula.

En conclusión, la microglía tras la infección con *Listeria monocytogenes* se transformaba en un macrófago del tipo M0-M1 con una expresión de **CD11b<sup>bajo</sup>** y con baja la capacidad de apoptosis. En los macrófagos, la expresión de MHC-II, F4/80 y CD11b está modulada por la señalización de IFN que tras la infección con *Listeria monocytogenes* se induce significativamente (Leber y col., Carrasco-Marín y col., 2012). Por lo tanto, la disociación de las respuestas mediadas por TNF- $\alpha$  e IFN, que hemos observado en la microglía, y que afectan a la producción de citocinas, de NO y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está también correlacionada con la disminución de la expresión de la integrina CD11b y con la falta de modificación en los niveles de los marcadores F4/80 y MHC-II después de la infección con *Listeria monocytogenes*. Estos bajos niveles de la integrina CD11b, reflejarían una menor capacidad de migración de la microglía infectada con el patógeno y una menor interacción y reclutamiento de otras células inflamatorias. Esto conduciría, a una menor diseminación de la infección y a una baja inducción de la inflamación.

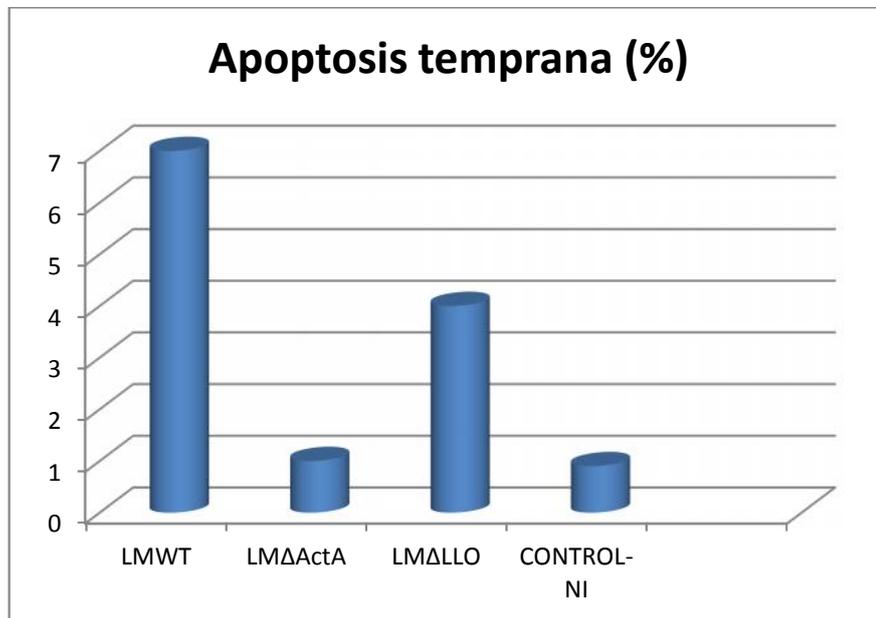
#### 4.4.2 Apoptosis microglial

Por último, dentro de la diseminación de la infección, exploramos nuestra hipótesis, de que la apoptosis de la microglía estaba justificada para evitar una apoptosis pro-inflamatoria que haría de efecto llamada a los monocitos sanguíneos y que conduciría a la diseminación de la infección del patógeno a células, que provocarían una inflamación exagerada en el cerebro. Para ello, se analizó la apoptosis por citometría en un FACsCanto mediante un método descrito en los Materiales y Métodos (*Apartado 6.7.3.*). Se examinaron muestras de microglía BV2 sin infectar o infectadas con la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* o con distintas mutantes ( $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  y  $LM^{ActA}$ ) y se marcaron, por un lado, con yoduro de propidio (IP) que se une al ADN en las células muertas o necróticas y que se detecta en el canal fluorescente de la ficoeritrina (PE), y por otro lado, con anexina marcada con FITC, marcador específico de apoptosis. Mediante estos dos marcadores, se cuantifican la cantidad de células de microglía, en cada etapa del ciclo de muerte celular y el porcentaje de células en cada tipo de muerte, necrosis, apoptosis temprana o tardía (**Fig.25**).





**Figura 25.** Resultado del análisis por citometría de flujo mediante FACsCanto de la apoptosis de la microglía inducida por *Listeria monocytogenes*. La apoptosis se cuantifica mediante la medición de la cantidad de células en cada estadio del ciclo de muerte celular marcado con el yoduro de propidio (IP) y la anexina. Se utilizaron células de microglía BV2 sin infectar como control negativo (CONTROL-NI), y muestras de células de microglía BV2, infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  y las mutantes  $LM^{ActA}$  y  $LM^{LLO}$ .



**Figura 26.** Gráfico representativo de los porcentajes de apoptosis temprana obtenidos en la infección de células de microglía BV2 con  $LM^{WT}$ ,  $LM^{ActA}$ ,  $LM^{LLO}$  y como control negativo se utilizan las células sin infectar (NI). Realizando las medidas de los números de células, por citometría con FACsCanto, en cada etapa del ciclo de muerte celular mediante un protocolo de marcaje con yoduro de propidio y anexina. Se observa una apoptosis exacerbada en la infección de la microglía BV2 con la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes*.

Los resultados obtenidos con la microglía infectada con las distintas cepas de *Listeria monocytogenes*, sugiere que se induce una apoptosis temprana, regulada por el gen *actA* (**Fig.26**) y que el porcentaje de células apoptóticas, es inferior al de los macrófagos.

Podemos concluir, que la apoptosis o suicidio de la microglía, se plantea como un mecanismo, para evitar la diseminación de la infección y que, así, no se recluten monocitos que esparcirían la infección y provocarían una respuesta pro-inflamatoria exagerada, que afectaría a la integridad neuronal. Así, la microglía conseguiría proteger a las neuronas de la infección y de la muerte celular, suicidándose y evitando una gran inflamación en el sitio de infección.

## **5. Modelo animal: ensayos de infección y vacunación *in vivo* en ratonas gestantes**

El uso de vacunas vivas basadas en *Listeria monocytogenes*, aunque sean atenuadas, presenta serias dificultades cuando se administra a individuos inmunocomprometidos. Sin embargo, los vectores vacuna celulares, como las células dendríticas, tienen la ventaja de inducir inmunidad innata multivalente, así como respuestas inmunes mediadas por células, y constituyen estrategias de vacunas nuevas y seguras, en la protección frente a listeriosis (*Calderón-González y col., 2014*). Sin embargo, estos vectores vacuna celulares, no serían factibles para gestantes, ya que no atravesarían la placenta, por ello, se ha de pensar en vectores diferentes, para la protección del feto a listeriosis.

Después de los estudios *in vitro*, para la caracterización de la respuesta de la microglía ante la infección de *Listeria monocytogenes*, nos planteamos un acercamiento a un modelo *in vivo*, dónde recrear una patología provocada por la listeriosis y evaluar, el uso de vacunas, que no solo evitaran la infección con este patógeno, sino que también, evitaran las co-morbilidades asociadas a la infección. Como un experimento *in vivo* de listeriosis cerebral directo, por vía hematoencefálica sería complicado, en

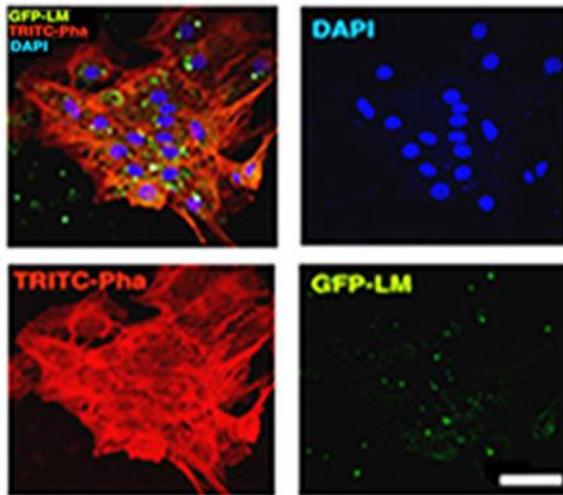
cuestión de metodología, nos planteamos probar con otra vía de infección característica e importante, como es la vía placentaria. Diseñamos un modelo murino en hembras, en período de gestación tardío (E16), a las que se les inyectó *Listeria monocytogenes*, en una cantidad de  $10^6$  bacterias, por vía intravenosa y después de comprobar, mediante diversos experimentos, la llegada del patógeno al sistema nervioso central del feto, por vía placentaria a través de la madre, planteamos ensayos con vacunas (*Calderón-González y col., 2014; Calderón-González y col., 2016*).

Para reflejar la importancia de este apartado del trabajo, del modelo de experimentación elegido y de todos los resultados precedentes, cabe comentar, que la listeriosis es una infección mortal para el feto y el recién nacido. Las dos principales morbilidades clínicas en el período neonatal son los abortos, es decir, la muerte fetal, la meningitis y las lesiones cutáneas difusas.

En este estudio, se utilizaron hembras gestantes en E9 (estadio embrionario en el día 9 de la gestación), a las que se vacunaron durante 7 días con unas vacunas peptídicas, en vectores de nanopartículas descritas en (*Calderón-González y col., 2014; Calderón-González y col., 2016*). Las gestantes se dividieron en vacunadas y no vacunadas. Las gestantes vacunadas, tuvieron neonatos libres de bacterias y sanos, mientras que, por otra parte, las gestantes no vacunadas, tuvieron neonatos, en mucho menor número que las vacunadas, observándose úteros con fetos no viables o reabsorbidos y los neonatos que sobrevivieron al parto, presentaban afecciones cerebrales claras, como la falta de irrigación del cerebro, baja compactación del mismo y un retraso en su desarrollo. Así comprobamos que el modelo era válido, para poder seguir evaluando la eficiencia de las vacunas y cualquier estudio de patogenia y prevención frente a listeriosis (**Fig. 27 y 28**).

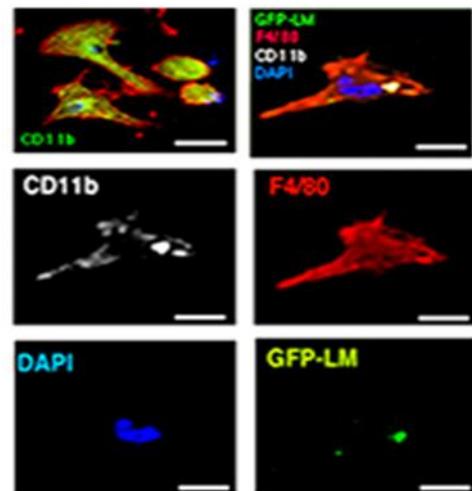
Panel A

isolated MG from P4-LM<sup>WT</sup>



Panel B

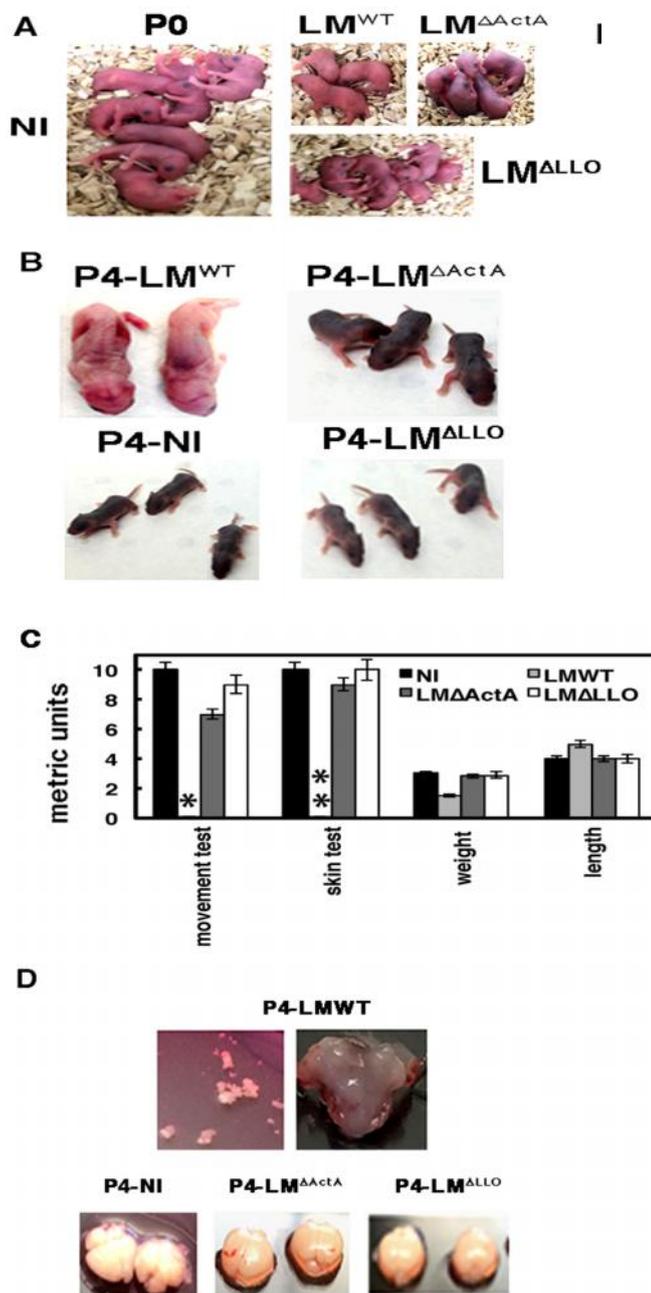
P4-NI P4-LM<sup>WT</sup>



**Figura 27. Panel A**, se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal, correspondientes a neonatos de 4 días (P4), obtenidos de cultivos mixtos de microglía de cerebelo de los ratones nacidos de las hembras gestantes e infectadas con la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* (P4-LM<sup>WT</sup>). Se utilizó GFP-LM<sup>WT</sup> que se muestra en el canal verde, los filamentos de actina se marcaron con TRITC-faloidina (TRITC-Pha) y los núcleos con el marcador de ADN, DAPI en el canal azul. En estos resultados, se muestra que este patógeno, presenta tropismo por la microglía en neonatos, cuando se inocula en ratonas gestantes. **Panel B**, se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal, correspondientes a neonatos P4 de gestantes infectadas con la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* (P4-LM<sup>WT</sup>) o no infectadas (P4-NI), donde se analizan distintos marcadores de activación de macrófagos, como el CD11b (conjugado con APC en las muestras P4-LM<sup>WT</sup> que se ven en fluorescencia en blanco o conjugado con FITC en las muestras P4-NI que se ve en fluorescencia verde), el F4/80 (conjugado con PE que se ve como fluorescencia roja) o DAPI que marca los núcleos (se ve como fluorescencia azul). La microglía obtenida de neonatos no infectados, presenta alta expresión de CD11b en la superficie celular e intracelular; sin embargo, la microglía obtenida de neonatos infectados con la cepa silvestre LM<sup>WT</sup>, no tiene expresión de CD11b en la superficie celular y toda su localización es intracelular (muestras P4-LM<sup>WT</sup>), que además co-localiza intracelularmente con la bacteria (GFP-LM) y con el marcador de activación F4/80, la co-localización de los tres marcadores, GFP-LM, CD11b-APC y F4/80-PE se detecta como fluorescencia amarilla clara.

Los resultados con la microglía purificada de neonatos E20 (estadio embrionario a día 20 de gestación), obtenidos de ratonas gestantes e infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  en E16, indicaron que el patógeno presentaba tropismo por este tipo celular en este modelo de listeriosis (**Fig.27, panel A**), ya que había una gran cantidad de bacterias (GFP- $LM^{WT}$ ) localizadas en la microglía del cerebelo de dichos neonatos. Además, dichas bacterias GFP-LM, co-localizaban intracelularmente con marcadores de la microglía como CD11b o F4/80 (**Fig.27, panel B**). Esta localización intracelular de los marcadores CD11b y F4/80 es característico de una microglía apoptótica, como ha sido descrito tras la infección de macrófagos con la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* (Cervantes et al., 2008), mientras que observamos que los marcadores CD11b y F4/80, se localizan predominantemente en la superficie celular de la microglía de neonatos E20, nacidos de ratonas gestantes y no infectadas (imágenes **P4-NI** en la **Fig.27, panel B**). Así, se comprueba que con el experimento se ha conseguido el objetivo de proponer un modelo *in vivo* que sea válido, para ensayos de infección en el SNC, que reproduce los hallazgos, con los experimentos de infección *in vitro* de la microglía purificada o de la línea celular (**Fig.11 y Fig.24**). Además, este modelo es útil para posibles estudios de la patogenia y la prevención frente a la infección con *Listeria monocytogenes*, en el SNC, mediante transmisión por vía placentaria.

Una vez puesto a punto el modelo de listeriosis cerebral por transmisión placentaria *in vivo*, se comprobó si la infección de gestantes E16, con las diferentes mutantes de *Listeria monocytogenes*, eran capaces de localizarse en la microglía, tras el nacimiento en E20, de forma que, pudiéramos asignar a cada gen del patógeno, una función en este modelo *in vivo*.



**Figura 28.** Modelo de listeriosis cerebral *in vivo* en gestantes infectadas con distintas cepas de *Listeria monocytogenes*. **Panel A**, se muestran el número de neonatos nacidos en E20 de gestantes infectadas con las distintas cepas  $LM^{WT}$ ,  $LM^{ActA}$ ,  $LM^{LLO}$  o no infectadas (NI). **Panel B**, se muestran 3 neonatos a día 4 post-natal (P4) seleccionados de cada grupo de gestantes. De las gestantes infectadas con la cepa  $LM^{WT}$ , sólo sobreviven 2 neonatos P4. Se observa que los nenonatos P4 de las gestantes infectadas con  $LM^{WT}$  no tienen melanocitos y presentan cerebritis, con cabezas de gran tamaño. **Panel C**, parámetros clínicos medidos en los neonatos de gestantes infectadas con las mismas cepas de los paneles A y B. **Panel D**, cerebros obtenidos de neonatos P4, nacidos de gestantes infectadas con las distintas cepas del patógeno,  $LM^{WT}$ ,  $LM^{ActA}$  o  $LM^{LLO}$ . Se observan cerebros desestructurados y poco consistentes y cráneos blandos, en los neonatos de gestantes infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  (imágenes P4-LMWT).

