



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Expresión diferencial de mediadores de inflamación en infección experimental con *Brucella*.

Trabajo Fin de Grado

Elisa Vivas Endolz

Grado en Biotecnología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias

Septiembre 2018

Dña. María Iturralde Navarro, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la Memoria del Trabajo Fin de Grado titulada "Expresión génica diferencial de proteínas de fase aguda en ratones infectados con *Brucella melitensis*" presentada por Dña. Elisa Vivas Endolz ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de esta Universidad bajo mi dirección y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autora como Trabajo Fin de Grado.

Zaragoza, 11 Septiembre de 2018

Fdo. María Iturralde Navarro

Agradecimientos

En primer lugar quiero mostrar mi agradecimiento a la Universidad de Zaragoza por darme la oportunidad de hacer este Trabajo de Fin de Grado, que culmina mi formación en el Grado de Biotecnología.

Quiero darle las gracias a mi tutora María Iturralde, por su ayuda y sobre todo su paciencia, a pesar de las dificultades que he mostrado a lo largo de la elaboración de este trabajo. Así como a Leo Conde por su ayuda y dedicación, guiándome en cada paso y método utilizado.

Gracias también a mi familia por entenderme y aguantarme, no solo este último año sino durante toda la carrera, incluso antes de comenzar.

A mis amigos, tanto de Zaragoza como de Teruel, por el apoyo y la ayuda recibida, siempre estando cerca y dispuestos a todo.

Por último agradecer a todas aquellas personas que se han cruzado en mi camino a lo largo de la carrera y me han ayudado a crecer como persona.

Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que supone grandes pérdidas económicas en el sector ganadero, así como numerosos casos en la población humana. Esta bacteria afecta a casi todas las especies animales de granja y se transmite muy fácilmente al hombre, además no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, por lo que es necesario desarrollar una mejor profilaxis animal que ayude a su erradicación. En los últimos años se han descrito nuevas especies de *Brucella* en distintos huéspedes, pero se trata de *Brucella melitensis* la que se considera principal causa de la brucelosis humana.

El problema radica en la vacunación animal, basada en bacterias vivas atenuadas, puesto que los métodos serológicos no permiten diferenciar los animales vacunados de los infectados porque desarrollan los mismos anticuerpos al estar ambos expuestos al mismo antígeno que el usado en el diagnóstico. Este es el lipopolisacárido de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*. Resulta un problema en el caso de infección ya que mediante serología no es posible distinguir animales vacunados de los infectados.

Las proteínas de fase aguda aumentan o disminuyen en respuesta a situaciones que representan una amenaza para el organismo (daño tisular, infección...) y que alteran los mecanismos homeostáticos, provocando lo que se conoce como respuesta de fase aguda. En este trabajo se ha estudiado la expresión génica de las proteínas de fase aguda en ratones que han sido infectados con *B. melitensis*. El interés de estudiar estas proteínas radica en que alguna de ellas podría ser un biomarcador capaz de identificar individuos infectados y al mismo tiempo diferenciarlos de los que no están infectados o de los que han sido vacunados.

Con el objetivo de estudiar lo que ocurre en los tejidos, se ha cuantificado la expresión génica para ver la síntesis de PFAs tanto en hígado como en bazo. El hígado es el órgano principal de síntesis de estas proteínas, mientras que la contribución del bazo está poco estudiada. Han sido cuatro proteínas de fase aguda, haptoglobina (HPT), hemopexina (HPX), α 1 glicoproteína ácida (AGP) y proteína amiloide A sérica (SAA), en tres modelos experimentales de ratón. Estos modelos han sido: infección con *B. melitensis* 16M intraperitoneal, vacunación con Rev-1 intraperitoneal y vacunación con Rev-1 subcutánea.

Los resultados de la cuantificación de mRNA se han relacionado con la concentración sérica de las proteínas. Se observó que los niveles de expresión en hígado fueron mayores que los séricos, y que el bazo solo contribuyó a la síntesis de la proteína SAA.

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease that involves great economic losses in the livestock sector, as well as numerous cases in the human population. This bacterium affects almost all farm animal species and is transmitted very easily to humans, besides it does not present a characteristic clinical picture that allows an early detection of the infected, so it is necessary to develop a better animal prophylaxis that helps its eradication. In recent years, new Brucella species have been described in different hosts, but it is Brucella melitensis which is considered the main cause of human brucellosis.

The problem lies in animal vaccination, based on live attenuated bacteria, since serological methods do not allow to differentiate vaccinated animals from infected ones because they develop the same antibodies when both are exposed to the same antigen as used in the diagnosis. This is the lipopolysaccharide of the outer membrane of the Brucella cell wall. It is a problem in the case of infection since it is not possible to distinguish vaccinated animals from those infected through serology.

The acute phase proteins increase or decrease in response to situations that represent a threat to the organism (tissue damage, infection...) and that alter the homeostatic mechanisms, causing what is known as acute phase response. In this work we have studied the gene expression of acute phase proteins in mice that have been infected with B. melitensis. The interest of studying these proteins lies in the fact that some of them could be a biomarker able to identify infected individuals and at the same time differentiate them from those that are not infected or from which they have been vaccinated.

In order to study what happens in tissues, gene expression has been quantified to see the synthesis of PFAs in both liver and spleen. The liver is the main organ of synthesis of these proteins, while the contribution of the spleen is little studied. There have been four acute phase proteins, haptoglobin (HPT), hemopexin (HPX), acid glycoprotein α 1 (AGP) and serum amyloid A protein (SAA), in three experimental mouse models. These models have been: infection with intraperitoneal 16M B. melitensis, vaccination with intraperitoneal Rev-1 and vaccination with subcutaneous Rev-1.

The results of mRNA quantification have been related to the serum concentration of the proteins. It was observed that the expression levels in the liver were higher than the serum levels, and that the spleen only contributed to the synthesis of the SAA protein.

Abreviaturas

- AGP:** α 1-Glicoproteína ácida (α 1-glycoprotein acid).
- ApoA1:** Apolipoproteína A1 (Apolipoprotein A1).
- 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).
- FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast growth factor).
- G:** Fuerza G (G-force).
- Hb:** Hemoglobina (Hemoglobin).
- HPT:** Haptoglobina (Haptoglobin).
- HPX:** Hemopexina (Hemopexin).
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad (High density lipoproteins).
- HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatic growth factor).
- IL-1:** Interleuquina-1 (Interleukin-1).
- IL-6:** Interleuquina-6 (Interleukin-6).
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (Low density lipoproteins).
- LPS:** Lipopolisacárido (Lipopolysaccharide).
- PBS:** Tampón fosfato salino (Phosphate buffer saline).
- PEG:** Polietilenglicol (*Polyethyleneglicol*).
- PFA/APP:** Proteína/s de fase aguda (Acute phase protein/s).
- PGE2:** Prostaglandina E2 (Prostaglandin E2).
- 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 poliacrilamida con SDS (SDS polyacrylamide gel electrophoresis).
- TGF- β :** Factor de crecimiento transformante β (Transforming growth factor- β).
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α (Tumor necrosis factor- α).
- UFC/CFU:** Unidades formadoras de colonias (Colony-forming units).

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Brucelosis.....	8
1.1.1 <i>Brucella melitensis</i>	9
1.1.1 Vacunas contra la brucelosis.....	9
1.2 Respuesta de fase aguda	9
1.2.1 Proteínas de fase aguda	11
1.2.2 Síntesis de proteínas de fase aguda	12
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Material biológico	15
3.1.1 Infección experimental.....	15
3.2 Expresión génica de APPs en hígado y bazo.....	15
3.2.1 Extracción de RNA total.....	15
3.2.2 Retrotranscripción.....	16
3.2.3 PCR cuantitativa a tiempo real.....	17
3.2.4 Diseño de primers	18
3.3 Western-Blot.....	18
3.3.1 Cuantificación por Bradford	19
3.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	19
3.3.3 Transferencia.....	20
3.3.4 Inmunodetección	21
3.3.5 Revelado.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Extracción y cuantificación de RNA	22
4.2 Expresión génica de proteínas de fase aguda	23
4.2.1 Expresión en hígado	23
4.2.1.1 Amiloide A sérico.....	23
4.2.1.2 α 1 Glicoproteína ácida	24
4.2.1.3 Haptoglobina	25

4.2.1.4 Hemopexina	25
4.2.2 Expresión en bazo	26
4.3 Western-Blot.....	27
4.4.1 Haptglobina	27
4.4.2 α 1 Glicoproteína ácida	28
4.4.3 Hemopexina	28
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	32

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Brucelosis.

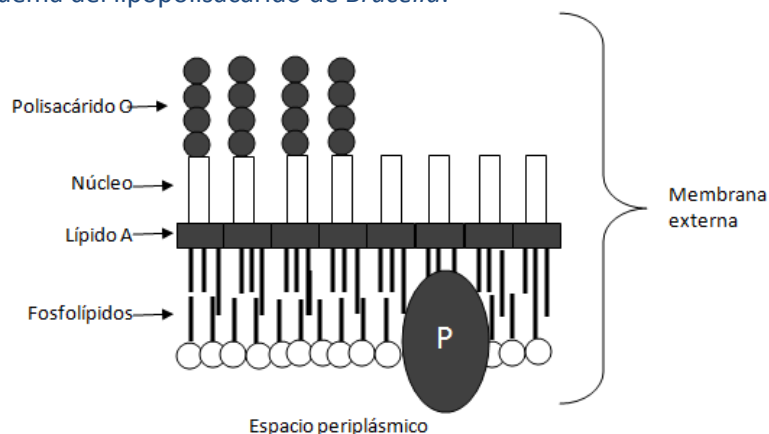
La brucelosis es una zoonosis humana mundial causada por bacterias intracelulares del género *Brucella* [1]. El género *Brucella* es un patógeno gram-negativo, facultativo, intracelular que produce enfermedades en diferentes mamíferos, incluyendo humanos [2]. Se replica en el medio interno de trofoblastos, macrófagos y células dendríticas (causando infecciones crónicas de larga duración) [3].

