

**COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EXPRESADAS EN
SUERO DE RATÓN POR INFECCIÓN DE REFERENCIA CON *BRUCELLA*
SUIS Y UNA NUEVA CEPA EMERGENTE AISLADA DE RANAS**

LEONOR CONDE BOSQUE

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER - JUNIO 2015

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Los Dres. María Iturralde Navarro y Fermín Lampreave Palacios, Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y la Dra. M^a Pilar Jiménez de Bagüés, investigadora del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón

CERTIFICAN:

Que la Memoria del Trabajo Fin de Máster titulado “Comparación de las proteínas de fase aguda expresadas en suero de ratón por infección de referencia con *Brucella suis* y una nueva cepa emergente aislada de ranas” presentada por Leonor Conde Bosque, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de esta Universidad bajo nuestra dirección, y reúne los requisitos para ser presentada por su autor como Trabajo Fin de Máster.

Zaragoza, 24 de Junio de 2015

Fdo. María Iturralde Navarro

Fdo. M^a Pilar Jiménez de Bagüés

Fdo. Fermín Lampreave Palacios

La respuesta de fase aguda (RFA) comprende una serie de procesos fisiológicos y metabólicos que se inducen ante situaciones que representan una amenaza para el organismo (infecciones...) y que alteran los mecanismos homeostáticos, con el fin de que éste vuelva a la situación normal. Un aspecto peculiar de la RFA es el papel fundamental que tiene el hígado, en el que se producen múltiples cambios que tienen como consecuencia la modificación de los niveles de proteínas plasmáticas sintetizadas por él, conocidas como proteínas de fase aguda (PFA).

La brucelosis es una zoonosis de amplia distribución en nuestro país que causa grandes pérdidas económicas en nuestra ganadería y que produce más de un millar de casos humanos anualmente. La gestión sanitaria de la brucelosis humana está directamente relacionada con la eliminación de la brucelosis animal, por lo que la investigación orientada al desarrollo de una mejor profilaxis animal está plenamente justificada. En los últimos años se han aislado nuevas especies de *Brucella* en distintos huéspedes de las que se desconoce su virulencia y capacidad de transmisión a los animales de interés económico y al hombre. Una de estas últimas cepas ha sido descrita como patógeno de la rana (*Brucella spp. BR3*).

La hipótesis que se ha planteado en este trabajo es que “las PFA en ratón podrían servir para monitorizar la infección por *Brucella* y distinguir una infección crónica (propia de *B. suis*) de una infección moderada (propia de *BR3*)”. El objetivo principal de este trabajo ha sido determinar las PFA en ratón y su posible uso como biomarcadores de infección por *B. suis* y *BR3*.

En este estudio se ha visto que la infección realizada con *BR3* es crónica, al igual que la de la cepa de referencia *B. suis*, ya que los ratones no consiguen eliminar las bacterias en el periodo de tiempo estudiado (tres meses). El peso y las unidades formadoras de colonias (UFC) en hígado/bazo evidencian que la cepa *B. suis* es más virulenta. En ambas infecciones se ha observado un aumento significativo en las concentraciones séricas de la haptoglobina (Hp), la hemopexina (Hx), el amiloide A sérico (SAA), la cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- α (ITI α 4) y la α_1 -glicoproteína ácida (GPA) durante la RFA, siendo mucho menor para la cepa *BR3*; por ello, los valores de la concentración de estas PFA permiten distinguir el tipo de infección. La transferrina (Tf) sólo aumenta en la infección por *B. suis*. La apolipoproteína A1 (ApoA1), la proteína C reactiva (CRP) y el inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa (ICP) no varían en ninguna de las dos infecciones, por lo que no pueden considerarse PFA en ratón. Se ha detectado la respuesta de inmunoglobulinas (Igs) totales y de IgG3 contra el lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus*, principal antígeno común de las cepas lisas de *Brucella*, a partir del día 28 post-infección por *B. suis*.

The acute phase response (APR) includes a series of physiological and metabolic processes that are induced in situations that suppose a threat to the body (i.e. infections) and alter its homeostatic mechanisms, in order to come back to the normal situation. A peculiar aspect of the APR is the fundamental role of the liver, in which many changes take place, that have the effect of altering the levels of plasma proteins synthesized by him, known as acute phase proteins (APP).

Brucellosis is a widespread zoonosis in our country, which causes great economic losses in our breeding and produces more than a thousand human cases annually. Health management of human brucellosis is directly related to the elimination of animal brucellosis, so research aimed at developing a better animal prophylaxis is fully justified. In recent years, there have been isolated new species of Brucella from different hosts, in which virulence and transmission capacity to the animals of economic interest and humans is unknown. One of the latter strains has been described as a pathogen in frogs (Brucella spp. BR3).

The hypothesis that has been proposed in this study is that “the mouse APP could serve to monitor Brucella infection and distinguish a chronic infection (typical of B. suis) of a mild infection (typical of BR3)”. The main objective of this study has been to determine mouse APP and its possible use as biomarkers of infection with B. suis and BR3.

In this study, it has been shown that BR3 infection is chronic, like B. suis reference strain, since mice fail to eliminate the bacteria in the studied period (three months). Weight and colony-forming units (CFU) in liver/spleen show that B. suis is the most virulent strain. In both infections it has been observed a significant increase in serum concentrations of haptoglobin (Hp), hemopexina (Hx), serum amyloid A (SAA), inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4 (TIH4) and α_1 -glycoprotein acid (GPA) during the APF, being much lower for BR3 strain; therefore, the values of the concentration of these APF allow to distinguish the type of infection. Transferrin (Tf) only increases in B. suis infection. Apolipoprotein A1 (ApoA1), C reactive protein (CRP) and α_1 -cysteine proteinase inhibitor (ICP) don't change in either infections, so they cannot be considered APF in mouse. It has been detected the response of total immunoglobulins (Igs) and IgG3 against the lipopolysaccharide (LPS) of B. abortus, the main common antigen of Brucella smooth strains, from the day 28 post-infection by B. suis.

Abreviaturas

ACTH: Hormona adrenocorticotropa (*Adrenocorticotropic hormone*)
ApoA1: Apolipoproteína A1 (*Apolipoprotein A1*)
BAB: Base de agar sangre (*Blood agar base*)
BR3: *Brucella* spp. aislada de rana (*Brucella* spp. isolated from frogs)
BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)
CITA/ARTC: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (*Agrifood Research and Technology Centre of Aragon*)
CNTF: Factor neutrófico ciliar (*Ciliary Neurotrophic Factor*)
CRP: Proteína C reactiva (*C reactive protein*)
DS: Desviación estándar (*Standard deviation*)
DO: Densidad óptica (*Optical density*)
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor*)
G: Fuerza G (*G-force*)
GPA: α_1 -Glicoproteína ácida (*α_1 -glycoprotein acid*)
Hb: Hemoglobina (*Hemoglobin*)
Hp: Haptoglobina (*Haptoglobin*)
Hx: Hemopexina (*Hemopexin*)
HDL: Lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoproteins*)
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatic growth factor*)
Igs: Inmunoglobulinas (*Immunoglobulins*)
IgG3: Inmunoglobulina G3 (*Immunoglobulin G3*)
IL-1: Interleuquina-1 (*Interleukin-1*)
IL-6: Interleuquina-6 (*Interleukin-6*)
ICP: Inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa (*α_1 -cysteine proteinase inhibitor*)
ITI4: Cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- α (*Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4*)
LCAT: Lecitin colesterol acil transferasa (*Lecithin-cholesterol acyltransferase*)
LDL: Lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoproteins*)
LIF: Factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia inhibitory factor*)
LPS: Lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide*)
OSM: Oncostatina M (*Oncostatin M*)
PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
PFA/APP: Proteína/s de fase aguda (*Acute phase protein/s*)
PGE₂: Prostaglandina E₂ (*Prostaglandin E₂*)
Pig-MAP: Principal proteína de fase aguda en cerdos (*Major acute phase protein in pigs*)
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern recognition receptors*)
RFA/APR: Respuesta de fase aguda (*Acute phase response*)
SAA: Amiloide A sérico (*Serum amyloid A*)
SDS: Dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliácridamida con SDS (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)
TA/RT: Temperatura ambiente (*Room temperature*)
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β (*Transforming growth factor- β*)
TLR4: Receptor de tipo Toll 4 (*Toll-like receptor 4*)
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (*Tumor necrosis factor- α*)
Tf: Transferrina (*Transferrin*)
UFC/CFU: Unidades formadoras de colonias (*Colony-forming units*)

1. Antecedentes y objetivos	páginas 1-2
2. Introducción	páginas 3-20
2.1. Respuesta de fase aguda	
2.1.1. Proteínas de fase aguda	
2.1.2. Regulación de la expresión de las proteínas de fase aguda	
2.2. <i>Brucella</i>	
2.2.1. Entrada celular y actividades intracelulares de <i>Brucella</i>	
2.2.2. <i>Brucella suis</i>	
2.2.3. <i>Brucella BR3</i>	
2.2.4. Vacunas contra la brucelosis	
2.2.5. Modelos de laboratorio para estudiar la patogénesis de <i>Brucella</i> y la eficacia de las vacunas	
3. Materiales y métodos	páginas 21-31
3.1. Materiales	
3.1.1. Animales (material biológico)	
3.1.2. Bacterias (material biológico)	
3.1.3. Reactivos del Bradford	
3.1.4. Reactivos del Western blot	
3.1.5. Reactivos de la inmunodifusión doble de Ouchterlony	
3.1.6. Reactivos de la inmunodifusión radial simple de Mancini	
3.1.7. Reactivos del ELISA para la determinación de PFA	
3.1.8. Reactivos del ELISA para la determinación de anticuerpos contra el LPS de <i>B. abortus</i>	
3.2. Métodos	
3.2.1. Diseño del estudio experimental	
3.2.2. Bradford	
3.2.3. Western blot	
3.2.4. Inmunodifusión doble de Ouchterlony	
3.2.5. Inmunodifusión radial simple de Mancini	
3.2.6. ELISA para la determinación de PFA	
3.2.7. ELISA para la determinación de anticuerpos contra el LPS de <i>B. abortus</i>	
3.2.8. Análisis estadístico	

4. Resultados y discusión	páginas 32-46
4.1. Determinación de la carga bacteriana	
4.2. Cuantificación de la proteína total	
4.3. Inmunoprecipitación	
4.4. Cuantificación de las proteínas de fase aguda	
4.4.1. Apolipoproteína A1	
4.4.2. Inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa	
4.4.3. Proteína C reactiva	
4.4.4. Cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- α	
4.4.5. Transferrina	
4.4.6. α_1 -Glicoproteína ácida	
4.4.7. Haptoglobina	
4.4.8. Hemopexina	
4.4.9. Amiloide A sérico	
4.5. Determinación de anticuerpos contra el LPS de <i>B. abortus</i>	
5. Conclusiones/Conclusions	páginas 47-48
6. Bibliografía	páginas 49-54

1. Antecedentes y objetivos

En nuestro laboratorio (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza) se tiene amplia experiencia en la respuesta de las proteínas de fase aguda (PFA) en distintas especies, como la porcina, la bovina y en rata. En este trabajo se aborda por primera vez la respuesta de estas proteínas en una infección experimental en ratón con *Brucella*.

Los animales superiores responden de forma inmediata al daño tisular y las infecciones que representan una amenaza para la integridad del organismo mediante importantes alteraciones en los mecanismos homeostáticos que rigen bajo circunstancias normales. Estas alteraciones constituyen, en un amplio sentido, la respuesta de fase aguda (RFA). Un aspecto particular de esta RFA es el papel fundamental que tiene el hígado, en el que se producen cambios de peso, ultraestructura y enzimáticos, y que tienen como consecuencia la modificación de los niveles de proteínas plasmáticas sintetizadas por él.

La brucelosis es una zoonosis de amplia distribución en nuestro país que causa unas grandes pérdidas económicas en nuestra ganadería y que produce más de un millar de casos humanos anualmente. La gestión sanitaria de la brucelosis humana está directamente relacionada con la eliminación de la brucelosis animal, por lo que la investigación orientada al desarrollo de una mejor profilaxis animal está plenamente justificada. Hasta el momento, las vacunas vivas atenuadas *B. abortus* S19 (para ganado vacuno) y *B. melitensis* Rev1 (para ganado ovino y caprino) son las únicas que han demostrado ser eficaces para controlar y erradicar la brucelosis animal. Sin embargo, presentan el inconveniente de interferir en el diagnóstico de la infección.

En los últimos años se han aislado nuevas especies de *Brucella* de diferentes huéspedes anfibios, marinos y roedores de las que se desconoce su virulencia y capacidad de transmisión a los animales de interés económico y al hombre. Estas nuevas cepas son consideradas como patógenos emergentes y se hace necesario definir su virulencia. Además, también es factible su utilización como posibles cepas vacunales para la profilaxis de la brucelosis animal. Una de estas últimas cepas ha sido descrita como patógeno de la rana (*BR3*). Sin embargo, todavía se desconocen los factores de atenuación de la virulencia implicados en dicha patogenicidad.

La **hipótesis** que se ha planteado en este trabajo es que “las PFA en ratón podrían servir para monitorizar la infección por *Brucella* y distinguir una infección crónica (propia de *B. suis*) de una infección moderada (propia de *BR3*) y que esta última podría utilizarse como cepa vacunal”.

El **objetivo principal** de este trabajo ha sido determinar las PFA en ratón y su posible uso como biomarcadores de infección por *B. suis* y *BR3*.

Los **objetivos específicos** han sido:

1. Realización de las infecciones con *B. suis* y *BR3* en ratones BALB/c. En el día 0 (previo a la infección) y los días 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84 post-infección se han recogido las siguientes muestras: bazo, hígado y suero sanguíneo.
 - a. Monitorización de la infección mediante cultivos de bacterias de muestras de bazo e hígado para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC).
 - b. Estudio de la evolución del peso del bazo e hígado durante la infección.
2. Estudio de la evolución de los niveles séricos de las proteínas de fase aguda.
 - a. Las descritas como de fase aguda positiva en ratón: α_1 -glicoproteína ácida (GPA), haptoglobina (Hp), hemopexina (Hx) y amiloide A sérico (SAA).
 - b. Las proteínas de dudosa clasificación en ratón: apolipoproteína A1 (ApoA1) y proteína C reactiva (CRP).
 - c. Las proteínas de fase aguda negativa en ratón: transferrina (Tf).
 - d. Y dos proteínas poco o nada estudiadas en ratón: una proteína descrita como principal proteína de fase aguda en rata, el inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa (ICP) y la cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- α (ITI4).

Los métodos utilizados para cuantificar las proteínas han sido: Western blot seguido de inmunoprecipitación (Ouchterlony), inmunodifusión radial (Mancini), dependiendo de la reactividad de los antisueros disponibles, y/o ELISA, dependiendo de su eficacia y disponibilidad en el mercado.

3. Estudio de la evolución de los niveles séricos de las proteínas totales por el método Bradford.
4. Detección de anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus* inducidos por *B. suis* y *BR3*.

2. Introducción

2.1. La respuesta de fase aguda

La respuesta de fase aguda (RFA) comprende una serie de procesos fisiológicos y metabólicos muy complejos que se inducen ante situaciones que representan una amenaza para el organismo, como estrés, infecciones, quemaduras, cirugía mayor, crecimiento neoplásico, alteraciones inmunológicas o agentes químicos que provocan daño tisular. Esta respuesta es un mecanismo homeostático que tiene como finalidad lograr que el organismo vuelva a la situación normal, y para ello implica la activación de la respuesta inmune. Al inicio de la agresión, la supervivencia del individuo depende de la destreza de su inmunidad innata para combatir las causas que la provocaron; pero más adelante, la inmunidad adquirida es la responsable de desarrollar unas respuestas humoral y celular específicas. Generalmente, este proceso revierte pocos días después de la desaparición de la causa que lo provocó, sin embargo, si la causa persiste puede darse una inflamación crónica¹⁻⁴.

Pocas horas tras el inicio de la RFA se pueden observar cambios en un gran número de procesos fisiológicos, endocrinos y metabólicos (Tabla 1)⁵. Se aprecian cambios en el calibre, la permeabilidad y el flujo vasculares; se produce la agregación de leucocitos en las zonas inflamadas; y, si es necesario, se activan las vías de coagulación y del complemento. El tejido inflamado y el sistema vascular circundante liberan citoquinas que actúan sobre diferentes órganos diana, dando lugar a una reacción sistémica⁶⁻⁸. Una de las principales manifestaciones clínicas es la aparición de fiebre, que refleja un reajuste en el centro de termorregulación. También se produce un incremento en el número de granulocitos sanguíneos y en la síntesis de varias hormonas, como insulina, glucagón, hormona adrenocorticotropa (ACTH), aldosterona, vasopresina, tiroxina y hormona del crecimiento, entre otras⁹. Asimismo, se modifican las concentraciones séricas de algunos iones, como cobre, hierro y zinc^{10,11}, y disminuyen los niveles de vitamina A y de α -tocoferol¹². Los cambios metabólicos más relevantes son el incremento del catabolismo proteico y de la gluconeogénesis. Además, se produce un balance negativo del nitrógeno, que conlleva a una pérdida de la masa muscular, y una disminución de la lipogénesis, que deriva en un descenso del colesterol asociado a las

lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) y en una bajada general de esta última fracción de lipoproteínas¹³. El hígado sufre alteraciones en su tamaño, ultraestructura y actividad metabólica; y, puesto que es responsable de sintetizar la mayor parte de las proteínas plasmáticas, se modifica considerablemente la síntesis y secreción de varias de éstas, a las que se les llama proteínas de fase aguda (PFA)¹. Las concentraciones de estas PFA pueden aumentar (PFA positivas) o disminuir (PFA negativas) en cuestión de horas o días durante el proceso⁴.

Tabla 1. Cambios que se producen en la respuesta de fase aguda⁵.

Neuroendocrinos	Fiebre, somnolencia, anorexia Aumento de la secreción de cortisol y hormona adrenocorticotropa Aumento de la secreción de vasopresina Disminución de la secreción del factor de crecimiento I similar a insulina Aumento de la secreción adrenal de catecolaminas
Hematopoyéticos	Anemia en enfermedades crónicas Leucocitosis Trombocitosis
Metabólicos	Balance negativo del nitrógeno y pérdida muscular Osteoporosis Aumento de la gluconeogénesis hepática Aumento de la lipogénesis hepática Aumento de la lipólisis en el tejido adiposo Disminución de la actividad lipoproteína lipasa en el músculo y en el tejido adiposo Caquexia Hiperglucemia e hipocolesterolemia Alteración del metabolismo proteico hepático
Constituyentes no proteicos del plasma	Hipozincemia, hipoferremia, hipercupremia Disminución de las concentraciones de retinol plasmático Aumento de las concentraciones de glutatión plasmático

En la cascada de eventos que se desarrollan durante la RFA interviene de forma destacada el sistema monocito/macrófago (Figura 1)³. Este sistema celular, activado por distintos factores, libera una serie de mediadores, entre los cuales las citoquinas de la familia de la interleuquina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) son de particular importancia en la iniciación de la siguiente cascada de reacciones en los fibroblastos y las células endoteliales. Esta primera oleada de citoquinas puede actuar tanto localmente, activando las células estromales, como a distancia. Sin embargo, hace

falta una segunda oleada de citoquinas, mediada principalmente por la interleuquina-6 (IL-6), liberada por los fibroblastos y las células endoteliales activadas, para amplificar la señal y desencadenar la respuesta la RFA celular^{8,14}.

