



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Brucelosis osteoarticular: alteración de la función de los osteocitos e implicancia de los linfocitos B como mediadores de daño óseo”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Química Biológica

Lic. Ayelén Ivana Pesce Viglietti

Directora: *Dra. María Victoria Delpino*

Consejero de Estudios: *Dr. Luis Scolaro*

Lugar de trabajo: *Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (CONICET-UBA)*

Buenos Aires, 2018

Brucelosis osteoarticular: Alteración de la función de los osteocitos e implicancia de los linfocitos B como mediadores del daño óseo.

RESUMEN

La brucelosis osteoarticular es la localización más común de la enfermedad activa en el hombre. Sin embargo, los mecanismos inmunomoleculares implicados no han sido completamente dilucidados.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que *B. abortus* invade y se replica en los osteocitos de la línea murina (MLO-Y4) inhibiendo la expresión de conexina-43, sin afectar su viabilidad e induciendo la secreción de mediadores proinflamatorios, entre los cuales RANKL y TNF- α fueron los principales involucrados en la inducción de osteoclastogénesis. La respuesta de los osteocitos pudo ser modulada por macrófagos infectados, los cuales redujeron la expresión de conexina-43 e indujeron la muerte de los osteocitos por apoptosis. Los osteocitos son la forma totalmente diferenciadas de los osteoblastos (células implicadas en la secreción de matriz ósea). *B. abortus* fue capaz de invadir y multiplicarse en osteoblastos inhibiendo la secreción de matriz mediante un mecanismo que depende de la activación de la vía autofágica.

B. abortus invade pero no se multiplica en los linfocitos B, indicando que constituyen un nicho de persistencia de la bacteria. Nuestros resultados demostraron que los linfocitos B están implicados en el daño óseo al inducir osteoclastogénesis mediante un mecanismo que involucra a RANKL.

En conjunto estos resultados indican que *B. abortus* crea un microambiente proinflamatorio y proosteoclastogénico el cual podría contribuir a la destrucción ósea y articular observada en pacientes con complicaciones osteoarticulares de la brucelosis.

Palabras claves: *Brucella abortus*; osteocitos; osteoblastos; linfocitos B; osteoclastogénesis.

Osteoarticular brucellosis: Alteration of the function of osteocytes and implication of B lymphocytes as mediators of bone damage.

ABSTRACT

Osteoarticular brucellosis is the most common site of active disease in man. However, the immunomolecular mechanisms involved have not been fully elucidated yet.

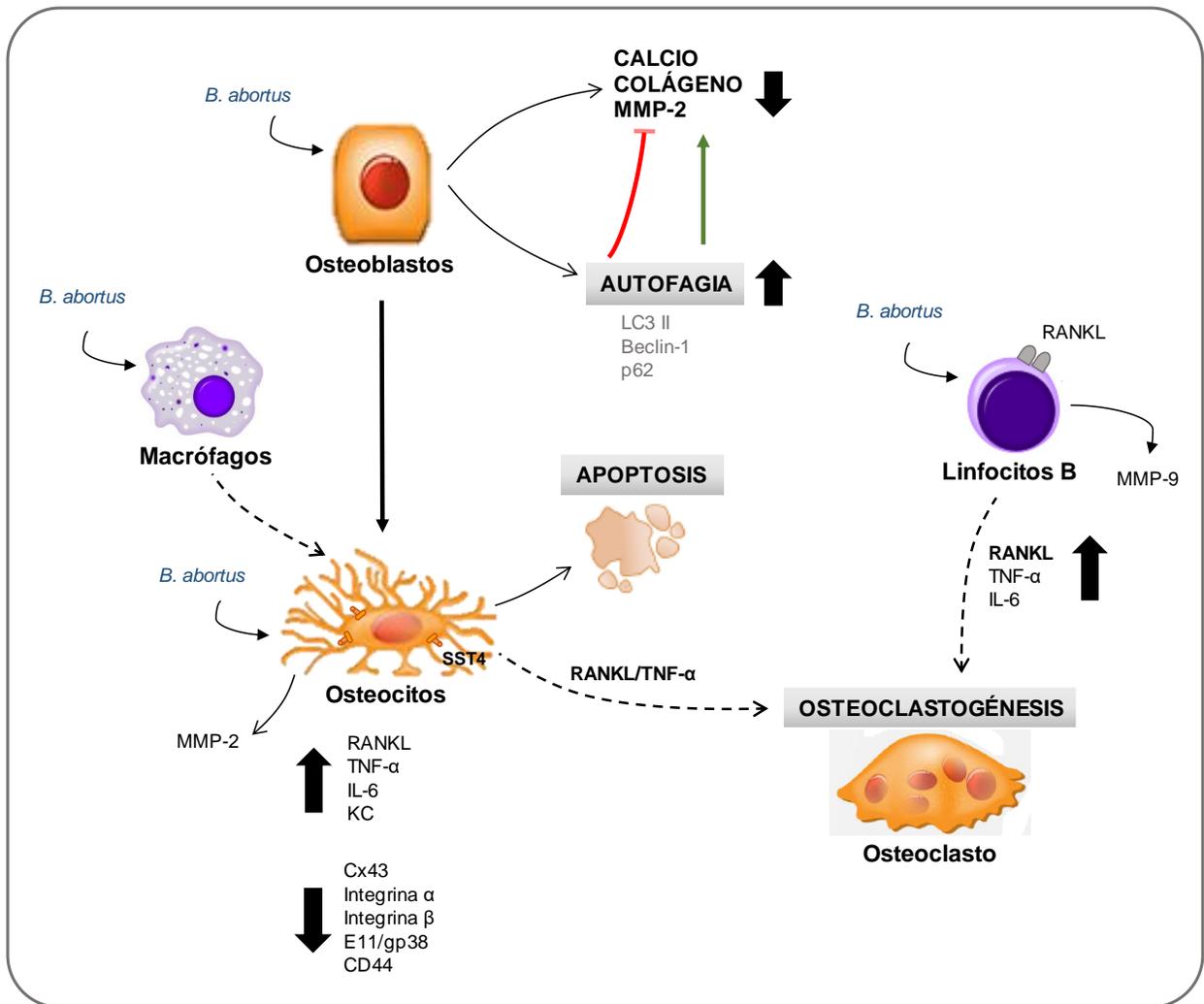
The results obtained in this thesis indicate that *B. abortus* invades and replicates in the osteocytes of the murine line (MLO-Y4) inhibiting the expression of connexin-43, without affecting its viability and inducing the secretion of proinflammatory mediators, among which RANKL and TNF- α were the main ones involved in the induction of osteoclastogenesis. The response of the osteocytes could be modulated by infected macrophages, which reduced the expression of connexin-43 and induced the death of osteocytes by apoptosis. Osteocytes are the totally differentiated form of osteoblasts (cells involved in the secretion of bone matrix). *B. abortus* was able to invade and multiply in osteoblasts by inhibiting matrix secretion by a mechanism that depends on the activation of the autophagic pathway.

B. abortus invades but does not multiply in B lymphocytes, indicating that they constitute a niche of persistence of the bacterium. Our results demonstrated that B lymphocytes are involved in bone damage by inducing osteoclastogenesis through a mechanism involving RANKL.

Overall, these results indicate that *B. abortus* creates a proinflammatory and pro-osteoclastogenic microenvironment which could contribute to the bone and joint destruction observed in patients with osteoarticular complications of brucellosis.

Keywords: *Brucella abortus*; osteocytes; osteoblast; B lymphocytes; osteoclastogenesis.

ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS RESULTADOS DE ESTE TRABAJO



AGRADECIMIENTOS

ESCRIBIRLOS

Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en revistas científicas internacionales con referato:

1. ***Brucella abortus* Invasion of Osteocytes Modulates Connexin 43 and Integrin Expression and Induces Osteoclastogenesis via Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion.** Ayelén Ivana Pesce Viglietti, Paula Constanza Arriola Benitez, María Virginia Gentilini, Lis Noelia Velásquez, Carlos Alberto Fossati, Guillermo Hernán Giambartolomei, María Victoria Delpino. *Infect Immun.* 2015 Oct 12;84(1):11-20.
2. ***Brucella abortus*-infected B cells induce osteoclastogenesis.** Pesce Viglietti AI, Arriola Benitez PC, Giambartolomei GH, Delpino MV. *Microbes Infect.* 2016 Sep;18(9):529-35. Seleccionado como artículo destacado de ese número.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
BRUCELOSIS.....	5
GENERALIDADES	5
EPIDEMIOLOGÍA.....	5
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	8
FUENTES Y VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	9
Brucelosis en humanos.....	9
Brucelosis animal.....	10
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	10
Brucelosis en humanos.....	10
Brucelosis animal.....	11
ETIOLOGÍA	11
<i>Brucella spp.</i>	11
Composición de la membrana y estructura antigénica	14
Biología de <i>Brucella sp.</i> y tráfico intracelular.....	16
El sistema de secreción de tipo 4	19
RESPUESTA INMUNE CONTRA BRUCELLA SPP.	23
Inmunidad innata	23
Inmunidad adaptativa.....	26
Células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	26
Respuesta humoral.....	27

Citoquinas	28
EL HUESO	29
Composición y dinámica normal del hueso	29
El hueso en condiciones inflamatorias	34
Brucelosis osteoarticular	35
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Cultivo de bacterias	41
Cultivo celular	41
Infección celular	43
Estimulación con medio condicionado	43
Zimografía	44
Medición de la concentración de citoquinas	44
Evaluación de la muerte celular por apoptosis	44
Ensayo de formación de osteoclastos	45
Análisis de la expresión de Cx43 por inmunofluorescencia	45
Obtención de ARN mensajero (ARNm) y RT-qPCR (de sus siglas en inglés, <i>quantitative reverse transcription-PCR</i>)	46
Western blotting	46
Inhibición de la autofagia	47
Determinación de la deposición de colágeno	47
Determinación de la deposición de calcio	48
Expresión de RANKL en linfocitos B	48
Análisis estadístico	48
CAPÍTULO I	49

INTRODUCCIÓN.....	50
RESULTADOS.....	53
<i>B. abortus</i> infecta y se multiplica intracelularmente en la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4	53
La infección con <i>B. abortus</i> induce la secreción de MMP-2, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas en osteocitos murinos	53
La infección con <i>B. abortus</i> redujo la expresión de Cx43 pero no modificó la expresión de integrina- α y - β , E11 / gp38 y CD44.....	54
Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con <i>B. abortus</i> inhiben la expresión de Cx43, integrina- α y - β , E11 / gp38 y CD44.....	56
La infección con <i>B. abortus</i> no induce apoptosis de los osteocitos	57
Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con <i>B. abortus</i> inducen apoptosis de los osteocitos	58
Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con <i>B. abortus</i> inducen osteoclastogénesis	59
<i>B. abortus</i> induce la secreción de TNF- α por parte de los osteocitos mediante un mecanismo que depende de la presencia de un SST4 (VirB) funcional	61
Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con <i>B. abortus</i> inducen osteoclastogénesis a través de RANKL y TNF- α	62
Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con la mutante $\Delta virB10$ inducen osteoclastogénesis a través de RANKL	63
Las mutantes de <i>B. abortus</i> para las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275 inducen la expresión de TNF- α	65
DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO II	70
INTRODUCCIÓN.....	71
RESULTADOS.....	74
La infección con <i>B. abortus</i> no induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteocitos	74

La infección con <i>B. abortus</i> induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteoblastos.....	75
La inhibición de la deposición de matriz ósea inducida por la infección con <i>B. abortus</i> en osteoblastos depende de la vía autofágica	75
La replicación de <i>Brucella</i> no está implicada en la inhibición de la función de los osteoblastos	76
La inhibición de la autofagia una vez iniciado el proceso de diferenciación no revierte el efecto inhibitorio sobre la función de los osteoblastos inducido por la infección con <i>B. abortus</i>	78
DISCUSIÓN	80
CAPÍTULO III.....	83
INTRODUCCIÓN.....	84
RESULTADOS.....	86
<i>B. abortus</i> es capaz de invadir pero no de multiplicarse en los linfocitos B	86
Los linfocitos B infectados por <i>B. abortus</i> secretan mediadores proinflamatorios	86
Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos B infectados con <i>B. abortus</i> inducen osteoclastogénesis vía RANKL.....	88
<i>B. abortus</i> muerta por calor (HKBA) induce la secreción de TNF- α e IL-6, pero no de RANKL en linfocitos B	89
Los macrófagos no inducen un aumento en la expresión de RANKL en linfocitos B durante la infección con <i>B. abortus</i>	89
DISCUSIÓN	92
CONCLUSIÓN GENERAL	94
BIBLIOGRAFÍA.....	98