La brucelosis produce infertilidad y pérdidas reproductivas con predilección por causar placentitis, neumonía fetal y mastitis. Supone pérdidas económicas significativas, ya sea por los costes del tratamiento clínico en las infecciones humanas, o por los costes económicos asociados a pérdidas reproductivas en el ganado [4].

El género *Brucella* se ha clasificado tradicionalmente en seis especies nombradas de acuerdo con sus huéspedes de preferencia [5]. *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* y *Brucella suis* son las especies más importantes desde el punto de vista económico y, respectivamente, infectan cabras y ovejas, bovinos y porcinos [3]. Otras especies del género *Brucella* son *Brucella ovis* (ovejas), *Brucella canis* (perros), *Brucella neotomae* (roedores) [5], *Brucella ceti* (cetáceos), *Brucella pinnipedialis* (pinnípedos), *Brucella microti* (roedor, zorro y suelo) [5], *B. inopinata* (se desconoce su reservorio natural), *B. papionis* (primates) [6] y *B. vulpis* (zorro) [7].

Brucella es capaz de sobrevivir dentro de las células de su hospedador y de replicarse dentro de ellas, siendo su presencia extracelular accidental. El principal componente que posee *Brucella* en la membrana externa es el lipopolisacárido (LPS). El LPS consta de: lípido A, núcleo, y las cadenas polisacáridicas O dispuestas hacia el exterior de la bacteria, pero que no están presentes en todos los organismos del género *Brucella*. Según la presencia o ausencia de la cadena O en el LPS de las cepas *Brucella*, su estructura se denomina lisa (S-LPS) o rugosa (R-LPS) [8]. Las cadenas O son el antígeno inmunodominante en el S-LPS. Las cadenas polisacáridicas O del S-LPS se consideran esenciales para la virulencia de las cepas lisas de *Brucella*, puesto que mutantes rugosos obtenidos *in vitro* a partir de cepas virulentas naturalmente lisas, presentan atenuación en modelos animales [9].

Figura 1: Esquema del lipopolisacárido de *Brucella*.



Según la OMS, la brucelosis es la zoonosis responsable de más enfermos y pérdidas económicas, y España ocupa uno de los primeros lugares del ranking mundial en cuanto a incidencia. La especie más importante en Aragón desde los puntos de vista económico y de salud pública es *Brucella melitensis* [10].

1.1.1 *Brucella melitensis*.

Las cabras y ovejas son los hospedadores preferidos de *Brucella melitensis*, aunque este patógeno también infecta a las vacas dependiendo de las condiciones epidemiológicas específicas. *B. melitensis* es también el agente causal más patógeno y más frecuente de la brucelosis en los seres humanos. Clínicamente, la brucelosis humana puede ser una enfermedad incapacitante que produce fiebre intermitente, escalofríos, sudoración, debilidad, mialgia, complicaciones osteoarticulares, endocarditis, depresión y anorexia con baja mortalidad [11].

1.1.2 Vacunas contra brucelosis.

Debido al considerable potencial zoonótico de *Brucella*, el control y la erradicación de la brucelosis en animales tiene importantes implicaciones a nivel de Sanidad Pública. Entre las medidas de prevención y control de la brucelosis animal se encuentra la vacunación, siendo las vacunas vivas atenuadas las más empleadas, principalmente Rev1 para ganado ovino y caprino [12]. Estas vacunas, pese a ser efectivas previniendo los efectos clínicos de la brucelosis, presentan una serie de limitaciones, entre otras, la interferencia en el diagnóstico serológico diferencial de animales vacunados/infectados por especies lisas de *Brucella* y/o riesgos de infección humana en la manipulación. Esto es debido a que las pruebas de diagnóstico serológico de las infecciones ocasionadas por *B. melitensis* se basan en la detección de anticuerpo frente a la cadena O del LPS. Por otra parte, la vacunación de los animales con Rev1, induce la producción de una respuesta de anticuerpos también frente a las cadenas O del S-LPS, lo que es indistinguible de los generados por la infección [13].

1.2 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 incluye la activación de la respuesta inmune a través de los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida. El papel principal de la respuesta inmune adquirida es el desarrollo de la respuesta humoral y celular específica, pero al inicio de la agresión, la supervivencia del individuo depende de la habilidad de su respuesta inmune innata para combatir las causas de la enfermedad. La RFA es un proceso dinámico que envuelve cambios sistémicos y metabólicos proporcionando un mecanismo de defensa temprana no específica contra el agresor antes de alcanzar la respuesta inmune adquirida [14].

Pocas horas después de iniciarse el proceso se observan cambios en un gran número de procesos metabólicos, endocrinos y fisiológicos, los cuales se muestran de manera esquemática en la figura 2 [15].

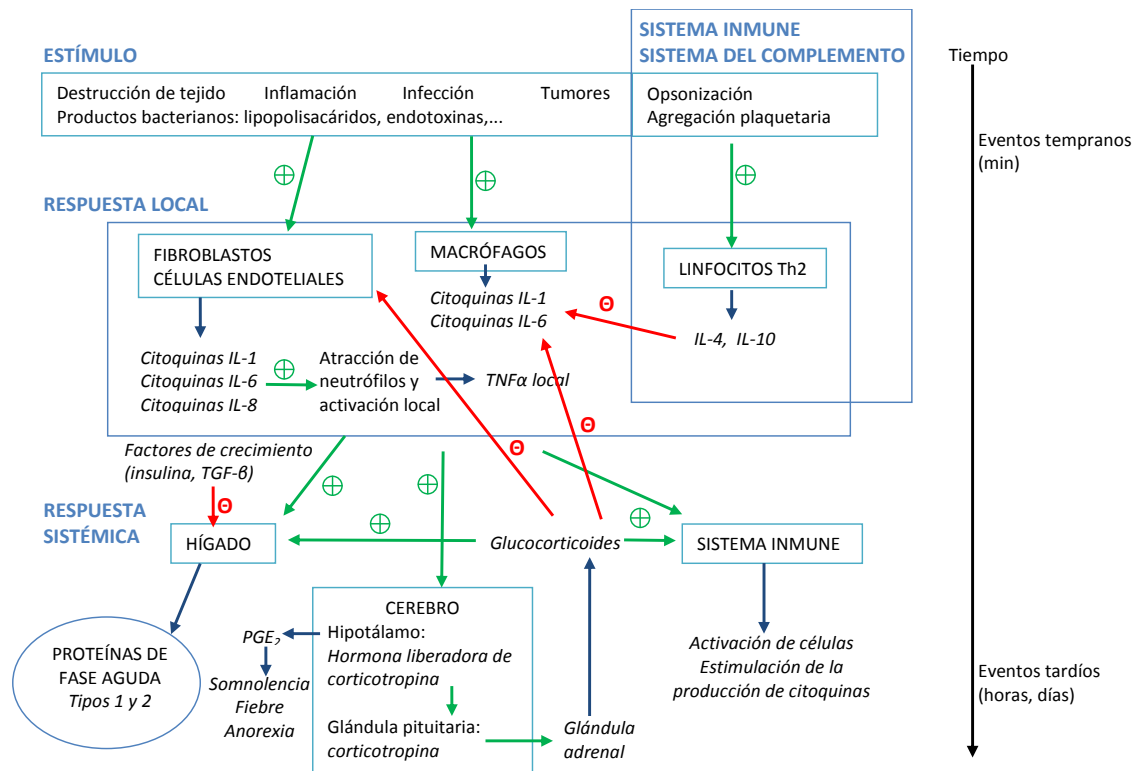


Figura 2: Representación esquemática de la respuesta de fase aguda. En cursiva: sustancias biológicamente activas. Flechas en verde: efecto estimulador. Flechas en rojo: efecto inhibitor. Flechas en azul: sustancias secretadas (cursiva) o efecto causado (no cursiva).

La RFA es un mecanismo homeostático, que tiene como finalidad lograr el aislamiento y destrucción de los agentes infecciosos, la eliminación del tejido dañado y la reparación del órgano afectado, permitiendo que el organismo vuelva a la situación normal. Generalmente el proceso revierte en unos pocos días una vez desaparece a causa que lo provocó, sin embargo, si la causa persiste puede darse una inflamación crónica [16].

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 tumores [14].

1.2.1. Proteínas de fase aguda.

La RFA afecta tanto a la síntesis como al catabolismo de la mayoría de las proteínas plasmáticas. Durante esta, el hígado sufre alteraciones de tamaño, ultraestructura y actividad metabólica y se trata del órgano responsable de la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda, que durante la RFA se modifica considerablemente. 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 inflamatorios [17]. El incremento de la concentración de las PFA positivas va acompañado de un descenso en los niveles plasmáticos de las PFA negativas. La magnitud de los cambios de concentración experimentados por las PFA varía enormemente de una proteína a otra [18].

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. 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 [19].

Este trabajo se ha centrado en las principales proteínas de fase aguda descritas en ratón, son α 1-glicoproteína ácida, haptoglobina, hemopexina y amiloide A sérico.