Como se observa en (**Fig.28, panel A**), sólo nacieron 3 neonatos de las ratonas gestantes e infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$ , 4 neonatos de las gestantes infectadas con la cepa  $LM^{ActA}$ , 8 neonatos de las gestantes infectadas con la cepa  $LM^{LLO}$  y 9 neonatos de las gestantes no infectadas (NI), lo que indica una mortalidad del 66% en las gestantes infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$ , en rangos similares a la mortalidad en la listeriosis humana neonatal como hemos descrito en nuestro grupo (*Calderón-Gonzalez et al., 2016*). A los 4 días post-nacimiento (P4) (**Fig.28, panel B**), solo sobreviven 2 neonatos, de las gestantes infectadas con la cepa silvestre (P4- $LM^{WT}$ ), mientras que todos los otros neonatos, no presentan mortalidad alguna y se escogen 3 neonatos de cada grupo de gestantes, para analizar posteriormente varios parámetros clínicos. Puesto que, obtenemos la mitad de neonatos que los controles en las gestantes infectadas con la cepa  $LM^{ActA}$ , esto indica que el gen *actA* tiene cierta participación en el desperdicio fetal, como ha sido descrito anteriormente (*Disson y Lecuit, 2013; Chaturvedi y col., 2015*), lo que justifica un menor número de neonatos. Además, se percibió una falta de pigmentación en los neonatos nacidos de gestantes infectados con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  (imágenes P4- $LM^{WT}$  en la **Fig.28, panel B**). Cuando se analizan los parámetros clínicos de peso, longitud, test de coordinación medido por los centímetros recorridos, en un papel métrico en 5 minutos o número de bulbos pilosos negros por mm de piel, en dichos neonatos; se observa que, todos los parámetros clínicos son normales, en los neonatos nacidos de gestantes no infectadas (P4-NI) o infectadas con la cepa  $LM^{LLO}$  (P4- $LM^{LLO}$ ) o la cepa  $LM^{ActA}$  (P4- $LM^{ActA}$ ), aunque en éstos últimos, el test de coordinación presentaba un 30% de reducción (**Fig.28, panel C**). Los neonatos nacidos de gestantes infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  presentaban una reducción del 50% en el peso, imposibilidad de moverse de forma coordinada (test de coordinación) y un número muy bajo de bulbos pilosos negros por milímetro de piel (barras grises claras en la **Fig.28, panel C**), además de una piel con apariencia rugosa y clara (imágenes P4- $LM^{WT}$  en la **Fig.28, panel B** y barras gris claro en **panel C**); mientras que, el resto de neonatos, tienen la piel negra (**Fig.28, panel B**). Cuando obtuvimos los cerebros de estos neonatos, observamos que los cerebros de los neonatos nacidos de gestantes infectadas con las cepas  $LM^{LLO}$ ,  $LM^{ActA}$  o no infectadas (P4-NI) (**Fig.28, panel D**), eran normales tanto en los cráneos como en los cerebros. Mientras que los neonatos nacidos de gestantes infectadas con la cepa silvestre  $LM^{WT}$  presentaban cráneos blandos, cerebritis y cerebros poco consistentes y desestructurados

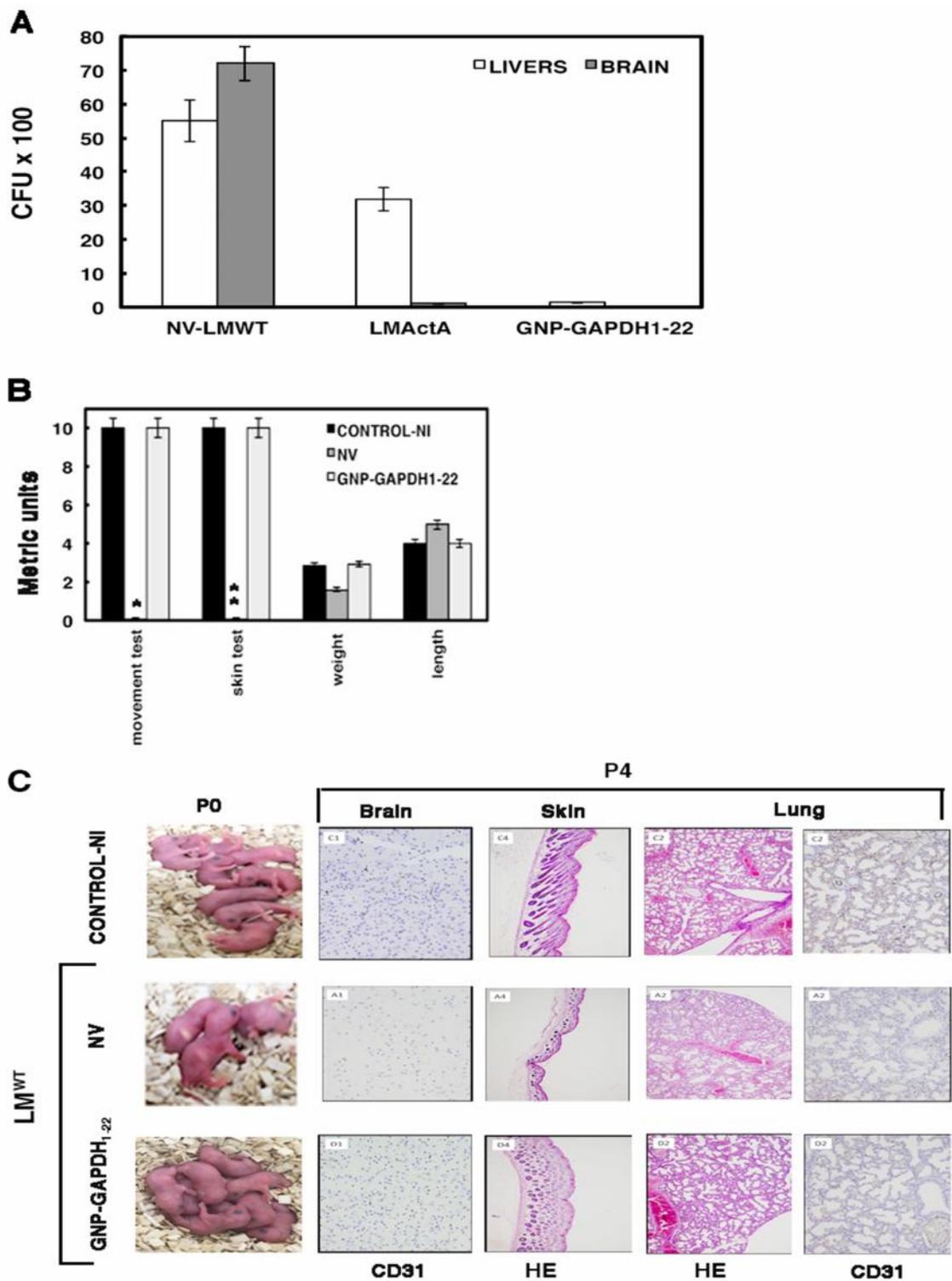
con ausencia de vasos sanguíneos (imágenes P4-LM<sup>WT</sup> en **Fig.28, panel D**). La falta de movimientos coordinados y la baja migración de los melanoblastos, a los folículos pilosos, en los neonatos P4 de gestantes infectadas con la cepa silvestre LM<sup>WT</sup>, se justifica si dichos neonatos presentasen un retraso grave del sistema nervioso central (SNC). Por lo tanto, concluimos, que la mayor parte de las morbilidades asociadas al cerebro, como cerebritis, reducción de vasos sanguíneos cerebrales y celularidad, un cerebro poco consistente y poca migración de los melanoblastos a los folículos pilosos, indica que tanto los genes *actA* como *hly* participaban en dichas morbilidades.

Posteriormente, exploramos la viabilidad de las bacterias que se localizaban en la microglía de los neonatos nacidos de gestantes infectadas con las distintas cepas de *Listeria monocytogenes*. Se detectaron  $6.2 \times 10^3$  CFU/mL en la microglía de los neonatos nacidos de gestantes infectadas con la cepa silvestre, LM<sup>WT</sup> (**Tabla3**), lo que se correspondía con un 20-25% del total del inóculo inyectado en las gestantes, confirmando el tropismo de este patógeno por la microglía. Sólo se detectaron 3,5 CFU/mL en la microglía de los neonatos nacidos de gestantes infectadas con la cepa LM<sup>ActA</sup> (**Tabla3**), cepa que se ha descrito es 1000 veces menos virulenta que la cepa silvestre (*Angelakopoulos y col., 2002; Travier y col., 2013*). La microglía de los neonatos nacidos de gestantes infectadas con la cepa LM<sup>LL0</sup>, no presentaban ninguna bacteria viable en la microglía (**Tabla3**), por lo que se descarta que estas mutantes puedan atravesar la barrera placentaria o hematoencefálica; mientras que las mutantes LM<sup>ActA</sup> eran capaces de atravesar estas barreras, aunque con menor eficiencia que las cepas silvestres, LM<sup>WT</sup>. Por lo que concluimos, que el gen *actA* participaba en el tropismo de este patógeno por la microglía.

**Tabla 3.** Recoge las unidades formadoras de colonias, CFU/mL, en la microglía de neonatos de ratonas gestantes (Mo) infectadas con distintas cepas de *Listeria monocytogenes*, cepa silvestre  $LM^{WT}$ ,  $LM^{LLO}$  y  $LM^{\Delta ActA}$ . La microglía aislada del cerebelo de los neonatos, se homogeniza y siembra en placas de agar-BHI para contar CFU/mL (CFU en la Tabla). ( $P = 0.05$ ), ( $*P = 0.01$ ).

<b>Organs (mice type)</b>	<b>CFU</b>
Microglia ( $LM^{WT}$ )	$6.2 \times 10^3 \pm 0.1$
Microglia ( $LM^{LLO}$ )	$0 \pm 0$
Microglia ( $LM^{\Delta ActA}$ )	$3.5 \pm 0.1^*$

Finalmente, exploramos si vectores vacuna que son eficientes en listeriosis y que atraviesan la barrera placentaria (Rodríguez-Del Río y col., 2015; Calderón-González y col., 2016), eran capaces de prevenir la listeriosis cerebral de transmisión placentaria en nuestro modelo *in vivo*. Para ello utilizamos como vectores vacuna, gliconanopartículas de oro acopladas al péptido 1-22 del factor de virulencia gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, GAPDH de *Listeria monocytogenes* (GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>) en formulación con un adyuvante, DIO-1, que induce señalización a través del TLR-2 y del TLR-4, e induce producción de IL-12, mientras que no induce la producción de IL-10 ni ninguna inflamación (Ovejero-Guisasola y Fresno-Escudero, patente WO2010/39352).



**Figura 29.** Efecto de la vacunación en gestación con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> formuladas con DIO-1 en la listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria. **Panel A**, neonatos P4 nacidos de gestantes no vacunadas (NV-LMWT) o vacunadas con la cepa *LM<sup>ActA</sup>* o con la vacuna GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>, con una sola dosis. 7 días después, todos los grupos de gestantes son infectadas con la cepa silvestre *LM<sup>WT</sup>*, durante 3 días. Los neonatos P4 se sacrifican y se obtienen sus hígados (“livers” en inglés) o microglía para

homogenizarlos y contar las CFU/mL. **Panel B**, test de parámetros clínicos realizados en los neonatos P4 nacidos de gestantes vacunadas con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> o no vacunadas (NV) y ambos grupos de gestantes infectadas con la cepa silvestre *LM*<sup>WT</sup>. Se evalúan el test de coordinación, longitud, peso y test cutáneo. **Panel C**, las imágenes a la izquierda corresponden a neonatos P0, nacidos del grupo de gestantes control (CONTROL-NI), no infectadas con la cepa silvestre, ni vacunadas o del grupo de gestantes infectadas con la cepa silvestre *LM*<sup>WT</sup> pero no vacunadas (NV) o vacunadas con la vacuna GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>. Las imágenes a la derecha corresponden a los análisis de histoquímica de cortes histológicos, de los distintos grupos de neonatos teñidos con hematoxilina-eosina (HE) o correspondientes a la inmunohistoquímica, de secciones con el marcador CD31, que indica vascularización de los órganos teñidos, bien pulmones (“lungs” en inglés) o cerebros (“brains” en inglés).

Los resultados que obtuvimos con la vacunación de las gestantes, a día E9 de gestación, con una sola dosis de las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> formuladas con el adyuvante DIO-1 o vacunadas con la cepa atenuada *LM*<sup>ActA</sup> y, 7 días después, se infectaron todos los grupos de gestantes vacunadas o no con la cepa silvestre *LM*<sup>WT</sup> durante 3 días, indicaron una alta eficiencia de las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>, para evitar la diseminación de las bacterias patogénicas en los neonatos, en los que sólo detectamos 20-25 CFU/ml en los hígados y absolutamente ninguna bacteria viable en los cerebros (**Fig.29, panel A**). Los vacunados con la cepa atenuada *LM*<sup>ActA</sup>, presentaron 10-12 CFU/mL en los cerebros, pero  $3.6 \times 10^3$  CFU/mL en los hígados, indicando alta diseminación en los hígados, comparado con las  $7 \times 10^3$  CFU/mL en los cerebros de los neonatos de gestantes no vacunadas (NV); y  $5.8 \times 10^3$  CFU/mL en los hígados. Además, también se analizó la capacidad de las vacunas para evitar las morbilidades asociadas a la listeriosis cerebral. Los neonatos P4 nacidos de gestantes vacunadas con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>, presentaron capacidad normal de coordinación, números normales de folículos pilosos, y longitud y pesos normales (**Fig.29, panel B**). Todos estos parámetros clínicos estaban reducidos en las gestantes no vacunadas (NV). La vacunación con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> también previno las formas más graves de la listeriosis como los abortos o las morbilidades asociadas al cerebro (**Fig.29, panel C**). Las gestantes vacunadas presentaron 8 neonatos P0, similar a los controles (CONTROL-NI), además de una celularidad y vascularización normal (imágenes CD31 en **Fig.29, panel C**). Análisis histológicos e inmunoquímicos indicaron piel normal, pulmones, estómagos y bazos maduros en los

neonatos nacidos de gestantes vacunadas con las nanovacunas GNP-GAPDH1-22 (imágenes GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> en **Fig.29, panel C**), sugiriendo una prevención total del retraso en el desarrollo del SNC y demás órganos afectados en listeriosis.

Estos resultados indicaron la eficiencia de la nanovacuna GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>, no sólo para prevenir la listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria, sino también para evitar todo tipo de morbilidades asociadas a la listeriosis.



## **V. DISCUSIÓN**



## V. DISCUSIÓN

### 1. Discusión

Los casos de listeriosis neonatal constituyen el 28% de todos los casos de listeriosis que nuestro grupo recientemente ha evaluado en dos instituciones sanitarias de nuestro entorno, el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y el Hospital Universitario Donostia en el periodo 2012 a 2016, con un índice de mortalidad muy alto del 50% (*Calderón-González y col., 2016*). Además de la alta mortalidad, los casos de listeriosis neonatal se caracterizan por presentar morbilidades graves en el cerebro, como meningitis, abscesos cerebrales, fiebre o letargia, además de lesiones y erupciones cutáneas difusas (*Mylonakis y col., 2002; Abram y col., 2003; Bubonja-Sonja y col., 2013; Clark y col., 2014; Calderón-González y col., 2016*). Por ello y porque se carece actualmente de vacuna alguna frente a listeriosis, sería conveniente diseñar vacunas seguras que protejan a las gestantes en alto riesgo de contraer listeriosis y que, además, impidan el desarrollo de morbilidades graves en el cerebro de los neonatos. Para poder preparar vacunas eficaces contra la listeriosis se han de identificar las células del cerebro que participan en el desarrollo de dichas morbilidades; así como los mecanismos moleculares. Puesto que las morbilidades en neonatos con listeriosis son fundamentalmente meningitis y en otros casos de meningitis neonatales causadas por el patógeno *Streptococcus pneumoniae*, esta morbilidad se asocia al reclutamiento de microglía y la inducción de apoptosis (*Mylonakis y col., 2013*), es posible que en los casos de meningitis neonatales causados por *Listeria monocytogenes*, también puedan participar la microglía. Además, en la listeriosis cerebral sistémica en adultos se ha sugerido que una reacción inflamatoria excesiva a una infección bacteriana, podría causar daños graves en el cerebro, pudiendo jugar la microglía un papel fundamental en el sistema nervioso central (SNC) que preservase la homeostasis celular del cerebro (*Dramsi y col., 1998; Schlüter y col., 1999; Virna y col., 2006; Drevets y col., 2008*). Por lo tanto, es factible que la microglía, como macrófago residente del cerebro, cuente con mecanismos reguladores especiales, que podrían ser diferentes a los que

desencadena esta misma bacteria en otros fagocitos como los macrófagos (*MacCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2008*).

En el presente trabajo se demuestra que la microglía son las células diana de *Listeria monocytogenes* en el sistema nervioso central (SNC) y relevantes también para el desarrollo de un gran número de manifestaciones clínicas cerebrales. En este estudio también se describe a nivel transcripcional, proteómico y funcional, las diferencias entre la microglía y los macrófagos para controlar la infección causada por *Listeria monocytogenes*, incluyendo la participación de distintos factores de virulencia del patógeno. Además, también se presenta un modelo *in vivo* de listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria, que corrobora el papel prioritario de la microglía como célula diana del patógeno en el cerebro y relevante para las morbilidades del cerebro. Utilizando este modelo de listeriosis neonatal *in vivo*, en el presente estudio se valida una vacuna segura para la prevención de la listeriosis cerebral en neonatos capaz de inhibir las morbilidades más frecuentes del cerebro.

Primero se ha confirmado *in vitro*, utilizando cultivos primarios de neuronas (*López-Fanarraga y col., 2007*) que la microglía era la célula diana de este patógeno en el SNC. Claramente, esta bacteria presenta tropismo por la microglía, ya que infecta exclusivamente células microgliales y no se detectan bacterias dentro de las neuronas (**Fig.11 y Fig.12**). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los macrófagos, como han detallado varios estudios (*Prada-Delgado y col., 2001; Del Cerro-Vadillo y col., 2006*), depende claramente del factor de virulencia LLO codificado por el gen *hly* y presenta un número de bacterias viables, CFU, que es 5 veces inferior al de la microglía. A pesar de que la microglía presenta marcadores característicos de macrófagos como son la integrina CD11b y el marcador de activación F4/80, el factor de virulencia LLO no juega ningún papel en la proliferación intracelular de *Listeria monocytogenes* en la microglía; ya que las cepas mutantes  $LM^{LLO}$  presentan una proliferación intracelular similar a la de la cepa silvestre,  $LM^{WT}$  (**Fig. 13**); lo que también se puede observar mediante imágenes de microscopía confocal, donde se aprecia un número alto de bacterias en el interior de la microglía (**Fig. 14 y Fig. 15**). La localización sub-celular de las distintas cepas mutantes y de la cepa silvestre de *Listeria monocytogenes* en las células microgliales (BV2) y en las líneas de macrófagos (J774), verificó que el

crecimiento de este patógeno era diferente en ambos tipos celulares. Es decir, la fracción de bacterias citosólicas era más alta que la fracción fagosomal en la microglía, lo que se justificaba al lograr un número alto de bacterias que escapan del fagosoma, evidenciando ser un compartimento poco bactericida. En contraposición, los macrófagos presentaban un número mayor de bacterias en la fracción fagosomal que en la fracción citosólica, ya que dichas bacterias no lograban escapar al citosol al ser dicho compartimento muy bactericida (**Tabla2**). Es decir, según el recuento de CFU, también se puede concluir que la microglía y los macrófagos controlaban la infección de *Listeria monocytogenes* de forma diferente.

Otro dato que apunta a dichas diferencias es el análisis de la respuesta transcripcional que induce *Listeria monocytogenes* en la microglía y que se corresponde con una respuesta inmune innata limitada y dominada por dos patrones transcripcionales. El primer patrón de expresión génica que observamos, es común a macrófagos y microglía y participan las vías de señalización TLR, TNF- $\alpha$ , PI3K, y NF- $\kappa$ B. El gen *actA* de *Listeria monocytogenes* participa en la inducción génica de la molécula asociada a TLR-2 e implicada en la adhesión de *Listeria monocytogenes*, *cd14* (MacCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2007; Leber y col., 2008; Corr y O'Neil, 2010), en la inducción de los genes *nfk*, *tnf* y los genes de las quimocinas *cxcl2* y *ccl4*, que están involucrados en el reclutamiento de monocitos. Sin embargo, el análisis proteómico de los fagosomas, indicó que pese a la inducción transcripcional, los niveles de TLR-2 fagosomales y la expresión en superficie de CD14 eran similares en la microglía y en los macrófagos. Mientras que los niveles fagosomales de NF $\kappa$ B eran más altos en la microglía que en los macrófagos y estaban controlados por ActA que regulaba esta vía de señalización.