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	de sus siglas en inglés <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albúmina Sérica Bovina (de sus siglas en inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Cx43	Conexina 43
DAPI	de sus siglas en inglés <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	de sus siglas en inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (de sus siglas en inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (de sus siglas en inglés <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>)
h/hs	Hora/s
HKBA	<i>B. abortus</i> muerta por calor (de sus siglas en inglés, <i>heat-killed B. abortus</i>)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de Propidio
KC/CXCL1	Quimioattractante de queratinocitos (de sus siglas en inglés, <i>keratinocyte chemoattractant</i>)
LPS	Lipopolisacarido
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos (de sus siglas en inglés, <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (de sus siglas en inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>)

min	Minutos
MMP/s	Metaloproteasa/s de matriz (de sus siglas en inglés <i>Matrix MetalloProteinases</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (de sus siglas en inglés <i>Multiplicity Of Infection</i>)
NK	Células citotóxicas naturales (de sus siglas en inglés <i>Natural Killer</i>)
OPG	Osteoprotegerina
Omp	Proteína de la membrana externa (de sus siglas en inglés <i>Outer Membrane Protein</i>)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (de sus siglas en inglés <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Buffer fosfato salino (de sus siglas en inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PFA	Paraformaldehído
PMA	<i>forbol-12-miristato-13-acetato</i> (de sus siglas en inglés <i>Phorbol-12-Myristato 13-Acetato</i>)
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (de sus siglas en inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (de sus siglas en inglés, <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
RPMI	de sus siglas en inglés <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	de sus siglas en inglés, quantitative reverse transcription-PCR
SDS-PAGE	de sus siglas en inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
seg	Segundos

SFB	Suero Fetal Bovino
SST4	Sistema de secreción tipo 4
TGF	Factor de crecimiento transformante (de sus siglas en inglés <i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	Células T- <i>helper</i> 1
TLR/s	Receptor/es tipo toll (de sus siglas en inglés <i>Toll Like Receptor</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (de sus siglas en inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato (de sus siglas en inglés, <i>Tartrate acid phosphatase resistant</i>)
TUNEL	de sus siglas en inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i>
TSA	Agar tripteína de soja (de sus siglas en inglés <i>Tryptic Soy Agar</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VCB	Vacuola que Contiene a <i>Brucella</i>
WT	Cepa salvaje (de sus siglas en inglés <i>Wild Type</i>)
α-MEM	de sus siglas en inglés, <i>α-Minimum Essential Medium</i>

Introducción general

BRUCELOSIS

GENERALIDADES

La brucelosis es una zoonosis endémica de distribución mundial causada por bacterias Gram negativas del género *Brucella* [1]. Esta enfermedad afecta al hombre, a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos. Su presentación en humanos está íntimamente relacionada con la enfermedad en animales domésticos. Debido a su potencial epidémico, la ausencia de una vacuna humana, y la eficiencia de la infección por aerosoles, *Brucella* es clasificada como un patógeno de nivel de bioseguridad 3 y es considerado un potencial agente de bioterrorismo [2].

Las consecuencias de esta enfermedad en la salud pública y en el sector agropecuario son de gran relevancia. La disminución de la capacidad reproductora y los abortos en el ganado, el parto de crías débiles y la contaminación de lácteos y carne hacen que esta enfermedad genere cuantiosas pérdidas económicas tanto en la industria agropecuaria como en la salud pública [3]. En la Argentina, la enfermedad es endémica a pesar de contar con un Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis y las pérdidas económicas anuales se han estimado en US\$ 60.000.000 [4].

EPIDEMIOLOGÍA

La brucelosis es considerada como la zoonosis bacteriana más común a nivel mundial con 500.000 nuevos casos por año [5]. La incidencia y prevalencia de la enfermedad en humanos varía geográficamente y se encuentra en constante cambio debido a razones sanitarias, socioeconómicas y políticas (**Imagen 1**) [5]. En la mayoría de los países los casos de brucelosis humana deben ser notificados al sistema de salud local, sin embargo la enfermedad no siempre es informada y los números oficiales sólo constituyen una fracción de la incidencia real de la enfermedad. Por lo tanto, la verdadera incidencia de la brucelosis humana es desconocida [6, 7]. Históricamente las zonas de mayor prevalencia eran el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica [5].

La Unión Europea ha concedido la condición de libre de brucelosis a los países de Suecia, Dinamarca, Finlandia, Alemania, Reino Unido, Austria, Países Bajos, Bélgica, Luxemburgo, Noruega y Suiza. Francia representa un buen ejemplo de control exitoso, en el año 1976 fueron reportados 800 casos y para el año 2000 el número de casos disminuyó a 44. Por otro lado, a pesar de los esfuerzos realizados, España es uno de los países con mayor incidencia anual en Europa y constituye un foco endémico [5].

En Medio Oriente la situación está empeorando rápidamente, esta ha sido considerada históricamente como zona endémica. Siria continúa siendo el país con la mayor incidencia anual mundial y el número de casos reportados se duplica cada año. La incidencia en países como Turquía sigue siendo muy alta y la enfermedad aún es endémica en Irak y Afganistán, aunque las estadísticas oficiales estén subvaloradas y los esfuerzos para controlarla sean difíciles en parte por la guerra y la escasez de recursos [5].

América del Sur se ha considerado tradicionalmente como una zona endémica de brucelosis humana, siendo las principales especies causantes de la infección en humanos *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. Actualmente es considerada como una de las infecciones zoonóticas más importantes debido a su impacto en la salud pública y en la economía regional [8]. Se considera que los países más afectados son México, Argentina y Perú. Si bien Brasil no se encuentra incluido, por no contar con datos sobre la situación sanitaria de la enfermedad, se presume que podría ser un foco endémico por ser el principal productor de caprinos a nivel mundial [5, 9]. México sigue siendo uno de los depósitos más importantes de brucelosis humana.

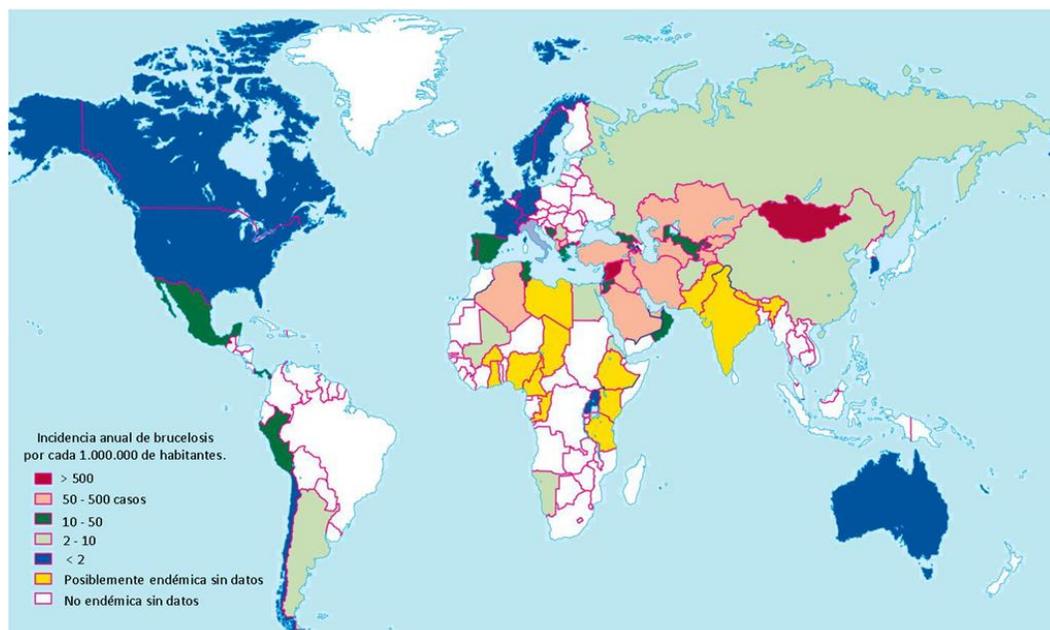


Imagen 1: Mapa global de la incidencia de brucelosis humana [5].

En Argentina, la enfermedad fue descrita por primera vez en 1922, en el año 1930 se realizó el primer aislamiento de una cepa de *B. melitensis* de un paciente infectado y en 1932 la brucelosis fue incluida entre las enfermedades profesionales. El mayor pico de la enfermedad fue registrado en el año

1997 con 687 casos, a partir de ese punto la incidencia comenzó a descender hasta llegar en 2005 a los 300 casos por año en todo el país [3, 10]. En los años subsiguientes el número de casos reportados fue variable pero continuó con la misma tendencia decreciente (**Imagen 2**) [2, 10]. Por ser una enfermedad de notificación obligatoria, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública informa semanalmente los casos detectados por provincia y regiones sanitarias. Es importante remarcar que si bien en nuestro país es una enfermedad de notificación obligatoria, las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas, por lo que se estima que la verdadera incidencia sería de 10 a 25 veces más alta que la indicada [10].

La brucelosis humana está altamente relacionada con la enfermedad en animales. En nuestro país se conoce la infección por *B. abortus* (ganado bovino), *B. ovis* (ganado ovino), *B. melitensis* (ganado caprino) y en menor medida, *B. suis* (cerdos) y *B. canis* (perros) [10]. En cuanto a la brucelosis bovina, un estudio realizado en 2014 reveló una prevalencia animal del 0,8% y una prevalencia de predios del 12,35% para las zonas de mayor producción bovina (Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Corrientes, La Pampa, San Luis, parte de Formosa, Santiago del Estero y Chaco) (Fuente: Programa de Brucelosis SENASA 2014). La situación epidemiológica de la brucelosis caprina y ovina no es del todo conocida ya que hay escasos trabajos publicados con datos oficiales. La prevalencia actual de la enfermedad en caprinos en la provincia de La Pampa es muy baja, y los resultados serían un indicador de que la provincia podría ser libre de brucelosis caprina [11]. Recientemente, en el mes de diciembre de 2017, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) declaró a la región patagónica libre de *B. melitensis*, lo que implica un mejoramiento en el estatus sanitario de la producción de ovinos y caprinos de esa zona del sur argentino. En Salta, se detectó una prevalencia de brucelosis caprina del 14,9%, en el departamento de Malargüe en Mendoza se reportó una prevalencia del 3,83% y en Formosa del 12,6% [12-14]. Por otro lado, si bien no hay un relevamiento nacional de brucelosis ovina por *B. ovis*, se estima que la prevalencia varía entre un 4 y un 21% [15].

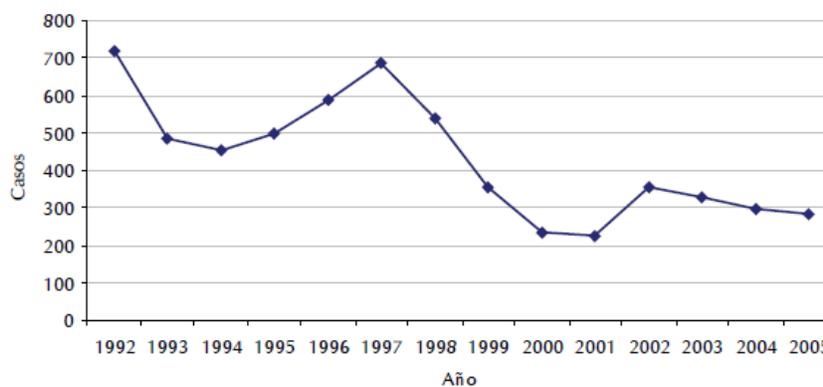


Imagen 2: Casos de brucelosis informados en Argentina durante el período 1992-2005 [10].

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

La brucelosis humana se caracteriza por presentar síntomas diversos e inespecíficos, debido a esto su detección no es sencilla [16]. Por lo tanto, para un diagnóstico eficiente se deben realizar estudios bacteriológicos y serológicos considerando la historia clínica del paciente y sus antecedentes epidemiológicos [2, 6, 17].

El diagnóstico de certeza de la enfermedad en humanos es el aislamiento de la bacteria [17] a partir de médula ósea, sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido articular o biopsias [2]. Se considera que el método más adecuado es el mielocultivo ya que la concentración de la bacteria es alta en la médula ósea; sin embargo, su aplicabilidad está limitada por ser una técnica dolorosa e invasiva. Por otro lado, si bien los hemocultivos son de fácil obtención, su sensibilidad es muy variable ya que el porcentaje de casos con cultivo positivo oscila en un rango del 15 al 70% [16].

