

Tesis Doctoral

Interacciones de *Brucella abortus* con la inmunidad innata del sistema nervioso central como determinante de patogénesis de la neurobrucelosis

García Samartino, Clara

2010

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

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

Cita tipo APA:

García Samartino, Clara. (2010). Interacciones de *Brucella abortus* con la inmunidad innata del sistema nervioso central como determinante de patogénesis de la neurobrucelosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

García Samartino, Clara. "Interacciones de *Brucella abortus* con la inmunidad innata del sistema nervioso central como determinante de patogénesis de la neurobrucelosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

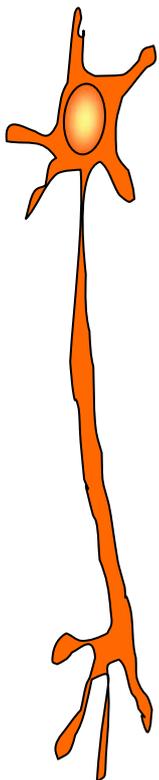
Universidad de Buenos Aires



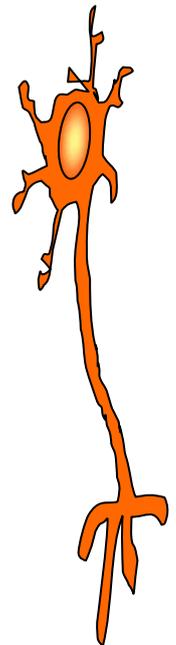
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

**“Interacciones de *Brucella abortus* con la inmunidad
innata del sistema nervioso central como determinante
de patogénesis de la neurobrucelosis”**

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
Área: Ciencias Biológicas



Autora: **Lic. Clara García Samartino**



Director: Dr. Guillermo H. Giambartolomei
Consejero de Estudios: Dr. Omar A. Coso
Lugar de trabajo: Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral
Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)

Buenos Aires, 2010

Índice

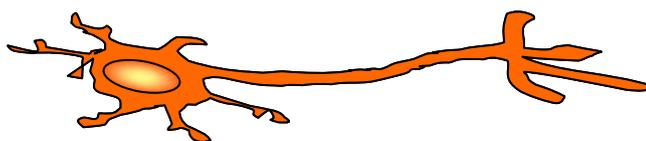
Abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	8
Brucelosis	9
Generalidades	9
Etiología	9
<i>Brucella</i> spp	9
Estructura antigénica	11
Epidemiología	12
Transmisión de la enfermedad	13
Diagnostico, tratamiento y control	13
Respuesta inmune contra <i>Brucella</i> spp.	15
Inmunidad innata	15
Receptores	16
Inmunidad adaptativa	16
Células T $\alpha\beta$ CD4 ⁺ y CD8 ⁺	16
Células T $\gamma\delta$	17
Respuesta humoral	17
Citoquinas	17
Manifestaciones clínicas	18
Factores de virulencia	20
Respuesta inflamatoria y patogenia	20
Activadores bacterianos de la respuesta inflamatoria	21
Sistema Nervioso Central	23
Funciones de las células neurogliales	23
Inmunidad e infección en el SNC	25
Consecuencias de la infección en el SNC	26
Inflamación y apoptosis	28
Neurobrucelosis	30
Diagnóstico diferencial	30
Tratamiento	31
Manifestaciones clínicas	31
Patobiología	33
Hipótesis y objetivos	36
Materiales y métodos	38
Animales	39
Bacterias	39
Lipoproteínas y LPS	40
Inyecciones estereotácticas intracraneales	40
Histología e inmunohistoquímica	40

Cultivos celulares	41
Infección <i>in vitro</i>	42
Estimulación de citoquinas y quimiocinas	42
Proliferación de astrocitos	43
Ensayos de apoptosis	43
Bloqueo de la actividad de caspasas	44
Análisis estadístico	44
Resultados	45
La presencia de <i>B. abortus</i> induce astrogliosis en el cerebro de ratones BALB/c	46
Caracterización inmunoquímica y morfológica de astrocitos y microglía	48
<i>B. abortus</i> infecta y se multiplica en astrocitos y microglía	50
HKBA induce la producción de citoquinas y quimiocinas en astrocitos y microglía	53
El LPS de <i>B. abortus</i> no es el responsable de la respuesta inflamatoria	55
L-Omp19 induce la producción de citoquinas y quimiocinas en astrocitos y microglía	57
L-Omp19 induce astrogliosis en el cerebro de ratones	59
TLR2 media la respuesta inflamatoria desencadenada por <i>B. abortus</i> y L-Omp19	61
HKBA y L-Omp19 inducen proliferación de astrocitos	64
La infección con <i>B. abortus</i> induce apoptosis de astrocitos	66
HKBA y L-Omp19 inducen apoptosis de astrocitos <i>in vitro</i>	67
La apoptosis de astrocitos está mediada por TNFR1	70
Las caspasas median la apoptosis inducida por HKBA y L-Omp19	73
Discusión	75
Conclusiones	83
Referencias	85

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD11b	Ac. específico microglía
DMEM	Medio de cultivo DMEM
Fig.	Figura
GFAP	Gliar Fibrilar Acidic Protein
HKBA	<i>Brucella abortus</i> muerta por calor
h	horas
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
O ₄	Ac. específico para oligodendrocitos
Omp	Proteína de membrana externa
Pam ₃ Cys	N-palmitoil-S-(dipalmitoilgliceril)-cisteína
PB	Polimixina
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
R	cepa fenotipo rugoso
S	cepa fenotipo liso
SF	Solución fisiológica
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UFC	Unidad Formadora de Colonias
WB	Western Blot

RESUMENES



“Interacciones de *Brucella abortus* con la inmunidad innata del sistema nervioso central como determinante de patogénesis de la neurobrucelosis”

La invasión al sistema nervioso central (SNC) por bacterias del género *Brucella* resulta en un desorden inflamatorio llamado neurobrucelosis. En este trabajo nosotros presentamos evidencia *in vivo* e *in vitro* mostrando que *B. abortus* y sus lipoproteínas activan la inmunidad innata del SNC, originando una respuesta inflamatoria que lleva a la astrogliosis, una característica típica de neurobrucelosis. Inyecciones intracraneales de *B. abortus* muerta por calor (HKBA) o de la proteína de la membrana externa 19 (Omp19), una lipoproteína de *B. abortus* utilizada como modelo, indujeron astrogliosis concomitantemente con un infiltrado neutrofílico en el cuerpo estriado de los ratones. La infección de astrocitos y microglía con *B. abortus* incitó la secreción de IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 y KC (CXCL1). HKBA también estimuló la liberación de estos mediadores inflamatorios, sugiriendo la independencia de la viabilidad bacteriana en este fenómeno e implicando a un componente estructural de la bacteria. De acuerdo con esto, Omp19 indujo el mismo patrón de secreción de citoquinas y quimiocinas. La respuesta inflamatoria desencadenada por Omp19 estuvo mediada por TLR2, ya que cultivos de células gliales provenientes de ratones TLR2 KO no promovieron la secreción de mediadores proinflamatorios. Sin embargo este receptor no media la infección ni la replicación de la bacteria en astrocitos o en microglía. La infección con *B. abortus* promovió apoptosis de astrocitos pero no de microglía. HKBA y Omp19 indujeron, no solo la apoptosis de los astrocitos sino también su proliferación, dos de las características que se observan durante la astrogliosis. La proliferación inducida por HKBA y Omp19 disminuyó en presencia de Ac anti-IL-6. Por otro lado, la apoptosis promovida por los 2 estímulos fue completamente suprimida en células provenientes de ratones deficientes del receptor p55 de TNF- α o cuando se agregó a los cultivos el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK. Por lo tanto, IL-6 contribuye a la proliferación de astrocitos, y la señalización de TNF- α vía TNFR1 a través de caspasas determina la apoptosis, cuando son estimulados con *B. abortus* y sus lipoproteínas. Los resultados de esta tesis son prueba de principio de que las lipoproteínas de *Brucella* podrían ser determinantes de patogénesis claves en neurobrucelosis, y que la astrogliosis podría contribuir a la patogénesis de la misma.

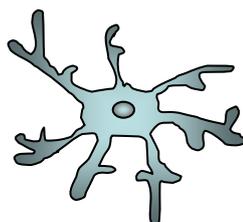
Palabras claves: *B. abortus*, Lipoproteínas, Inmunidad innata, Neurobrucelosis, Astrogliosis.

“Interactions of *Brucella abortus* with innate immunity of central nervous system as a determinant of neurobrucellosis”

Central nervous system (CNS) invasion by bacteria of the genus *Brucella* results in an inflammatory disorder called neurobrucellosis. In this study we present *in vivo* and *in vitro* evidence showing that *B. abortus* and its lipoproteins activate the innate immunity of the CNS, eliciting an inflammatory response that leads to astrogliosis, a characteristic feature of neurobrucellosis. Intracranial injection of heat killed *B. abortus* (HKBA) or outer membrane protein 19 (Omp19), a *B. abortus* lipoprotein used as a model, induced astrogliosis with concomitant neutrophil's infiltrate in mouse striatum. Infection of astrocyte and microglia with *B. abortus* induced the secretion of IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1 and KC (CXCL1). HKBA also induced these inflammatory mediators, suggesting independency of bacterial viability and involvement of a structural component of the bacterium. Accordingly, Omp19 induced the same cytokine and chemokine secretion pattern. TLR2 mediated the inflammatory response induced by Omp19 since cultures from TLR2 KO mice did not induced the secretion of proinflammatory mediators. However, this receptor is not involved in the infection or replication of the bacteria inside astrocytes or microglia. *B. abortus* infection induced astrocyte, but not microglia, apoptosis. HKBA and Omp19 elicited not only astrocyte apoptosis but also proliferation, two features observed during astrogliosis. Proliferation induced by HKBA and Omp19 was diminished in the presence of anti-IL-6 antibody, and apoptosis induced by both stimuli was completely suppressed in cells of TNF- α receptor p55^{-/-} mice or when the general caspase inhibitor Z-VAD-FMK was added to cultures. Hence, IL-6 contributes to astrocyte proliferation, and TNF- α signaling via TNFR1 through the coupling of caspases determines apoptosis, as elicited by *B. abortus* and its lipoproteins. Our results provide proof of the principle that *Brucella* lipoproteins could be key virulence factors in neurobrucellosis, and that astrogliosis might contribute to neurobrucellosis pathogenesis.

Key words: *B. abortus*, Lipoproteins, Innate immunity, Neurobrucellosis, Astrogliosis.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Brucelosis

Generalidades

La brucelosis es una zoonosis endémica causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella*, las cuales se comportan como parásitos intracelulares facultativos. Fue descubierta por el microbiólogo David Bruce en 1887 a partir de un soldado que presentaba fiebre de Malta, estableciendo una relación causal entre la bacteria y la enfermedad ¹. Esta enfermedad afecta al hombre y a distintas especies animales, tanto domésticas (bovinos, caprinos, porcinos, caninos, etc.) como salvajes (camellos, delfines, roedores, etc.). En animales esta enfermedad causa disminución de la capacidad reproductora, abortos, crías débiles y contaminación de lácteos y carnes. Algunas de las especies que afecta la enfermedad se encuentran muy relacionadas con la alimentación y la actividad laboral ganadera ^{2, 3}. Resulta, entonces, un importante problema alimentario y sanitario; tanto en nuestro país como a nivel mundial ⁴.

Etiología

Brucella spp.

Las bacterias del género *Brucella* pertenecen a la clase alfa-proteobacterias, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae ^{5, 6}. Los agentes causales de la brucelosis son bacilos cocoides pequeños, Gram negativos, inmóviles, no esporulantes y que no poseen cápsulas ni flagelos. Estas bacterias son microorganismos intracelulares facultativos capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema reticuloendotelial y tejidos asociados. Se considera que esta cualidad es el factor que les confiere virulencia. Son capaces de infectar a fagocitos profesionales (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas) y no profesionales como neutrófilos y monocitos. Además de otros tipos celulares como, células endoteliales, y osteoblastos ⁷⁻¹¹.

	Especie	Hospedador	Patogenicidad en humanos
Especies Lisas (S)	<i>B. melitensis</i>	Caprinos, ovinos, camélidos	Elevada
	<i>B. suis</i>	Porcinos, roedores salvajes	Moderada
	<i>B. abortus</i>	Bovinos, camélidos, búfalos, bisontes	Moderada
	<i>B. pinnipediae</i>	Focas, lobos marinos	Moderada
	<i>B. cetaceae</i>	Cetáceos	Desconocida
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	Desconocido
Especies Rugosas (R)	<i>B. ovis</i>	Ovinos	No posee
	<i>B. canis</i>	Caninos	Moderada

Tabla 1. Características de las diferentes especies del género *Brucella*

Las distintas especies del género *Brucella* se clasifican en lisas o rugosas según el tipo de colonias que forman en cultivo. Estas diferencias en el fenotipo de la colonia reflejan las diferencias en la composición química del lipopolisacárido (LPS). A su vez existe una relación entre el tipo de colonia que forman y la virulencia; las cepas lisas son más virulentas que las rugosas^{12, 13}.

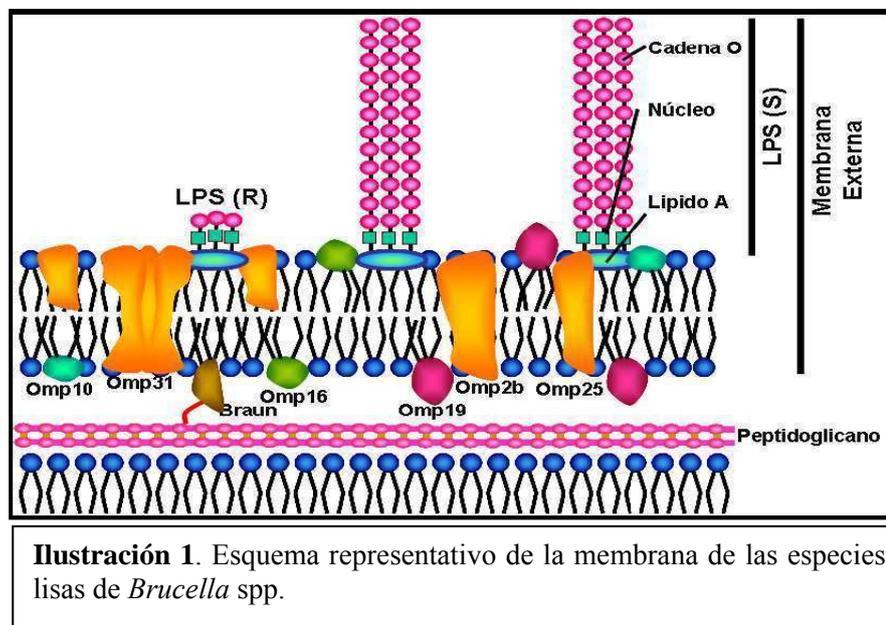
El género *Brucella* es un género en expansión. Hasta el año 2008 constaba de 8 especies clasificadas de acuerdo a variaciones antigénicas y al hospedador preferencial. Estas eran: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. pinnipediae*, *B. cetaceae*, *B. neotomae*, *B. canis* y *B. ovis*¹⁴. De estas 8 especies sólo 5 son patógenas para el hombre: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* y *B. pinnipediae*. De ellas, las 3 primeras son responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana^{7, 15, 16} (**Tabla 1**). En el 2008 se reportaron 2 nuevas especies: *B. microti*¹⁷ cuya secuencia es muy similar a la de *B. suis* (aislada a partir de ratones salvajes) y *B. inopinata*¹⁸, aislada en un implante mamario de una mujer de 71 años con síntomas de brucelosis.

El genoma de *Brucella* consiste de 2 cromosomas circulares sin plásmidos¹⁹ y al igual que se encontró para otras proteobacterias los genes asociados a la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), a la transcripción y traducción de genes y a la biosíntesis de la pared celular están presentes en ambos. Recientemente se secuenciaron los genomas de todas las especies de *Brucella* los cuales proveerán abundante información para dilucidar los mecanismos de patogenicidad de la bacteria²⁰.

Estructura antigénica

La envoltura celular de las bacterias del género *Brucella* está formada por una membrana interna, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio (**Ilustración 1**). Éste contiene algunas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopéptido denominado peptidoglicano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria.

La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) considerado el principal antígeno (Ag). El LPS consta de una parte glucolípida (Lípido A) inserta en la membrana externa, y por tanto no expuesta en la superficie, y otra exclusivamente polisacarídica dirigida hacia el exterior.



La parte polisacarídica del LPS se divide en 2 secciones: un oligosacárido intermedio, llamado núcleo y la cadena O. El Ag “O” es la porción antigénicamente dominante de la molécula y está constituido por unidades repetitivas de oligosacáridos en los cuales suelen residir los determinantes antigénicos del LPS de las cepas lisas (S). Este segmento está ausente en el LPS de las cepas del tipo rugoso (R). El lípido A se encuentra inmerso en la capa lipídica actuando como soporte o unión del resto de la molécula a la superficie bacteriana. El lípido A del LPS de *Brucella*, a diferencia del de la mayoría de las enterobacterias, posee una estructura atípica caracterizada por su alta hidrofobicidad, su bajo grado de sustitución y por poseer cadenas alifáticas más largas⁵.

Asociadas al LPS y formando parte de la membrana se encuentran proteínas de la membrana externa (Omps). Estas proteínas se han dividido en 3 grupos de acuerdo a su peso molecular: grupo 1 (89 y 94 kDa); grupo 2 (35 y 40 kDa) y grupo 3 (25 y 30 kDa). Las proteínas de los grupos 2 y 3 se encuentran en mayor cantidad y son conocidas como Omp “mayores”. Las proteínas del grupo 1, junto con otras con pesos moleculares entre 10 y 20 kDa, son denominadas Omp “menores”. Se conoce que las proteínas del grupo 2 funcionan como porinas²¹⁻²³ mientras que las proteínas del grupo 3 son similares a la Omp A de *E. coli*²⁴. Tibor y col.²⁵ han demostrado que las Omp 10, 16 y 19 son lipoproteínas. Estos 3 grupos de proteínas se encuentran expuestos en la membrana externa, y son reconocidos por el sistema inmune en el curso de la infección²⁶. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas^{24, 27, 28}.

Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la brucelosis varían según el área geográfica. Las zonas con mayor prevalencia son el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica, especialmente países con bajos recursos económicos²⁹⁻³¹. A nivel mundial, la infección en animales con *B. abortus* es la más frecuente a pesar de la vacunación masiva; excepto en Europa y en Australia donde ha sido prácticamente erradicada. En América del Norte, la brucelosis afecta preferencialmente zonas agrícolas del norte y centro de México³², aunque en Canadá y Estados Unidos ha disminuido en los últimos años. En América Central todos los países son afectados por *B. abortus*, siendo la prevalencia de hasta un 8%³⁰. En Sudamérica se encuentra en varios países, en la mayoría es endémica y representa un problema sanitario importante^{29, 33}. En Chile, sobre todo en las zonas ganaderas y productoras de leche, se encuentra la mayor concentración de ganado infectado³⁴.

La incidencia de la brucelosis es muy alta en nuestro país, si bien la enfermedad se encuentra subdiagnosticada y subreportada³⁵, cerca del 15% de los bovinos se encuentran infectados y el número de personas que adquiere la infección anualmente oscila entre 10.000 y 20.000³. Datos aportados por el SENASA en el año 2005 muestran que la prevalencia de la brucelosis en los bovinos fue del 5%³⁶. Sin embargo, una encuesta realizada el mismo año por el INTA Bariloche, la Dirección de Ganadería de la provincia de Río Negro y el laboratorio de brucelosis de la Fundación Barrera Patagónica, reveló que la prevalencia de la enfermedad era de 21,4 % de establecimientos positivos a *B. abortus* -con un rango de 10% al 40%- y una tasa de

reaccionantes del 3,7%³⁷. Las áreas más afectadas son el nordeste, la pre-cordillera de los andes, la Mesopotamia y la pampa húmeda, ubicando a la brucelosis en el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles crónicas de la Argentina, después de la enfermedad de Chagas, la tuberculosis y la sífilis.

La distribución geográfica de la brucelosis humana está en estrecha relación con la distribución de la brucelosis animal. La incidencia puede variar desde valores inferiores a 0,01/100.000 habitantes en los países desarrollados hasta cifras superiores a 200/100.000 habitantes en los países menos desarrollados. En la Argentina, donde no sólo hay un importante consumo de lácteos y carnes, sino que además la producción y elaboración de estos productos es una de las principales actividades económicas, la incidencia es muy alta siendo una de las enfermedades laborales más importantes³⁸.

Transmisión de la enfermedad

Los reservorios naturales de la bacteria suelen ser los mismos animales que infecta: cerdos, ovinos, caprinos, bovinos y mamíferos marinos³⁹. La variedad de mamíferos que se ven afectados son muy diversos: roedores, cánidos, camellos y cetáceos. Hay que tener en cuenta que estos animales también manifiestan la enfermedad, solo que con diferentes sintomatologías dependiendo del hospedador y la especie de *Brucella* de la que se trate. La bacteria también es capaz de sobrevivir en el suelo y en los alimentos (leche, manteca y queso) por varias semanas.

La entrada de las bacterias se puede producir por contacto directo con material infectado, por aerosoles o alimentos contaminados^{31, 40} a través de las vías conjuntival, inhalatoria, gástrica o dérmica en la piel lesionada^{40, 41}. Además, la entrada por inoculación accidental con cepas vacunales es frecuente en peones y veterinarios^{2, 42} así como trabajadores de la industria de la carne. En países desarrollados es una enfermedad típicamente ocupacional.

Diagnóstico, tratamiento y control

En general el diagnóstico de la enfermedad es difícil debido a que los síntomas que caracterizan a la enfermedad en la primera etapa no son patognomónicos⁴³. Es muy importante que el médico realice una exhaustiva anamnesis que le permita pensar en la posibilidad de que se trate de brucelosis.

Para corroborar el diagnóstico se realizan estudios de laboratorio como detección de anticuerpos (Ac) específicos contra *Brucella* en sangre por seroaglutinación. También se puede utilizar el diagnóstico por PCR (Polymerase Chain Reaction) la cual es altamente específica e incluso sirve para distinguir entre las diferentes especies de *Brucella*, pero su costo hace que la seroaglutinación siga siendo la técnica más utilizada. Aunque el diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos; esto solo se logra en un 50% de los casos donde los métodos serológicos dieron positivos⁴⁴.

Si la enfermedad es confirmada tempranamente, con un adecuado tratamiento en la mayoría de los casos la evolución del paciente es favorable. En las formas agudas de la enfermedad, la administración precoz y prolongada de una apropiada combinación de antibióticos durante períodos de varias semanas (en promedio de 6 a 8) provoca la remisión del cuadro clínico en al menos el 90% de los pacientes. La asociación de doxiciclina y estreptomicina constituye el tratamiento de elección ya que en estas condiciones se presenta un menor porcentaje de pacientes con recaídas⁴⁵. La administración de doxiciclina y rifampicina es empleada como tratamiento alternativo.

En cuanto al control de la enfermedad, dado que no existen hasta el momento vacunas para humanos, la forma más efectiva de tratar esta zoonosis es evitar que se infecten los animales.

Las vacunas para animales más utilizadas se obtienen a partir de cepas vivas atenuadas. Actualmente se utilizan dos cepas vacunales lisas: *B. abortus* cepa 19 (S19) para el ganado vacuno y *B. melitensis* REV-1 para pequeños rumiantes, y una cepa atenuada rugosa: *B. abortus* RB51 para el ganado vacuno²⁹.

En Argentina la brucelosis humana es una enfermedad que persiste en las regiones donde la infección animal no está controlada; a pesar de ello se están realizando esfuerzos para proveer asistencia, diagnóstico y vacunación en todas las provincias argentinas⁴. Algunas medidas de prevención a tener en cuenta son: programas de saneamiento del ganado, educación para la salud en áreas endémicas, medidas de higiene y seguridad en el trabajo y control sanitario en las fronteras.

Respuesta inmune contra *Brucella* spp.

Inmunidad innata

El rol de la respuesta innata en estadios tempranos de la infección por *Brucella*, es reducir el número inicial de bacterias promoviendo un ambiente adecuado para generar una respuesta Th1 en el hospedador¹⁵. Los neutrófilos, los macrófagos y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente al microorganismo⁴⁶.

Diversos autores han demostrado que macrófagos y neutrófilos poseen la capacidad de eliminar un alto porcentaje de las bacterias fagocitadas^{47, 48}. Del mismo modo se pudo determinar que tanto la fagocitosis como el estallido respiratorio en macrófagos son dependientes de la opsonización de las bacterias por Acs y complemento, así como de la activación celular por el interferón gama (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que puedan producir otras células⁴⁸. Todas las especies del género *Brucella* son sensibles a los metabolitos reactivos del oxígeno y del nitrógeno, sin embargo son capaces de inhibir la degranulación de los gránulos primarios y secundarios aumentando su supervivencia intracelular^{49, 50}.

Si bien hasta el momento no se ha establecido la importancia de las células dendríticas (DC) en el control de la infección por *Brucella* spp., recientemente se ha demostrado que la bacteria puede sobrevivir dentro de estas células tal como lo hace en otros tipos celulares⁵¹. Un estudio reciente ha implicado a las DC B220- CD11b⁺ LY-6C⁺ NK1.1⁻ iNOS⁺ en la infección con *Brucella*, sugiriendo que las mismas serían los principales efectores de la respuesta Th1 murina contra bacterias intracelulares y que podrían estar involucradas en el desarrollo de la respuesta Th1 en humanos. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que *B. abortus* es capaz de inducir la maduración de DC e inducir una respuesta Th1 en DC humanas¹⁰.

Por otro lado, el rol de las células NK en la infección con *Brucella* no está del todo claro. Aparentemente estas células no son claves en la erradicación de la bacteria durante la infección aguda, ya que ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/10) controlan la infección por *B. abortus* 2308 en ausencia de células NK⁵². En pacientes con brucelosis, la actividad de las células NK se encuentra aparentemente suprimida⁵³. Sin embargo, el co-cultivo de células NK humanas con macrófagos infectados con *B. suis*, activa a las NK para producir IFN- γ y TNF- α y destruir a los macrófagos infectados⁵⁴.

Receptores

Los receptores de la inmunidad innata de tipo Toll (TLR) reconocen a *Brucella* spp. y a sus componentes bacterianos, y luego los fagocitos mononucleares inician respuestas inmunes que influyen tanto en la inmunidad innata como adaptativa. Los TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos. Estos patrones incluyen entre otros al LPS que es reconocido por TLR4; los ácidos nucleicos (ADN/ARN) son reconocidos por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9; el peptidoglicano y las lipoproteínas son reconocidos por TLR1, TLR2, TLR6, y la flagelina que es reconocida por TLR5⁵⁵.

Estudios recientes han revelado las cascadas de señalización intracelulares que participan en el inicio de la respuesta inmune mediada por TLR en la infección por *Brucella*. Los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 han sido implicados en las interacciones del hospedador con *Brucella*. Las vías de señalizaciones dependientes de MyD88 e independientes de TRIF participan en la activación de la respuesta innata por parte de *Brucella*. Recientemente se ha demostrado el rol crítico de la molécula MyD88 en la maduración de las células dendríticas y la producción de IL-12 durante la infección por *B. abortus*⁵⁶. También hay que destacar la contribución de NOD y los receptores IFN tipo-I durante la infección por *Brucella*⁵⁷.

Inmunidad adaptativa

La respuesta adaptativa contra *Brucella* involucra 3 mecanismos principales. Primero, el IFN- γ producido por células T CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ activa las funciones bactericidas del macrófago inhibiendo la supervivencia intracelular de *Brucella*. Segundo, la citotoxicidad T CD8⁺ y $\gamma\delta$ puede destruir al macrófago infectado. Tercero, los isotipos de Acs de tipo T "helper 1" (Th1) como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan la fagocitosis¹⁵.

Células T $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺

La importancia tanto de las células T CD4⁺ como CD8⁺ ha sido definida en la inmunidad contra *Brucella*^{58,28}. Estudios de transferencia adoptiva de Winter y col.²⁴ han demostrado que la inmunidad protectora contra *B. abortus* S19 en ratón se debe a un efecto combinado de células CD4⁺ (L3t4) y CD8⁺ (Lyt2). A pesar de ello, experimentos en ratones deficientes en los genes que codifican para moléculas MHCI o MHCII demuestran que los ratones que no tienen células T CD8⁺ controlan la infección más lentamente que los ratones de la cepa salvaje. Mientras que los ratones deficientes en células T CD4⁺ lo hacen en forma similar a los ratones de la cepa

salvaje⁵⁹. Por otro lado, otros autores utilizando *B. abortus* 2308 sugieren que los ratones deficientes en $\beta 2$ microglobulina controlan eficazmente la infección y que las células T CD8⁺ no son importantes hasta después de la primera semana de infección⁵⁴.

Células T $\gamma\delta$

Se ha descrito que este tipo celular con el receptor T V γ 9V δ 2 está aumentado a nivel periférico en pacientes agudos infectados con *B. melitensis*⁶⁰. Estas células activadas por Ags no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares porque secretan TNF- α e IFN- γ activando las funciones bactericidas del macrófago. Estudios *in vitro* sugieren que las células T V γ 9V δ 2 también podrían lisar directamente a las células infectadas⁶¹.

Respuesta humoral

Al comienzo de la infección aparecen Acs que suelen permanecer detectables en el suero durante años. Éstos están dirigidos contra diferentes componentes del microorganismo, pero especialmente contra los Ags superficiales, en especial el LPS⁶². A pesar que dichos Acs colaboran en la lucha contra el patógeno, no son suficientes para evitar la enfermedad. No obstante, la detección de Acs dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, pronóstico y curso de la infección⁶².

Citoquinas

Hay varias citoquinas que juegan un rol importante en el control de la infección por *Brucella* spp.: IL-12, IFN- γ y TNF- α ^{63,64}.