El gen *actA* de *Listeria monocytogenes* también era responsable de la inducción de los genes de las citocinas y quimocinas *tnf- $\alpha$*  y *ccl2* en la microglía (**Fig. 19**).

El gen *hly* de *Listeria monocytogenes* controla también parte de este programa transcripcional temprano al reprimir la expresión del gen *pi3kcg*, gen que codifica para el polipéptido catalítico de PI3K quinasa. Por consiguiente, los fagosomas microgliales que contienen esta bacteria, son deficientes en componentes microbicidas oxidativos

que están regulados por la señalización de PI3K, tales como PI3Kp110, Rab5a y Arf1, que podrían enviar una señal negativa a la oxidasa fagosomal, que explicaría la baja producción de reactivos microbicidas como el peróxido de hidrógeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se vierte en los fagosomas (**Fig. 20**) (Jun y col., 1993; Cohen y col., 2000; Prada-Delgado y col., 2001; Beemiller y col., 2006). Por lo tanto, una baja producción de reactivos microbicidas en los fagosomas, explicaría un alto número de bacterias que escapan al citosol en las células microgliales infectadas con *Listeria monocytogenes* y confirmaría un potencial microbicida menor que en los macrófagos.

El segundo patrón de expresión génica que se detectó, es específico para la microglía y consistía en la represión de genes de la respuesta inmune innata tardía, clasificados en dos grupos funcionales que en los macrófagos están inducidos, según se ha descrito (Herkowits y col., 2007; Leber y col., 2008; Carrasco-Marín y col., 2012). Este patrón transcripcional está regulado por el gen *actA* e incluye varias vías (Carrasco-Marín y col., 2012). Una de las vías inhibidas es un grupo funcional de degradación caracterizado principalmente por genes reguladores del tráfico fagosomal, esta vía la componen los genes de autofagia, como *atg4b*, y los genes de degradación lisosomal como *scarb2*, *smpd1*, *vps16*, *rilp2*. La otra vía inhibida es un grupo funcional listericida caracterizado por genes de la vía de señalización del IFN tipo I e implicados en la producción de productos tóxicos para las neuronas como IFN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO (Al., 1993; MacMicking y col., 1997; Myers y col., 2003; Carrasco-Marín y col., 2012).

El gen *actA* de *Listeria monocytogenes* parece ser importante en la inhibición de los genes del grupo de degradación que participan en la fusión de orgánulos, tales como syntaxina-3 y syntaxina-8; el gen de autofagia específico *atg4b*, que podría participar en la degradación citosólica de *Listeria monocytogenes* (Yin y col., 2009; Mostowy y col., 2011), los genes lisosomales *vps16*, *lamp-1*, and *rilp2*; y, especialmente, la represión de dos genes lisosomales implicados en la inmunidad innata de *Listeria monocytogenes* como son *scarb2* (Carrasco-Marín y col., 2011) y *smpd1* (Del Cerro-Vadillo y col., 2006; Schramm y col., 2008). Por lo tanto, parece que el gen *actA* de *Listeria monocytogenes* es imprescindible en microglía para poder evitar su degradación fagosomal y citosólica, controlar eventos de fusión tardíos y regular la producción de TNF (Drevets y col., 2008).

También se confirmó mediante proteómica que los fagosomas de microglía carecían de estos componentes listericidas no oxidativos SCARB2 y SMPD1, que están implicados en el confinamiento de *Listeria monocytogenes* dentro de los fagosomas (Schramm y col., 2008; Carrasco-Marín y col., 2011) (**Fig. 18**).

El gen *hly* de *Listeria monocytogenes* parece ser relevante para el programa de expresión específico de la microglía, que reprime los genes de la vía del IFN tipo I, como los genes *ccl5*, *jak1* e induce el gen *socs3*, lo que evita la amplificación de la respuesta inmune pro-inflamatoria de *Listeria monocytogenes*. De hecho, la producción de IFN / es muy baja en la microglía infectada con *Listeria monocytogenes*. Esta baja producción se justifica por la inducción del gen *socs3* en microglía que es el inhibidor de la señalización del IFN de Tipo I (Jun y col., 1993; Mersick y col. 2003; Utermöhlen y col., 2003). Este programa de expresión también reprime el gen *jak1*, la quinasa asociada con los receptores de IFN. El análisis de proteómica de los fagosomas microgliales de *Listeria monocytogenes* confirmaron la represión de la vía del IFN tipo I, ya que carecen de JAK1 y contienen altos niveles de SOCS3. Estos genes enteros actúan como mecanismos de retroalimentación para aumentar la maquinaria microbicida de los macrófagos (McCaffrey y col., 2004; Herskovits y col., 2007; Leber y col., 2008; Dedoni y col., 2010), por lo que su represión en microglía después de la infección por *Listeria monocytogenes* justifica nuevamente unos niveles bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La señalización de IFN también controla la producción de NO, por lo que su represión justifica que la microglía infectada con *Listeria monocytogenes* tenga niveles bajos de NO, que justifican números inusualmente altos de bacterias citosólicas que no son eliminadas por estos niveles tan bajos de NO.

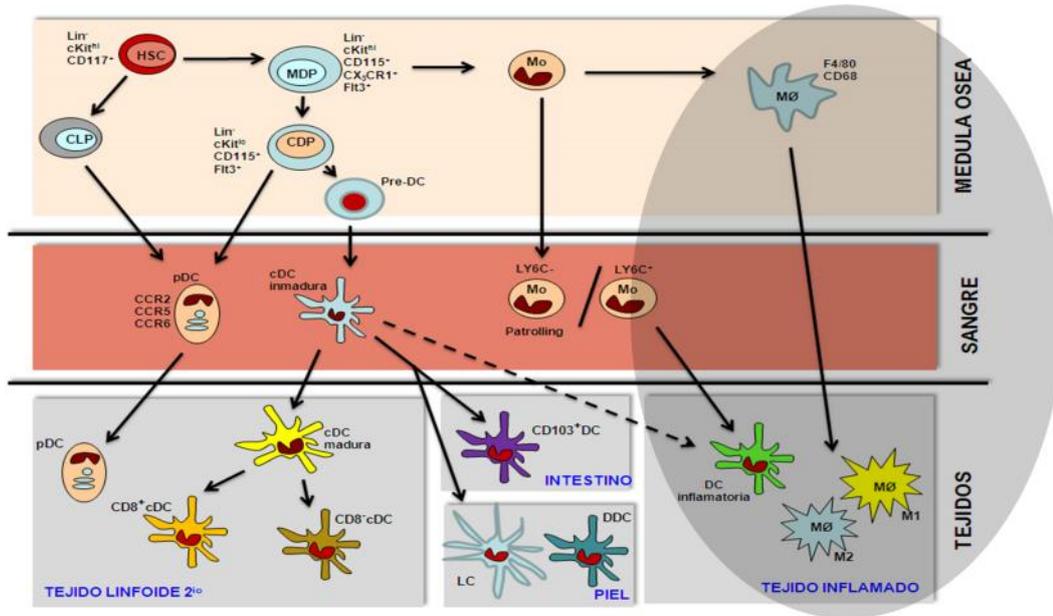
En resumen, las células de microglía tienen compartimentos tanto fagosomales como citosólicos con baja capacidad microbicida, que inhibe la señalización pro-inflamatoria citosólica y no inducirían una respuesta exacerbada inflamatoria (Herskovits y col., 2007; Leber y col., 2008).

Todo este programa transcripcional inducido por la infección con *Listeria monocytogenes* en microglía, parece disociar las respuestas mediadas por TNF- $\alpha$  e IFN tipo I (**Fig.17**); lo que se comprobó al cuantificar las citocinas y detectarse una sobreproducción de TNF- $\alpha$  y MCP-1/CCL2 en la microglía infectada con *Listeria monocytogenes*, y una reducción de la producción de IFN tipo I y compuestos bactericidas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO. Esta disociación también tiene como objetivo limitar el daño neuronal, porque las señales de LPS o IFN, que no causan esta disociación, son más neurotóxicas (modelo en la **Fig.31**).

Por otro lado, esta alta producción de TNF- $\alpha$  y MCP-1 también podría servir para reclutar a otros monocitos al sitio de la infección, y controlar así, la propagación de patógenos a otras células. De hecho, este control de la diseminación del patógeno a otras células, también se justifica con los cultivos mixtos del hipocampo, donde se observa el crecimiento del patógeno exclusivamente en la microglía y no en otros tipos celulares. La inhibición de la expresión en superficie de marcadores migratorios como el CD11b tras la infección de la microglía con *Listeria monocytogenes*, podría también explicar la inhibición en la diseminación del patógeno.

En definitiva, este patrón transcripcional inducido por *Listeria monocytogenes* en la microglía tenía como elemento central una alta producción de TNF- $\alpha$  pero baja producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y IFN tipo I y tenía el objetivo de causar una apoptosis neuronal limitada, en comparación con la apoptosis inducida por otros estímulos como LPS o IFN. Esta estrategia de la microglía de inducir una apoptosis neuronal limitada parece preservar el delicado equilibrio del cerebro y destaca el papel de la microglía en la prevención de infecciones microbiológicas que podrían exacerbar los procesos neurodegenerativos (*Dedoni y col., 2010*) (**Fig.31**). La falta de producción de IFN de tipo I también limita la respuesta inflamatoria aguda al no reclutar otros leucocitos y reducir el daño cerebral (*Virna y col., 2006; Yin y col., 2009; Dedoni y col., 2010; Sonje y col., 2010*).

Estos resultados de producción de citocinas unidos al estudio de la expresión de marcadores de activación en la superficie celular, predice que las células de la microglía, tras la infección de *Listeria monocytogenes*, se transforman en macrófagos M0-M1 con una expresión de CD11b<sup>low</sup>F4/80<sup>high</sup>MHC-II<sup>high</sup> y con una baja inducción de apoptosis que producen citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6 (**Fig. 30**).



**Figura 30.** Esquema de la Ontogenia de las células mieloides (macrófagos, monocitos y células dendríticas) a partir de un precursor común hematopoyético de médula ósea. *Abreviaturas:* HSC: célula madre hematopoyética, MØ: macrófago, Mo: monocito, MDP: precursor común de macrófago/monocito/célula, CDP: precursor común de célula dendrítica, CLP: precursor linfocítico común, pDC: célula dendrítica plasmacitoide, cDC: célula dendrítica convencional, LC: célula de Langerhans, DDC: célula dendrítica dermal (*Sánchez-Madrid y col, 2011*). Remarcado con un sombreado la transformación de macrófagos (MØ) a macrófagos activados (en estado M1 o M2) en tejido inflamatorio.

Esta disociación de las respuestas inmunes innatas en la microglía tras la infección infectada por *Listeria monocytogenes*, parece correlacionarse con la heterogenicidad de las respuestas de la microglía, ya que la infección por *Listeria monocytogenes* podría seleccionar una población específica de microglía (*Scheffel específica y col., 2012*).

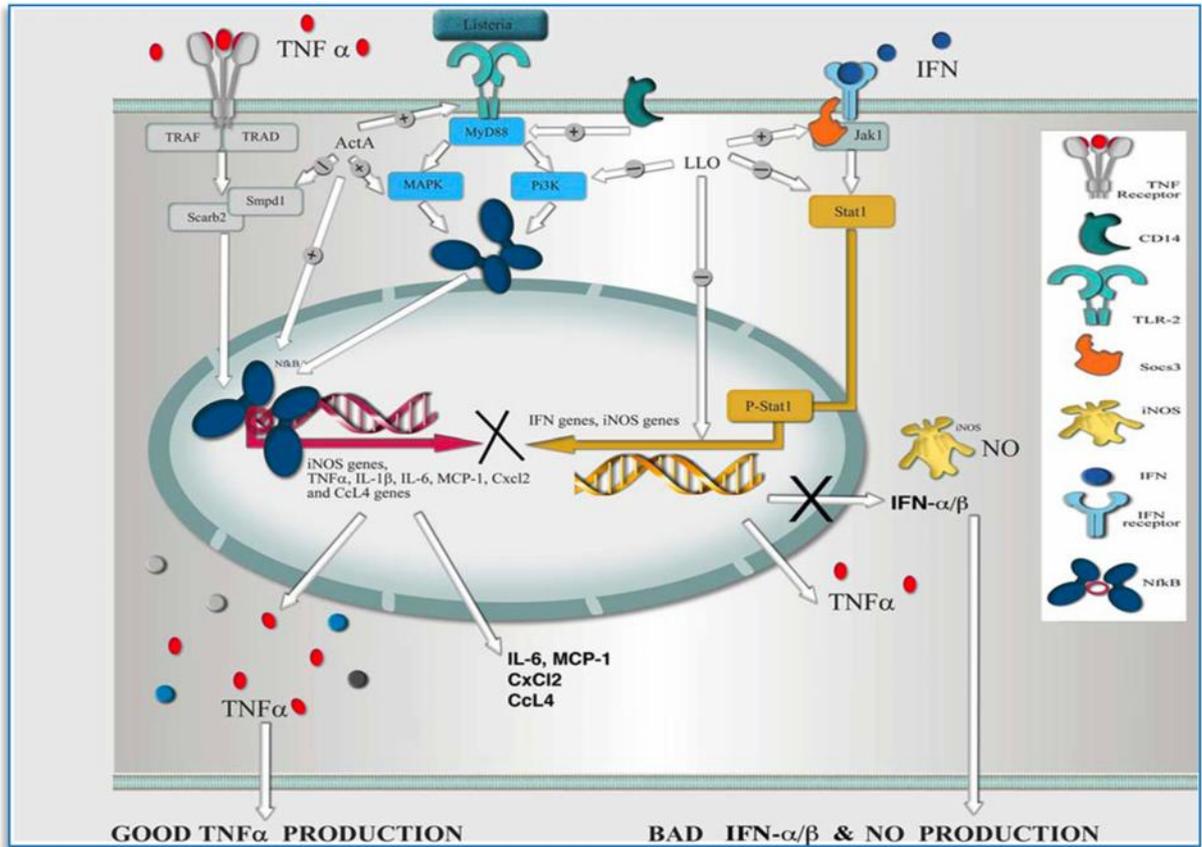
Una vez estudiado *in vitro* que la célula diana de *Listeria monocytogenes* era la microglía y desvelado su mecanismo de acción a nivel transcripcional, proteómica y funcional, había que confirmar estos hallazgos *in vivo* en un modelo de listeriosis cerebral neonatal. El modelo planteado de listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria se establece a finales de la gestación (semana 16, E16), aunque no era exactamente similar, este modelo experimental se asemejaba en gran medida a la listeriosis neonatal en humanos, imitando la mayoría de los síntomas clínicos humanos de la listeriosis; tales como abortos espontáneos o nacidos muertos (*Hardy y col., 2012; Travier y col., 2013; Perez-Trallero y col., 2014*). Además, parece retardar el desarrollo normal del feto en general y del cerebro del feto en concreto al detectarse un bajo número de cuerpos neuronales, baja densidad de epidermis o falta de irrigación sanguínea en el cerebro. Estos retrasos en el desarrollo explicarían la falta de movimientos coordinados observados en el experimento de motricidad y se asemeja a las graves morbilidades cerebrales reportadas de neonatos humanos no tratados con antibióticos (*Mylonakis y col., 2002; Drevets y col., 2008; Abdlla y col., 2015*). Además, se observaron otros síntomas de inmadurez en el desarrollo normal del feto como estómagos no distendidos o pulmones colapsados y reducción de los vasos sanguíneos en estos órganos y la ausencia de bazo. Este ensayo de listeriosis cerebral sugirió un grave retraso en el desarrollo tardío de los fetos y una reducción significativa de la respuesta inmune (**Fig.28**).

Las incidencias de listeriosis han aumentado en Europa desde 2008, y especialmente en el norte de España con dos brotes y tasas de incidencia actuales de 1.71-1.86 casos por 100.000 habitantes (*Allerberger y col., 2010; Perez-Trallero y col., 2014; Calderón-González y col., 2016*). Por lo que, el modelo *in vivo* planteado en este estudio de listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria, ha permitido confirmar *in vivo* que la microglía es la célula diana de *Listeria monocytogenes* (**Fig.27**) y plantear experimentos de vacunación. Las vacunas pueden además contribuir a disminuir las incidencias de listeriosis y también a implementar la competencia inmunológica de las mujeres embarazadas.

La formulación que se escogió como vacuna con gliconanopartículas de oro acopladas al péptido 1-22 de la GAPDH, GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> formuladas con el adyuvante DIO-1, que activa la señalización por TLR-2 y TLR-4, se escogió como la más probable, dado que había sido en vectores vacuna con células dendríticas la más eficaz para proteger frente a listeriosis. Se justificaba el uso de nanovacunas y no vacunas celulares, ya que era improbable que estas últimas, en una vacunación de gestantes, pudieran atravesar la placenta. Sin embargo, el tamaño en nano-escala de las GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>, predecía que lograrán atravesar todas las barreras, la placentaria y la hematoencefálica y evitaran así en los neonatos la aparición de morbilidades cerebrales. La vacunación con la formulación GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>/DIO-1 en gestantes logró una prevención de la listeriosis cerebral en los neonatos y su diseminación a otros órganos como al hígado, pero además también impidió el desarrollo de morbilidades asociadas a las funciones de la microglía como son la coordinación del movimiento y el mantenimiento de la celularidad en el cerebro, además de no inducir apoptosis en la microglía. Pero también se observaron beneficios para otras morbilidades tales como presentar números normales de neonatos en el nacimiento que permanecieron sanos a momentos más tardíos del desarrollo. También se obtuvo una vascularización de los cerebros y pulmones normalizada.

En conclusión, esta formulación de nanovacunas era eficaz en prevenir la diseminación del patógeno y en evitar el desarrollo de morbilidades cerebrales y generalizadas. Se justifica una acción tan amplia de estas formulaciones de nanovacunas ya que el adyuvante DIO-1 puede inducir la señalización TLR-2 en diversas células inmunes que son protectoras para listeriosis y su formulación en nano-escala les permite atravesar la barrera placentaria y la hematoencefálica, induciendo una respuesta pro-inflamatoria Th1, lo que previene la diseminación del patógeno al cerebro y al hígado de los neonatos, previniendo la mayoría de las morbilidades asociadas a listeriosis.