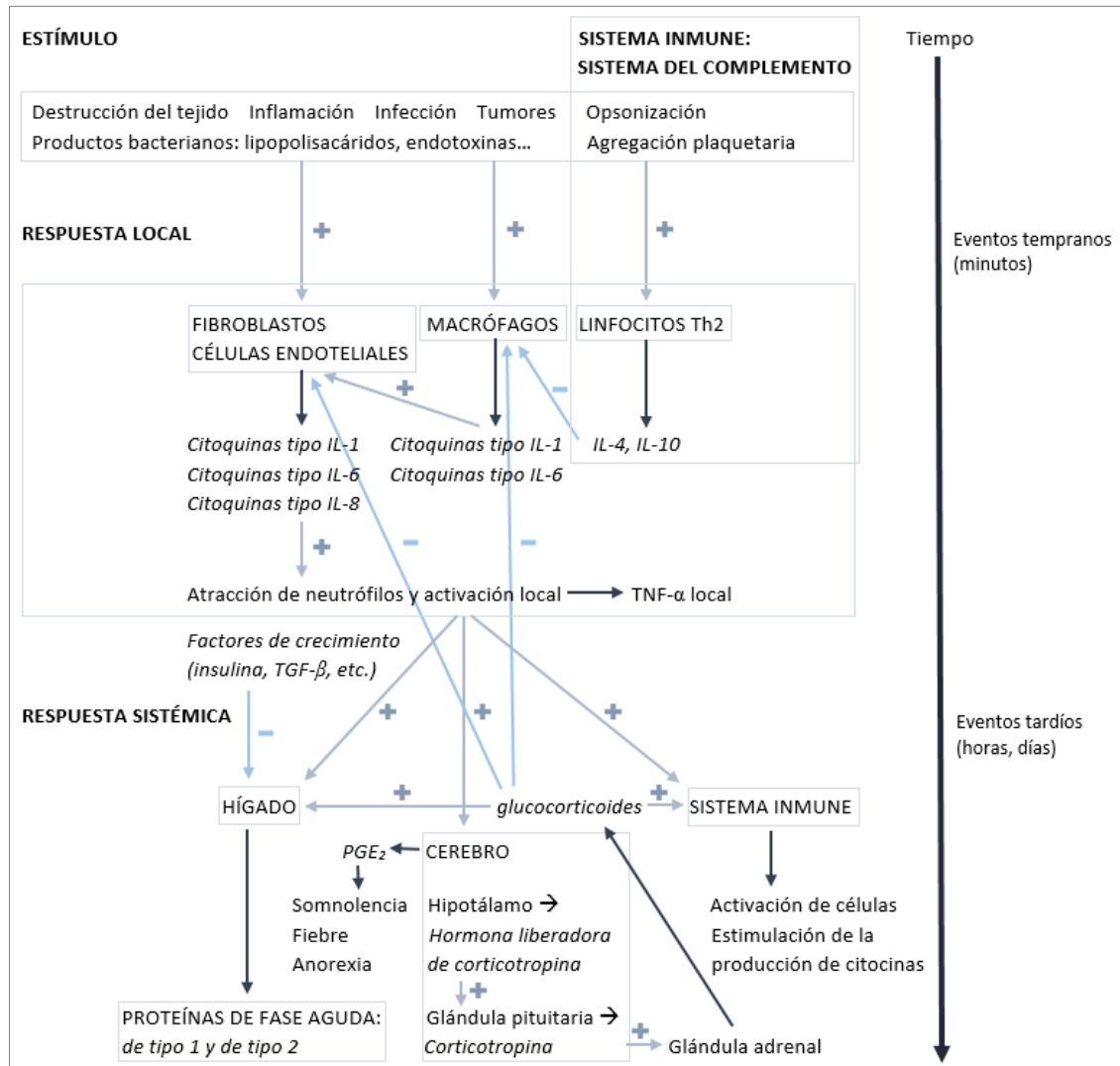


Figura 1. Cascada de eventos que se desarrollan durante la respuesta de fase aguda³. En cursiva aparecen las sustancias biológicamente activas (hormonas, citoquinas, etc.). Las flechas con el símbolo “+” indican un efecto estimulador sobre el órgano o tejido señalado; las flechas con el símbolo “-” indican un efecto inhibitor sobre el órgano o tejido señalado; y las flechas negras muestran la sustancia secretada (en cursiva) o el efecto causado (no cursiva) por la sustancia que le preceda.

Las células endoteliales ya mencionadas desempeñan un papel fundamental en la respuesta local, ya que, al activarse, aumentan la expresión de moléculas de adhesión en su superficie. Éstas interaccionan con los leucocitos circulantes, disminuyendo su movimiento y facilitando su trasvase hacia el tejido dañado¹⁵. Asimismo, la liberación por parte del tejido inflamado de diversos mediadores, como especies reactivas de

oxígeno, ácido nitroso o productos de la cascada del ácido araquidónico, contribuye a la dilatación y el aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Las citoquinas liberadas durante la inflamación actúan a distancia, dando lugar a una respuesta sistémica. Estas citoquinas tienen un gran efecto neuroendocrino, ya que tanto ellas como sus receptores cognitivos están presentes en el sistema neuroendocrino y el cerebro. En animales de laboratorio se ha observado que dichas citoquinas modulan el metabolismo de los carbohidratos, la grasa y los sustratos proteicos, regulando el flujo hipotálamo-pituitario y actuando sobre el cerebro para reducir la ingesta de comida¹⁸. La fiebre está mediada, entre otros factores, por IL-6, IL-1 y TNF- α a través de la inducción de la prostaglandina E₂ (PGE₂)¹⁸. Además, la IL-1 y la IL-6 median también la generación del ACTH, y en consecuencia la producción de cortisol, lo que proporciona un mecanismo de regulación negativa, ya que los corticoides inhiben la expresión de citoquinas¹⁹. Pero aun así, estas citoquinas y otros mediadores son capaces de desencadenar la RFA hepática.

En los animales de experimentación, la RFA se ha estudiado utilizando un amplio rango de inductores, que abarcan desde la inducción aséptica de la inflamación con sustancias químicas, lipopolisacáridos (LPS), proteínas y peptidoglicanos bacterianos, hasta las infecciones con diversos agentes como virus, bacterias, micobacterias y hongos, o mediante la implantación de tumores³.

2.1.1. Proteínas de fase aguda

La RFA afecta tanto a la síntesis como al catabolismo de la mayoría de las proteínas plasmáticas. Así pues, el término “proteínas de fase aguda” (PFA) se utiliza para designar a las proteínas plasmáticas cuya concentración se modifica al menos un 25% debido a los estímulos inflamatorios¹.

Gran parte del conocimiento de las PFA se refiere a la especie humana y a las especies empleadas en su estudio experimental, como la rata y el ratón^{20,21}. Se ha visto que el incremento de la concentración de las PFA positivas va acompañado de un descenso en los niveles plasmáticos de las PFA negativas y que la magnitud de los cambios de concentración experimentados por las PFA varía enormemente de una proteína a otra²².

También se ha observado que existe una gran variabilidad entre la RFA de diferentes especies, hasta el punto de que una PFA en una especie no lo es necesariamente en otra. Sin embargo, en general, en todas las especies estudiadas hasta el momento existe un incremento en la síntesis de la haptoglobina, los fibrinógenos y la α_1 -glicoproteína ácida (a excepción del cerdo) y una reducción en la síntesis de la albúmina, la transtirretina y la transferrina (a excepción del pollo) durante la RFA. Por el contrario, la proteína C reactiva, los amiloides A y P séricos y la α_2 -macroglobulina muestran grandes diferencias de una especie a otra. Este trabajo está centrado en las PFA de ratón (Tabla 2).

Tabla 2. Principales proteínas de fase aguda descritas en ratón.

Proteína	Concentración normal	Concentración RFA
α_1-Glicoproteína ácida	0.265 \pm 0.006 mg/ml ²³ 0.4 mg/ml ²⁴ ND ²⁵ ND ²⁶	0.682 \pm 0.189 mg/ml ²³ 1 \pm 0.2 mg/ml ²⁴ + 30% ²⁵ + 50-60% ²⁶ , 2.5X ²⁶
Haptoglobina	0.02 \pm 0.04 mg/ml ²³ 0 \pm 0.03 mg/ml ²⁷ < 0.1 mg/ml ²⁴ 0 - 0.1 mg/ml ²⁸ < 0.1 mg/ml ²⁹ ND ^{25,26}	1.795 \pm 0.64 mg/ml ²³ 1.5 \pm 0.71 mg/ml ²⁷ 2.2 \pm 1.8 mg/ml ²⁴ 0.3 - 2 mg/ml ²⁸ 1.5 mg/ml ²⁹ 4X ^{25,26}
Hemopexina	0.55 - 1.25 mg/ml ³⁰ ND ^{25,26}	ND ³⁰ 4X ^{25,26}
Amiloide A sérico	19.06 \pm 10.83 μ g/ml ²³ < 20 μ g/ml ²⁸ ND ³¹ ND ²⁶	183.59 \pm 48.495 μ g/ml ²³ 80 μ g/ml ²⁸ 1 mg/ml ³¹ 2.5X ²⁶

Nota: Las iniciales “ND” significan que no está descrito en el artículo.

Las PFA varían mucho en sus características fisicoquímicas, sus capacidades funcionales y sus actividades biológicas. Las proteínas plasmáticas, al ser proteínas de secreción, se sintetizan inicialmente con una secuencia de 15-40 aminoácidos en su extremo N-terminal, que constituye el llamado péptido señal³². La mayoría de ellas poseen carbohidratos unidos covalentemente a la cadena polipeptídica, con una estructura básica común y gran variabilidad en los componentes, lo que supone un factor adicional de regulación funcional. La unión de los oligosacáridos a la cadena polipeptídica se produce en un residuo de asparagina en el interior de una secuencia consenso del tipo Asn-X-Ser (Tre), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina³³.

La RFA es un mecanismo defensivo que se considera importante para superar el periodo que sigue a la agresión y conseguir la destrucción del agente infeccioso, la eliminación del tejido dañado y la reparación del órgano afectado. Por lo tanto, es razonable suponer que las PFA desempeñen una función especialmente necesaria durante este proceso; y de hecho, esta idea viene avalada por importantes funciones metabólicas y fisiológicas que, aunque todavía inciertas en algunos casos, realizan estas proteínas.

La **α_1 -glicoproteína ácida** (GPA) se ha considerado como una PFA positiva en todas las especies de mamíferos estudiadas (a excepción del cerdo³⁴) incluyendo el ratón²³⁻²⁶. Esta proteína, cuya masa molecular está entre 41-43 kDa, es de gran importancia en el metabolismo de drogas y psicotrópicos de carácter básico³⁵ y parece desempeñar una función inmunomoduladora. Se ha observado que inhibe la activación de los neutrófilos y que aumenta la secreción de los receptores antagonistas de la IL-1 por los macrófagos³⁶. Además, podría aumentar la eliminación del LPS bacteriano uniéndose directamente a él, y neutralizando así su toxicidad. También se ha visto que inhibe la actividad de las células naturales asesinas³⁷.

La **haptoglobina** (Hp) también se ha considerado como una PFA positiva en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas (humana, rata, conejo, vaca, cerdo, caballo, perro, gato y oveja) incluyendo el ratón²³⁻²⁸. La Hp es una glicoproteína de unos 34 kDa de masa molecular que aparece en la fracción de las α_2 -globulinas, presente en el plasma de todas las especies de mamíferos estudiadas³⁸. Se trata de una de las tres proteínas plasmáticas, junto con la transferrina y la hemopexina, involucradas en la conservación y transporte de la hemoglobina (Hb) y sus metabolitos³⁹. Su función biológica se asocia con la capacidad que posee para formar complejos estables, en proporción 1:1, con la Hb⁴⁰. De esta forma, puede controlar la disponibilidad del hemo circulante, impedir las pérdidas excesivas de hierro por excreción en la orina y reducir el daño oxidativo asociado a la hemólisis. El complejo Hp-Hb es reconocido por CD163, un receptor específico que se encuentra en los macrófagos, y es eliminado por los fagocitos. Además, otras actividades atribuidas a esta proteína son la estimulación de la angiogénesis, la inhibición de la catepsina B, la hemaglutinación viral, la modulación de la función de los macrófagos, la estimulación de la formación de prostaglandina E₂, la inhibición de la producción de superóxidos y el aumento intracelular de calcio en los neutrófilos⁴¹⁻⁴³.

La **hemopexina** (Hx) es otra de las proteínas de las que se ha podido demostrar su pertenencia a la familia de las PFA positivas del ratón^{25,26}, ya que su síntesis es inducida por varias citoquinas en procesos inflamatorios⁴⁴. Es una proteína plasmática involucrada en la conservación y el transporte de la hemoglobina y sus metabolitos. Concretamente, tiene una gran afinidad de unión al grupo hemo, encargado de incrementar la vasopermeabilidad, promover la expresión de moléculas de adhesión y favorecer la infiltración de los leucocitos en el tejido durante la inflamación⁴⁴.

El **amiloide A sérico** (SAA) es una de las principales proteínas inducidas con la fase aguda en ratón^{23,26,28,31,45} y también se considera PFA positiva en la mayoría de las especies estudiadas (humana, perro, caballo, conejo y vaca, entre otras). El SAA designa a una familia de proteínas polimórficas, codificadas por múltiples genes. Estas proteínas de bajo peso molecular se encuentran presentes en el suero en forma de complejos con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Durante la fase aguda, el SAA (12 kDa) se une a las HDL más densas, denominadas HDL₃, desplazando a la ApoA1, lo que modifica el transporte y metabolismo del colesterol⁴⁶. El SAA aumenta la capacidad de unión de las HDL₃ a los macrófagos, a la vez que disminuye su capacidad de interaccionar con los hepatocitos⁴⁷. Asimismo, se ha visto que, en el ratón, el SAA inhibe la fiebre inducida por IL-1 β y TNF- α y la síntesis de prostaglandina E₂⁴⁸, por lo que se ha propuesto que esta proteína desempeña un papel regulador negativo de dichas citoquinas, capaces de estimular su síntesis⁴⁹. Además, parece inhibir la respuesta a los antígenos mediada por linfocitos, daña la agregabilidad plaquetaria, e induce la migración y adhesión de las células T, y la migración, adhesión e infiltración de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares al tejido⁴⁶.

La **transferrina** (Tf) se ha considerado como una PFA negativa en varias especies de mamíferos (humana, rata, vaca y caballo) incluyendo al ratón. Sin embargo, su concentración aumenta en respuesta a inflamaciones inducidas experimentalmente en pollos y en conejos⁴. Esta proteína, de 80 kDa, participa en el transporte de metales; concretamente, del hierro⁵⁰. Además, parece estar implicada en la respuesta inmune innata, secuestrando los iones férricos para prevenir que los patógenos y parásitos los usen como nutriente⁵¹.

La **cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- α** (ITIH4) es una PFA positiva en diversas especies (humana, rata, entre otras) y recientemente se ha descrito en ratón⁵². En la especie porcina es muy importante⁵³, hasta el punto de que también se le llama *Pig-MAP* (“*major acute phase protein in pigs*”, principal PFA en cerdos en inglés). La ITIH4 es una glicoproteína de 120 kDa de masa molecular⁵² que pertenece a una familia de proteínas plasmáticas que generalmente se ensamblan a partir de dos proteínas precursoras: una cadena ligera (bikunina) y una o dos cadenas pesadas. La familia de las cadenas pesadas (ITIHs) consta de al menos 6 miembros: ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4, ITIH5 e ITIH5-like o ITIH5L⁵⁴. La bikunina, denominada así porque contiene dos dominios inhibidores de proteasas tipo Kunitz, se une a las cadenas pesadas H1, H2 y H3 antes de que éstas sean liberadas a la circulación sanguínea⁵⁵. La isoforma ITIH5 también contiene el motivo conservado de interacción con la bikunina⁵⁴, pero hasta la fecha no se ha detectado ningún complejo proteico en el que formen parte ambas moléculas. En cuanto a la ITIH4, ésta carece de la secuencia consenso de unión a la bikunina, por lo que existe como una molécula libre en el plasma y no posee la actividad inhibidora característica de las proteínas de esta familia^{53,56}. A pesar de su evidente implicación en la fase aguda, todavía se desconoce su función biológica.

La **apolipoproteína A1** (ApoA1) se ha definido como PFA negativa en muchas especies (humanos, vaca, cerdo y mono). Sin embargo, los estudios en ratón son contradictorios, ya que unos autores la han considerado PFA negativa⁵⁷, mientras que otros han afirmado que se trata de una PFA positiva^{25,26}. La ApoA1 que tiene una masa molecular de 28 kDa, es la apolipoproteína más abundante en el plasma y el principal constituyente proteico de las HDL maduras y de los quilomicrones nacientes⁵⁸. Su principal función fisiológica es el transporte lipídico, y actuar como cofactor de la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), capaz de esterificar el colesterol⁵⁹. Existen numerosas publicaciones que la relacionan con procesos que tienen lugar durante la RFA, y que le otorgan propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anticoagulantes^{60–63}, además de considerarla un inhibidor de la agregación y toxicidad del péptido amiloide beta⁶⁴.

El **inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa** (ICP) es una glicoproteína de 68 kDa de masa molecular que se descubrió por primera vez en el suero de humanos y ratas. En esta última especie es una de las principales PFA positivas. Su función más relevante es la

inhibición de la papaína. Se ha visto que es fisicoquímicamente semejante a la α_1 -globulina de fase aguda, pese a ciertas diferencias en el contenido de cisteína y en el coeficiente de extinción. Por otra parte, la ICP se comporta como una típica PFA, incrementando su concentración en suero tras la inducción de inflamación por turpentina en ratas⁶⁵.