Entre las pruebas serológicas, la técnica de aglutinación en tubo es la más antigua y la más utilizada para el diagnóstico de la brucelosis en fase aguda por permitir la detección de anticuerpos séricos IgM, IgA e IgG. Por otra parte, la prueba de aglutinación 2-mercaptoetanol y la técnica de fijación del complemento son utilizadas para la detección de anticuerpos IgG que predominan en casos crónicos [2, 6].

Una alternativa a las técnicas convencionales es la PCR (de sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*), es más sensible que el cultivo y más específica que las pruebas serológicas, entre las ventajas cabe destacar que permite el diagnóstico temprano de la enfermedad y la detección de *Brucella* en muestras de diversos orígenes como leche y queso [17, 18].

El tratamiento de los pacientes con brucelosis incluye la combinación de antibióticos con efecto sinérgico, administrados durante varias semanas para reducir la aparición de recaídas. Las combinaciones más usadas son las propuestas por la Organización Mundial de la Salud que contemplan dos opciones; ambas incluyen la doxiciclina durante 6 semanas, combinada con estreptomocina durante 2 a 3 semanas, o rifampicina durante 6 semanas [16]. Si bien ambos esquemas poseen un elevado promedio de curación (mayor al 95%), el tratamiento de elección es doxiciclina/estreptomocina por presentar el índice más bajo de pacientes con recaídas [19].

En la actualidad no existe una vacuna para el control de la brucelosis en humanos, sin embargo se han desarrollado diferentes vacunas para prevenir la enfermedad en el ganado y las más utilizadas provienen de cepas vivas atenuadas. Para inmunizar al ganado bovino se utilizan principalmente las vacunas *B. abortus* cepa 19 (S19) y la cepa rugosa *B. abortus* RB51; para el ganado caprino se emplea la vacuna atenuada Rev-1, derivada de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056. El mayor inconveniente de estas vacunas es que son patógenas para el hombre, pueden causar abortos en animales gestantes y además la S19 y Rev-1 interfieren con la serología utilizada para el diagnóstico de la enfermedad [20, 21].

FUENTES Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

Brucelosis en humanos

Los animales domésticos infectados con *Brucella* constituyen la principal fuente de infección para el hombre, principalmente los bovinos, caprinos, porcinos y ovinos. Los perros y animales salvajes (liebres, conejos, zorros, etc.) también son reservorios naturales y por lo tanto una fuente de contagio [22].

Es considerada una enfermedad ocupacional ya que está prácticamente restringida a los trabajadores rurales, veterinarios, matarifes y ganaderos; también puede afectar a trabajadores de laboratorio o de servicios de salud. Sin embargo, en las zonas endémicas el peligro de infección no está limitado a las ocupaciones de riesgo [23].

El hombre puede infectarse con *Brucella* por el contacto de la piel erosionada, conjuntiva o mucosa nasal con tejidos de animales infectados o sus productos como sangre, orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados y en especial placentas. Este mecanismo es el más frecuente en el medio rural y puede llegar a ser el responsable del 60%-70% de todos los casos registrados. Otra forma de transmisión es la ingesta de alimentos no pasteurizados de origen animal, como leche y sus derivados (quesos, crema, manteca, helados). La bacteria también puede ingresar al organismo por el sistema

respiratorio, al inhalar aerosoles contaminados, o por la inoculación directa de material contaminado [2]. Si bien es poco frecuente, otra vía de transmisión es la transplacentaria originada cuando una mujer embarazada contagia al feto a través de la placenta produciendo el aborto o el nacimiento de niños infectados [23].

Brucelosis animal

En el ganado, la principal forma de contagio es por vía digestiva, esta se produce cuando los animales lamen fetos abortados, placentas, terneros recién nacidos o los genitales de otros animales. También es importante la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con secreciones vaginales y leche de hembras enfermas [24]. La infección también puede ocurrir a través de las mucosas oculares y nasales [20]. Aunque poco frecuente, otras vías de ingresos de la bacteria son las mucosas: anal, prepucial, mamaria y uterina. Asimismo, la brucelosis puede transmitirse a través de la inseminación artificial y vía congénita, de la madre a las crías y estos animales quedar persistentemente infectados [20]. En bovinos, la brucelosis no es una enfermedad venérea, sin embargo los caninos y porcinos pueden infectarse por vía sexual [24].

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Brucelosis en humanos

La brucelosis es una enfermedad proteiforme y sistémica que no presenta un cuadro clínico característico que permita la detección precoz del individuo infectado. Esto favorece la evolución a la cronicidad, complicando las alternativas terapéuticas y la curación definitiva. Si bien la mortalidad por brucelosis es baja, puede dejar secuelas discapacitantes de magnitud variable [19, 25].

La brucelosis puede ser clasificada como aguda, subaguda o crónica en base al tiempo de evolución de la misma [26, 27]. La virulencia y la tendencia a la cronicidad varían entre especies de *Brucella*, siendo *B. abortus* y *B. suis* las de mayor propensión a la cronicidad. Por el contrario, *B. melitensis* produce las infecciones más severas, tanto en humanos como en animales [27]. La etapa aguda se manifiesta con fiebre elevada, escalofríos, sudoración de olor característico, dolores musculares y articulares [26]. Es difícil la identificación de la enfermedad en esta etapa, ya que los signos y síntomas pueden ser comunes a otras enfermedades como la fiebre tifoidea, la tuberculosis y la leptospirosis. El recuento de células en sangre se caracteriza usualmente por una leucopenia moderada y una relativa linfocitosis, junto con una leve anemia y trombocitopenia [16].

La brucelosis osteoarticular es la complicación más frecuente, puede presentarse como artritis periférica, sacroileítis, espondilitis, osteomielitis y bursitis [25, 28, 29]. En el sistema genitourinario, la localización más común es en testículo y epidídimo, también puede afectar a los riñones provocando nefritis, oliguria y albuminuria. En la mujer, la infección adquirida durante el embarazo constituye un riesgo de aborto espontáneo [23]. Por otro lado, si bien el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular son localizaciones poco frecuentes de la bacteria, cuando se ven afectados las consecuencias pueden ser severas y permanentes, siendo la complicación cardiovascular la principal causa de mortalidad en pacientes con brucelosis [23]. También se han descrito afecciones oculares como inflamación de la córnea y úvea, queratoconjuntivitis, neuritis óptica, y cataratas [2]. La mayoría de los pacientes con brucelosis, indistintamente de la ruta de infección, experimentan síntomas gastrointestinales que incluyen anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos y dolor abdominal [25]. Éstos pacientes pueden presentar manifestaciones clínicas como esplenomegalia, hepatomegalia, hepatitis granulomatosa y en ocasiones abscesos hepáticos, inflamación de la vesícula biliar, del peritoneo y páncreas, obstrucción o perforación intestinal y colitis erosiva [23].

Brucelosis animal

En los animales, después de la infección, las hembras adultas en gestación desarrollan una placentitis que conduce al aborto en periodos avanzados de la gestación [20]. También se puede observar infertilidad, retención placentaria, nacimientos prematuros o a término de crías débiles o muertas, camadas pequeñas en el caso de las hembras politocas (perra y cerda), metritis y disminución de la producción láctea. En general, las hembras adultas no gestantes infectadas son asintomáticas [2]. La infección en los machos puede producir orquitis que cursa con escroto distendido por la presencia de exudado hemorrágico y/o fibrinopurulento. También pueden estar afectados el epidídimo y la vesícula seminal. La afección del sistema reproductivo conduce a la pérdida temporal o permanente de la fertilidad [24]. También puede presentarse hepatomegalia, esplenomegalia, artritis, discoespondilitis, alteración oftalmológica, decaimiento y anorexia en periodos de bacteriemia [2].

ETIOLOGÍA

Brucella spp.

Las especies del género *Brucella* pertenecen a la clase α -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae [30]. El género *Brucella* está compuesto por cocobacilos Gram negativos pequeños, aerobios estrictos y de crecimiento lento. No poseen cápsulas ni flagelos, tampoco forman esporas y pueden

sobrevivir en medio bacteriológico o en el medio ambiente aunque su nicho preferencial es el intracelular [31]. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está compuesto por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos [32]. La única excepción dentro del género lo constituye la biovariedad 3 de *B. suis* que cuenta con un único cromosoma de gran tamaño [33].

El género *Brucella* es un género en expansión. Históricamente constaba de 6 especies clásicas clasificadas de acuerdo a variaciones antigénicas y a su hospedador preferencial. Estas eran: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. canis* y *B. ovis*. Actualmente también se reconocen biovariedades dentro de las 3 especies clásicas más importantes: *B. abortus* cuenta con 8, *B. melitensis* con 3 y *B. suis* posee 5 biovariedades. Las primeras nuevas incorporaciones al género correspondieron a especies aisladas de animales marinos: *B. pinnipedialis* y *B. ceti* [34]. En 2008 se reportaron otras 2 nuevas especies: *B. microti*, aislada en un primer momento de ratones salvajes [35] y luego encontrada también en zorros rojos [36] y como contaminante en el suelo [37], y *B. inopinata*, la cual fue aislada de un implante mamario [38, 39]. A su vez, también se aisló la cepa de *Brucella* BO2 de un paciente con enfermedad pulmonar crónica y se determinó que tiene una gran similitud a *B. inopinata* [40]. En el año 2014 se estableció una nueva especie aislada a partir de crías nacidas muertas de mandriles, *B. papionis* [41]. Otra especie recientemente aislada es *B. vulpis* la cual fue hallada en los nódulos linfáticos de zorros rojos en Austria en el año 2016 [42]. Otras incorporaciones recientes corresponden a cepas aisladas de ranas como la rana arbórea africana (*Pyxicephalus adspersus*) [43], la rana arbórea de ojos grandes de África (*Leptopelis vermiculatus*) [44] y la rana arbórea verde de Australia (*Litoria caerulea*) [45]. El primer caso de infección por *Brucella* de un anfibio en América, fue hallado en una rana Pac-Man (*Ceratophryus ornate*) en un hospital veterinario de Texas [46]. Los análisis filogenéticos revelaron que los microorganismos aislados de ranas están estrechamente relacionados con las cepas de *Brucella inopinata* BO1 y BO2 [47].

En los últimos años, se han logrado secuenciar la mayoría de los genomas de las especies de *Brucella* y esto permitió demostrar que el género es altamente homogéneo. Los genomas de las 6 especies clásicas de *Brucella* tienen una homología mayor al 90% [32].

De las especies clásicas de *Brucella* sólo 4 son patógenas para el hombre: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*. De ellas, las tres primeras son responsables de la mayoría de los casos de brucelosis humana [1, 48, 49]. En los últimos años también se reconoció el potencial zoonótico de las especies marinas y su aparente tendencia a las formas complicadas de la enfermedad como la neurobrucelosis

[50, 51]. Por otra parte, *B. inopinata* fue aislada de un caso humano si bien no se conoce su reservorio natural ni su ecología (**Tabla 1**) [39, 40].

Las especies de *Brucella* se clasifican generalmente como lisas (S) o rugosas (R), de acuerdo al aspecto de las colonias que forman en medio sólido (**Tabla 1**). Estas diferencias en el fenotipo de la colonia se deben a diferencias en la composición química del lipopolisacárido (LPS) expresado en la superficie bacteriana. Además, existe una relación entre el tipo de colonia y la virulencia; las cepas lisas son más virulentas [52]

CLASIFICACIÓN	ESPECIE	HOSPEDADOR PREFERENCIAL	NIVEL DE PATOGENICIDAD EN HUMANOS
Especies Lisas	<i>B. melitensis</i>	Caprinos, ovinos, camélidos	Elevada.
	<i>B. abortus</i>	Bovinos, camélidos, búfalos, bisontes	Moderada.
	<i>B. suis</i>	Porcinos, renos, caribúes, roedores	Moderada.
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	No reportada
	<i>B. pinnipediae</i>	Focas, lobos marinos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	<i>B. cetaceae</i>	Delfines, focénidos	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (neurobrucelosis, espondilitis).
	<i>B. microti</i>	Roedores salvajes	No reportada.
	<i>B. inopinata</i>	Desconocido	Aislada de un caso humano.
	<i>B. papionis</i>	Mandriles	No reportada.
	<i>B. vulpis</i>	Zorro rojo	No reportada.
	<i>Especies relacionadas con Brucella inopinata</i> cepa BO1 y <i>Brucella inopinata</i> - cepa BO2	Anfibios	No reportada
Especies Rugosas	<i>B. ovis</i>	Ovinos	No reportada.
	<i>B. canis</i>	Caninos	Moderada.