## 2. Modelo de infección de *Listeria monocytogenes* en microglía



**Figura 31.** Modelo planteado de infección por *Listeria monocytogenes* en microglía. El patógeno parece inducir en microglía la disociación de una respuesta transcripcional dominada por la inmunidad innata usando tres eventos regulados por el gen *actA* y parcialmente por el gen *hly*: (i) el gen *actA* parece relevante para la inducción de respuestas innatas tempranas compiladas en tres vías de señalización: TLR, TNF y NF- $\kappa$ . Después de unirse las bacterias a TLR2, la inducción de la quinasa activada por mitógeno y PI3K parecía ocurrir con la participación de CD14. La activación siguiente del NF $\kappa$  podría inducir altos niveles de quimiocinas de TNF (buena producción de TNF en el modelo) y MCP-1, y CXCL2 y CCL4 que reclutaron otros monocitos. (ii) El gen *actA* también reprimió un grupo de degradación, perteneciente a las últimas respuestas innatas y caracterizado por los genes lisosómicos *smpd1* y *scarb2*. El gen *hly* parecía reprimir el grupo de genes que respondían a IFN, pertenecientes a respuestas innatas tardías que implicaban una alta inducción del represor Socs3 (1 flecha) que bloqueaba la vía del IFN y reprimía Jak1, la quinasa asociada con el receptor de IFN (vías). Por lo tanto, la producción de IFN de tipo I (es decir, IFN y NO se redujo (BAD IFN y la producción de NO en el modelo) porque la activación de los genes iNOS parecía comprometida. El gen *hly* parecía también importante para la inhibición del gen *pi3kcg*, que podría evitar la activación de la oxidasa fagosomal (conocida como phox) y bloquear la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## **VI. CONCLUSIONES**

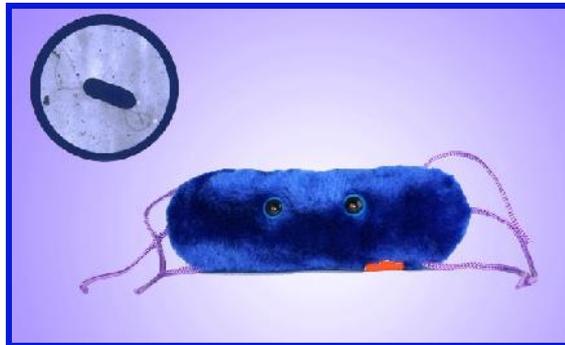


## VI. CONCLUSIONES

### Conclusiones

1. La célula diana de *Listeria monocytogenes* en el sistema nervioso central (SNC) es la microglía.
2. Los factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* en células de microglía durante el ciclo de infección juegan un papel distinto que en la infección de las células macrófagos.
  - La infección en microglía no está controlada por el factor de virulencia *LLO*
3. Los fagosomas formados en las células de microglía son distintos a los de los macrófagos.
4. La infección de *Listeria monocytogenes* en células de microglía induce señales mediadas por el TNF- $\alpha$  pero reprime las señales de la vía del IFN tipo I y la vía de degradación.
5. Las células de microglía son menos microbicidas que otras células fagocíticas como los macrófagos.
6. La microglía protege a las neuronas: a partir del control de su respuesta pro-inflamatoria y por su propio “suicidio” (apoptosis microglial) para evitar la muerte neuronal.
7. La microglía es responsable de la inducción de las principales morbilidades cerebrales en un modelo *in vivo* de listeriosis cerebral transmitida por vía placentaria.

8. La prevención de la listeriosis cerebral en neonatos tras vacunación de las gestantes evita la inducción de apoptosis en la microglía y preserva su función.
9. La prevención de la listeriosis cerebral en neonatos tras vacunación de las gestantes previene la diseminación del patógeno a cerebro e hígado.
10. La prevención de la listeriosis cerebral en neonatos tras vacunación de las gestantes previene la aparición de las morbilidades cerebrales y las más frecuentes en listeriosis.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A., Lichtman A., Pillai S., 2010. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 566.

Abdlla O.A., Elboshy M.E., reisha E.F., Gadlla H.A., El-Khodery S.A., 2015. Tumor Necrosis Factor- , Interleukins-12(p40), 6, and 10 levels in cerebrospinal fluid and outcome prediction in Ossimi sheep with encephalitic listeriosis. Cytokine; 73(2):283-7.

Abram M., Schlüter D., Vuckovic D., Wraber B., Doric M., Deckert M., 2003. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. FEMS Immunol Med Microbiol; 35(3):177-82.

Agaisse H., Burrack L.S., Philips J.A., Rubin E.J., Perrimon N., Higgins D.E., 2005. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracelular bacterial infection. Science. 309:1248-1251.

Akira S., Uematsu S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 124, 783-801.

Akiyama H., McGeer P.L., 1990. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. J Neuroimmunol. 30, 81-93

Allerberger F., Wagner M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect; 16(1):16-23.

Aloisi F., 2001. Immune function of microglia. Glia. 36, 165-179.

Aloisi F., Ria F., Adorini L., 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. Immunol Today. 21, 141-147.

Álvarez-Domínguez C., Carrasco-Marín E. and Leyva-Cobián F., 1993. Role of complement C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophagelike cell lines. *Infect. Immun.* 61(9):3664-3672.

Álvarez-Domínguez C., Barbieri M.A., Beron W., Wandiger-Ness A. and Stahl P.D., 1996. Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences rab5 regulated in vitro phagosome-endosome fusion. *J. Biol. Chem.* 271(23):13834-13843.

Álvarez-Domínguez C., Vázquez-Boland J.A., Carrasco-Marín E., López-Mato P. and Leyva-Cobián F., 1997a. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun.* 65(1):78-88.

Álvarez-Domínguez C., Roberts R. and Stahl P.D., 1997b. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* 110:731-743.

Álvarez-Domínguez C., Stahl P., 1999. Increased expression of Rab5a correlates directly with accelerated maturation of *Listeria monocytogenes* phagosomes. *J Biol Chem* 274:11459-11462.

Álvarez-Domínguez C., Carrasco-Marín E., López-Mato P., Leyva-Cobián F., 2000. The contribution of both oxygen and nitrogen intermediates to the intracellular killing mechanisms of C1q-opsonized *Listeria monocytogenes* by the macrophage-like IC-21 cell line. *Immunology* 101:83-89.

Álvarez-Domínguez C., Madrazo-Toca F., Fernández-Prieto L., Vandekerckhove J., Pareja E., Tobes R., Gómez-López M.T., Del Cerro-Vadillo E., Fresno M., Leyva-Cobián F. and Carrasco-Marín E., 2008. Characterization of a *Listeria monocytogenes* protein interfering with Rab5a. *Traffic.* 9(3):325-37.

Angelakopoulos H., Looock K., Sisul D.M., Jensen E.R., Miller J.F., Hohmann E.L., 2002. Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a

deletion of acA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect Immun*; 70(7):3592-601.

Aranami T., Yamamura T.. 2008. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 57, 115-120.

Aravalli R.N., Hu S., Rowen T.N., Palmquist J.M., Lokensgard J.R., 2005. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol.* 175, 4189-4193.

Bannam T. and Goldfine H., 1999. Mutagenesis of active-site histidines of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on enzyme activity and biological function. *Infect Immun.* 67:182-6.

Barker C.F., Billingham R.E., 1977. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 25, 1-54.

Bartfield A.A., 2000. Bacterial meningitis. *Prim Care Update Ob Gyns* 7(2):49-54.

Becher B., Prat A., Antel J.P., 2000. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia.* 29, 293-304.

Bechmann I., Kwidzinski E., Kovac A.D., Simburger E., Horvath T., Gimsa U., Dirnagl U., Priller J., Nitsch R., 2001. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol.* 168, 242-249.

Bechmann I., Mor G., Nilsen J., Eliza M., Nitsch R., Naftolin F., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia.* 27, 62-74.

Becroft D.M., Farmer K., Seddon R.J., Sowden R., Stewart J.H., Vines A., Wattie D.A., 1971. Epidemic listeriosis in the newborn. *Br Med J.* 3(5777):747-51.

Beemiller .P, Hoppe A.D., Swanson J.A., 2006. A phosphatidylinositol-3-kinase dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fcc-receptormediated phagocytosis. *PloS Biol* 4:e62.

Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Appel S.H., 2008. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model f inherited ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 15558-15563.

Bell M.D., López-González R., Lawson L., Hughes D., Fraser I, Gordon S., Perry V.H., 1994. Upregulation of the macrophages scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol*. 23, 605-613.

Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo VK., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441, 235-238.

Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K., 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 8, 345-350.

Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F., 1990. Inmortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27:229–237.

Block M.L., Zecca L., Hong J.S., 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57–69.

Bluestone J.A., Tang Q., 2005. How do CD4+ CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol*. 17, 638-642.

Boldrick J.C., Alizadeh A.A., Diehn M., Dudoit S., Liu C.L., Belcher C.E., Botstein D., Staudt L.M., Brown P.O., Relman D.A., 2002. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:972–977.

Bronchalo-Vicente L., Rodríguez-Del Rio E., Freire J., Calderón-González R., Frande-Cabanes E., Gómez-Roman J.J., Fernández-Llaca H., Yañez-Díaz S., Álvarez-Domínguez C., 2015. A novel therapy for melanoma developed in mice: transformation of melanoma into dendritic cells with *Listeria monocytogenes*. PLoS One 10(3):e0117923.

Bubonja-Sonje M., Mustac E., Brunn A., Deckert M., Abram M., 2013. Listeriosis in pregnancy: case report and retrospective study. J Matern Fetal Neonatal Med. 26(3):321-3.

Burguillos M.A., Deierborg T., Kavanagh E., Persson A., Hajji N-, García- Quintanilla A., Cano J., Brundin P., Englund E., Venero J.L., Joseph B, 2011. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. Nature 472:319–324.

Calderón-González R., Terán-Navarro H., Marimon J.M., González-Rico C., Calvo-Monts J., Frande-Cabanes E., Alkorta-Gurrutxaga M., Fariñas M.C., Martínez-Martínez L., Pérez-Trallero E., Álvarez-Domínguez C., 2016. Biomarker Tools to Design Clinical Vaccines Determined from a Study of Annual Listeriosis Incidence in Northern Spain. Front Immunol 7:541.

Calderón-González R., Bronchalo-Vicente L., Freire J., Frande-Cabanes E., Aláez-Álvarez L., Gómez-Román J., Yañez-Díaz S., Álvarez-Domínguez C., 2016. Exceptional antineoplastic activity of a dendritic-cell-targeted vaccine loaded with a *Listeria* peptide proposed against metastatic melanoma. Oncotarget 7(13):16855-65.

Calderón-González R., Terán-Navarro H., Frande-Cabanes E., Ferrández-Fernández E., Freire J., Penadés S., Marradi M., García I., Gómez-Román J., Yañez-Díaz S., Álvarez-Domínguez C., 2016. Pregnancy Vaccination with Gold Glyco-Nanoparticles Carrying *Listeria monocytogenes* Peptides Protects against Listeriosis and Brain- and Cutaneous-Associated Morbidities. Nanomaterials (Base) 6(8).

Calderón-González R., Tobes R., Pareja E., Frande-Cabanes E., Petrovsky N., Álvarez-Domínguez C., 2015. Identification and characterisation of T-cell epitopes for

incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines. *J Immunol Methods* 424:111-9.

Calderón-González R., Frande-Cabanes E., Bronchalo-Vicente L., Lecea-Cuello M.J., Pareja E., Bosch-Martínez A., Fanarraga M.L., Yañez-Díaz S., Carrasco-Marín E., Álvarez-Domínguez C., 2014. Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Front Cell Infect Microbiol* 4:22.

Camejo A., Carvalho F., Reis O., Leitão E., Sousa S., Cabanes D., 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2: 379-94.

Carpentier P.A., Duncan D.S., Miller S.D., 2008. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun.* 22, 140-147.

Carrasco-Marín E., Fernández-Prieto L., Rodríguez-Del Río E., Madrazo-Toca F., Reinheckel T., Saftig P., Álvarez-Domínguez C., 2011. Limp-II links late phagosomal trafficking with the onset of *Listeria monocytogenes* innate immunity: A role in macrophage activation. *J Biol Chem* 286:3332–3341.

Carrasco-Marín E., Madrazo-Toca F., de los Toyos J.R., Cacho-Alonso E., Tobes R., Pareja E., Paradelo A., Albar J.P., Chen W., Gómez-López M.T., Álvarez-Domínguez C., 2009. The innate immunity role of cathepsin-D is linked to Trp-491 and Trp-492 residues of listeriolysin O. *Mol Microbiol* 72:668–682.

Carrasco-Marín E., Rodríguez-Del Río E., Frande-Cabanes E., Tobes R., Pareja E., Lecea-Cuello M.J., Ruiz-Sáez M., Madrazo-Toca F., Hölscher C., Álvarez-Domínguez C., 2012. Phagosomes induced by cytokines function as anti-*Listeria* vaccines: A novel role for functional compartmentalization of Stat-1 and cathepsin-D. *J Biol Chem* 287:14310–14324.

Carson M.J., 2002. Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia.* 40, 218-231.

Carson M.J., Bilousova T.V., Puntambekar S.S., Melchior B., Doose J.M., Ethell I.M., 2007. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. *Neurotherapeutics*. 4, 571-579.

Carson M.J., Doose J.M., Melchior B., Schmid C.D., Ploix C.C., 2006. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev*. 213, 48-65.

Cervantes J., Nagata T., Uchijima M., Shibata K., Koide Y., 2008. Intracytosolic *Listeria monocytogenes* induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. *Cell Microbiol*; 10(1):41-52.

Chao C.C., Hu S., Molitor T.W., Shaskan E.G., Peterson P.K., 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149:2736–2741.

Chaturvedi V., Ertelt J.M., Jiang T.T., Kinder J.M., Xin L., Owens K.J., Jones H.N., Way S.S., 2015. CXCR3 blockade protects against *Listeria monocytogenes* infection-induced fetal wastage. *J Clin Invest*; 125(4):1713-25.

Cheeran M.C., Hu S., Sheng W.S., Rashid A., Peterson P.K., Lokensgard J.R., 2005. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *J Neuroviol*. 11, 512-524.

Chew L.J., Takanohashi A., Bell M., 2006. Microglia and inflammation: impact on developmental brain injuries. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 12, 105-112.

Clark D.R., Chaturvedi V., Kinder J.M., Jiang T.T., Xin L., Ertelt J.M., Way S.S., 2014. Perinatal *Listeria monocytogenes* susceptibility despite preconceptual priming and maintenance of pathogen-specific CD8(+) T cells during pregnancy. *Cell Mol Immunol*; 11(6):595-605.

Cohen P., Bouaboula M., Bellis M., Baron V., Jbilo O., Poinot-Chazel C., Galie` gue S., Hadibi E.H., Casellas P., 2000. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem* 275:11181– 11190.

Collins M.D., Wallbanks S., Lane D.J., Shah J., Nietupski R., Smida J., Dorsch M., Stachebrandt E., 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria monocytogenes* on reverse transcriptase sequencing of 16S r-rna. *Int J Syst Bacteriol.* 41:240-246.

Conlan J.C., North R.J., 1991. Neutrophil-mediated Dissolution of Infected Host Cells as a Defense Strategy Against a Facultative Intracellular. *J Exp Med* 174: 741-744.

Conlan J.W., North R.J., 1992. Early Pathogenesis of Infection in the Liver with the Facultative Intracellular Bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella Typhimurium* Involves Lysis of Infected Hepatocytes by Leukocytes. *Infec Immun* 60: 5164-5171.

Conlan J.W., 1996. Early patogénesis of *Listeria monocytogenes* infection in the Mouse soleen. *J. Med. Microbiol.* 44:295-302.

Conus S. and Simon H. U., 2008. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* 76:1374–1382.

Corr S.C., O'Neill L.A., 2010. *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity. *Cell Microbiol* 11:703–709.

Cossart P. and Toledo-Arana A., 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: overview. *Microbes Infect*; 10(9):1041-50.

Crombie R. and Silverstein R., 1998. Lysosomal integral membrana protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesión molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J. Biol. Chem.* 273:4855–4863.

Curotto de Lafaille M.A. and Lafaille J.J., 2009. Natural and adaptive foxp3 regualtory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 30, 626-635.

Czuprynski C.J., Brown J.F., Wagner R.D. and Steinberg H., 1994. Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* infection in previously immunized mice. *Infect Immun.* 62(11):5161-3.

Czuprynski C.J. and Braun J.F., 1987. Dual regulation of anti-bacterial resistance and inflammatory neutrophil and macrophage accumulation by L3T4+ and Lyt 2+ *Listeria*-immune cells. *Immunology.* 60:287-293.

Dabiri G.A., Sanger J.M., Portnoy D.A. and Southwick F.S., 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:6068– 6072.

Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci.* 8, 752-758.

Dedoni S., Olanas M.C., Onali P., 2010. Interferon- $\beta$  induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway. *J Neurochem* 115:1421–1433.

Del Cerro-Vadillo E., Madrazo-Toca F., Carrasco-Marín E., Fernández-Prieto L., Beck C., Leyva-Cobián F., Saftig P., Álvarez-Domínguez C., 2006. A novel nonoxidative mechanism exerted by cathepsin-D controls *Listeria monocytogenes* intracellular growth. *J Immunol* 276:1321–1325.

Dheen S.T., Kaur C., Ling E.A., 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem.* 14, 1189-1197.

Dietrich P.Y., Escudier B., Ravaud A., Berton D., Chevreau C., Douillard J.Y., 1998. Phase II study of interferon-alpha and all-trans retinoic acid in metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* (1):62-4.

Dijkstra C.D., Dopp E.A., van den Berg T.K., Damoiseaux J.G., 1994. Monoclonal antibodies against rat macrophages. *J Immunol Methods*. 174, 21-23.

DiMaio H., 2002. *Listeria* Infection in Women. *Obst Ginecol* 7: 40-45.

Dinneen J.L. and Ceresa B.P., 2004. Continual expression of Rab5(Q79L) causes a ligand-independent EGFR internalization and diminishes EGFR activity. *Traffic*. 5(8):606-15.

Disson O. and Lecuit M., 2013. In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap. *Microbes Infect*; 15(14-15):971-80.

Dittel B.N., 2008. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. *Brain Behav Immun*. 22, 421-430.

Dramsi S., Biswas I., Maguin E., Braun L., Mastroeni P., Cossart P., 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* Into Hepatocytes Requires the Expression of InlB, a Surface Protein of the Internalin Multigene Family. *Mol Microbiol*; 16: 251-261.

Dramsi S., Cossart P., 1998. Intracellular Pathogens and the Actin Cytoskeleton. *Ann Rev Cell and Develop Biol*; 14: 137-166.

Dramsi S., Cossart, P., 2002. Listeriolysin O: a Genuine Cytolysin Optimized for an Intracellular Parasite. *J Cell Biol*; 156: 943-946.

Dramsi S., Levi S., Triller A., Cossart P., 1998. Entry of *Listeria* into neurons occur by cell-to-cell spread: An in vitro model. *Infect Immun* 66:4461–4468.

Drevets D.A., Sawyer R.T., Potter T.A. and Campbell P.A., 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun*. 63:4268–4276.

Drevets D.A., 1999. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by Infected Phagocytes. *Infect Immun*; 67(7): 3512-3517.

Drevets D.A., Schawang J.E., Dillon M.J., Lerner M.R., Bronze M.S., Brackett D.J., 2008. Innate responses to systemic infection by intracellular bacteria trigger recruitment of Ly-6Chigh monocytes to the brain. *J Immunol* 181:529–536.

Duclos S., Diez R., Garin J., Papadopoulou B., Descoteaux A., Stenmark H. and Desjardins M., 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW-264.7 macrophages. *J Cell Sci.* 113(19):3531-41.

Dunn P.L. and North R.J., 1991. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* 59(9):2892-2900.