La IL-12 es la responsable de dirigir la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th1 tanto *in vitro* como *in vivo*^{65,66}, con producción de IFN- γ , y es producida por células B, macrófagos y DC. Si bien se conoce la importancia de esta citoquina en brucelosis^{67,68}; los mecanismos de inducción de IL-12 en estas células no se han esclarecido.

El IFN- γ permite a la inmunidad enfrentarse a *Brucella* mediante la activación de las funciones bactericidas del macrófago, induciendo la apoptosis, aumentando la diferenciación celular y la producción de citoquinas, induciendo el “switch” de inmunoglobulina G (IgG) a IgG2a y aumentando la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica^{43,50}.

La relevancia del IFN- γ en la resolución de la infección por *Brucella* se evidencia en estudios con ratones deficientes en el gen de esta citoquina ya que éstos mueren luego de 6 semanas de la infección con *B. abortus*⁵⁴. Sin embargo a pesar de ser *Brucella* un potente inductor de IFN- γ , esta bacteria es capaz de sobrevivir y reproducirse durante un largo período en el bazo de ratones infectados⁶⁹. Otros estudios han sugerido que la activación con IFN- γ impide que *Brucella* establezca su nicho replicativo, y por tanto si ya se estableció el bruceloma, el IFN- γ no tiene efecto alguno⁷⁰. La producción temprana durante la infección de una citoquina inmunomoduladora como IL-10 podría explicar en parte este fenómeno⁵².

Estudios conducidos hasta la fecha han revelado que *B. abortus* puede inducir en diversos tipos celulares la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α ^{59, 63, 68, 71-74}.

El IFN- γ es el componente crucial de la inmunidad que permite la supervivencia del hospedador, y así el estado crónico de infección. A pesar que las células T CD4⁺ y CD8⁺ están claramente involucradas en la producción de interferón, y que las células T CD8 pueden ser citotóxicas, el rol para las células NK y la citotoxicidad no se ha sustentado experimentalmente⁵³.

Manifestaciones clínicas

En el hombre la brucelosis presenta una gran tendencia a la cronicidad y se caracteriza por fiebre y focalización de las bacterias en distintos tejidos (articulaciones, hueso, endocardio, sistema nervioso, etc.). La supervivencia intracelular de *Brucella* condiciona el curso ondulante de la enfermedad y la tendencia a la recaída y evolución crónica. Si bien constituye una enfermedad de baja mortalidad, puede dejar secuelas discapacitantes de magnitud variable. Por otra parte, la brucelosis humana no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, lo que favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva. Muchos pacientes padecen infecciones asintomáticas. El período de incubación varía entre 10 y 20 días, aunque la sintomatología puede aparecer varios meses después⁷⁴.

La brucelosis puede ser clasificada como aguda, subaguda o crónica en base al tiempo de evolución de la misma^{74, 75}. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares⁷⁵. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras

enfermedades como la salmonelosis, fiebre tifoidea, tuberculosis y leptospirosis. Debido al empleo de los antibióticos ya no se registra el clásico patrón de fiebre ondulante. El recuento de células en sangre se caracteriza usualmente por una leucopenia moderada y una relativa linfocitosis, junto con una leve anemia y trombocitopenia ⁴³.

La tercera parte de los pacientes presenta tos seca o productiva, el 30% estreñimiento y el 5-10% diarreas. En el 50% de los casos se produce hepatomegalia (ligera o moderada) y esplenomegalia y en el 25% adenopatías. Más del 5% de los pacientes presentan lesiones cutáneas: erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo. Es característico el desarrollo de localizaciones específicas como la osteoarticular ⁷⁶, respiratoria, genitourinaria y nerviosa. Las recaídas o recidivas se presentan en el 15% de los casos, luego de 2 a 3 meses de la finalización del tratamiento.

En ambas fases, aguda y crónica, se observa un proceso inflamatorio generalizado. Los signos clínicos de esa inflamación son: fiebre ondulante, artritis, endocarditis, meningitis, pleocitosis, infiltración monocitaria de las articulaciones, granulomas, etc. ⁷⁴. La presencia de tejido granulomatoso es frecuentemente asociada con la persistencia de *Brucella*. La liberación de bacterias de estos granulomas puede favorecer la diseminación de la bacteria a distintas localizaciones a través de repetidos episodios de bacteremia ⁷⁷.

La complicación osteoarticular es la más frecuente de las formas localizadas de la enfermedad, la cual puede afectar articulaciones periféricas, articulaciones sacroilíacas o la columna vertebral ⁷⁸⁻⁸¹. En etapas tempranas de brucelosis humana se puede presentar una artritis inflamatoria intermitente o crónica, que asemeja otras formas de artritis inflamatorias humanas ⁷⁴. El tejido sinovial de pacientes con artrosis producida por *Brucella* revela un infiltrado linfocítico y una hiperplasia de las células sinoviales ⁷. El daño en las articulaciones está frecuentemente asociado con la presencia de *Brucella* en las mismas ⁸².

En el hígado, la infección con *Brucella* induce lesiones hepáticas que pueden ser tanto granulomatosas como no granulomatosas ^{7, 83}. Histológicamente, los granulomas muestran necrosis central, un infiltrado de células polimórficas y fibrosis periférica ⁸⁴.

En neurobrucelosis, el rasgo característico de la inflamación es la meningoencefalitis, la cual es ocasionada por la invasión al SNC por *Brucella* ¹⁹. El examen del líquido cefalorraquídeo en la meningitis ocasionada por *Brucella* generalmente revela un elevado contenido de proteínas y pleocitosis linfocítica ¹⁹. Las biopsias quirúrgicas del cerebro o meninges y el examen postmórtem del tejido nervioso evidencian infiltrado linfocítico perivascular y formación de granulomas ¹⁹.

Factores de virulencia

Brucella presenta varias cualidades que la diferencian del resto de las bacterias respecto a la virulencia; ya que no cuenta con factores clásicos de virulencia como cápsulas, fimbrias, flagelos, exotoxinas, exoenzimas incluyendo exoproteasas, citolisinas, formas de resistencia, variaciones antigénicas, plásmidos y fagos lisogénicos⁸⁵⁻⁸⁷. En cambio *Brucella* delega su virulencia en su capacidad de sobrevivir y replicarse en los compartimentos fagocíticos vacuolares de los macrófagos⁸⁶.

Los macrófagos están altamente adaptados a la destrucción de bacterias, la modulación de la apoptosis por algunas especies de bacterias es un mecanismo de virulencia muy importante. Las cepas virulentas lisas como *B. abortus* 2308, son capaces de inhibir la muerte celular programada en macrófagos humanos y de ratón^{13, 88, 89}. La inhibición de la muerte celular facilita la supervivencia y la replicación de las cepas lisas de *Brucella* dentro de los macrófagos. En contraste muchas cepas rugosas derivadas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, deficientes en el Ag O del LPS, no pueden sobrevivir dentro de los macrófagos y por lo tanto son atenuadas^{12, 90}.

La supervivencia de *Brucella* dentro de las células se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes⁹¹ y a la producción de GMP (guanosina 5' monofosfato) y adenina, que inhiben la fusión fagosoma-lisosoma, la degranulación, la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del TNF- α ⁵⁰.

Respuesta inflamatoria y patogenia

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

B. abortus, uno de los agentes etiológicos de la enfermedad, ha demostrado ser capaz de activar poderosamente el sistema inmune innato y adaptativo, conduciendo a una fuerte respuesta pro-inflamatoria que favorece un perfil Th1 tanto *in vitro* como *in vivo*^{46, 66}. Como ya mencionamos, *B. abortus* puede inducir en diversos tipos celulares la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α ^{59, 63, 68, 71-73, 92}. Estas citoquinas generalmente poseen potentes funciones efectoras que se superponen para dar lugar a distintos

componentes de la inflamación como por ejemplo: necrosis tisular⁹³, quimotaxis de infiltrados celulares, inducir la secreción de colagenasas y prostaglandinas por los fibroblastos sinoviales y condrocitos^{94, 95}, reabsorción ósea y destrucción del cartílago⁹⁶, al igual que una plétora de mecanismos microbicidas⁹⁷. Además, se han reportado niveles aumentados de IFN- γ en pacientes con brucelosis aguda⁶⁶; y otros estudios confirmaron que el IFN- γ y el TNF- α están involucrados en la patofisiología de la brucelosis y que se encuentran estrechamente relacionados con la activación inflamatoria de la enfermedad⁶⁶.

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

Activadores bacterianos de la respuesta inflamatoria

La mayoría de los rasgos relacionados con la patogenicidad de estas bacterias parecen estar concentrados en su membrana externa. Dentro de los componentes de la membrana con posible asociación a la patogenicidad, el LPS de *Brucella* ha suscitado especial interés^{98, 99}, a pesar de que ha sido demostrado que la mayoría de las características químicas, físicas y biológicas de esta molécula difieren cuantitativamente y cualitativamente del LPS “clásico” de las enterobacterias¹⁰⁰. A diferencia de otras endotoxinas, el LPS de *Brucella* no es pirogénico, no activa la cascada del complemento de manera significativa y es un mitógeno muy débil de linfocitos B murinos y humanos. Comparado con el LPS de las enterobacterias, se requieren concentraciones 100 veces más altas de LPS de *Brucella* para inducir muerte por shock endotóxico. En cuanto a la producción de mediadores inflamatorios, se ha demostrado que la actividad biológica del LPS de *Brucella* es entre 3 y 4 órdenes de magnitud menor que el LPS de las enterobacterias^{65, 72, 92}. Todas las propiedades biológicas del LPS dependen del lípido A, cuya estructura está conservada en un gran número de especies bacterianas¹⁰¹. La atenuada actividad biológica del LPS de *Brucella* parece estar relacionada con el lípido A de esta molécula y su particular estructura química mencionada anteriormente¹⁰²⁻¹⁰⁴.

El mayor enigma que plantea el estudio de la patogenicidad en brucelosis es cómo pueden las bacterias del género *Brucella* desencadenar una respuesta inflamatoria si la actividad endotóxica de su LPS es despreciable. En forma alternativa, *B. abortus* podría utilizar su ADN para provocar una respuesta pro-inflamatoria. El ADN bacteriano se encuentra enriquecido en motivos CpG no metilados los cuales han demostrado activar el sistema inmune innato¹⁰⁵. Sin embargo, se ha comprobado que el ADN de *B. abortus* es relativamente ineficiente en

desencadenar la producción de citoquinas⁹². Se ha demostrado recientemente que HKBA (*Brucella* muerta por calor) induce la producción de TNF- α a través de una vía dependiente de TLR2; transductor específico de peptidoglicano y lipoproteínas; e independiente de TLR4 y TLR9⁷³. Dado que el LPS y el ADN bacteriano utilizan TLR4 y TLR9, respectivamente, para estimular la producción de citoquinas, éste último hallazgo sostiene la noción de que el LPS y el ADN de *B. abortus* no están involucrados en desencadenar la respuesta pro-inflamatoria en brucelosis. Esto implica que otros componentes bacterianos son los responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria.

Estudios desarrollados por el director de esta tesis, así como investigaciones realizadas por otros grupos de trabajo¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, han demostrado que las lipoproteínas bacterianas, ligandos TLR2¹⁰⁹, son capaces de estimular la proliferación celular al igual que la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Este fenómeno está asociado a la acilación de estas proteínas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Además, se ha demostrado que las lipoproteínas bacterianas también son capaces de inducir la producción de IL-10, una citoquina anti-inflamatoria, en monocitos humanos¹¹⁰. La inhibición tanto autócrina como exócrina de la producción de IL-10 da como resultado un aumento en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12¹¹¹. El hecho de que las lipoproteínas puedan inducir no sólo citoquinas inflamatorias, sino también anti-inflamatorias, como IL-10, ha reforzado la idea de que las lipoproteínas son factores cruciales en la patogénesis de las infecciones bacterianas.

Mediante clonado y secuenciación se ha demostrado que 3 genes que codifican para Omps de *B. abortus*, Omp10, Omp16 y Omp19, exhiben características estructurales de precursores de lipoproteínas^{23, 112}, es decir que poseen un péptido señal aminoterminal que conforma la secuencia consenso necesaria para la modificación lipídica y el procesamiento de las lipoproteínas^{23, 112}. El correcto procesamiento de Omp10, Omp16 y Omp19 en *E. coli* sugiere que el camino de maduración para lipoproteínas es funcionalmente compartido entre *Brucella* spp. y *E. coli*²³. Análisis fisicoquímicos y funcionales confirmaron que Omp10, Omp16 y Omp19 son lipoproteínas y que se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa de *Brucella*²⁵. El mismo trabajo ha demostrado que estas lipoproteínas están presentes en todas las especies del género *Brucella* y sus biovars.

A pesar del poderoso potencial inmunomodulador de las lipoproteínas, se les ha prestado hasta el momento poca atención en la brucelosis, siendo nuestro grupo de trabajo un precursor en la investigación de la función de estas moléculas en la patogenia inflamatoria de la brucelosis^{10,}

113, 114

Sistema Nervioso Central

Dado que el trabajo se enfocará en los mecanismos de patogenia de la neurobrucelosis, es importante recordar como está formado el SNC y qué células del parénquima cerebral son las responsables de generar la respuesta inmune inflamatoria.

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. En él se integra y relaciona la información sensitiva aferente, se generan los pensamientos y almacena la memoria. El SNC está conectado con los receptores sensitivos, los músculos y las glándulas de las zonas periféricas del organismo, a través del sistema nervioso periférico (SNP). Este último está formado por los nervios craneales, que nacen en el encéfalo y los nervios raquídeos que nacen en la médula espinal. Una parte de estos nervios lleva los impulsos nerviosos hasta el SNC, mientras que otras partes transportan los impulsos que salen del SNC.

El componente aferente del SNP consiste en células nerviosas, llamadas neuronas sensitivas o aferentes, que conducen el impulso desde receptores sensitivos de varias partes del organismo hasta el SNC. El componente eferente consiste en células nerviosas llamadas neuronas motoras o eferentes, se originan dentro del SNC y conducen los impulsos nerviosos hasta músculos y glándulas.

Las **neuronas** del SNC están sostenidas por células no excitables que se denominan **neuroglía**. Estas células son más pequeñas que las neuronas y las superan de 5 o 10 veces en número (50% del volumen del encéfalo y la médula espinal). Hay 4 tipos principales de células neurogliales, los **astrocitos**, los **oligodendrocitos**, la **microglía** y las **células del epéndimo**.

El SNC está protegido por los huesos del cráneo y la columna vertebral, las meninges, el líquido cefalorraquídeo dentro del espacio subaracnoideo y la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo puede ser invadido y dañado por una gran variedad de microorganismos ¹¹⁵. La defensa del cuerpo contra estas infecciones involucra a las células residentes del SNC, especialmente a los astrocitos, la microglía, y las células inmunes que invaden el tejido nervioso desde la vasculatura ¹¹⁵.

Funciones de las células neurogliales

Los **astrocitos** tienen cuerpos celulares pequeños con prolongaciones que se ramifican y extienden en todas direcciones y que en su interior poseen filamentos intermedios. Estos filamentos intermedios están compuestos en su gran mayoría por una proteína denominada

proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) ¹¹⁶. Existen 2 tipos de astrocitos según su morfología celular y ubicación anatómica, los **fibrosos (tipo I)** se encuentran principalmente en la sustancia blanca (formada principalmente por las prolongaciones nerviosas: dendritas y axones) y los **protoplasmáticos (tipo II)**, se encuentran en la sustancia gris (constituida por los cuerpos neuronales) ¹¹⁷. Ambos, los fibrosos y los protoplasmáticos, proporcionan un marco de sostén, son aislantes eléctricos, limitan la diseminación de los neurotransmisores, captan iones de K⁺, almacenan glucógeno y tienen función fagocítica, ocupando el lugar de las neuronas muertas (gliosis de reemplazo). Son de origen neuroectodérmico y son esenciales para la homeostasis cerebral y las funciones neuronales ¹¹⁸. Además son los responsables de formar los limitantes de la glía alrededor de las venas restringiendo el acceso de las células inmunes al parénquima del SNC ¹¹⁹.

Los **oligodendrocitos** tienen cuerpos celulares pequeños y algunas prolongaciones delicadas; no hay filamentos en su citoplasma. Son los responsables de la formación de la vaina de mielina de las fibras nerviosas del SNC. Se cree que influyen en el microambiente de las neuronas ¹²⁰. Los oligodendrocitos se originan a partir de las células de un precursor propio O-2A (precursores de oligodendrocitos y astrocitos tipo-II) ¹²¹. Estas células progenitoras O-2A, son bipotenciales *in vitro* y pueden originar, también, una segunda población de astrocitos tipo-II ¹²².

La **microglía** son las células más pequeñas y se hallan dispersas en todo el SNC. En sus pequeños cuerpos celulares se originan prolongaciones ondulantes ramificadas que tienen numerosas proyecciones como espinas. Son inactivas en el SNC normal pero proliferan en la enfermedad y son activamente fagocíticas (su citoplasma se llena con lípidos y restos celulares). Pertenecen al linaje mielóide y **son consideradas los macrófagos del SNC**. Estas células son capaces de modificar su fenotipo y reactividad luego de una injuria o inflamación ¹²³.

Las **células endodiales** revisten las cavidades del encéfalo y el conducto central de la médula espinal. Forman una capa única de células cúbicas o cilíndricas que poseen microvellosidades y cilias. Las cilias son móviles y contribuyen al flujo de líquido cefalorraquídeo.

Ante una injuria, las primeras células del SNC que reaccionan son los astrocitos y la microglía. Los astrocitos responden con firmeza a las infecciones del SNC así como a las enfermedades desmielinizantes inflamatorias inducidas por células inmunes autorreactivas ¹²⁴. La astrocitosis reactiva característicamente incluye un aumento en el número y tamaño de células que expresan GFAP ¹⁹ y con frecuencia se supone que es el resultado de la proliferación astrogliar y migración de astrocitos que expresan GFAP desde las regiones vecinas. Este cambio fenotípico es complejo; implica la expresión de muchas moléculas nuevas no detectables en la

astroglía en reposo, así como el aumento en la modulación de una variedad de moléculas, además de GFAP, que se encuentran en astrocitos en reposo ¹²⁵.

Inmunidad e infección en el SNC

El SNC ha sido comúnmente tratado como un sitio inmuno-privilegiado ^{55, 126}. Sin embargo importantes estudios publicados durante los últimos 10 años indican que el SNC puede ofrecer un lugar para la respuesta inmune innata y la adaptativa ¹²⁷. Esto refleja la habilidad del SNC de luchar contra las infecciones a pesar de su supuesto estado inmunoprivilegiado ¹²⁸.

Las infecciones en el SNC siguen siendo de importante morbilidad y mortalidad ^{129, 130}. La invasión microbiana a través de la BHE es un prerrequisito para la infección del SNC. La BHE es una barrera funcional y estructural formada por células endoteliales vasculares, astrocitos y pericitos (células que se encuentran alrededor de capilares y están relacionadas con células del músculo liso). La asociación con los pericitos reduce la apoptosis endotelial y estabiliza la vasculatura, manteniendo el microambiente neural regulando el pasaje de moléculas dentro y fuera del cerebro, protegiendo el cerebro de cualquier microorganismo y toxinas que están circulando en la sangre ¹³¹⁻¹³⁴. Los astrocitos junto con las células microgliales y las endoteliales, regulan el reclutamiento de células hematopoyéticas infiltrantes y pueden afectar la translocación de algunos microorganismos ¹³⁵. Además de las actividades antimicrobianas de los astrocitos y la modulación de las vías de señalización de transducción en el cerebro, las células endoteliales junto con los pericitos pueden afectar la integridad de la barrera ^{136, 137}.

Los patógenos pueden atravesar BHE de forma transcelular, paracelular y/o infectando fagocitos (mecanismo de caballo de Troya) ¹³⁰. Consecuentemente los patógenos pueden causar la disfunción de la BHE, inclusive aumentar su permeabilidad, ocasionando pleocitosis y encefalopatías ¹³⁰.

La vía transcelular se refiere a la penetración del microorganismo a través de las células de la barrera sin evidencia del microorganismo entre las células o de disrupción de las uniones entre las mismas ^{130, 138}. La vía paracelular está definida como la penetración del microorganismo entre las células de la barrera con o sin evidencia de disrupción de las uniones de las células de la barrera. El mecanismo del Caballo de Troya involucra la penetración de la barrera utilizando trasmigración dentro de fagocitos infectados ^{130, 138}.

La vía transcelular ha sido demostrada para la mayoría de los patógenos bacterianos causantes de meningitis, incluyendo a *E. Coli* ^{129, 139, 140}, *Streptococos agalactiae* ^{129, 139, 141}, *S.*

pneumoneae^{129, 139, 142}, *Neisseria meningitides*^{129, 139, 143} y patógenos como hongos *Candida albicans*¹⁴⁴ y *Cryptococcus neoformans*¹⁴⁵. La vía paracelular ha sido sugerida para los protozoos como *Tripanosoma spp.*^{146, 147} y *Borrelia spp.*^{147, 148}, aunque estos microorganismos también han demostrado atravesar la barrera hematoencefálica de forma transcelular. El mecanismo de caballo de Troya ha sido sugerido para *Listeria monocitogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*^{31, 139} pero también se demostró que lo hacen por medio de la vía transcelular^{129, 139, 149-151}.

Consecuencias de la infección en el SNC

Como discutimos anteriormente, la infección de microorganismos al SNC puede inducir la disfunción de la BHE y afectar a la secreción y expresión de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión induciendo citotoxicidad y apoptosis en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, lo que resulta en un aumento en la permeabilidad de la BHE, pleocitosis y encefalopatías¹³⁹.

Una vez que los microorganismos logran atravesar la BHE, la infección en el SNC representa un desafío para la defensa contra los patógenos, debido a que el SNC cuenta con un sistema de vigilancia mínimo y no posee drenaje linfático¹⁵². Por lo tanto las células residentes del SNC deben ser capaces de montar una respuesta rápida y efectiva para controlar la infección hasta que las células del sistema inmune adaptativo periférico, macrófagos y linfocitos sean reclutadas.

Si bien la microglía juega un rol crucial en la respuesta inmune en el SNC^{123, 152-154}; los astrocitos, el tipo celular más numeroso de la glía, también son capaces de contribuir al ambiente inflamatorio^{118, 155}.

En estadios tempranos de la infección, productos bacterianos o virales activan el sistema inmune innato, en gran medida por medio de los receptores TLR (Toll-like receptors) que reconocen patrones moleculares específicos¹⁵⁶. La expresión de TLR ha sido demostrada en astrocitos murinos y humanos en reposo^{55, 157-159}, permitiendo a estas células responder a la infección. Ambos han demostrado tener TLR2^{157, 158}, TLR3¹³⁸, TLR4^{158, 160}, TLR5^{158, 160} y TLR9^{158, 160} los cuales son importantes para el reconocimiento de las bacterias¹⁶¹. La microglía también cuenta con la expresión de diferentes TLR: TLR1-13^{162, 163-165}.

Los astrocitos y la microglía han demostrado responder a señales de infecciones bacterianas como LPS, peptidoglicano, o motivos de ADN no metilados CpG, tanto *in vivo* como

in vitro, con incrementos en la secreción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, incluyendo interleuquina 6 (IL-6), TNF- α , IL-12, CCL2, CCL3 y CCL4^{159, 166-169}.

Los mediadores liberados por los astrocitos y la microglía luego del reconocimiento al patógeno disparan 2 tipos de eventos: i) activan células vecinas y amplifican la respuesta local iniciando la respuesta inmune innata y ii) modifican la permeabilidad de la BHE y atraen células inmunes de la circulación dentro del tejido neural, dando comienzo a la respuesta inmune adaptativa.

Entre las **citoquinas**, el TNF- α , el IFN- γ y la IL-1 son las principales activadoras de los astrocitos y la microglía. Estudios de perfiles genéticos en astrocitos expuestos *in vitro* a las citoquinas inflamatorias mencionadas demostraron que regulan genes involucrados en varias vías celulares (de la inmunidad innata y la adaptativa), la presentación de antígenos, la apoptosis, la migración de leucocitos y la permeabilidad de BHE^{170, 171}. Diversas citoquinas (IL-6, INF- β , TGF- β , GM-CSF, IL1- β , y TNF- α) tienen un efecto dual. Por un lado son pro-inflamatorias: aumentan la permeabilidad de la BHE y activan las células del endotelio. También producen la activación, diferenciación y proliferación de monocitos, microglía y astrocitos. Así mismo inducen la sobrevida y diferenciación de células B. Por otro lado el efecto anti-inflamatorio conduce a la inmosupresión y liberación de mediadores neuroprotectores⁵⁵.

Las respuestas de los astrocitos a las **quimiocinas** involucran la quimiotaxis, la proliferación celular y la supervivencia. Las quimiocinas como CCL2, CCL5, CCL20, CXCL10, CXCL12, CXCL1, CXCL2 y CX3CL1, poseen efectos duales. Un efecto pro-inflamatorio como el reclutamiento de monocitos y macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, y neutrófilos; y un efecto anti-inflamatorio como es la regulación de la mielinización y la actividad microglial. A su vez inducen la proliferación y sobrevida de los astrocitos y la migración de microglía y progenitores neurales⁵⁵. Además, CXCL12 y CCL5, pueden inducir la liberación de glutamato y la síntesis de citoquinas y quimiocinas, evidenciando el rol de esta clase de moléculas en la regulación de la comunicación entre glía-glía y glía-neurona^{155, 172}.

Los factores derivados de astrocitos, tales como GM-CSF, IL-6, CCL2 y CCL5 regulan la migración microglial, la activación y proliferación celular. Algunos mediadores solubles derivados de las células gliales, incluyendo CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL12 y BAFF, también son responsables de la activación la inmunidad adaptativa en el SNC inflamado.

Los astrocitos además de quimiocinas y citoquinas, liberan **factores neurotróficos**. Los factores neurotróficos tales como NGF, CNTF, BDNF, VEGF, IGF1 y LIF, poseen mayormente

actividad anti-inflamatoria generando sobrevida, diferenciación y regeneración neuronal. Así como sobrevida de oligodendrocitos, promoviendo la remielinización y la neurogénesis⁵⁵.

La infección viral también puede inducir expresión de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias en astrocitos a través de mecanismos aún no determinados^{54, 166, 173, 174}. Las quimiocinas sirven como señales de reclutamiento *in vivo* para neutrófilos (MIP-2), monocitos y linfocitos (MCP-1 y MIP-1 α respectivamente). Mientras que IL-1 β y TNF- α suelen alterar la permeabilidad de la BHE e inducir la expresión de moléculas de adhesión críticas en el endotelio vascular del SNC.

Estudios recientes demuestran que las metaloproteasas (MMP) MMP2 y MMP9 son requeridas para inducir neuroinflamación intraparenquimal^{119, 175}. Estas observaciones proveen un escenario para la interacción entre células T y macrófagos luego de la restimulación perivascular y/o por señales de los neutrófilos (quimiocinas como MCP-1, conocida como CCL2¹⁷⁶) induciendo la expresión de MMP y otras exoenzimas, permitiendo la penetración de la glía limitante¹⁷⁷.

Durante el curso de la infección en el SNC, la infiltración de células inmunes de la periferia también es una fuente potencial de citoquinas pro-inflamatorias que pueden luego activar a los astrocitos y la microglía. El balance entre los caminos inflamatorios y los inmunosupresores es fundamental para controlar las reacciones ante un trauma en el SNC. La desregulación de estos caminos puede llevar a la neuroinflamación y neurodegeneración crónica.

Inflamación y apoptosis

La inflamación contribuye a una amplia variedad de patologías cerebrales (Enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple, síndrome de demencia asociado al SIDA, etc.), así como a la meningitis y el accidente cerebrovascular¹⁷⁸⁻¹⁸². Estas patologías tienen diferentes causas y cursos, pero todos involucran la inflamación cerebral. Hay diferentes tipos de inflamación y es importante entender por qué a veces la inflamación es protectora y otras dañina¹¹⁷. Se han identificado varios mecanismos por los cuales astrocitos y microglía activados como consecuencia de la inflamación, inducen la muerte neuronal¹¹⁷.

La muerte celular programada es crucial durante el proceso de desarrollo y la homeostasis de los organismos, su desregulación está asociada a numerosas patologías, incluida la patología inflamatoria. Es inducida generalmente luego de una infección como parte de un mecanismo de defensa del hospedador frente al patógeno¹⁸³. La apoptosis de las células del hospedador durante

la infección funciona como un mecanismo de defensa destruyendo el sitio de replicación donde se encuentra el patógeno.

Las características fenotípicas de la apoptosis incluyen la fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina, el encogimiento celular y la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta sistémica inflamatoria. La ejecución de la apoptosis requiere de la expresión *de novo* de genes y síntesis de proteínas¹⁸⁴.

El proceso de apoptosis puede ocurrir por múltiples caminos, que pueden ser independientes, sin embargo, puede haber comunicación entre ambos. La apoptosis puede ocurrir a través de dos caminos; uno involucra la activación de cisteína proteasas, llamadas caspasas y el otro involucra la liberación de factores apoptóticos independientes de caspasas por parte de la mitocondria¹⁸⁴.

La apoptosis mediada por **casapas puede ocurrir vía extrínseca o intrínseca**. La **vía extrínseca** involucra receptores de membrana presentes en múltiples tipos celulares incluyendo neuronas; involucra al receptor de TNF (TRADD) y el de Fas (FADD). Estos complejos señalizadores de muerte luego se unen e inducen el autoclivaje y activación de caspasas. La **vía intrínseca** es iniciada por estrés en organelas celulares, incluyendo la mitocondria y el retículo endoplasmático. La liberación del citocromo c luego de la despolarización de la membrana mitocondrial y la formación de poros de transitorios que la permeabilizan. Éste interactúa con proteasas apoptóticas activando al factor 1 (Apaf-1), ATP, y procaspasa 9, par formar el apoptosoma y llevar así a la muerte celular programada¹⁸⁴.