La **proteína C reactiva** (CRP) fue la primera PFA caracterizada como tal⁶⁶, y uno de los ejemplos más destacados de este tipo de proteínas en humanos, en los que su concentración puede aumentar cientos de veces sus niveles normales. También se ha considerado como una PFA positiva en otras especies (rata y vaca); sin embargo, en el ratón su concentración es muy baja (inferior a 2 $\mu\text{g/ml}$) tanto en el suero normal como en el de fase aguda⁶⁷. La CRP pertenece al grupo de proteínas conocidas como pentraxinas, de las que se han encontrado proteínas homólogas en todos los mamíferos. Consta de una asociación no covalente de 5 subunidades idénticas, cada una de unos 25 kDa de masa molecular, dispuesta en forma de anillo pentagonal y, a diferencia de la mayoría de las PFA, no es una glicoproteína^{67,68}. La CRP juega un papel importante en la protección frente a la infección, dada su capacidad para opsonizar bacterias, intervenir en la eliminación del tejido dañado y regular la respuesta inflamatoria⁶⁹. Además, es capaz de activar la cascada del complemento, interaccionar con receptores específicos de las células fagocíticas para mediar la fagocitosis o inducir la producción de citoquinas antiinflamatorias⁷⁰.

En general, la magnitud de la RFA está relacionada con la severidad del proceso inflamatorio y la extensión de la enfermedad. La cinética de inducción es variable entre las distintas PFA, aunque la rapidez y la magnitud del cambio suelen ir juntas⁷¹. El incremento de la concentración plasmática de las PFA se debe fundamentalmente a un aumento de la velocidad de síntesis, como ha sido demostrado *in vitro* empleando cortes y cultivos tisulares, mediante perfusión de órganos y mediante estudios *in vivo*^{22,72}. Las modificaciones en el catabolismo y la síntesis extrahepática generalmente tienen poca influencia en el fenómeno; aunque se ha visto síntesis de algunas PFA en células distintas a los hepatocitos, como monocitos, células endoteliales, fibroblastos o adipocitos. Respecto a las PFA negativas, la información existente es mucho más escasa, ya que los cambios que sufren suelen ser menores. El descenso de la concentración de estas

proteínas plasmáticas se ha explicado por la necesidad de tener aminoácidos disponibles para la síntesis de las PFA positivas durante la respuesta sistémica. Esta explicación reduce el papel de las PFA negativas, que serían menos esenciales para la defensa del huésped, aunque este hecho no ha sido demostrado. Sin embargo, se ha observado que varias PFA negativas tienen función antiinflamatoria⁷³, lo que explicaría su descenso durante la inflamación producida en la RFA.

2.1.2. Regulación de la expresión de las proteínas de fase aguda

La estimulación o inhibición de la síntesis de las PFA se atribuye al efecto de una serie de citoquinas y otros factores reguladores secretados por monocitos, macrófagos y células estromales activadas, que actúan como mediadores entre la zona afectada y los hepatocitos⁷⁴. Estos mediadores se pueden agrupar en cuatro categorías: (1) citoquinas de tipo IL-6, tales como la propia IL-6, la oncostatina M (OSM), el factor neutrófico ciliar (CNTF), la cardiotropina-1, la IL-11 y el factor inhibidor de la leucemia (LIF); (2) citoquinas de tipo IL-1, entre ellas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α y TNF- β ; (3) glucocorticoides; y (4) factores de crecimiento, como la insulina, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β)⁸. Las citoquinas actúan como estimuladores o inhibidores primarios de la expresión génica de las PFA, mientras que los glucocorticoides y los factores de crecimiento actúan a nivel de regulación de la acción de las propias citoquinas. Por otro lado, se ha visto que la IL-8 también puede modular la expresión de algunas PFA³.

El estudio de la regulación de las PFA se ha realizado principalmente en experimentos *in vitro*, utilizando células de hepatoma HepG2 o HepB3 o cultivos primarios de hepatocitos a los que se administra IL-1, TNF- α o IL-6 recombinante, y determinando después la expresión del mRNA de las distintas PFA a estudio⁷⁵. Aunque también se han hecho estudios *in vivo* administrando las citoquinas directamente a los animales, y analizando posteriormente lo ocurrido en sus niveles de mRNA hepáticos⁷⁶. Según el tipo de mediadores que regulan su síntesis, se suele hablar de dos tipos de PFA: las PFA de tipo I, inducidas por citoquinas tipo IL-1; y las PFA de tipo II, inducidas por citoquinas IL-6⁸. Aunque por otra parte, la IL-6 es capaz de estimular directamente la síntesis de la mayoría de las PFA, por lo que puede actuar de forma sinérgica con las citoquinas de tipo IL-1 en la estimulación de las PFA tipo I⁷. Sin embargo, las citoquinas de tipo IL-1 no

son capaces de estimular directamente la síntesis de las proteínas de tipo II y si tienen algún efecto sobre su síntesis suele ser de tipo inhibidor⁸. En general, son PFA de tipo I la ApoA1, la CRP, la GPA, la Hp de rata, el SAA y el C3; mientras que son PFA de tipo II la ITIH4, la Hp humana y de cerdo, el fibrinógeno, la α_1 -antitripsina y la ceruloplasmina³. Por lo tanto, en la regulación de la RFA también existen diferencias entre las distintas especies.

No parece claro que la producción de todas las PFA esté controlada de la misma manera, ya que se dan considerables diferencias en sus incrementos relativos en respuesta a la inflamación. La RFA es el resultado de la actuación de un gran número de mediadores, muchos de ellos posiblemente todavía desconocidos, que actúan sinérgicamente y que explican la enorme complejidad y diversidad del fenómeno. La expresión de los genes de las PFA está regulada fundamentalmente a nivel transcripcional, aunque también intervienen mecanismos post-traduccionales⁷⁷. Los cambios en el patrón de glicosilación de estas proteínas se deben al efecto de las citoquinas pro-inflamatorias⁷⁸.

La terminación de la RFA viene moderada por la corta vida media de los mediadores pro-inflamatorios y por la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-4, IL-13 y TGF- β , entre otras. Una de las funciones de la IL-10 es inhibir la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Los excesos de citoquinas pro-inflamatorias pueden ser eliminados por receptores solubles de citoquinas o por receptores antagonistas y también pueden ser bloqueados por los glucocorticoides⁷⁹. Por lo tanto, la terminación de la RFA parece ser tan compleja como los mecanismos implicados en su inicio.

2.2. *Brucella*ⁱ

Brucella es una bacteria Gram negativa, facultativa e intracelular que causa brucelosis zoonótica en humanos y diversos animales. En todo el mundo se han descrito más de medio millón de casos en humanos, aunque debido a la amplia e inespecífica naturaleza de los signos clínicos el número real podría ser mucho más elevado. Además, produce enormes pérdidas económicas en la ganadería.

ⁱ Para la redacción de este apartado se utilizó la revisión "Olsen, S. C. & Palmer, M. V. *Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years*" de la revista *Veterinary pathology*⁸³, más alguna referencia adicional (indicada como en el resto del trabajo).

Hace 50 años, se consideraba que tan sólo existían 3 especies de bacterias del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*; generalmente como patógenos específicos de su huésped: vacas, ovejas y cabras, y cerdos, respectivamente; en los que causa infertilidad y abortos. Estas especies pueden infectar y provocar la enfermedad clínica en seres humanos. Desde principios de 1960, se han identificado al menos 7 nuevas especies del mismo género: *B. ovis* (en ovejas), *B. canis* (en perros), *B. neotomae* (en roedores), *B. ceti* (en cetáceos), *B. pinnipedialis* (en focas), *B. microti* (en zorros rojos y roedores de campo) y *B. inopinata* (en humanos). Además, en los últimos años se han aislado nuevas especies potenciales, con las características típicas de *Brucella*, de dos babuinos nacidos muertos y de ranas-toro africanas⁸⁰⁻⁸².

En humanos, la mortalidad (provocada principalmente por una endocarditis) no es común; pero los síntomas incluyen fiebre, sudores nocturnos, anorexia, poliartritis, meningitis y neumonía. Los periodos de incubación pueden ser largos (hasta de 6 meses) y los síntomas pueden persistir durante años en ausencia de tratamiento. La infección suele ocurrir por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar procedentes de animales infectados con *Brucella*, pero también puede suceder por el contacto directo con animales infectados o con tejidos o fluidos asociados al aborto. La infección se produce a través de superficies mucosas: por aerosolización en tejidos respiratorios, por consumo oral o por penetración a través de roturas en la epidermis. Además, la exposición inadvertida a cepas vacunales vivas, comúnmente por pinchazos de aguja, también ha sido una fuente frecuente de infecciones en humanos, sobre todo en la profesión veterinaria. Por último, aunque es poco común, se han reportado algunos casos de difusión a través de la leche materna o por transmisión venérea.

Múltiples estudios han demostrado que la localización de la brucelosis en sus reservorios animales es el mecanismo más rentable para controlar la brucelosis humana⁸³. Por lo tanto, la mayoría de las estrategias de control implica la vigilancia de la brucelosis en el ganado mediante la vacunación y el uso de test y estrategias de eliminación.

2.2.1. Entrada celular y actividades intracelulares de *Brucella*

Brucella penetra el epitelio mucoso y se transporta como bacteria libre, o dentro de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos regionales. Su ubicación dentro de estos ganglios resulta en una hipertrofia de los mismos, en hiperplasia linfática y

retículoendotelial y en inflamación. A continuación, si la bacteria no se localiza y mata (lo que drenaría el sitio de infección) se replica y propaga por la vía sanguínea o linfática hacia otros tejidos linforeticulares y órganos como el bazo, el tracto reproductivo y/o la glándula mamaria.

Las especies de *Brucella* se caracterizan de acuerdo con el aspecto de su membrana externa en “lisas” y “rugosas”. Esta diferencia se basa en el tipo de LPS que predomina en dicha membrana. Así pues, para las cepas lisas predomina el LPS-S (“smooth”, liso en inglés), mientras que para las cepas rugosas predomina el LPS-R (“rough”, rugoso en inglés) deficiente en el O-polisacárido. La entrada de *Brucella* en las células difiere entre unas especies y otras dependiendo del tipo de LPS que posean. Las cepas lisas de *Brucella* no opsonizadas utilizan el citoesqueleto de la célula huésped para internalizar. Interactúan con microdominios ricos en colesterol (denominados balsas lipídicas) dentro de la membrana plasmática de la célula huésped que facilitan su internalización por las células fagocíticas. Estas balsas lipídicas también se encuentran en orgánulos y vesículas intracelulares. El O-polisacárido del LPS de *Brucella* parece ser una molécula clave para la interacción con las balsas lipídicas de las células huésped. También previene la lisis de la bacteria mediada por el sistema de complemento y la apoptosis de la célula huésped. La opsonización de las cepas lisas de *Brucella* aumenta la entrada 10 veces y se produce mediante receptores IgG (Fc) y del complemento (C3b y 4b) presentes en la superficie de los fagocitos, lo que la dirige hacia el compartimento fagolisosomal⁸³. Las cepas rugosas de *Brucella* son incapaces de mantener interacciones con las balsas lipídicas, pero son fácilmente fagocitadas mediante el reconocimiento por el receptor tipo Toll 4 (TLR4) o por el receptor de manosa que reconoce la carencia del O-polisacárido del LPS. Como resultado, las cepas rugosas muestran una elevada probabilidad de invasión, ya que exponen ligandos si normalmente están escondidos por la cadena lateral O y podrían aumentar la capacidad de adherirse a macrófagos. Por ello, *Brucella* rugosa no opsonizada es internalizada tan eficientemente como *Brucella* opsonizada y dirigida hacia el compartimento fagolisosomal.

Generalmente, las cepas rugosas son incapaces de replicarse, mientras que las cepas lisas que sobreviven a la fagocitosis mediada por opsonina son capaces de replicarse en el interior celular de forma eficiente. Los genes necesarios para la síntesis de la cadena

lateral O juegan un papel importante en el establecimiento del compartimento replicativo intracelular para las cepas lisas de *Brucella*.

Dentro de la célula, las cepas lisas de *Brucella* que han entrado por vía de las balsas lipídicas se dirigen rápidamente hacia el compartimento endosomal temprano, donde modifican el fagosoma para formar el denominado bruceloma mediante la adquisición de componentes del retículo endoplasmático. Inicialmente se localizan dentro de fagosomas acidificados, ya que *Brucella* requiere un pH bajo al inicio de la replicación intracelular ($\text{pH} < 4.5$). Así pues, su localización en un ambiente acidificado induce la expresión del operón *VirB*, el cual controla la expresión de genes asociados con el sistema de secreción de tipo IV. A continuación, el operón *VirB* interactúa con el retículo endoplasmático para neutralizar el pH del fagosoma. Las modificaciones inducidas por *Brucella* en el fagosoma previenen la fusión con el lisosoma. *Brucella*, dentro del bruceloma está en ambiente con agotamiento de nutrientes y limitada disponibilidad de oxígeno.

Otro mecanismo utilizado por *Brucella* para sobrevivir intracelularmente envuelve la modificación del contenido lipídico de la membrana limitante del fagosoma. De esta forma, las cepas virulentas de *Brucella* expresan una sintasa de glucano cíclico que produce y secreta glucanos cíclicos de bajo peso molecular. Estas moléculas interrumpen los microdominios de las balsas lipídicas, lo que inhibe la maduración del fagosoma y previene la fusión con lisosomas.

Desde que se descubrió que la muerte oxidativa es el principal mecanismo utilizado por los fagocitos del huésped para controlar la replicación de patógenos intracelulares, se ha visto que *Brucella* dispone de múltiples mecanismos para desintoxicarse de los radicales libres. Por ejemplo, expresa dos superóxido dismutasas, SodA y SodC, para eliminar aniones superóxido. Por otro lado, el gen *ahpC* también podría resguardar frente a la muerte oxidativa, ya que en otras bacterias protege frente a bajos niveles de peróxido de hidrógeno y puede eliminar el componente oxidante peroxinitrito. El gen *dps*, que juega un papel crítico en la resistencia frente a la muerte oxidativa y al pH ácido en otras bacterias, también se ha identificado en *Brucella*. Por último, la cadena lateral O también parece proteger frente a péptidos catiónicos celulares y metabolitos del oxígeno.

De acuerdo a su naturaleza sigilosa, *Brucella* también ha desarrollado mecanismos para escapar de la inmunidad. Así pues, minimiza la estimulación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) por el sistema inmune innato del huésped. La envoltura celular de *Brucella* tiene alta hidrofobicidad, y sus LPS tienen una estructura no canónica que provoca una respuesta inflamatoria reducida y retardada en comparación con otras bacterias Gram negativas; asimismo, tiene una menor actividad estimuladora sobre receptores TLR4. La cadena lateral O del LPS puede formar complejos con moléculas del MHC-II que interfieren con la habilidad de los macrófagos para presentar proteínas exógenas. Las lipoproteínas que posee en su membrana externa son pobres activadores de la inmunidad innata. Además, las bacterias *Brucella* están desprovistas de muchas de las estructuras clásicas envueltas en la virulencia (pili, fimbrias, cápsulas, plásmidos), las cuales estimulan a los PRRs. La capacidad de *Brucella* para prevenir la maduración del fagosoma y la fusión con lisosomas también podría interferir con otros procesos de la inmunidad innata y adaptativa. Por ejemplo, se han identificado proteínas que muestran una gran homología con moléculas adaptadoras del TLR, por lo que podrían interferir con su señalización. También se cree que la capacidad de las cepas lisas (pero no rugosas) para inhibir la apoptosis del macrófago mejora la supervivencia bacteriana manteniendo un ambiente favorable del fagocito, previniendo la liberación de la bacteria hacia el ambiente extracelular (donde muestra una replicación reducida) y contribuyendo a evitar su inactivación mediada por los anticuerpos y por el sistema del complemento. Por último, en comparación a otras bacterias Gram negativas, *Brucella* induce una baja tasa de maduración y activación de las células dendríticas, lo que podría impedir el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

2.2.2. *Brucella suis*

La cepa *B. suis* se describió por primera vez en 1914 en un feto de cerdo abortado en Indiana. Esta especie presenta múltiples variantes (biovars), que cambian en función de la especificidad y el fenotipo del huésped. Así pues, los biovars 1, 2 y 3 infectan principalmente a cerdos domésticos y salvajes, y a jabalís salvajes; mientras que el biovar 4 afecta sobre todo a renos.

El aborto es el único signo clínico observado en el ganado porcino infectado con *B. suis*, aunque es mucho menos común que en el ganado bovino infectado con *B. abortus*. La pérdida temprana del feto puede pasar desapercibida y aparentar tratarse de infertilidad. El aborto, generalmente ocurre en el segundo o tercer mes de gestación, aunque también son comunes los lechones nacidos muertos o débiles.

Los jabalís infectados con *B. suis* se caracterizan por sufrir orquitis. En casos crónicos, los machos suelen presentar testículos pequeños y atróficos. Además, tanto las hembras como los machos pueden presentar artritis con cojera o parálisis posterior ocasional.

Por último, los renos infectados con *B. suis* sufren múltiples signos clínicos, entre los que destacan: abortos, crías débiles, retención de la placenta, orquitis, epididimitis, mastitis, artritis y nefritis.

2.2.3. *Brucella* BR3

La cepa BR3 se aisló e identificó por primera vez en 2012, en una cuarentena de ranas-toro africanas encontradas muertas o moribundas en Tanzania⁸¹.

Se ha visto que, de manera similar a *B. inopinata* y *B. microti*, las bacterias BR3 son de crecimiento rápido y presentan un perfil bioquímico similar al de *Ochrobactrum*. Además, se ha podido demostrar que genéticamente están estrechamente relacionadas con *Brucella*⁸¹.

El aislamiento de esta nueva especie de *Brucella* en anfibios amplía significativamente el rango ecológico del género y sugiere que las cinco clases de vertebrados pueden ser capaces de servir como huéspedes para *Brucella*.

Actualmente se desconoce su virulencia y capacidad de transmisión a los animales de interés común y al hombre. Por ello, su caracterización forma parte de este trabajo en colaboración con el CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Dra. M^a Pilar Jiménez de Bagüés).

2.2.4. Vacunas contra la brucelosis

La vacunación es una herramienta muy valiosa para ayudar a controlar la brucelosis. Actualmente, las vacunas más utilizadas para el ganado son cepas vivas atenuadas, las cuales resultan muy efectivas previniendo los efectos clínicos de la brucelosis (aborto

y/o infección de la descendencia) que conducen a la transmisión de la enfermedad. Concretamente son dos las vacunas de cepas vivas atenuadas: *B. abortus* S19 (para el ganado vacuno) y *B. melitensis* Rev1 (para el ganado ovino y caprino).