Ebe Y., Hasegawa G., Takatsuka H., Umezu H., Mitsuyama M., Arakawa M., Mukaida NNaito M., 1999. The Role of Kupffer Cells and Regulation of Neutrophil Migration Into the Liver by Macrophage Inflammatory Protein-2 in Primary Listeriosis in Mice. *Pathol Int* 49: 519-532.

Edelson B., Cossart P., Unanue R., 1999. Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to *Listeria* Infection. *J Immunol* 163: 4087-4090.

Edelson B.T. and Unanue E.R., 2000. Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol.* 12(4):425-31.

Edelson B.T. and Unanue E.R., 2002. MyD88-Dependent but Toll-Like Receptor 2-Independent Innate Immunity to *Listeria*: No Role for Either in Macrophage Listericidal Activity. *J. Immunol.* 169:3869-3875.

Emmerling P., Finger H. and Hof H., 1997. Cell-mediated resistance to infection with *Listeria monocytogenes* in nude mice. *Infect. Immun.* 15(2):382385.

Engelhardt B., 2006. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural TRansm.* 113, 477-485.

Engelhardt B., Ransohoff R.M., 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26, 485-495.

Eskelinen E. L., Tanaka Y. and Saftig P., 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membraneproteins. *Trends Cell Biol.* 13:137–145.

Essani N.A., McGuire G.M., Manning A.M. and Jaeschke H., 1995. Differential induction of mRNA for ICAM-1 and selectins in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells durins endotoxemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 211(1):74-82.

Fenlon D.R., 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment, p. 2137. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis and food safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Frande-Cabanes E., Fernandez-Prieto L., Calderón-Gonzalez R., Rodríguez-Del-Río E., Yañez-Diaz S., López-Fanarraga M., Álvarez-Domínguez C., (2014). Dissociation of innate immune responses in microglia infected with *Listeria monocytogenes*. *Glia*, 62(2), 233–246. <http://doi.org/10.1002/glia.22602>

Gaillard J.L., Berche P., Mounier J., Richard S. and Sansonetti P., 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55:2822–2829.

Gaillard J.L., 1991. Entry of *L. monocytogenes* into Cells is Mediated by Internalin, a Repeat Protein Reminiscent of Surface Antigens from Gram-positive Cocci. *The Cel*; 65: 1127-1141.

Gaillard J.L., Jaubert F., Berche P., 1996. The inlAB Locus Mediates The Entry of *Listeria monocytogenes* Into Hepatocytes In Vivo. *J Exp Med*; 183: 359-369.

Galea I., Bechmann I., Perry V.H., 2007. What is immune privilege (not)? Trends Immunol. 28, 12-18.

Galea I., Palin K., Newman T.A., Van Rooijen N., Perry V.H., Boche D., 2005. Mannose receptor perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. Glia. 49, 375-384.

Garden G.A., Moller T., 2006. Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Pharmacol. 1, 127-137.

Gedde M.M., Higgins D.E., Tilney L.G., Portnoy D A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 2000; 68: 999-1003

Geginat G., Schenk S., Skoberne M., Goebel W. and Hof H., 2001. A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. J Immunol. 166(3):1877-84.

Gerner-Smidt P., Ethelberg S., Schiellerup P., Christensen J.J., Engberg J., Fussing V., 2005. Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. Clin Microbiol Infect; 11: 618-24.

Glass W.G., Lim J.K., Cholera R., Pletnev A.G., Gao J.L., Murphy P.M., 2005. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. J Exp Med. 202, 1087-1098.

Glomski I.J., Decatur A.L. and Portnoy D.A., 2003. *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listeriolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. Infect Immun. 71:6754-65.

Goebel W. and Kreft J., 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. Trends Microbiol. 5:86-88.

Goulet V., Hedberg C., Le Monnier A., de Valk H., 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis*; 14: 734-40.

Graeber M.B., Streit W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 89-105.

Graeber M.B., 2010. Changing face of microglia. *Science*; 330(6005):783-8.

Graeber M.B. and Streit W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):89-105.

Graham J., Lanser S., Bignardi G., Pedler SHollyoak V., 2002. Hospital Acquired Listeriosis. *J Hosp Infect* 51: 136-139.

Graves L.M., Helsel L.O., Steigewalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E., Orsi R.H., Fortes E.D., Molillo S.R., den Bakker H.C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauders B.D., 2010. *Listeria marthii* sp. Nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Mirobiol.* 60(Pt 6):1280-8.

Gray M.L., and Killinger A.H., 1996. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacterial. Rev*, 30:309-371.

Gregory S.H., and Wing E.J., 1990. Accessory function of Kupffer cells in the antigen-specific blastogenic response of an L3T4+ T-lymphocyte clone to *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 58(7):2313-9.

Gregory S.H., and Wing E.J., 1993. IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol.* 151(3):1401-9.

Gregory S.H. and Liu C.C., 2000. CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol Rev.* 174:112-22.

Gregory S.H. and Wing E.J., 2002. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 72:239-248.

Greter M. and Merad M., 2013. Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 61:121–127.

Guzman C.A., Rohde M., Chakraborty T., Domann E., Hudel M., Wehland J. and Timmis K.N., 1995. Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 63:3665–3673.

Hanisch U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140–155.

Hanisch U.K., Kettenmann H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal an pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10, 1387-1394.

Hardy J., Kirkendoll B., Zhao H., Pisani L., Luong R., Switzer A., McConnell M.V., Contag C.H., 2012. Infection of pregnant mice with *Listeria monocytogenes* induces fetal bradycardia. *Pediatr Res*; 71(5):539-45.

Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T.. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6, 1123-1132.

Harrington L.E., Mangan P.R., Weaver C.T., 2006 Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 18, 349-356.

Heath W.R. and Carbone F.R., 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 19:47–64

Henry R., Shaughnessy L., Loessne, M.J., Alberti-Segui C., Higgins D.E. and Swanson J.A., 2006. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 8(1):107-19.

Herskovits A.A., Auerbuch V., Portnoy D.A., 2007. Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PloS Pathogens* 3:e51.

Holmoy T., 2008. T cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 15, 360-366.

Horwitz D.A., Zheng S.G., Gray J.D., 2008. Natural and TGF-beta-induced Foxp3+ CD4+ CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* 29, 429-435.

Husemann J., Loike J.D., Anankov R., Febbraio M., Silverstein S.C., 2002. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia.* 40, 195-205.

Issazadeh S., Navikas V., Schaub M., Sayegh M., Khoury S., 1998. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J immunol.* 161, 1104-1112.

Join-Lambert O.F., Ezine S., Le Monnier A., Jaubert F., Okabe M., Berche P., Kayal S., 2005. *Listeria monocytogenes*-infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. *Cell Microbiol* 7: 167–180.

Jun C.D., Kim S.H., Soh C.T., Kang S.S., Chung H.T., Nitric oxide mediates the toxoplasmastatic activity of murine microglial cells in vitro. 1993. *Immunol Invest* 22:487–501.

Kampelmacher E.H., Van Noorle J.L., 1980. Listeriosis in humans and animals in the Netherlands (1958-1977). *Zentbl. Baktenol. Hyg. I Abt. Orig. A* 246:211-227.

Karunasagar I., Senghaas B., Krohne G. and Goebel W., 1994. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect. Immun.* 62:3554–3558.

Kaufmann S.H.E., 1987. Possible role of helper and cytotoxic T lymphocytes in antibacterial defence: conclusions based on a murine model of listeriosis. *Rev. Infect. Dis.* 9(5): 650-659.

Kaur C., Hao A.J., Wu C.H., Ling E.A., 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 1:2-9.

Khelef N., Lecuit M., Bierne H. and Cossart P., 2006. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* 8:457-70.

Kielian T., Mayers P., Kielian M., 2002. Characterization of microglial responses to *Staphylococcus aureus*: effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. *J Neuroimmunol.* 130, 86-99.

Kratz S. and Kurlander R.J., 1998. Characterization of the pattern of inflammatory cell influx and cytokine production during the murine host response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 141:598-606.

Kreutzberg G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-318.

Kuhn M., Goebel W., 1999. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Ryser E T, Marth E H, Dekker M. New York: 97-130.

Lanzavecchia A., 1997. Understanding the mechanisms of sustained signaling and T cell activation. *J Exp Med.* 185, 1717-1719.

Lawson L.J., Perry V.H., Gordon S., 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 48, 405-415.

Leber J.H., Crimmins G.T., Raghavan S., Meyer-Morse N.P., Cox J.S., Portnoy D.A., 2008. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathogens* 4:e6.

Leclercq A., Clemont D., Bizet C., Grimnt P.A., Le Fleche-Mateos A., Roche S.M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M., Allerberger F., 2010. *Listeria rocourtiae* sp. Nov. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 9):2210-4.

Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C., Fedor-Chaiken M., Gumbiner B. and Cossart P., 1999. A single amino acid in E cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. EMBO J. 18:3956-63.

Lecuit M., Hurme R., Pizarro-Cerdá J., Ohayon H., Geiger B. and Cossart P., 2000. A role for alpha-and betacatenins in bacterial uptake. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:10008-13.

Lecuit M., Vandormael-Pournin S., Lefort J., Huerre M., Gounon P., Dupuy C., Babinet C. and Cossart P., 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science. 292(5522):1722-5.

Lecuit M., 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. Clin Microbiol Infect; 11: 430-6.

Lehnardt S., Lachance C., Patrizi S., Lefebvre S., Follett P.L., Jensen F.E., Rosenberg P.A., Volpe J.J., Vartanian T., 2002. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. J. Neurosci. 22, 2478-2486.

Lehnardt S., 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. Glia. 5, 253-263.

Lindan M.J., Mascola L., Lou X.D., Goulet V., May S., Salminen C., 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N Engl J Med; 319: 823-8.

Linehan S.A., 2005. The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. BMC Immunol. 6, 4.

Linehan S.A., Martínez-Pomares L., Gordon S., 2000. Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol.* 479, 1-14.

Linehan S.A., Martínez-Pomares L., Stahl P.D., Gordon S., 1999. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by select macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med.* 189, 1961-1972.

Liu D, Lawrence M, Ainsworth A, Austin F., 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol;* 118: 101-15.

London A., Cohen M., Schwartz M., 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair *Front. Cell. Neurosci.*, 08 April 2013 | <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00034>

López-Fanarraga M., Carranza G., Bellido J., Kortazar D., Villegas J.C., Zabala J.C., 2007. Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *J Neurochem* 100:1680–1687.

López V., Suárez M., Chico-Calero I., Navas J., Martínez- Suárez J.V., 2006. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Rev Arg Microbiol;* 38: 224-34.

López V., Villatoro D., Ortiz S., López P., Navas J., Dávila J.C., Martínez-Suárez J.V., 2007. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Sci;* 78(1-2): 130-4.

Lorber B., 1997. *Listeriosis.* *Clin Infect Dis.* 24:1-9.

Lorber B., 2005. *Listeria monocytogenes.* Mandell G L, Bennett J E, Dolin R. *Principies and Practice of Infectious Diseases*, sexta edición. Philadelphia. Churchill Livingstone. p. 2478.

Low J.C., y Donachie W., (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, 153, 9–29.

Lübke T., Lobel P. and Sleat D. E., 2009. Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:625–635.

Mack .CL., Vanderlugt-Castaneda C.L., Neville K.L., Miller S.D., 2003. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 144, 68-79.

Mackaness G. B. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*, 1962. 116:381–406.

Mackaness G.B., 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med.* 120:105-20.

Mackaness G.B., 1968. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.* 129:873-992.

Mackaness, 1969. The effect of cytotoxic agents on the passive transfer of cell-mediated immunity. *JEM.*

MacLauchlin J., Low J.C., 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet Rec*; 135: 615-7.

MacMicking J., Xie Q.W., Nathan C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Ann Rev Immunol* 15:323–350.

Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R., Weaver C.T., 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 441, 231-234.

Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M., Rudensky A.Y., 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 201, 1061-1067.

Marshall J.G., Booth J.W., Stambolic V., Mak T., Balla T., Schreiber A.D., Meyer T. and Grinstein S., 2001. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol.* 153(7):1369-80.

Matyszak M.K., Perry V.H., 1998. *Bacillus Calmette-Guerin* sequestered in the brain parenchyma escapes immune recognition. *J Neuroimmunol.* 82, 73-80.

McBride H.M., Rybin V., Murphy C., Giner A., Teasdale R. and Zerial M., 1999. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell.* 98(3):377-86.

McCaffrey R.L., Fawcett P., O’Riordan M., Lee K.D., Havell E.A., Brown P.O., Portnoy D.A., 2004. A specific gene expression program triggered by grampositive bacteria in the cytosol. *Proc Nat Acad Sci U S A* 101:11386–11391.

McGeachy M.J., Bak-Jensen K.S., Chen Y., Tato C.M., Blumenschein W., McClanahan T., Cua .DJ., 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 8, 1390-1397.

McMenamin P.G., 1999. Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophage in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol.* 405, 553-562.

McMenamin P.G., Wealthall R.J., Deverall M., Cooper S.J., Griffin B., 2003. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 313, 259-269.

Medawar P.B., 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. Br J Exp Pathol. 29, 58-69.

Mengaud J., Ohayon H., Gounon P., Mege R.M. and Cossart P., 1996. Ecadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. Cell. 84:923-32.

Miki K. and Mackaness G.B., 1964. The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. J Exp Med. 120:93-103

Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., Kozlovskaya N., Agapov I., Volkmandt W. and Bereiter-Hahn J., 2004. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. Histochem Cell Biol. 121(6):429-39.

Moragas M., Martínez-Yélamos S., Murillo O., Fernández-Viladrich P., 2010. Absceso cerebral del adulto por *Listeria monocytogenes*: presentación de 6 casos y revisión de la literatura médica. Enferm Infecc Microbiol Clin, 28, pp. 87-94 <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2009.01.011> Medline

Morritt A., Mclean N., Snow M., 2002. Oral Cancer, Fever of Unknown Origin, and Listeriosis. British J Oral Maxillo Surg 40: 442-443.

Mostowy S., Cossart P., 2012. Virulence factors that modulate the cell biology of *Listeria* infection and the host response. Adv Immunol. 113: 1-32

Mostowy S., Sancho-Shimizu V., Hamon M.A., Simeone R., Brosch R., Johansen T., Cossart P., 2011. P62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. J Biol Chem 286:26987–26995.

Mostowy S., Cossart P., 2012. Virulence factors that modulate the cell biology of *Listeria* infection and the host response. Adv Immunol. 113:19-32.

Mounier J., Ryter A., Coquis-Rondon M. and Sansonetti P.J., 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 58:1048–1058.

Murray E.G., Webb R.A., Swann N.B., 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytes, caused by hitherto undescribed bacillus, *bacterium monocytogenes*. *J Path Bact.* 29:407.

Myers J.T., Tsang A.W., Swanson J.A., 2003. Localized reactive oxygen and nitrogen intermediates inhibit escape of *Listeria monocytogenes* from vacuoles in activated macrophages. *J Immunol* 171:5447–5453.

Mylonakis E., Hohmann E.L., Calderwood S.B., 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literatura. *Medicine*; 77(5):313-36.

Mylonakis E., Paliou M., Hohmann E.L., Calderwood S.B., Wing E J., 2002 Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)*; 81: 260-9.

Nadeau S., Rivest S., 2000. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci.* 20, 3456-3468.

Nakane A., Numata A., Chen. Y. and Minagawa T., 1991. Endogenous gamma interferon-independent host resistance aganist *Listeria monocytogenes* infection in CD4 T cell and asialo GM1+ cell-depleted mice. *Infect Immun.* 59(10):3439-3445.

Nieman R.E., Lorber B.. 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern: report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect Dis.* 2:207-227.

Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308, 1314-1318.

Nolla-Salas J., Almela M., Passer I., Latorre C., Salvadó M., Coll P., 2002. Spontaneous *Listeria monocytogenes* Peritonitis: A Population Based Study of 13 Cases Collected in Spain. *American J Gastroenterol*; 97(6): 1507-1511.

North R.J., 1970. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J. Exp. Med.* 132:521–534.

North R.J., 1973. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. *Cell. Immunol.* 7:166-176.

North R.J., 1975. Nature of “memory” in T-cell mediated antibacterial immunity: anammestic production of mediator T cells. *Infect. Immun.* 12(4):754760.

O’Connell R.M., Vaidya S.A., Perry A.K., Saha S.K., Dempsey P.W. and Cheng G., 2005. Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J. Immunol.* 174:1602-1607.

Oeverman A., Zurbriggen A., Vandeveld M., 2010. Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010:632513.

Okun E., Mattson M.P., Arumugam T.V., 2009. Involvement of Fc Receptors in Disorders of the Central Nervous System. *Neuromolecular Med.*

Olson J.K., Miller S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 173, 3916-3924.

Pamer E.G., 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol.* 4(10):812-23.

Paredes-Ballena M.P., Pretell-Ybañez D.M., Poma-Reyes G.G., 2011. Meningitis o meningoencefalitis. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Medicina.

Pérez-Trallero E., Zigorraga C., artieda J., Alkorta M., Marimon J.M., 2014. Two outbreaks of *Listeria monocytogenes* infection, Northern Spain. *Emerg Infect Dis*; 20(12):2155-7.

Perry V.H., 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol.* 90, 113-121.

Petito C.K., Adkins B., McCarthy M., Roberts B., Khamis I., 2003. CD4+ and CD8+ cells accumulate in the brains of acquired immunodeficiency virus encephalitis. *J Neurovirol.* 9, 36-44.

Philips J.A., Rubin E.J. and Perrimon N., 2005. Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 309:1251-1255.

Piffaretti J.C., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille J., Bannerman E., Musser J.M., Selander R.K., Rocourt J., 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(10):3818-22.

Pirie J.H., 1927. A new disease of veld rodents: Tiger River disease. *Pub S African Inst Med Res.* 3:163-86.

Pirie J.H., 1940. The genus *Listerella* Pirle. *Science.* 91(2364):383.

Pizarro-Cerdá J., Cossart P., 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124(4):715-27.

Pizarro-Cerdá J., Kühbacher A., Cossart P., 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1-18

Pokock J.M., Liddle A.C., 2001. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Prog Brain Res* 132:555–565.

Portnoy D.A., Jacks P.S. and Hinrichs D.J., 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167:1459– 1471.

Portnoy D.A., Schreiber R.D., Connelly P. and Tilney L.G., 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med.* 170(6):2141-6.

Prada-Delgado A., Carrasco-Marín E., Pena-Macarro C., Del Cerro-Vadillo E., Fresno-Escudero M., Leyva-Cobián F., Álvarez-Domínguez C., 2001. Interferongamma listericidal action is mediated by novel Rab5a functions at the phagosomal environment. *J Biol Chem* 276:19059–19065.

Prada-Delgado A., Carrasco-Marin E., Peña-Macarro C., Del Cerro-Vadillo E., Fresno-Escudero M., Leyva-Cobián F. and Álvarez-Domínguez C., 2005. Inhibition of Rab5a exchange activity is a key step for *Listeria monocytogenes* survival. *Traffic.* 6(3):252-65.

Raivich G., Banati R., 2004. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Rev.* 46, 261-281.

Raivich G., Jones L.L., Kloss C.U., Werner A., Neumann H., Kreutzberg G.W., 1998. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci.* 18, 5804-5816.

Ramaswamy V., Cresence V .M., Rejitha J.S., Lekshmi M.U., Dharsana K.S., Prasad S.P., 2007. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect*; 40: 4-13.