La apoptosis **independiente de casapas involucra vías de proteínas mitocondriales**. El factor de inducción de apoptosis (AIF) puede ser liberado desde la mitocondria luego de la despolarización de su membrana. Esto ocurre, por ejemplo, en neuronas bajo condiciones de estrés oxidativos. Otras proteínas mitocondriales relacionadas con la apoptosis incluyen la endonucleasa F, Htr2A/Omi, y Smac/Diablo¹⁸⁴.

La regulación de la apoptosis tanto la vía dependiente como independiente de caspasas depende de la familia de proteínas del linfoma de células B (Bcl2), que incluye miembros pro y anti-apoptóticos. La apoptosis también puede estar regulada por una vía intracelular de transducción de señal. Perturbaciones en la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAP-K) pueden ocurrir luego del daño cerebral. Varios de los componentes de la vía de las MAPK, c-Jun y p38 son diferencialmente activados dependiendo de la región cerebral y el tiempo de injuria¹⁸⁴.

Neurobrucelosis

La neurobrucelosis fue descrita por primera vez en 1897 por Hughes, quien aisló el agente patógeno a partir del tejido cerebral de un caso mortal¹⁸⁵. La neurobrucelosis ha sido considerada una complicación rara, sin embargo la frecuencia puede llegar hasta el 18% de los casos de brucelosis^{19, 186}. Algo que es importante destacar es que si bien no es la focalización más frecuente, es la más mórbida. Tanto el SNC como el SNP pueden ser afectados y su prognosis es aciaga⁴³. La mayoría de los casos de neurobrucelosis se describieron en individuos infectados por *B. melitensis*, pero también existen casos relacionados con *B. suis*, *B. abortus* y *B. pinipedae*^{4, 74, 187, 188}. Hasta el momento no queda claro si la mayor proporción de neurobrucelosis debido a *B. melitensis* se debe a características intrínsecas de la especie (un tropismo especial hacia SNC respecto de otras especies de *Brucella*), a factores epidemiológicos como la forma de transmisión o simplemente al sesgo.

Esta focalización puede iniciarse en forma constitutiva o puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad. El compromiso neurológico generalmente ocurre por diseminación sanguínea, pero puede ser también secundaria a la extensión de un foco de osteítis del cráneo¹⁸⁹. Se estima que las lesiones pueden ser producidas por la presencia directa de la bacteria, la acción de citoquinas inflamatorias o por el efecto dañino de la respuesta inmuno patológica¹⁹⁰. Las manifestaciones neurológicas pueden o no estar acompañadas por síntomas sistémicos. Mientras que la meningoencefalitis es la manifestación clínica más frecuente, otras condiciones patológicas como mielitis, radiculitis, poliradiculitis, Síndrome de Guillian-Barré¹⁹¹, compromiso cerebrovascular, astrogliosis, abscesos cerebrales y neuropatías periféricas también han sido descritos¹⁹⁰.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de neurobrucelosis debe basarse en datos clínicos, epidemiológicos, de imágenes y de laboratorio. Si bien la historia de una probable fuente de infección es fundamental para el diagnóstico de la brucelosis, algunos autores han reportado casos de neurobrucelosis en donde los datos epidemiológicos no fueron de ayuda^{19, 192}.

El aislamiento de la bacteria a partir de líquido cefalorraquídeo (LCR) para confirmar el diagnóstico es muy difícil y solo es exitoso en un 20% de los casos⁴⁴. Por lo tanto se utilizan diferentes técnicas [aglutinaciones, fijación del complemento, ELISA y ensayo de polarización

fluorescente (FPA)] para detectar anticuerpos específicos en el LCR. Estas pruebas junto con tomografías computadas (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN), son herramientas indispensables para el diagnóstico y el tratamiento de la neurobrucelosis.^{193, 194}

Tratamiento

En el caso de la neurobrucelosis los antibióticos que se utilicen deberían contar con ciertas características como la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y mantenerse a concentraciones adecuadas en el LCR, además de los requisitos generales de acción contra la *Brucella*: que tengan penetración y actividad intracelular.

Para el tratamiento de esta afección se utiliza la combinación de 3 drogas: doxicilina combinada con rifampicina y gentamicina es el más utilizado. Aunque doxicilina con rifampicina y trimetropina/sulfametazona es un tratamiento alternativo⁴³. Se desaconseja el uso de estreptomina, dado que tiene baja capacidad de penetrar dentro del líquido cefalorraquídeo y debido a su potencial neurotóxico¹⁹⁵. El uso de corticoesteroides en etapas tempranas de la meningoencefalitis suele ser beneficioso¹⁹⁵. El tratamiento es por lo general eficaz con los tratamientos disponibles, aunque de vez en cuando los pacientes desarrollan síntomas persistentes o recurrentes¹⁹⁰.

La recuperación se basa en el seguimiento clínico, con serologías en sangre y toma de muestras de LCR periódicas hasta observar "curación" clínica y una tendencia a la disminución de la serologías; aunque pueden no negativizarse nunca sin ello indicar infección activa. El tiempo recomendado de tratamiento para la neurobrucelosis ronda las ocho semanas, extendiéndose incluso más de 15 meses si es preciso. La duración del tratamiento debe ser individualizado dada la ausencia de un índice corte adecuado¹⁹⁰.

En los casos de afectación neurológica por compresión extrínseca (medular, craneal), puede estar indicada la cirugía, así como en los casos que desarrollan una hidrocefalia secundaria a meningitis.

Manifestaciones clínicas

La neurobrucelosis puede presentarse al principio (forma aguda) o en cualquier etapa posterior de la enfermedad (formas sub aguda y crónica)^{7, 196}. Por otra parte, se puede manifestar

como un episodio agudo varios meses después de la recuperación clínica¹⁸⁶. Los pacientes generalmente no presentan enfermedades asociadas^{7, 19}. Sin embargo, se han informado casos con condiciones asociadas tales como tumor cerebral o la sinusitis maxilar^{196, 197}. En zonas endémicas, se debe sospechar de brucelosis en cualquier paciente con un síndrome neurológico sin explicación¹⁹⁴.

Como cualquier otra focalización de la brucelosis, la neurobrucelosis puede presentarse junto con los síntomas generales de esta afección descriptos anteriormente. Sin embargo, los hallazgos clínicos y patológicos de la neurobrucelosis más frecuentes se describen en la **Tabla 2**.

Las manifestaciones neurológicas, como meningitis, encefalitis, mielitis, radiculitis y neuritis, se pueden presentar con o sin síntomas sistémicos, y pueden estar asociadas con otras formas de focalización de la brucelosis^{19, 42, 198}. La meningitis brucelar se puede presentar como una meningitis aguda, subaguda o crónica. El examen del fluido cerebroespinal en meningitis provocada por *Brucella* generalmente revela alto contenido proteico (superior a 2 g/l), pleocitosis linfocítica, la producción de anticuerpos intratecales anti-*Brucella*^{147, 186} y glucosa baja, aunque puede ser normal.

Meningitis
Radiculitis y neuritis
Mielitis y mielopatía
Neuropatías craneales
Narcolepsia-cataplejía
Síndrome parkinsoniano
Corea
Síndrome cerebeloso
Lesiones desmielinizantes focales
Manifestaciones paroxísticas
Vasculares
Neuritis óptica
Infarto
Hemorragia subaracnoidea
Aneurisma micótico
Epilepsia
Migraña
Hipertensión intracraneal pura
Oculomotores

Tabla 2: Categorías de cuadros clínicos con demostración de afectación directa de *Brucella* spp. en el SNC o SNP.

Otras manifestaciones patológicas de neurobrucelosis incluyen poliradiculoneuritis, poliomielitis anterior, síndrome de Guillain-Barré, trastornos cerebrovasculares, supuración del cerebro, absceso epidural, corea, parkinsonismo, y pseudotumores cerebrales^{199, 200}.

Madkour y col.²⁰¹ ha descrito condiciones neurológicas primarias y secundarias. Las condiciones primarias incluyen manifestaciones como meningoencefalitis, mielitis, Síndrome de Guillain-Barré, complicaciones cerebrovasculares, supuración cerebral, y esclerosis múltiple. Las condiciones secundarias incluyen la espondilitis con absceso epidural, compresión medular, la radiculopatía, y neuropatías periféricas.

Otros autores²⁰² han clasificado la neurobrucelosis en forma central y periférica. Las formas centrales se presentan como meningoencefalitis y las formas periféricas como poliradiculoneuritis. Mientras que la mayoría de los casos de neurobrucelosis presentan la participación tanto a nivel central como periférico, existen casos con la participación primaria

del SNP²⁰². Sin embargo, la participación aislada del SNP es poco frecuente^{203, 204}. La meningoencefalitis es el síndrome más frecuente en neurobrucelosis, y ha sido descrito en más del 90% los pacientes con neurobrucelosis^{205, 206}. Aunque esta forma clínica predomina en los varones adultos, se ha descrito también en niños^{207, 208}.

La encefalitis y la mielitis pueden deberse tanto a la acción directa de la bacteria en el tejido cerebral como en la médula espinal²⁰⁸. La presentación clínica puede ser aguda, subaguda, o crónica. En la mayoría de los casos, las manifestaciones iniciales son fiebre, dolor de cabeza, fotofobia, y vómitos. Además, hasta el 60% de los pacientes pueden presentar síntomas sistémicos, como artralgia, mialgia, astenia y sudoración¹⁹.

El síndrome de Guillain-Barré es una polirradiculoneuropatía que se manifiesta como una enfermedad inflamatoria aguda desmielinizante y que resulta de la autorreactividad inmune a antígenos del SNP. El síndrome puede ser consecuencia de enfermedades infecciosas (en el 60% de los casos), vacunas, cirugías, o enfermedades malignas, y ha sido asociada con brucelosis por algunos autores^{191, 194, 209, 210}. Desde el punto de vista clínico, el síndrome se caracteriza por una parálisis simétrica de las extremidades con la pérdida de reflejos, discapacidad sensorial, la participación de los músculos respiratorios, la parálisis de la vejiga, y la regulación deficiente de la presión sanguínea arterial. El análisis del LCR revela el incremento de la concentración de albúmina.

La neurobrucelosis también puede manifestarse como ataques isquémicos transientes²¹¹, ocasionar granulomas brucelares intramedulares cervicales²¹² y abscesos intramedulares²¹³. A su vez en un estudio retrospectivo de casos de neurobrucelosis se manifestaron síntomas como dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, vómitos, pérdida de conocimiento, paraplejia, pérdida de la visión y ataxia²¹⁴.

La neurobrucelosis también suele cursar con síntomas neuropsiquiátricos. Estos incluyen irritabilidad y depresión. Además, pueden presentarse alteraciones del estado mental tales como obnubilación, deficiencias neurológicas, alteraciones intelectuales, convulsiones y coma^{82, 215}.

Patobiología

La afectación del SNC por lo general ocurre a través de la diseminación sanguínea en etapas tempranas de la enfermedad, dando lugar a la meningitis, que puede ser clínica o subclínica. Desde el emplazamiento meníngeo, la bacteria puede llegar a afectar tejidos nerviosos vecinos²¹⁶. En raras ocasiones, los resultados de la invasión al SNC son consecuencia

de una extensión de una lesión focal granulomatosa o supurativa de una vértebra o una osteítis del cráneo⁷⁷.

Los mecanismos precisos por los cuales la bacteria entra en el SNC no se conocen. Las especies lisas de *Brucella* han desarrollado varios mecanismos para sobrevivir dentro de la célula, especialmente dentro de los macrófagos^{10, 28}. Por lo tanto, la infección por medio de los fagocitos (caballo de Troya) es un mecanismo posible para la entrada al SNC. Además, la bacteria puede invadir células fagocíticas no profesionales^{11, 217}. Por lo tanto, otra posible vía de infección e invasión al SNC sería a través de células endoteliales¹³⁰.

Prácticamente no hay estudios patológicos en la literatura. Solo se han realizado biopsias en casos sospechosos de tumor cerebral u otra manifestación clínica. Las alteraciones tisulares descritas incluyen diferentes grados de inflamación vascular, desde infiltrados crónicos (mononucleares, plasmáticas y macrófagos) o agudos (polimorfonucleares), inflamación meníngea difusa; edema cortical; granulomas no caseificantes e infiltrados inflamatorios en el perineuro de las raíces nerviosas. No hay casos patológicos correspondientes a lesiones de tipo desmielinizante en la resonancia magnética.

Entre los casos clínicos en los que se realizaron biopsias de cerebro fueron, por ejemplo, en el de dos ciudadanos peruanos¹⁸⁸, en uno de ellos fue a partir de donde se aisló por primera vez *B. maris* (que luego se subdividió a las especies *B. pinipedae* y *B. cetaceae*). En ambos casos se encontraron infiltrados linfocíticos perivasculares y granulomas junto con **astrogliosis**¹⁸⁸. En otro caso un niño de 14 años que había sido diagnosticado y tratado para brucelosis, luego de 4 meses de haber finalizado con el tratamiento comenzaron los síntomas que referían al compromiso neurológico (pérdida de conocimiento y convulsiones)²¹⁶. Los resultados histopatológicos mostraron un infiltrado compuesto por linfocitos y células plasmáticas, indicando un proceso inflamatorio crónico no granulomatoso en el tejido cerebral y en las meninges adyacentes. La corteza estaba infiltrada, especialmente en la zona perivascular. Si bien se observó **astrogliosis** y una intensa reacción inflamatoria, no se aislaron microorganismos²¹⁶. Otros casos en niños reportaron pérdida de la visión y del oído²¹⁸ y cuadriplegia²¹⁹.

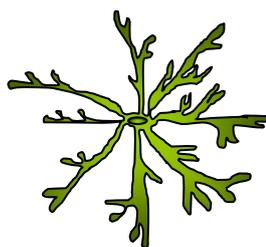
Recientemente, en un caso de neurobrucelosis fue descrita la afectación difusa de la sustancia blanca con un patrón parecido al de leucoencefalopatía. La biopsia reveló una **astrogliosis** recativa y el infiltrado inflamatorio estaba predominantemente compuesto de células T, incluyendo numerosos linfocitos T citotóxicos (CTL)²²⁰. Algunos autores creen que déficit de la clínica y anomalías en la RM son mediadas, al menos en parte, por los mecanismos mediados por linfocitos T citotóxicos de la sustancia blanca y la corteza cerebral.

Se cree que la asociación entre las infecciones bacterianas y el desarrollo de Síndrome de Guillain-Barré es el resultado de mimetismo molecular entre las estructuras del núcleo exterior de lipo-oligosacáridos bacterianos y los gangliósidos humanos^{221, 222}. Esto fue demostrado para *Campylobacter jejuni*, bacteria frecuentemente asociada con el desarrollo de Síndrome de Guillain-Barré²²³, dado que expresa lipo-oligosacáridos estructuralmente homólogos al gangliósido GM1 en su superficie²²¹

Como quedó evidenciado, a pesar de no contar con muchos estudios patológicos, en los casos de brucelosis en los que se realizaron descripciones microscópicas de las patologías del SNC se han reportado consistentemente **astrogliosis** (es decir proliferación y apoptosis de astrocitos) y **microgliosis reactiva**^{188, 220}.

La dificultad en el diagnóstico de la neurobrucelosis y la escasez de biopsias de cerebro hace que el conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad sea escaso. Allí radica la importancia de establecer un modelo que permita el estudio de la misma y así esclarecer cómo el deterioro de las funciones de la astrogliá y microglía por *Brucella* contribuye al desarrollo de ésta y otras enfermedades neurológicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



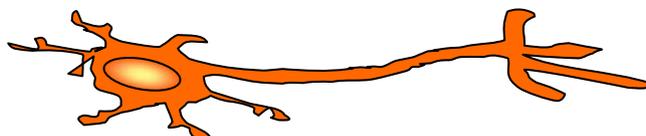
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es dilucidar los determinantes de la patogénesis de la neurobrucelosis, es decir la brucelosis del SNC.

Nosotros sostenemos que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la brucelosis ²²⁴. Por lo tanto, durante la invasión al SNC por parte de *Brucella*, la respuesta inflamatoria generada contra este organismo podría también contribuir a la patogénesis de la neurobrucelosis. **Las 2 hipótesis principales que serán exploradas en este trabajo son 1) que las interacciones de *B. abortus* con las células del SNC pueden estimular en las mismas la producción de mediadores inflamatorios y que 2) esas respuestas inflamatorias pueden causar astrogliosis y activación de la microglía, 2 de los signos patológicos más frecuentes de la neurobrucelosis.** La hipótesis secundaria que será examinada es que las lipoproteínas de *B. abortus*, y no su LPS, pueden inducir, parcial o totalmente, los efectos inflamatorios producidos por la bacteria. Un corolario de nuestra hipótesis secundaria es que la inmunidad innata, en la forma de una respuesta contra un patrón molecular asociado a patógenos (en este caso lipoproteínas) ejerce vía los TLR alguno o todos los efectos inflamatorios desencadenados por *B. abortus*.

La corroboración de ambas hipótesis implica un mecanismo patogénico para la brucelosis en el SNC.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para las inyecciones estereotácticas, se utilizaron ratones BALB/c (hembras) de 6 a 8 semanas de vida. Para los cultivos primarios de astrocitos y microglía se utilizaron ratones de 1 a 3 días de vida BALB/c (provistos por el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica), ratones C57BL/6 que carecen de la subunidad p55 de receptor de TNF- α (TNFR p55^{-/-}) (provistos por la Dra. Silvia de Genaro, Universidad de San Luis, San Luis, Argentina)²²⁵, ratones C57BL/6 salvajes (provistos por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) y ratones C57BL/6 que carecen del receptor TLR2 (TLR2 KO) (provistos por el Dr. Sergio Oliveira, Minas Gerais, Brasil). Los animales fueron alojados en condiciones controladas de temperatura (22°C \pm 2°C) y luz artificial bajo ciclos de 12 h en un ambiente libre de patógenos en un gabinete de presión positiva (EHRET, Emmendingen, Alemania) y fueron provistos de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo a las reglas y estándares de los usos de animales de laboratorio aprobados por el comité de ética del Instituto Fundación Leloir y el Instituto IDEHU.

Bacterias

B. abortus S2308 fue cultivada en medio de triptosa-soja suplementado con extracto de levadura (Merck, Buenos Aires, Argentina). El número de bacterias en la fase estacionaria se determinó comparando la DO a 600 nm con una curva estándar como fuera descrito previamente por Giambartomei y col¹¹³. Luego el cultivo de *Brucella* fue lavado 5 veces por 10 min cada vez en PBS estéril, y se hirvió durante 20 min para obtener *Brucella* muerta por calor (Heat killed *Brucella abortus*, HKBA). Se realizaron alícuotas de esta preparación y se guardaron a -70 °C hasta ser utilizadas. La ausencia de viabilidad de *B. abortus* subsiguiente a la muerte por calor fue verificada por la ausencia de crecimiento en triptosa-agar.

Lipoproteínas y LPS

La proteína de membrana externa de *B. abortus* de 19 kDa lipidada (L-Omp19) así como la versión no lipidada de la misma (U-Omp19) fueron obtenidas como fue descrito previamente por Giambartolomei y col¹¹³. Ambas proteínas recombinantes contenían menos de 0,25 unidades endotóxicas/ μ g según fue determinado por el ensayo de *Limulus Amebocyte Lysates* (Associates of Cape Cod). El LPS de *B. abortus* S2308 y el LPS de *Escherichia coli* O111k58H2 fueron provistas por el Dr. I. Moriyón (Universidad de Navarra, Pamplona, España). El lipoheptapéptido sintético [tripalmitoyl-S-glycerol-Cys-Ser-Lys4-OH (Pam₃Cys)] fue comprado a Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

Inyecciones estereotácticas intracraneales

Para las inyecciones estereotácticas, los animales ($n = 5$) fueron anestesiados con ketamina clorhidrato (150 mg/kg) y xylazin (15 mg/kg) y luego fueron inyectados en el cuerpo estriado del hemisferio izquierdo del cerebro con 1 μ l de HKBA (1×10^6 bacterias), L-Omp19 (500 ng), U-Omp19 (500 ng) o solución de PBS (control negativo), utilizando un capilar de 50 μ m. Las coordenadas del cuerpo estriado izquierdo fueron: bregma + 0,4 mm; lateral + 1,8 mm; ventral - 3,0 mm²²⁶. Las inyecciones con HKBA, U-Omp19, L-Omp19 o solución de PBS fueron administradas en el transcurso de 4 min, y el capilar fue dejado en el lugar por 2 min adicionales antes de retirarlo. Luego de 24 h los animales fueron sacrificados.

Histología e inmunohistoquímica

Los animales fueron anestesiados y perfundidos transcardiacamente con una solución de heparina seguida de paraformaldehído (PFA) 4% frío 0,1 M en PBS. Luego de remover los cerebros, éstos fueron colocados en la misma solución fijadora toda la noche a 4 °C. Posteriormente, los tejidos fueron crioprotectados sumergiéndolos en sacarosa 30%, congelados en isopentano y seccionados en cortes seriados mediante un crióstato (30 μ m) a lo largo del estriado en el plano coronal. Se utilizaron secciones de 30 μ m para la tinción con violeta de cresilo, para determinar la morfología nuclear o para determinar la presencia de proteína fibrilar ácida (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), un marcador de activación de astrocitos. Para detectar las células GFAP⁺, las secciones flotantes fueron incubadas en solución de bloqueo (1% suero de burro, 0,1% Tritón en 0,1M PBS) por 45 min, y enjuagadas en 0,1% Tritón en 0,1M

PBS, e incubadas toda la noche con anticuerpo anti-GFAP (DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluído 1:700 en solución de bloqueo. Después de 3 lavados, las secciones fueron incubadas con anticuerpos de burro-anti-conejo conjugados con Cy2 (1:250; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc, West Grove, PA) por 2 h, enjuagadas en 0,1 M PBS y montadas en Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA). Las imágenes digitales fueron obtenidas con un microscopio láser confocal Zeiss LSM 510 equipado con un láser de kriptón-argón.

Cultivos celulares

Los cultivos primarios de células gliales fueron obtenidos a partir de cerebros de ratones de 1 a 3 días de vida BALB/c, C57BL/6, C57BL/6 TNFRp55^{-/-} o C57BL/6 TLR2 KO siguiendo los procedimientos publicados en ²²⁷. Los cerebros fueron cuidadosamente separados de las meninges, cortados y disociados mediante el uso de pipetas seguido de un tratamiento con tripsina junto con agitación por 20 min a temperatura ambiente. Las células fueron colocadas en botellas de cultivo de 75 cm² (TPP, Renner, Alemania) previamente tratadas con poly-lisina y crecidas en una estufa con 95% aire, 5% CO₂, en DMEM alta glucosa (Hyclone) conteniendo 10% suero fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, Nueva York) suplementado con 2 mM L-glutamina, 1mM piruvato de sodio, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y 25 µg/ml fungizona (GIBCO BRL) (medio completo). El medio se cambió luego de 24 h y cada 3 días. Después de 10 días aproximadamente se obtuvo la confluencia celular. La microglía fue separada del cultivo mixto de células gliales por medio de agitación durante 1 h a 180 rpm. Las células fueron recolectadas del sobrenadante, centrifugadas y cultivadas en placas de 24 pocillos (GBO, Greiner Bio One, Maybachstrasse, Alemania), colocando 1 x 10⁶ células/pocillo en medio completo. Luego de 1 h se cambió el medio para remover las células no adheridas. Para obtener astrocitos puros, los cultivos de células gliales mixtos que habían alcanzado confluencia celular luego de 10 días de cultivo, fueron colocados en agitación por 3 h a 180 rpm para eliminar la microglía y oligodendrocitos que crecían como una monocapa sobre éstos. Las células remanentes fueron tratadas con tripsina, lavadas y centrifugadas; la suspensión obtenida se colocó en botellas de 75 cm² y se dejó a temperatura ambiente para permitir que se adhiriera la microglía en la superficie del plástico. Treinta minutos después, las células no adheridas (astrocitos) se centrifugaron y se resuspendieron en medio completo en placas de 24 pocillos colocando 1 x 10⁶ células/pocillo.

La pureza celular se corroboró mediante citometría de flujo. Para la detección de microglía, las células se marcaron con anticuerpos anti-ratón CD11b-FITC (clon M170) (BD

Pharmingen, San Diego, CA) o con el respectivo control de isotipo. Para la detección de oligodendrocitos, las células se marcaron con anticuerpos anti-O₄-FITC (Chemicon, Temecula, California) o con el respectivo control de isotipo. Para la detección de los astrocitos, las células fueron fijadas con 4% PFA en PBS por 10 min a temperatura ambiente. Luego fueron permeabilizados con Tritón X-100 (0.1% en PBS) por 5 min a temperatura ambiente. Más tarde las células fueron bloqueadas con suero normal de cabra por 30 min. Después, fueron incubados por 30 min en hielo con anticuerpos anti-GFAP (1:200) (BioGenex Laboratories, San Ramon, California) o con el respectivo control de isotipo seguido de un anticuerpo de cabra F(ab')₂ anti-ratón IgG (1:50) por 30 min en hielo. Subsecuentemente, las células fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, California), adquiriendo 10.000 eventos. Los datos fueron procesados y normalizados (se graficaron como % of maximum) utilizando el software de FlowJo (Tree Star).

Infección in vitro

Los astrocitos y la microglía fueron cultivados en placas de 24 pocillos colocando 1 x 10⁶ células/pocillo en medio completo (sin el agregado de antibióticos). La infección con *B. abortus* S2308 fue realizada a diferentes multiplicidades de infección (MOI) y luego las células fueron incubadas por 2 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5%. Luego los astrocitos y la microglía fueron lavados extensivamente con DMEM para remover las bacterias extracelulares e incubados en medio suplementado con 100 µg/ml gentamicina y 50 µg/ml estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares que pudieran haber quedado. A diferentes tiempos post-infección las células fueron lavadas 3 veces con PBS antes de procesarlas. Para monitorear la sobrevida intracelular de la bacteria, las células infectadas fueron lisadas con 0,1% (vol/vol) Tritón X-100 en H₂O, después de lavar con PBS y hacer diluciones seriadas de los lisados, se cultivó en placas con TBS agar para contar unidades formadoras de colonias (UFC).

Estimulación de citoquinas y quimiocinas

Cultivos primarios de microglía y astrocitos fueron infectados (como se describió anteriormente) o incubados por 24 h con LPS *B. abortus* (1 µg/ml), LPS *E. coli* (1 µg/ml), HKBA (1 x 10⁷ - 1 x 10⁹ bacterias/ml), U-Omp19, (500 ng/ml), L-Omp19 (10, 100 o 500 ng/ml) o Pam₃Cys (50 ng/ml). Luego se cuantificó la secreción de IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1 en

sobrenadantes de cultivo mediante ELISA de BD y la secreción de KC (CXCL1) fue cuantificada con ELISA de R&D Systems Inc. (Mineapolis, MN, USA).

Proliferación de astrocitos

Los astrocitos fueron cultivados (2×10^4 células/pocillo) en medio completo en placas de 96 pocillos de fondo plano (GBO). Luego de 24 h, el medio de cultivo fue reemplazado con medio sin suero por 24 h y las células fueron tratadas con HKBA (1×10^9 bacterias/ml), L-Omp19 (500 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml), mIL-6 (10 ng/ml) o medio de cultivo (SFB 2%). Cinco días más tarde se le agregó 1 μ Ci de [³H]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) a cada pocillo. Después de 18 h, las células fueron cosechadas en filtros de papel, secados y cuantificadas utilizando un analizador de líquido de centelleo 1600TR (Pachard Instruments, Meriden, CT, USA). Cada ensayo fue realizado por triplicado. Los resultados fueron expresados como la media del total de cpm \pm S.E.M. Para estudiar el efecto de IL-6 endógena, los astrocitos (1×10^6 células/ml) fueron incubados con HKBA (1×10^9 bacterias/ml) o L-Omp19 (500 ng/ml) en presencia de anticuerpos neutralizantes de IL-6 (clone MQ2-13A5) (eBioscience) o su respectivo control de isotipo (20 μ g/ml).

La proliferación celular también fue corroborada mediante la incorporación de BrdU y por citometría de flujo. Brevemente, los astrocitos purificados fueron obtenidos como se describió anteriormente, y se estimularon durante 5 días con HKBA (1×10^9 bacterias/ml), o con medio de cultivo (SFB 2%) en presencia de BrdU (10 μ M). Luego las células fueron cosechadas, fijadas, permeabilizadas, teñidas con un anticuerpo anti-BrdU-FITC y analizados mediante la incorporación de BrdU con el citómetro de flujo FACSCalibur®. Los datos fueron procesados por el software de FlowJo (Tree Star).

Ensayos de apoptosis

Para determinar la apoptosis cultivos primarios de astrocitos fueron cultivados en placas de 24 pocillos (1×10^6 células/pocillo) y estimulados por 24 h con HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacteria/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (10, 100 o 500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml), TNF- α (5 ng/ml), o PFA 2%. Luego, se recuperaron mediante la utilización de tripsina y se incubaron con Anexina V-FITC / Ioduro de Propidio (IP) por 10 min en hielo. Posteriormente se analizó la apoptosis por citometría de flujo con un citómetro de flujo FACSCalibur® y los datos fueron procesados utilizando el software de FlowJo (Tree Star).

A su vez la apoptosis también fue aseverada cuantitativamente por el ensayo de TUNEL utilizando Fluorescein-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem, San Diego, USA); por tinción con Hoechst dye 33342 (que permitió visualizar morfología nuclear) o por anexina V-FITC/IP. Para ello las células fueron cultivadas (2×10^5 células/pocillo) en cámaras de permanox (Nunc, Roskilde, Dinamarca), y estimuladas utilizando los mismos estímulos que los mencionados anteriormente. Las células marcadas fueron analizadas y cuantificadas por microscopía de fluorescencia. El porcentaje de células que presentaban apoptosis (apoptosis temprana más apoptosis tardía) fue calculado mediante la relación entre células FITC⁺ + FITC⁺/PI⁺ y el número total de células por campo x 100.