Tabla 1. Características de las especies del género *Brucella* [49, 53-55].

Composición de la membrana y estructura antigénica

Al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, las bacterias del género *Brucella* poseen una envoltura celular, la cual está formada por una membrana interna y una membrana externa, las cuales delimitan un espacio periplasmático intermedio. Éste espacio contiene componentes solubles y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (**Imagen 3**) [56].

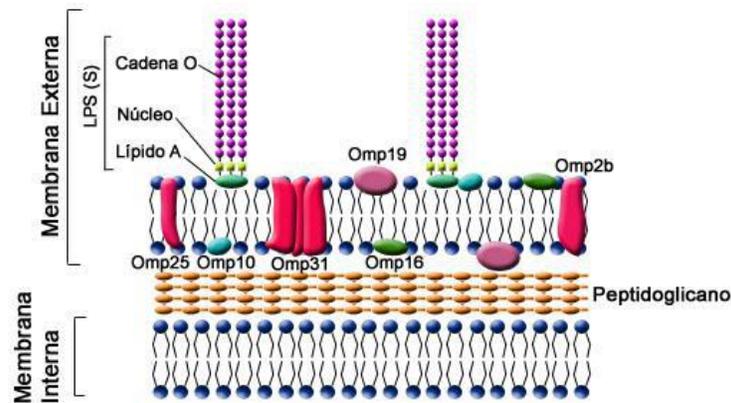


Imagen 3. Esquema representativo de la membrana de las especies lisas de *Brucella* spp.

La membrana externa de *Brucella* contiene proteínas, fosfolípidos y un lipopolisacárido (LPS), considerado como el principal antígeno en las bacterias Gram negativas [57]. El LPS es una molécula anfipática que consta de una parte exclusivamente polisacáridica dirigida hacia el exterior, y otra parte glucolipídica (lípidos A) inserta en la membrana externa, y por lo tanto no expuesta a la superficie. La parte polisacáridica del LPS se divide en dos secciones: un oligosacárido intermedio, llamado núcleo; y la cadena O. Esta última es la estructura antigénica más expuesta de la bacteria, la cual está ausente en el LPS de cepas rugosas (LPS-R).

Las bacterias del género *Brucella* poseen un LPS atípico en comparación con el clásico LPS de las enterobacterias como *Escherichia coli* [58]. La estructura básica del lípidos A está formada por un disacárido 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa (diaminoglucosa) unido en configuración β 1-6, y también por ácidos grasos saturados de cadena larga ligados mediante uniones éster o amida (C16:0 a C18:0) e hidroxilados (3-OH-C12:0 a 29-OH-C30:0). Se encuentra inmerso en la capa lipídica actuando como soporte o unión del resto de la molécula a la superficie bacteriana. El lípidos A de *Brucella*, a diferencia del lípidos A de la mayoría de las enterobacterias se caracteriza por su alta hidrofobicidad, su bajo grado de sustitución y por poseer cadenas alifáticas más largas [59]. El núcleo está compuesto por glucosa,

manosa, 2-amino-2,6-dideoxi-D-glucosa (quinovosamina), 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (glucosamina), ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y otros azúcares aún no identificados. La cadena O de las cepas lisas es un homopolímero no ramificado compuesto por 4,6-dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo unidos en configuración α -1,2 usualmente con una longitud de cadena media de 96 a 100 subunidades glicosílicas [60]. Las moléculas de LPS de las especies clásicas de *Brucella* se caracterizan también por su heterogeneidad a nivel, no sólo de la cadena O, sino también a nivel del núcleo y del lípido [61]. Asimismo, se describió la presencia de moléculas de LPS atípicas en las nuevas especies de *Brucella* emergentes en particular a nivel de los epitopes antigénicos dominantes A y M [54].

Asociadas al LPS y formando parte de la membrana se encuentran proteínas de la membrana externa (Omps), muchas de las cuales han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional [62]. Estas proteínas se han dividido en 3 grupos de acuerdo a su peso molecular: grupo 1 (88 o 94 kDa); grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa) [63]. Las Omps del grupo 2 fueron clasificadas como porinas y lipoproteínas que tienen semejanza a la lipoproteína de Braun de *E. coli* [64]. A su vez, las proteínas de los grupos 2 (Omp2a y Omp2b) y 3 (Omp25 y Omp31) se encuentran en mayor cantidad y son conocidas como Omps “mayores”. Las proteínas del grupo 1 junto con otras con pesos moleculares entre 10 y 20 kDa (Omp19, Omp16 y Omp10), son denominadas Omps “menores” [56]. Estos tres grupos de proteínas se encuentran expuestos en la membrana externa, y son reconocidos por el sistema inmune en el curso de la infección (**Imagen 3**) [65]. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas [66, 67].

Además de las diferencias en cuanto a su LPS, existen diferencias en cuanto a la membrana externa de las bacterias del género *Brucella* con respecto a las de otras Proteobacterias Gram negativas [68]. En varios estudios se reportó la incapacidad de extraer la envoltura celular de *Brucella* por los métodos estándares y también se determinó que estas bacterias son sensibles al uso de medios estándares utilizados para otras bacterias Gram negativas. La membrana externa de *Brucella* tiene la tendencia a generar evaginaciones (“blebs”) espontáneas las cuales contienen componentes de la superficie celular y del espacio periplásmico [69-72].

A su vez, la membrana externa de *Brucella* forma una bicapa más estable comparada a la de otras bacterias Gram negativas debido tal vez a una mayor presencia del lípido fosfatidilcolina en la composición de su membrana externa en comparación a fosfatidiletanolamina en otras bacterias Gram negativas. Los ácidos grasos en *Brucella* tienden a tener cadenas de acilos más largas por lo cual se

propuso un modelo de membrana más extenso que el de bacterias Gram negativas convencionales [56]. Las interacciones entre las proteínas de la membrana externa (Omp; Outer membrane protein) de *Brucella* y los otros componentes de la membrana externa también tienden a ser más hidrofóbicas que en otras bacterias Gram negativas. A su vez, las Omps de *Brucella* poseen un dominio hidrofóbico que les permite la interacción con la capa de peptidoglicano y la superficie [73]. Por otra parte, se propuso que una porción de las Omps de *Brucella* podría estar covalentemente anclada a la capa de peptidoglicano [74, 75]. Si bien la inactivación de *Brucella* por calor causa el colapso de la membrana interna, la membrana externa mantiene su morfología intacta lo que sugiere que la membrana externa de *Brucella* posee una mayor rigidez en comparación a la de otras bacterias Gram negativas [68]. Debido a las características del LPS, sustratos hidrofóbicos fácilmente permean la membrana externa de *Brucella* [64, 76]. Además, su resistencia a los policaciones también le confiere resistencia a los sistemas bactericidas independientes del oxígeno de los fagocitos [77, 78].

Biología de *Brucella sp.* y tráfico intracelular.

Las bacterias de este género se comportan como patógenos intracelulares facultativos capaces de sobrevivir y replicar dentro de células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas. La principal vía de ingreso son las membranas mucosas del tracto respiratorio e intestinal, luego las bacterias se diseminan a tejidos preferenciales por medio de un tropismo celular, por ejemplo, hacia los trofoblastos placentarios en hembras embarazadas, al pulmón fetal, al sistema reticuloendotelial y al tracto reproductivo [1, 79, 80]. Si bien se considera que el nicho intracelular preferencial de las bacterias son las células fagocíticas y los trofoblastos placentarios, también son capaces de infectar otros tipos celulares como células endoteliales, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, hepatocitos, células estrelladas hepáticas, linfocitos B y T y células del sistema nervioso [81-88].

Los mecanismos de ingreso de la bacteria a todos estos tipos celulares no han sido del todo investigados. Sin embargo, el tráfico intracelular en células epiteliales y macrófagos ha sido intensamente estudiado en los últimos años. En cuanto a los hallazgos obtenidos en células epiteliales, *Brucella* induce un mecanismo de tipo cremallera (“zipper-like”) para su internalización. La entrada ocurre a los pocos minutos de la interacción con la superficie de las células epiteliales y requiere de la activación de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [89]. *Brucella* sobrevive y se multiplica dentro de células fagocíticas no-profesionales por hasta 72 hs *in vitro* y se mueve a través del

epitelio *in vivo* evadiendo la función de barrera epitelial para facilitar la migración transepitelial de las bacterias [80, 90].

En cuanto a los macrófagos, las cepas lisas de *Brucella* entran a través de sitios en la membrana celular ricos en colesterol conocidos como “lipid rafts” o microdominios lipídicos. Este mecanismo de entrada a través de “lipid rafts” pareciera ser clave para la supervivencia de las bacterias en los macrófagos infectados, ya que la disrupción farmacológica de los “lipid rafts” lleva a una fagocitosis independiente de los mismos y a la posterior eliminación de todas las bacterias fagocitadas [91]. Se han propuesto dos receptores a través de los cuales los macrófagos internalizan a *Brucella*: el receptor Scavenger de clase A (SR-A) que interactúa con el LPS y la proteína celular priónica (PrPC), la cual se une a la molécula Hsp60 presente en la superficie de *B. abortus* [92]. Sin embargo, el rol de este último receptor no se extendería a todas las especies de *Brucella* ya que otro estudio demostró que no participaba en la entrada de *B. suis* en macrófagos [93]. Por otro lado, tanto en células epiteliales como en macrófagos se ha demostrado que *Brucella* se une a receptores de superficie que contienen ácido siálico y residuos sulfatados [81].

En el caso de las bacterias opsonizadas, éstas ingresan dentro de los macrófagos a través de receptores Fc para IgG y por lo tanto, de manera independiente de “lipid rafts”. A pesar de esto, tanto las bacterias opsonizadas como las no opsonizadas son capaces de multiplicarse si bien la naturaleza del compartimiento replicativo donde residen es distinta [94]. La opsonización permite el ingreso de más bacterias dentro de las células pero a la vez, disminuye su capacidad de crecimiento intracelular [93, 95].

Una vez dentro de los macrófagos, estos microorganismos residen en una vacuola denominada vacuola conteniendo a *Brucella* (VCB) o “brucellosoma”, la cual interactúa con las vías endocítica y secretorias para asegurar la supervivencia bacteriana. La VCB recién formada interactúa con endosomas tempranos y adquiere marcadores como el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) y la proteína de unión a GTP Rab5 [96-98]. Estas interacciones ocurren inmediatamente luego de la internalización y son transitorias. En experimentos realizados con macrófagos murinos infectados con *B. abortus* se ha demostrado que hay una disminución inicial del número de organismos luego de la fagocitosis. Durante esta etapa hasta un 90-99% de los organismos son eliminados, mientras que las bacterias que logran sobrevivir se replican posteriormente [99].

La VCB luego adquiere marcadores endocíticos tardíos/lisosomales como Rab7 y su efector, la proteína lisosomal que interactúa con Rab (RILP), LAMP-1 y CD63. Los eventos de fusión con endosomas

tardíos/lisosomas son limitados y controlados. Sin embargo, tanto estas interacciones como también la acidificación de la VCB son importantes para la correcta maduración del compartimiento replicativo [100]. La disminución del pH de la VCB facilita la expresión de genes que son necesarios para la supervivencia y división intracelular de *Brucella*. El factor de virulencia más importante que se induce por la acidez del medio es el sistema de secreción tipo 4 (SST4) el cual está codificado por el operón *VirB* presente en el cromosoma II [101, 102]. Este aparato de secreción es esencial para la supervivencia de *Brucella* dentro de macrófagos y células epiteliales ya que las mutantes que carecen de cualquiera de los genes *virB* son incapaces de replicar intracelularmente [101, 103, 104].

Después de su paso por endosomas tardíos, la VCB se asocia al retículo endoplasmático (RE) rugoso y la replicación de las bacterias tiene lugar en VCBs que contienen una única bacteria y sus membranas cargadas de ribosomas [98]. La VCB es capaz de interceptar vesículas membranosas que trafican hacia el aparato de Golgi, provenientes de los sitios de salida del RE [105, 106]. La captación de membranas y componentes del RE por parte de la VCB se acompaña de una fuerte reorganización tanto estructural como funcional del RE [98].