La **α 1-glicoproteína ácida (AGP)** se ha considerado como una PFA positiva en todas las especies de mamíferos estudiadas (a excepción del cerdo [20]) incluyendo el ratón [21]. Esta proteína, cuya masa molecular está entre 41-43 kDa, es de gran importancia en el metabolismo de drogas y psicotrópicos de carácter básico y parece desempeñar una función inmunomoduladora. La AGP inhibe la activación de los neutrófilos y aumenta la secreción de los receptores antagonistas de la IL-1 por los macrófagos. Además, podría aumentar la eliminación del LPS bacteriano uniéndose directamente a él, y neutralizando así su toxicidad. También inhibe la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos y la actividad de las células naturales asesinas (NK) [23].

La **haptoglobina (HPT)** PFA positiva en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas (humana, rata, conejo, vaca, cerdo, caballo, perro, gato y oveja) incluyendo el ratón [22]. 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 estudiadas [24]. Se trata de una de las tres proteínas plasmáticas involucradas en la conservación y transporte de la hemoglobina (Hb) y sus metabolitos, junto con la transferrina y la hemopexina. Su función biológica se asocia con la capacidad que posee para formar complejos estables, en proporción 1:1, con la Hb. El complejo HPT-Hb es reconocido por CD163, un receptor específico que se encuentra en los macrófagos, y es eliminado por los fagocitos [25]. Tanto en ratón como en la especie bovina, la concentración de HPT en suero normal es muy baja y aumenta decenas de veces durante la fase aguda [26].

La **hemopexina (HPX)** es otra PFA positiva del ratón [22], ya que su síntesis es inducida por varias citoquinas en procesos inflamatorios. Es una proteína plasmática de 57 kDa 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 inflamación [27]. Otros estudios han demostrado que juega un papel anti-inflamatorio gracias a su capacidad para modular la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [28].

El **amiloide A sérico (SAA)** es una de las principales proteínas inducidas en la fase aguda en ratón [22] 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. En humano y ratón se ha visto que 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, HDL3, desplazando a la ApoA1, lo que modifica el transporte y metabolismo del colesterol [29]. 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 E2, por lo que desempeñaría un papel regulador negativo de dichas citoquinas, capaces de estimular su síntesis [30]. Además, parece inhibir la respuesta a los antígenos mediada por linfocitos e induce la migración y adhesión de las células T, y la migración, adhesión e infiltración de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares en los tejidos [29].

1.2.2. Síntesis de proteínas de fase aguda.

El hígado es el órgano responsable de la síntesis y secreción de las proteínas de fase aguda [17]. En estudios de los cambios en los mRNA del hígado durante la respuesta de fase aguda en varias cepas de ratón endogámicas, se observa la inducción de mRNA para las proteínas de fase aguda: amiloide A sérico, hemopexina, haptoglobina y α 1 glicoproteína ácida [31].

Por otra parte, hay un estudio que describe que las células no hepáticas, incluyendo células inmunes, también pueden producir haptoglobina, aunque a un nivel mucho más bajo que la producción por el hígado durante la RFA, la cual se produce a altos niveles. La haptoglobina generada por las células B del bazo, en lugar de por el hígado, contribuye funcionalmente a una respuesta inmune normal. Los leucocitos aislados del bazo expresan haptoglobina y liberan una forma pro-HPT que difiere únicamente de la haptoglobina hepática en que no puede unirse a la hemoglobina. Esto sugiere que el bazo contribuye en la síntesis de haptoglobina [32].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

La brucelosis es una enfermedad bacteriana infecciosa crónica que afecta a diferentes especies de animales, y es zoonótica para el ser humano. Supone un grave problema tanto sanitario como económico, en concreto en el sector ganadero. Además, es de distribución mundial, pero afecta principalmente a países mediterráneos, incluyendo España, esto hace que su erradicación sea un importante objetivo así como el desarrollo de una mejor profilaxis animal. Por otra parte, la brucelosis no presenta un cuadro clínico característico que permita una detección precoz del infectado, lo que favorece su evolución y complica su erradicación.

El género *Brucella* está constituido por bacilos gram negativos. Actualmente incluye varias especies que infectan a distintos mamíferos como ganado ovino, caprino, vacuno, porcino, etc. Pero se trata de *Brucella melitensis* la que se considera principal causa de la brucelosis humana.

La aparición y la epidemiología de la brucelosis animal, así como su control y erradicación, dependen de varios factores, que incluyen principalmente el uso responsable de la prueba diagnóstica y la vacunación. Hoy en día, un problema típico de las vacunas disponibles contra la brucelosis animal, basadas en bacterias vivas atenuadas, es que los animales vacunados desarrollan los mismos anticuerpos que los animales infectados, ya que ambos han estado expuestos al mismo tipo de antígeno utilizado en las pruebas diagnósticas, el lipopolisacárido de *Brucella*. El problema resultante es esencial en las campañas de saneamiento ya que en el caso de una infección no es posible distinguir, a través de la serología, los animales vacunados de los infectados.

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. Un aspecto particular de la respuesta de fase aguda es el papel fundamental que tiene el hígado, en el que se producen cambios de peso, de ultraestructura y enzimáticos, y que tienen como consecuencia la modificación de los niveles de proteínas plasmáticas sintetizadas por él.

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 en distintas especies. En este trabajo se aborda la respuesta de estas proteínas en una infección experimental en ratón con *Brucella*.

En estudios realizados en el grupo de trabajo se ha visto en ratón que la concentración de estas cuatro proteínas aumenta en el suero de los ratones, produciéndose un máximo entre los 7-14 días de infección con *B. mel* intraperitonealmente. Este aumento en la concentración de las PFAs fue mucho menor o inexistente en la vacunación con Rev-1 vía subcutánea. Por ello se pueden proponer estas PFAs, en solitario o combinadas como biomarcadores para diferenciar los animales vacunados de los animales infectados.

Los **objetivos** de este trabajo han sido:

- 1.** Estudiar la evolución de la expresión génica en el hígado ya que es el órgano principal de síntesis de las siguientes PFAs: haptoglobina, hemopexina, α 1 glicoproteína ácida y amiloide A sérico.
- 2.** Relacionar los valores de mRNA obtenidos con la concentración de las proteínas en suero, y comprobar que los valores de concentración en suero de estas proteínas correlacionan con su expresión génica.
- 3.** Estudiar la evolución de la expresión génica en el bazo para ver la participación de este órgano en la síntesis de estas proteínas.
- 4.** Estudiar si la vía de infección intraperitoneal o subcutánea influye en la expresión de las PFAs en hígado y/o bazo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Material biológico.

La experimentación animal se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), en estricta conformidad con las directrices de la Federación de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio y aprobado por el comité de experimentación animal ética del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA).

Se utilizaron ratones BALB /c de nueve semanas de edad, obtenidos de Charles River Laboratories (L'Abresle Cedex, Francia). Las cepas de Brucella *B. melitensis* 16M y vacuna Rev-1. Ambas fueron proporcionadas por la Dra. M^a Pilar Jiménez de Bagüés Picazo, del CITA.

3.1.1 Infección experimental.

Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) que contenía 10⁴ unidades formadoras de colonias (CFU) de *B. melitensis* 16M o de Rev-1 (cepa vacunal). También se inyectaron subcutáneamente (sc) con 100 µl de PBS que contenía 10⁵ CFU de Rev-1 vacuna. Como control se inyectaron ratones vía ip con 100 µl de PBS. El sacrificio se realizó por asfixia en cámara de CO₂. Cuatro ratones por lote fueron eutanasiados en diferentes días post-infección. Las siguientes muestras se recogieron durante los días 3, 7, 14, 21 y 28 días post-infección. El bazo y el hígado se recogieron asépticamente y se congelaron en N₂ líquido. La sangre se recogió mediante punción cardíaca, y luego se centrifugó (2.000xg, 15 min, RT) para obtener el suero. Los sueros se pasaron a través de *Ultrafree Centrifugal Filters* de 0,22 µm (Merck Millipore, Alemania) y se almacenaron a -80°C.

Se hicieron 4 lotes con 4 ratones cada uno:

- Lote 1: ratones inyectados intraperitonealmente con *B. melitensis* 10⁴.
- Lote 2: ratones inyectados intraperitonealmente con Rev1 10⁴.
- Lote 3: ratones inyectados subcutáneamente con Rev1 10⁵.
- Lote 4: control.

3.2 Expresión génica de PFAs en hígado y bazo.

3.2.1 Extracción de RNA total.

El aislamiento de RNA a partir de muestras de bazo e hígado se llevó a cabo de acuerdo con la instrucción del fabricante del Reactivo TRI[®] (Molecular Research Center, Inc. EE.UU.).

En primer lugar se procedió a la homogeneización del tejido. Para ello, se descongelaron las muestras y se introdujeron en un potter (homogeneizador), disgregándolas en pequeños trozos. Se les añadió el Trizol, que aísla el RNA manteniendo su integridad. Tras esto, se procedió a la extracción de RNA añadiendo cloroformo, centrifugando, y obteniendo la fase superior acuosa. Posteriormente se añadió isopropanol y se llevó a cabo la purificación

por precipitado, lavando con etanol y resuspendiendo el RNA final en agua miliQ para su uso en las aplicaciones posteriores. El protocolo a seguir, con más detalle, es el siguiente:

1. Homogenización: se añadió 1 ml de TRI por cada 50-100 mg de tejido.

2. Fase de separación: se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, se añadió 0.2 ml de cloroformo, se agitó de forma vigorosa 15 segundos y se centrifugó a 12.000 g, 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase de fenol roja inferior, interfase y la fase acuosa superior incolora. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa, mientras que el DNA y las proteínas se encuentran en la fase orgánica e interfase.