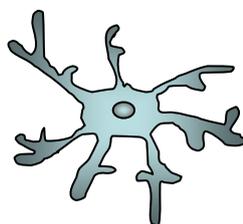
Bloqueo de la actividad de caspasas

Se cultivaron astrocitos (1×10^6 células/pocillo) en placas de 24 pocillos y se trataron con o sin un inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (R&D Systems) (50 μ M) por 2 h, luego fueron incubadas por 24 h con HKBA (1×10^9 bacterias/ml), L-Omp19 (500 ng/ml), Pam₃Cys (0,1 μ g/ml), TNF- α (5 ng/ml), Staurosporina (STS, 1 μ M) (Sigma, Steinheim, Alemania) o con medio de cultivo. Posteriormente se determinó apoptosis mediante la tinción con anexina V/IP y se analizó por citometría de flujo como se describió anteriormente.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA 1 factor, seguido de un ensayo de Tuckey Post Hoc. Los datos se representaron como la media \pm S.E.M.

RESULTADOS



RESULTADOS

La presencia de *B. abortus* induce astrogliosis en el cerebro de ratones BALB/c

Nuestra hipótesis establece que cuando *B. abortus* tiene acceso al cerebro podría causar inflamación y que esta respuesta inflamatoria podría inducir astrogliosis. Para corroborar dicha hipótesis, *B. abortus* muerta por calor (HKBA) fue inyectada mediante estereotaxis en el cuerpo estriado de ratones BALB/c, 24 h más tarde los animales fueron sacrificados y se obtuvieron cortes del cuerpo estriado. Luego de haber realizado una inmunomarcación con GFAP y una tinción con violeta de cresilo, las secciones del cuerpo estriado fueron analizadas por microscopía confocal.

Una extensa y amplia astrogliosis, evidenciada como células GFAP⁺ ramificadas, fue observada en el cuerpo estriado de todos los animales inyectados con HKBA. Esta activación fue considerablemente más notoria cerca del sitio de inyección aunque también se extendió, en menor grado, hasta los alrededores del sitio de inyección (**Fig. 1A**). El cuerpo estriado del mismo modo exhibió un infiltrado inflamatorio moderado cerca del sitio de inyección compuesto principalmente por neutrófilos (**Fig. 1B, flechas**), así como también una pequeña vasodilatación. No se observaron células GFAP⁺, ni reclutamiento de ningún tipo de leucocitos en los ratones inyectados con PBS o en el hemisferio contralateral (Fig. 1A y datos no mostrados).

Estos resultados indican que la presencia de *B. abortus* dentro del cerebro puede inducir una respuesta inflamatoria que lleva a la astrogliosis y a la inducción de un infiltrado neutrofílico.

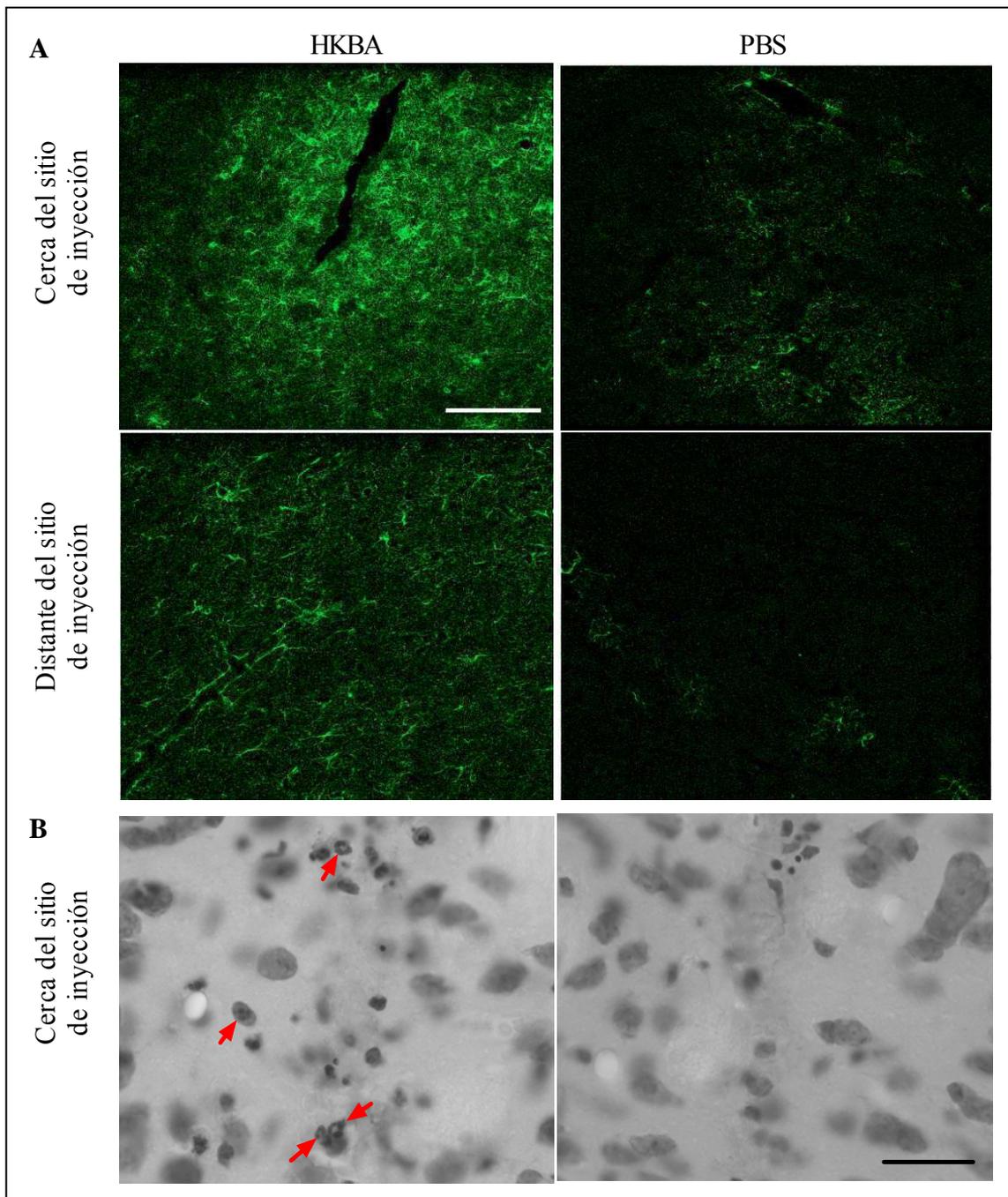


Figura 1. HKBA induce astrogliosis en el cuerpo estriado de ratones. Ratones BALB/c fueron inyectados intracranalmente con HKBA (1×10^6 bacterias) o PBS. Luego de 24 h los animales fueron sacrificados y los cortes del cuerpo estriado fueron marcados con Ac. anti-GFAP (A) o teñidos con violeta de cresilo (B). Luego se tomaron imágenes con microscopía confocal cerca o distante del sitio de inyección. Las imágenes revelaron astrogliosis (A) e infiltrado neutrofílico (B, flechas) en aquellos animales que fueron tratados con HKBA, pero no en los tratados con PBS. Barra = 50 µm.

Caracterización inmunoquímica y morfológica de los cultivos de microglía y astrocitos

Puesto que *in vivo* la bacteria fue capaz de reproducir el fenómeno de astrogliosis, decidimos analizar la capacidad de ésta para interactuar con dos de los tipos de células más importantes de la neuroglía, los astrocitos y la microglía¹²³.

Para evaluar la interacción de *Brucella* con astrocitos y microglía como determinantes de inflamación en el SNC, nos aseguramos que todos los experimentos que realizáramos se llevaran a cabo con cultivos primarios de estas células, carentes de cualquier contaminación con algún otro tipo celular. La pureza del cultivo fue comprobada por medio de la marcación superficial con Ac. anti-Mac-1/CD11b, marcador para macrófagos/microglía, y por medio de una marcación intracelular con un Ac. específico para astrocitos, Ac. anti-GFAP. Los análisis por medio de citometría de flujo revelaron que los cultivos de microglía y astrocitos contenían más del 90% de células CD11b⁺ y de células GFAP⁺, respectivamente. En ningún caso se observó contaminación cruzada, ni tampoco contaminación con oligodendrocitos (O₄) (**Fig. 2A**). También se corroboró la morfología de los cultivos a través de microscopía de contraste de fase (**Fig. 2B**).

Estos cultivos puros permitieron llevar a cabo los experimentos descritos a continuación.

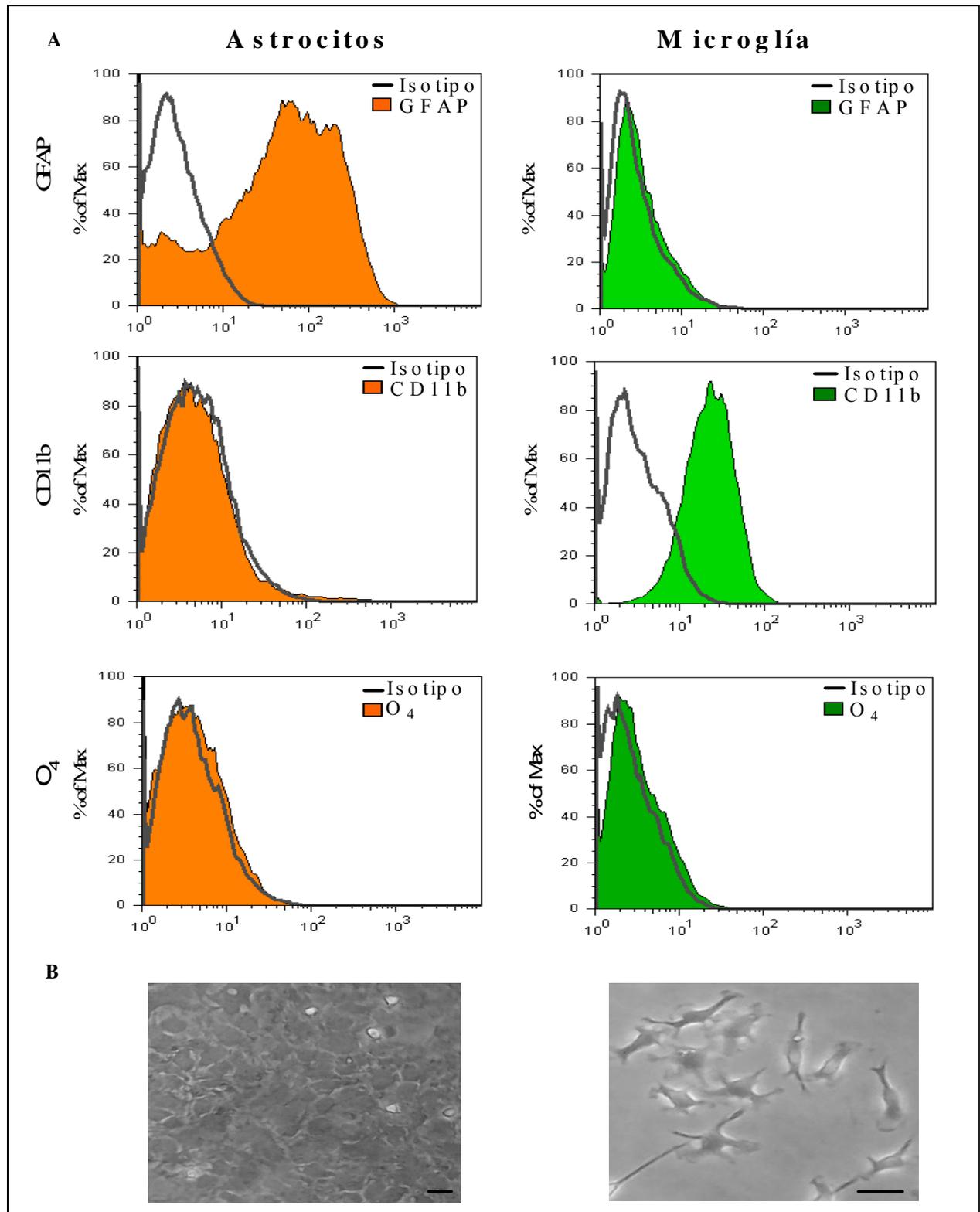


Figura 2. Pureza de los cultivos primarios. Cultivos de astrocitos y microglía obtenidos a partir de cerebros de ratones BALB/c fueron teñidos con Ac. específicos para macrófagos/microglía (Mac-1/CD11b), para oligodendrocitos (O_4) o para astrocitos (GFAP). Los mismos se analizaron por citometría de flujo (A). También se muestran microscopías de contraste de fase de los cultivos de microglía y astrocitos (B). Barra = 50 μ m.

B. abortus infecta y se multiplica dentro de astrocitos y microglía

Para evaluar la interacción de *Brucella* con astrocitos y microglía como determinantes de inflamación en el SNC; lo primero que hicimos fue determinar la habilidad de *B. abortus* para infectar estos tipos celulares.

Para ello cultivos primarios de astrocitos y microglía fueron infectados con *B. abortus* 2308 a diferentes multiplicidades de infección (MOI) y a distintos tiempos. Luego, fue determinada la magnitud de la infección y la secreción de citoquinas y quimiocinas en los sobrenadantes de cultivo de dicha infección.

Los experimentos de infección demostraron que *B. abortus* fue internalizada por los astrocitos y la microglía *in vitro*. La bacteria fue también capaz de multiplicarse eficientemente dentro de ambos tipos celulares. La magnitud de la infección (UFC intracelulares) fue directamente proporcional a la MOI utilizada. Tanto la infección como la replicación intracelular fueron observadas a partir de la MOI de 10 (**Fig. 3A–B**).

El número de bacterias internalizadas dentro de microglía fue mayor a la observada en astrocitos luego de 2 h de infección (MOI 100) (1.750 ± 350 vs 315 ± 163 UFC por pocillo). En ambos tipos celulares, luego de una disminución en el número de bacterias a las 8 h, el número de bacterias intracelulares aumentó a las 24 h, y siguió haciéndolo de ahí en más. A pesar de ello, a cualquier tiempo ensayado el número de bacterias intracelulares fue mayor en microglía que en astrocitos (**Fig. 3C**). Como control, fueron infectadas en paralelo células J774.A1, una línea celular en la cual *B. abortus* es capaz de infectar y replicarse^{228, 229}. La magnitud y la cinética de infección en microglía fueron comparables con la de éstas células (**Fig. 3C**).

La infección indujo la secreción significativa ($P < 0.05$) de las citoquinas IL-6, IL-1 β y TNF- α , y de las quimiocinas MCP-1 y KC de forma MOI-dependiente en ambos tipos celulares (**Fig. 4**).

Estos resultados indican que *B. abortus* puede infectar y replicarse tanto en astrocitos como en microglía y, como resultado, la bacteria activa la respuesta inmune produciendo la secreción de mediadores pro-inflamatorios.

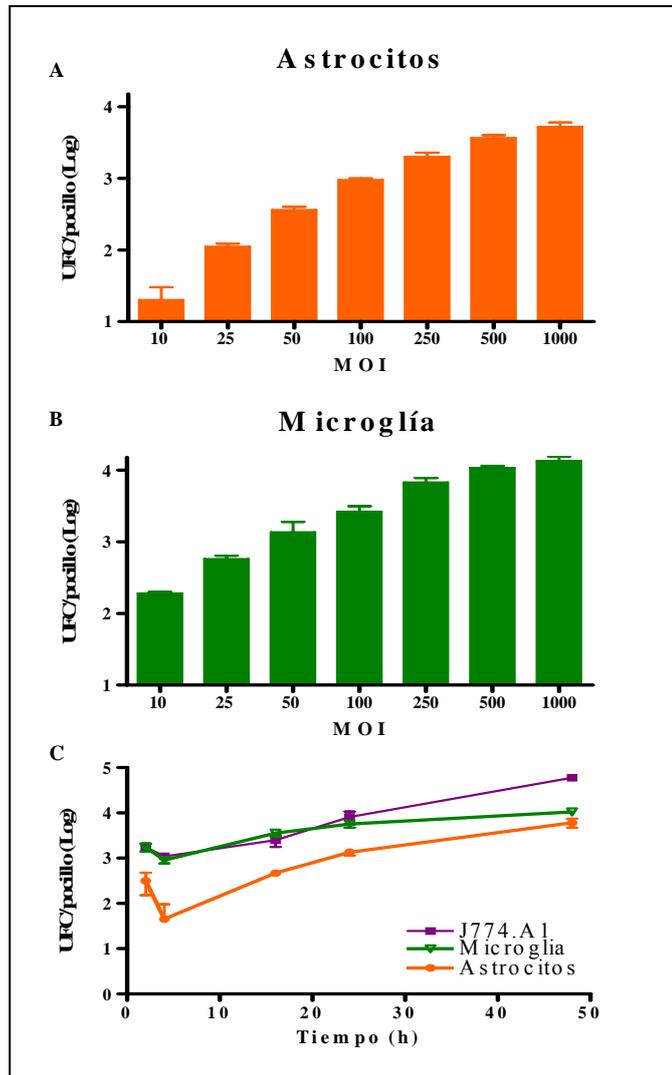


Figura 3. *B. abortus* infecta y se replica en astrocitos y microglía. Cultivos de astrocitos (A) y microglía (B) fueron infectados con *B. abortus* a diferentes multiplicidades de infección (MOI). Cultivos de astrocitos, microglía y J774.A1 fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100) y se determinó la replicación dentro de cada tipo celular mediante UFC luego de 2, 8, 16, 24 o 48 h (C). Los símbolos expresan la media \pm S.E.M de duplicados. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados.

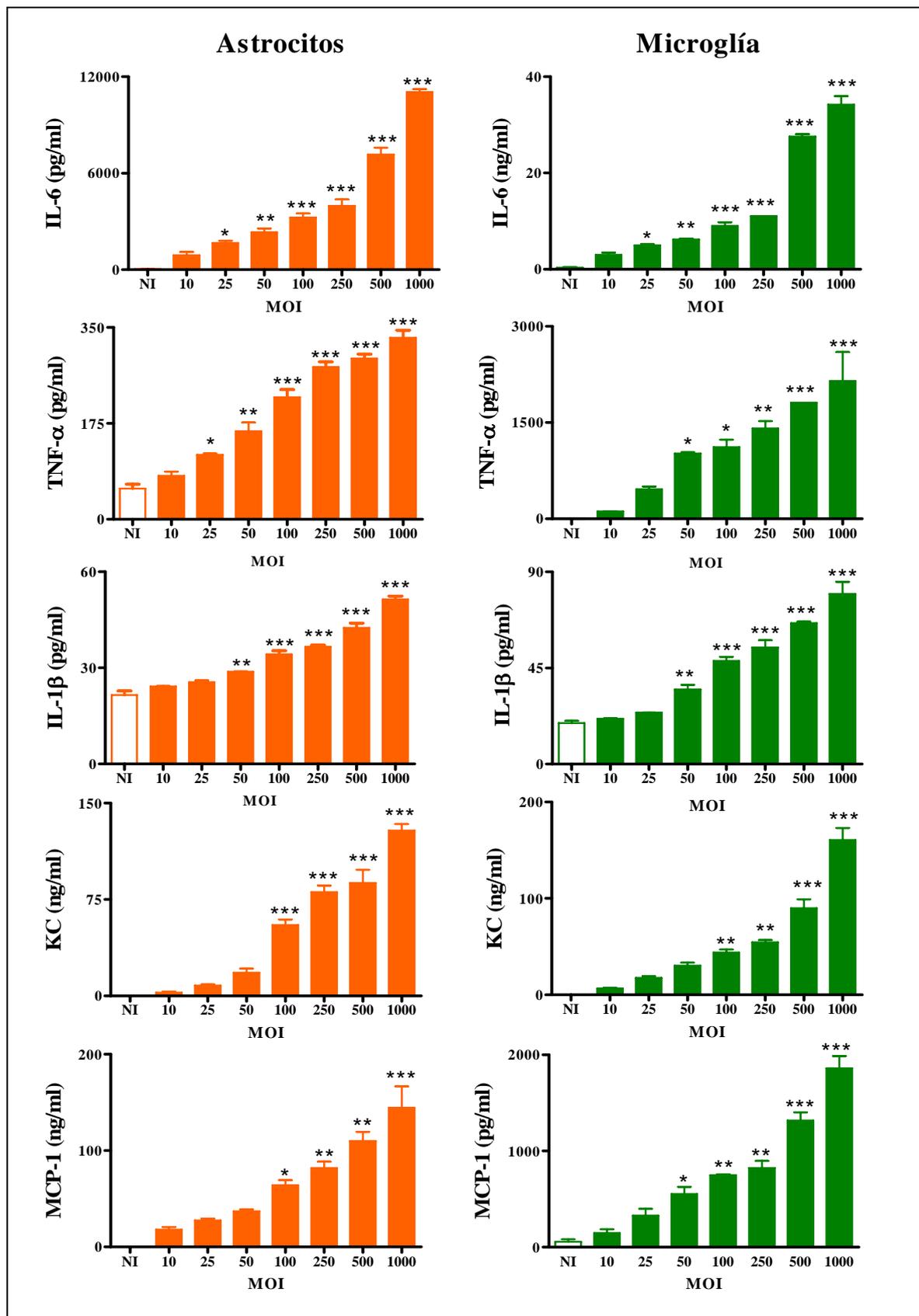


Figura 4. La infección con *B. abortus* produce la secreción de mediadores pro-inflamatorios. Cultivos de astrocitos y microglía fueron infectados con *B. abortus* durante 24 h a diferentes MOI y se determinó en sobrenadantes de cultivo la presencia de citoquinas (IL-6, IL-1 β y TNF- α) y quimiocinas (KC y MCP-1) mediante ELISA. Las barras expresan la media \pm S.E.M de duplicados. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NI (no infectado).

HKBA induce la producción de citoquinas y quimiocinas en astrocitos y microglía

Para determinar si la viabilidad bacteriana era necesaria para inducir la respuesta inflamatoria en astrocitos y microglía, decidimos examinar la habilidad de HKBA para estimular la secreción de citoquinas y quimiocinas.

Para ello, estimulamos con diferentes concentraciones de HKBA cultivos primarios de astrocitos y microglía murinos, utilizando LPS de *E. coli* como control positivo. Luego de 24 h se cuantificaron las citoquinas y quimiocinas en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.

HKBA indujo tanto la producción de citoquinas como de quimiocinas en ambos tipos celulares de manera dosis dependiente, observándose secreción significativa ($P < 0,05$) a partir de una concentración de 1×10^8 bacterias/ml (**Fig. 5**).

Estos resultados indican que HKBA es capaz de generar una respuesta inflamatoria al interactuar con células de la inmunidad innata del SNC y sugieren que un componente estructural de la bacteria induciría este fenómeno.

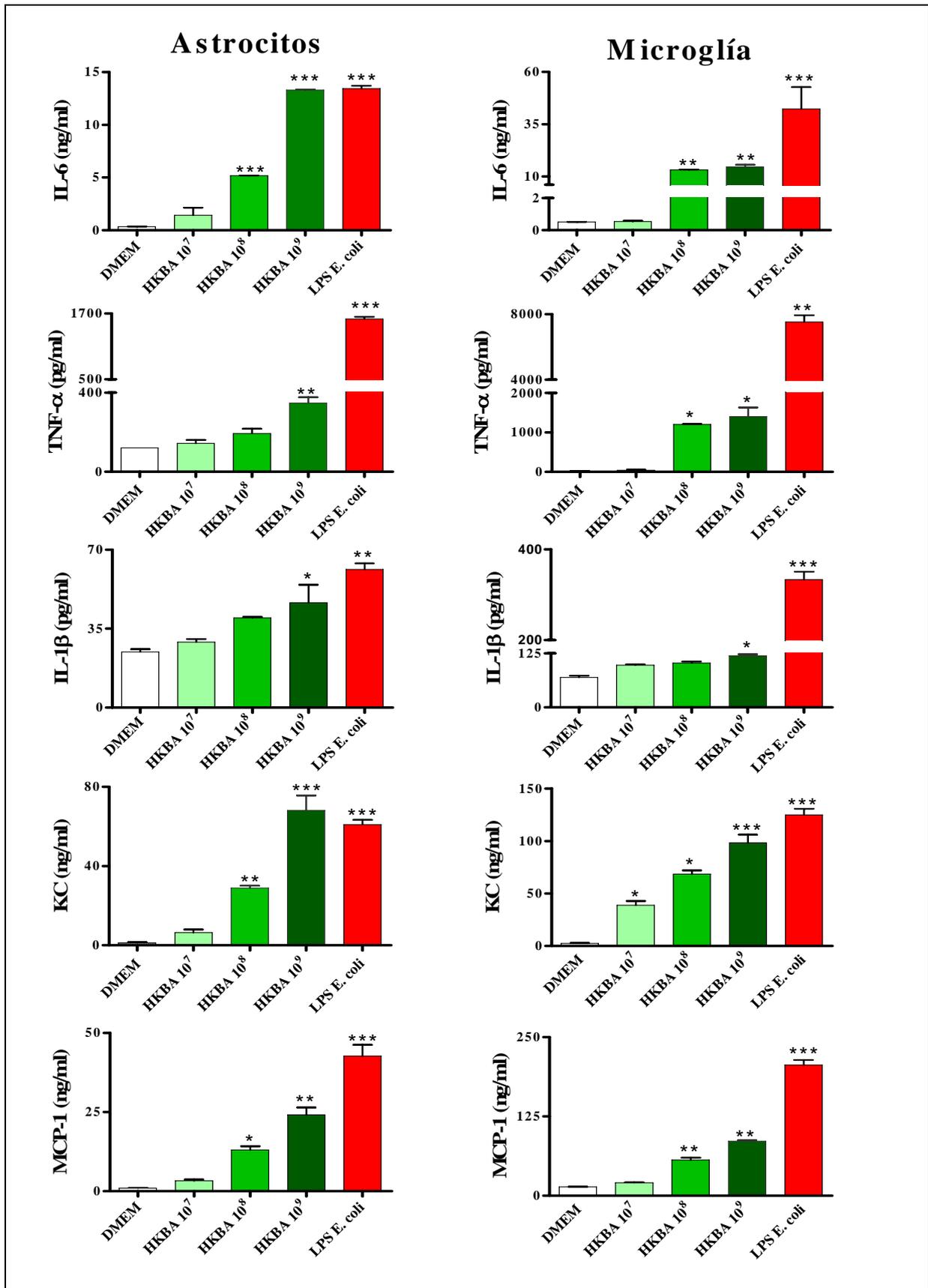


Figura 5. HKBA induce secreción de mediadores pro-inflamatorios. Cultivos de astrocitos y microglía fueron estimulados con medio de cultivo (DMEM), HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacterias/ml) o $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS de *E. coli* (LPS *E. Coli*). Luego de 24 h se cuantificaron TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 y KC en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados. Las barras representan la media \pm S.E.M de duplicados * $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. DMEM

El LPS de *Brucella abortus* no es el responsable de la respuesta inflamatoria

El LPS de *E. coli* es un componente de las bacterias Gram negativas con una poderosa actividad inflamatoria⁶⁵. Dado que *B. abortus* también es una bacteria Gram negativa, decidimos investigar si su LPS era el responsable de la inflamación desencadenada en células de la inmunidad innata del SNC.

Para ello astrocitos y microglía fueron estimulados con medio de cultivo (DMEM) o HKBA en presencia o ausencia de polimixina B (PB), un inhibidor de la actividad biológica del LPS²³⁰. Como control fue utilizado LPS de *E. coli*. Luego de 24 h se cuantificaron citoquinas y quimiocinas en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.

HKBA indujo niveles similares de TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 y KC tanto en presencia como en ausencia de PB. Como era de esperar, la inducción de citoquinas y quimiocinas mediada por el LPS de *E. coli* fue inhibida en presencia de PB. Más aún, el LPS de *Brucella* altamente purificado, utilizado a concentraciones similares a las presentes en la cantidad de bacterias utilizadas para estimular astrocitos y microglía²³¹, fue también incapaz de inducir en forma significativa, la producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 y KC (**Fig. 6**).

En conjunto estos resultados indican que el LPS de *Brucella* no es el responsable de desencadenar una respuesta inflamatoria en astrocitos y microglía.