Ransohoff R.M., Perry V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 27, 119-145.

Ransohoff R.M., Kivisakk P., Kidd G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 3, 569-581.

Reinhardt R.L., Kang S.J., Liang H.E., Locksley R.M., 2006. T helper cell effector fates—who, how and where? *Curr Opin Immunol.* 18, 271-277.

Reis O., Sousa S., Camejo A., Villiers V., Gouin E., Cossart P., 2010. LapB, a Novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. *J Infect Dis.* 202: 551-62

Remuzgo-Martinez S., Pilares-Ortega L., Icardo J.M., Valdizan E.M., Vargas V.I., Pazos A., Ramos-Vivas J., 2013. Microglial activation and expression of immune-related genes in a rat ex vivo nervous system model after infection with *Listeria monocytogenes*. *Glia* 61:611–622.

Rezai-Zadeh K., Gate D., Town T., 2009. CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol.* 4, 462-475.

Ribes S., Ebert S., Regen T., Agarwal A., Tauber S.C., Czesnik D., Spreer A., Bunkowski S., Hanisch U.W., Hammerschmidt S., Nau R., 2010. Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun* 78: 865–871.

Ribes S., Regen T., Meister T., Tauber S.C., Schutze S., Mildner A., Mack M., Hanisch U.K., Nau R., 2013. Resistance of the brain to *Escherichia coli* K1 infection depends on MyD88 signaling and the contribution of neutrophils and onocytes. *Infect Immun*; 81(5):1810-9.

Robbins J.R., Barth A.I., Marquis H., de Hostos E.L., Nelson W.J. and Theriot J.A., 1999. *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* 146:1333–1350.

Roberts A.J., y Wiedemann M., 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 904–918.

Rocourt J., 1996. Taxonomy of the *Listeria* genus and typing of *L. monocytogenes*. *Pathol Biol (París)*. 44-(9):749-56.

Rocourt J., Alonso J.M., Seeliger H.P.R., 1983. Virulence comparee des cinq groupes genomiques de *Listeria monocytogenes*. *Ann Microbiol.* 134<sup>a</sup>:359-364.

Rocourt J., Bille J., 1997. Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.*, 50, 67–73.

Rocourt J., Seeliger H.P.R., 1985. Distribution des especes du genre *Listeria*. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A.* 259:317-330.

Rodríguez-Del Rio E., Frande-Cabanes E., Tobes R., Pareja E., Lecea-Cuello M.J., Ruiz-Sáez M., Carrasco-Marín E., Álvarez-Domínguez C., 2011. The intact structural form of LLO in endosomes cannot protect against listeriosis. *Int J Biochem Mol Biol* 2:207–218.

Rodríguez-Del Rio E., Marradi M., Calderón-González R., Frande-Cabanes E., Penadés S., Petrovsky N., Álvarez-Domínguez C., 2015. A gold glyco-nanoparticle carrying a Listeriolysin O peptide and formulated with Advax<sup>tm</sup> delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. *Vaccine* 33(12):1465-73.

Rogers H.W. and Unanue E.R., 1993. Neutrophils are involved in acute, non specific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect. Immun.* 61(12):5090-5096.

Rogers H.W., Callery M.P., Deck B. and Unanue E.R., 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* 156:679-684.

Rothe J., Lesslauer W., Lötscher H., Lang Y., Koebel P., Köntgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., and Bluethmann H., 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 364:798–802.

Rutkowski M.D., Lambert F., Raghavendra V., DeLeo J.A., 2004. Presence of spinal B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) co-stimulatory molecules following peripheral nerve injury: role of nondestructive immunity in neuropathic pain. *J Neuroimmunol*. 146, 94-98.

Sallen B.A., Rajoharison S., Desverenne S., Quinn F., Mabilat C., 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol*. 46:669-674.

Sánchez-Artola B., Palencia-Herrejón E., 2010. Infecciones por *Listeria*. *Medicine*

Sánchez F., y Martín P., 2011. Avizores del Sistema Inmune, Guardianes del Organismo. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Dpto. Biología Vascular e Inflamación. ¡ Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.

Santambrogio L., Belyanskaya S.L., Fischer F.R., Cipriani B., Brosnan C.F., Ricciardi-Castagnoli P., Stern L.J., Strominger J.L., Riese R., 2001. Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 6295-6300.

Santambrogio L., Strominger J.L., 2006. The ins and outs of MHC class II proteins in dendritic cells. *Immunity*. 25, 857-859.

Sasaki T., Mieno M., Udono H., Yamaguchi K., Usui T., Hra K. and Nakayama E., 1990. Roles of CD4 and CD8 cells and the effect of administration of recombinant murine interferon gamma in listerial infection. *J. Exp. Med*. 171:1141-1154.

Sashinami H., Hu D.L., Li S.J., Mitsui T., Hakamada K., Ishiguro Y., Fukuda S. and Nakane A., 2010. Virulence factor p60 of *Listeria monocytogenes* modulates innate immunity by inducing tumor necrosis factor alpha. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 59(1):100-7.

Scheffel J., Regen T., Van Rossum D., Seifert S., Ribes S., Nau R., Parsa R., Harris R.A., Boddeke H.W.G.M., Chuang H.H., Pukrop T., Wessels J.T., Jurgens T., Merkler D., Bruck W., Schnaars M., Simmons M., Kettenmann H., Hanisch U.K., 2012. Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia* 60:1930–1943.

Schlech W.F, Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Alien A.C., Haldane E.V., Wort A.J, 1983. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. *N Engl J Med*; 308: 203-6.

Schlüter D., Back C., Reiter S., Meyer T., Hof H., Deckert-Schluter M., 1999. Immune reactions to *Listeria monocytogenes* in the brain. *Immunobiology* 201:188–195.

Schlüter D., Domann E., Buck C., Hain T., Hof H., Chakraborty T., Deckert- Schlüter M., 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. *Infect Immun* 66:5930–5938.

Schramm M., Herz J., Haas A., Kronke M., Utermöhlen O., 2008. Acid sphingomyelinase is required for efficient phago-lysosomal fusion. *Cell Microbiol* 10: 1839–1853.

Sechi A.S., Wehland J. and Small J.V., 1997. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J. Cell Biol.* 137:155–167.

Shen Y., Naujokas M., Park M. and Ireton K., 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell.* 103:501-10.

Shiloh M.U., MacMicking J.D., Nicholson S., Brause J.E., Potter S., Marino M., Fang F., Dinauer M. and Nathan C., 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity*. 10(1):29-38.

Simpson J.C., Griffiths G., Wessling-Resnick M., Fransen J.A., Bennett .H, Jones A.T., 2004. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*. 117(Pt 26):6297-311.

Smith G.A., Marquis H., Jones S., Johnston N.C., Portnoy D.A. and Goldfine H., 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun*. 63:4231-7.

Sonje M.B., Abram M., Stenzel W., Deckert M., 2010. *Listeria monocytogenes* (delta-actA mutant) infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient neonatal mice. *Microb Pathog* 49:186–195.

Southwick F.S., Purich D.L., 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. *N Engl J Med*; 334: 770-6.

Steinman L., 2004. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol*. 5, 575-581.

Stevenson P.G., Hawke S., Sloan D. J., Bangham C.R., 1997. The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site. *J Virol*. 71, 145-151.

Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., Gluck S.L., Heuser J. and Russell D.G., 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 263(5147):678-81.

Su X., Lodhi I.J., Saltiel A.R. and Stahl P.D., 2006. Insulin-stimulated Interaction between insulin receptor substrate 1 and p85alpha and activation of protein kinase B/Akt require Rab5 J Biol Chem. 281(38):27982-90.

Sun J., Deghmane A.E., Sonalhiné H., Hong T., Bucci C., Solodkin A. and Hmama Z., 2007. Mycobacterium bovis BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation. J. Leukoc. Biol. 82:1437-1445.

Swaminathan B., 2001. *Listeria monocytogenes*. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Second Edition, Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J., eds. ASM Press, Washington, DC, EE.UU., 383– 409.

Swaminathan B., Gerner-Smidt P., 2007. Epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect; 9: 1236-43

Takatori H., Kanno Y., Chen Z., O’Shea J.J., 2008. New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. Mod Rheumatol. 18, 533-541.

Theriot J.A., Mitchison T.J., Tilney L.G. and Portnoy D.A., 1992. The rate of actinbased motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. Nature. 357:257–260.

Theriot J.A., 1995. The cell biology of infection by intracellular pathogens. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11:213–239.

Tilney L.G. and Tilney M.S., 1993. The wily ways of a parasite, induction of actin assembly by *Listeria*. Trends Microbiol. 1:25–31.

Travier L., Lecuit M., 2013. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a “classic” viulence factor. Curr Opin Microbiol; 17:53-60.

Unanue E.R., 1997. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* 9:3543.

Unanue E.R., 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol. Rev.* 158:11-25.

Utermöhlen O., Karow U., Löhler J., Krönke M., 2003. *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity. Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase. *J Immunol* 170:2621–2628.

Valencia-Ortega M.E., Enriquez-Crego A., Laguna-Cuesta F., Ortega-Millán G., González-Lahoz J.M., 2000. Listeriosis: una infección poco frecuente en pacientes con VIH. *An Med Interna* vol.17 no.12.

Vander T.M.M., Hallevy C., Golzman G., Herishanu Y., 2002. *Listeria monocytogenes* Meningitis in a Patient with Chronic Hepatitis C Infection, Treated by Interferon Alfa and Ribavirin, Case Reports. *British Infect Soc* 10: 70.

Vázquez-Boland J., Domínguez-Bernal G., González-Zorn B., Kreft J Goebel W., 2001a. Pathogenicity Islands and Virulence Evolution in *Listeria*. *Microb Infect*; 3: 571-584.

Vázquez-Boland J., Domínguez L., Blanco M., Rocourt J., Fernández-Garayzábal J.F., Gutiérrez C.B., Tascón R., IRodríguez-Ferri E.F., 1992a. Epidemiologic Investigation of a Silage-associated Epizootic of Ovine Listeric Encephalitis, Using a New *Listeria*-selective Enumeration Medium and Phage Typing. *American Journal of Veterinary Research*; 53: 368-371.

Vázquez-Boland J., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J., 2001b. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev*; 14(3): 584-640.

Veiga E., Guttman J.A., Bonazzi M., Boucrot E., Toledo-Arana A., Lin A.E., Enninga J., Pizarro-Cerdá J., Finlay B.B., Kirchhausen T., Cossart P., 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2(5):340-51.

Vera A., González G., Domínguez M., Bello H., 2013. Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. 30(4):407-16.

Via L.E., Deretic D., Ulmer R.J., Hibler N.S., Huber L.A. and Deretic V., 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 272(20):13326-31.

Vieira O.V., Bucci C., Harrison R.E., Trimble W.S., Lanzetti L., Gruenberg J., Schreiber A.D., Stahl P.D. and Grinstein S., 2003. Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* 23(7):2501-14.

Virna S., Deckert M., Lütjen S., Soltek S., Foulds K.E., Shen H., Körner H., Sedgwick J.D., Schlüter D., 2006. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis. *J Immunol* 177:3972–3982.

Watkins J., Sleath K.P., 1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J Appl Bacteriol.* 50:1-9.

Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M., 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 24, 677-688.

Welshimer H.J., Donker-Voet J., 1971. *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol.* 21:516-519.

Williams K., Álvarez X., Lackner A.A., 2001. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia.* 36, 156-164.

Wuenscher M.D., Kohler S., Bubert A., Gerike U. and Goebel W., 1993. The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability and its gene products p60 has bacteriolytic activity. J Bacteriol. 175:3491-3501.

Yamayoshi S., Yamashita Y., Li K., Hanagata N., Minowa T., Takemura T. and Koike S., 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. Nature. 15:798-801.

Yin F., Banerjee R., Thomas B., Zhou P., Qian L., Jia T., Ma X., Ma Y., Iadecola C., Beal M.F., Nathan C., Ding A., 2009. Exaggerated inflammation, impaired host defence, and neuropathology in progranulin-deficient mice. J Exp Med 207:117–128.

Zenewicz L. and Shen H., 2007. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. Microbes Infect. 9:1208-1215.



## **VIII. ANEXOS**



## **Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral**



## Original Article

# The intact structural form of LLO in endosomes cannot protect against listeriosis

Estela Rodríguez-Del Río<sup>1,\*</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1,\*</sup>, Raquel Tobes<sup>2</sup>, Eduardo Pareja<sup>2</sup>, M. Jesús Lecea-Cuello<sup>1</sup>, Marta Ruiz-Sáez<sup>1</sup>, Eugenio Carrasco-Marín<sup>1</sup>, Carmen Alvarez-Dominguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Genómica, Proteómica de Infecciones Bacterianas e Inflamación. Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV and Hospital Santa Cruz de Liencres (HUMV). Santander. Cantabria. Spain. <sup>2</sup>Bioinformatics Unit, Era7 Information Technologies SL, BIC Granada CEEI, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud-Armilla. 18100-Granada, Spain. \*Authors contributed equally to this study.

Received April 25, 2011; accepted July 12, 2011; Epub July 15, 2011; Published August 30, 2011

**Abstract:** LLO is the major immuno-dominant antigen in listeriosis and is also required for protective immunity. Two forms of LLO can be observed in endosomal membranes, a LLO intact form and a Ctsd-processed LLO<sub>1-491</sub> form. Endosomes obtained from resting macrophages contained only LLO intact forms, while endosomes obtained from IFN-activated macrophages contained both forms. Both types of endosomes elicited LLO<sub>90-91</sub>/CD8<sup>+</sup> and LLO<sub>189-201</sub>/CD4<sup>+</sup> specific immune responses. However, only endosomes containing the Ctsd-processed LLO<sub>1-491</sub> form showed significant CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses similar to LM infected bone marrow derived macrophages and characteristic of protective *Listeria* immunity. Moreover, endosomes with intact LLO could not confer protection as vaccine carriers against murine listeriosis. While endosomes with Ctsd-processed LLO<sub>1-491</sub> form showed a moderate ability, slightly lower than high efficiency vaccine vectors as MØ infected with LM. These studies argue that all cell-free membrane vesicles might serve as valid vaccine carriers against infectious agents. Exclusively those cell-free vesicles MIIC competent for LLO processing are protective vaccine vectors since they recruit significant numbers of mature dendritic cells to the vaccination sites and contain a LLO<sub>1-491</sub> form that might be accessible for MHC class I and class II antigen presentation.

**Keywords:** LLO structural forms, listeriosis, endosomes, vaccines

## Introduction

*Listeria monocytogenes* (LM) elicits a potent and multifactor innate and adaptive immune response that makes this pathogen an attractive vector for vaccine designs [1]. LM immune response and protection ability depends on the main virulence factor listeriolysin O (LLO) that triggers a Th1 based immune response. In this regard, LLO is the major immunodominant antigen able to elicit both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells restricted immune responses [2]. High dose inoculation of mice with LLO-deficient bacterial mutants might prime CD8<sup>+</sup> T cells and protect against listeriosis, while wild type LM need only low doses to confer protection [3]. Safety concerns are critical when considering LM vaccines as a clinical alternative, even when using bacterial mutants with attenuated virulence. First, listeriosis is a serious and potentially fatal dis-

ease, especially in immunocompromised fellows. Second, the potential cytotoxicity of LLO decreases the chances to be used as a direct DNA-vaccine or protein-vaccine. However, efficiency of LM vectors in treating neoplastic diseases or other infectious diseases in which a Th1-based immune response is required, suggest that new *Listeria*-based vaccines should be prepared [4].

Cellular based vaccines such as dendritic cells (DC) or macrophages (MØ) have showed good vaccination efficiencies against infectious agents [5, 6]. Moreover, MØ seem to co-operate with DC and transfer them processed antigens, a mechanism known as cross-presentation [7, 8]. However, for ethical reasons the use of cell lines in immunization protocols in humans is not feasible either. Therefore, cell-free membrane vesicles are a good alternative as vaccine

# Phagosomes Induced by Cytokines Function as anti-*Listeria* Vaccines

## NOVEL ROLE FOR FUNCTIONAL COMPARTMENTALIZATION OF STAT-1 PROTEIN AND CATHEPSIN-D<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, February 1, 2012 Published, JBC Papers in Press, February 15, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.348615

Eugenio Carrasco-Marín<sup>‡</sup>, Estela Rodriguez-Del Rio<sup>‡</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>‡</sup>, Raquel Tobes<sup>§</sup>, Eduardo Pareja<sup>§</sup>, M. Jesús Lecea-Cuello<sup>‡</sup>, Marta Ruiz-Sáez<sup>‡</sup>, Fidel Madrazo-Toca<sup>‡</sup>, Christoph Hölscher<sup>¶</sup>, and Carmen Alvarez-Dominguez<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Grupo de Genómica, Proteómica de Infecciones Bacterianas e Inflamación, Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV and Hospital Santa Cruz de Liencres, 39120-Santander, Cantabria, Spain, the <sup>§</sup>Bioinformatics Unit, Era7 Information Technologies SL, BIC Granada CEEI, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud-Armilla, 18100-Granada, Spain, and the <sup>¶</sup>Research Center Borstel, University of Lubeck, D-23845 Borstel, Germany

**Background:** The effectiveness of phagosomes as vaccines is unknown.

**Results:** Listericidal phagosomes contain a compartmentalized signaling pathway and a nontoxic listeriolysin form bound to immune molecules. As vaccines they activate effector T cells and recruit immune cells.

**Conclusion:** Protection with listericidal phagosomes requires recruitment of dendritic cells and T cell regulation.

**Significance:** Phagosomes are effective immunotherapies and are a new generation of vaccine tools.

Phagosomes are critical compartments for innate immunity. However, their role in the protection against murine listeriosis has not been examined. We describe here that listericidal phago-receptosomes are induced by the function of IFN- $\gamma$  or IL-6 as centralized compartments for innate and adaptive immunity because they are able to confer protection against murine listeriosis. These phago-receptosomes elicited LLO(91–99)/CD8<sup>+</sup> and LLO(189–201)/CD4<sup>+</sup>-specific immune responses and recruited mature dendritic cells to the vaccination sites controlled by T cells. Moreover, they present exceptional features as efficient vaccine vectors. First, they compartmentalize a novel listericidal STAT-1-mediated signaling pathway that confines multiple innate immune components to the same environment. Second, they show features of MHC class II antigen-loading competent compartments for cathepsin-D-mediated LLO processing. Third, murine cathepsin-D deficiencies fail to develop protective immunity after vaccination with listericidal phago-receptosomes induced by IFN- $\gamma$  or IL-6. Therefore, it appears that the connection of STAT-1 and cathepsin-D in a single compartment is relevant for protection against listeriosis.