3. Precipitación de RNA: se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y precipitar el RNA mezclándolo con isopropanol (0.5 ml de isopropanol por 1 ml de reactivo TRI). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 8 minutos a 4-25°C. El precipitado de RNA es visible en el fondo del tubo.

4. Lavado de RNA: se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con etanol al 75% agitando en vórtex, (1 ml de etanol al 75% por 1 ml de reactivo TRI), se centrifugó posteriormente a 7.500 g durante 5 minutos a 4-25°C.

5. Solubilizar RNA: retirar el etanol y dejar secar al aire el precipitado de RNA durante 3-5 minutos. Es importante evitar el secado completo del precipitado ya que esto disminuye en gran medida su solubilidad. Por último, disolver el RNA en 50 µl de agua miliQ (exenta de RNasa).

Posteriormente se cuantificó y se determinó la pureza y concentración del RNA mediante un nanoespectrofotómetro, NanoVue Plus® (Biochrom, EE.UU.). En primer lugar se colocó 2 µl de agua miliQ en el espectrofotómetro para realizar el blanco. A continuación, se añadió 2 µl de cada muestra para, con la ayuda del programa informático que tiene asociado el NanoVue Plus®, obtener los datos de concentración y pureza. Para finalizar, tras la última muestra, se realizó la medición de otro blanco para asegurar que no quedasen ácidos nucleicos en el aparato.

3.2.2 Retrotranscripción (RT).

El RNA extraído por el método del Trizol se transcribió a cDNA siguiendo el protocolo del kit de transcripción de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, EE.UU.).

Es un proceso en el que, empleando una polimerasa de origen retroviral, transcriptasa inversa, se sintetiza cDNA a partir de un molde de RNA. Este kit cuenta con cebadores aleatorios (Random Primers) que se unen al mRNA molde en distintos sitios y que actúan como primers para producir una librería de cDNA. Contiene reactivos que, cuando se combinan, forman una mezcla 2X Reverse Transcription Master Mix. Por lo que se añadió el mismo volumen de muestra RNA para que quedase 1X. Toda la preparación se realizó en hielo.

Como se disponía de la pureza de cada muestra de RNA, se realizaron los cálculos necesarios para obtener 1.5 µg de RNA en 10 µl de H₂O miliQ.

La mezcla de RT utilizada para 10 µl de RNA total (1.5µg) y un volumen total de mezcla de reacción de 20 µl, fue la siguiente:

Tabla 1: Composición de la mezcla de reacción de la RT-PCR.

Reactivo	Volumen (µl)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	--
Nuclease-free H ₂ O	4.2
Total	10.0

La mezcla de reacción se preparó multiplicando el volumen de una unidad de reacción por el número de casos con los que se procedía a realizar la PCR y se añadió un volumen adicional para compensar posibles errores al pipetear. Tras la preparación de la mezcla de reacción, se vorteo el tubo para que los componentes se homogeneizaran. Se dispuso el volumen final (10 µl) correspondiente a cada tubo de reacción. En último lugar, se añadió un volumen de 10 µl de RNA (equivalente a 1.5 µg de RNA total) a cada tubo de reacción, salvo al blanco, al que se añadió un volumen equivalente de agua. Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador y se ejecutó el programa recogido en la Tabla 2:

Tabla 2: Programa de temperaturas para la retrotranscripción.

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

Los productos de la RT se almacenaron en el frigorífico a 4°C.

3.2.3 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Para cuantificar las proteínas de fase aguda, se realizó una qPCR de las cuatro APP (HPT, HPX, SAA y AGP) y de una proteína de normalización (GADPH) de acuerdo con la instrucción del fabricante de PowerUp SYBR Green Master Mix en placas de reacción de 96 pocillos con el software de PCR en tiempo real QuantStudio (Applied Biosystems, EE.UU.). Este método se caracteriza por realizar una cuantificación a tiempo real de la amplificación de un gen en concreto, empleando el cDNA molde obtenido en la retrotranscripción.

En las placas para la qPCR se cargó cada pocillo con 15 µl de mezcla total: 14 µl de Mix qPCR y 1 µl de muestra diluida 1/20. La dilución de muestras se realizó añadiendo 95 µl de H₂O miliQ a 5 µl de muestra y el Mix de qPCR fue el siguiente:

Tabla 3: Composición de la mezcla de reacción de la qPCR.

Reactivo	Volumen (μl)
SYBR Green Master Mix	7.5
Primer Reverse (500mM)	0.75
Primer Forward (500mM)	0.75
H ₂ O miliQ	5.0
Total	14.0

Como cada proteína a estudiar tiene sus respectivos Primer Reverse y Primer Forward, para realizar la mezcla de reacción, el mix se preparó por separado. Primero se multiplicó el volumen de unidad de reacción del SYBR y de H₂O por el número de casos a realizar, teniendo en cuenta que cada reacción se realiza por triplicado y añadiendo un poco por la pérdida en el pipeteo. Además, se tuvo en cuenta las 3 reacciones correspondientes al blanco (sin cDNA). Se vorteo el tubo, se dispensó el volumen a cada tubo correspondiente a una proteína y se añadieron los primers reverse y forward. A continuación, se preparó la placa de qPCR, añadiendo a cada pocillo 1 μl de muestra (cDNA), a excepción del blanco, en el cual se añadió 1 μl de H₂O, y 14 μl del mix. Por último, se colocó la pegatina del kit que cubre toda la placa. Todo este procedimiento se realizó en hielo y en la mayor oscuridad posible.

Antes de introducir la placa en el instrumento de PCR en tiempo real (situado en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón) se realizó un pulso de centrifuga para homogeneizar las mezclas cargadas. La placa se introdujo en el termociclador, y se ejecutó el programa recogido en la Tabla 4:

Tabla 4: Programa de temperaturas para la qPCR.

Temperatura(°C)	Tiempo (s)	Nº ciclos
95°C	15	40
60°C	60	

3.2.4 Diseño de primers.

Todos los cebadores se diseñaron con Primer Express Software (Applied Biosystems, EE.UU.). Primero, se necesitó el código (RefSeq) del mRNA en ratón de cada proteína para la búsqueda de la secuencia en la base de datos de nucleótidos de la página del NCBI (National Center for Biotechnology Information), y se seleccionó la secuencia codificante (CDS). Esta secuencia se introdujo en el Software de Primer Express, obteniéndose varios posibles primers. Los elegidos se comprobaron en el programa Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.). Este programa ofrece diversos análisis que muestran una multitud de datos, tales como estructura secundaria de DNA y RNA, formación de dímeros, homología, estabilidad interna, composición y propiedades físicas. De esta manera se eligieron los más adecuados a las condiciones de la qPCR.

3.3 Western-blot.

La HPT, HPX, AGP Y SAA se detectaron en el suero por Western-Blot.

3.3.1 Cuantificación por Bradford.

Las muestras de suero se cuantificaron por el método de Bradford, dando como resultado 40-50 µg/ml suero de proteína total.

El método de Bradford está basado en el cambio de color del colorante Azul de Coomassie G-250 (*Brilliant Blue*, Sigma) en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas.

Como estándar proteico se utilizó una disolución stock de albúmina bovina (1 mg/ml), se preparó una curva patrón y las diluciones de los sueros. Finalmente se añadió el reactivo de azul de Coomassie a todos los tubos; tanto a las diluciones que contenían la albúmina como a las que contenían los sueros. Se agitaron los tubos, se dejó incubar 5 min, y a continuación se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

3.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Las muestras de suero se diluyeron 1/20 veces, y luego se cargaron, corrieron y se resolvieron por electroforesis en geles desnaturalizantes de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 % y al 10 % dependiendo del sistema utilizado. Los sistemas de polimerización de gel utilizados para este fin fueron el MiniVE de Hoefer para geles al 12% y el Mini Protean III de BioRad para geles al 10%, y las soluciones necesarias para preparar el gel fueron las siguientes:

- **Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida** (*Acrylamide/bis-acrylamide 30 % Solution*, Sigma): acrilamida 30 % : bisacrilamida 0.8 % (p/v), que se almacenó protegida de la luz a 4°C.
- **Tampón de electroforesis 10x**: Tris-HCl 250 mM pH 8.6, glicina (*Glycine*, Sigma) 1.92 M, SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*, Sigma) 1 % (p/v).
- **Tampón del gel separador (resolving)**: Tris-HCl (*Trizma Hydrochloride*, Sigma) 1.5 M pH 8.8, SDS 10 %, EDTA 8 mM.
- **Tampón del gel concentrador (stacking)**: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10 %, EDTA 8 mM.
- **Tampón de carga 3x**: Glicerol 10 %, Tris-HCl 60 mM pH 6.8, EDTA 20 mM, SDS 2 % (p/v), azul de bromofenol (*Bromophenol blue*, Sigma) 0.005 % (p/v), β-mercaptoetanol (*2-Mercaptoethanol*, Sigma) 5 % (v/v).
- **APS** (*Ammonium Persulfate*, Sigma) 10 %.
- **TEMED** (*Tetramethylethylenediamine*, Sigma)

La preparación de 5 ml de gel separador del 10% (sistema BioRad) y/o del 12% (sistema Hoefer), y de 2.5 ml de gel concentrador se realizó de la siguiente manera:

Tabla 5: Composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador (resolving) (10% y 12%) y concentrador (stacking) para electroforesis SDS-PAGE.