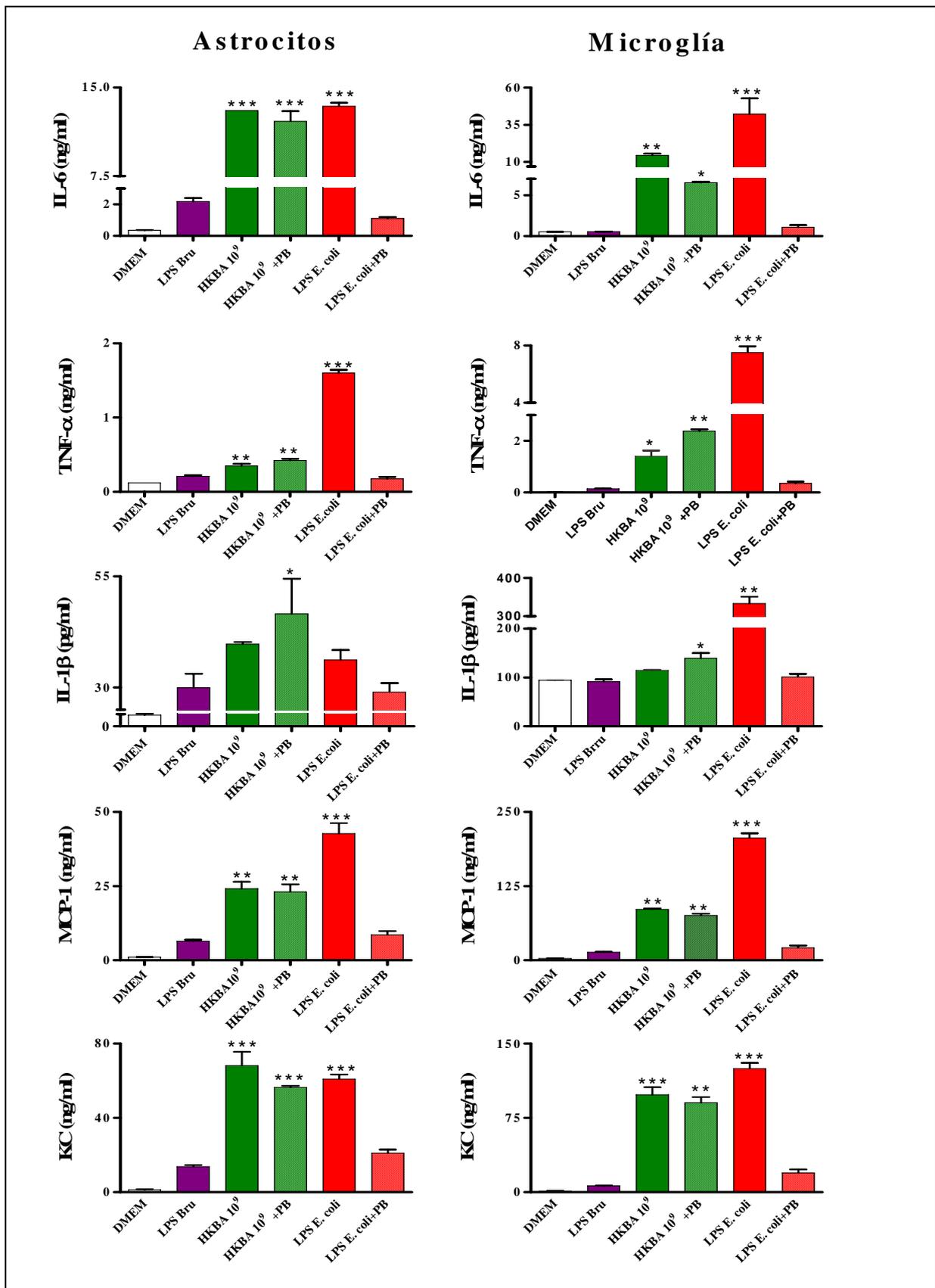


Figura 6. El LPS de *B. abortus* no induce secreción de mediadores pro-inflamatorios. Cultivos de astrocitos y microglía fueron estimulados con DMEM, HKBA (1×10^9 bacterias/ml) en presencia o ausencia de polimixina B (PB), LPS de *B. abortus* (LPS Bru) ($1 \mu\text{g/ml}$), LPS de *E. coli* ($1 \mu\text{g/ml}$) o LPS de *E. coli* ($1 \mu\text{g/ml}$) + PB. Luego de 24 h se cuantificó TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 y KC en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados. Las barras representan la media \pm S.E.M de los duplicados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. DMEM

L-Omp19 induce la producción de citoquinas y quimiocinas en astrocitos y microglía

Teniendo en cuenta que HKBA induce la secreción de quimiocinas y citoquinas inflamatorias, que el LPS de *Brucella* no es el responsable de inducir dicha respuesta, y que trabajos previos publicados por nuestro grupo^{10, 113, 114} establecen que las lipoproteínas de *B. abortus* son moléculas con una considerable actividad inflamatoria, decidimos investigar si éstas podrían inducir la producción de mediadores inflamatorios en las células del SNC. Para investigar esto, fue utilizada la proteína recombinante L-Omp19 como modelo de lipoproteína de *Brucella*. Esta lipoproteína forma parte de la membrana externa de la bacteria, y se encuentra presente en todas las especies de *Brucella*²⁵.

Con este fin, astrocitos y microglía de ratones BALB/c fueron estimulados con DMEM, U-Omp19 (la versión no lipidada de Omp19) o diferentes concentraciones de L-Omp19. Como control fue utilizado un lipoheptapéptido sintético que mimetiza la estructura lipídica de las lipoproteínas (Pam₃Cys). Luego de 24 h fueron cuantificadas en los sobrenadantes de cultivo citoquinas y quimiocinas mediante ELISA.

L-Omp19 indujo la producción tanto de las citoquinas como de quimiocinas de una manera dosis-dependiente a partir de una concentración de 10 ng/ml. Este fenómeno fue dependiente de la acilación de las moléculas, ya que U-Omp19 no fue capaz de promover la secreción de dichos mediadores pro-inflamatorios. El hecho de que Pam₃Cys indujera la misma respuesta que la versión lipidada de la proteína corrobora la dependencia de la acilación en el fenómeno observado (**Fig. 7**).

De esta manera estos resultados indican que las lipoproteínas de *B. abortus* son capaces de generar una respuesta inflamatoria al interactuar con células de la inmunidad innata del SNC.

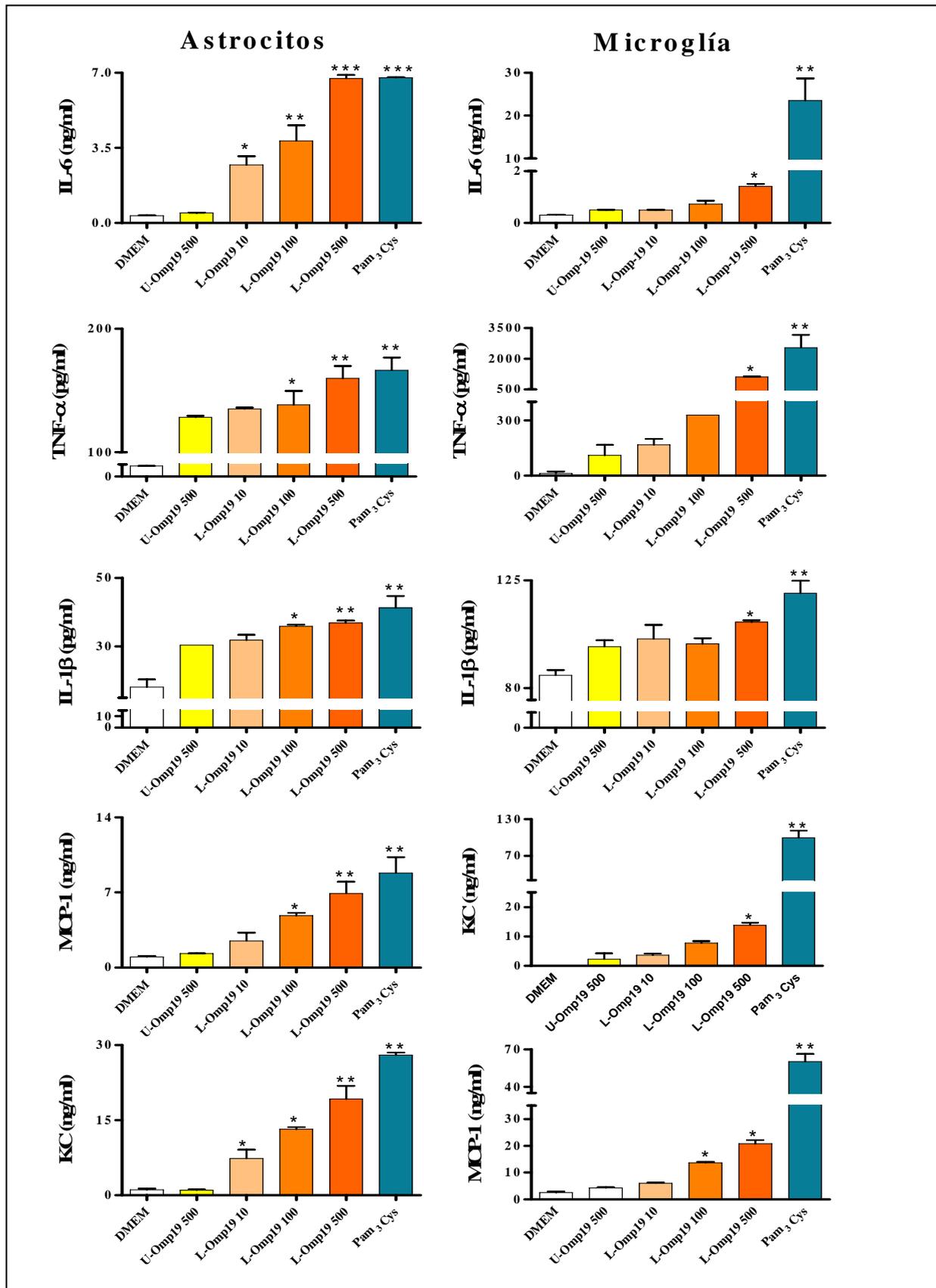


Figura 7. L-Omp19 induce secreción de mediadores pro-inflamatorios Cultivos de astrocitos y microglía fueron estimulados con DMEM, U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (10, 100, 500 ng/ml) o Pam₃Cys (50 ng/ml). Luego de 24 h se cuantificó TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 y KC en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados. Las barras representan la media \pm S.E.M de duplicados. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

L-Omp19 induce astrogliosis en el cerebro de ratones

En vista que L-Omp19 fue capaz de inducir la activación de astrocitos *in vitro*, mediante la secreción de mediadores pro-inflamatorios; examinamos subsecuentemente su habilidad de inducir astrogliosis *in vivo*.

Para llevar a cabo este cometido, L-Omp19, U-Omp19 o PBS fueron inyectados en el cuerpo estriado de ratones BALB/c mediante estereotaxis, 24 h más tarde los animales fueron sacrificados y se realizaron cortes seriados del cuerpo estriado. Estos cortes luego fueron marcados con Ac. anti-GFAP y teñidos con violeta de cresilo para ser analizados por microscopía confocal.

Una marcada astrogliosis, establecida como un aumento de células GFAP⁺, fue evidenciada en aquellos ratones que habían sido inyectados con L-Omp19. Al igual que con la bacteria entera, se observaron células GFAP⁺ intensamente ramificadas cerca del sitio de inyección (**Fig. 8A**). El cuerpo estriado también exhibió un leve infiltrado inflamatorio cerca del sitio de inyección compuesto por neutrófilos así como una leve vasodilatación (**Fig. 8B**). No se observó infiltrado neutrofílico ni células GFAP⁺ en los ratones inyectados con U-Omp19 o con PBS ni tampoco en los hemisferios no inyectados (contralateral) (**Fig. 8** y datos no mostrados).

En conjunto estos resultados demuestran que *B. abortus* y sus lipoproteínas son capaces de inducir astrogliosis *in vivo* e *in vitro*.

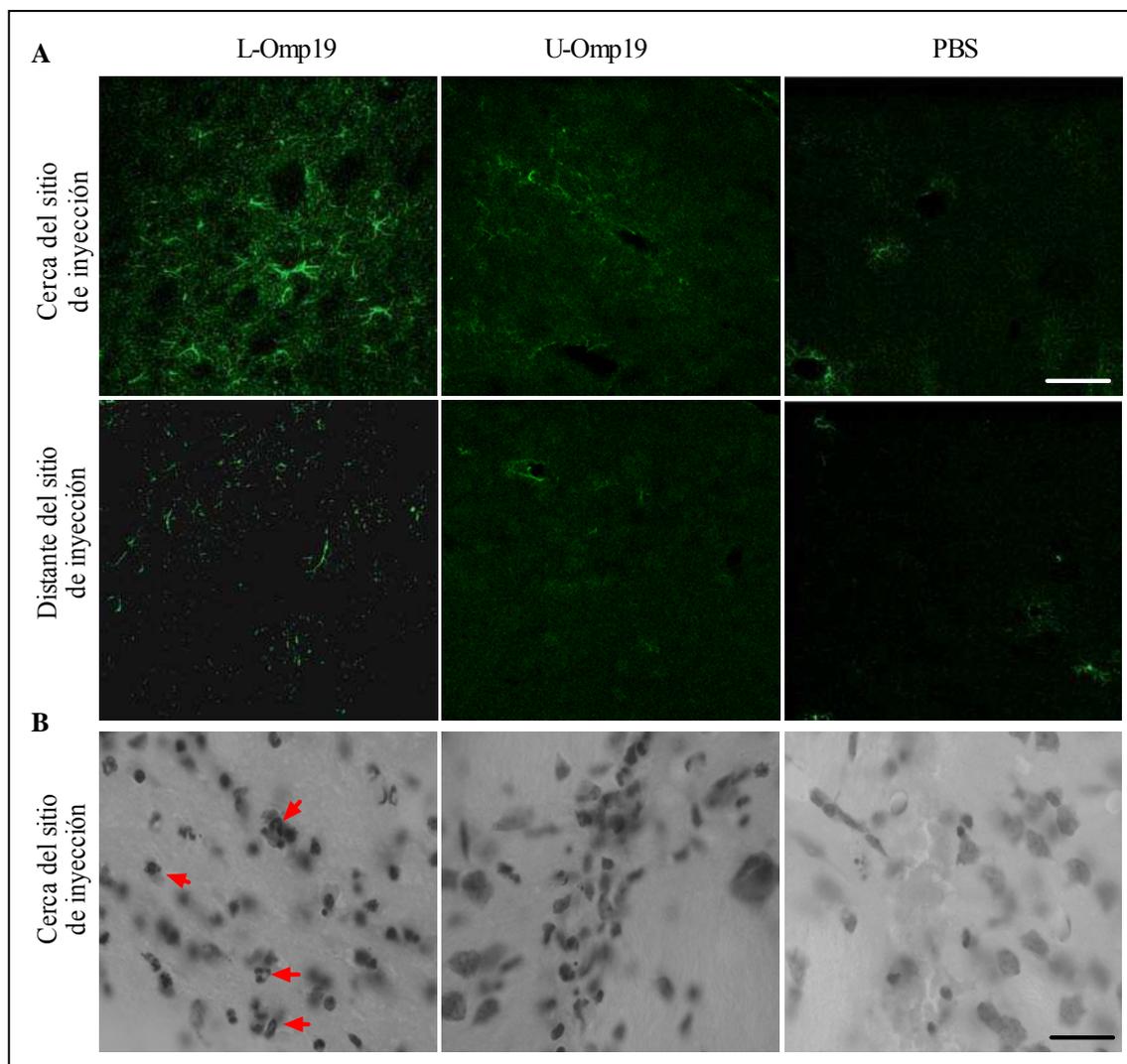


Figura 8. L-Omp19 induce astrogliosis en el cuerpo estriado de ratones. Ratones BALB/c fueron inyectados intracranalmente con L-Omp19 (500 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml) o PBS. Luego de 24 h los animales fueron sacrificados, las secciones del cuerpo estriado fueron marcadas con Ac. Anti-GFAP (A) o violeta de cresilo (B) y se tomaron imágenes mediante microscopía confocal, cerca o distante del sitio de inyección. Las imágenes revelaron astrogliosis (A) e infiltrado neutrofilico (B, flechas) en los animales tratados con L-Omp19, no así en los tratados con U-Omp19 o PBS. Barra = 50 μ m.

TLR2 media la respuesta inflamatoria desencadenada por *B. abortus* y L-Omp19

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que la respuesta inflamatoria inducida por *B. abortus* en diversas células de la inmunidad innata es mediada por TLR2^{10, 113, 114}. Por tal motivo decidimos investigar el rol de este receptor en la respuesta inflamatoria desencadenada en astrocitos.

Para ello es que repetimos los mismos experimentos de infección que fueron realizados con *B. abortus* y ratones BALB/c, solo que a partir de cultivos de astrocitos de ratones TLR2 KO. Como el background genético de estos ratones es C57BL6/6J, como control fueron utilizados cultivos de astrocitos provenientes de ratones salvajes C57BL6/6J. Los cultivos fueron infectados a distintos tiempos, con una multiplicidad de infección (MOI) de 100.

En las primeras horas de infección los ratones de la cepa salvaje se infectaron en un grado menor que los TLR2 KO; sin embargo a partir de las 8 h no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ambas cepas de ratones (**Fig. 9A**).

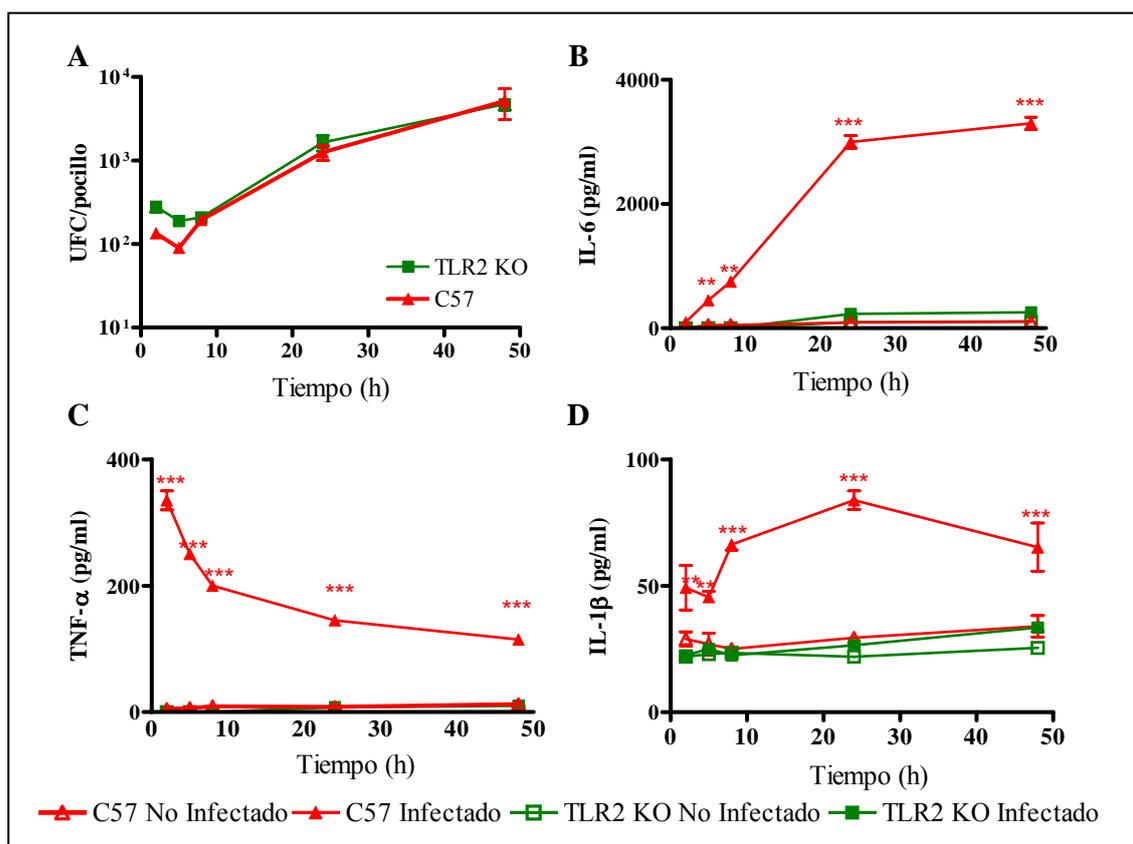


Figura 9. La secreción de citoquinas pro-inflamatorias depende de TLR2. Cultivos de astrocitos de ratones TLR2 KO (verde) y C57BL6/6J (rojo) fueron infectados con *B. abortus* a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 a diferentes tiempos y se determinó la replicación de la bacteria mediante el cálculo de UFC luego de 2, 8, 16, 24 o 48 h (A). Se detectó la presencia de citoquinas (IL-6, IL-1β y TNF-α) en los sobrenadantes de infección de los cultivos a diferentes tiempos (2, 8, 24 y 48 h) mediante ELISA (B, C y D). Las barras expresan la media ± S.E.M de duplicados. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados.

La liberación de citoquinas IL-6, TNF- α e IL-1 β generadas durante la infección, fue dependiente de TLR2 ya que la misma fue abrogada en los astrocitos de los ratones TLR2 KO respecto de los niveles secretados por los astrocitos de los ratones normales C57BL6/6J (**Fig. 9B, C y D**).

Estos resultados revelan que si bien la bacteria no requiere del receptor TLR2 para infectar astrocitos o replicarse dentro de éstos, la respuesta inmune generada si se ve afectada, ya que se ve totalmente abolida la secreción de mediadores inflamatorios.

Asimismo analizamos si la capacidad de HKBA y las lipoproteínas de promover la liberación de dichos mediadores era mediada por TLR2. Para lo cual cultivos de astrocitos provenientes de ratones TLR2 KO fueron estimulados con U-Omp19, diferentes dosis de HKBA y L-Omp19 o Pam₃Cys. El LPS de *E. coli* fue utilizado como control positivo, ya que es un ligando que utiliza la vía de TLR4 y no la vía de TLR2. Luego de 24 h fueron cuantificados TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.

Tanto HKBA como L-Omp19 y el péptido sintético Pam₃Cys fueron incapaces de inducir la secreción de IL-6, IL-1 β y TNF- α en los cultivos de astrocitos provenientes de los ratones TLR2 KO. El único estímulo que indujo la liberación significativa de citoquinas pro-inflamatorias fue el LPS de *E. Coli* (**Fig. 10**).

En función de lo expuesto, nuestros resultados demuestran que la respuesta inflamatoria inducida por *B. abortus* es dependiente de TLR2 y que las lipoproteínas de *B. abortus* serían el ligando TLR2 que utiliza la bacteria para inducir dicha respuesta.

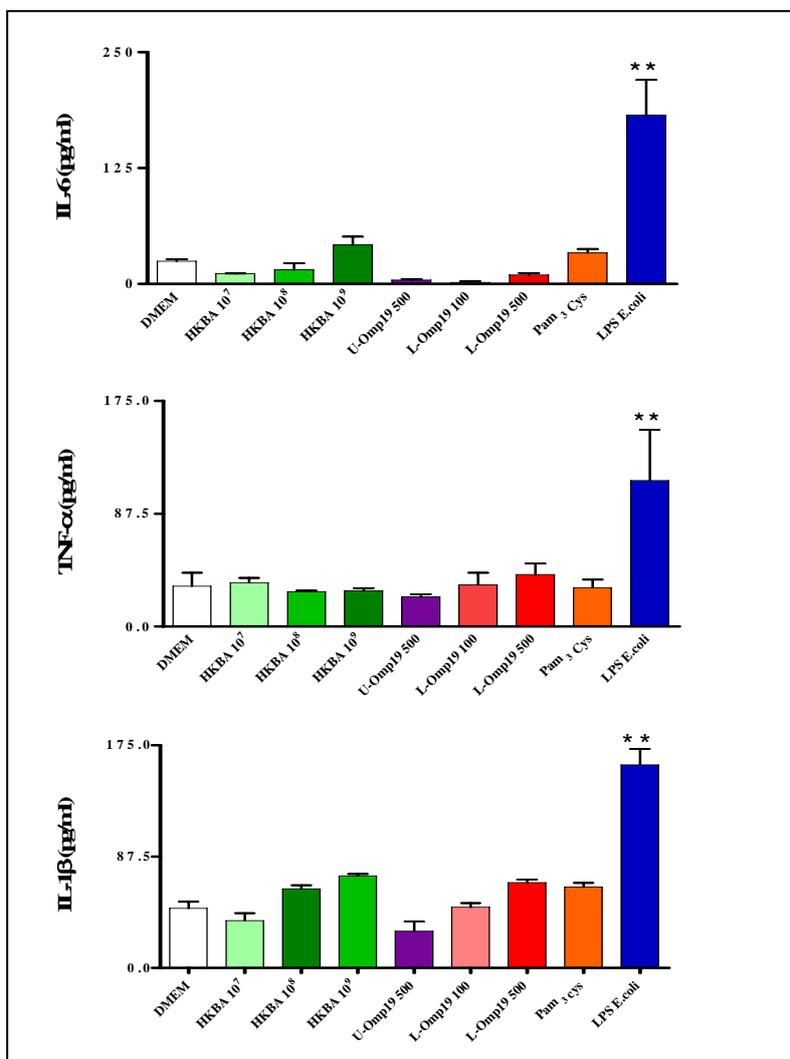


Figura 10. TLR2 media los efectos inducidos por HKBA y L-Omp19 Cultivos de astrocitos de ratones TLR2 KO fueron estimulados con DMEM, HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacterias/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (100, 500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o LPS de *E. Coli* (1 μ g/ml) como control. Luego de 24 h se cuantificó TNF- α , IL-1 β y IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 3 realizados. Las barras representan la media \pm S.E.M de los duplicados * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

HKBA y L-Omp19 inducen proliferación de astrocitos

La astrogliosis está caracterizada tanto por la apoptosis como por la proliferación de los astrocitos^{232, 233}. Ya que *in vivo* HKBA y L-Omp19 indujeron astrogliosis decidimos, para comenzar a investigar con más detalle este fenómeno, desafiar nuestro modelo *in vitro* con ambos estímulos para determinar si éstos podían inducir la proliferación de los astrocitos.

En primer lugar, medimos proliferación celular mediante la incorporación de [³H]-timidina. Para ello, cultivos de astrocitos fueron tratados con DMEM, HKBA, U-Omp19, L-Omp19 o Pam₃Cys. IL-6 fue usada como control positivo de la proliferación. Aproximadamente 18 h antes de ser cosechadas las células, se les agregó 1μCi de [³H]-timidina al cultivo. Al cabo de 5 días se midió con un contador de centelleo la incorporación de [³H]-timidina.

HKBA, L-Omp19 y Pam₃Cys fueron capaces de inducir en forma significativa ($P<0,01$) la proliferación de los astrocitos. Sin embargo U-Omp19 no fue capaz de inducirla, indicando que la porción lipídica es requerida para inducir dicho fenómeno. Como era de esperar, la exposición de los cultivos primarios de astrocitos a IL-6 recombinante indujo una proliferación celular significativa ($P<0,05$) (**Fig. 11A**).

Para determinar el rol de IL-6 en el fenómeno de proliferación repetimos el experimento anterior, solo que pre-incubando las células con Ac. anti-IL-6 o un control de isotipo 2 h antes de colocar los estímulos. Nuevamente se determinó proliferación mediante la incorporación de [³H]-timidina, como se detalló anteriormente.

Cuando las células fueron tratadas con Ac. anti-IL-6 hubo una disminución de la proliferación celular, tanto cuando las células fueron estimuladas con HKBA (29%), como con L-Omp19 (25%) o con Pam₃Cys (20%) indicando que, al menos parcialmente, IL-6 está involucrada en el fenómeno de proliferación de los astrocitos (**Fig. 11B**).

El fenómeno de proliferación también fue corroborado por medio de la incorporación de Bromodioxiidina (BrdU). Para ello se estimularon cultivos de astrocitos de ratones BALB/c con DMEM o con HKBA en presencia de BrdU-FITC. Al cabo de 5 días las células fueron cosechadas y por medio de citometría de flujo fue determinada la incorporación de BrdU-FITC en los cultivos.

La BrdU fue incorporada tanto en presencia como en ausencia del estímulo, como fue evidenciado con el aumento de la intensidad fluorescencia de esos cultivos comparados con los niveles de fluorescencia en ausencia de BrdU (**Fig. 11C**). Los astrocitos estimulados con HKBA mostraron 2 poblaciones, una que exhibía una media de intensidad de fluorescencia 4 veces mayor a aquellas células que habían sido expuestas al medio de cultivo solo; y otra población

cuya intensidad de fluorescencia fue de aproximadamente la mitad respecto de las células no estimuladas (**Fig. 11C**).

Estos resultados indican que *B. abortus* es capaz de inducir la proliferación de astrocitos *in vitro*. Es más, el hecho que una subpoblación de células parece incorporar BrdU a una tasa mucho menor comparada con las células no estimuladas estaría indicando que un fenómeno concomitante se está llevando a cabo.

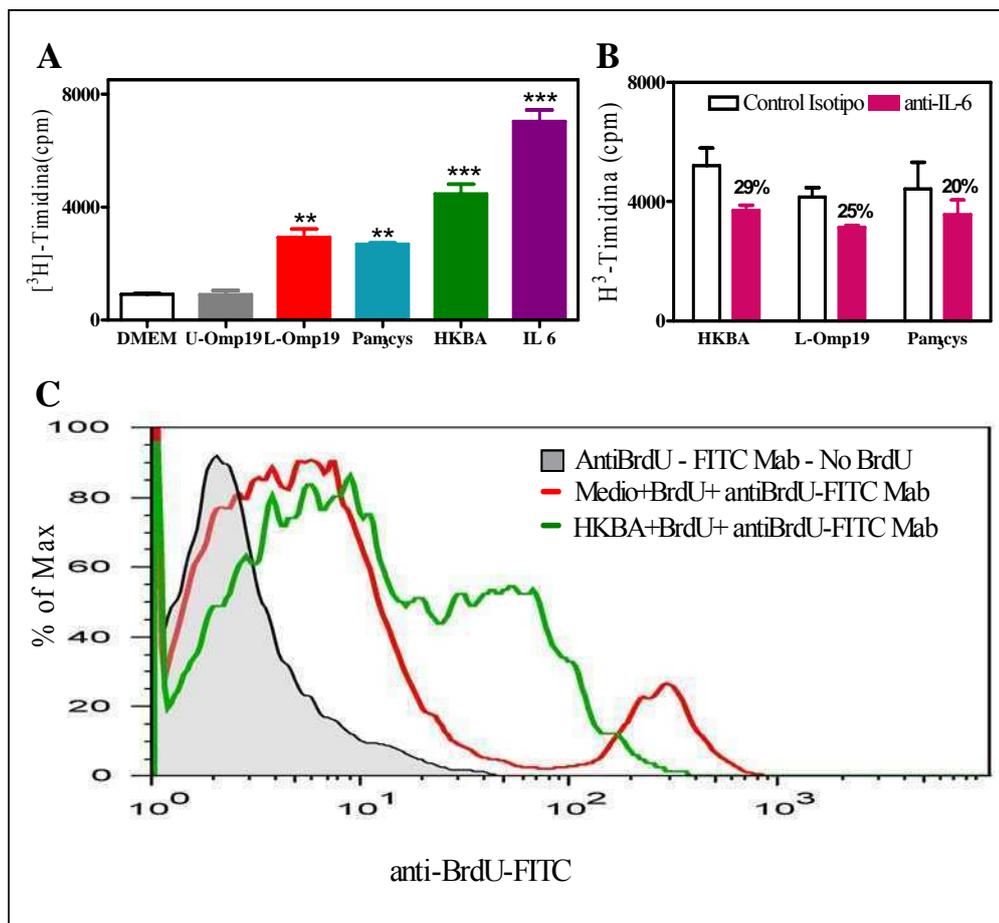


Figura 11. HKBA y L-Omp19 inducen proliferación de astrocitos. Astrocitos fueron estimulados con DMEM, HKBA (10⁹ bacterias/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o IL-6 (10 ng/ml). Luego de 5 días se determinó proliferación por medio de la incorporación de [³H]-timidina (**A**). Astrocitos se preincubaron 2 h con Ac. anti-IL-6 o control de isotipo, luego se estimularon con HKBA (10⁹ bacterias/ml), L-Omp19 (500 ng/ml) o Pam₃Cys (50 ng/ml). Después de 5 días se determinó proliferación por medio de la incorporación de [³H]-timidina. Los números sobre las barras indican la disminución en la incorporación de [³H]-timidina de las células tratadas con anti-IL-6 vs. células tratadas con el control de isotipo, en porcentaje. Las barras indican la media ± S.E.M por triplicado* P<0,05; ** P<0,01; ***P<0,001 vs. DMEM (**B**). Cultivo de astrocitos tratados con DMEM o HKBA (10⁹ bacteria/ml). Luego de 5 días se analizó la proliferación mediante la incorporación de BrdU-FITC (**C**). Los datos mostrados son representativos de 5 ex realizados.