Durante los últimos años, a pesar de que se han seguido publicando datos sobre nuevas vacunas candidatas, la mayoría del trabajo se ha dirigido hacia modelos murinos. Así pues, el desarrollo de nuevas vacunas para el ganado ha sido escaso. Y del mismo modo, tampoco se ha conseguido desarrollar una vacuna segura y eficaz contra la brucelosis en humanos.

Debido a los problemas de seguridad asociados con las vacunas vivas actuales, los avances tecnológicos en la expresión antigénica *in vivo*, los adyuvantes y los métodos de entrega resultan atractivos para el desarrollo de vacunas de *Brucella* muertas con igual o mejor eficacia que las actuales. Pese a que se han identificado algunos genes que juegan un papel en la protección, el progreso en vacunas de subunidades se ve mermado por las dificultades que conlleva la caracterización de los antígenos de *Brucella* que median la inmunidad protectora. Además, estos antígenos podrían diferir entre distintas especies de *Brucella*. Por todo esto, a pesar de que se prevé que el trabajo de desarrollo continuará, es imposible pronosticar cuándo podrá conseguirse una nueva vacuna con mejores propiedades respecto a las vacunas actualmente disponibles.

2.2.5. Modelos de laboratorio para estudiar la patogénesis de *Brucella* y la eficacia de las vacunas

Los ratones endogámicos, particularmente las especies BALB/c y C57BL, son los modelos de laboratorio más utilizados para estudiar la patogénesis de la brucelosis. En general, se utiliza la infección intraperitoneal, aunque también pueden usarse las vías aerosol, oral e intranasal. Las cargas bacterianas en el bazo y/o hígado son comúnmente utilizadas para evaluar la patogénesis.

Los modelos murinos pueden relacionarse más estrechamente a la infección humana, donde la esplenomegalia es una observación clínica común. Sin embargo, cuando las especies de *Brucella* infectan sus huéspedes naturales se localizan más frecuentemente en tejidos linfáticos, glándulas mamarias y órganos reproductivos, lo que es raro de observar en modelos murinos. Así pues, pese a que los modelos murinos son populares

debido a su bajo coste y a sus reducidos requerimientos, se debe tener en cuenta que presentan algunas limitaciones tanto a la hora de evaluar la eficacia de las vacunas como a la hora de entender la patogénesis de la brucelosis en sus huéspedes naturales. Además, debe remarcarse que a excepción del aborto, el huésped natural generalmente no muestra enfermedad clínica mientras que los humanos a menudo presentan síntomas que frecuentemente son crónicos.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Animales (material biológico)

En todos los experimentos se utilizaron ratones hembra de 9 semanas BALB/c silvestres proporcionados por los laboratorios Charles River (Francia).

3.1.2. Bacterias (material biológico)

Se utilizaron dos especies distintas de *Brucella* (*B. suis* y *BR3*), las cuales fueron proporcionadas por el CITA (Zaragoza, España).

3.1.3. Reactivos del Bradford

Bradford (Sigma, EE.UU.); BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma, EE.UU.); K_2HPO_4 (*di-Potassium Hydrogen Phosphate anhydrous*, Panreac, España); KH_2PO_4 (*Potassium di-Hydrogen Phosphate*, Panreac, España); NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, Panreac, España).

3.1.4. Reactivos del Western blot

Acrilamida (*Acrylamide/bis-acrylamide 30% Solution*, Sigma, EE.UU.); APS (*Ammonium Persulfate*, Sigma, Japón); Azul de bromofenol (*Bromophenol blue*, Sigma, India); Glicerol (*Glycerol*, Sigma, Alemania); Glicina (*Glycine*, Sigma, EE.UU.); Fijador (*Kodak processing chemicals for autoradiography films*, Sigma, EE.UU.); K_2HPO_4 (*di-Potassium Hydrogen Phosphate anhydrous*, Panreac, España); KH_2PO_4 (*Potassium di-Hydrogen Phosphate*, Panreac, España); Leche desnatada en polvo (Nestlé, España); Marcador de peso molecular (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, Lituania); Mercaptoetanol (*2-Mercaptoethanol*, Sigma, Alemania); NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, Panreac, España); PO (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma, Israel); Revelador (*Carestream Kodak autoradiography GBX developer/replenisher*, Sigma, EE.UU.); SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*, Sigma, Japón); Sustrato de la PO (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific, EE.UU.); TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*, Sigma, China); Timerosal (*Thimerosal*, Fluka, Argentina); Tris (*Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane*, Panreac, Europa); Tris-HCl (*Trizma Hydrochloride*, Sigma, EE.UU.); Tween (*Tween20 for synthesis*, Panreac, España).

3.1.5. Reactivos de la inmunodifusión doble de Ouchterony

Ácido acético glacial (*Acetic Acid Glacial*, Panreac, España); Ácida sódica (*Sodium azide*, Sigma, Alemania); Agar (*Agar*, Sigma, EE.UU.); Agarosa (*Agarose*, Sigma, EE.UU.); Azul de Coomassie (*Brilliant Blue R*, Sigma, Alemania); Glicerol (*Glycerol*, Sigma, Alemania); Metanol (*Methanol*, Sigma, Alemania); Polietilenglicol (*Polyethyleneglicol 3.350*, Sigma, EE.UU.), Veronal (*Barbital*, Sigma, EE.UU.).

3.1.6. Reactivos de la inmunodifusión radial simple de Mancini

Ácido acético glacial (*Acetic Acid Glacial*, Panreac, España); Ácida sódica (*Sodium azide*, Sigma, Alemania); Agarosa (*Agarose*, Sigma, EE.UU.); Azul de Coomassie (*Brilliant Blue R*, Sigma, Alemania); Glicerol (*Glycerol*, Sigma, Alemania); Metanol (*Methanol*, Sigma, Alemania); Polietilenglicol (*Polyethylene-glicol 3.350*, Sigma, EE.UU.); Transferrina pura de ratón (*apo-Transferrin from mouse*, Sigma, EE.UU.); Veronal (*Barbital*, Sigma, EE.UU.).

3.1.7. Reactivos del ELISA para la determinación de PFA

Kit ELISA para Hp de ratón (*Mouse Haptoglobin ELISA Kit*, ICL, EE.UU.); Kit ELISA para SAA de ratón (*Mouse SAA ELISA Kit*, ICL, EE.UU.); Kit ELISA para Hx de ratón (*Mouse Hemopexin ELISA Kit*, ICL, EE.UU.).

3.1.8. Reactivos del ELISA para la determinación de anticuerpos contra el LPS de *B. abortus*

Kit ELISA para las inmunoglobulinas (Igs) totales contra el LPS de *B. abortus* (*Norwegian School of Veterinary Science*, NVH, Noruega); Kit ELISA para la inmunoglobulina G3 (IgG3) contra el LPS de *B. abortus* (*Norwegian School of Veterinary Science*, NVH, Noruega).

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño del estudio experimentalⁱⁱ

Preparación de las dosis. Ambas especies se sembraron en diferentes placas de cultivo con base de agar sangre (BAB) y se mantuvieron en la estufa a 37°C durante aproximadamente 18 horas. Se recolectó una porción del cultivo de cada una de las especies de *Brucella* previamente sembradas y se diluyó en un tubo “eppendorf” con un volumen inferior a 900 µl de PBS estéril (DPBS, Pan-Biotech, Alemania). De este “eppendorf” se cogió un volumen al azar y se añadió en un tubo de ensayo con 4.5 ml de PBS estéril, del cual, tras agitarlo, se trasvasó 1 ml a una cubeta de lectura espectrofotométrica para medir la DO a 600 nm en el espectrofotómetro (Thermo Biomate, Reino Unido)ⁱⁱⁱ. En función de la DO obtenida y con el volumen previamente recogido, se calculó el volumen necesario con el que conseguir una DO ≈ 0.200 nm^{iv}. Finalmente, a partir del tubo con esta DO (10^9 bacterias), se hicieron diluciones seriadas 1:10 en PBS estéril, y se verificó que las dosis preparadas eran las correctas (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 bacterias) dispersando gotas de 25 µl de cada una de estas diluciones en placas de cultivo con BAB.

Infección de los animales. La experimentación animal se llevó a cabo de acuerdo a las guías de la Federación para Asociaciones Científicas de Animales de Laboratorio y fue aprobada por comités éticos locales de experimentación animal (I111/2010/2). Los 60 animales comprados se distribuyeron en tres grupos: 4 se utilizaron como control, 28 se infectaron con *B. suis* y 28 se infectaron con BR3. La infección se hizo por inyección intraperitoneal con una dosis de 10^4 bacterias, por lo que se inyectaron 100 µl de la dilución 10^5 . Al grupo control se le inyectaron del mismo modo 100 µl de PBS estéril con el fin de que todos animales sufrieran el mismo estrés.

Sacrificio de los animales. Los ratones se sacrificaron a distintos tiempos de infección (días 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84) por asfixia en cámara de CO₂. Seguidamente se obtuvo la sangre por punción torácica y se extrajeron el bazo y el hígado asépticamente (Figura 2).

ⁱⁱ Puesto que se trabajó con *Brucella*, esta parte del estudio se hizo en un laboratorio de seguridad P3; más concretamente en el CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza).

ⁱⁱⁱ Como blanco se utilizó PBS estéril.

^{iv} En el caso de *Brucella*, una DO = 0.200 nm corresponde a 10^9 bacterias.

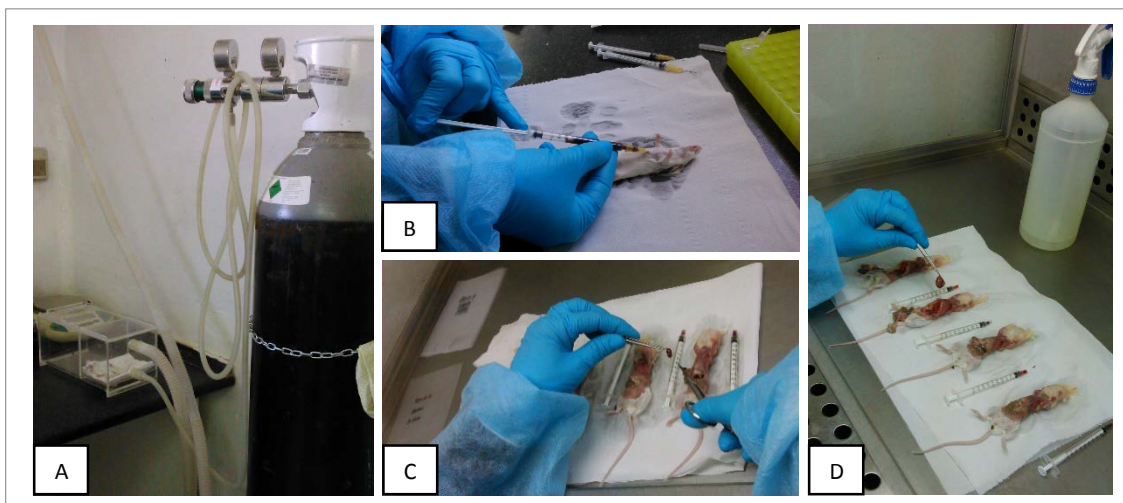


Figura 2. Sacrificio de los animales. A) Asfixia en cámara de CO₂. B) Extracción de la sangre por punción torácica. C) Extracción del bazo (en campana, para evitar contaminaciones). D) Extracción del hígado (en campana, para evitar contaminaciones).

Extracción del suero. La sangre se centrifugó a 2000 G durante 15 minutos y a continuación, el sobrenadante se traspasó a tubos de centrifuga con filtro (*Ultrafree Centrifugal Filters*, Durapore 0.22 µm, Alemania) y se centrifugó a 12000 G durante 4 minutos para retener a las bacterias de *Brucella* en dicho filtro. Finalmente, el suero libre de bacterias se alicuotó y congeló a -20°C con el fin evitar la degradación de las proteínas para su posterior análisis.

Determinación de la carga bacteriana. En primer lugar, el bazo y el hígado se pesaron enteros. Seguidamente se cortó y pesó un trozo de cada uno de estos órganos, y se homogenizó con la ayuda de un “stomacher” (Seward Stomacher, Reino Unido) añadiendo 1 ml al bazo y 2 ml al hígado de PBS estéril. A continuación, se realizaron diluciones^v seriadas 1:10 en PBS estéril, y se sembraron 100 µl de cada una de ellas en placas de cultivo con BAB [en el caso del hígado enriquecido con antibiótico (*Brucella Selective Supplement*, Thermo Scientific, Reino Unido)]. Por último, las placas se incubaron durante 24-48 horas a 37°C y se hizo el recuento de las UFC a partir de la fórmula siguiente^{vi}:

$$UFC = n^{\circ} \text{ colonias} \cdot \text{dilución} \cdot v \text{ de homogenización} \cdot \text{factor de corrección de peso}$$

^v En número de diluciones realizadas dependió del tiempo de incubación de la infección, ya que interesa que no haya un número de colonias excesivamente alto para facilitar el recuento.

^{vi} UFC: unidades formadoras de colonias; n° colonias: número de colonias contadas (se utiliza la dilución en la que el número de colonias está entre 30 y 300); dilución: dilución en la que se determinó el número de colonias; v de homogenización: volumen en el que se homogenizó el trozo de órgano (1 ml para el bazo y 2 ml para el hígado); factor de corrección de peso: peso del órgano entero dividido entre peso del trozo de órgano cortado.

3.2.2. Bradford

Los niveles de proteína total en suero se determinaron por el método de Bradford⁸⁴. Brevemente, este método se basa en la unión del azul de Coomassie G-250 a la proteína, lo que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 365 a 595 nm. El incremento de la absorción a 595 nm es monitorizado, y la cantidad de esta absorción es proporcional a la proteína presente.

Las muestras se prepararon diluyendo (1/3000) en PBS (NaCl 1.54 M, K₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 15 mM) los sueros de los ratones guardados a -20°C, y el ensayo se llevó a cabo según⁸⁵. La recta de calibrado se preparó haciendo diluciones seriadas de BSA 2 mg/ml en PBS (concretamente, se prepararon los puntos correspondientes a 0, 5, 10, 20, 30 y 40 µg/ml). A continuación, se añadieron 40 µl del reactivo Bradford en todos los pocillos de una microplaca (Greiner Bio-one Microplates, Alemania), y seguidamente se añadieron las muestras y la recta de calibrado por triplicado, pipeteando 160 µl de las mismas. Finalmente, se midió la absorbancia a 620 nm en el espectrofotómetro (Thermo Multiskan EX, China).

3.2.3. Western blot

En primer lugar se puso a punto la técnica con la batería de antisueros disponible en el laboratorio (anti-ApoA1 de cerdo, anti-CRP de cerdo, anti-GPA de cerdo, anti-Hp de cerdo, anti-ITIH4 de cerdo, anti-ICP de rata o anti-Tf de cerdo). El método Western blot se utilizó para cuantificar relativamente las correspondientes proteínas. Este método se utiliza para identificar positivamente una proteína de una mezcla compleja. Las proteínas son separadas mediante una electroforesis en gel y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea para prevenir las uniones inespecíficas de los anticuerpos con los que es posteriormente incubada y, finalmente, se sondea con algún tipo de detección o conjugado.

Los sueros se diluyeron (1/20) en PBS (NaCl 1.54 M, K₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 15 mM). A continuación, se añadieron en un tubo “eppendorf” 14 µl de muestra ya diluida y 7 µl de tampón de carga 3X (tris-HCl 60 mM, glicerol 10%, SDS 2%, mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.005%). Y finalmente, se incubaron a 100°C durante 5 minutos.

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 10% o al 12% (*Staking*: acrilamida 13.3%, tris-HCl 100 mM, SDS 0.1%, APS 0.4%, TEMED 0.2%; *Resolving* 10%: acrilamida 33.3%, tris-HCl 375 mM, SDS 0.1%, APS 0.2%, TEMED 0.1%; *Resolving* 12%: acrilamida 39.96%, tris-HCl 375 mM, SDS 0.1%, APS 0.2%, TEMED 0.1%), en función de las proteínas a determinar en el ensayo^{vii}.

En cada prueba se disponía de diez carriles: uno para el marcador de peso molecular, dos para un par de muestras del grupo control (animales no infectados) y siete para una muestra de cada uno de los tiempos de infección (3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84 días). Las muestras se cargaron, corrieron y se resolvieron por electroforesis (SDS-PAGE) a 120V 20mA durante aproximadamente 1:30 horas. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Alemania) a 20V 400mA durante 1 hora. A continuación, las membranas se bloquearon a TA durante 1 hora, en agitación, con leche desnatada en polvo al 5% en tampón B (NaCl 1.54 M, K₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 15 mM, tween 0.1%, timerosal 0.1 g/l). Se hicieron 3 lavados de 5 minutos, en agitación, con tampón B, y se incubaron a TA durante 1 hora, en agitación, con los siguientes antisueros: anti-ITI4 de cerdo (1/1000), anti-ApoA1 de cerdo (1/250), anti-ICP (1/3000) de rata, anti-GPA de cerdo (1/2000), anti-Tf de cerdo (1/5000), anti-Hp de cerdo (1/1000) y anti-CRP de cerdo (1/500); todos disueltos en tampón B con leche en polvo al 2.5% (p/v). A continuación, se repitieron los lavados, y se incubaron a TA durante 1 hora, en agitación, con el anticuerpo secundario PO (1/20000); disuelto en tampón B con leche en polvo al 2.5% (p/v). Por último, tras volver a repetir los lavados, las membranas se incubaron con el sustrato de la PO durante 1 minuto, se colocaron en un casete (*X ray film cassette*) y se revelaron en films (*CL-XPosure Film*, Thermo Scientific, Bélgica) a distintos tiempos de exposición en función de la proteína a determinar^{viii}. Los films se escanearon en un scanner Epson y el contenido proteico de las bandas electroforéticas se cuantificó con el software ImageJ y su módulo Gel Analyzer, con el que tras convertir las imágenes a escala de grises y eliminar el ruido de fondo, se integró la señal de las bandas.

^{vii} Las proteínas a determinar en el suero de cada uno de los animales que se incluyeron en el estudio se distribuyeron en tres geles diferentes: gel 1 (al 10%) → ITIH4 (≈ 120 kDa) y ApoA1 (≈ 28 kDa); gel 2 (al 10%) → ICP (≈ 68 kDa) y GPA (≈ 40 kDa); gel 3 (al 12%) → Tf (≈ 80 kDa), Hp (≈ 40 kDa) y CRP (≈ 25 kDa).

^{viii} Tiempos de exposición: ITIH4, ICP, GPA, Tf y Hp → ≈ 1 minuto; ApoA1 → ≈ 30 segundos; CRP → ≈ 3 minutos.