Componente	Stacking	Resolving 10%	Resolving 12%
AA:BA (30%)	325 μ l	1.65 ml	2 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	630 μ l	-	-
Tris-HCl 0.5 M pH 8.8	-	1.25 ml	1.25 ml
H ₂ O destilada	1.5 ml	2.01 ml	1.67 ml
SDS 10%	25 μ l	50 μ l	50 μ l
APS 10%	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Total	2.5 ml	5 ml	5 ml

Se utilizaron cristales de 0.75 mm de espesor de BioRad y separadores de 0.75 mm en Hoefer. Se vertió el gel separador entre los cristales que componen el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador, espacio que se cubrió con etanol, evitando así la formación de menisco y la entrada de oxígeno, lo que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel se eliminó el etanol y se vertió el gel concentrador. Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se retiró cuando el gel hubo polimerizado. La preparación de las muestras se realizó mezclando 14 μ l de suero con 7 μ l de tampón de carga 3X y se introdujo durante 10 minutos en un termo-bloque a 100°C para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se llenó la cubeta con tampón de electroforesis 1X y se procedió a cargar las muestras y el marcador de pesos moleculares (Nippon Genetics™ BlueStar Prestained Protein Marker. Rango de 10 kDa hasta 180 kDa). La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 20 mA por gel y 180V. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas.

3.3.3 Transferencia.

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-C extra*, American-Biosciences) mediante un sistema de transferencia semiseca (*Trans-Blot SD semidry transfer cell*, BioRad). Tras sumergir la nitrocelulosa y el gel durante 5 minutos en el tampón de transferencia (TRIS (*Tris Hydroxymethyl Aminomethane*, Panreac), 25mM, glicina (*Glycine*, Sigma) 192mM, SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*, Sigma) 3.5mM, metanol (*Methanol*, Sigma) 20%, pH 8.3) se colocó sobre el ánodo una capa de papel de filtro grueso (*Whatman*) humedecida con el tampón de transferencia, sobre ella la nitrocelulosa, a continuación el gel y por último otra capa de papel de filtro, evitando que se formasen burbujas de aire entre las distintas capas. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje de 20V y un amperaje de 400 mA durante 1 hora.

El gel se tiñó con Azul de Coomassie (*Brilliant Blue*, Sigma) una vez finalizada la transferencia para comprobar que las proteínas se habían transferido a la membrana de nitrocelulosa correctamente. La tinción se efectuó por inmersión de los geles durante 1 hora en una solución de Azul de Coomassie (*Brilliant Blue*, Sigma) y se dejaron destiñendo toda la noche en una solución decolorante que contenía 10% de ácido acético glacial (*Acetic Acid Glacial*, Panreac), 25% de metanol (*Methanol*, Sigma), 2% de glicerol (*Glycerol*, Sigma) y 63% de agua.

3.3.4 Inmunodetección.

Tras la transferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa, la detección específica de cada proteína se realizó utilizando antisueros frente a las proteínas obtenidas en el laboratorio, según el método descrito por Towbin [33] con alguna modificación detallada a continuación. Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon incubando durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en tampón B (NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, Panreac) 0,12 M, TRIS/HCl (*Trizma Hydrochloride*, Sigma) 0,01 M, Tween-20 (*Tween20 for synthesis*, Panreac) 0,5% (p/v), pH 8 y azida sódica (*Sodium azide*, Sigma) al 0,1%). Seguidamente las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos, con agitación vigorosa, con tampón B. Posteriormente se incubaron durante 1 hora con el correspondiente antisuero disuelto en tampón B con leche desnatada en polvo al 2,5% (p/v).

En el laboratorio se disponían de los siguientes antisueros hechos en conejo que reconocían, por reacción cruzada, las proteínas de fase aguda del ratón y se utilizaron como primer antisuero en los Western-blot: Anti-alpha-1 glicoproteína ácida de rata, Anti-hemopexina de cerdo y Anti-haptoglobina de cerdo. El amiloide sérico A no se pudo visualizar al no funcionar correctamente el anticuerpo del que se disponía. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa.

Tabla 6: Diluciones de los anticuerpos utilizados en el Western Blot.

Anticuerpo	Dilución
Anti-HPT	1/2000
Anti-AGP	1/500
Anti-HPX	1/500

Finalizada la incubación se lavó 3 veces con tampón B del mismo modo descrito anteriormente. A continuación las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con la enzima peroxidasa (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma) y diluido 1/20.000 en tampón B con leche desnatada en polvo al 2,5% (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Tras lavar con el tampón B 3 veces, los inmunocomplejos se detectaron mediante la reacción de la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario con un sustrato comercial (HRP (Horseradish Peroxidase) Substrate, Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate), que se dejó reaccionar durante 1:30 minutos.

3.3.5 Revelado.

Finalmente, se colocaron las membranas en un Cassette (*X ray film cassette*) y se revelaron en films (*CL-XPosure Film*, Thermo Scientific). Se utilizó una solución reveladora (100ml Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma) + 350 ml H₂O_d) y una solución fijadora (100 ml Kodak processing chemicals for autoradiography films (Sigma) + 400 ml H₂O_d), en la que se sumergieron los films (*CL-Xposure Film*, Thermo Scientific) de revelado. Por último estos films se escanearon para su posterior análisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Extracción y cuantificación de RNA.

Se cuantificaron los RNAs obtenidos de los lotes 1,2, 3 y 4 en los diferentes días post-infección con *B. melitensis* ip y vacunados con Rev1 ip y sc (tabla 7):

Tabla 7: Cuantificaciones (en ng/ μ l) de RNA de las 15 muestras de hígado y 9 de bazo en los diferentes días post-infección por método espectrofotométrico (NanoVue®). *B. melitensis* (Mel) y Rev-1 (Rev1).

Muestras	Hígado					Bazo		
	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días	7 días	14 días	21 días
Mel ip	1630	1795	1294	1197	1614	968.4	1049	756.8
Rev1 ip	1734	1232	1378	1561	1789	946.8	834.0	1055
Rev1 sc	1610	1296	1734	1115	1745	991.6	1546	1564

Observando los datos obtenidos vemos que la concentración de RNA total obtenida está entre 1.3-1.7 μ g/ μ l en hígado y entre 0.9-1.0 μ g/ μ l en bazo. Estos resultados sirvieron para poder realizar la retrotranscripción de 1.5 μ g de RNA de cada muestra.

Para definir la calidad de las muestras se midieron los ratios de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , recogidos en las tablas 8 y 9.

El ratio A_{260}/A_{280} informa de una posible contaminación de la muestra con proteínas ya que a una longitud de onda de 260 nm absorben los ácidos nucleicos, y a 280 nm absorben las proteínas, principalmente por los residuos de triptófano. En el caso del RNA, se establece que una relación A_{260}/A_{280} con un valor alrededor de 1.8 se corresponde con un RNA puro, aceptablemente.

Tabla 8: Ratios de absorbancia de las muestras de hígado. *B. melitensis* (Mel) ip y Rev-1 (Rev1) ip y sc.

Muestras	Hígado				
	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
Mel ip	1.825	1.665	1.934	1.935	1.807
Rev1 ip	1.706	1.935	1.950	1.874	1.713
Rev1 sc	1.745	1.615	1.737	1.937	1.373

Tabla 9: Ratios de absorbancia de las muestras de bazo. *B. melitensis* (Mel) ip y Rev-1 (Rev1) ip y sc.

	Bazo		
	7 días	14 días	21 días
Muestras	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{280}
Mel ip	1.971	1.987	1.917
Rev1 ip	1.945	1.954	1.964
Rev1 sc	1.982	1.886	1.853

Como se puede observar en las tablas 8 y 9 de resultados, el ratio A_{260}/A_{280} está en torno a 1.8 en la mayoría de resultados, por lo que se podría decir que el RNA tiene una pureza considerable tras la extracción.

4.2 Expresión génica de proteínas de fase aguda.

El cambio en la expresión de APPs en el hígado y el bazo se evaluó por qPCR en tres modelos experimentales: infección con *Brucella melitensis* 16M ip, vacunación con Rev1 ip y la vacunación con Rev1 sc. Las cuatro proteínas analizadas en todos los modelos fueron APP positivas en esta especie: HPT, HPX, SAA y AGP, durante los días post-infección: 3, 7, 14, 21 y 28 en hígado, y los días 7, 14 y 21 en bazo.

4.2.1 Expresión en hígado.

Tras la qPCR de las muestras de hígado, los datos de cada APP fueron normalizados con los de la proteína housekeeping (GAPDH) y representados gráficamente. Además estos resultados han sido relacionados con los datos de las concentraciones séricas de otros estudios realizados en el grupo de trabajo, para comprobar si la concentración sérica de estas proteínas se ve reflejada en su expresión génica.

4.2.1.1 Amiloide A sérico.

En el caso de SAA (figura 3b), se observa que la mayor expresión de mRNA en hígado se alcanza a los 14 días de vacunación con Rev1 ip, lo que coincide con el aumento de la concentración en suero (fig. 3a). El primer pico de mRNA en hígado se obtiene a los 7 días de la infección con *B. melitensis*, también igual que en suero (fig. 3a). Por otra parte, el aumento provocado por la vacunación con Rev1 sc se produce a los 14 días en la expresión génica en hígado (fig. 3b), y un poco más tarde en suero, a los 21 días (fig. 3a).