Macrophages (M $\phi$ )<sup>2</sup> are critical cells for the innate and adaptive immune responses against *Listeria monocytogenes* (1–3). The phagosomal compartments in M $\phi$  regulate all of these immune processes by undergoing a profound transformation to mediate efficient listericidal functions, high levels of oxidative burst and lysosomal proteases, and increased antigen processing capacity (4–6). Several pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6 enhance the microbicidal mechanisms of M $\phi$ s and restrict the intracellular growth of *L. monocytogenes* (7). It is unclear whether the microbicidal signaling of these cytokines is connected with phagosomal trafficking or with protection against infections. Two main listericidal mechanisms the oxidative and nonoxidative pathways operate within the phagosomal compartments. However, degradation of *L. monocytogenes* requires the action of nonoxidative mechanisms (8–11) that are mediated by lysosomal proteins as cathepsin-D (CTSD). In this regard, CTSD participates in innate immunity and inactivates the main phagosomal *L. monocytogenes* cytolysin, listeriolysin O (LLO) (12–14). CTSD-mediated degradation of the immunodominant antigen LLO occurs through a unique cleavage site between <sup>491</sup>WW<sup>492</sup> residues. This site also contains the phagosomal binding domain (15). Therefore, a connection might exist between listericidal components and *L. monocytogenes* immunity within the phagosomes. Here, we examine the hypothesis that a common listericidal route induced by pro-inflammatory cytokines may be compartmentalized in unique vesicles connecting STAT-mediated signaling, trafficking regulators, listericidal lysosomal enzymes such as CTSD, and immune phagosomal functions.

\* This work was supported in part by Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias Grants 00/3073, PI01/3128, PI03-1009, PI07-0289, and PI10-0660, Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV Grant API2011/PI10-0660 (to E. C.-M.), Spanish Ministerio de Ciencia, Investigación e Innovación Grants BIO2002-0628, SAF2006-08968, and SAF2009-08695, Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant PI04-0324, and Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV Grant API2010/03/SAF2009-08695 (to C. A.-D.).

C. A.-D. dedicates this study to P. Stahl (Washington University, St. Louis) for introducing our group to the phagosomes field and to P. Saftig (Biochemisches Institute Albrechts-Ludwig-Universität of Kiel, Germany) for advising us with lysosomal proteins and providing personal encouragement and generously providing mice.

[5] This article contains supplemental Figs. S1–S6, Tables S1–S4, and “Experimental Procedures.”

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-942-203584; Fax: 34-942-203847; E-mail: calvarez@humv.es.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: M $\phi$ , macrophage; Ctsd, cathepsin-D; DC, dendritic cell; LLO, listeriolysin O; MIIC, MHC-class II antigen loading compartment; NV, nonvaccinated; PEC, peritoneal exudate cell; BM-DM, bone marrow-derived macrophage; NI, noninfected sample; NT, nontreated; FC, fold change.

# Dissociation of Innate Immune Responses in Microglia Infected with *Listeria monocytogenes*

Elisabet Frande-Cabanes,<sup>1</sup> Lorena Fernandez-Prieto,<sup>1,2</sup> Ricardo Calderon-Gonzalez,<sup>1,2</sup> Estela Rodríguez-Del Río,<sup>1</sup> Sonsoles Yañez-Díaz,<sup>1,3</sup> Monica López-Fanarraga,<sup>2</sup> and Carmen Alvarez-Domínguez<sup>1</sup>

Microglia, the innate immune cells of the brain, plays a central role in cerebral listeriosis. Here, we present evidence that microglia control *Listeria* infection differently than macrophages. Infection of primary microglial cultures and murine cell lines with *Listeria* resulted in a dual function of the two gene expression programmes involved in early and late immune responses in macrophages. Whereas the bacterial gene *hly* seems responsible for both transcriptional programmes in macrophages, *Listeria* induces in microglia only the tumor necrosis factor (TNF)-regulated transcriptional programme. *Listeria* also represses in microglia the late immune response gathered in two clusters, microbial degradation, and interferon (IFN)-inducible genes. The bacterial gene *actA* was required in microglia to induce TNF-regulated responses and to repress the late response. Isolation of microglial phagosomes revealed a phagosomal environment unable to destroy *Listeria*. Microglial phagosomes were also defective in several signaling and trafficking components reported as relevant for *Listeria* innate immune responses. This transcriptional strategy in microglia induced high levels of TNF- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 and low production of other neurotoxic compounds such as nitric oxide, hydrogen peroxide, and Type I IFNs. These cytokines and toxic microglial products are also released by primary microglia, and this cytokine and chemokine cocktail display a low potential to trigger neuronal apoptosis. This overall bacterial strategy strongly suggests that microglia limit *Listeria* inflammation pattern exclusively through TNF-mediated responses to preserve brain integrity.

GLIA 2014;62:233–246

**Key words:** listeriosis, microglia, neuronal cell death, cytokines, macrophages

## Introduction

*Listeria monocytogenes* (LM) is a bacterial pathogen with tropism for human nervous tissue. Listeriosis can be a life-threatening disease causing severe meningitis, encephalitis, and brain abscess in pregnant women, neonates, elderly, and immunocompromised individuals. Some murine models have shown that invasion of the central nervous system (CNS) by LM is facilitated by infected bone-marrow-derived monocytes that adhere to activated brain endothelial cells and accumulate

in brain vessels to invade the brain parenchyma (Join-Lambert et al., 2005; Oeverman et al., 2010).

Several cell types have been identified as potential targets of LM in the brain, for example, epithelial cells from choroid plexus, ependymal cells, macrophages, microglia, and neurons (Schlüter et al., 1999). Acute cerebral listeriosis is accompanied by hippocampal neuronal apoptosis (Schlüter et al., 1998). It is known that virulence factors participating in nonlethal infection models also contribute to fatal CNS infection

View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/glia.22602

Published online December 6, 2013 in Wiley Online Library ([wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)). Received Feb 10, 2013, Accepted for publication Nov 5, 2013.

Address correspondence to Carmen Alvarez-Dominguez, Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Spain. E-mail: [calvarez@humv.es](mailto:calvarez@humv.es)

From the <sup>1</sup>Grupo de Genómica, Proteómica y vacunas, Instituto de Investigación y Formación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Primera Planta-Laboratorio 124, Avda. de Cardenal Herrera Oria, s/n, 39011, Santander, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria-IFIMAV, 39008, Santander, Spain; <sup>3</sup>Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, 39008, Santander, Spain.

Elisabet Frande-Cabanes and Lorena Fernandez-Prieto contributed equally to this work.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

© 2013 The Authors Glia Published by Wiley Periodicals, Inc.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes



# Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH

Ricardo Calderón-González<sup>1,2†</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1†</sup>, Lucía Bronchalo-Vicente<sup>1,3</sup>, M. Jesús Lecea-Cuello<sup>4</sup>, Eduardo Pareja<sup>5</sup>, Alexandre Bosch-Martínez<sup>1</sup>, Mónica L. Fanarraga<sup>2</sup>, Sonsoles Yañez-Díaz<sup>1,3</sup>, Eugenio Carrasco-Marín<sup>4‡</sup> and Carmen Álvarez-Domínguez<sup>1\*‡</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Primera Planta-Laboratorio 124, Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

<sup>3</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

<sup>4</sup> Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

<sup>5</sup> Information Technologies Research Group, Era7 Bioinformatics, Granada, Spain

## Edited by:

Stephanie M. Seveau, The Ohio State University, USA

## Reviewed by:

William Picking, Oklahoma State University, USA

Jean-Pierre Gorvel, Centre National de la Recherche Scientifique, France

## \*Correspondence:

Carmen Álvarez-Domínguez, Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Spain  
e-mail: calvarez@humv.es

<sup>†</sup> Authors participated equally in this study.

<sup>‡</sup> Directors participated equally in this study.

The use of live *Listeria*-based vaccines carries serious difficulties when administered to immunocompromised individuals. However, cellular carriers have the advantage of inducing multivalent innate immunity as well as cell-mediated immune responses, constituting novel and secure vaccine strategies in listeriosis. Here, we compare the protective efficacy of dendritic cells (DCs) and macrophages and their safety. We examined the immune response of these vaccine vectors using two *Listeria* antigens, listeriolysin O (LLO) and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH), and several epitopes such as the LLO peptides, LLO<sub>189–201</sub> and LLO<sub>91–99</sub> and the GAPDH peptide, GAPDH<sub>1–22</sub>. We discarded macrophages as safe vaccine vectors because they show anti-*Listeria* protection but also high cytotoxicity. DCs loaded with GAPDH<sub>1–22</sub> peptide conferred higher protection and security against listeriosis than the widely explored LLO<sub>91–99</sub> peptide. Anti-*Listeria* protection was related to the changes in DC maturation caused by these epitopes, with high production of interleukin-12 as well as significant levels of other Th1 cytokines such as monocyte chemoattractant protein-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ , and with the induction of GAPDH<sub>1–22</sub>-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> immune responses. This is believed to be the first study to explore the use of a novel GAPDH antigen as a potential DC-based vaccine candidate for listeriosis, whose efficiency appears to highlight the relevance of vaccine designs containing multiple CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> epitopes.

**Keywords:** dendritic vaccines, *Listeria monocytogenes*, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase

## INTRODUCTION

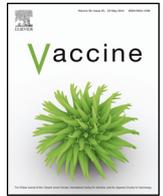
*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive pathogenic bacterium that is widely used as a vector for vaccines against other pathogens or in cancer therapy. However, because it is a human pathogen, it may cause life-threatening infections such as severe meningitis, encephalitis, and brain abscess in pregnant women, neonates, elderly people, and immunocompromised individuals. Vaccination is one of the most successful strategies to treat infectious diseases. However, in the case of listeriosis, there is no vaccine available for high-risk groups such as infants, pregnant women, or individuals with immunological impairment.

Current studies of prophylactic vaccines against *L. monocytogenes* focus on three strategies: (i) the creation of live attenuated pathogens able to access the cytosol and stimulate T cells, including the vaccine vectors with metabolically active but non-viable bacteria; (ii) the use of safe vectors with adjuvant properties able to induce strong immune responses; and (iii) the use of subunit vaccines containing bacterial antigens that might stimulate specific immune responses (Sashinami et al., 2003; Starks et al., 2004; Bruhn et al., 2007; Mohamed et al., 2012; Quispe-Tintaya

et al., 2013). There is not a single ideal vector that might be considered safe for human trials, and the use of live vaccines in individuals with any type of immunosuppression poses severe difficulties. Safer vaccines such as subunit vaccines present the disadvantage of requiring strong adjuvants to potentiate their immune responses and these adjuvants might induce undesirable side effects in tissues.

Dendritic cells (DCs) show promise for use as prophylactic or therapeutic vaccine vectors in human trials (Martirosyan et al., 2012; Palucka and Banchereau, 2013; Yu et al., 2013). DCs play a major role in the development of cell-mediated immunity because they link innate and adaptive immune responses. They are powerful antigen-presenting cells (APCs) and have a distinct ability to prime naïve T helper (Th) T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes (CTLs). These features of DCs are responsible for their immunostimulatory potential. In fact, they have been used as cellular vaccines or adjuvants in immunotherapy against cancer or infections, such as listeriosis or AIDS (Pion et al., 2010; Kono et al., 2012; Vacas-Cordoba et al., 2013).

Macrophages are also efficient APCs and crucial cells for the innate and adaptive immune responses against listeriosis



# A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection



Estela Rodriguez-Del Rio<sup>a</sup>, Marco Marradi<sup>b,c</sup>, Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>a</sup>,  
Elisabet Frande-Cabanes<sup>a</sup>, Soledad Penadés<sup>b,c</sup>, Nikolai Petrovsky<sup>d,e,1</sup>,  
Carmen Alvarez-Dominguez<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain

<sup>b</sup> CIC biomaGUNE, P<sup>o</sup> de Miramón 182, San Sebastian, Gipuzcoa, Spain

<sup>c</sup> CIBER-BBN, P<sup>o</sup> de Miramón 182, San Sebastian, Gipuzcoa, Spain

<sup>d</sup> Department of Diabetes and Endocrinology, Flinders University, Adelaide 5042, SA, Australia

<sup>e</sup> Vaxine Pty Ltd, Flinders Medical Centre, Adelaide 5042, SA, Australia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 November 2014

Received in revised form 12 January 2015

Accepted 25 January 2015

Available online 7 February 2015

### Keywords:

Listeriosis  
Glyconanoparticles  
Dendritic cells  
Vaccines  
Advax

## ABSTRACT

In the search for an effective vaccine against the human pathogen, *Listeria monocytogenes* (*Listeria*), gold glyconanoparticles (GNP) loaded with a listeriolysin O peptide LLO<sub>91–99</sub> (GNP-LLO) were used to immunise mice, initially using a dendritic cell (DC) vaccine approach, but subsequently using a standard parenteral immunisation approach. To enhance vaccine immunogenicity a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin (Advax™) was also co-formulated with the GNP vaccine. Confirming previous results, DC loaded *in vitro* with GNP-LLO provided better protection against listeriosis than DC loaded *in vitro* using free LLO peptide. The immunogenicity of GNP-LLO loaded DC vaccines was further increased by addition of Advax™ adjuvant. However, as DC vaccines are expensive and impracticable for prophylactic use, we next asked whether the same GNP-LLO antigen could be used to directly target DC *in vivo*. Immunisation of mice with GNP-LLO plus Advax™ adjuvant induced LLO-specific T-cell immunity and protection against *Listeria* challenge. Protection correlated with an increased frequency of splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells and CD8α<sup>+</sup> DC, and Th1 cytokine production (IL-12, IFN-γ, TNF-α, and MCP-1), post-challenge. Enhanced T-cell epitope recruitment post-challenge was seen in the groups that received Advax™ adjuvant. Immunisation with GNP-LLO<sub>91–99</sub> plus Advax™ adjuvant provided equally robust *Listeria* protection as the best DC vaccine strategy but without the complexity and cost, making this a highly promising strategy for development of a prophylactic vaccine against listeriosis.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Candidate prophylactic vaccines against *Listeria monocytogenes* (*Listeria*) include live attenuated pathogens [1–4], live vector-based

approaches [5–7] and subunit vaccines [8,9]. However, the use of live vaccines in at-risk immunocompromised individuals including pregnant women poses major safety risks, making a non-living subunit vaccine a more preferable approach. Unfortunately, subunit vaccines by themselves are generally ineffective due to overall poor immunogenicity and inability, in particular, to generate the T-cell immunity required for protection against intracellular organisms such as *Listeria*.

Dendritic cell (DC) vaccines are produced by isolation of DC from a subject, *in vitro* loading of the DC with the relevant vaccine antigen, and then intravenous or subcutaneous injection of the live DC back into the subject. Based on their improved ability to induce T-cell immunity, DC vaccines have been proposed as solutions for induction of T-cell protection against intracellular infections, such as HIV [10]. Our group previously reported a DC vaccine loaded with a peptide from the *Listeria* protein, glyceraldehyde 3-phosphate

**Abbreviations:** APC, antigen-presenting cells; CFU, colony forming units; Ctsd, cathepsin-D; DC, dendritic cells; GNP, gold glyconanoparticles; *i.p.*, intra-peritoneal; *i.v.*, intra-venous; LLO, listeriolysin O; MHC, major histocompatibility complex; MIIC, MHC-class II antigen loading compartments; MØ, macrophages; LM, *Listeria monocytogenes*.

\* Corresponding author at: Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Laboratorio 124. Edificio IFIMAV, Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Cantabria, Spain.

Tel.: +34 942315515x74104; fax: +34 942 315517.

E-mail address: [calvarez@humv.es](mailto:calvarez@humv.es) (C. Alvarez-Dominguez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally as senior authors of this paper.

RESEARCH ARTICLE

# A Novel Therapy for Melanoma Developed in Mice: Transformation of Melanoma into Dendritic Cells with *Listeria monocytogenes*

Lucia Bronchalo-Vicente<sup>1,2‡</sup>, Estela Rodriguez-Del Rio<sup>1‡</sup>, Javier Freire<sup>3</sup>, Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>1</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1</sup>, Jose Javier Gomez-Roman<sup>3</sup>, Hector Fernández-Llaca<sup>2</sup>, Sonsoles Yañez-Díaz<sup>1,2</sup>, Carmen Alvarez-Dominguez<sup>1\*</sup>

**1** Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, **2** Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria, Spain, **3** Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria, Spain

‡ These authors contributed equally to this work.

\* [calvarez@humv.es](mailto:calvarez@humv.es)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Bronchalo-Vicente L, Rodriguez-Del Rio E, Freire J, Calderon-Gonzalez R, Frande-Cabanes E, Gomez-Roman JJ, et al. (2015) A Novel Therapy for Melanoma Developed in Mice: Transformation of Melanoma into Dendritic Cells with *Listeria monocytogenes*. PLoS ONE 10(3): e0117923. doi:10.1371/journal.pone.0117923

**Academic Editor:** Dipshikha Chakravorty, Indian Institute of Science, INDIA

**Received:** October 27, 2014

**Accepted:** January 3, 2015

**Published:** March 11, 2015

**Copyright:** © 2015 Bronchalo-Vicente et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants SAF2009-08695 and SAF2012-34203. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

*Listeria monocytogenes* is a gram-positive bacteria and human pathogen widely used in cancer immunotherapy because of its capacity to induce a specific cytotoxic T cell response in tumours. This bacterial pathogen strongly induces innate and specific immunity with the potential to overcome tumour induced tolerance and weak immunogenicity. Here, we propose a *Listeria* based vaccination for melanoma based in its tropism for these tumour cells and its ability to transform *in vitro* and *in vivo* melanoma cells into matured and activated dendritic cells with competent microbicidal and antigen processing abilities. This *Listeria* based vaccination using low doses of the pathogen caused melanoma regression by apoptosis as well as bacterial clearance. Vaccination efficacy is LLO dependent and implies the reduction of LLO-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses, strong stimulation of innate pro-inflammatory immune cells and a prevalence of LLO-specific CD8<sup>+</sup> T cells involved in tumour regression and *Listeria* elimination. These results support the use of low doses of pathogenic *Listeria* as safe melanoma therapeutic vaccines that do not require antibiotics for bacterial removal.

## Introduction

Coley reported for the first time cancer therapies based on the use of bacteria after observation of the tumour regression in a patient after bacterial infection [1]. During the early development of bacterial-based anticancer therapies, different anaerobic bacteria were used that can proliferate in a hypoxic environment such as that of tumours. Some examples are *Clostridium novyi*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus pyogenes* or *Vibrio cholera*. The use of bacteria as anticancer agents was followed by antibiotic treatment to control the infection. However, current

## A Dendritic Cell-Targeted Vaccine Loaded with Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Peptides Proposed for Individuals at High Risk of Listeriosis

Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>1</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1</sup>, Raquel Tobes<sup>2</sup>, Eduardo Pareja<sup>2</sup>, Lidia Alaez-Alvarez<sup>1</sup> and Carmen Alvarez-Dominguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain

<sup>2</sup>Era7 Bioinformatics, Granada, Spain

\*Corresponding author: Carmen Alvarez-Dominguez, Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas. Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Laboratorio 124, Edificio IDIVAL, Avda, Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Cantabria, Spain, Tel: 34-942315515/74104; Fax: +34-942-315517; E-mail: [calvarez@humv.es](mailto:calvarez@humv.es)

Received date: 15 December 2014; Accepted date: 16 January 2015; Published date: 20 January 2015

Copyright: © 2015 Calderon-Gonzalez R, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

**Objective:** Individuals at risk of *Listeria* infection lacked vaccines to prevent the development of severe listeriosis symptoms. Here, we identify the best epitopes from *Listeria* proteins GAPDH and LLO for an optimal DC vaccine candidate to protect against individuals high susceptible to listeriosis.