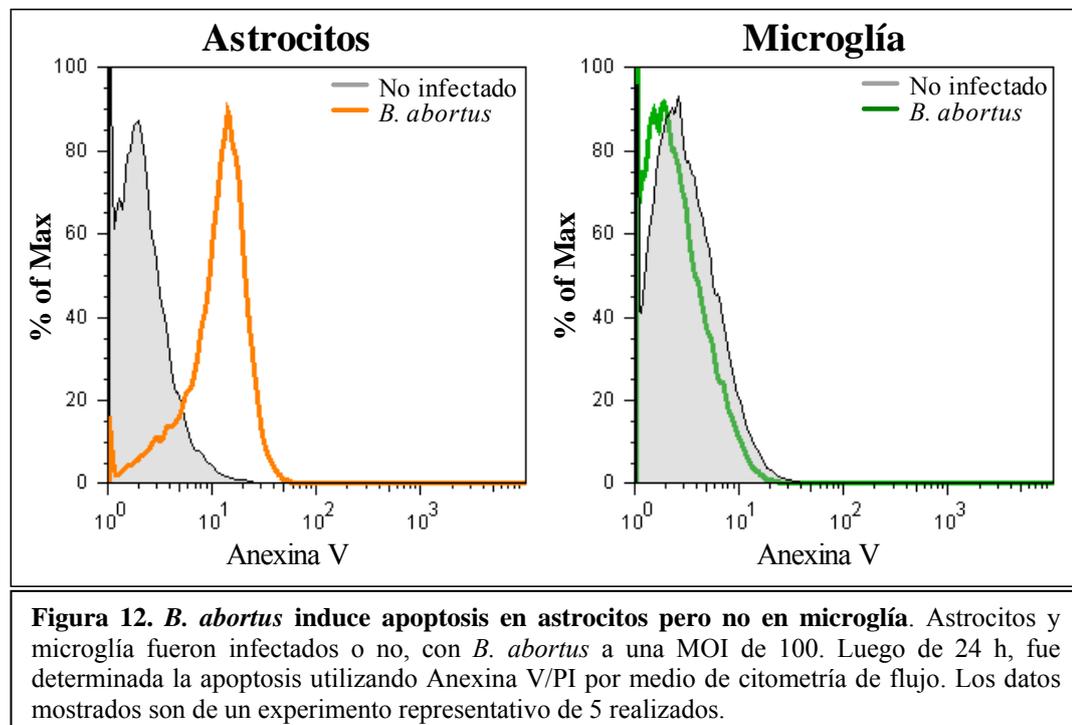
La infección con *B. abortus* induce apoptosis de astrocitos

Uno de los rasgos característicos de la astrogliosis es la apoptosis, y ésta puede ocurrir en el contexto de la gliosis^{232, 233}. Es por ello que decidimos evaluar este fenómeno desafiando nuestro modelo *in vitro* mediante la infección de astrocitos.

Para ello, astrocitos provenientes de ratones BALB/c fueron infectados con *B. abortus*, 24 h más tarde las células fueron marcadas con anexina V/IP y la apoptosis fue determinada por medio de citometría de flujo. La bacteria fue capaz de inducir la apoptosis en astrocitos (**Fig. 12**).

Así como *B. abortus* y otras especies de *Brucella* son capaces de inhibir la apoptosis de macrófagos^{88, 234}, y teniendo en cuenta que la microglía es considerada como los macrófagos residentes del cerebro²³⁵, decidimos investigar también el efecto de la infección con *B. abortus* sobre la muerte celular programada en microglía. Se infectó microglía tal como se hizo con los astrocitos. A diferencia de lo que ocurrió con los astrocitos, la infección con *Brucella* en microglía no condujo a la apoptosis (**Fig. 12**).

Estos resultados estarían indicando que *Brucella* induce apoptosis en astrocitos luego de infectarlos; y que en microglía la bacteria es capaz de desarrollar durante la infección, mecanismos de evasión a la muerte celular programada.



A su vez analizamos la capacidad de HKBA y de las lipoproteínas de inducir la apoptosis de microglía *in vitro*.

Para ello, se trataron cultivos primarios de microglía durante 24 h con HKBA, L-Omp19, Pam₃Cys o PFA 2% y luego se determinó la apoptosis mediante anexina V/IP utilizando citometría de flujo. Al igual que ocurrió con la infección, no fue detectada la apoptosis en los cultivos de microglía, donde solo el PFA (control positivo) fue capaz de inducirla (**Fig. 13**).

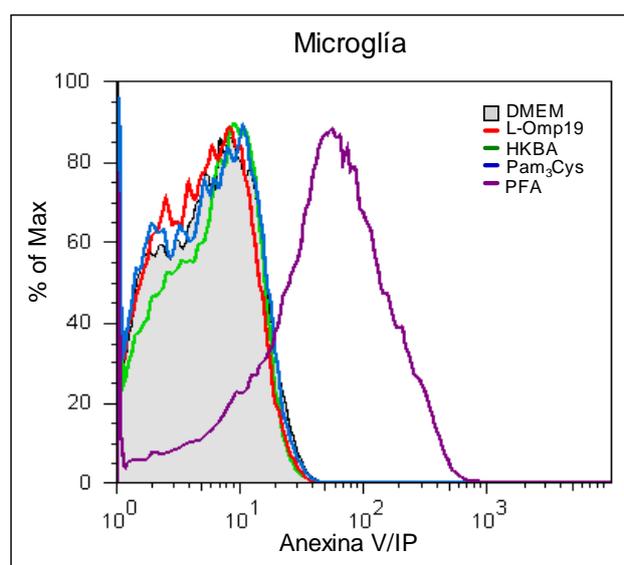


Figura 13. HKBA y L-Omp19 no inducen apoptosis en microglía Se estimularon cultivos primarios de microglía durante 24 h con DMEM, HKBA (1×10^9 bacterias/ml), L-Omp19 (500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o PFA 2%. Luego fueron incubados con anexina V/IP y analizados por citometría de flujo. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 5 realizados.

En conjunto estos resultados señalan que la bacteria, viva o muerta, es capaz de inducir mecanismos diferentes en cada tipo celular, ya que la microglía es capaz de resistir a la muerte celular programada.

HKBA y L-Omp19 inducen apoptosis de astrocitos *in vitro*.

Asimismo analizamos el efecto de HKBA y L-Omp19 sobre la apoptosis de los astrocitos. Para este fin, astrocitos provenientes de ratones BALB/c fueron estimulados durante 24 h con medio (DMEM), HKBA, U-Omp19, L-Omp19 o Pam₃Cys y se marcaron las células con anexina V/IP. Luego la apoptosis fue determinada por citometría de flujo y fue establecida la intensidad de fluorescencia media (MFI) generada por cada estímulo. El TNF- α y paraformaldehído (PFA) fueron utilizados como controles positivos (**Fig. 14A y B**).

Tanto HKBA como L-Omp19 fueron capaces de inducir una apoptosis significativa ($P < 0,05$) de manera dosis dependiente. U-Omp19 no fue capaz de promover la muerte celular programada, indicando que la porción lipídica de la lipoproteína está directamente involucrada en el fenómeno. Esto fue corroborado por la habilidad que presentó el Pam₃Cys en reproducir dicho efecto (**Fig. 14C y D**).

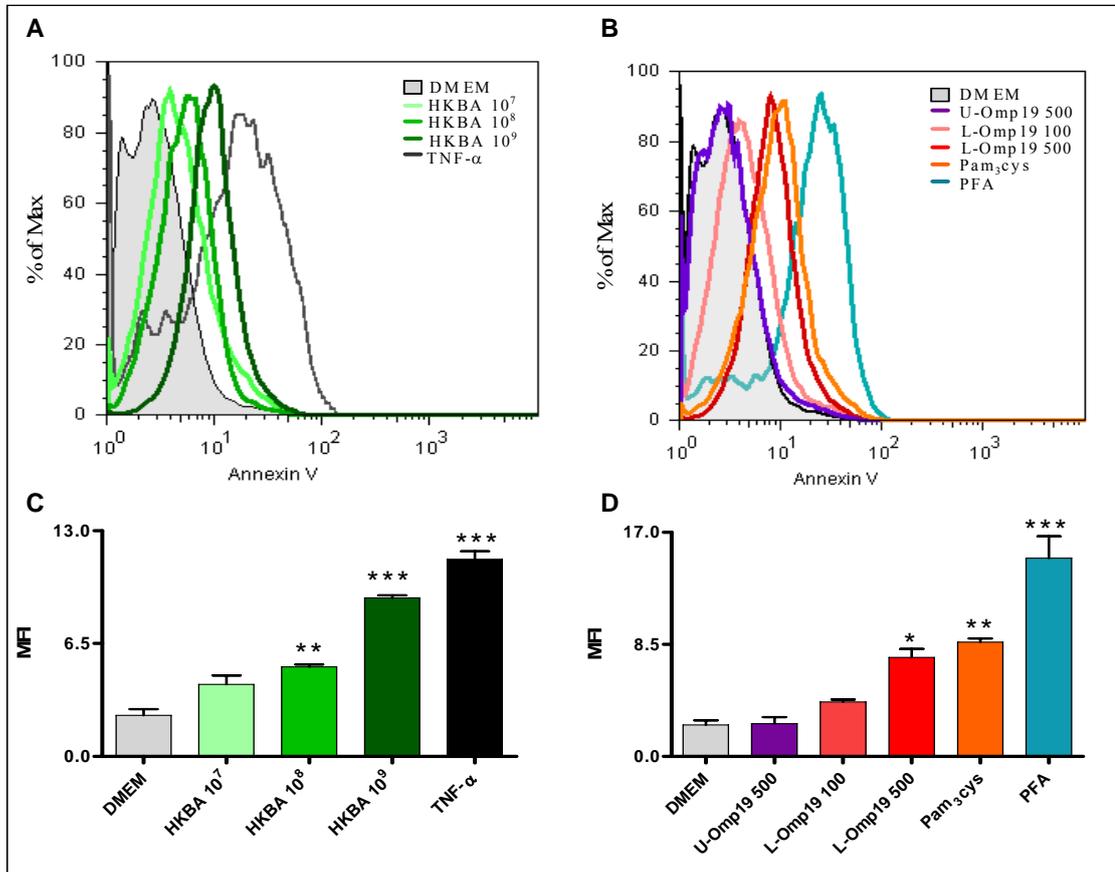


Figura 14. HKBA y L-Omp19 inducen apoptosis de astrocitos *in vitro* (Anexina). Astrocitos de ratones BALB/c fueron estimulados con DMEM, HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacteria/ml), TNF- α (5 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (100 ng/ml y 500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o PFA 2%. Luego de 24 h, fue determinada la apoptosis mediante anexina V/IP por medio de citometría de flujo (A y B). El gráfico de barras muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) para cada estímulo. Las barras expresan la media \pm S.E.M de duplicados (C y D). Los datos mostrados son un experimento representativo de 5 realizados. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

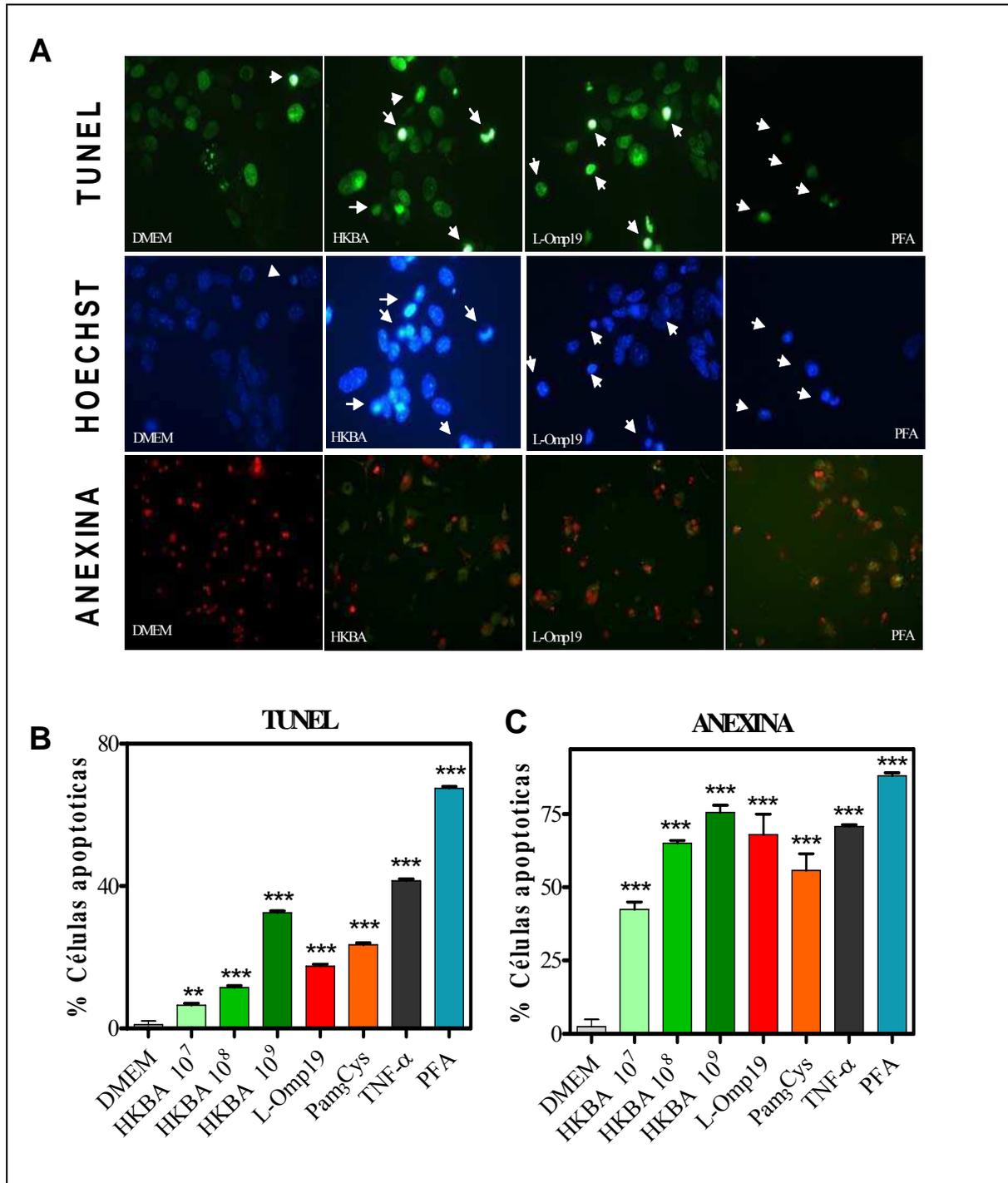


Figura 15. HKBA y L-Omp19 inducen apoptosis de astrocitos *in vitro* (TUNEL y HOECHST). Astrocitos de ratones BALB/c fueron estimulados con DMEM, HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacteria/ml), TNF- α (5 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (100 y 500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o PFA 2%. Luego de 24 h, se determinó apoptosis mediante de Anexina V/IP, Hoechst dye 33342 y TUNEL. Las flechas indican las células apoptóticas (A). Cuantificación de apoptosis por Anexina V/PI y TUNEL. Las barras expresan la media \pm S.E.M de los duplicados (B, C). Los datos mostrados son un experimento representativo de 5 realizados. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

Además la apoptosis fue aseverada cualitativamente (**Fig. 15A, flechas**) y cuantitativamente por tres métodos diferentes: por medio del ensayo de TUNEL; por tinción con Hoechst dye 33342 y por anexina V-FITC/IP (**Fig. 15B y C**). Estos ensayos determinaron que HKBA, L-Omp19 y Pam₃Cys inducían apoptosis en forma significativa ($P<0,05$), confirmando y extendiendo los resultados obtenidos por citometría de flujo (**Fig.14** y datos no mostrados).

En conjunto estos resultados indican que el fenómeno de apoptosis no depende de la viabilidad de *Brucella*, y que las lipoproteínas de *Brucella* pueden inducir en astrocitos la muerte celular programada.

La apoptosis de astrocitos está mediada por TNFR1

Nuestros resultados indican que tanto *B. abortus* como sus lipoproteínas tienen la capacidad de inducir la secreción de TNF- α en las células de la inmunidad innata del SNC. Dado que esta citoquina está involucrada en los procesos de apoptosis^{236, 237}, decidimos evaluar si era la responsable de inducir la apoptosis de los astrocitos.

Para verificar el efecto de TNF- α en astrocitos, células de ratones TNFRp55^{-/-} fueron estimuladas por 24 h con medio (DMEM), HKBA, L-Omp19 o U-Omp19 y después de marcarlas con anexina V/IP se determinó la apoptosis por medio de citometría de flujo. Los astrocitos de ratones C57BL/6 fueron utilizados como control.

Tanto HKBA como L-Omp19 fueron incapaces de inducir apoptosis en los astrocitos provenientes de ratones TNFRp55^{-/-} (**Fig. 16A y B**). En contraste, ambos estímulos fueron capaces de promoverla en astrocitos provenientes de ratones C57BL/6 de forma significativa ($P<0,05$). Sin embargo, U-Omp19 no logró inducir apoptosis en astrocitos de ninguna de las cepas (**Fig. 16A y B**). Como era de esperar TNF- α no indujo apoptosis en astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-}, pero si lo hizo en cultivos de ratones normales. Por otro lado, PFA fue capaz de inducir la apoptosis en cultivos de ambas cepas (**Fig. 16**).

La incapacidad de los astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-} para entrar en apoptosis luego de la estimulación con HKBA o L-Omp19 fue corroborada mediante otras dos formas independientes: el ensayo de TUNEL y la tinción con Hoechst dye; que fueron analizadas (**Fig. 17A**) y cuantificadas (**Fig. 17B y C**) por medio de microscopía de fluorescencia.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, nuestros resultados indican que el TNF- α actuando vía TNFR1 determina la apoptosis de astrocitos inducida por *B. abortus* y sus lipoproteínas.

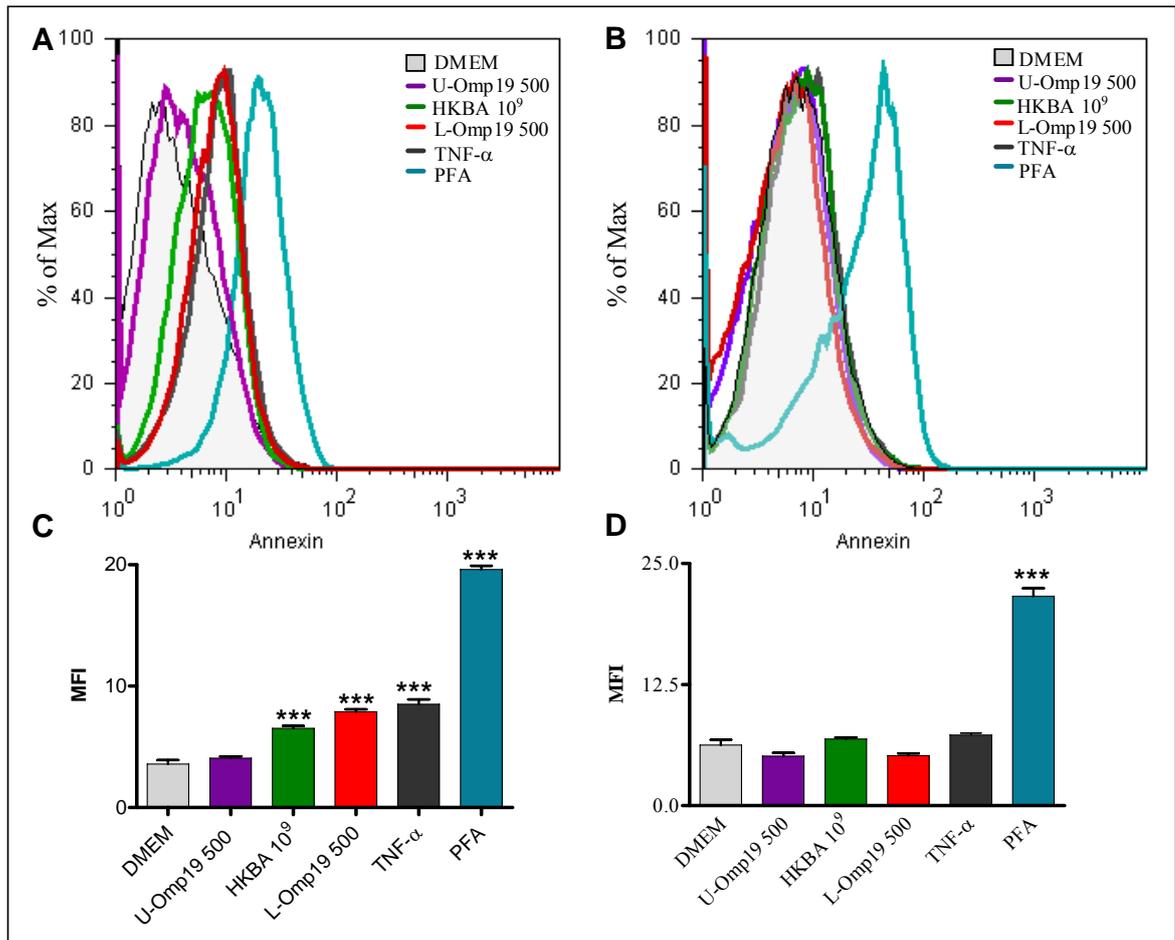


Figura 16. HKBA y L-Omp19 son incapaces de inducir apoptosis en astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-} (ANEXINA). Astrocitos de ratones C57BL/6 (A) o TNFRp55^{-/-} (B) fueron estimulados con DMEM, HKBA (1 x 10⁹ bacteria/ml), TNF-α (5 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (500 ng/ml) o PFA 2%. Luego de 24 h, se determinó apoptosis mediante Anexina V/IP por medio de citometría de flujo. El gráfico de barras muestra la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) para cada estímulo. Las barras expresan la media ± S.E.M de los duplicados (C y D). Los datos mostrados son un experimento representativo de 5 realizados. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

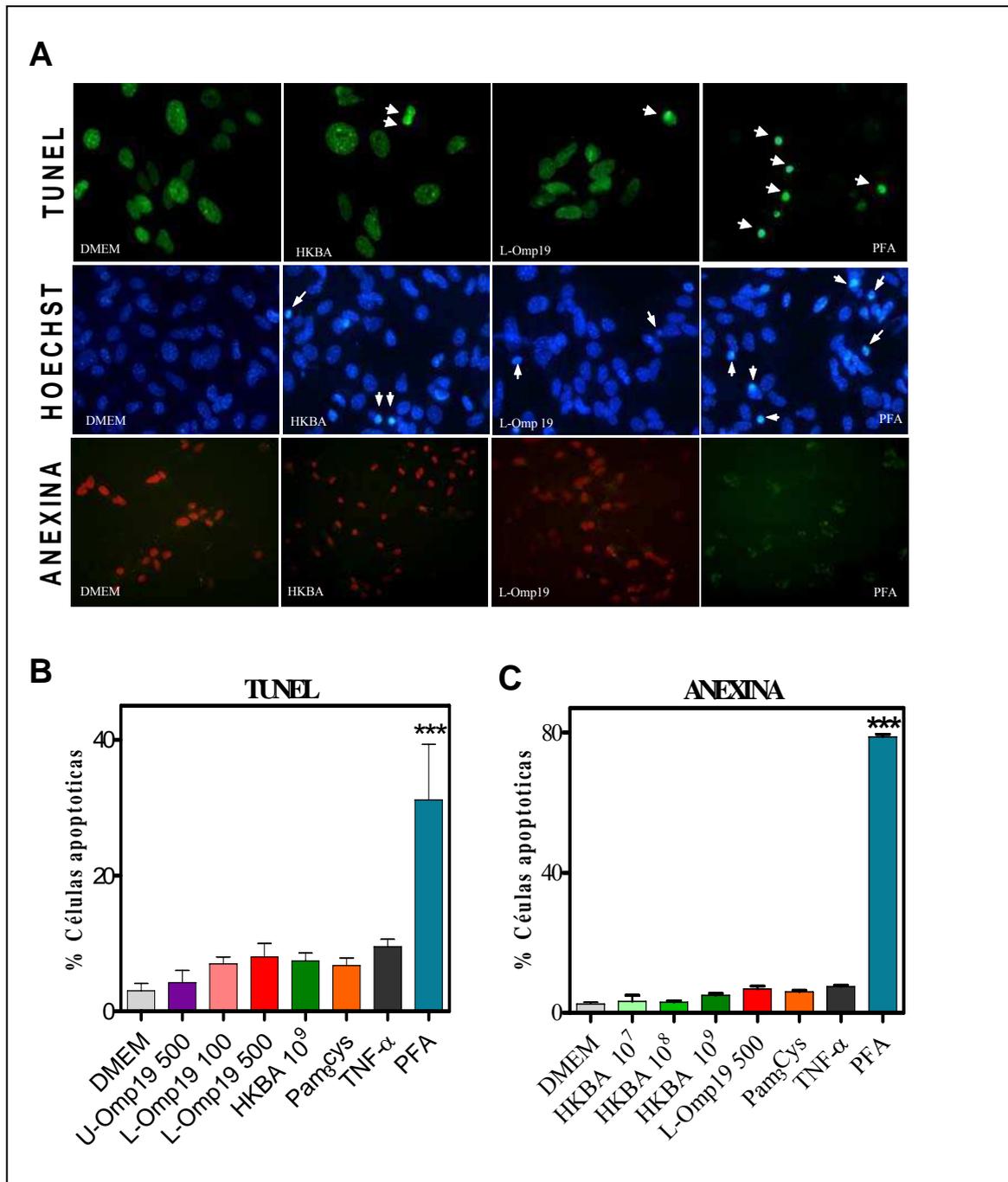


Figura 17. HKBA y L-Omp19 no inducen apoptosis en astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-} (TUNEL y HOECHST). Astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-} fueron estimulados con DMEM, HKBA (1×10^7 - 1×10^9 bacteria/ml), TNF- α (5 ng/ml), U-Omp19 (500 ng/ml), L-Omp19 (100 ng/ml y 500 ng/ml), Pam₃Cys (50 ng/ml) o PFA 2%. Luego de 24 h, se determinó apoptosis por medio de Anexina V/IP, Hoechst dye 33342 y TUNEL. Las flechas indican las células apoptóticas (A). Cuantificación de apoptosis por Anexina V/PI y TUNEL. Barras expresan la media \pm S.E.M de los duplicados (B, C). Los datos mostrados son un experimento representativo de 5 realizados. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ vs. DMEM.

Las caspasas median la apoptosis inducida por HKBA y L-Omp19

Se ha descrito que la señalización de TNF- α vía TNFR1 induce apoptosis a través de la unión de caspasa-8 con el adaptador TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain), que a su vez activa a la caspasa-3 (26)²³⁷. Por lo tanto, nosotros decidimos investigar el rol de las caspasas en la apoptosis inducida por HKBA y L-Omp19.

Para llevarlo a cabo, cultivos de astrocitos fueron tratados con un inhibidor general de las caspasas (Z-VAD-FMK)²³⁸ y luego estimulados con medio completo, HKBA o L-Omp19. El TNF- α y la staurosporina (STS) – un inductor de la apoptosis por medio de la vía de caspasas²³⁸ – fueron usados como controles positivos. La apoptosis fue estimada por medio de la tinción con anexina V/IP y analizada mediante citometría de flujo.

El Z-VAD-FMK inhibió la apoptosis de los astrocitos inducida por HKBA y L-Omp19. Como era de esperar, la apoptosis mediada por el TNF- α y la staurosporina también fue abolida (**Fig. 18**).

Estos resultados indican que las caspasas están involucradas en la apoptosis de astrocitos inducida por HKBA y L-Omp19. Asimismo corroboran que la señalización de TNF- α vía TNFR1 es crítica en la apoptosis de los astrocitos inducida por HKBA y L-Omp19.