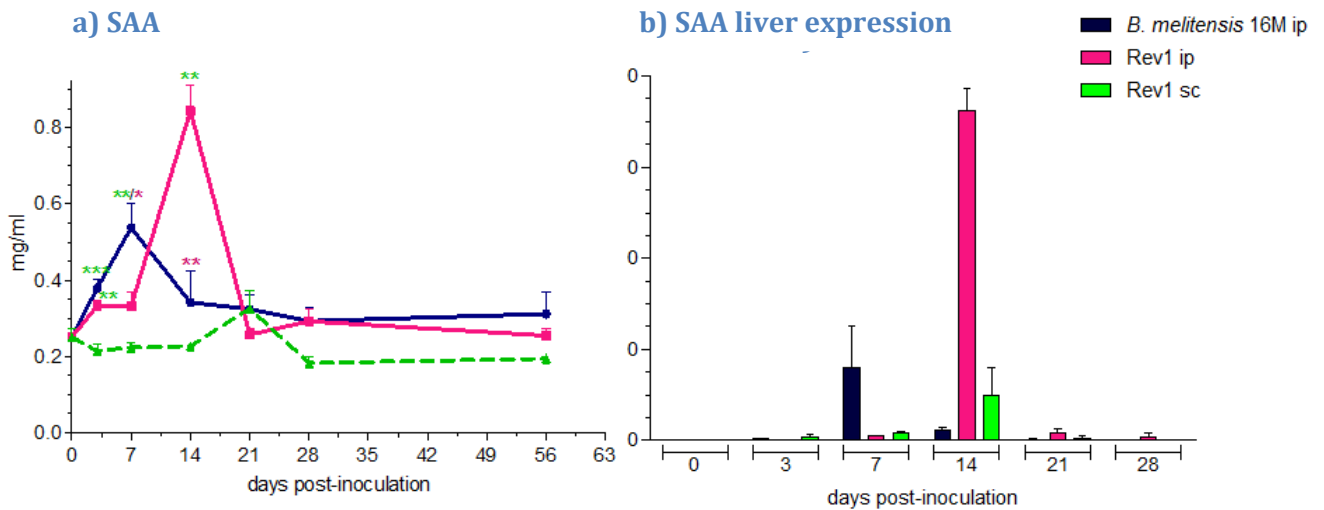


Figura 3: a) Evolución de la concentración sérica de SAA en ratones infectados con con *B. melitensis ip* y vacunados con Rev 1 ip y sc. Estudios antecedentes a este trabajo. b) Evolución temporal de la expresión génica de SAA en hígado de ratón en la infección con *B. melitensis ip* y vacunación con Rev 1 ip y sc. Los resultados se expresan en unidades relativas de RNA.

4.2.1.2 α 1-Glicoproteína ácida.

La expresión génica de AGP (fig. 4b) en hígado sigue una evolución similar, el mayor aumento se induce a los 14 días por la vacunación con Rev1 ip y el primer aumento lo produce la infección por *B. melitensis* a los 7 días, lo que concuerda con lo visto en suero (fig. 4a). Sin embargo hay una mayor expresión de AGP en los hígados de los ratones vacunados (Rev1 sc) que por *B. melitensis* (fig.4b).

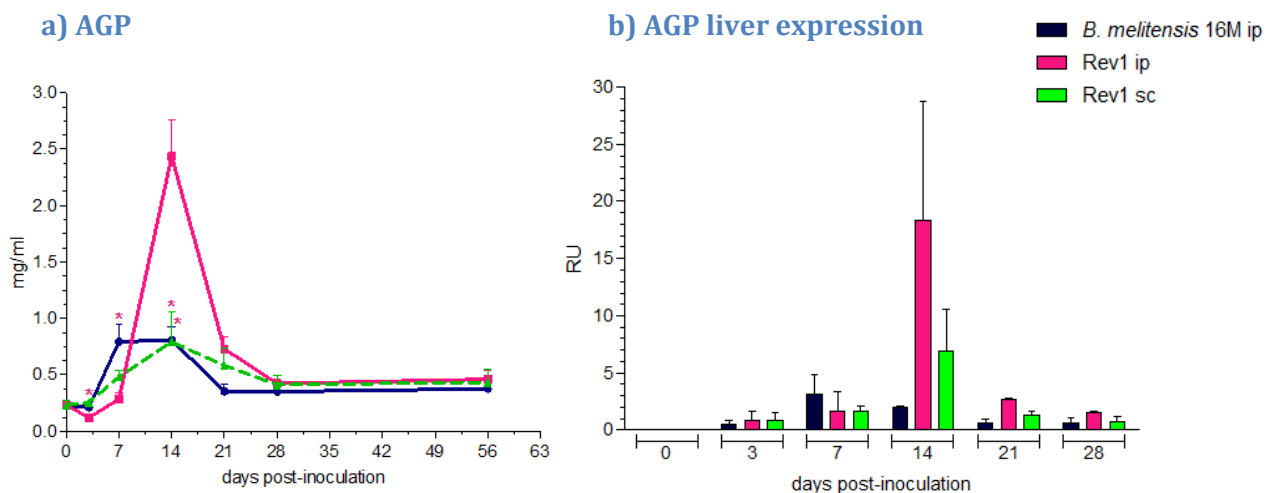


Figura 4: a) Evolución de la concentración sérica de AGP en ratones infectados con con *B. melitensis ip* y vacunados con Rev 1 ip y sc. Estudios antecedentes a este trabajo. b) Evolución temporal de la expresión génica de AGP en hígado de ratón en la infección con *B. melitensis ip* y vacunación con Rev 1 ip y sc. Los resultados se expresan en unidades relativas de RNA.

4.2.1.3 Haptoglobina.

En la evolución de la Haptoglobina (figura 5b), la expresión génica producido por *B. melitensis* se induce a los 3 días, crece un poco a los 7 días y se mantiene a los 14 días de forma moderada (fig. 5b) respecto a su concentración en suero (fig. 5a). En este caso también el aumento más alto es el producido por Rev1 ip a los 14 días, lo que concuerda con la concentración de HPT en suero (fig. 5a). Sin embargo, el aumento de la expresión de mRNA producido por Rev1 sc a los 14 días es mayor que el aumento producido por *B. melitensis* (fig. 5b) siendo la concentración de HPT en suero mucho menor en la vacunación vía sc.

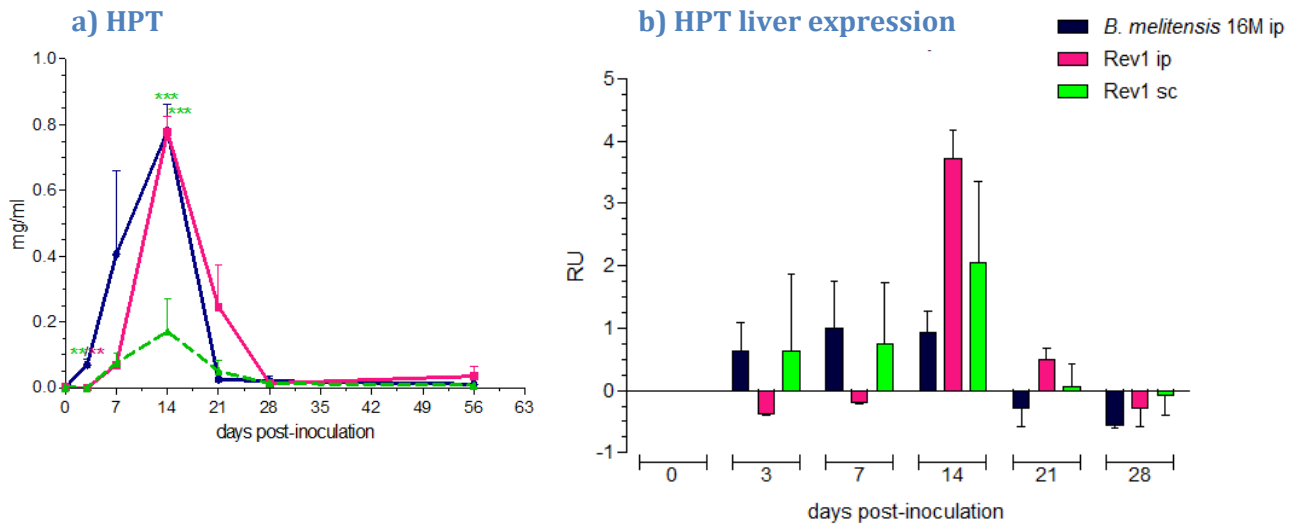


Figura 5: a) Evolución de la concentración sérica de HPT en ratones infectados con con *B. melitensis* ip y vacunados con Rev 1 ip y sc. Estudios antecedentes a este trabajo. b) Evolución temporal de la expresión génica de HPT en hígado de ratón en la infección con *B. melitensis* ip y vacunación con Rev 1 ip y sc. Los resultados se expresan en unidades relativas de RNA.

4.2.1.4 Hemopexina.

Como se observa en la figura 6b, los valores más altos de expresión génica de la HPX los induce Rev1 sc a los 14 días, lo que no encaja con lo observado en suero, donde apenas sube la concentración de HPX (fig. 6a). El aumento de la expresión génica de HPX inducido por Rev1 ip se alcanza a los 14 días, como el aumento de la concentración de HPX en suero, y la infección por *B. melitensis* apenas produce un aumento en la expresión génica de esta proteína, aunque el aumento de su concentración en suero es notable.