3.2.4. Inmunodifusión doble de Ouchterlony

Se testaron algunos sueros de ratón con la batería de antisueros disponible en el laboratorio (anti-ApoA1 de cerdo, anti-GPA de cerdo, anti-GPA de rata, anti-Hp de cerdo, anti-Hx de cerdo, anti-ITIH4 de cerdo, anti-ITIH4 de rata, anti-ICP de rata, anti-Tf de cerdo y anti-Tf de ratón) para ver si había reacción cruzada. Brevemente, el método de Ouchterlony⁸⁶ es una técnica inmunológica utilizada para la detección de antígenos o anticuerpos en una muestra biológica. Se basa en la naturaleza multivalente de la mayoría de los antígenos, y en la capacidad de los anticuerpos para unirse al mismo tiempo a varias moléculas. De esta forma, al encontrarse unos con otros, se entrecruzan y crean una gran matriz de agregados antígeno-anticuerpo que precipitan en el gel revelando una línea blanquecina.

En primer lugar, se prepararon los portas con el gel. Las primeras capas se hicieron con una solución de agarosa al 1% en agua destilada; la cual se puso a hervir hasta su completa disolución, se añadió sobre varias placas y se dejó secar en la estufa a 60°C hasta que toda el agua quedó evaporada. A continuación, se prepararon las segundas capas^{ix}: por un lado, se preparó una solución de agarosa al 1% en veronal (0.025 M, pH 8.2); y por otro lado, se preparó una solución de agarosa al 1%, agar al 0.5% y polietilenglicol al 3% en veronal (0.025 M, pH 8.2). Ambas soluciones se pusieron a hervir hasta su completa disolución y tras atemperarlas a 56°C y añadirles ácido sódico al 0.1%, se pipetearon sobre las primeras capas de las placas. Una vez que las segundas capas solidificaron a TA, se utilizaron una plantilla y una troqueladora para agujerearlas.

A continuación, se prepararon las muestras. Para ello, se hicieron distintas diluciones en PBS (NaCl 1.54 M, K₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 15 mM) de algunos de los sueros de los ratones guardados a -20°C y de algunos sueros de rata que servirían como control (se probaron tanto sueros de rata normales como de fase aguda inducida con trementina; disponibles en el laboratorio).

^{ix} Se utilizaron dos soluciones distintas porque, tras ver que con la primera (agarosa al 1% en veronal) el método no funcionaba, se probó una segunda con una composición algo diferente (agarosa al 1%, agar al 0.5% y polietilenglicol al 3% en veronal) para tratar de favorecer la reacción de precipitación.

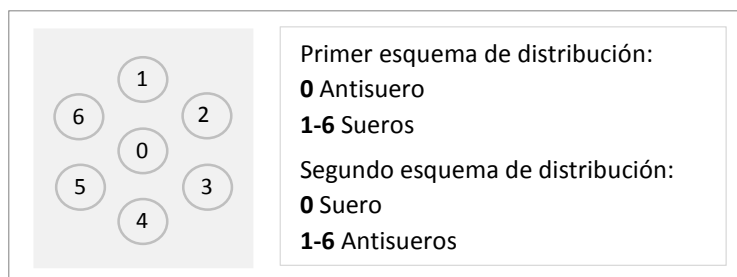


Figura 3. Esquemas de distribución de antisueros y sueros.

Tras tener listas los portas con el gel y las muestras, se añadieron a los pocillos 15 µl de antisuero o de muestra, en función de la distribución escogida (Figura 3), y se dejaron incubar a 4°C durante aproximadamente 48 horas. Después, las placas se envolvieron en papel de filtro y se pusieron a lavar en PBS con acida sódica al 0.1%, en agitación, durante unos dos días^x. Una vez lavadas, se quitó el papel de filtro y se dejaron secar en la estufa a 60°C hasta que todo el líquido quedó evaporado. Finalmente, se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0.5 g/l en ácido acético glacial al 6%, metanol al 45% y agua al 49%), y se decoloró el fondo con una solución decolorante (ácido acético glacial al 10%, metanol al 25%, glicerol al 2% y agua al 63%) con el fin de facilitar la visualización de las líneas de precipitación.

3.2.5. Inmunodifusión radial simple de Mancini

Se determinaron los niveles de transferrina en suero con el antisuero anti-Tf de ratón positivo por el método de Ouchterlony. Brevemente, el método de Mancini⁸⁷ es una técnica inmunológica utilizada para determinar la cantidad o concentración de un antígeno en una muestra biológica. Se basa en la difusión radial del antígeno por el medio que contiene el anticuerpo hasta que se alcanza el punto de equivalencia, lo que termina formando un círculo de precipitación. Finalmente, el antígeno es cuantificado midiendo el diámetro de este círculo y comparándolo con los diámetros de círculos de precipitación formados por cantidades o concentraciones conocidas del antígeno.

En primer lugar, se prepararon las placas con el gel. Las primeras capas se hicieron con una solución de agarosa al 1% en agua destilada; la cual se puso a hervir hasta su completa disolución, se añadió sobre varias placas y se dejó secar en la estufa a 60°C

^x En este periodo de tiempo la solución de lavado se renovó varias veces, y en cada cambio se puso a secar el papel del filtro que recubría las placas.

hasta que toda el agua quedó evaporada. A continuación, se prepararon las segundas capas con una solución de agarosa al 2% y polietilenglicol al 3% en veronal (0.025 M, pH 8.2); la cual se puso a hervir hasta su completa disolución y, tras atemperarla a 56°C y añadirle ácida sódica al 0.1%, se le añadió también el antisuero anti-Tf de ratón al 2% y se pipeteó sobre las primeras capas de las placas. Una vez que las segundas capas solidificaron a TA, se utilizaron una plantilla y una troqueladora para agujerearlas.

Las muestras se prepararon haciendo diluciones seriadas (1/40 y 1/80) en PBS (NaCl 1.54 M, K₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 15 mM) de los sueros de los ratones guardados a -20°C. Y la recta de calibrado se preparó haciendo diluciones seriadas (1/20, 1/40, 1/80 y 1/160) de transferrina pura de ratón 2 mg/ml en PBS.

Tras tener listas las placas con el gel, las muestras y la recta de calibrado, se añadieron 6 µl a los pocillos por duplicado, y se dejaron incubar a TA durante aproximadamente 48 horas. Pasado este tiempo, las placas se envolvieron en papel de filtro y se pusieron a lavar en PBS con ácida sódica al 0.1%, en agitación, durante unos dos días^{xi}. Una vez lavadas, se quitó el papel de filtro y se dejaron secar en la estufa a 60°C hasta que todo el líquido quedó evaporado. Finalmente, se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0.5 g/l en ácido acético glacial al 6%, metanol al 45% y agua al 49%), y se decoloró el fondo con una solución decolorante (ácido acético glacial al 10%, metanol al 25%, glicerol al 2% y agua al 63%) con el fin de facilitar la visualización y la medida del diámetro de los círculos de precipitación.

3.2.6. ELISA para la determinación de PFA

Se utilizó la técnica ELISA para cuantificar algunas de las principales PFA en ratón (Hp, Hx y SAA). Brevemente, esta técnica utiliza un inmunoensayo enzimático en fase sólida para identificar una sustancia, generalmente un antígeno, en una muestra líquida. Los antígenos de la muestra se unen en la superficie de la placa, y seguidamente se añade un anticuerpo específico a dichos antígenos. Este anticuerpo está ligado a una enzima que, en la etapa final, servirá para que al añadir su sustrato se produzca una señal detectable, comúnmente un cambio en el color del sustrato.

^{xi} En este periodo de tiempo la solución de lavado se renovó varias veces, y en cada cambio se puso a secar el papel del filtro que recubría las placas.

Para los tres kits (Hp de ratón, Hx de ratón o SAA de ratón) se siguieron las detalladas instrucciones del fabricante (Immunology Consultants Laboratory, EE.UU.). Las muestras se prepararon diluyendo (1/10000 para el kit de la Hp; 1/20000 para el kit de la Hx; o 1/1000 para el kit del SAA) los sueros de los ratones guardados a -20°C en el diluyente que proveía el kit. La recta de calibrado se preparó diluyendo el correspondiente calibrador (0, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 y 125 ng/ml para el kit de la Hp; 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 ng/ml para el kit de la Hx; o 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ng/ml para el kit del SAA) en el mismo diluyente utilizado para las muestras. A continuación, se añadieron por duplicado 100 µl de las muestras o de la recta de calibrado en los pocillos de la placa, y se incubó a TA durante 15 minutos (Hp) o 1 hora (Hx y SAA), en función del kit. Pasado este tiempo, se vaciaron los pocillos y se hicieron 4 lavados con la solución que proveía el kit. Después, se añadieron 100 µl del correspondiente anticuerpo conjugado con la enzima, y se incubó a TA y en oscuridad durante 15 minutos (Hp) o 30 minutos (Hx y SAA), en función del kit. Tras esto, se volvieron a vaciar los pocillos, se repitieron los 4 lavados, se añadieron 100 µl del sustrato de la enzima, y se incubó a TA y en oscuridad durante 10 minutos. Por último, se añadieron 100 µl de la solución stop y se leyó la absorbancia del cambio de color (amarillo → azul) a 450 nm en el espectrofotómetro (Thermo Multiskan EX, China).

3.2.7. ELISA para la determinación de anticuerpos contra el LPS de *B. abortus*

Se utilizó la técnica ELISA para determinar las Igs totales y la IgG3 contra el LPS de *B. abortus* tal y como describe en⁸⁸.

3.2.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 16.0.

Para cada infección, la concentración de las proteínas para cada día experimental post-infección (días 3, 5, 7, 14, 28, 56 u 84) se ha comparado con la del día previo a la infección (día 0) por ANOVA seguido de una prueba post-hoc, Dunnett o Games-Howell dependiendo de si las varianzas eran iguales o diferían, respectivamente, siendo ** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$.

La comparación entre la cepa *B. suis* y la cepa *BR3* se ha realizado a los mismos días post-infección (días 3, 5, 7, 14, 28, 56 u 84) por la T de Student, siendo ** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación de la carga bacteriana

En primer lugar se determinó tanto el peso como la carga bacteriana [expresada en unidades formadoras de colonia (UFC)] en hígado y bazo para definir el tipo de infección de ambas cepas de *Brucella*.

Respecto al peso del hígado, en los animales infectados por *B. suis* se observó un aumento a los 14 días tras la inoculación de la bacteria; mientras que en los animales infectados por *BR3* el incremento fue mucho menos pronunciado a partir de los 7 días tras la inoculación de la bacteria (Figura 4). En referencia a la carga bacteriana en hígado, en los animales infectados por *B. suis* se produjo un ligero aumento a los 7 días tras la inoculación de la bacteria y a partir de ese momento las UFC decayeron, aunque no llegaron a desaparecer. Sin embargo, en los animales infectados por *BR3* se percibió una carga bacteriana bastante menor a la de los animales infectados *B. suis* y las UFC descendieron a partir del día 3, hasta casi llegar a desaparecer (Figura 5).

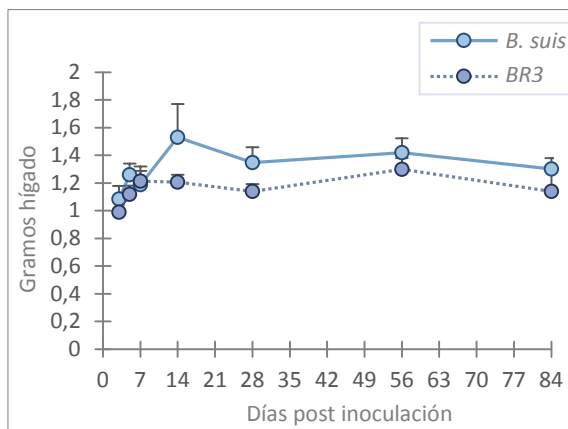


Figura 4. Evolución del peso del hígado en ratones inoculados con *B. suis* o *BR3*. Los resultados se expresan como media \pm SD (n = 4) del peso del hígado.

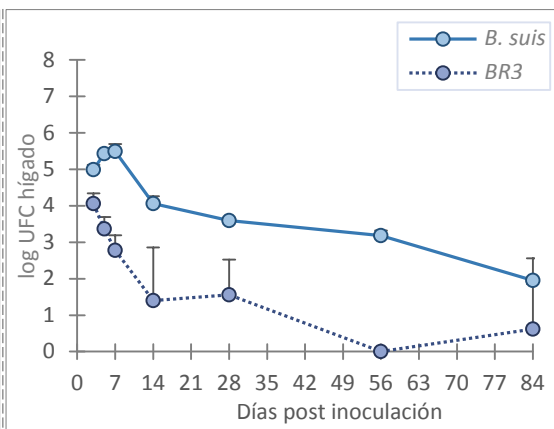


Figura 5. Cinética de la infección en hígado de ratones inoculados con *B. suis* o *BR3*. Los resultados se expresan como media \pm SD (n = 4) del logUFC en hígado.

Respecto al peso del bazo, en los animales infectados por *B. suis* se observó un aumento muy pronunciado a los 14 días tras la inoculación de la bacteria; mientras que en los animales infectados por *BR3* el incremento fue bastante más ligero a los mismos días tras la inoculación de la bacteria (Figura 6). En referencia a la carga bacteriana en bazo, en los animales infectados por *B. suis* el pico máximo se produjo a los 7 días tras la

inoculación de la bacteria y a partir de ese momento el número de UFC decayó, aunque no llegó a desaparecer. En los animales infectados por *BR3* se observó algo muy similar, salvo que en este caso las UFC fueron menores a las de los animales infectados por *B. suis* (Figura 7).

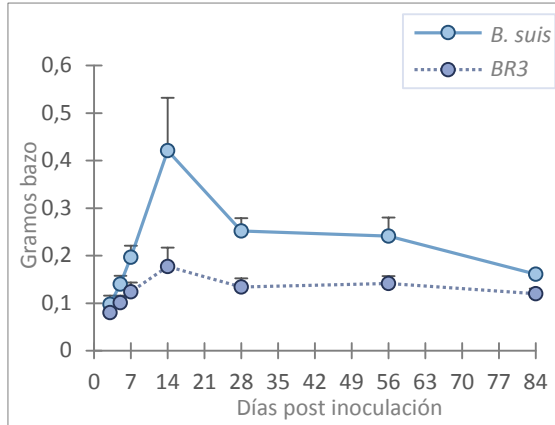


Figura 6. Evolución del peso del bazo en ratones inoculados con *B. suis* o *BR3*. Los resultados se expresan como media \pm SD (n = 4) del peso del bazo.

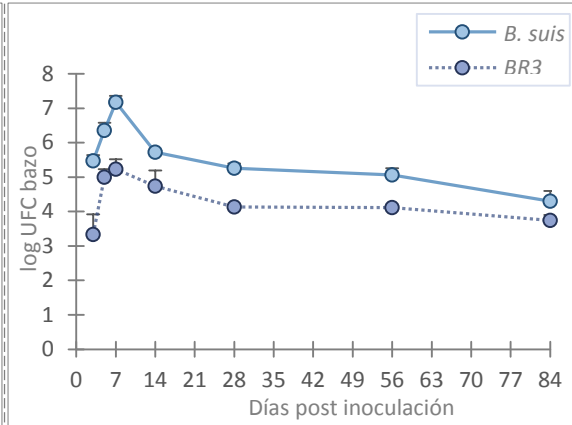


Figura 7. Cinética de la infección en bazo de ratones inoculados con *B. suis* o *BR3*. Los resultados se expresan como media \pm SD (n = 4) del logUFC en bazo.

Tras analizar todos estos resultados se puede considerar que las infecciones realizadas tanto con *B. suis* como con *BR3* son crónicas, ya que los ratones no consiguen eliminar a las bacterias en el periodo de tiempo estudiado (3 meses). También se observa la característica esplenomegalia propia de modelos murinos infectados por este tipo de bacterias⁸³. Además, la infección producida con *B. suis* es mucho más patogénica que la causada con *BR3*, ya que con la primera cepa las UFC fueron mayores tanto en hígado como en bazo.

4.2. Cuantificación de la proteína total

Se determinó la cantidad de proteína total en suero por el método Bradford para cada uno de los animales incluidos en el estudio. En los ratones infectados con *B. suis* la cantidad de proteína total tendió a disminuir a los 7 días tras la inoculación de la bacteria; mientras que en los ratones infectados con *BR3* lo hizo en los 3-7 días post-infección. Sin embargo, tras analizar estadísticamente los resultados obtenidos se comprobó que las ligeras diferencias observadas en función del tiempo de infección no fueron significativas para ninguna de las dos cepas de *Brucella* (Figura 8).

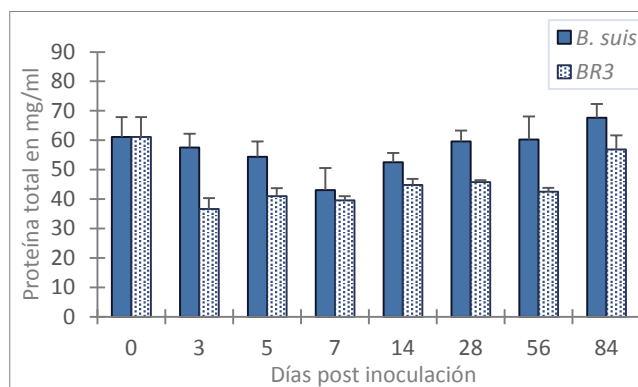


Figura 8. Evolución de la concentración de proteína total en ratones inoculados con *B. suis* o BR3. La concentración de proteína total se determinó por el método Bradford (ver materiales y métodos). Los resultados se expresan como media \pm SD ($n = 4$) de la concentración de proteína total.

4.3. Inmunoprecipitación

Los antisueros de cerdo, rata y ratón disponibles en el laboratorio se testaron por el método de Ouchterlony. El suero de los ratones incluidos en el estudio (infectados con *B. suis* o BR3) sólo produjo reacción de precipitación con el antisuero anti-Tf de ratón (Figura 9). Por lo tanto, la Tf fue la única proteína que se pudo cuantificar por el método de Mancini.

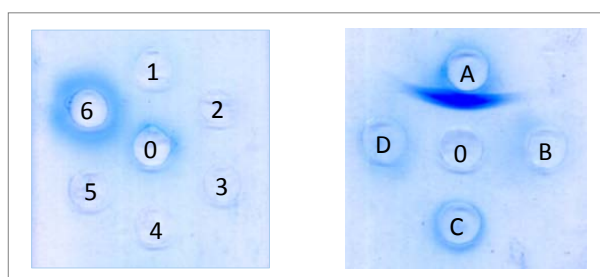


Figura 9. Ouchterlony. En el pocillo central (0) se añadieron 15 μ l de suero de ratón infectado, que se enfrentó con (1) anti-ApoA1 de cerdo, (2) anti-GPA de cerdo, (3) anti-Hp de cerdo, (4) anti-Hx de cerdo, (5) anti-ITIH4 de cerdo, (6) anti-Tf de cerdo, (A) anti-Tf de ratón, (B) anti-GPA de rata, (C) anti-ITIH4 de rata, (D) anti-ICP de rata.