Por último, la VCB adquiere características autofágicas y vuelve a entrar en la vía endocítica para completar su ciclo de vida intracelular. En esta etapa, la VCB vuelve a ser positiva para el marcador LAMP-1, envuelve a varias bacterias a la vez y posee múltiples membranas. La formación de las VCBs requiere de las proteínas de iniciación de la autofagia: Beclin1, ULK1 y Atg14L pero no de las proteínas implicadas en la etapa de elongación (Atg5, Atg7, LC3B, Atg16L, Atg4B). La formación de esta VCB autofágica sería necesaria para promover la liberación de las bacterias y contribuir a la infección de células adyacentes **(Imagen 4)** [107].

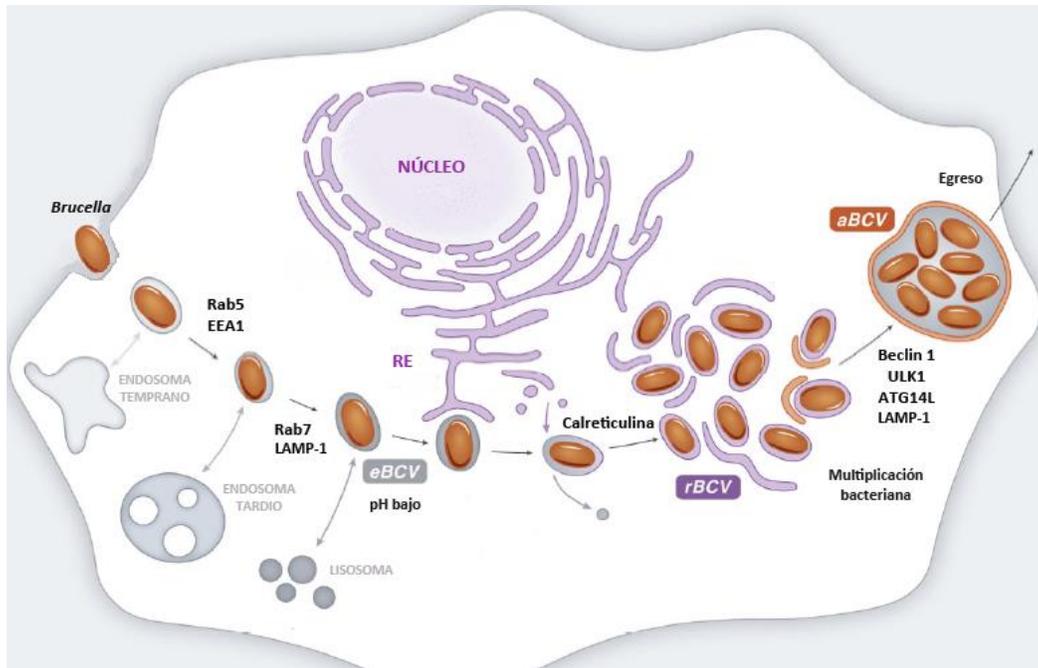


Imagen 4: Modelo del tráfico intracelular de *Brucella*. Modificado de [108]

El sistema de secreción de tipo 4

El sistema de secreción de tipo 4 (SST4) es un factor de virulencia de gran relevancia para algunas bacterias Gram negativas patógenas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* y las del género *Brucella* [109]. Estos sistemas de secreción son complejos multiproteicos macromoleculares asociados a membranas utilizados para el transporte de proteínas o material genético a través de la envoltura celular de bacterias Gram negativas al espacio extracelular o a otras células [110, 111]. Este aparato de secreción es imprescindible para la replicación intracelular, supervivencia y virulencia de *Brucella*, está implicado en el tráfico intracelular de la VCB y en el control de la respuesta inmune del hospedador [101, 112]. El SST4 funcional es necesario para establecer y mantener una infección persistente [95, 98, 110, 113-116]. Se encuentra constituido por 12 proteínas, denominadas VirB1 a VirB12, siendo los componentes VirB2-VirB6 y VirB8-11 imprescindibles para su función [95, 98, 104, 110, 113-116]. En cuanto a la organización génica, el aparato está codificado por el operón *virB* que se localiza en el cromosoma II y está constituido por 12 marcos abiertos de lectura (*virB1* a *virB12*) [102]; el operón *virB* está regulado por un único promotor corriente arriba de *virB1* y se encuentra conservado entre las diferentes especies de *Brucella* [111].

El SST4 es esencial para la multiplicación intracelular de *Brucella* en células epiteliales humanas (células HeLa), en macrófagos murinos derivados de médula ósea, en diferentes líneas de

monocitos/macrófagos, en células dendríticas y en hepatocitos durante la infección [83, 98, 112, 117-119]. Si bien *in vitro* la mutante *virB* es eliminada luego de 24 hs de infección, en experimentos *in vivo*, realizados tanto en el modelo murino como en hospedadores naturales (caprinos y bovinos), se ha demostrado que el SST4 no es necesario para la colonización sistémica inicial pero si lo es para la persistencia crónica [90, 95, 112, 120-123]. Al infectar ratones con la mutante *virB* se puso en evidencia que su capacidad de colonización es la misma a la de la bacteria “wild type, WT”, es capaz de diseminarse a diferentes sitios como nódulos linfáticos, hígado y bazo; no obstante, su número comienza a declinar luego del día 5 post-infección poniendo en evidencia que el sistema es fundamental para la persistencia de la infección más allá de los 3 días post-infección [95].

El mecanismo por el cual el SST4 contribuye a la supervivencia y multiplicación de la bacteria se basa en la manipulación del tráfico intracelular para establecer el nicho replicativo en el RE y evadir la degradación lisosomal [124]. Las bacterias deficientes en el SST4 son capaces de invadir a la célula hospedadora y pueden interactuar con los endosomas tempranos y tardíos. Se observó que la cinética de adquisición y pérdida del marcador de endosoma temprano (EEA1), así como también la cinética de adquisición de la proteína lisosomal LAMP-1 de las cepas mutantes no difieren de las de la cepa salvaje, indicando que el sistema VirB de *Brucella* no participa en la dirección del tráfico intracelular durante los primeros estadios de la infección [99, 103, 117]. No obstante, a diferencia de *Brucella* WT, la VCB que contiene a la mutante no excluye a LAMP-1 y permanece positiva para dicho marcador, por lo tanto son un blanco para los lisosomas y eventualmente las bacterias son degradadas [98, 103, 117]. En consecuencia, la mutante *virB* no completa el ciclo intracelular, no logra escapar de los endosomas tardíos para alcanzar el RE, multiplicarse y utilizar las vacuolas autofágicas para sobrevivir [107, 125]. El SST4 codificado por el operón *virB* de *Brucella* cumple un rol fundamental en el control del tráfico intracelular de *Brucella* e interviene en el control de la maduración de la VCB, siendo esencial para que la bacteria evite la degradación lisosomal y alcance su nicho replicativo [98, 117].

Brucella utiliza varios mecanismos para evitar el reconocimiento por el sistema inmune del huésped, y provoca una respuesta inmune mucho menor comparada a otras infecciones bacterianas [126]. A diferencia de *Brucella* WT, que estimula la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamación, la infección con la mutante *virB* no es capaz de inducir cambios en el perfil transcriptómico de los genes asociados a la inmunidad del huésped [127]. A su vez, se ha demostrado que el SST4 contribuye a la polarización de la respuesta inmune del hospedador hacia un perfil Th1, ya que los ratones infectados con la mutante *virB* presentan niveles séricos más bajos de IgG2a, interferón gamma

(IFN- γ) y de interleuquina (IL)-12p40 respecto de los infectados con la bacteria WT [128]. Además, se ha descrito que el SST4 es esencial para la completa activación del inflammasoma y la consecuente producción de IL-1 β en macrófagos murinos [129].

Los sustratos que son translocados por el SST4 son denominados “efectores” debido a que son capaces de modular la respuesta de las células infectadas [111]. Hasta el momento se han identificado sólo 15 efectores que son transportados de forma dependiente del sistema VirB de *Brucella* [111, 124]. En la mayoría de los casos, la estructura, la función y el blanco molecular de estos sustratos es desconocida [124]. Los efectores secretados por el SST4 tienen actividades inhibitorias de la inflamación en las células huésped. Por lo tanto, la pérdida de un SST4 funcional puede conducir a una disminución de la secreción efectora y a una respuesta inmune regulada. En *Brucella*, los efectores del SST4 podrían funcionar en los siguientes eventos moleculares asociados con la infección: (1) exclusión de marcadores de endosomas tardíos o lisosomas, (2) adquisición de marcadores de RE, (3) interactuando con vías secretorias, (4) adquisición de marcadores de autofagosomas, (5) resistiendo en el ambiente intracelular y (6) regulando la activación de las vías inmunitarias vitales [124].

Al realizar un análisis de los genes coregulados por VjbR, el regulador del operón *virB*, se identificaron los primeros sustratos VceA y VceC. El efector VceC contiene una región rica en prolina capaz de unirse a una chaperona del RE (Bip/Grp78), además se ha descrito que VceC activa la respuesta a proteínas desplegadas, causa estrés del RE e induce una respuesta inflamatoria durante la infección [130].

RicA (de sus siglas en inglés *Rab2 Interacting Conserved protein A*) es una proteína de 175 aminoácidos capaz de unirse a GDP-Rab2, una GTPasa necesaria para el tráfico intracelular de la bacteria. Aunque la depleción de RicA no modifica la capacidad de *Brucella* de ingresar y sobrevivir en células HeLa, las mutantes inducen un reclutamiento menor de Rab2 en la VCB y excluyen más rápidamente a LAMP-1, mostrando una cinética del tráfico intracelular alterado y una mayor proliferación bacteriana que *Brucella* WT [111, 131].

Se han identificado también, dos proteínas de *Brucella* que contienen dominios TIR y son secretadas por el SST4 a la célula hospedadora donde participan en el control de la respuesta inflamatoria al inhibir la señalización de los TLRs (de sus siglas en inglés *Toll like receptors*). Ambas proteínas inhiben la maduración de las células dendríticas y son fundamentales para la virulencia [132, 133]. La proteína BtpA (también denominada Btp1/TcpB) fue la primera en ser descubierta. Se ha demostrado que BtpA inhibe

la maduración de las células dendríticas, la activación de NF- κ B inducida por MAL (de sus siglas en inglés MyD88 adapter-like) así como también la señalización de TLR2 y TLR4 [122, 134-137], sin embargo el mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado. Trabajos recientes demostraron que BtpA interactúa con MAL, MyD88 y TLR4 y sugieren que BtpA estaría compitiendo con MAL por la unión con TLR4 [133, 136-138], y no con MyD88 como fue sugerido por otros autores [122]. La proteína BtpB que también contiene dominios TIR mostró una eficiencia de translocación notablemente menor a la de la proteína BtpA [124]. En estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que BtpB es un inhibidor potente de TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 y en conjunto con BtpA participa en el control de la maduración de las células dendríticas [132].

Las proteínas efectoras BPE005, BPE123, BPE275 y BPE043 fueron identificadas a través de análisis bioinformático y ensayos con el sistema reportero de la adenilato ciclasa (CyaA). Estos sustratos se encuentran conservados entre las diferentes especies de *Brucella*. La proteína BPE005, está compuesta por 153 aminoácidos que llevan un dominio de unión a nucleótido monofosfato cíclico (NMPC), que en las células hepáticas estrelladas induce la deposición de colágeno e inhibe la expresión de la metaloproteasa de matriz (MMP)-9 mediante un mecanismo que involucra al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [139, 140], BPE043 es una proteína de 1553 aminoácidos, con 2 dominios transmembrana y 4 dominios de apolipoproteína. BPE275 contiene 253 aminoácidos y es un miembro de la familia romboide, una familia de serina proteasas. Por otro lado, BPE123 es una proteína de 17 kDa con un motivo dimérico “coiled-coil”, una estructura implicada en las interacciones proteína-proteína que participa en varios procesos celulares [139]. En macrófagos derivados de médula ósea infectados con *B. abortus*, la α -enolasa humana (ENO-1) se asocia a VCBs de una manera dependiente de BPE123, lo que indica que la interacción con BPE123 translocada también está ocurriendo durante la fase intracelular de la bacteria. La interacción entre BPE123 y la ENO-1 induce cambios estructurales y / o funcionales que explican la activación de la α -enolasa de la célula huésped [141].