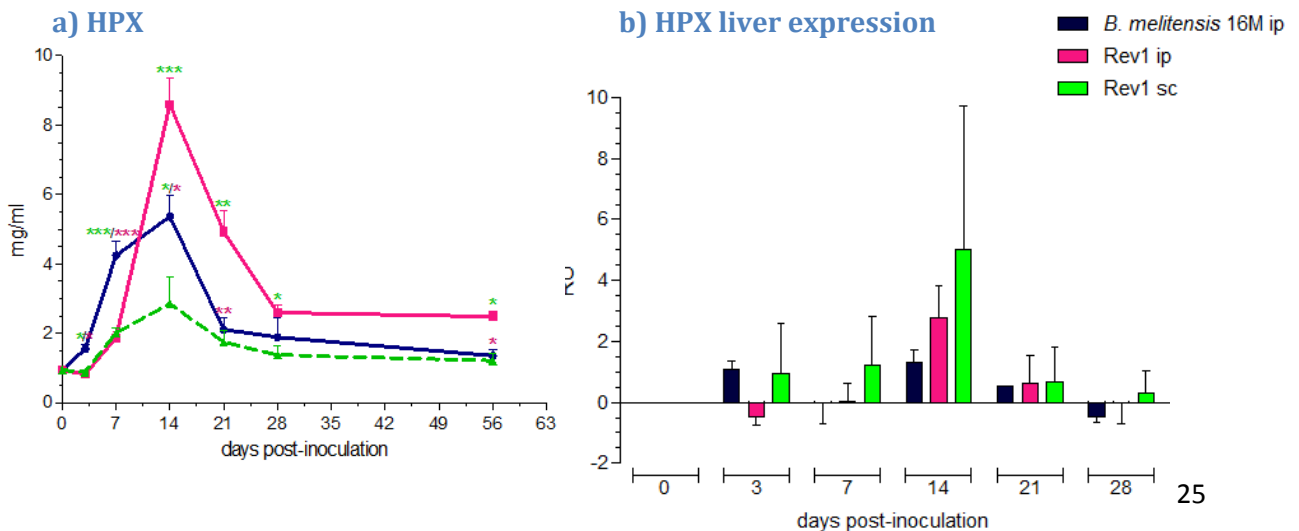


Figura 6: a) Evolución de la concentración sérica de HPX en ratones infectados con con *B. melitensis* ip y vacunados con Rev 1 ip y sc. Estudios antecedentes a este trabajo. b) Evolución temporal de la expresión génica de HPX en hígado de ratón en la infección con *B. melitensis* ip y vacunación con Rev 1 ip y sc. Los resultados se expresan en unidades relativas de RNA.

La vacunación con Rev-1 tanto por vía ip como por vía sc produce un mayor aumento de la expresión génica de SAA, AGP, HPT y HPX a los 14 días post-vacunación. En el caso de la vacunación por vía ip que produce el mayor aumento de la expresión génica (excepto la HPX) concuerda con el aumento de la concentración de proteínas en suero.

La infección con *B. melitensis* indujo a un menor aumento en la expresión de las PFA del hígado pero más temprano que la vacunación con Rev-1. Aunque la expresión génica fue menor, los valores de concentración de las PFAs en suero fueron intermedios, mayores que con la vacunación por sc y menores cuando se realizó vía ip. También la aparición de PFAs en el suero se produjo antes con la infección por *B. melitensis*.

La expresión génica en hígado de las cuatro APPs estudiadas no se ve reflejada directamente con la concentración sérica. La influencia de la vía de inoculación en la en la expresión génica en el hígado de las PFAs podría reflejar alteraciones en el mecanismo de secreción de estas proteínas al plasma, o bien un fallo en la propia traducción del mRNA.

4.2.2 Expresión en bazo:

Los datos de la qPCR de las muestras de bazo de dos ratones también se normalizaron y se representaron en gráfico (figura 7). Al contrario que en hígado, el bazo prácticamente no contribuyó a la síntesis de mRNA de APPs, excepto a la de SAA. Se puede observar que la subida de expresión en el animal 1 es a los 14 días y en el animal 2 a los 21 días.

La infección con *B. melitensis* produjo una represión de la expresión génica de las cuatro proteínas en ambos animales. Por otra parte, la inoculación con Rev1 ip produjo una sobreexpresión de mRNA de SAA (20 veces) y menor de AGP (1 vez) a los 14 días en el animal 1 y a los 21 en el animal 2, así como poca síntesis de HPX a los 14 días en el animal 1. Por último, la vacunación con Rev1 sc indujo una ligera sobreexpresión de todas las proteínas, siendo menor la de HPT y HPX, del animal 2 a los 21 días. La expresión génica de los animales 1 y 2 muestra la misma tendencia aunque en el animal 2 se observa un retraso en la inducción de la síntesis de las PFAs.

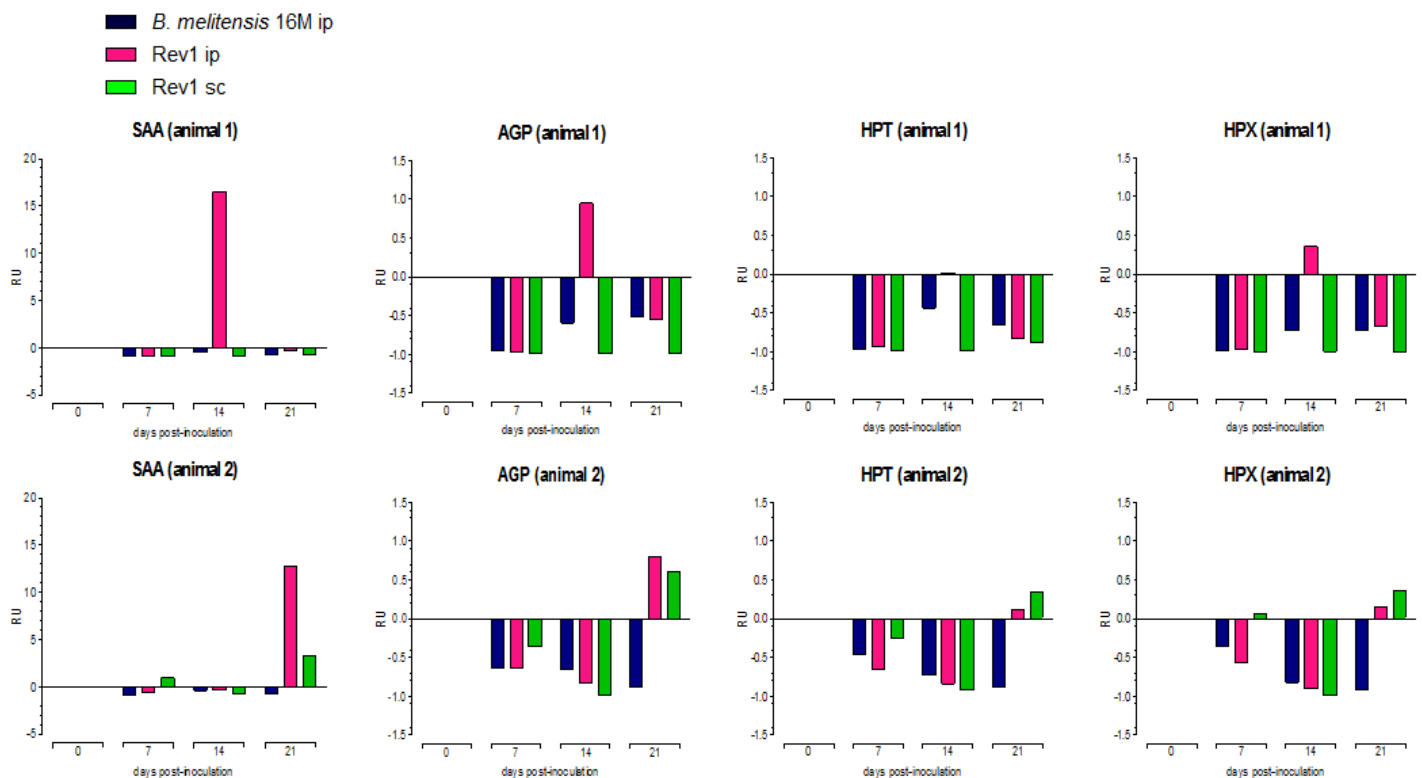


Figura 7: Evolución temporal de la expresión génica de APPs en bazo de ratón en la infección con *B.melitensis* ip y vacunación con Rev1 vía ip y sc. Los resultados se expresan en unidades relativas de mRNA de las proteínas SAA, AGP, HPT y HPX de 2 ratones.

4.3 Western-Blot.

Se procedió a una detección cualitativa de las PFAs en suero por Western-blot. Los antisueros disponibles en el laboratorio presentaron diferencias notables en cuanto a su afinidad por las distintas PFAs. Se consiguieron buenos resultados con el antisuero anti-HPT (fig. 6), pero para que los antisueros anti-HPX y anti-AGP reconocieran sus respectivas proteínas se tuvieron que emplear muestras de suero depletadas en las que se había eliminado las proteínas mayoritarias del suero, las inmunoglobulinas, la transferrina y la albúmina. Estas muestras fueron proporcionadas por Leonor Conde y en ellas sí fue posible la identificación de la Hemopexina y la AGP (fig. 9 y 10).

4.3.1 Haptoglobina:

Como se aprecia en la figura 8, la haptoglobina muestra grandes diferencias a lo largo de la infección. El máximo aumento se alcanza a los 14 días en cada inoculación.

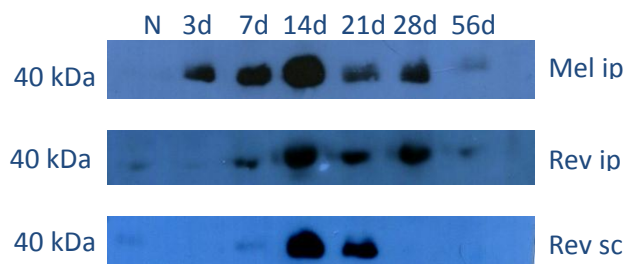


Figura 8: Detección de HPT por Western Blot. Los sueros de ratón infectados con *B. melitensis* y vacunados con Rev-1 recogidos en los distintos días de infección (0, 3, 7, 21, 28 y 56) se diluyeron 1/20, se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-HPT de cerdo (dilución 1/2.000) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa.