4.4. Cuantificación de las proteínas de fase aguda

Se utilizó la batería de antisueros disponibles en el laboratorio para cuantificar por Western blot algunas de las proteínas implicadas en la RFA del ratón según la literatura.

Las que resultaron ser PFA se trataron de cuantificar por el método de Mancini (Tf) o por ELISA (en función de su eficacia y disponibilidad en el mercado).

4.4.1. Apolipoproteína A1

En este estudio la ApoA1 se cuantificó por el método Western blot, pero las ligeras diferencias observadas entre los días de infección tras la inoculación de la bacteria (*B. suis* o *BR3*) no fueron estadísticamente significativas con respecto al día previo a la infección (día 0). Por lo tanto, aunque en estudios previos los resultados respecto a la ApoA1 como proteína de fase aguda en ratón se han mostrado contradictorios; ya que unos consideran que es una PFA negativa⁵⁷, mientras que otros afirman que es una PFA positiva^{25,26}; en este tipo de infección la ApoA1 no es una PFA en ratón.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre las dos especies de *Brucella* a los mismos días de infección; por lo que la ApoA1 no sirve para diferenciar entre la infección crónica típica de *B. suis* y la infección moderada propia de *BR3* (Figura 10, A y B).

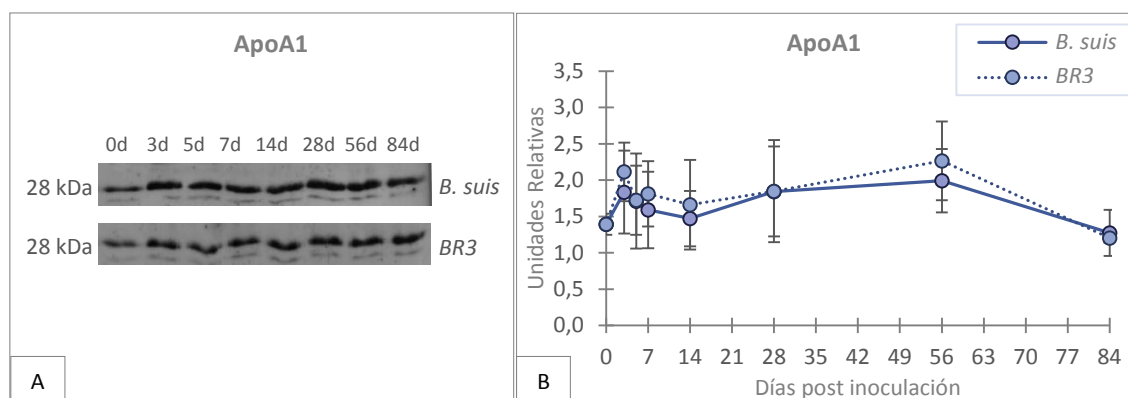


Figura 10. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*. Los sueros de ratón ($n = 4$) se recogieron a distintos días de infección ($d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución 1/20) y se sometieron a una SDS-PAGE (10%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisero primario anti-ApoA1 (dilución 1/250) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución 1/20000). A) Imagen representativa de cuatro experimentos distintos. B) Unidades relativas de la respuesta de la ApoA1 durante la infección. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.2. Inhibidor de la α_1 -cisteína proteasa

En este estudio el ICP se cuantificó por el método Western blot, pero las pequeñas diferencias observadas entre los días de infección tras la inoculación de la bacteria (*B. suis* o *BR3*) no fueron estadísticamente significativas con respecto al día previo a la

infección (día 0). Por lo tanto, aunque en estudios previos se ha demostrado que el ICP es una de las principales proteínas de fase aguda positivas en rata⁶⁵, hasta ahora no se había estudiado en ratón; y en este tipo de infección, al igual que sucedió con la ApoA1, el ICP no es una PFA en ratón.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre las dos especies de *Brucella* a los mismos días de infección; por lo que el ICP no sirve para diferenciar la infección crónica típica de *B. suis* de la infección moderada propia de *BR3* (Figura 11, A y B).

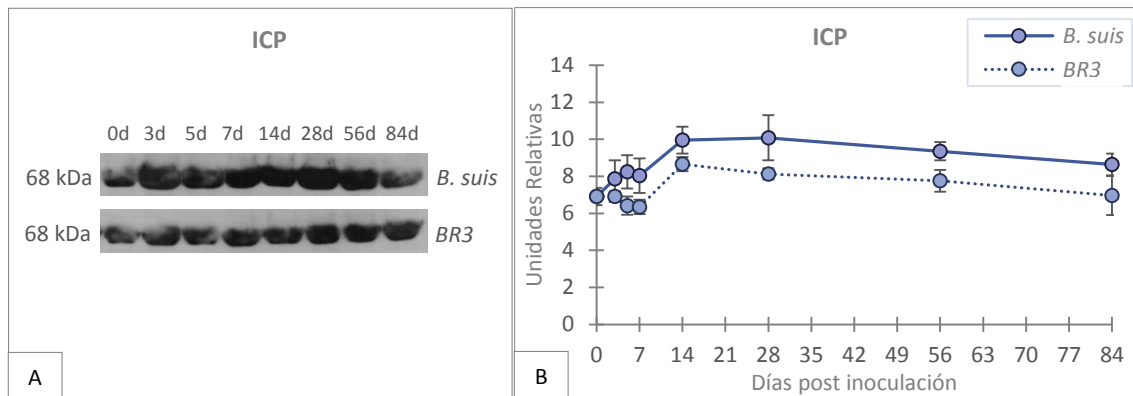


Figura 11. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*. Los sueros de ratón ($n = 4$) se recogieron a distintos días de infección ($d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución 1/20) y se sometieron a una SDS-PAGE (10%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-ICP (dilución 1/3000) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución 1/20000). A) Imagen representativa de cuatro experimentos distintos. B) Unidades relativas de la respuesta del ICP durante la infección. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.3. Proteína C reactiva

En este estudio la CRP se cuantificó por el método Western blot, pero las ligeras diferencias observadas entre los días de infección tras la inoculación de la bacteria (*B. suis* o *BR3*) no fueron estadísticamente significativas con respecto al día previo a la infección (día 0). En estudios previos se ha demostrado que la CRP es una proteína que se encuentra en muy baja concentración en ratón, tanto en situación normal como en fase aguda⁶⁷; por lo tanto, coincidiendo con lo descrito en la literatura, en este tipo de infección, al igual que sucedió con la ApoA1 y el ICP, la CRP no es una PFA en ratón.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre las dos especies de *Brucella* a los mismos días de infección; por lo que la CRP no sirve para diferenciar entre la infección crónica típica de *B. suis* y la infección moderada propia de *BR3* (Figura 12, A y B).

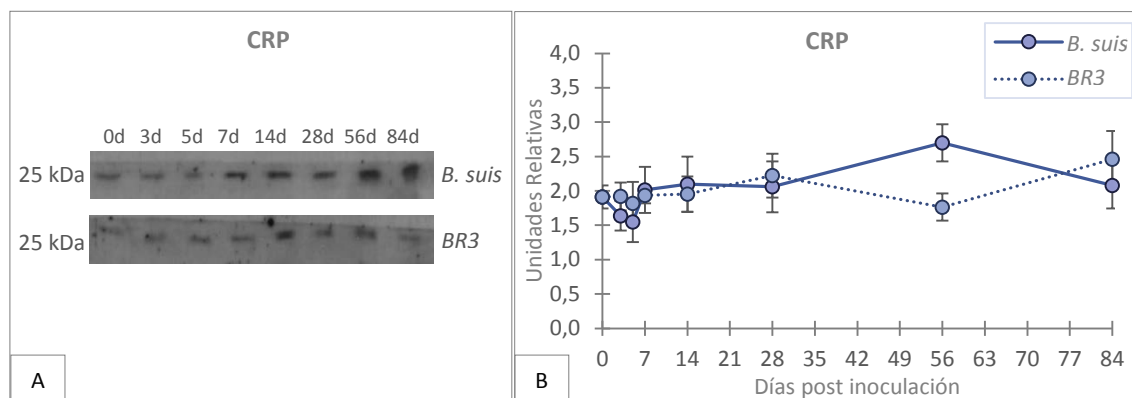


Figura 12. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*. Los sueros de ratón (n = 4) se recogieron a distintos días de infección (d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84) (dilución 1/20) y se sometieron a una SDS-PAGE (12%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisero primario anti-CRP (dilución 1/500) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución 1/20000). A) Imagen representativa de cuatro experimentos distintos. B) Unidades relativas de la respuesta de la CRP durante la infección. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.4. Cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- α

En este estudio la ITIH4 se cuantificó por el método Western blot. Las diferencias observadas entre algunos de los tiempos de infección tras la inoculación de la bacteria y el día previo a la infección (día 0) fueron estadísticamente significativas tanto para los animales infectados con *B. suis* (días 7, 14, 28 y 56) como con *BR3* (día 7). En el caso de *B. suis*, la concentración máxima apareció a los 7 días de infección, alcanzando un valor 3.5 veces superior al del día 0 (Figura 13, A). En el caso de *BR3*, la concentración máxima apareció también a los 7 días de infección, pero en este caso su valor fue tan solo 1.6 veces superior al del día 0 (Figura 13, B). En nuestro laboratorio, la ITIH4 se ha determinado como PFA positiva en especies como el cerdo⁸⁹, la vaca y recientemente el perro. Sin embargo, en ratón hay muy pocos estudios que avalan la ITIH4 como PFA. En este trabajo, la ITIH4 es una PFA positiva en la infección por *Brucella* en ratón.

Además, las notables diferencias entre las dos especies de *Brucella* a los mismos tiempos de infección fueron estadísticamente significativas para los días 3, 7, 14, 28 y 56; por lo

que la ITIH4 podría servir para diferenciar la infección crónica típica de *B. suis* de la infección moderada propia de *BR3* (Figura 14).

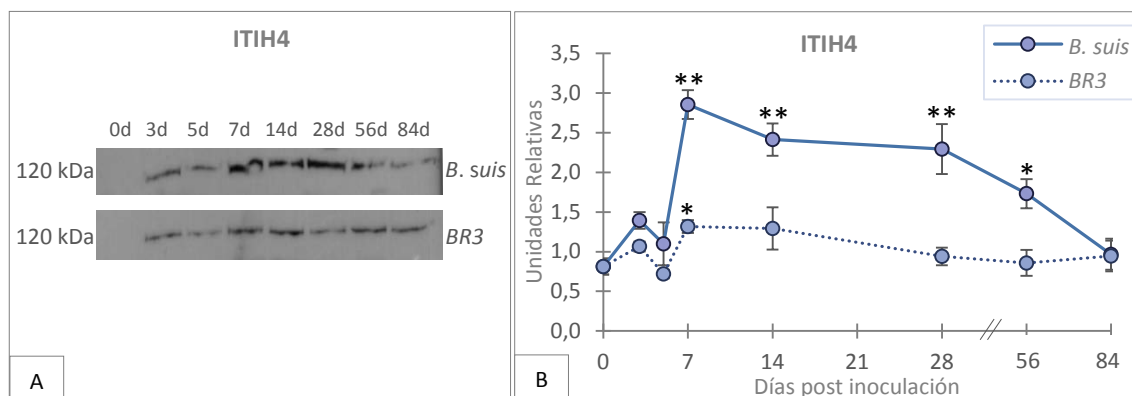


Figura 13. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*. Los sueros de ratón ($n = 4$) se recogieron a distintos días de infección ($d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución $1/20$) y se sometieron a una SDS-PAGE (10%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-ITIH4 (dilución $1/1000$) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución $1/20000$). A) Imagen representativa de cuatro experimentos distintos. B) Unidades relativas de la respuesta de la ITIH4 durante la infección. $** P \leq 0.001$ y $* P \leq 0.05$, diferencias significativas referidas al día 0 analizadas por ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. Las barras verticales corresponden a la DS.

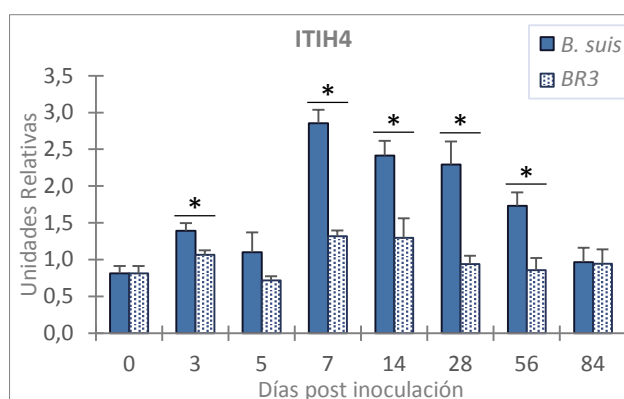


Figura 14. Comparación de la respuesta de la ITIH4 entre la infección por *B. suis* y por *BR3* en los mismos días de infección. $* P \leq 0.05$, diferencias significativas analizadas por la T de Student. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.5. Transferrina

La Tf se cuantificó por el método Western blot y los resultados indicaron que podría tratarse de una proteína de fase aguda positiva en ratón, pero las cantidades de esta proteína en suero fueron muy elevadas para un escáner satisfactorio (Figura 15). A continuación, puesto que el antisuero anti-Tf de ratón funcionó por el método de Ouchterlony, se puso a punto para cuantificar la Tf por el método de Mancini (Figura 16,

A). Tal y como ya se vio por Western blot, la concentración máxima de *B. suis* apareció a los 14 días de infección, alcanzando un valor 1.7 veces superior al del día 0; en el caso de *BR3* la concentración máxima apareció también a los 14 días de infección, pero en este caso la diferencia con respecto al día 0 no resultó significativa (Figura 16, B). Aunque en otros estudios se ha considerado que es una PFA negativa⁴, en la infección por *Brucella* la Tf es una PFA positiva en ratón.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las dos especies de *Brucella* a los mismos días de infección; por lo que la Tf no sirve para diferenciar entre la infección crónica típica de *B. suis* y la infección moderada propia de *BR3* (Figura 17).

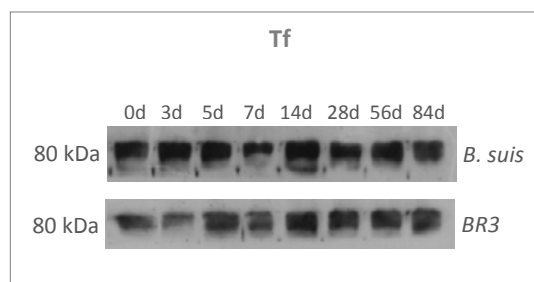


Figura 15. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*.

Los sueros de ratón ($n = 4$) se recogieron a distintos días de infección ($d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución $1/20$) y se sometieron a una SDS-PAGE (12%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-Tf (dilución $1/5000$) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución $1/20000$). Imagen representativa de cuatro experimentos distintos.

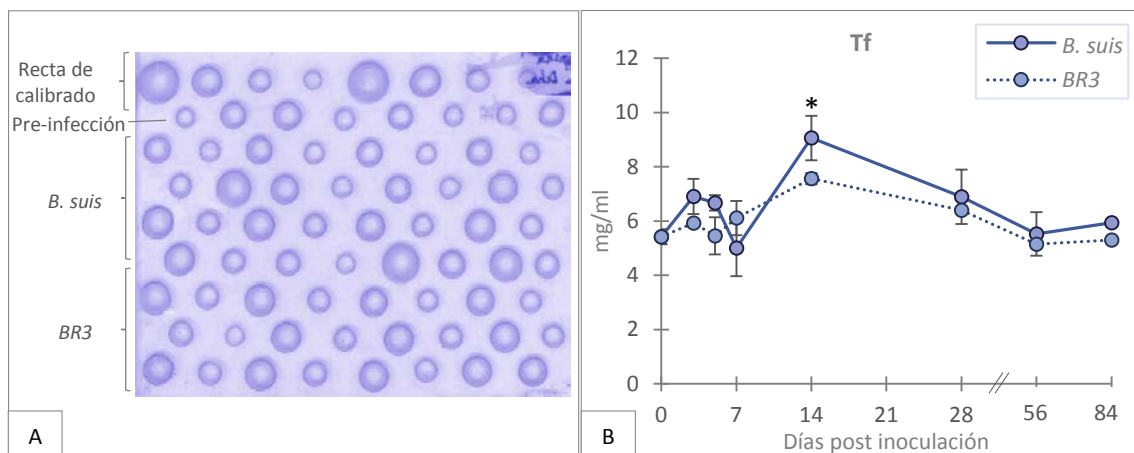


Figura 16. Mancini de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*. Los sueros de ratón ($6 \mu\text{l}$) ($n = 4$) recogidos a distintos días de infección ($0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución $1/40$ y $1/80$) se probaron por Mancini con el antisuero anti-Tf de ratón (dilución 2%). Como recta de calibrado se prepararon diluciones seriadas ($1/20, 1/40, 1/80$ y $1/160$) de Tf pura de ratón (2 mg/ml). A) Imagen representativa de dos experimentos distintos. B) Concentración de la respuesta de la Tf durante la infección. * $P \leq 0.05$, diferencias significativas referidas al día 0 analizadas por ANOVA seguido de la prueba post-hoc Games-Howel. Las barras verticales corresponden a la DS.

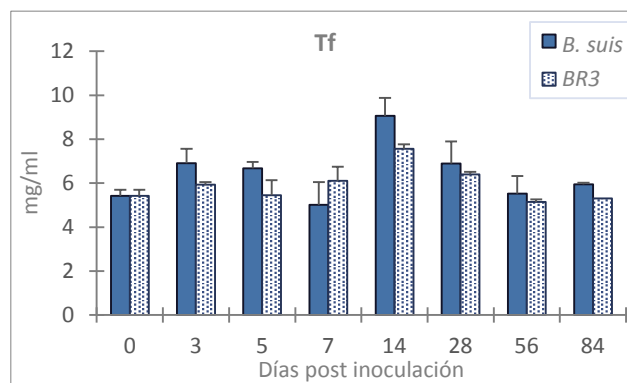


Figura 17. Comparación de la respuesta de la Tf entre la infección por *B. suis* y por BR3. Se compararon los valores de la Tf (mg/ml) determinados por Mancini a los mismos días de infección entre una y otra cepa. No se observaron diferencias significativas por la T de Student. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.6. α_1 -Glicoproteína ácida

La GPA se cuantificó por el método Western blot, y aunque los resultados son provisionales (ya que el antisuero disponible produjo interferencias a la hora de la detección y no se pudo cuantificar un número suficiente de muestras como para hacer el análisis estadístico), podría tratarse de una proteína de fase aguda positiva (Figura 18, A). Se observaron diferencias entre el día 14 tras la inoculación de la bacteria y el día previo a la infección (día 0) para los animales infectados con *B. suis* (Figura 18, B). Esta proteína no pudo detectarse en los animales infectados con BR3. Por lo tanto, parece que, tal y como está descrito en la literatura^{23–26}, en la infección por *Brucella* también es una PFA positiva en ratón.