Los efectores BspA, BspB y BspF, BspC y BspE (del inglés “*Brucella secreted proteins*”), fueron identificados utilizando una estrategia similar a la utilizada para la identificación de las proteínas efectoras BPE [142]. A través de la expresión ectópica se evidenció que estos efectores presentan diferentes localizaciones intracelulares: BspA y BspB se localizan en el RE, BspC en el aparato de Golgi, BspE forma vesículas discretas ubicadas predominantemente en el área perinuclear mientras que BspF se encuentra en el citoplasma y en la membrana plasmática. En cuanto a su función, BspA, BspB y BspF inhiben la secreción proteica durante la infección y contribuyen a la biogénesis de la VCB, a la replicación

de *Brucella* en macrófagos y a la persistencia crónica de la bacteria en el hígado de ratones infectados [142].

SepA es, hasta el momento, el último sustrato dependiente del SST4 de *Bucella* identificado. Esta es una proteína de 130 aminoácidos. La secreción de SepA ocurre en las etapas muy tempranas de la infección, de una manera dependiente del SST4. Este es un proceso de dos pasos donde una proteína intermediaria es secretada al espacio peri plasmático. La mutante deficiente de SepA presenta alterada la multiplicación intracelular debido a su capacidad reducida de evitar la fusión con los lisosomas, sin embargo son más invasivas que la bacteria WT [143].

RESPUESTA INMUNE CONTRA *BRUCELLA SPP.*

Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos invasivos. Dentro de sus componentes se incluyen barreras anatómicas (la piel y epitelios internos), moléculas secretorias (citoquinas y quemoquinas, el sistema del complemento y distintas opsoninas) y poblaciones celulares tales como los fagocitos (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas), y las células linfoides innatas (células *natural killer* (NK) y células T $\gamma\delta$).

Las células del sistema inmune innato contribuyen a controlar las infecciones, no sólo por su rol como células efectoras, sino también porque inician y dirigen la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil funcional determinado. En particular, los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse en distintos perfiles (Th1, Th2, Th17 y Treg, entre otros), los cuales se caracterizan por la producción de diferentes citoquinas y median diferentes funciones inmunitarias. Las principales células que realizan esta tarea son los macrófagos y las células dendríticas, a través de su habilidad de producir mediadores proinflamatorios (IL-12, IL-23, etc) y expresar determinadas moléculas coestimuladoras (CD80/CD86, CD40, etc.) [144].

En estadios tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es prevenir la replicación y reducir el número inicial de bacterias promoviendo un ambiente adecuado para generar una respuesta adaptativa robusta. Los macrófagos, las células dendríticas, los neutrófilos y el complemento participan con distintos roles en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo [145].

Células de la inmunidad innata

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la inmunidad frente a *Brucella*, ya que como fue mencionado, constituyen el nicho preferencial de multiplicación de la bacteria. Estas células cumplen un papel dual en la infección frente a *Brucella*: por un lado, permiten la replicación y supervivencia de las bacterias durante las etapas tempranas de la infección; no obstante, en los estadios tardíos y, en particular una vez que se estableció la inmunidad adaptativa, los macrófagos activados son los principales responsables de la eliminación de *Brucella*. Esta actividad bactericida es inducida principalmente por el IFN- γ , y en segundo lugar por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α y reside en la capacidad de estas células de realizar el estallido respiratorio mediante la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno [146, 147].

Por su parte, las células dendríticas humanas y murinas son susceptibles a la infección por *Brucella* [134, 148, 149]. A su vez, en nuestro laboratorio demostramos que la infección con *B. abortus* induce la expresión de las moléculas CD86, CD80, CCR7, CD83, CD40 y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, como también la secreción de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12. No sólo eso, sino que las lipoproteínas de la membrana externa de *B. abortus* serían las que inducen la maduración de estas células generando una respuesta de tipo Th1 [150].

En cuanto a las células NK, *in vitro* se demostró que el cocultivo de estas células con macrófagos infectados con *B. suis* activa a las NK para producir IFN- γ , TNF- α y destruir a dichos macrófagos [151]. Las células NK también parecen ser importantes para la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos [152]. A pesar de estos antecedentes, estas células no tendrían un rol crucial en el control de la brucelosis murina, ya que su depleción *in vivo* no afecta el curso de la infección en ratones [153] como así tampoco en humanos, donde se describió una disminuida actividad citotóxica por parte de células NK en pacientes con brucelosis aguda [154].

Finalmente, en nuestro laboratorio demostramos que *B. abortus* es capaz de activar neutrófilos humanos y prolongar su sobrevivencia *in vitro*. Este efecto también es mediado por las lipoproteínas de la membrana externa de *Brucella* y estaría asociado a la patogénesis de la brucelosis ya que contribuiría al daño tisular e inflamación localizada características de la enfermedad [155]. El rol de los neutrófilos en el control de la brucelosis *in vivo* también es controversial. En primer lugar, se demostró que estas células no parecieran tener un rol significativo en la eliminación de *Brucella* en las etapas tempranas de la

infección en ratones [126] y por otra parte, la depleción de neutrófilos permite la eliminación de las bacterias de manera más eficiente durante los estadios tardíos de la enfermedad [156].

Receptores, citoquinas y quemoquinas de la inmunidad innata

La primera línea de defensa comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Existen diferentes clases funcionales de PRR, la mejor caracterizada comprende a los TLRs, receptores transmembrana que censan diversos productos microbianos [157]. El rol de los TLRs en la resistencia contra la infección por *Brucella* ha sido intensamente estudiado durante estos últimos años. El TLR2 no parecería tener un rol preponderante en el control de la infección con *B. abortus* en ratones *in vivo* [158, 159]. A pesar de esto, la señalización a través de este receptor contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células inmunes innatas [150, 155, 160, 161]. En contraste, se demostró el requerimiento de TLR9 para la eliminación de *B. abortus* en ratones infectados ejerciendo un papel fundamental en el control de la infección [162], otros muestran que si bien la secreción de TNF- α durante la infección depende de TLR4, este receptor no sería necesario para la eliminación del patógeno [159]. Por último, los ratones deficientes en el adaptador MyD88, (MyD88 $^{-/-}$), común a todos los receptores de tipo TLR menos TLR3, son muy susceptibles a la infección con *Brucella* [159, 162, 163]. Los ratones MyD88 $^{-/-}$ presentan defectos en la maduración de las células dendríticas y ausencia de producción de IL-12 y TNF- α por los macrófagos y las células dendríticas en respuesta a *Brucella* [162]. Existen otros receptores de la inmunidad innata capaces de reconocer y montar una respuesta frente a patógenos intracelulares. Recientemente se han reportado distintos roles tanto de los receptores tipo NOD (NLRs) y los inflamasomas [164] como de los IFN de tipo I y el receptor IFN- $\alpha\beta$ R [165] en la infección con *B. abortus*.

Durante las etapas tempranas de la infección con *Brucella* una de las primeras citoquinas en ser secretada es el TNF- α [93, 160]. Los macrófagos activados por TNF- α son capaces de inhibir la replicación *in vitro* de *Brucella* [93] y además, esta citoquina junto con IL-12 están directamente involucradas en la resistencia a la brucelosis murina [166, 167]. El rol de IL-12 también es importante, no sólo porque esta citoquina juega un rol preponderante en la inducción de una respuesta de tipo Th1 con la consecuente producción de IFN- γ , sino porque los esplenocitos provenientes de ratones depletados de IL-12 tienen una menor capacidad de generar el estallido respiratorio [166]. Asimismo, también ha sido reportada la secreción de IL-6, IL-1 β e IL-10 durante las primeras etapas de la infección [160, 166, 168]. Más allá de dichas citoquinas, tanto macrófagos como células dendríticas infectadas son capaces de producir

quemoquinas en respuesta a la infección con *Brucella*, entre ellas MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, CXCL1 e IL-8 [169, 170].

Inmunidad adaptativa

A pesar de todos los componentes y mecanismos de la inmunidad innata que se activan frente a la infección con *B. abortus*, estos no siempre son suficientes para su erradicación y es absolutamente necesario el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que combata a la infección [147].

Se han identificado 3 mecanismos de la respuesta inmune adaptativa esenciales para el control de la infección por *Brucella*: primero, el IFN- γ producido por células T CD4 $^+$, CD8 $^+$ y $\gamma\delta$ activa las funciones bactericidas del macrófago inhibiendo la supervivencia intracelular de las bacterias [171-174]; segundo, la citotoxicidad T CD8 $^+$ y $\gamma\delta$ puede destruir al macrófago infectado [131, 133-135, 175]; y por último, los isotipos de anticuerpos de tipo Th1 como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan su fagocitosis [66, 176].

Células T CD4 $^+$ y CD8 $^+$

Los antígenos de *B. abortus* son capaces de ser presentados por MHC-I y II, y de esta manera activar tanto a las células T CD4 $^+$ como las T CD8 $^+$ [177-179]. La mayoría de los estudios señalan a las células T CD4 $^+$ como las principales productoras de IFN- γ [168, 171, 180], aunque también hay producción de esta citoquina por parte de linfocitos T CD8 $^+$, $\gamma\delta$ y células NK [181].

La infección con *B. abortus* genera una poderosa inducción hacia el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 [147, 182]. La importancia de las células Th1 en la respuesta frente a *Brucella* se determinó en primer lugar en el modelo murino. Diversos estudios demostraron que los ratones deficientes en elementos claves de la respuesta Th1 como IFN- γ o IL-12 eran más susceptibles a la infección, y asimismo se determinó que la administración de estas citoquinas de manera exógena favorecía el desarrollo de una respuesta protectora en dichos ratones [166, 171, 173]. Más aún, los estudios en pacientes con brucelosis también señalan la importancia del desarrollo de una respuesta de tipo Th1 para combatir la infección, ya que existe una correlación entre disminuidas respuestas Th1 y recaídas o estadios crónicos de la enfermedad [183-186] así como una asociación entre determinados polimorfismos o mutaciones genéticas que afectan a este tipo de respuesta y una mayor susceptibilidad a la brucelosis [187].

Las células T CD8⁺ no sólo contribuyen a la respuesta frente a *Brucella* mediante la secreción de IFN- γ , sino que su función principal es la de eliminar células infectadas mediante la interacción Fas-FasL o la secreción de perforinas y granzimas [177, 188, 189]. Además de las células T CD8⁺ citotóxicas, recientemente se ha descrito el potencial citotóxico de las células T CD4⁺ frente a *B. abortus* en ratones [190].

A pesar de las vigorosas respuestas T CD4⁺ y CD8⁺ generadas por *B. abortus*, esta bacteria utiliza distintas estrategias para evadir la vigilancia inmunológica y persistir dentro de las células de su hospedador por muchos años, estableciendo una infección crónica. Se demostró que *B. abortus* por contacto directo inhibe la proliferación y producción de IL-2 e IFN- γ por parte de las mismas. Por otra parte, *B. abortus* mediante la secreción de TNF- α es capaz de inducir la apoptosis de linfocitos T [88]. Además, la infección de monocitos/macrófagos humanos con *B. abortus* es capaz de inhibir la expresión inducida por IFN- γ de MHC-II, MHC-I y del receptor de tipo I para la porción Fc de IgG (Fc γ RI o CD64) [191-193]. Como consecuencia, los macrófagos infectados presentan disminuida capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y disminuida fagocitosis restringida al Fc γ RI.

Las células T $\gamma\delta$ también cumplirían una importante función en la inmunidad frente a *Brucella*. El número de células T V γ 9V δ 2 aumenta en sangre periférica de pacientes con brucelosis aguda y declina luego de un tratamiento exitoso [194, 195]. Por otra parte, los ratones deficientes en células T $\gamma\delta$ poseen una susceptibilidad aumentada a la infección con *B. abortus*, lo cual se relacionó a una falla en la inmunidad innata desarrollada por estos ratones frente a dichas bacterias, lo que sugeriría que la función protectora de estas células transcurre durante los estadios tempranos de la enfermedad [196]. Asimismo, las células T $\gamma\delta$ activadas por antígenos no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares debido a que secretan TNF- α e IFN- γ activando las funciones bactericidas del macrófago. Estudios *in vitro* sugieren que las células T V γ 9V δ 2 también serían capaces de lisar a las células infectadas, ya sea por contacto directo o de manera indirecta a través de la secreción de un factor bactericida, la catelicidina LL-37 [197, 198].