**Methods:** We vaccinated high susceptible Balb/c and low susceptible C57BL/6 mice with a single dose of DC-LLO<sub>91-99</sub>, DC-LLO<sub>189-200</sub>, DC-LLO<sub>190-201</sub>, DC-LLO<sub>189-201</sub>, DC-LLO<sub>296-304</sub>, DC-GAPDH<sub>1-15</sub> or DC-GAPDH<sub>1-22</sub> vaccines. CFU in spleens, predictions of DC-peptide binding to MHC-I and MHC-II and analysis of Th1 immune responses were used to assess vaccine efficiency.

**Results:** DC-GAPDH<sub>1-22</sub> and DC-GAPDH<sub>1-15</sub> vaccines with intermediate binding epitopes to MHC-I and weak binders to MHC-II, provided maximal protection in *Listeria* susceptible and resistant mice. DC-LLO<sub>91-99</sub> vaccine with a strong binding epitope to MHC-I follows protection in both mice strains. DC-LLO<sub>296-304</sub> vaccine conferred protection only in resistant mice and DC-LLO<sub>190-201</sub>, DC-LLO<sub>189-200</sub> and DC-LLO<sub>189-201</sub> vaccines with binding epitopes to MHC-II, lacked protection properties. Maximal protection in listeriosis correlated with increased splenic CD8 $\alpha^+$  DC, enhanced IL-12 production and high frequencies of CD8 $^+$  and CD4 $^+$  producing IFN- $\gamma$  T cells in both mice strains.

**Discussion:** Maximal protection against listeriosis in susceptible and resistant mice is only achieved with DC-GAPDH<sub>1-22</sub> and DC-GAPDH<sub>1-15</sub> vaccines, able to activate simultaneously CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T cells as they include binding epitopes to both, MHC-I and MHC-II. CD8 $^+$  T cell activation seemed predominant as DC-LLO<sub>91-99</sub> and DC-LLO<sub>296-304</sub> vaccines that exclusively activate CD8 $^+$  T cells in both mice strains conferred significant listeriosis protection. In this regard, DC-LLO<sub>189-201</sub>, DC-LLO<sub>189-200</sub> or DC-LLO<sub>190-201</sub> vaccines that activated CD4 $^+$  T cells caused no protection at all. We observed that a combination of several MHC-I and at least one MHC-II binding epitopes in a single peptide provided the highest listeriosis protection.

**Conclusion:** DC-GAPDH<sub>1-22</sub> and DC-GAPDH<sub>1-15</sub> vaccines might protect against human listeriosis in high susceptible immune-compromise patients.

**Keywords:** Listeriosis; Dendritic cells; Vaccines; Listeriolysin O; Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase

### Abbreviations

CFU: Colony Forming Units; DC: Dendritic Cells; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; i.g: intragastric; i.p: intra-peritoneal; i.v: intravenous; LLO: Listeriolysin O; LM: *Listeria* monocytogenes; MHC: Major Histocompatibility Complex

### Introduction

Pregnant women, neonates and the elderly are the individuals suffering human listeriosis but also chronic autoimmune, hepatic transplanted and oncologic patients become infected. While no vaccine is available for human listeriosis, this pathogen has increased 5-fold its annual incidence in our country health institutions [1-3]

and, therefore, there is an urgency to develop a safe and wide vaccine that covers the diversity of all human groups at risk of listeriosis. The reasons for this increase in listeriosis referred to the aging of the population and to the significant increase on the half-life of oncological and transplanted patients with the new biological therapies. In this regard, the recent availability of *Listeria*-based therapies for certain tumours using attenuated strains of *Listeria* [4], also predicted the convenience to offer these patients at high risk of listeriosis with alternative immune-therapies to develop immune protection before applying the tumour therapies. Low doses of this pathogen are sufficient to cause severe listeriosis complications in pregnant women and newborns [3], but also to confer significant protection in healthy individuals [5]. However, the *Listeria*-based therapies for tumour patients used a bacterial burden 500-fold higher than the classical doses used for listeriosis vaccination, requiring longer and aggressive antibiotic treatments to eliminate the bacteria.



## Research paper

# Identification and characterisation of T-cell epitopes for incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines



Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>a</sup>, Raquel Tobes<sup>b</sup>, Eduardo Pareja<sup>b</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>a</sup>, Nikolai Petrovsky<sup>c,d</sup>, Carmen Alvarez-Dominguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain

<sup>b</sup> Information Technologies Research Group, Era7 Bioinformatics, Granada, Spain

<sup>c</sup> Department of Diabetes and Endocrinology, Flinders University, Adelaide, Australia

<sup>d</sup> Vaxine Pty Ltd, Flinders Medical Center, Adelaide, Australia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 April 2015

Received in revised form 25 May 2015

Accepted 26 May 2015

Available online 29 May 2015

## Keywords:

Listeriosis

Dendritic cells

Vaccines

Listeriolysin O

Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase

## ABSTRACT

Dendritic cells loaded with antigenic peptides, because of their safety and robust immune stimulation, would be ideal for induction of immunity to protect against listeriosis. However, there is no currently accepted method to predict which peptides derived from the *Listeria* proteome might confer protection. While elution of peptides from MHC molecules after *Listeria* infection yields high-affinity immune-dominant epitopes, these individual epitopes did not reliably confer *Listeria* protection. Instead we applied bioinformatic predictions of MHC class I and II epitopes to generate antigenic peptides that were then formulated with Advax™, a novel polysaccharide particulate adjuvant able to enhance cross-presentation prior to being screened for their ability to induce protective T-cell responses. A combination of at least four intermediate strength MHC-I binding epitopes and one weak MHC-II binding epitope when expressed in a single peptide sequence and formulated with Advax adjuvant induced a potent T-cell response and high TNF- $\alpha$  and IL-12 production by dendritic cells resulting in robust listeriosis protection in susceptible mice. This T-cell vaccine approach might be useful for the design of vaccines to protect against listeriosis or other intracellular infections.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Dendritic cells (DCs) present antigenic peptides on MHC I and class II molecules resulting in stimulation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, respectively. This ability to activate both CD4 and CD8 T cell responses is the basis for the effectiveness of DC-based vaccines in prophylaxis against infections including HIV, *Streptococcus pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* or *Mycobacterium* (Vacas-Cordoba et al., 2013; Cohen et al., 2012; Rey-Ladino et al., 2014; Kawasaki et al., 2014; Fromen et al., 2015).

Groups at risk of listeriosis include pregnant women, neonates, the elderly and immune-compromised patients. DC vaccines loaded *ex vivo* with peptides and injected back into the host, are highly effective at inducing cellular immunity and thereby could be useful for *Listeria* immunization (Wood and Paterson, 2014).

The objective of this study was to find a simple method to predict the minimum epitope requirements for a DC vaccine against human listeriosis and involved testing DC vaccines in mice susceptible or resistant to *Listeria*. C57BL/6 mice have a *Listeria* resistant allele at the *Hc* locus on chromosome 2 and show reduced susceptibility to intravenous, *i.v.*, intragastric, *i.g.* or intraperitoneal, *i.p.* challenge with *Listeria* when compared to susceptible Balb/c mice (Mainou-Fowler et al., 1988; Poulsen et al., 2011). Therefore, we used C57BL/6 mice to mimic the population at low risk of listeriosis, while Balb/c mice were used to mimic high-risk groups. Two *Listeria* antigens were selected as the focus of our study, listeriolysin O (LLO) and the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) as they have previously been shown to elicit strong CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses (Alvarez-Dominguez et al., 2008; Calderon-Gonzalez et al., 2014, 2015). This was important as human listeriosis is not well characterised and antigens other than LLO or GAPDH that induce cellular immunity have yet to be found (Angelakopoulos et al., 2002; CAD and RCG unpublished results).

Bioinformatic methods that predict T cell epitopes *via* their ability to bind MHC molecules provide a faster and less costly alternative to strategies for selection of T-cell vaccine candidates such as MHC peptide elution or assays to map T-cell epitopes using complete sets of overlapping peptides (Geginat et al., 2001; Skoberne and Geginat, 2002). This is

*Abbreviations:* DC, dendritic cell; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *i.p.*, intra-peritoneal; LLO, listeriolysin O; MHC, major histocompatibility complex.

\* Corresponding author at: Grupo de Genómica, Proteómica y Vacunas, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Laboratorio 124, Edificio IDIVAL, Avda, Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander, Cantabria, Spain.

E-mail address: [calvarez@humv.es](mailto:calvarez@humv.es) (C. Alvarez-Dominguez).

# Exceptional antineoplastic activity of a dendritic-cell-targeted vaccine loaded with a *Listeria* peptide proposed against metastatic melanoma

Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>1</sup>, Lucia Bronchalo-Vicente<sup>1,2</sup>, Javier Freire<sup>3</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1</sup>, Lidia Alaez-Alvarez<sup>1</sup>, Javier Gomez-Roman<sup>3</sup>, Sonsóles Yañez-Díaz<sup>2</sup>, Carmen Alvarez-Dominguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Group of Genomics, Proteomics and Vaccines, Marqués de Valdecilla Research Institute (IDIVAL), Santander, Spain

<sup>2</sup>Dermatology Department, Marqués de Valdecilla University Hospital (HUMV), Santander, Spain

<sup>3</sup>Pathological Anatomy Department, Marqués de Valdecilla University Hospital (HUMV), Santander, Spain

**Correspondence to:** Carmen Alvarez-Dominguez, **e-mail:** calvarez@humv.es

**Keywords:** dendritic cells, *Listeria* peptides, vaccines, melanoma, immunotherapy

**Received:** July 13, 2015

**Accepted:** February 09, 2016

**Published:** March 01, 2016

## ABSTRACT

**Vaccination with dendritic cells (DCs) is proposed to induce lasting responses against melanoma but its survival benefit in patients needs to be demonstrated. We propose a DC-targeted vaccine loaded with a *Listeria* peptide with exceptional anti-tumour activity to prevent metastasis of melanoma. Mice vaccinated with vaccines based on DCs loaded with listeriolysin O peptide (91–99) (LLO<sub>91–99</sub>) showed clear reduction of metastatic B16OVA melanoma size and adhesion, prevention of lung metastasis, enhanced survival, and reversion of immune tolerance. Robust innate and specific immune responses explained the efficiency of DC-LLO<sub>91–99</sub> vaccines against B16OVA melanoma. The notable features of this vaccine related to melanoma reduction were: expansion of immune-dominant LLO<sub>91–99</sub>-specific CD8 T cells that helped to expand melanoma-specific CD8<sup>+</sup> T cells; high numbers of tumour-infiltrating lymphocytes with a cytotoxic phenotype; and a decrease in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. This vaccine might be a useful alternative treatment for advanced melanoma, alone or in combination with other therapies.**

## INTRODUCTION

Human melanoma is a malignant tumour of melanocytes and an aggressive skin cancer that has registered a 3% increase in annual incidence in Northern Spain [1]. Melanoma is one of the most rapidly growing cancers worldwide but yet there is no satisfactory treatment except for surgery, either in the early stages or when it has advanced to metastatic disease. Pharmacological treatment with small molecule inhibitors such as vemurafenib leads to resistance and has major cutaneous effects, but fails to induce lasting responses, which has turned the focus to immunotherapy. Classical immunotherapy agents such as interleukin (IL)-2 [2] or interferon (IFN)- $\alpha$  induce durable responses but the survival benefit is low. New

immunomodulatory antibodies such as ipilimumab and nivolumab that block T-cell-negative regulators cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 and programmed death-1, respectively, cause some side effects, such as high toxicity and activation of autoreactive T cells [3]. In this context, dendritic cells (DCs) are pivotal cells of the immune system with high capacity to induce T-cell immunity, and are used as vaccines to increase host resistance to melanoma [4, 5]. However, the lack of immunodominant melanoma antigens triggering potent cytotoxic T-cell responses, induction of immunosuppressor T cells known as regulatory T (Treg) cells in melanoma patients, and a limited beneficial effect on survival, has dampened widespread use of DC-based vaccines as melanoma immunotherapy [6, 7].



Article

# Pregnancy Vaccination with Gold Glyco-Nanoparticles Carrying *Listeria monocytogenes* Peptides Protects against Listeriosis and Brain- and Cutaneous-Associated Morbidities

Ricardo Calderón-Gonzalez <sup>1,†</sup>, Héctor Terán-Navarro <sup>1,†</sup>, Elisabet Frande-Cabanes <sup>1</sup>,  
Eva Ferrández-Fernández <sup>1</sup>, Javier Freire <sup>2</sup>, Soledad Penadés <sup>3,4</sup>, Marco Marradi <sup>3,4,5</sup>,  
Isabel García <sup>3,4</sup>, Javier Gomez-Román <sup>2</sup>, Sonsoles Yañez-Díaz <sup>5</sup>  
and Carmen Álvarez-Domínguez <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Grupo de Nanovacunas y Vaculas Celulares Basadas en Listeria y Sus Aplicaciones en Biomedicina, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla, Avda. Cardenal Herrera Oria S/N, 39011 Santander, Cantabria, Spain; ricardocalderongonzalez@hotmail.com (R.C.-G.); hteran35@hotmail.com (H.T.-N.); desli87@hotmail.com (E.F.-C.); ferrandez.eva@gmail.com (E.F.-F.)
  - <sup>2</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Avda. Valdecilla 25, 39008 Santander, Cantabria, Spain; javifreiresalinas@gmail.com (J.F.); apagrj@humv.es (J.G.-R.)
  - <sup>3</sup> CIC-biomaGUNE. P de Miramon, 20009 San Sebastian, Gipuzkoa, Spain; spenades@cicbiomagune.es (S.P.); marcomarradi76@gmail.com (M.M.); igarcia.ciber-bbn@cicbiomagune.es (I.G.)
  - <sup>4</sup> Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Nanomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), P de Miramon 182, 20009 San Sebastian, Gipuzkoa, Spain
  - <sup>5</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Avda. Valdecilla 25, 39008 Santander, Cantabria, Spain; syanez@humv.es
- \* Correspondence: calvarez@humv.es; Tel.: +34-9423-15515 (ext. 74104)  
† These authors contributed equally in this study.

Academic Editor: Thomas Nann

Received: 16 July 2016; Accepted: 12 August 2016; Published: 19 August 2016

**Abstract:** Listeriosis is a fatal infection for fetuses and newborns with two clinical main morbidities in the neonatal period, meningitis and diffused cutaneous lesions. In this study, we vaccinated pregnant females with two gold glyconanoparticles (GNP) loaded with two peptides, listeriolysin peptide 91–99 (LLO<sub>91–99</sub>) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1–22 peptide (GAPDH<sub>1–22</sub>). Neonates born to vaccinated mothers were free of bacteria and healthy, while non-vaccinated mice presented clear brain affections and cutaneous diminishment of melanocytes. Therefore, these nanoparticle vaccines are effective measures to offer pregnant mothers at high risk of listeriosis interesting therapies that cross the placenta.

**Keywords:** glyconanoparticles; listeria peptides; vaccines; melanocytes

## 1. Introduction

Human listeriosis is a food-borne invasive illness caused by the pathogen *Listeria monocytogenes* (LM) that causes infections in pregnant women, infants, the elderly, and the immune-compromised. While infections are rare among the healthy population, listeriosis is one of the most lethal bacterial diseases for fetuses and newborns [1–7]. Nevertheless, pregnant women who get infected experience only mild symptoms, making the diagnosis very difficult, even if fetuses are fatally infected [1]. Therefore, vaccination of pregnant women appears as the most cost-effective measure to deal with this deadly pathogen in pregnancy, as it may be responsible for a high number of non-diagnosed spontaneous abortions.



# Biomarker Tools to Design Clinical Vaccines Determined from a Study of Annual Listeriosis Incidence in Northern Spain

Ricardo Calderon-Gonzalez<sup>1</sup>, Hector Teran-Navarro<sup>1</sup>, José María Marimon<sup>2,3</sup>, Claudia González-Rico<sup>4</sup>, Jorge Calvo-Montes<sup>5</sup>, Elisabet Frande-Cabanes<sup>1</sup>, Miriam Alkorta-Gurrutxaga<sup>2,3</sup>, M. C. Fariñas<sup>4,6</sup>, Luis Martínez-Martínez<sup>5,7</sup>, Emilio Perez-Trallero<sup>2,3</sup> and Carmen Alvarez-Dominguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Nanovacunas y vacunas celulares basadas en *Listeria* y sus aplicaciones en biomedicine, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain, <sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, Spain, <sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain, <sup>4</sup>Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, <sup>5</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, <sup>6</sup>Departamento de Medicina y Psiquiatría, Universidad de Cantabria, Santander, Spain, <sup>7</sup>Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Laurel L. Lenz,  
University of Colorado Denver School  
of Medicine, USA

### Reviewed by:

Olivier Dussurget,  
University Paris Diderot, France  
Rebecca Leigh Schmidt,  
Upper Iowa University, USA

### \*Correspondence:

Carmen Alvarez-Dominguez  
calvarez@humv.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 14 July 2016

Accepted: 16 November 2016

Published: 29 November 2016

### Citation:

Calderon-Gonzalez R,  
Teran-Navarro H, Marimon JM,  
González-Rico C, Calvo-Montes J,  
Frande-Cabanes E, Alkorta-  
Gurrutxaga M, Fariñas MC,  
Martínez-Martínez L, Perez-Trallero E  
and Alvarez-Dominguez C (2016)  
Biomarker Tools to Design Clinical  
Vaccines Determined from a Study of  
Annual Listeriosis Incidence  
in Northern Spain.  
Front. Immunol. 7:541.  
doi: 10.3389/fimmu.2016.00541

Two regions of northern Spain, Gipuzkoa, and Cantabria present high annual incidence of listeriosis (1.86 and 1.71 cases per 100,000 inhabitants, respectively). We report that the high annual incidences are a consequence of infection with highly virulent *Listeria monocytogenes* isolates linked to fatal outcomes in elderly patients with cancer. In addition, listeriosis patients with cancer present low IL-17A/IL-6 ratios and significantly reduced levels of anti-GAPDH<sub>1-22</sub> antibodies, identified as two novel biomarkers of poor prognosis. Analysis of these biomarkers may aid in reducing the incidence of listeriosis. Moreover, GAPDH<sub>1-22</sub>-activated monocyte-derived dendritic cells of listeriosis patients with cancer seem useful tools to prepare clinical vaccines as they produce mainly Th1 cytokines.

**Keywords:** listeriosis, *Listeria*, zoonoses

## BACKGROUND

In Spain, increased cases of listeriosis were recorded between 2008 and 2014, with up to 1.15 cases per 100,000 inhabitants according to the last European summary report in 2014, signifying one of the highest incidences of listeriosis in Europe (1–4). Over this period, outbreaks were additionally documented in Austria, Portugal, Spain, and Denmark (1, 5–8). Listeriosis has only recently been listed as a notifiable disease in Spain since March 2015 (9), and therefore, the annual incidence may be even higher (1–5, 10, 11). Reduced immunocompetency of listeriosis patients was recently reported as a major risk factor for fatal outcomes (12). Epidemiologically specific *Listeria monocytogenes* genotypes show greater virulence, contributing to more human listeriosis cases (13, 14). Despite accumulating epidemiological data on listeriosis (1–14), effective immunological biomarkers are yet to be established that *a priori* appear to represent valuable tools to prepare clinical vaccines for patients at high risk of listeriosis, which may help to reduce the incidence of infectious disease.

The main purpose of this study was to establish the annual incidence of listeriosis in two northern Spain communities with voluntary reports of high numbers of listeriosis cases. We