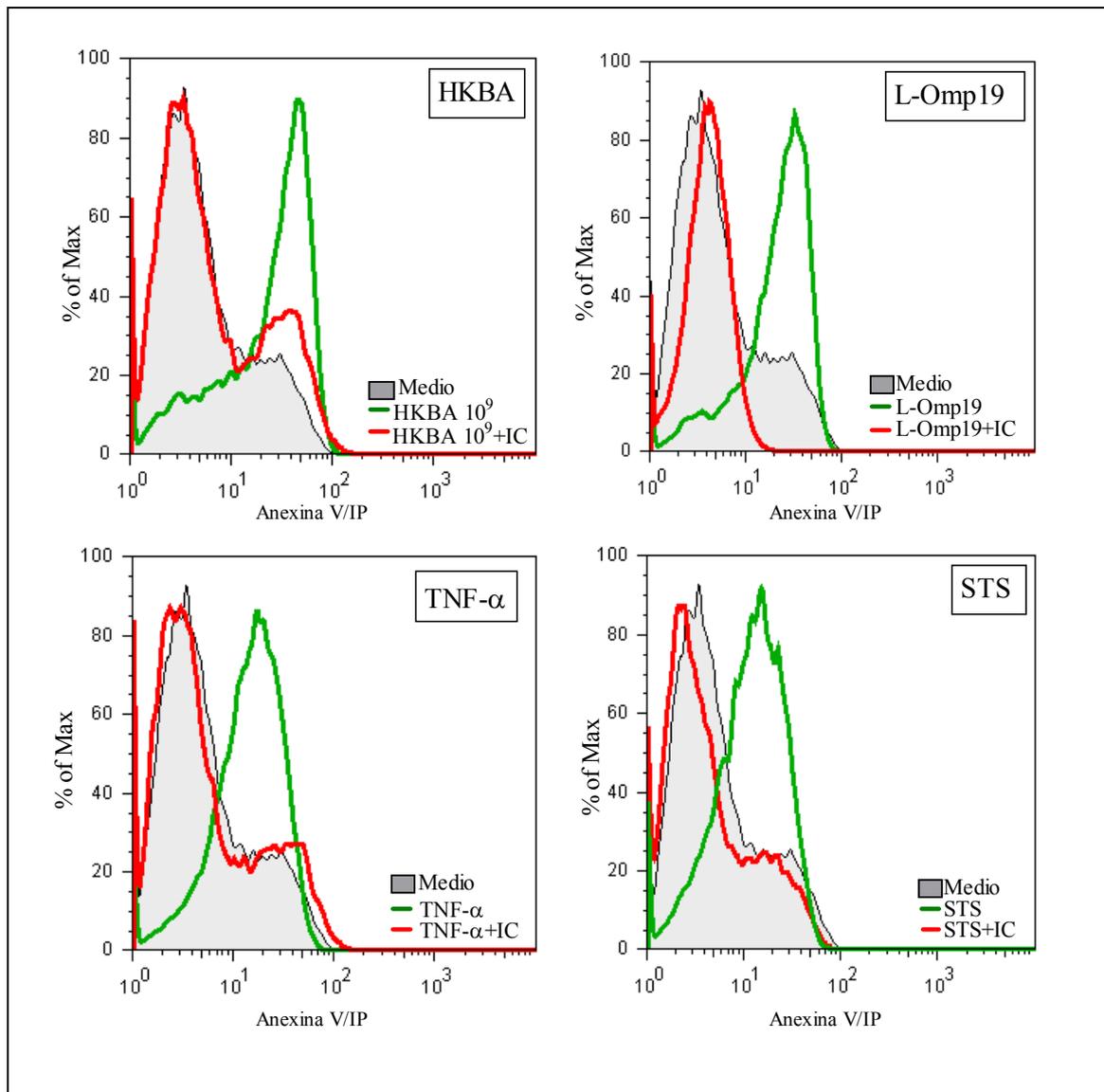
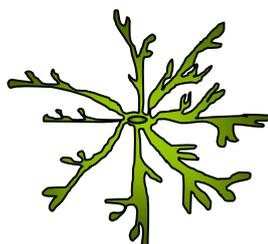


Figura 18. Las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por HKBA y L-Omp19. Astrocitos de ratones BALB/c fueron tratados con un inhibidor general de caspasas (IC) (50 μ M), 2 h después las células fueron estimuladas con DMEM, HKBA (1×10^9 bacteria /ml), L-Omp19 (500 ng/ml), TNF- α (5 ng/ml) o staurosporina (STS) (1 μ M). Luego de 24 h, la apoptosis fue determinada utilizando anexina V/PI por medio de citometría de flujo. Los datos mostrados son de un experimento representativo de 5 realizados.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

El mecanismo preciso por el cual *Brucella* entra en el SNC es desconocido. Dado que las cepas lisas de *Brucella* han desarrollado varios mecanismos para sobrevivir intracelularmente, especialmente dentro de los macrófagos, la infección facilitada por fagocitos (llamado mecanismo de caballo de Troya) es un mecanismo probable para la entrada de la bacteria al SNC¹³⁰. Además, *Brucella* spp. puede invadir fagocitos no profesionales²³⁹, y por lo tanto la invasión transcelular a células endoteliales podría ser otra ruta posible para la infección del SNC por parte de estas bacterias¹³⁰. Ya sea que la bacteria use uno u otro mecanismo, es claro que una vez que alcanza el SNC causa una respuesta inflamatoria patológica²⁰⁸. Los mecanismos que llevan a los signos y síntomas de la neurobrucelosis aún son desconocido. Se ha propuesto que el daño causado en el SNC, puede ser atribuido a la acción directa de la bacteria o a un proceso inmunopatológico debido al efecto de las citoquinas inflamatorias^{208, 239}.

En este trabajo nosotros presentamos evidencias de que la presencia directa de *B. abortus* en el cerebro de ratones normales induce una respuesta inflamatoria que lleva a la astrogliosis. Esto fue logrado utilizando HKBA. No podemos determinar si la bacteria viva podría inducir una respuesta mayor o no. Sin embargo si HKBA fue capaz de inducir astrogliosis nosotros esperaríamos que la bacteria viva también pudiera reproducir este fenómeno, al menos en un nivel similar. Imitando lo que fue documentado en pacientes con neurobrucelosis²⁴⁰, junto con la astrogliosis se indujo un infiltrado celular compuesto de neutrófilos, indicando que la injuria del microorganismo desencadenó un proceso inflamatorio. Ni la astrogliosis ni el infiltrado neutrofílico fueron observados en animales inyectados con solución fisiológica o en áreas del cerebro donde la bacteria no fue inyectada. Por lo tanto, hay una relación causal entre la presencia de *Brucella* y el proceso inflamatorio inducido en el cerebro.

En vista de esto, la aproximación experimental que nosotros postulamos fue i) demostrar, aunque *in vitro*, la habilidad de *B. abortus* para infectar y replicarse dentro de astrocitos y microglía, e inducir una respuesta inflamatoria debido a la infección y ii) probar que *B. abortus*, particularmente sus lipoproteínas, pueden causar astrogliosis en astrocitos en reposo debido a la inflamación producida. Creemos haber logrado ambas metas.

Hasta donde nosotros sabemos, este es el primer trabajo que muestra que *B. abortus* puede infectar y multiplicarse dentro de astrocitos y microglía. La bacteria infecta preferentemente microglía murina más que astrocitos. Este descubrimiento no es particularmente sorprendente dada la considerable bibliografía que establece que *B. abortus* tiene tropismo por

los macrófagos^{30, 241}. Existen otras bacterias intracelulares que infectan el SNC como *Listeria* y *Mycobacterium*, que también tienen tropismo preferencial por microglía más que por astrocitos^{242, 243}. El hecho que *B. abortus* sea capaz de infectar astrocitos suma nueva evidencia acerca de la habilidad de la bacteria para sobrevivir dentro de células no fagocíticas como osteoblastos¹¹ y células epiteliales²⁴⁴.

Evidencias crecientes le asignan un rol prominente a la inflamación como un factor patogénico potencial en muchas enfermedades del SNC. Tanto astrocitos como microglía son los principales efectores de la respuesta inmune innata del SNC^{55, 118, 123, 245}, siendo activados en condiciones patológicas como las infecciones microbianas^{159, 242, 246} y enfermedades neurodegenerativas^{247, 248}. La infección de astrocitos y microglía por *B. abortus* induce la producción de una variedad de citoquinas (TNF- α , IL-1 β y IL-6) y quimiocinas (KC y MCP-1). A pesar que estos mediadores pro-inflamatorios podrían hipotéticamente jugar un rol tanto directa o indirectamente en la defensa del hospedador con *B. abortus*, también podrían tener un rol importante en la iniciación, propagación y regulación de la respuesta inmune innata inflamatoria en el cerebro. Diversos mediadores pro-inflamatorios incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno y quimiocinas liberadas por los astrocitos y microglía demostraron actuar acrecentando enfermedades como la encefalitis por HIV²⁴⁹⁻²⁵¹, la encefalitis por *Toxoplasma*, la enfermedad de Alzheimer²⁴⁹⁻²⁵¹ y la esclerosis múltiple²⁵¹, entre otras. De hecho, la presencia de infiltrado neutrofílico en el cerebro de los ratones inyectados con HKBA podría reflejar la habilidad de los astrocitos y microglía de secretar KC – uno de los mayores quimioattractantes responsables del reclutamiento de neutrófilos en ratones²⁵² – luego de la infección/estimulación con *B. abortus*.

La producción de los mediadores inflamatorios no fue dependiente de la viabilidad de la bacteria, dado que éstos también son inducidos al ser expuestos ambos tipos celulares (astrocitos y microglía) a la bacteria muerta por calor (HKBA), sugiriendo que son inducidos por algún componente estructural de la bacteria. Este trabajo de tesis establece que el componente estructural responsable de la respuesta no es el LPS de *B. abortus*.

B. abortus posee lipoproteínas²⁵ y estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que éstas pueden liberar mediadores inflamatorios de varios tipos celulares^{10, 113, 114}. Así como otras lipoproteínas bacterianas tienen la habilidad de inducir la liberación de citoquinas inflamatorias en células del SNC²⁴⁶, nosotros propusimos como hipótesis que las lipoproteínas de *B. abortus* podrían ser los componentes estructurales involucrados en el fenómeno observado. L-Omp 19, una lipoproteína prototípica de *B. abortus*, indujo la secreción de citoquinas (TNF- α , IL-1 β y IL-6) y quimiocinas (KC y MCP-1) en astrocitos y microglía en forma dosis

dependiente. U-Omp19 no tuvo efecto, demostrando que la acilación de Omp19 es necesaria para su actividad biológica. No solo L-Omp19 sino también Pam₃Cys fueron capaces de inducir mediadores inflamatorios. Dado que todas las lipoproteínas de *Brucella* comparten la modificación del Pam₃Cys, esto implica que cualquier lipoproteína debería ser capaz de producir este efecto. Puesto que el genoma de *B. abortus* contiene no menos de 80 genes putativos que codifican para lipoproteínas²⁵³, muchas de las cuales se expresan en la membrana externa de la bacteria²⁵, uno podría esperar que la concentración local de lipoproteínas de *B. abortus* en espacios confinados dentro del cerebro son suficientes como para ejercer su efecto biológico. En este contexto nosotros postulamos que cualquier lipoproteína puede ser relevante más allá de cualquier experimento *in vitro* y que no una lipoproteína sino una combinación de las mismas podrían contribuir a la respuesta pro-inflamatoria promovida por *B. abortus* en astrocitos y microglía.

La participación de TLR2 en la inducción de la astrogliosis y en la producción de citoquinas y quimiocinas promovidas por *B. abortus* merece discusión. Nuestros resultados indican que tanto HKBA como L-Omp19 estimulan la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 y KC vía TLR2, y coinciden en este aspecto con los resultados obtenidos por Huang y col.⁷³. En dicho trabajo los investigadores observan que HKBA también induce TNF- α en células de ratones vía TLR2. En cambio Campos y col.⁵⁹ obtienen evidencias que sugiere que la producción del TNF- α inducida por HKBA es dependiente de TLR4. Nosotros también mostramos, al igual que Huang y col. que el LPS no es el mediador de la actividad de HKBA y proveemos pruebas de que las lipoproteínas de *Brucella* serían ligandos TLR2 que la bacteria utiliza para disparar la liberación de mediadores pro-inflamatorios.

Cabe destacar además que nuestros resultados indican que el TLR2 no está involucrado en la infección de la bacteria sino en la respuesta inflamatoria desencadenada. Estos resultados junto con los obtenidos por otros laboratorios^{57, 59} suman evidencias a la noción de que el TLR2 solo participa en mediar respuestas inflamatorias en brucelosis.

La astrogliosis es una enfermedad no específica. Los astrocitos que sufren gliosis aumentan su tamaño, se dividen más rápidamente, y expresan activamente GFAP, así como proteína S100, precursores de la proteína amiloide y muchos receptores^{135, 254}. Cualquier injuria cerebral (infección, autoinmunidad, tumor o accidente cerebro-vascular) puede inducir dicha gliosis, cuya intensidad y duración puede ser limitada por la apoptosis de los astrocitos, como fue reportado en la encefalitis causada por HIV²⁵⁵, neuroborreliosis²⁴⁶, enfermedad de Alzheimer²⁵⁶ y esclerosis múltiple²⁵⁷. La astrogliosis también está presente en la neurobrucelosis^{188, 220}, y en este trabajo nosotros hemos corroborado que la inyección tanto de la bacteria como de

lipoproteínas de *Brucella* en el cerebro de ratones sanos induce astrogliosis. En este trabajo también se corroboró *in vitro* que *B. abortus* y sus lipoproteínas pueden causar astrogliosis. Un hecho basado en dos características de este fenómeno: aumento en la tasa de división celular y apoptosis^{232, 233}.

Nuestros resultados revelan que HKBA y L-Omp19 inducen la proliferación de astrocitos. Es más, la evaluación de la tasa de división celular por medio de la incorporación de BrdU hizo posible la observación de una dicotomía en el comportamiento de la respuesta de los astrocitos ante la estimulación con HKBA. Alrededor del 20% de la población de los astrocitos aumenta su tasa de división celular mientras el resto de las células deja de dividirse respecto a la tasa de división de las células no estimuladas. Los experimentos de incorporación de BrdU demostraron que una subpoblación de astrocitos es capaz de aumentar su tasa de división, y así exhibir esta característica de astrogliosis, en respuesta a *B. abortus*. Nosotros asumimos pero no demostramos, que la población de astrocitos que se divide lentamente o no se divide (que fue identificada en el experimento de incorporación de BrdU) ha entrado, al menos en parte, en apoptosis.

La segunda característica de astrogliosis que nosotros decidimos explorar fue la apoptosis. La infección con *B. abortus* induce la apoptosis de astrocitos. Así como la capacidad de inducir mediadores inflamatorios, la apoptosis inducida por *B. abortus* no es dependiente de la viabilidad bacteriana y es producida, al menos, por sus lipoproteínas. Tres determinaciones diferentes (anexina V/IP, Hoechst dye y TUNEL) corroboraron que HKBA y L-Omp19 son capaces de inducir apoptosis de astrocitos. En la actualidad, aún se debate si la apoptosis inducida por un patógeno es beneficiosa o perjudicial para el hospedador²⁵⁸. La desregulación de los astrocitos generada por la invasión de *B. abortus* podría generar un micro ambiente en el cual la secreción de mediadores pro-inflamatorios podrían llevar a la desestabilización de la estructura de la glía. Por otro lado, la apoptosis proveería los medios para que el hospedador disminuyera la respuesta inflamatoria y limitara el daño causado por los componentes bacterianos pro-inflamatorios. Parece contradictorio que *B. abortus* y sus lipoproteínas sean capaces de inducir la apoptosis de astrocitos cuando ha sido reportado que las especies de *Brucella* son capaces de inhibir la apoptosis en macrófagos^{88, 234}. Sin embargo, a diferencia de los astrocitos, la microglía fue resistente a la apoptosis mediada por *Brucella*. Dado que *Brucella* está particularmente adaptada a infectar y replicarse en macrófagos^{30, 241}, y la microglía son los macrófagos residentes del cerebro, su resistencia a la apoptosis debería ayudar a asegurarse su viabilidad para poder establecer una infección crónica.

Desconocemos a que se podrían deber las diferentes susceptibilidades a la apoptosis entre astrocitos y microglía, pero el hecho que la apoptosis en astrocitos sea mediada por un ligando TLR2, tal como la lipoproteína de *B. abortus* L-Omp19^{10, 113, 114}, podría ayudar a clarificar esta cuestión. Aliprantis y col¹⁰⁹, observaron al estudiar la activación celular mediada por TLR2, utilizando HEK293 transfectadas, que las lipoproteínas/lipopéptidos tienen propiedades proapoptóticas. En cambio, estudios con macrófagos murinos no pudieron confirmar que la señalización vía TLR2 sea intrínsecamente apoptogénica²⁵⁹⁻²⁶². También ha sido reportado para otras infecciones microbianas una susceptibilidad a la apoptosis dependiente del tipo celular^{258, 263} incluyendo una susceptibilidad diferencial entre astrocitos y microglía^{264, 265}.

Como muchas citoquinas la IL-6 es pleiotrópica. En el SNC, la IL-6 desarrolla efectos beneficiosos y perjudiciales. Los efectos nocivos de la IL-6 están asociados al exceso de producción de esta citoquina. Se cree que la sobre expresión de la misma puede ser un factor que contribuye en muchas de las enfermedades del SNC, dentro de los cuales se encuentran la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular, y shock séptico²⁴⁹⁻²⁵¹. Dado que la IL-6 es capaz de promover la proliferación de astrocitos, se cree que la misma puede desempeñar un rol en la astrogliosis. En este trabajo, cuando se agregó IL-6 recombinante aumentó marcadamente la división celular en astrocitos murinos en relación a la tasa de división celular de los tratados con medio solamente. Sin embargo, la adición de un exceso molar de Ac. anti-IL-6 durante la estimulación con HKBA, L-Omp19 o Pam₃Cys solo pudo inhibir parcialmente la incorporación de [³H] timidina. Otras citoquinas que también son expresadas por astrocitos y por las cuales estas células tienen receptores, como IL-3 e INF- γ ²⁶⁶, han sido implicadas en la proliferación de astrocitos y es posible que la producción de estas citoquinas sea inducida también por la lipoproteínas. Esto aún no ha sido establecido en nuestro laboratorio.

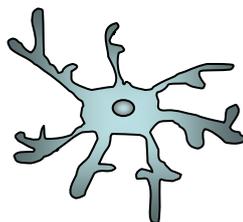
El TNF- α actúa a través de 2 receptores de superficie: TNFR1 y TNFR2. TNFR2 se expresa solo en células hematopoyéticas y endoteliales, mientras TNFR1 es expresado en todos los tipos celulares e inicia la mayoría de los procesos biológicos mediados por TNF- α ²³⁷. A pesar que los 2 receptores de TNF- α se encuentran en el cerebro, TNFR1 se expresa en forma constitutiva en los astrocitos²⁶⁷ mientras que TNFR2 se observa solo cuando éstos son estimulados²⁶⁸. La mayor diferencia entre estos 2 receptores es la presencia de dominios de muerte en TNFR1, lo cual le confiere la habilidad de inducir apoptosis²³⁷. La IL-6 inducida por las lipoproteínas contribuye, pero no determina, a estimular la proliferación de los astrocitos. Sin embargo el TNF- α vía la señalización de TNFR1 parece ser el único determinante de la apoptosis de los astrocitos cuando son estimulados con *B. abortus* o sus lipoproteínas, dado que

la apoptosis es completamente inhibida cuando se utilizan astrocitos de ratones TNFRp55^{-/-}. El hecho de que un pan-inhibidor de caspasas también inhiba la apoptosis inducida por *B. abortus* remarca la relevancia de la señalización del TNF- α vía TNFR1 en este fenómeno, ya que se ha descrito que la apoptosis vía TNFR1 involucra la activación de caspasas²³⁷. Ha sido reportado tanto para la IL-6 como para el TNF- α , que juegan un rol en el daño derivado de infecciones como la meningitis bacteriana, la malaria cerebral y el síndrome de demencia del SIDA, así como desordenes neurodegenerativos como Alzheimer o esclerosis múltiple.

El presente estudio de interacción de *B. abortus* con las células de la glía, nos ha provisto de información potencial respecto de 3 elementos de la patogénesis de la brucelosis en el SNC. En primer lugar la bacteria infecta microglía y astrocitos, con un tropismo preferencial por las primeras. Segundo, la infección de ambos tipos celulares induce la secreción de una variedad de citoquinas (TNF- α , IL-1 β y IL-6) y quimiocinas (KC y MCP-1), algunas de las cuales contribuyen al daño en el SNC, ya que están involucradas directamente en el fenómeno de proliferación y apoptosis de astrocitos cuando son estimulados con la bacteria. Tercero, que las lipoproteínas de *Brucella* son los principales contribuyentes a la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria. Estas razones nos llevan a postular que la respuesta inmune innata a los PAMP's de *B. abortus* (principalmente las lipoproteínas) generarían una respuesta inflamatoria vía TLR2 que llevarían a una apoptosis vía TNF- α (dependiente de caspasas) de células de la glía y eventualmente de las neuronas. Este daño podría llevar a producir el déficit neurológico observado en neurobrucelosis^{43, 190, 224}.

Dado que la red de interacciones fisiológicas descritas en este trabajo no se circunscribe a brucelosis, es razonable asumir que el conocimiento que emerge de este trabajo no es necesariamente restringido a esta enfermedad, sino que tiene una trascendencia significativa en otras neuropatologías. Mas aún, la activación de astrocitos y microglía y la subsecuentemente iniciación de la respuesta inmune inflamatoria podría ser un importante componente de otros desordenes inflamatorios en el SNC.

CONCLUSIONES



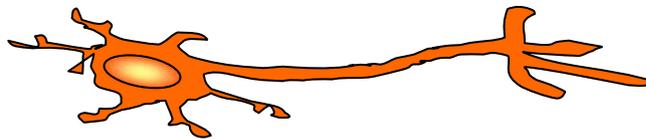
CONCLUSIONES

- ♣ Este trabajo permitió desarrollar un **modelo** en el cual fuera posible esclarecer los determinantes de una de las manifestaciones más mórbidas de la brucelosis, la neurobrucelosis. También nos proporcionó información esencial respecto de 3 elementos de la patogénesis de la brucelosis en el SNC:
- ♣ En primer lugar, la bacteria infecta microglía y astrocitos, con un tropismo preferencial por las primeras.
- ♣ En segundo lugar, la infección de ambos tipos celulares induce la secreción de una variedad de citoquinas y quimiocinas que contribuyen al daño en el SNC, ya que están involucradas directamente en el fenómeno de proliferación y apoptosis de astrocitos cuando son estimulados con la bacteria.
- ♣ En tercer lugar, las lipoproteínas de *Brucella* son los principales contribuyentes a la respuesta inflamatoria inducida por la bacteria.
- ♣ Estas razones nos llevan a postular que la respuesta inmune innata contra los PAMPs de *B. abortus* (específicamente lipoproteínas) generaría una respuesta inflamatoria vía TLR2 que llevaría a una apoptosis mediada por TNF- α (dependiente de caspasas) de células de la glía y eventualmente de las neuronas. Este daño podría llevar a producir el déficit neurológico observado en neurobrucelosis.
- ♣ En conjunto, este modelo posibilitó delinear un mecanismo patogénico para la brucelosis en el SNC. Además permitió analizar cómo el deterioro de las funciones de la astroglia y microglía contribuye al desarrollo de ésta y potencialmente, de otras enfermedades neurológicas

Lic. Clara García Samartino

Dr. Guillermo. H. Giambartolomei

REFERENCIAS



REFERENCIAS

1. Wilkinson L: "Brucellosis", In Kiple, Kenneth F. (ed.), Cambridge University Press. 1993, The Cambridge World History of Human Disease, Cambridge:
2. Serre A, Bascoul S, Vendrell JP, Cannat A: Human immune response to *Brucella* infection, *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987, 138:113-117
3. Garcia Carrillo C, Szyfres B, Gonzalez Tome J: [Typing of *Brucella* isolated from humans and animals in Latin America], *Rev Latinoam Microbiol* 1972, 14:117-125
4. Samartino LE: Brucellosis in Argentina, *Vet Microbiol* 2002, 90:71-80
5. Velasco J, Romero C, Lopez-Goni I, Leiva J, Diaz R, Moriyon I: Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp, *Int J Syst Bacteriol* 1998, 48 Pt 3:759-768
6. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P: Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*, *J Bacteriol* 2009, 191:2864-2870
7. Young EJ: An overview of human brucellosis, *Clin Infect Dis* 1995, 21:283-289; quiz 290
8. Elzer PH, Phillips RW, Robertson GT, Roop RM, 2nd: The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes, *Infect Immun* 1996, 64:4838-4841
9. Porte F, Liautard JP, Kohler S: Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages, *Infect Immun* 1999, 67:4041-4047
10. Zwerdling A, Delpino MV, Barrionuevo P, Cassataro J, Pasquevich KA, Garcia Samartino C, Fossati CA, Giambartolomei GH: *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*, *Microbes Infect* 2008, 10:1346-1354
11. Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC: Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp, *Infect Immun* 2009, 77:984-995
12. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop RM, 2nd, Robertson GL, Hoover DL: Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis, *Infect Immun* 2003, 71:2110-2119
13. Tolomeo M, Di Carlo P, Abbadessa V, Titone L, Miceli S, Barbusca E, Cannizzo G, Mancuso S, Arista S, Scarlata F: Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management, *Clin Infect Dis* 2003, 36:1533-1538
14. Cloeckert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J: Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus, *Microbes Infect* 2001, 3:729-738
15. Ko J, Splitter GA: Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans, *Clin Microbiol Rev* 2003, 16:65-78
16. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS: Review of clinical and laboratory features of human brucellosis, *Indian J Med Microbiol* 2007, 25:188-202
17. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC: *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen, *BMC Genomics* 2009, 10:352

18. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kampfer P, Cloeckeaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK: *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection, *Int J Syst Evol Microbiol* 2009,
19. Bouza E, Garcia de la Torre M, Parras F, Guerrero A, Rodriguez-Creixems M, Gobernado J: Brucellar meningitis, *Rev Infect Dis* 1987, 9:810-822
20. Mayer-Scholl A, Draeger A, Gollner C, Scholz H, Nockler K: Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species, *J Microbiol Methods* 2009,
21. Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ: Porins of *Brucella* species, *Infect Immun* 1984, 44:16-21
22. Mobasher H, Ficht TA, Marquis H, Lea EJ, Lakey JH: *Brucella* Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction, *FEMS Microbiol Lett* 1997, 155:23-30
23. Tibor A, Saman E, de Wergifosse P, Cloeckeaert A, Limet JN, Letesson JJ: Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*, *Infect Immun* 1996, 64:100-107
24. Winter AJ, Verstrete DR, Hall CE, Jacobson RH, Castleman WL, Meredith MP, McLaughlin CA: Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants, *Infect Immun* 1983, 42:1159-1167
25. Tibor A, Decelle B, Letesson JJ: Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins, *Infect Immun* 1999, 67:4960-4962
26. Bae JE, Schurig GG, Toth TE: Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens, *Vet Microbiol* 2002, 88:189-202
27. Bowden RA, Cloeckeaert A, Zygmunt MS, Dubray G: Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*, *J Med Microbiol* 1998, 47:39-48
28. Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, Garcia Samartino C, Giambartolomei GH: *Brucella abortus* activates human neutrophils, *Microbes Infect* 2009, 11:689-697
29. Corbel MJ: Brucellosis: an overview, *Emerg Infect Dis* 1997, 3:213-221
30. Gorvel JP, Moreno E: *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication, *Vet Microbiol* 2002, 90:281-297
31. Drevets DA, Leenen PJ, Greenfield RA: Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria, *Clin Microbiol Rev* 2004, 17:323-347
32. Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E: Limited genetic diversity of *Brucella* spp, *J Clin Microbiol* 2001, 39:235-240
33. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K: Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis, *J Clin Microbiol* 1999, 37:3245-3248
34. Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay E, Khrestchatisky M: [The MMP/TIMP system in the nervous system], *Med Sci (Paris)* 2004, 20:55-60
35. Godfroid J, Cloeckeaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ: From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis, *Vet Res* 2005, 36:313-326
36. SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. SENASA Argentina [On-line]. <http://www.senasa.gov.ar/indexhtml.php>. Edited by 2005, p.

37. INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA [On-line]. <http://www.inta.gov.ar/actual/ant/2005/may18.htm>. Edited by 2005, p.
38. Garcia-Carrillo C: La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana., Paris. OIE 1987, p.303
39. Hernandez-Mora G, Gonzalez-Barrientos R, Morales JA, Chaves-Olarte E, Guzman-Verri C, Barquero-Calvo E, De-Miguel MJ, Marin CM, Blasco JM, Moreno E: Neurobrucellosis in stranded dolphins, Costa Rica, Emerg Infect Dis 2008, 14:1430-1433
40. El-Amin EO, George L, Kutty NK, Sharma PP, Choithramani RS, Jhaveri VP, Salil P, Bedair SM: Brucellosis in children of Dhofar Region, Oman, Saudi Med J 2001, 22:610-615
41. Moreno-Lafont MC, Lopez-Merino A, Lopez-Santiago R: Cell response to a salt-extractable and sonicated *Brucella melitensis* 16M antigen in human brucellosis, Clin Diagn Lab Immunol 1995, 2:377-380
42. Wallach JC, Ferrero MC, Victoria Delpino M, Fossati CA, Baldi PC: Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina, Clin Microbiol Infect 2008, 14:805-807
43. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E: Brucellosis, N Engl J Med 2005, 352:2325-2336
44. Memish Z, Mah MW, Al Mahmoud S, Al Shaalan M, Khan MY: *Brucella* bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients, J Infect 2000, 40:59-63
45. Montejo JM, Alberola I, Glez-Zarate P, Alvarez A, Alonso J, Canovas A, Aguirre C: Open, randomized therapeutic trial of six antimicrobial regimens in the treatment of human brucellosis, Clin Infect Dis 1993, 16:671-676
46. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H: Immunity and protection against *Brucella abortus*, Microbes Infect 2001, 3:43-48
47. Spector WG, Reichhold N, Ryan GB: Degradation of granuloma-inducing microorganisms by macrophages, J Pathol 1970, 101:339-354
48. Span LF, Pennings AH, Vierwinden G, Boezeman JB, Raymakers RA, de Witte T: The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique, Cytometry 2002, 47:24-31
49. Frenchick PJ, Markham RJ, Cochran AH: Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*, Am J Vet Res 1985, 46:332-335
50. Canning PC: Phagocyte function in resistance to brucellosis, Texas A&M University Press, College Station 1990, Advances in brucellosis research:151.
51. Billard E, Cazevieille C, Dornand J, Gross A: High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*, Infect Immun 2005, 73:8418-8424
52. Fernandes DM, Baldwin CL: Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*, Infect Immun 1995, 63:1130-1133
53. Baldwin CL, Goenka R: Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection?, Crit Rev Immunol 2006, 26:407-442
54. Sun N, Grzybicki D, Castro RF, Murphy S, Perlman S: Activation of astrocytes in the spinal cord of mice chronically infected with a neurotropic coronavirus, Virology 1995, 213:482-493
55. Farina C, Aloisi F, Meinel E: Astrocytes are active players in cerebral innate immunity, Trends Immunol 2007, 28:138-145
56. Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC: Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection, J Immunol 2008, 180:1080-1087

57. Oliveira SC, de Oliveira FS, Macedo GC, de Almeida LA, Carvalho NB: The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond, *Microbes Infect* 2008, 10:1005-1009
58. Cassataro J, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, Pasquevich KA, Fossati CA, Giambartolomei GH: A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response, *Infect Immun* 2005, 73:6537-6546
59. Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC: Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice, *Infect Immun* 2004, 72:176-186
60. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, Muscat C, Scalise F, Castellucci G, Sposito M, Candio F, Vaccaro R: Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection, *Eur J Immunol* 1993, 23:1177-1180
61. Ottones F, Dornand J, Naroeni A, Liautard JP, Favero J: V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect, *J Immunol* 2000, 165:7133-7139
62. Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Diaz R: Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*, *Infect Immun* 1989, 57:1419-1426
63. Zhan Y, Kelso A, Cheers C: Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts, *Immunology* 1993, 80:458-464
64. Zhan Y, Liu Z, Cheers C: Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms, *Infect Immun* 1996, 64:2782-2786
65. Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, Lee YL, Angus RD, Golding B: Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines, *Infect Immun* 1992, 60:1385-1389
66. Demirdag K, Ozden M, Kalkan A, Godekmerdan A, Sirri Kilic S: Serum cytokine levels in patients with acute brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers, *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003, 39:149-153
67. Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Splitter GA: Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis, *J Immunol* 2002, 168:2433-2440
68. Zhan Y, Cheers C: Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro, *Infect Immun* 1995, 63:720-723
69. Ho M, Cheers C: Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*, *J Infect Dis* 1982, 146:381-387
70. Jiang X, Baldwin CL: Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*, *Infect Immun* 1993, 61:124-134
71. Stevens MG, Olsen SC: In vitro effects of live and killed *Brucella abortus* on bovine cytokine and prostaglandin E2 production, *Vet Immunol Immunopathol* 1994, 40:149-161
72. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B: *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*, *Infect Immun* 1996, 64:3109-3117
73. Huang LY, Aliberti J, Leifer CA, Segal DM, Sher A, Golenbock DT, Golding B: Heat-killed *Brucella abortus* induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways:

- TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent, *J Immunol* 2003, 171:1441-1446
74. Serre A, Young EJ, Corbel MJ: Immunology and pathophysiology of human brucellosis. In: *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects*. Edited by 1989, p. p. 85.
75. Lulu AR, Araj GF, Khateeb MI, Mustafa MY, Yusuf AR, Fenech FF: Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases, *Q J Med* 1988, 66:39-54
76. Khateeb MI, Araj GF, Majeed SA, Lulu AR: Brucella arthritis: a study of 96 cases in Kuwait, *Ann Rheum Dis* 1990, 49:994-998
77. Madkour MM, Al-Moutaery KR, Al-Deeb S: Neurobrucellosis. In: Madkour MM, ed. *Madkour's Brucellosis*. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 166-78., 2001,
78. Chevrel J, Riojas A, Lafargues JP, Sarlangue J, Barbier R: [Osteoarticular brucellosis and signs of autoimmunity], *Arch Pediatr* 2001, 8:834-837
79. Colmenero JD, Reguera JM, Fernandez-Nebro A, Cabrera-Franquelo F: Osteoarticular complications of brucellosis, *Ann Rheum Dis* 1991, 50:23-26
80. Kubler PA, Klestov AC: Osteoarticular brucellosis with long latent period, *Clin Rheumatol* 2001, 20:444-446
81. Priest JR, Low D, Wang C, Bush T: Brucellosis and sacroiliitis: a common presentation of an uncommon pathogen, *J Am Board Fam Med* 2008, 21:158-161
82. Antinori A, Giancola ML, Alba L, Soldani F, Grisetti S: Cardiomyopathy and encephalopathy in AIDS, *Ann N Y Acad Sci* 2001, 946:121-129
83. Jordans HG, DeBruin KD: Granulomas in *Brucella melitensis* infection, *Ann Intern Med* 1980, 92:264-265
84. Colmenero Jde D, Queipo-Ortuno MI, Maria Reguera J, Angel Suarez-Munoz M, Martin-Carballino S, Morata P: Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, 42:159-167
85. Letesson JJ, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, Fretin D, Taminiau B, Tibor A, Dricot A, Deschamps C, Haine V, Leonard S, Laurent T, Mertens P, Vandenhautte J, De Bolle X: Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug", *Vet Microbiol* 2002, 90:317-328
86. Roop RM, 2nd, Gee JM, Robertson GT, Richardson JM, Ng WL, Winkler ME: *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence, *Annu Rev Microbiol* 2003, 57:57-76
87. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N: *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes, *Vet Microbiol* 2008, 129:1-14
88. Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Dornand J: In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells, *Infect Immun* 2000, 68:342-351
89. He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, Ding X, Lathigra R, Craig JC, Sobral BW, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SM: *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages, *Infect Immun* 2006, 74:5035-5046
90. Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D, Foulongne V, Rouot B, Dornand J: Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes, *J Leukoc Biol* 2003, 74:1045-1055
91. Teixeira-Gomes AP, Cloeckert A, Zygmunt MS: Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*, *Infect Immun* 2000, 68:2954-2961
92. Huang L, Krieg AM, Eller N, Scott DE: Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria, *Infect Immun* 1999, 67:6257-6263
93. Waage A, Halstensen A, Espevik T: Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease, *Lancet* 1987, 1:355-357

94. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA: Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells, *J Clin Invest* 1986, 77:645-648
95. Evequoz V, Bettens F, Kristensen F, Trechsel U, Stadler BM, Dayer JM, De Weck AL, Fleisch H: Interleukin 2-independent stimulation of rabbit chondrocyte collagenase and prostaglandin E2 production by an interleukin 1-like factor, *Eur J Immunol* 1984, 14:490-495
96. Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol* 1992, 10:411-452
97. Takemura R, Werb Z: Secretory products of macrophages and their physiological functions, *Am J Physiol* 1984, 246:C1-9
98. Kreutzer DL, Robertson DC: Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*, *Infect Immun* 1979, 23:819-828
99. Young EJ, Borchert M, Kretzer FL, Musher DM: Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes, *J Infect Dis* 1985, 151:682-690
100. Moreno E, Berman DT, Boettcher LA: Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides, *Infect Immun* 1981, 31:362-370
101. Ulevitch RJ, Tobias PS: Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu Rev Immunol* 1995, 13:437-457
102. Berman DT, Kurtz RS: Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS, *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987, 138:98-101
103. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaiillon JM, Van der Meer JW: Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?, *Trends Immunol* 2002, 23:135-139
104. Qureshi N, Takayama K, Seydel U, Wang R, Cotter J, Agrawal PK, Bush CA, Kurtz R, Berman DT: Structural analysis of lipid A derived from lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. , *J. Endotoxin Res.* 1: 137. 1994,
105. Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, *Annu Rev Immunol* 2002, 20:709-760
106. Giambartolomei GH, Dennis VA, Lasater BL, Philipp MT: Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14, *Infect Immun* 1999, 67:140-147
107. Ma Y, Weis JJ: *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties, *Infect Immun* 1993, 61:3843-3853
108. Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV: *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages, *J Immunol* 1995, 154:2866-2877
109. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science* 1999, 285:736-739
110. Giambartolomei GH, Dennis VA, Philipp MT: *Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys, *Infect Immun* 1998, 66:2691-2697
111. Giambartolomei GH, Dennis VA, Lasater BL, Murthy PK, Philipp MT: Autocrine and exocrine regulation of interleukin-10 production in THP-1 cells stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins, *Infect Immun* 2002, 70:1881-1888
112. Tibor A, Weynants V, Denoel P, Lichtfouse B, De Bolle X, Saman E, Limet JN, Letesson JJ: Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins, *Infect Immun* 1994, 62:3633-3639

113. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT: Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*, *J Immunol* 2004, 173:4635-4642
114. Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino MV, Zwerdling A, Pasquevich KA, Garcia Samartino C, Wallach JC, Fossati CA, Giambartolomei GH: *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2, *Infect Immun* 2008, 76:250-262
115. Stichel CC, Muller HW: The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier, *Cell Tissue Res* 1998, 294:1-9
116. Bignami A, Dahl D: Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein, *J Comp Neurol* 1974, 153:27-38
117. Brown GC: Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase, *Biochem Soc Trans* 2007, 35:1119-1121
118. Dong Y, Benveniste EN: Immune function of astrocytes, *Glia* 2001, 36:180-190
119. Bechmann I, Galea I, Perry VH: What is the blood-brain barrier (not)?, *Trends Immunol* 2007, 28:5-11
120. Vernadakis A: Neuron-glia interrelations, *Int Rev Neurobiol* 1988, 30:149-224
121. Small RK, Riddle P, Noble M: Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve, *Nature* 1987, 328:155-157
122. Wolswijk G, Noble M: Identification of an adult-specific glial progenitor cell, *Development* 1989, 105:387-400
123. Aloisi F: Immune function of microglia, *Glia* 2001, 36:165-179
124. Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW: Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes, *J Neurosci* 2000, 20:2427-2438
125. Baldi PC, Araj GF, Racaro GC, Wallach JC, Fossati CA: Detection of antibodies to *Brucella* cytoplasmic proteins in the cerebrospinal fluid of patients with neurobrucellosis, *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, 6:756-759
126. Galea I, Bechmann I, Perry VH: What is immune privilege (not)?, *Trends Immunol* 2007, 28:12-18
127. Nguyen MD, Julien JP, Rivest S: Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?, *Nat Rev Neurosci* 2002, 3:216-227
128. Dietrich PY, Walker PR, Saas P: Death receptors on reactive astrocytes: a key role in the fine tuning of brain inflammation?, *Neurology* 2003, 60:548-554
129. Kim KS: Microbial translocation of the blood-brain barrier, *Int J Parasitol* 2006, 36:607-614
130. Kim KS: Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier, *Nat Rev Microbiol* 2008, 6:625-634
131. Kim YV, Di Cello F, Hillaire CS, Kim KS: Differential Ca²⁺ signaling by thrombin and protease-activated receptor-1-activating peptide in human brain microvascular endothelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 286:C31-42
132. Ruffer C, Strey A, Janning A, Kim KS, Gerke V: Cell-cell junctions of dermal microvascular endothelial cells contain tight and adherens junction proteins in spatial proximity, *Biochemistry* 2004, 43:5360-5369
133. Stins MF, Badger J, Sik Kim K: Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells, *Microb Pathog* 2001, 30:19-28
134. Rubin LL, Staddon JM: The cell biology of the blood-brain barrier, *Annu Rev Neurosci* 1999, 22:11-28

135. Mucke L, Eddleston M: Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system, *Faseb J* 1993, 7:1226-1232
136. Daubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schrotten H: Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase, *Infect Immun* 2001, 69:6527-6531
137. Anfuso CD, Lupo G, Romeo L, Giurdanella G, Motta C, Pascale A, Tirolo C, Marchetti B, Alberghina M: Endothelial cell-pericyte cocultures induce PLA2 protein expression through activation of PKC α and the MAPK/ERK cascade, *J Lipid Res* 2007, 48:782-793
138. Park C, Lee S, Cho IH, Lee HK, Kim D, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ: TLR3-mediated signal induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in astrocytes: differential signaling mechanisms of TLR3-induced IP-10 and IL-8 gene expression, *Glia* 2006, 53:248-256
139. Kim KS: Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury, *Nat Rev Neurosci* 2003, 4:376-385
140. Kim KS, Itabashi H, Gemski P, Sadoff J, Warren RL, Cross AS: The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat, *J Clin Invest* 1992, 90:897-905
141. Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE: Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci, *Infect Immun* 1997, 65:5074-5081
142. Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI: Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway, *J Clin Invest* 1998, 102:347-360
143. Unkmeir A, Latsch K, Dietrich G, Wintermeyer E, Schinke B, Schwender S, Kim KS, Eigenthaler M, Frosch M: Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells, *Mol Microbiol* 2002, 46:933-946
144. Jong AY, Stins MF, Huang SH, Chen SH, Kim KS: Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro, *Infect Immun* 2001, 69:4536-4544
145. Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, Dam T, Paul-Satyaseela M, Kim KS, Kwon-Chung KJ: Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier, *Infect Immun* 2004, 72:4985-4995
146. Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K: Migration of African trypanosomes across the blood-brain barrier, *Physiol Behav* 2007, 92:110-114
147. Krishnan C, Kaplin AI, Graber JS, Darman JS, Kerr DA: Recurrent transverse myelitis following neurobrucellosis: immunologic features and beneficial response to immunosuppression, *J Neurovirol* 2005, 11:225-231
148. Sethi N, Sondey M, Bai Y, Kim KS, Cadavid D: Interaction of a neurotropic strain of *Borrelia turicatae* with the cerebral microcirculation system, *Infect Immun* 2006, 74:6408-6418
149. Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Weiglein I, Bubert A, Engelbrecht F, Stins M, Kuhn M: Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells, *Infect Immun* 1998, 66:5260-5267
150. Jain SK, Paul-Satyaseela M, Lamichhane G, Kim KS, Bishai WR: Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis, *J Infect Dis* 2006, 193:1287-1295
151. Gul HC, Erdem H, Gorenek L, Ozdag MF, Kalpakci Y, Avci IY, Besirbellioglu BA, Eyigun CP: Management of neurobrucellosis: an assessment of 11 cases, *Intern Med* 2008, 47:995-1001
152. Carson MJ, Sutcliffe JG: Balancing function vs. self defense: the CNS as an active regulator of immune responses, *J Neurosci Res* 1999, 55:1-8
153. Aloisi F, Ria F, Adorini L: Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes, *Immunol Today* 2000, 21:141-147

154. Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD: 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* 2003, 144:68-79
155. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C: The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis, *J Neurol Sci* 2002, 202:13-23
156. Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity, *Nat Rev Immunol* 2001, 1:135-145
157. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM: Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system, *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61:1013-1021
158. Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I: Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products, *Glia* 2003, 43:281-291
159. Esen N, Tanga FY, DeLeo JA, Kielian T: Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*, *J Neurochem* 2004, 88:746-758
160. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD: Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli, *Glia* 2005, 49:360-374
161. Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C: Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases, *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1:797-807
162. Olson JK, Miller SD: Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs, *J Immunol* 2004, 173:3916-3924
163. Laflamme N, Echchannaoui H, Landmann R, Rivest S: Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria, *Eur J Immunol* 2003, 33:1127-1138
164. Chakravarty S, Herkenham M: Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines, *J Neurosci* 2005, 25:1788-1796
165. van Noort JM, Bsibsi M: Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair, *Prog Brain Res* 2009, 175:139-148
166. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML: Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86:6348-6352
167. Chung IY, Benveniste EN: Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta, *J Immunol* 1990, 144:2999-3007
168. Hayashi M, Luo Y, Laning J, Strieter RM, Dorf ME: Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells, *J Neuroimmunol* 1995, 60:143-150
169. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM: Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells, *J Immunol* 2001, 167:3555-3558
170. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF: Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation, *Nat Med* 2002, 8:1115-1121
171. John GR, Lee SC, Song X, Riviaccio M, Brosnan CF: IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery, *Glia* 2005, 49:161-176
172. Ambrosini E, Aloisi F: Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system, *Neurochem Res* 2004, 29:1017-1038
173. Palma JP, Kwon D, Clipstone NA, Kim BS: Infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus directly induces proinflammatory cytokines in primary astrocytes via

- NF-kappaB activation: potential role for the initiation of demyelinating disease, *J Virol* 2003, 77:6322-6331
174. Palma JP, Kim BS: Induction of selected chemokines in glial cells infected with Theiler's virus, *J Neuroimmunol* 2001, 117:166-170
175. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM: Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Exp Med* 2006, 203:1007-1019
176. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T: Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS, *J Neurosci* 2003, 23:7922-7930
177. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH: Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke, *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997, 23:406-415
178. Klegeris A, McGeer EG, McGeer PL: Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease, *Curr Opin Neurol* 2007, 20:351-357
179. Zipp F, Aktas O: The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases, *Trends Neurosci* 2006, 29:518-527
180. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM: The role of inflammation in CNS injury and disease, *Br J Pharmacol* 2006, 147 Suppl 1:S232-240
181. Block ML, Zecca L, Hong JS: Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms, *Nat Rev Neurosci* 2007, 8:57-69
182. Wyss-Coray T: Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?, *Nat Med* 2006, 12:1005-1015
183. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Major cell death pathways at a glance, *Microbes Infect* 2009, 11:1050-1062
184. Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS: Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury, *Crit Care* 2005, 9:66-75
185. Hughes ML: Mediterranean, Malta or Undulant fever. London: Mac Millan;1897:124, 1897,
186. Kochar DK, Kumawat BL, Agarwal N, Shubhakararan, Aseri S, Sharma BV, Rastogi A: Meningoencephalitis in brucellosis, *Neurol India* 2000, 48:170-173
187. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A: *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts, *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, 57:2688-2693
188. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC: Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp, *Emerg Infect Dis* 2003, 9:485-488
189. Galle C, Struelens M, Liesnard C, Godfroid J, Maes N, Dewitte O, Farber CM, Clevenbergh P, Van Vooren JP: *Brucella melitensis* osteitis following craniotomy in a patient with AIDS, *Clin Infect Dis* 1997, 24:1012
190. Giambartolomei GH, Wallach JC, Baldi PC: Neurobrucellosis. Edited by Halperin J. New York, U.S.A., The Egerton Group, 2008, p. 255-272
191. Namiduru M, Karaoglan I, Yilmaz M: Guillain-Barre syndrome associated with acute neurobrucellosis, *Int J Clin Pract* 2003, 57:919-920
192. Dalmau-Ciria M, Tarruella J, Solé Llenas J: Estudio inmunoclínico de la neurobrucelosis. A propósito de 35 casos, *Med Clin Barc* 1965, 45 (7):387-407
193. Corbel MJ: Brucellosis: Epidemiology and prevalence worldwide. In: Young EJ, Corbel MJ, eds. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press 25-40., 1989,
194. al Deeb SM, Yaqub BA, Sharif HS, Phadke JG: Neurobrucellosis: clinical characteristics, diagnosis, and outcome, *Neurology* 1989, 39:498-501

195. Pappas G, Akritidis N, Christou L: Treatment of neurobrucellosis: what is known and what remains to be answered, *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007, 5:983-990
196. Habeeb YK, Al-Najdi AK, Sadek SA, Al-Onaizi E: Paediatric neurobrucellosis: case report and literature review, *J Infect* 1998, 37:59-62
197. Montes J, Rodriguez MA, Martin T, Martin F: Laboratory-acquired meningitis caused by *Brucella abortus* strain 19, *J Infect Dis* 1986, 154:915-916
198. Young EJ: Clinical manifestations of human brucellosis, Young EJ and Corbel MJ, eds. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989, 97-126.:
199. Debono JE: Brucellosis Simulating Acute Anterior Poliomyelitis, *Lancet* 1964, 1:1132-1133
200. Spink WW: *The nature of brucellosis*. Minneapolis, MN: University of Minnesota Press, 1955,
201. Madkour MM A-MK, Al-Deeb S, et al. : Neurobrucellosis. In: Madkour MM, ed. *Madkour's Brucellosis*. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001:166-78.,
202. Shakir RA, Al-Din AS, Araj GF, Lulu AR, Mousa AR, Saadah MA: Clinical categories of neurobrucellosis. A report on 19 cases, *Brain* 1987, 110 (Pt 1):213-223
203. Pedro-Pons A, Foz M, Codina A, Rey C: [Neurobrucellosis (study of 41 cases)], *Cah Med* 1972, 13:855-862
204. Young EJ: Human brucellosis, *Rev Infect Dis* 1983, 5:821-842
205. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA: Human infection with M- strain of *Brucella canis*, *Emerg Infect Dis* 2004, 10:146-148
206. Bouza E: Brucelosis crónica y otras formas clínicas especiales. In: Baquero F, Buzón L, eds. *Encuentro internacional sobre brucelosis*. Madrid, 57-60., 1985,
207. Omar FZ, Zuberi S, Minns RA: Neurobrucellosis in childhood: six new cases and a review of the literature, *Dev Med Child Neurol* 1997, 39:762-765
208. McLean DR, Russell N, Khan MY: Neurobrucellosis: clinical and therapeutic features, *Clin Infect Dis* 1992, 15:582-590
209. Al-Eissa YA, Al-Herbish AS: Severe hypertension: an unusual presentation of Guillain-Barre syndrome in a child with brucellosis, *Eur J Pediatr* 1996, 155:53-55
210. Oliveri R, Matera G, Foca A, Zappia M, Aguglia U, Quattrone A: Polyradiculoneuropathy with cerebrospinal fluid albuminocytological dissociation due to neurobrucellosis, *Clin Infect Dis* 1996, 23:833-834
211. Bingol A, Togay-Isikay C: Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks, *Eur J Neurol* 2006, 13:544-548
212. Nas K, Tasdemir N, Cakmak E, Kemaloglu MS, Bukte Y, Geyik MF: Cervical intramedullary granuloma of *Brucella*: a case report and review of the literature, *Eur Spine J* 2007, 16 Suppl 3:255-259
213. Vajramani GV, Nagmoti MB, Patil CS: Neurobrucellosis presenting as an intramedullary spinal cord abscess, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005, 4:14
214. Haji-Abdolbagi M, Rasooli-Nejad M, Jafari S, Hasibi M, Soudbakhsh A: Clinical and laboratory findings in neurobrucellosis: review of 31 cases, *Arch Iran Med* 2008, 11:21-25
215. Gendelman HE, Folks DG: Innate and acquired immunity in neurodegenerative disorders, *J Leukoc Biol* 1999, 65:407-408
216. Martinez-Chamorro E, Munoz A, Esparza J, Munoz MJ, Giangaspro E: Focal cerebral involvement by neurobrucellosis: pathological and MRI findings, *Eur J Radiol* 2002, 43:28-30
217. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC: Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death, *Microbes Infect* 2009, 11:476-483
218. Tonekaboni SH, Karimi A, Armin S, Khase LA, Sabertehrani AS: Neurobrucellosis: a partially treatable cause of vision loss, *Pediatr Neurol* 2009, 40:401-403

219. Keihani-Douste Z, Daneshjou K, Ghasemi M: A quadriplegic child with multiple brain abscesses: case report of neurobrucellosis, *Med Sci Monit* 2006, 12:CS119-122
220. Seidel G, Pardo CA, Newman-Toker D, Olivi A, Eberhart CG: Neurobrucellosis presenting as leukoencephalopathy: the role of cytotoxic T lymphocytes, *Arch Pathol Lab Med* 2003, 127:e374-377
221. Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T: A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure, *J Exp Med* 1993, 178:1771-1775
222. Moran AP, Prendergast MM: Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides and the development of Guillain-Barre syndrome, *J Infect Dis* 1998, 178:1549-1551
223. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA: *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome, *N Engl J Med* 1995, 333:1374-1379
224. García Samartino C, Delpino MV, Godoy CP, Di Genaro MS, Pasquevich KA, Zwerdling A, Barrionuevo P, Mathieu P, Cassataro J, Pitossi F, Giambartolomei GH: *Brucella abortus* Induces the Secretion of Proinflammatory Mediators from Glial Cells Leading to Astrocyte Apoptosis, *Am J Pathol*
225. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW: Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection, *Cell* 1993, 73:457-467
226. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A: Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight, *J Neurosci Methods* 1985, 13:139-143
227. Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L: Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation, *J Immunol* 1998, 160:4671-4680
228. Pei J, Ficht TA: *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture, *Infect Immun* 2004, 72:440-450
229. Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA: *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage, *Infect Immun* 2006, 74:2667-2675
230. Morrison DC, Jacobs DM: Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides, *Immunochemistry* 1976, 13:813-818
231. Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M: *Physiology of the Bacterial Cell*. Sinauer Associates, Sunderland, p. 4. Edited by 1990, p.
232. Saas P, Boucraut J, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, Desplat-Jego S, Bernard D, Walker PR, Dietrich PY: CD95 (Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: a key role in brain inflammation?, *J Immunol* 1999, 162:2326-2333
233. Eddleston M, Mucke L: Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease, *Neuroscience* 1993, 54:15-36
234. Eskra L, Mathison A, Splitter G: Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with *Brucella abortus*, *Infect Immun* 2003, 71:1125-1133
235. Town T, Nikolic V, Tan J: The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses, *J Neuroinflammation* 2005, 2:24
236. Segal BM, Cross AH: Fas(t) track to apoptosis in MS: TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination, *Neurology* 2000, 55:906-907
237. Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, *Science* 2002, 296:1634-1635
238. Belmokhtar CA, Hillion J, Segal-Bendirdjian E: Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, *Oncogene* 2001, 20:3354-3362

239. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP: *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes, *Infect Immun* 1998, 66:5711-5724
240. Alba D, Torres E, Molina F, Vazquez JJ: [Neutrophilic pleocytosis in brucella meningitis], *Med Clin (Barc)* 1992, 99:478
241. Roop RM, 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA: Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche, *Mol Microbiol* 2004, 52:621-630
242. Rock RB, Hu S, Gekker G, Sheng WS, May B, Kapur V, Peterson PK: Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine and chemokine expression by human microglia and astrocytes: effects of dexamethasone, *J Infect Dis* 2005, 192:2054-2058
243. Dramsi S, Levi S, Triller A, Cossart P: Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study, *Infect Immun* 1998, 66:4461-4468
244. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP: Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells, *Microbes Infect* 2000, 2:829-835
245. Rasley A, Anguita J, Marriott I: *Borrelia burgdorferi* induces inflammatory mediator production by murine microglia, *J Neuroimmunol* 2002, 130:22-31
246. Ramesh G, Alvarez AL, Roberts ED, Dennis VA, Lasater BL, Alvarez X, Philipp MT: Pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: *Borrelia burgdorferi* lipoproteins induce both proliferation and apoptosis in rhesus monkey astrocytes, *Eur J Immunol* 2003, 33:2539-2550
247. Perry VH: The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease, *Brain Behav Immun* 2004, 18:407-413
248. Tacconi MT: Neuronal death: is there a role for astrocytes?, *Neurochem Res* 1998, 23:759-765
249. Gonzalez-Scarano F, Baltuch G: Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases, *Annu Rev Neurosci* 1999, 22:219-240
250. Williams R, Dhillon NK, Hegde ST, Yao H, Peng F, Callen S, Chebloune Y, Davis RL, Buch SJ: Proinflammatory cytokines and HIV-1 synergistically enhance CXCL10 expression in human astrocytes, *Glia* 2008,
251. Munoz-Fernandez MA, Fresno M: The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system, *Prog Neurobiol* 1998, 56:307-340
252. Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI: Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor, *J Immunol* 1995, 155:2158-2164
253. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC: Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*, *J Bacteriol* 2005, 187:2715-2726
254. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH: Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neurosci* 1997, 20:570-577
255. Shi B, De Girolami U, He J, Wang S, Lorenzo A, Busciglio J, Gabuzda D: Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system, *J Clin Invest* 1996, 98:1979-1990
256. Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE, Jr.: Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease, *Exp Neurol* 1995, 133:225-230
257. Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain, *J Exp Med* 1996, 184:1513-1518
258. Byrne GI, Ojcius DM: Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen, *Nat Rev Microbiol* 2004, 2:802-808
259. Haase R, Kirschning CJ, Sing A, Schrottner P, Fukase K, Kusumoto S, Wagner H, Heesemann J, Ruckdeschel K: A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages, *J Immunol* 2003, 171:4294-4303

260. Hacker G, Kirschnek S, Fischer SF: Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus, *Med Microbiol Immunol* 2006, 195:11-19
261. Hacker H, Furmann C, Wagner H, Hacker G: Caspase-9/-3 activation and apoptosis are induced in mouse macrophages upon ingestion and digestion of *Escherichia coli* bacteria, *J Immunol* 2002, 169:3172-3179
262. Ruckdeschel K, Pfaffinger G, Haase R, Sing A, Weighardt H, Hacker G, Holzmann B, Heesemann J: Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages, *J Immunol* 2004, 173:3320-3328
263. Cruz AR, Moore MW, La Vake CJ, Eggers CH, Salazar JC, Radolf JD: Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, potentiates innate immune activation and induces apoptosis in human monocytes, *Infect Immun* 2008, 76:56-70
264. Pozner RG, Berria MI, Negrotto S, Schattner M, Gomez RM: Differential astrocyte response to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, *Intervirology* 2005, 48:279-284
265. Ghadge GD, Ma L, Sato S, Kim J, Roos RP: A protein critical for a Theiler's virus-induced immune system-mediated demyelinating disease has a cell type-specific antiapoptotic effect and a key role in virus persistence, *J Virol* 1998, 72:8605-8612
266. Rubio N, Torres C: Interferon-gamma induces proliferation but not apoptosis in murine astrocytes through the differential expression of the myc proto-oncogene family, *Brain Res Mol Brain Res* 1999, 71:104-110
267. Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE: Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia, *J Neuroimmunol* 1997, 75:104-112
268. Lung HL, Leung KN, Stadlin A, Ma CM, Tsang D: Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor-alpha in rat primary astrocytes, *Life Sci* 2001, 68:2081-2091