Respuesta humoral

La contribución de la inmunidad humoral en la respuesta frente a la brucelosis no ha sido del todo esclarecida. Tempranamente en la infección aparecen anticuerpos que suelen permanecer detectables en el suero durante años. Estos anticuerpos están dirigidos contra varios componentes del microorganismo, pero especialmente contra los antígenos superficiales, particularmente el LPS [199]. Desde el punto de

vista clínico, la detección de anticuerpos dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, y seguimiento de la infección. En ratones se observó un cierto nivel de protección conferido por anticuerpos contra la cadena O del LPS de *Brucella* [200-202]. No obstante, si bien la opsonización de las bacterias por anticuerpos aumenta su fagocitosis y por lo tanto, disminuye el nivel inicial de infección, la naturaleza intracelular de *Brucella* hace que este efecto sea limitado y que de cualquier manera progrese la enfermedad [94]. Asimismo, un estudio reciente demostró que células B murinas pueden establecerse como un nicho intracelular para *B. abortus* opsonizada por IgM o el complemento [87].

Citoquinas

Una de las citoquinas de mayor relevancia en la infección por *Brucella* es el IFN- γ . Dicha molécula tiene un rol central en la inmunidad frente a *Brucella* principalmente mediante la activación de las funciones bactericidas del macrófago, la inducción de la expresión de moléculas de MHC y coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos profesionales, la estimulación de la citotoxicidad por parte de células T citotóxicas y la potenciación de la muerte de los macrófagos infectados [177]. Como ya fue mencionado, la importancia del IFN- γ en la resolución de la infección por *Brucella* fue demostrada en estudios con ratones deficientes en el gen de esta citoquina. Estos ratones mueren 6 semanas después de la infección con *B. abortus* [172]. Sin embargo, a pesar de ser *Brucella* un potente inductor de IFN- γ , esta bacteria es capaz de sobrevivir y reproducirse durante un largo período en el bazo de ratones infectados [203, 204]. Otros estudios han sugerido que la activación con IFN- γ impide que *Brucella* establezca su nicho replicativo y que, por lo tanto, si las bacterias ya están localizadas intracelularmente, IFN- γ no tiene efecto alguno [99]. La producción temprana, durante la infección, de una citoquina inmunomoduladora como IL-10 podría explicar en parte este fenómeno [205].

EL HUESO

La afección osteoarticular es la complicación más común de la brucelosis activa en humanos; esta llega a afectar hasta el 85% de los pacientes. Las formas más comunes de la afección osteoarticular son sacroileítis, espondilitis, osteomielitis y artritis periférica, siendo la pérdida de hueso una complicación grave de la infección por *Brucella* [23, 28]. En el presente trabajo, se estudiarán algunos de los mecanismos implicados en el daño óseo mediado por la infección por *Brucella*.

Composición y dinámica normal del hueso

La matriz del hueso está compuesta en un 50 a 70% por matriz mineral, 20 a 40% por matriz orgánica, 5 a 10% por agua y < 3% por lípidos [206]. La matriz orgánica está compuesta en un 90% por proteínas colágenas, en su mayoría por colágeno tipo I con trazas de colágeno tipo III y V. El 10% restante está compuesto por proteoglicanos, como el condroitin sulfato y el queratán sulfato, por glicoproteínas, como la osteonectina y la fibronectina, por proteínas con grupos γ -carboxiglutámicos, como la osteocalcina, y por citoquinas como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y las proteínas morfogenéticas óseas [206]. El contenido mineral del hueso es en su mayoría hidroxiapatita en forma de cristales $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, con pequeñas cantidades de carbonato, magnesio y fosfato ácido [206]. La matriz mineral proporciona rigidez y resistencia a las fuerzas de compresión, mientras que la matriz orgánica proporciona elasticidad y flexibilidad [206].

Aunque macroscópicamente el esqueleto parece ser un órgano estático, es un tejido extremadamente dinámico a nivel microscópico [207]. Para mantener la integridad estructural, el hueso se encuentra en continuo remodelado lo cual hace posible reparar microlesiones, cuya acumulación comprometería la resistencia del hueso, y por otro lado permite una cierta adaptación de la estructura ósea a los requerimientos físicos predominantes. El remodelado del hueso es un proceso complejo y muy controlado basado en la acción concertada de dos tipos celulares claves: los osteoclastos y los osteoblastos. Los osteoclastos son las células encargadas de degradar la matriz extracelular, mientras que los osteoblastos son las células especializadas en sintetizar la matriz ósea, regular la mineralización y finalmente diferenciarse a osteocitos (células encargadas de mantener la homeostasis del sistema óseo) o a “células de revestimiento” que tapizan las superficies óseas [207]. La actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos se encuentra estrictamente regulada por factores locales y sistémicos, ya que las

desviaciones significativas de un equilibrio neutral entre la resorción y la formación significaría una acelerada pérdida o ganancia ósea con posibles consecuencias adversas [207-210].

La remodelación ósea tiene lugar en lo que Frost denominó la “Unidad Multicelular Básica” (UMB) (Imagen 5), que comprende los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos dentro de la cavidad de remodelación ósea [211]. El ciclo de remodelación comienza con una fase de iniciación que incluye el reclutamiento de precursores de osteoclastos, su diferenciación en osteoclastos maduros, así como la activación y el mantenimiento de la resorción ósea. Luego, sigue la fase de reversión en la cual la degradación del hueso es inhibida y los osteoclastos mueren por apoptosis, mientras que los precursores de los osteoblastos son reclutados y comienzan a diferenciarse. El último paso se denomina fase de terminación e implica la formación de matriz por parte de los osteoblastos y la posterior mineralización [212, 213]. Como la remodelación ósea es un evento multicelular, la señalización y la conversación cruzada entre las células involucradas es importante para controlar este proceso [212].

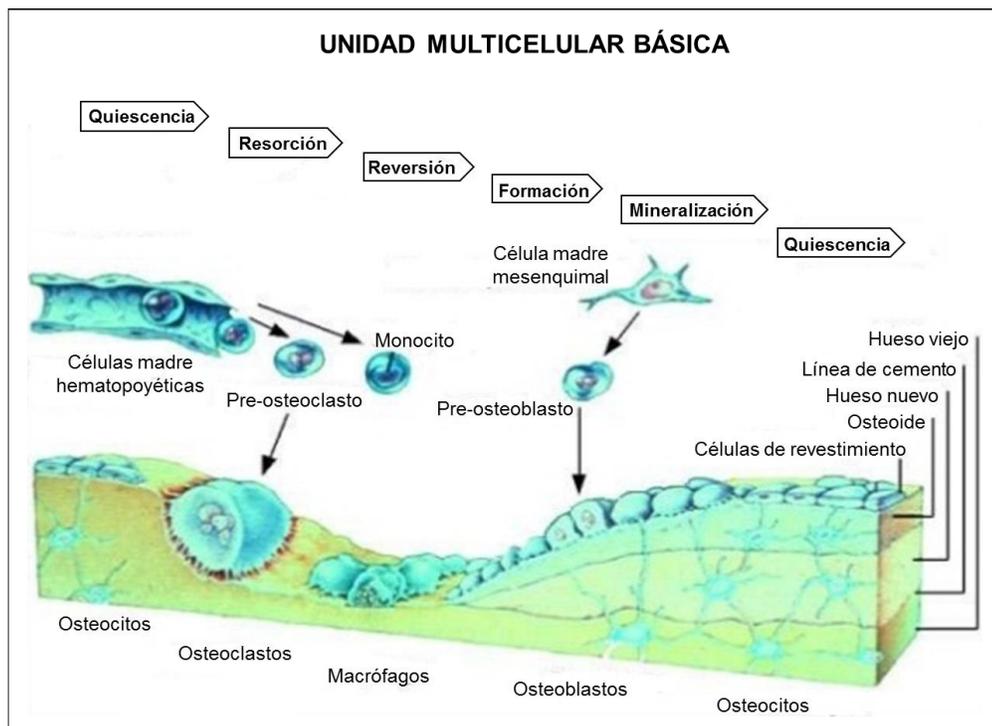


Imagen 5: Esquema representativo de la Unidad Multicelular Básica (UMB).

Los osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas gigantes formadas por la fusión de progenitores mononucleares de la familia de monocitos/macrófagos en un proceso denominado osteoclastogénesis [212, 214, 215]. Los osteoclastos existen en dos estados funcionales: un estado móvil y uno degradativo. En cada estado los osteoclastos muestran diferencias morfológicas. Durante el estado móvil son células aplanadas y no polarizadas que migran desde la médula ósea a su sitio de resorción mediante la formación de lamelipodios [216, 217]. Al llegar al sitio de reabsorción, los osteoclastos se polarizan a través de la reorganización del citoesqueleto, lo cual resulta en la formación de un borde rugoso con profundos pliegues por donde se secretan iones H^+ , y se produce la exocitosis, mediada por vesículas, de las enzimas catepsina K y metaloproteasas de matriz (MMPs). Los iones H^+ acidifican el medio lo cual disuelve la matriz mineral mientras que las enzimas secretadas degradan la matriz proteica. El contacto con la matriz ósea también genera en los osteoclastos la formación de un anillo rico en filamentos de actina que rodea a la zona rugosa y sella el compartimento acidificado donde ocurre la degradación, aislándolo del resto de la superficie [218-220].

La diferenciación de los precursores de los osteoclastos requiere la presencia de dos factores claves: el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL). El M-CSF producido por los osteoblastos se une a su receptor c-fms en los precursores de los osteoclastos promoviendo su supervivencia y proliferación [212, 221]. RANKL es expresado en la superficie de los osteoblastos o bien puede ser liberado en forma soluble, aunque también se ha documentado su expresión por otros tipos celulares como fibroblastos, linfocitos B y T activados [222-224]. Su actividad biológica está regulada por el inhibidor natural osteoprotegerina (OPG) que actúa como un receptor soluble de RANKL que inhibe en forma competitiva la unión de este último a su receptor RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos [225]. RANKL estimula a los precursores expandidos con M-CSF a comprometerse con el fenotipo de osteoclastos. Estas células expresan entonces los marcadores claves de los osteoclastos incluyendo la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Luego los preosteoclastos se fusionan para formar células multinucleadas que comienzan a expresar marcadores de osteoclastos más específicos, tales como receptor de calcitonina y catepsina K [212].

Además de degradar matriz ósea los osteoclastos también pueden participar en la regulación de la formación del hueso de diversas formas. A medida que los osteoclastos degradan el hueso liberan

factores inmersos en la matriz los cuales actuarían sobre los osteoblastos promoviendo la formación del hueso. Ejemplos de estos factores son las proteínas morfogenéticas óseas [226], los factores de crecimiento insulínico (IGFs) I y II, y TGF- β [227-229]. Otro mecanismo por el cual los osteoclastos pueden regular la función de los osteoblastos es a través del contacto directo célula-célula. Se ha reportado que la interacción de las proteínas transmembrana ephrinB2 expresadas por los osteoblastos y EphB4 expresadas por los osteoclastos promueve la diferenciación de osteoblastos e inhibe la diferenciación de los osteoclastos [230, 231]. La regulación también puede ocurrir a través de factores liberados por los osteoclastos. Un ejemplo es el factor secretado por los osteoclastos esfingosina-1-fosfato (SP-1) el cual ha sido involucrado en el reclutamiento de precursores de osteoblastos y en el incremento de la producción de RANKL por estas últimas células [232]. SP-1 también tiene efectos directos sobre los osteoclastos regulando la migración de sus precursores [233].

Los osteoblastos

Los osteoblastos son las únicas células responsables de la formación del hueso. Juegan un papel crucial en la inducción y regulación de la mineralización de la matriz extracelular y en el control de la remodelación ósea [234]. Se originan a partir de células madre mesenquimales [235-237], en presencia de los estímulos adecuados estas pueden diferenciarse a preosteoblastos. Los preosteoblastos a su vez dan lugar a osteoblastos maduros, que pueden ser identificados por su morfología cúbica, los cuales residen a lo largo de la superficie del hueso en los lugares de activa formación ósea [212]. La diferenciación es controlada por el factor de transcripción maestro RUNX2 [213]. Los osteoblastos maduros secretan colágeno tipo I y proteínas no colágenas incluyendo osteocalcina, osteopontina, sialoproteína y fosfatasa alcalina (las cuales ejercen funciones de regulación del recambio óseo y control de la mineralización) [234]. Los osteoblastos pueden seguir tres destinos diferentes: pueden ser eliminados por apoptosis, pueden quedar embebidos dentro de la matriz mineralizada y transformarse en osteocitos o pueden transformarse en células de revestimiento que tapizan la superficie del hueso [212, 234].