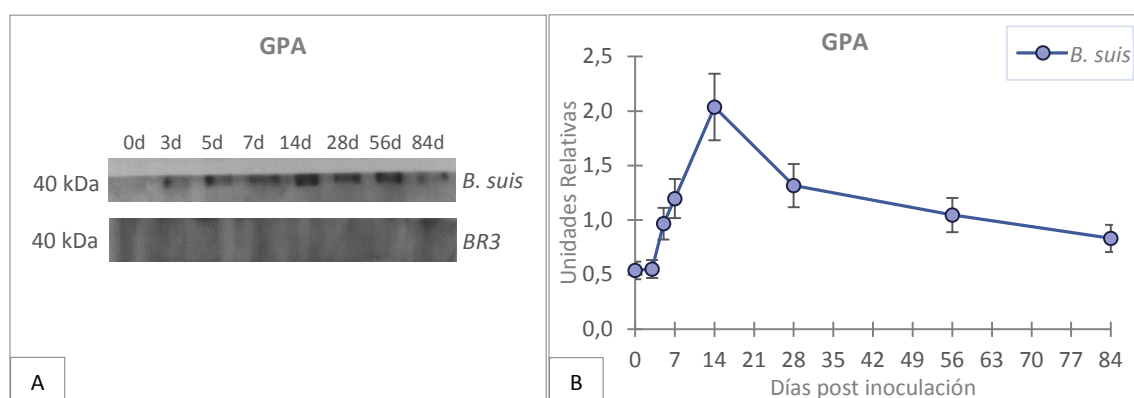


Figura 18. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o BR3. Los sueros de ratón ($n = 4$) se recogieron a distintos días de infección ($d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56$ y 84) (dilución 1/20) y se sometieron a una SDS-PAGE (10%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-GPA (dilución 1/2000) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución 1/20000). A) Imagen representativa de cuatro experimentos distintos. B) Unidades relativas de la respuesta de la GPA durante la infección. Las barras verticales corresponden a la DS.

Para confirmar estos resultados se intentó cuantificar por ELISA y se probaron dos kits comerciales que no funcionaron (YHbiosearch, China; y Elabsscience, China). No se consiguió encontrar un kit ELISA para la GPA de ratón de confianza en el tiempo de este estudio.

4.4.7. Haptoglobina

En primer lugar la Hp se cuantificó por el método Western blot y los resultados indicaron que se trata de una proteína de fase aguda positiva en ratón. Se observaron diferencias entre algunos de los tiempos de infección tras la inoculación de la bacteria y el día previo a la infección (día 0) tanto para los animales infectados con *B. suis* (días 7, 14 y 28) como con *BR3* (día 14) (Figura 19). A continuación, se procedió a cuantificar la Hp por ELISA. Los resultados indicaron, tal como ya se vio por Western blot, que la concentración máxima de *B. suis* apareció a los 14 días de infección (0.6 mg/ml), al igual que con *BR3* (0.045 mg/ml); aunque en este último caso el aumento fue muy pequeño, pero significativo en comparación al día 0 (Figura 20, A y B). Por lo tanto, tal como está descrito en la literatura²³⁻²⁸, en este tipo de infección la Hp también es una PFA positiva en ratón. Además, los valores de concentración de la Hp en suero durante la RFA indicados por otros autores (0.3-2.2 mg/ml)²³⁻²⁸ coinciden con los vistos en este trabajo. Por otro lado, pudo comprobarse que las notables diferencias entre las dos especies de *Brucella* a los mismos tiempos de infección fueron estadísticamente significativas para los días 7, 14, 28 y 56; por lo que la Hp podría servir para diferenciar la infección crónica típica de *B. suis* de la infección moderada propia de *BR3* (Figura 21).

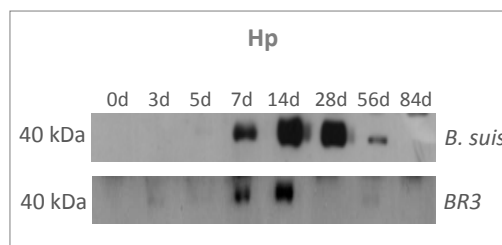


Figura 19. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. suis* o *BR3*.

Los sueros de ratón (n = 4) se recogieron a distintos días de infección (d = 0, 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84) (dilución 1/20) y se sometieron a una SDS-PAGE (12%) seguida de transferencia a membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-Hp (dilución 1/1000) seguido de un anticuerpo secundario IgG conjugado con PO (dilución 1/20000). Imagen representativa de cuatro experimentos distintos.

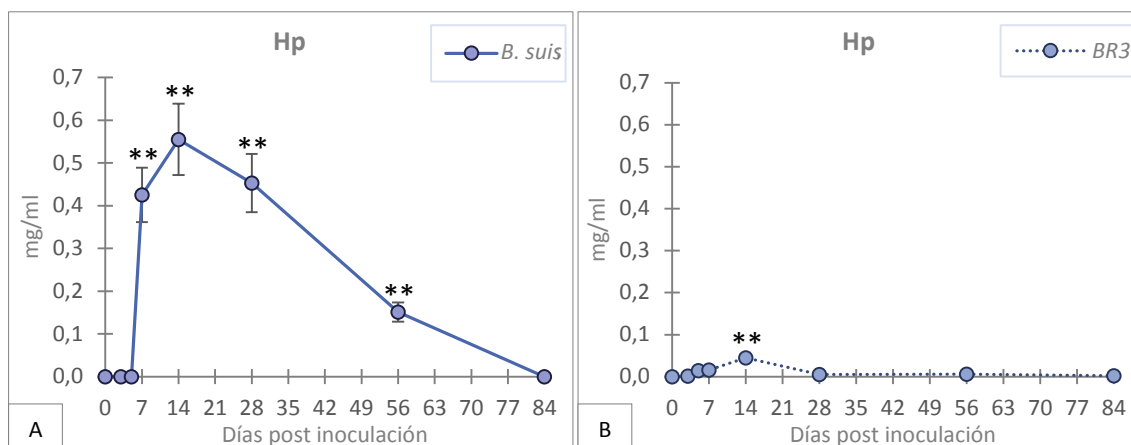


Figura 20. Evaluación temporal de la respuesta de la Hp en sueros de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. suis* o *BR3*. La concentración de la Hp (mg/ml) en los sueros de ratón (n = 4) se determinó por ELISA tal como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. A) Concentración de la respuesta de la Hp durante la infección con *B. suis*. B) Concentración de la respuesta de la Hp durante la infección con *BR3*. ** $P \leq 0.001$, diferencias significativas referidas al día 0 analizadas por ANOVA seguido de la prueba post-hoc Games-Howel. Las barras verticales corresponden a la DS.

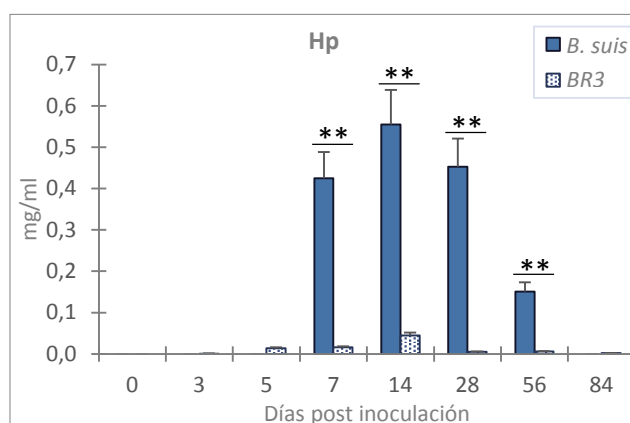


Figura 21. Comparación de la respuesta de la Hp entre la infección por *B. suis* y por *BR3*. Se compararon los valores de la Hp (mg/ml) determinados por ELISA a los mismos días de infección entre una y otra cepa. ** $P \leq 0.001$, diferencias significativas entre *B. suis* y *BR3* analizadas por la T de Student. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.8. Hemopexina

La Hx se cuantificó por ELISA y los resultados indicaron que se trata de una proteína de fase aguda positiva en ratón. Se observaron diferencias entre algunos de los tiempos de infección tras la inoculación de la bacteria y el día previo a la infección (día 0) tanto para los animales infectados con *B. suis* (días 5, 7, 14, 28, 56 y 84) como con *BR3* (días 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84). En el caso de *B. suis* la concentración máxima apareció a los 14 días de infección (5.2 mg/ml) y en el caso de *BR3* también (2.6 mg/ml); y aunque en este último el aumento con respecto al día 0 (0.85 mg/ml) fue menor, las diferencias resultaron

significativas en ambos casos (Figura 22, A y B). Por lo tanto, tal y como ya se ha visto en otros estudios^{25,26,44}, en la infección por *Brucella* la Hx también es una PFA positiva en ratón. Además los aumentos de concentración de la Hx en suero durante la RFA indicados por otros autores (2-4X)^{25,26} coinciden con los vistos en este trabajo.

Por otro lado, pudo comprobarse que las notables diferencias entre las dos especies de *Brucella* a los mismos tiempos de infección fueron estadísticamente significativas para los días 7, 14, 28, 56 y 84; por lo que la Hx podría servir para diferenciar la infección crónica típica de *B. suis* de la infección moderada propia de *BR3* (Figura 23).

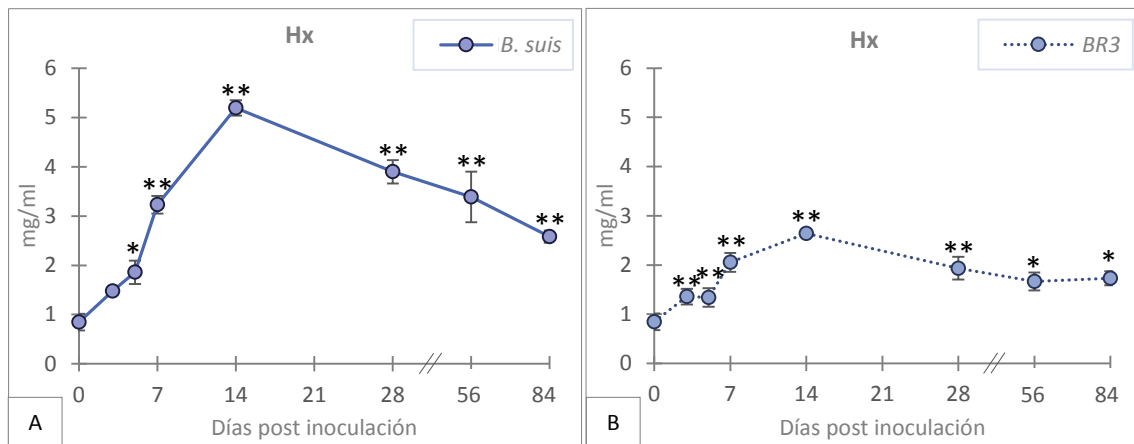


Figura 22. Evaluación temporal de la respuesta de la Hx en sueros de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. suis* o *BR3*. La concentración de la Hx (mg/ml) en los sueros de ratón (n = 4) se determinó por ELISA tal como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. A) Concentración de la respuesta de la Hx durante la infección con *B. suis*. B) Concentración de la respuesta de la Hx durante la infección con *BR3*. ** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$, diferencias significativas referidas al día 0 analizadas por ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett. Las barras verticales corresponden a la DS.

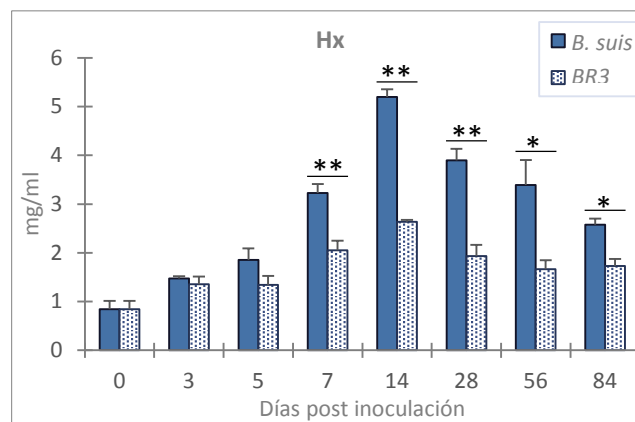


Figura 23. Comparación de la respuesta de la Hx entre la infección por *B. suis* y por *BR3*. Se compararon los valores de la Hx (mg/ml) determinados por ELISA a los mismos días de infección entre una y otra cepa. ** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$, diferencias significativas entre *B. suis* y *BR3* analizadas por la T de Student. Las barras verticales corresponden a la DS.

4.4.9. Amiloide A sérico

El SAA se cuantificó por ELISA y los resultados indicaron que se trata de una proteína de fase aguda positiva en ratón. Se observaron diferencias entre algunos de los tiempos de infección tras la inoculación de la bacteria y el día previo a la infección (día 0) tanto para los animales infectados con *B. suis* como con *BR3* (días 3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84 para ambas cepas). En el caso de *B. suis* la concentración máxima apareció a los 7 días de infección (0.55 mg/ml) y en el caso de *BR3* también (0.28 mg/ml); y aunque en este último el aumento con respecto al día 0 (0.04 mg/ml), las diferencias resultaron significativas en ambos casos 0 (Figura 24, A y B). Por lo tanto, tal y como está descrito en la literatura^{23,26,28,31,45}, en la infección por *Brucella* el SAA también es una PFA positiva en ratón. Además, los valores de concentración del SAA en suero durante la RFA indicados por otros autores (0.08 - 1 mg/ml)^{23,26,28,31} coinciden con los vistos en este trabajo.

Por otro lado, pudo comprobarse que las diferencias observadas entre las dos especies de *Brucella* a los mismos tiempos de infección fueron estadísticamente significativas para el día 7; por lo que el SAA podría servir para diferenciar la infección crónica típica de *B. suis* de la infección moderada propia de *BR3* a tiempos cortos (Figura 25).

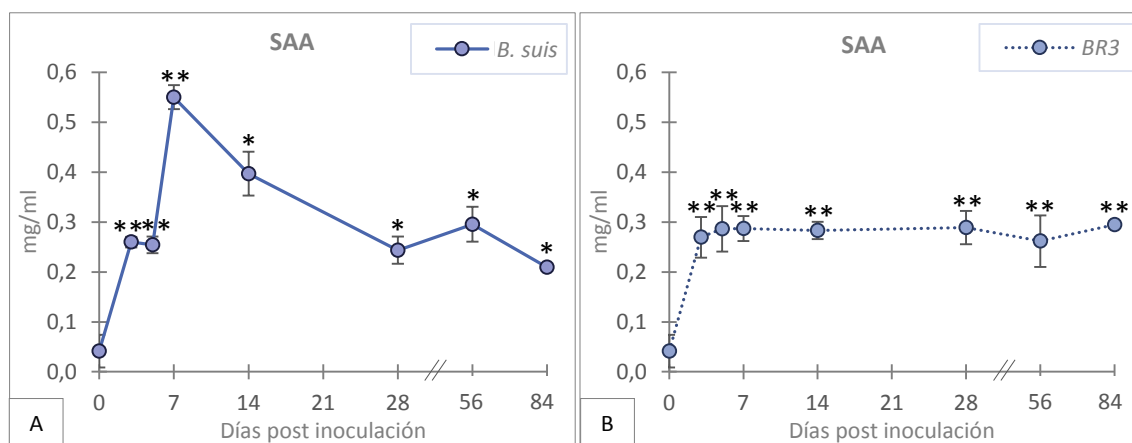


Figura 24. Evaluación temporal de la respuesta del SAA en sueros de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. suis* o *BR3*. La concentración del SAA (mg/ml) en los sueros de ratón (n = 4) se determinó por ELISA tal como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. A) Concentración de la respuesta del SAA durante la infección con *B. suis*. B) Concentración de la respuesta del SAA durante la infección con *BR3*. ** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$, diferencias significativas referidas al día 0 analizadas por ANOVA seguido de la prueba post-hoc Dunnett (cepa *B. suis*) o Games-Howel (cepa *BR3*). Las barras verticales corresponden a la DS.

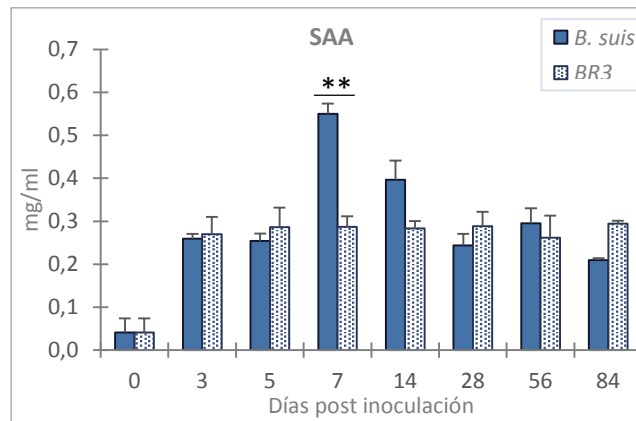


Figura 25. Comparación de la respuesta del SAA entre la infección por *B. suis* y por *BR3*. Se compararon los valores del SAA (mg/ml) determinados por ELISA a los mismos días de infección entre una y otra cepa. ** $P \leq 0.001$, diferencias significativas entre *B. suis* y *BR3* analizadas por la T de Student. Las barras verticales corresponden a la DS.

Las PFA más relevantes en la infección de *Brucella* en ratón han sido la Hp, la Hx, el SAA, la ITIH4 y la GPA, lo que coincide con los estudios de otros autores^{23–28,31,45,46}. Tanto en *B. suis* como en *BR3* el pico máximo de PFA se alcanza a los mismos tiempos de infección y varía según la PFA estudiada. La mayor diferencia entre las dos infecciones se refleja en el incremento de la cantidad de las PFA, siendo mucho mayor para *B. suis* que para *BR3*. Esta mayor respuesta se correlaciona con la agresividad de la infección.