4.3.2 α -1-Glicoproteína ácida.

El Western blot de la AGP se hizo con tres muestras depletadas. Estas muestras fueron recogidas a los 7 días de inoculación con PBS (N), vacunación con Rev1 sc (1), vacunación con Rev1 sc y a los 30 días infección con *B. melitensis* (2) e infección con *B. melitensis* (3). En la figura 9 no se observa proteína en (N), lo que era de esperar. Por otra parte, de las dos muestras vacunadas (1 y 2), tiene menor aumento de AGP y el mayor aumento se observó en la que solo fue infectada (3).

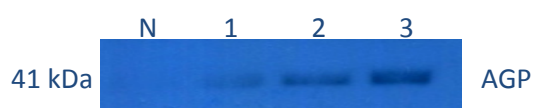


Figura 9: Detección de AGP por Western Blot. Los sueros depletados de ratón infectados con *B. melitensis* y vacunados con Rev-1 recogidos a los 7 días se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-AGP de rata (dilución 1/500) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa.

4.3.3 Hemopexina.

La cuantificación de la hemopexina también se hizo mediante Western blot con las muestras depletadas al obtener muchas uniones inespecíficas con las muestras sin depletar. Estas muestras fueron recogidas a los 7 días de inoculación con PBS (N), vacunación con Rev1 sc (1), vacunación con Rev1 sc y a los 30 días infección con *B. melitensis* (2) e infección con *B. melitensis* (3). Al igual que en la AGP, la muestra con mayor aumento de hemopexina se trata de la infectada con *B. melitensis* (3), y siendo algo menor la muestra vacunada e infectada (2).



Figura 10: Detección de HPX por Western Blot. Los sueros depletados de ratón infectados con *B. melitensis* y vacunados con Rev-1 recogidos a los 7 días se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-HPX de cerdo (dilución 1/500) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa.

5. CONCLUSIONES

1. La expresión génica en hígado de las PFAs difiere en los ratones infectados con *B. melitensis* respecto de los vacunados con Rev-1, siendo mayor en los ratones vacunados que en los infectados.
2. La vía de inoculación de la cepa vacunal Rev-1 influye en la expresión génica de las PFAs y, excepto en el caso de la HPX, los mayores aumentos se observan en los ratones vacunados vía ip.
3. El bazo tiene poca contribución en la síntesis de las cuatro PFAs estudiadas, excepto en lo referente al SAA en la vacunación vía ip.
4. La expresión génica en hígado de las cuatro PFAs estudiadas se ve solo parcialmente reflejada en su concentración sérica. En el suero, la concentración mayor de proteínas se obtiene con la vacuna Rev-1 ip seguida de la infección por *B. melitensis*, y las concentraciones más bajas son producidas por Rev-1 sc. (Datos del trabajo de Leonor Conde).

Conclusions

1. *Gene expression in the liver of APPs differs in mice infected with B. melitensis compared to those vaccinated with Rev-1, being higher in the vaccinated than in the infected mice.*
2. *The route of inoculation of the vaccine strain Rev-1 influences the gene expression of the APPs and except in the case of HPX, the highest increases are observed in mice vaccinated via ip.*
3. *The spleen has little contribution in the synthesis of the four APPs studied, except in relation to SAA in the vaccination via ip.*
4. *Gene expression in the liver of the four studied APPs is only partially reflected in its concentration. In serum, the highest protein concentration is obtained with the Rev-1 ip vaccine, then infection with B. melitensis, and the lowest concentrations are produced by Rev-1 sc. (Data of the work of Leonor Conde).*

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Jiménez de Bagüés, M. P., Dudal, S., Dornand, J. & Gross, A. (2005). "Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation.", [Abstract]. *Clin Immunol.* 114(3): 227-38.
2. Jiménez de Bagüés, M. P., Terraza, A., Gross, A., & Dornand, J. (2004). "Different Responses of Macrophages to Smooth and Rough *Brucella* spp.: Relationship to Virulence." *Infect. Immun.* 72(4): 2429-2433.
3. Grillá, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyán, I. & Moreno, E. (2012). "What have we learned from brucellosis in the mouse model?." *Vet. Res* 43(1):1-35.
4. Olsen, S. C. and M. V. Palmer (2014). "Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years." *Vet Pathol* 51(6): 1076-89.
5. Jiménez de Bagüés, M. P., Iturralde, M. *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).
6. Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckart, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M.S., Brew, S.D., Perrett, L.L., Koylass, M.S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H.C., Dick, E.J. Jr, Hubbard, G. and Schlabritz-Loutsevitch, N.E. (2014). "*Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.)." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:4120-4128.
7. Scholz, H.C., Revilla-Fernández, S., Al Dahouk, S., Hammerl, J.A., Zygmunt, M.S., Cloeckart, A., Koylass, M., Whatmore, A.M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K. & Hofer, E. (2016). "*Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). " *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 2090–8.
8. Vizcaíno, N. & Cloeckart, A. (2012). "Biology and Genetics of the *Brucella* Outer Membrane", *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics* , 133–161.
9. Allen, C.A., Adams, L.G. & Ficht, T.A. (1998). "Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival", *Infect. Immun.*, 66(3): 1008–1016.
10. Brucellosis en Aragón. *Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón.* https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/927/1/10532-87_2.pdf
11. Rossetti, C. A., Drake, K. L., Lawhon, S. D., Nunes, J. S., Gull, T., Khare, S. and Adams, L. G. (2017). "Systems Biology Analysis of Temporal In vivo *Brucella melitensis* and Bovine Transcriptomes Predicts host: Pathogen Protein–Protein Interactions", *Front. Microbiol.*, 8 (1275).
12. Corbel, M. J. (2006). "Brucellosis in humans and animals", WHO, Organización Mundial de la Salud.
13. Blasco, J.M. (1997). "A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats", *Prev. Vet. Med.* 31:275–283.
14. Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. H. (2004). "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry." *Vet. Res.* 35, 163–187.
15. Cecilian, F., Giordano, A. & Spagnolo, V. "The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins." *Protein Pept. Lett.* 9, 211–223 (2002).
16. Thomas, T. and Schreiber, G. (1985). "Acute-phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation in neonatal rats.", *Inflammation* 9(1), 1-7.

17. Kushner, I. (1982). "The phenomenon of the acute phase response." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 389, 39–48.
18. Koj, A. (1974). Structure and Function of Plasma Proteins. Acute phase reactants. Their synthesis, turnover, and biological significance.
19. Baumann, H., Jahreis, G. P. & Gaines, K. C. (1983). "Synthesis and regulation of acute phase plasma proteins in primary cultures of mouse hepatocytes." *J. Cell Biol.* 97, 866–76.
20. Lampreave, F., González-Ramón, N., Martínez-Ayensa, S., Hernández, M.A., Lorenzo, H.K., García-Gil, A. and Piñeiro, A. (1994). "Characterization of the acute phase serum protein response in pigs." *Electrophoresis* 15, 672–6.
21. Xie, H., Huff, G. R., Huff, W. E., Balog, J. M., Holt, P. and Rath, N. C., (2002). "Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens.", *Poult. Sci.* 81(1), 112-20.
22. Abdinasir, Y. O., Jesse, F.F.A., Saharee, A.A., Jasni, S., Khairani-Bejo, S. and Haron, A.W. (2012). "Acute Phase Response in Mice Experimentally Infected with Whole Cell and Exotoxin (PLD) Extracted from *Corynebacterium pseudotuberculosis*." *J. Anim. Vet. Adv.* 11 (21): 4.
23. Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. (2000). "Alpha-1-acid glycoprotein." *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 157–71.
24. Jayasinghe, J. D. H. E., Elvitigala, D. A. S., Whang, I., Nam, B.-H. & Lee, J. (2015). "Molecular characterization of two immunity-related acute-phase proteins: Haptoglobin and serum amyloid A from black rockfish (*Sebastes schlegeli*)." *Fish Shellfish Immunol.*
25. Bowman, B. H., Barnett, D. R., Lum, J. B. & Yang, F. (1988). "Haptoglobin." *Methods Enzymol.* 163, 452–74.
26. Young, C. R., Eckersall, P. D., Saini, P. K. and Stanker, L. H. (1995). "Validation of immunoassays for bovine haptoglobin." *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 1-13.
27. Tolosano, E., Fagoonee, S., Hirsch, E., Berger, F.G., Baumann, H., Silengo, L. and Altruda, F. (2002). "Enhanced splenomegaly and severe liver inflammation in haptoglobin/hemopexin double-null mice after acute hemolysis." *Blood* 100, 4201–8.
28. Rolla, S., Ingoglia, G., Bardina, V., Silengo, L., Altruda, F., Novelli, F. and Tolosano, E. (2013). "Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development", *J. Immunol.* 191(11), 5451-9.
29. Artl, A., Marsche, G., Lestavel, S., Sattler, W. & Malle, E. (2000). "Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 763–72.
30. Steel, D. M. & Whitehead, A. S. (1994). "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein." *Immunol. Today* 15, 81–88.
31. Baumann, H., Held, W. A. and Berger, F. G. (1984). "The acute phase response of mouse liver. Genetic analysis of the major acute phase reactants". *J. Biol. Chem.* 259:566-573.
32. Huntoon, K.M., Russell, L., Tracy, E., Barbour, K.W., Li, Q., Shrikant, P.A., Berger, F.G., Garrett-Sinha, L.A. and Baumann, H. (2013). "A unique form of haptoglobin produced by murine hematopoietic cells supports B-cell survival, differentiation and immune response", *Mol. Immunol.* 55 (3-4): 345-54.
33. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (9), 4350-4354.