4.5. Determinación de anticuerpos contra el LPS de *B. abortus*

La respuesta de las Igs totales y de la IgG3 contra el LPS de *B. abortus* fue paralela, comenzó a ser evidente en el día 28 post-infección y se incrementó progresivamente hasta el final del experimento en la infección con *B. suis* (Figura 26, A y B). En la infección con *BR3* no hubo respuesta de inmunoglobulinas (ni totales ni de IgG3). Esta última cepa ha sido recientemente caracterizada como rugosa en el CITA (Dra. M^a Pilar Jiménez de Bagüés, comunicación personal) por lo que la carencia de respuesta de las inmunoglobulinas frente al LPS puede ser debida a la deficiencia del polisacárido O del LPS o a que no hay reactividad cruzada con el LPS de *B. abortus*.

Uno de los problemas en el diagnóstico diferencial entre animales vacunados e infectados es que en ambas se producen inmunoglobulinas contra el LPS, que es el test diagnóstico habitual. La posible utilización de la cepa *BR3* como vacuna tendría la

ventaja de poder diferenciarse de los animales infectados, lo que no es posible con las vacunas disponibles en la actualidad.

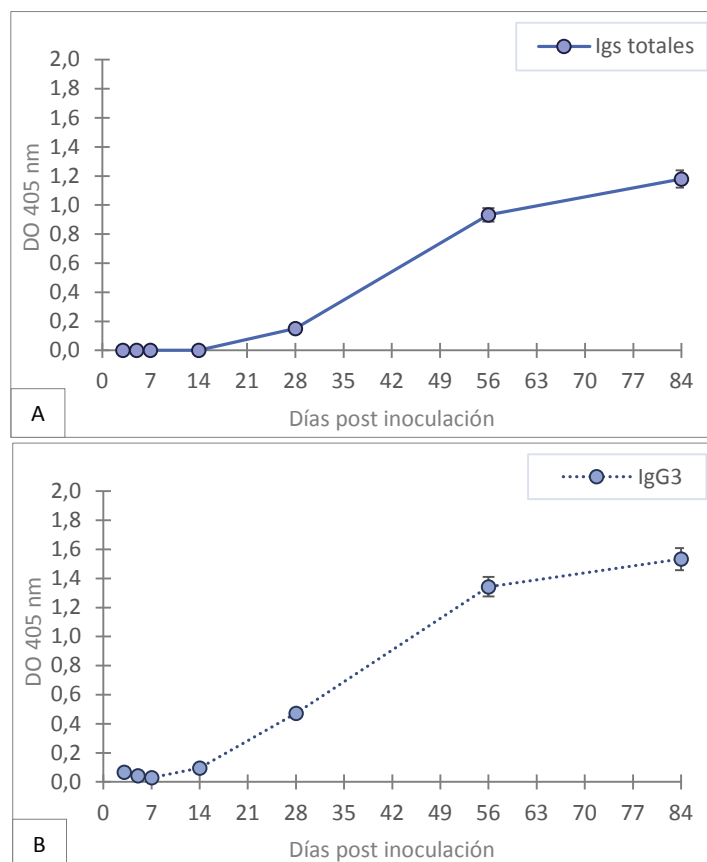


Figura 26. Título de anticuerpos contra el LPS de *B. abortus*. Se determinaron por ELISA las Igs totales y la IgG3 en sueros de ratón ($n = 4$) (dilución 1/50) a distintos días de infección (3, 5, 7, 14, 28, 56 y 84) por *B. suis*. A) Evolución del título de Igs totales para la infección con *B. suis*. B) Evolución del título de IgG3 para la infección con *B. suis*. Las barras verticales corresponden a la DS.

5. Conclusiones

1. Las infecciones realizadas con *B. suis* y *BR3* pueden considerarse como crónicas, ya que los ratones no consiguen eliminar las bacterias en el periodo de tiempo estudiado (3 meses).
2. El tipo de infección se refleja en la evolución de las UFC, cuyo máximo se alcanza a los 7 días en bazo con ambas cepas, aunque el aumento causado por *BR3* es mucho menor.
3. En el hígado, *B. suis* comienza a desaparecer a partir del día 7, mientras que *BR3* lo hace a partir del día 3, llegando casi a desaparecer.
4. El tipo de infección también se refleja en la evolución del peso del hígado y, sobre todo, del bazo, que alcanza su máximo a los 14 días en ambas cepas, pero el aumento causado por *BR3* (cepa de menor virulencia) es mucho más moderado.
5. Se han estudiado sueros de ratones normales e infectados con *B. suis* y *BR3* mediante técnicas electroforéticas e inmunoquímicas, obteniendo como resultados más significativos un destacado aumento en la Hp, la Hx, el SAA, la ITIH4 y la GPA durante la respuesta de fase aguda.
6. La evolución de la concentración de estas PFA es similar en las dos infecciones, alcanzándose el pico máximo en el día 7 para el SAA y la ITIH4, y en el día 14 para la Hp, la Hx y la GPA.
7. Los valores de concentración de las PFA también permiten distinguir el tipo de infección. Así pues, los picos máximos de concentración de las PFA fueron mayores con *B. suis* en comparación a *BR3*, siendo el aumento de 10 veces para la Hp y de 2 veces para la Hx, el SAA y la ITIH4, aproximadamente. La GPA no se pudo detectar en *BR3* con las técnicas empleadas.
8. La infección con *B. suis* produjo un aumento de la Tf de 1.7 veces el día 14 post-infección, pero este aumento no fue significativo para la infección con *BR3*.
9. La concentración de ApoA1 no varió en ninguna de las dos infecciones, por tanto, en este contexto no se puede considerar PFA, ni negativa ni positiva. Tampoco se produjo una variación en las concentraciones de la CRP y del ICP.
10. La concentración de proteína total en suero tiene tendencia a disminuir en los días 3 a 56 para la infección con *BR3* y en los días 7 a 14 para la infección con *B. suis*, aunque esta variación no resultó ser significativa.
11. Se detectó la respuesta de Igs totales y de IgG3 contra el LPS de *B. abortus* a partir del día 28 post-infección por *B. suis*.

5. Conclusions

1. *B. suis* and BR3 infections can be considered chronic by the fact that infected mice fail to eliminate bacteria in the studied period (3 months).
2. The type of infection is reflected in the CFU evolution, whose maximum is reached in the spleen after 7 days with both strains, although the increase caused by BR3 is much lower.
3. In the liver, *B. suis* starts disappearing from day 7, while BR3 does it from day 3, till it is very close to became disappeared.
4. The type of infection is also reflected in the liver weight evolution and, specially, in the spleen weight evolution, whose maximum value is reached on day 14th in both strains, but the increase produced by BR3 (the least virulent strain) is much more moderate.
5. They have been studied sera from normal mice and *B. suis* and BR3 infected mice by electrophoretic and immunochemical techniques, getting as more significant results an important increase in Hp, Hx, SAA, ITIH4 and GPA during acute phase response.
6. The evolution of the concentration of these APP is similar in both infections, with the maximum peak on day 7th for SAA and ITIH4, and on day 14th for Hp, Hx and GPA.
7. The APP concentration values are also useful whenever having to distinguish the type of infection. Thus, the maximum peak of APP concentrations values were higher for *B. suis* than for BR3, being increased 10 times for Hp and 2 times for Hx, SAA and ITIH4, approximately. GPA could not be detected in BR3 with the used techniques.
8. For *B. suis*, Tf increased 1.7 times on day 14th post-infection, but this increase was not significant for BR3 infection.
9. ApoA1 concentration did not change in none of the infections, therefore, in this context it cannot be considered a positive or negative APP. CRP and ICP concentrations neither suffered a change.
10. The concentration of total sera protein has a tendency to decrease from day 3 till 56 for BR3 infection and from day 7 till 14 for *B. suis* infection, although this change was not significant.
11. It has been detected the response of total Igs and IgG3 against the LPS of *B. abortus* from the day 28 post-infection by *B. suis*.

7. Bibliografía

1. Kushner, I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**, 39–48 (1982).
2. Gabay, C. & Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* **340**, 448–454 (1999).
3. Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* **35**, 163–187 (2004).
4. Cray, C., Zaia, J. & Altman, N. H. Acute phase response in animals: A review. *Comp. Med.* **59**, 517–526 (2009).
5. Cecilian, F., Giordano, A. & Spagnolo, V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept. Lett.* **9**, 211–223 (2002).
6. Dinarello, C. A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N. Engl. J. Med.* **311**, 1413–1418 (1984).
7. Heinrich, P. & Castell, J. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **2**, (1990).
8. Baumann, H. & Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol. Today* **15**, 74–80 (1994).
9. Koj, A. Cytokines regulating acute inflammation and synthesis of acute phase proteins. *Blut* **51**, 267–74 (1985).
10. Verheijden, J. H., van Miert, A. S., Schotman, A. J. & van Duin, C. T. Plasma zinc and iron concentrations as measurements for evaluating the influence of endotoxin-neutralizing agents in Escherichia coli endotoxin-induced mastitis. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 724–8 (1982).
11. Shenkin, A. Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support. *Nutrition* **11**, 100–5
12. Filteau, S. M. Vitamin A and the acute-phase response. *Nutrition* **15**, 326–8 (1999).
13. Khovidhunkit, W. *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* **45**, 1169–96 (2004).
14. Mackiewicz, A. Acute phase proteins and transformed cells. *Int. Rev. Cytol.* **170**, 225–300 (1997).
15. Rot, A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* **13**, 291–4 (1992).
16. Johnson, R. W., Curtis, S. E., Dantzer, R. & Kelley, K. W. Central and peripheral prostaglandins are involved in sickness behavior in birds. *Physiol. Behav.* **53**, 127–31 (1993).

17. Johnson, R. W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *J. Anim. Sci.* **75**, 1244–55 (1997).
18. Biddle, C. The neurobiology of the human febrile response. *AANA J.* **74**, 145–50 (2006).
19. Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* **233**, 652–4 (1986).
20. Andus, T. *et al.* The biosynthesis of acute-phase proteins in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **133**, 561–71 (1983).
21. Baumann, H., Jahreis, G. P. & Gaines, K. C. Synthesis and regulation of acute phase plasma proteins in primary cultures of mouse hepatocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 866–76 (1983).
22. Koj, A. *Structure and Function of Plasma Proteins. Acute phase reactants. Their synthesis, turnover, and biological significance.* (1974).
23. Abdinasir, Y. O. *et al.* Acute Phase Response in Mice Experimentally Infected with Whole Cell and Exotoxin (PLD) Extracted from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *J. Anim. Vet. Adv.* **11 (21): 4**, (2012).
24. Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339–342 (1994).
25. Wait, R. *et al.* Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes. *Proteomics* **5**, 4245–53 (2005).
26. Gianazza, E., Vegeto, E., Eberini, I., Sensi, C. & Miller, I. Neglected markers: altered serum proteome in murine models of disease. *Proteomics* **12**, 691–707 (2012).
27. Ngure, R. M. *et al.* Major acute phase response of haptoglobin and serum amyloid-P following experimental infection of mice with *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Int.* **46**, 247–254 (1997).
28. Lamason, R. *et al.* Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol.* **7**, 2 (2006).
29. Eckersall, P. D. *et al.* Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice. *Parasitol. Int.* **50**, 15–26 (2001).
30. Ishiguro, T., Imanishi, K. & Suzuki, I. Hemopexin levels in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **6**, 241–4 (1984).
31. Fattori, E. *et al.* Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1243–50 (1994).

32. Devillers-Thiery, A., Kindt, T., Scheele, G. & Blobel, G. Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 5016–20 (1975).
33. Jamieson, J. Glycosilation and migration of membrane and secretory proteins. Plasma protein secretion by the liver. *T.P.H. Glaumann, C.R. New York Acad. Press* 257–284 (1983).
34. Lampreave, F. *et al.* Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* **15**, 672–6 (1994).
35. Belaiba, R. *et al.* Blood binding and tissue transfer of drugs: the influence of alpha 1 acid glycoprotein binding. *Prog. Clin. Biol. Res.* **300**, 287–305 (1989).
36. Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 157–71 (2000).
37. Okumura, Y. *et al.* Influence of acute-phase proteins on the activity of natural killer cells. *Inflammation* **9**, 211–9 (1985).
38. Jayasinghe, J. D. H. E., Elvitigala, D. A. S., Whang, I., Nam, B.-H. & Lee, J. Molecular characterization of two immunity-related acute-phase proteins: Haptoglobin and serum amyloid A from black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Fish Shellfish Immunol.* (2015). doi:10.1016/j.fsi.2015.05.020
39. Bowman, B. H., Barnett, D. R., Lum, J. B. & Yang, F. Haptoglobin. *Methods Enzymol.* **163**, 452–74 (1988).
40. Javid, J. & Liang, J. C. The hemoglobin-haptoglobin bond. I. Dissociation of the complex and recovery of the native haptoglobin in an affinity chromatography system. *J. Lab. Clin. Med.* **82**, 991–1002 (1973).
41. Köhler, W. & Prokop, O. Relationship between haptoglobin and Streptococcus pyogenes T4 antigens. *Nature* **271**, 373 (1978).
42. Oh, S. K., Pavlotsky, N. & Tauber, A. I. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 142–8 (1990).
43. Fröhlander, N., Ljunggren, O. & Lerner, U. H. Haptoglobin synergistically potentiates bradykinin and thrombin induced prostaglandin biosynthesis in isolated osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 343–51 (1991).
44. Tolosano, E. *et al.* Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis. *Blood* **100**, 4201–8 (2002).
45. Gorevic, P. D., Levo, Y., Frangione, B. & Franklin, E. C. Polymorphism of tissue and serum amyloid A (AA and SAA) proteins in the mouse. *J. Immunol.* **121**, 138–40 (1978).

46. Artl, A., Marsche, G., Lestavel, S., Sattler, W. & Malle, E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 763–72 (2000).
47. Kisilevsky, R. & Subrahmanyam, L. Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function. *Lab. Invest.* **66**, 778–85 (1992).
48. Shainkin-Kestenbaum, R. *et al.* Acute phase protein, serum amyloid A, inhibits IL-1- and TNF-induced fever and hypothalamic PGE2 in mice. *Scand. J. Immunol.* **34**, 179–83 (1991).
49. Steel, D. M. & Whitehead, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* **15**, 81–88 (1994).
50. Grebe, M., Pröckrock, D., Kakuschke, A., Broekaert, J. A. C. & Prange, A. Metallomics approach for the identification of the iron transport protein transferrin in the blood of harbour seals (*Phoca vitulina*). *Metallomics* **2**, 683–93 (2010).
51. Law, J. H. Insects, oxygen, and iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1191–5 (2002).
52. Duan, X., Yarmush, D., Berthiaume, F., Jayaraman, A. & Yarmush, M. L. Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins. *Proteomics* **5**, 3991–4000 (2005).
53. González-Ramón, N. *et al.* The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Lett.* **371**, 227–30 (1995).
54. Himmelfarb, M. *et al.* ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett.* **204**, 69–77 (2004).
55. Salier, J. P., Rouet, P., Raguenez, G. & Daveau, M. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem. J.* **315** (Pt 1, 1–9 (1996).
56. Saguchi, K. *et al.* Cloning and characterization of cDNA for inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP), a novel human plasma glycoprotein. *J. Biochem.* **117**, 14–8 (1995).
57. Cabana, V. G., Lukens, J. R., Rice, K. S., Hawkins, T. J. & Getz, G. S. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J. Lipid Res.* **37**, 2662–74 (1996).
58. Cubedo, J., Padró, T. & Badimon, L. Glycoproteome of human apolipoprotein A-I: N- and O-glycosylated forms are increased in patients with acute myocardial infarction. *Transl. Res.* **164**, 209–22 (2014).
59. Wang, M. & Briggs, M. R. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem. Rev.* **104**, 119–37 (2004).

60. Kawai, C. Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall. *Circulation* **90**, 1033–43 (1994).
61. Andersson, L. O. Pharmacology of apolipoprotein A-I. *Curr. Opin. Lipidol.* **8**, 225–8 (1997).
62. Burger, D. & Dayer, J.-M. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun. Rev.* **1**, 111–7 (2002).
63. Barter, P. J. *et al.* Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res.* **95**, 764–72 (2004).
64. Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Lefterova, M. I. & Lazo, J. S. Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* **40**, 3553–60 (2001).
65. Esnard, F. & Gauthier, F. Rat alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. An acute phase reactant identical with alpha 1 acute phase globulin. *J. Biol. Chem.* **258**, 12443–7 (1983).
66. Abernethy, T. J. & Avery, O. T. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood: I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of *Pneumococcus*. *J. Exp. Med.* **73**, 173–82 (1941).
67. Pepys, M. B. & Baltz, M. L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.* **34**, 141–212 (1983).
68. De Beer, F. C. *et al.* Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat. *Immunology* **45**, 55–70 (1982).
69. Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B. & Du Clos, T. W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R. *J. Immunol.* **169**, 7019–25 (2002).
70. Du Clos, T. W. & Mold, C. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**, 289–93 (2001).
71. Kushner, I. The acute phase response: an overview. *Methods Enzymol.* **163**, 373–83 (1988).
72. Schreiber, G. *et al.* The acute phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation. *J. Biol. Chem.* **257**, 10271–7 (1982).
73. Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 143–56 (1997).
74. Baumann, H., Jahreis, G. P., Sauder, D. N. & Koj, A. Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. *J. Biol. Chem.* **259**, 7331–42 (1984).

75. Baumann, H., Onorato, V., Gauldie, J. & Jahreis, G. P. Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 9756–68 (1987).
76. Geiger, T. *et al.* Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* **18**, 717–21 (1988).
77. Jiang, S. L. *et al.* Kinetic modeling and mathematical analysis indicate that acute phase gene expression in Hep 3B cells is regulated by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J. Clin. Invest.* **95**, 1253–61 (1995).
78. Van Dijk, W. & Mackiewicz, A. Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **762**, 319–30 (1995).
79. Koj, A. Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen. Pharmacol.* **31**, 9–18 (1998).
80. He, Y. Analyses of Brucella pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 2 (2012).
81. Eisenberg, T. *et al.* Isolation of potentially novel Brucella spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3753–5 (2012).
82. Jiménez de Bagüés, M. P. *et al.* The new strains Brucella inopinata BO1 and Brucella species 83-210 behave biologically like classic infectious Brucella species and cause death in murine models of infection. *J. Infect. Dis.* **210**, 467–72 (2014).
83. Olsen, S. C. & Palmer, M. V. Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. *Vet. Pathol.* **51**, 1076–89 (2014).
84. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
85. Sigma-Aldrich. Technical bulletin: Bradford Reagent B6916. 3–8 (2013). at <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>> [10/02/1015]
86. Ouchterlony, O. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **25**, 186–91 (1948).
87. Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235–54 (1965).
88. Nymo, I. H. *et al.* A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-Brucella antibodies in Arctic wildlife. *J. Vet. Diagn. Invest.* **25**, 369–75 (2013).
89. González-Ramón, N. *et al.* Pig MAP/ITI4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1878–85 (2000).