Una de las vías de señalización más importantes que regula la formación del hueso es la vía Wnt/ β -catenina [212, 238, 239]. La misma está involucrada en la estimulación de la proliferación y diferenciación, y promueve la supervivencia de los osteoblastos y los osteocitos. Otra vía de señalización importante involucrada en la diferenciación de los osteoblastos incluye la vía de la superfamilia TGF- β , siendo dos miembros claves TGF- β y las proteínas morfogenéticas óseas [240, 241].

Como se mencionó los osteoblastos son capaces de regular la diferenciación y función de los osteoclastos a través de la expresión de M-CSF, RANKL y OPG. Por otro lado, los osteoblastos pueden inducir la migración de los precursores de los osteoclastos a la superficie ósea a través de la secreción de factores quimioattractantes. Dos de estos factores los cuales derivan de la matriz ósea son osteocalcina y colágeno tipo I [242]. Estos son producidos por los osteoblastos y son depositados en la matriz durante la formación del hueso. La proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1) producida por los osteoblastos también ha sido involucrada en la atracción de los precursores de osteoclastos [243].

El proceso de remodelado también se encuentra regulado por factores sistémicos entre los que se encuentran la hormona paratiroidea [244], la 1,25-dihidroxi vitamina D [245], los glucocorticoides [246], y el estrógeno [247], estimulando la degradación o la formación de hueso.

Los osteocitos

Los osteocitos son osteoblastos totalmente diferenciados que se incorporan a la matriz ósea mineralizada recién formada donde residen durante largos periodos de tiempo, pero al final sufren muerte por apoptosis [248]. Representan más del 95% del componente celular del hueso adulto maduro [249-252]. Presentan forma estrellada y son más pequeños que los osteoblastos y han perdido muchas de sus organelas citoplasmáticas [253]. Los mismos se encuentran espacialmente aislados unos de otros [248]. Sin embargo, poseen una gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas que les permiten comunicarse entre sí, y con los osteoblastos, los osteoclastos o las células de revestimiento que tapizan las superficies del hueso [254-256]. Hay evidencias que sugieren que la función primaria de los osteocitos se relaciona con la determinación y el mantenimiento de la estructura ósea [257]. La red de osteocitos es el mecanosensor principal que orquesta el proceso de remodelado del hueso en zonas específicas, muy probablemente detectando cambios en el flujo de fluidos que se producen en la red canalicular en respuesta a la carga mecánica [258-260]. Las microlesiones generadas en el hueso han sido implicadas en el inicio de este proceso. Se ha descrito que los osteocitos próximos a las microlesiones mueren por apoptosis lo cual ha sido correlacionado con un incremento en la remodelación ósea, debido a un aumento en la producción de RANKL y un incremento en la formación de osteoclastos [261]. Un estudio ha demostrado que los osteocitos mismos expresan RANKL, estimulando así la osteoclastogénesis. Los ratones que carecen de RANKL específicamente en osteocitos muestran un fenotipo osteopetrótico, lo que sugiere que los osteocitos pueden ser la principal fuente de RANKL durante la remodelación ósea

[262]. Los osteocitos además, detectan cambios en los niveles de hormonas, como el estrógeno y los glucocorticoides, los cuales influyen en su supervivencia [263-265].

Las conexinas son esenciales para la comunicación de las células entre sí y con su entorno. Considerando que los osteocitos forman una vasta red interconectada de células que depende mucho de las conexiones célula-célula para la transmisión rápida de señales, las conexinas desempeñen un papel importante en la función de los osteocitos [258, 266]. Los canales formados por conexina 43 (Cx43), el miembro más abundante de la familia de proteínas conexinas expresada en células óseas, median la comunicación de los osteocitos entre si y entre los osteocitos y las células en la superficie ósea. Dentro de la familia de las conexinas, Cx43 es esencial para la supervivencia de osteocitos y para controlar la expresión de genes en osteocitos que afectan tanto la función de osteoclastos como la de osteoblastos [267].

El hueso en condiciones inflamatorias

Durante un proceso inflamatorio causado por ejemplo por una infección bacteriana de los huesos y/o las articulaciones el balance existente entre la formación y la degradación del hueso puede verse afectado. La inflamación crónica es un importante desencadenante de la pérdida ósea local y sistémica. La desintegración de la interacción célula-matriz es un requisito previo para la invasión del tejido inflamatorio en el hueso [268]. Las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 han sido implicadas en la progresión de enfermedades inflamatorias crónicas del hueso con un aumento en la degradación ósea [269]. El daño osteoarticular puede ocurrir a través de distintos mecanismos:

Producción de MMPs. Se ha demostrado que los antígenos bacterianos y las citoquinas proinflamatorias son capaces de inducir la producción de MMPs en varios tipos celulares como osteoblastos y fibroblastos sinoviales [270, 271] presentes en los huesos y articulaciones, respectivamente. Asimismo, los macrófagos y los neutrófilos atraídos a los tejidos inflamados también pueden responder a dichos estímulos produciendo MMPs [272, 273]. Las MMPs han sido implicadas en el daño tisular debido a que degradan componentes de la matriz extracelular [274].

Inducción de la osteoclastogénesis. Se ha reportado que TNF- α [275-277] e IL-6 [278, 279], así como también el incremento patológico en la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos [280] y otros tipos celulares como linfocitos B [281] y linfocitos T [282] contribuyen a la destrucción ósea mediante el reclutamiento de precursores de osteoclastos de la médula ósea a las áreas inflamadas. Aquí TNF- α y

RANKL promueven la fusión de precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros [274]. IL-6 actúa directamente sobre los osteoclastos estimulando las primeras etapas de la hematopoyesis, así como las primeras etapas de la osteoclastogénesis *in vitro* [283]. IL-1 β es uno de los actores claves durante la inflamación aguda y es producida por múltiples células incluyendo macrófagos, linfocitos, y células mesenquimales. Se ha demostrado que dicha citoquina ejerce potentes efectos sobre el tejido óseo mediante el aumento de la resorción ósea *in vitro* [284] e *in vivo* [285] y prolonga la vida útil de los osteoclastos [286, 287].

Inhibición de la función de los osteoblastos. Las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β [288, 289] como así también distintos antígenos bacterianos [290, 291] son capaces de inhibir la diferenciación de osteoblastos con la consecuente reducción de hueso mediante la inhibición de la deposición de matriz orgánica y mineral. La supresión de la autofagia conduce a una formación ósea deficiente debido a la diferenciación defectuosa de los osteoblastos y a una disminución en su proliferación [292, 293].

Brucelosis osteoarticular

La brucelosis osteoarticular es la presentación más común de la enfermedad activa en los humanos. Su prevalencia varía ampliamente, pero un estudio reciente ha revelado que hasta el 47% de los pacientes con brucelosis experimentaron complicaciones osteoarticulares [28]. Las tres formas más comunes de la afección osteoarticular son; espondilitis, sacroileítis y artritis periférica. Esta última es la más común y afecta las rodillas, las caderas, los tobillos y las muñecas en el contexto de la infección aguda [16]. Menos frecuentemente *Brucella* puede afectar otros sitios musculoesqueléticos produciendo tendinitis u osteomielitis de huesos largos [294]. También se ha descrito infección en la bolsa sinovial aunque es poco frecuente [295-297]. Las características clínicas incluyen dolor e hinchazón de las articulaciones, sensibilidad, aumento del calor local y limitación del movimiento [298-300].

La espondilitis es una de las complicaciones más serias la cual se presenta en las formas subagudas o crónicas de la enfermedad [16]. Ocurre con mayor frecuencia en las personas mayores [301], y suele predominar el compromiso lumbar, seguido del cervical y el dorsal. Con la extensión de la infección pueden aparecer abscesos paravertebrales, abscesos epidurales espinales y complicaciones neurológicas [302, 303]. Incluso en algunos casos se requiere tratamiento quirúrgico. Además del dolor lumbar los pacientes suelen presentar fiebre, pérdida de peso, astenia y depresión. El dolor lumbar puede ser gradual o súbito, con irradiación a los miembros inferiores con limitación en ocasiones para la marcha. La espondilitis, sigue siendo extremadamente difícil de tratar ya que a menudo parece resultar en daño óseo

residual [16]. La sacroileítis y las artritis periféricas usualmente reflejan las formas agudas de la enfermedad y se acompañan con síntomas sistémicos. Frecuentemente responden a regímenes terapéuticos estándares [16]. A diferencia de la espondilitis, estas complicaciones son reportadas usualmente dentro de las primeras tres décadas de vida [304].

Como ocurre con otras infecciones articulares, la persistencia de la enfermedad en la articulación infectada puede resultar en daño tisular. Aunque el cultivo de *Brucella* a partir de muestras de fluido resulta dificultoso, el daño en las articulaciones ha sido frecuentemente asociado con la presencia de *Brucella* en dichas articulaciones, como se demostró por el cultivo *in vitro* de fluido y tejido sinovial [305, 306] indicando que los síntomas son causados por una verdadera infección de la articulación. Es importante destacar que el tejido sinovial revela, característicamente, un infiltrado celular compuesto principalmente por monocitos y neutrófilos, e hiperplasia de las células sinoviales [306-309].

Los mecanismos involucrados en el daño óseo debido a la infección por *Brucella* aún no se conocen completamente. El daño óseo puede atribuirse a la acción directa de las bacterias o a un proceso inmunopatológico debido a la inflamación desencadenada por la repuesta inmune frente a la infección. Hasta el momento no se han descrito proteasas, toxinas o enzimas líticas secretadas por *Brucella*; por lo tanto, es poco probable que este hecho cause un efecto deletéreo directo, señalando a la respuesta inmune innata como la principal causa de la patología osteoarticular [310].

Las anomalías radiográficas se desarrollan tarde en el curso de la brucelosis con complicaciones osteoarticulares, y son poco frecuentes en artritis periféricas. En la brucelosis vertebral los cambios destructivos debidos a la pérdida de tejido óseo pueden no hacerse evidentes hasta el tercer mes de la enfermedad, en consecuencia no se logra un diagnóstico temprano [311]. Otras técnicas que se utilizan ampliamente para la visualización de la afección osteoarticular son la exploración ósea, la tomografía computarizada y la resonancia magnética [312, 313].

En cuanto al tratamiento terapéutico con antibióticos, se suele utilizar el mismo que se describió anteriormente, doxiciclina durante 6 semanas, combinada con estreptomocina durante 2 a 3 semanas, o rifampicina durante 6 semanas, aunque en los casos de espondilitis se recomienda una terapia más prolongada en comparación con la forma sistémica, en promedio 6 meses y ante presencia de abscesos la terapia debe continuar hasta desaparición del mismo [314].

Si bien las complicaciones osteoarticulares son las más frecuentes en la brucelosis activa en el hombre, los mecanismos inmunomoleculares implicados han comenzado a ser descritos hace menos de 10 años y hasta hoy no han sido completamente dilucidados. Allí radica la importancia del estudio de esta patología.

Hipótesis y objetivos

La brucelosis osteoarticular es la localización más común de la enfermedad activa en el hombre. El examen histopatológico revela la presencia de infiltrado inflamatorio pudiendo haber o no lesión granulomatosa. A su vez, se observa destrucción del hueso.

Por lo tanto, **el objetivo general de este trabajo es dilucidar los determinantes de patogénesis responsables del daño osteoarticular causado por *Brucella***. Sostenemos que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la brucelosis. Por lo tanto, en las infecciones osteoarticulares por *Brucella* la respuesta inflamatoria generada contra este organismo podría también contribuir a la patogénesis de la brucelosis osteoarticular.

La hipótesis central a ser analizada en este trabajo es que *B. abortus* puede causar inflamación osteoarticular, y que esta respuesta inflamatoria puede conducir al daño óseo por inducción de un aumento en la expresión de MMPs, inducción de la osteoclastogénesis y alteración de la función de los osteocitos.

Para poner a prueba nuestra hipótesis formulamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar si *Brucella abortus* altera la función de los osteocitos. En particular, analizar si la infección modula la expresión de Cx43, integrinas y moléculas accesorias, la muerte por apoptosis y la producción de mediadores inflamatorios e inductores de osteoclastogénesis por parte de los osteocitos. Por otro lado, se estudiará la contribución de los macrófagos infectados (principal nicho de multiplicación de la bacteria) sobre la función de los osteocitos.
2. Estudiar si las alteraciones en la función de los osteocitos y de los osteoblastos (por ser los osteocitos el estadio terminal de diferenciación de los osteoblastos) infectados con *B. abortus* involucran la activación de la vía autofágica.
3. Evaluar si *B. abortus* puede activar a los linfocitos B induciendo la secreción de MMPs, citoquinas proinflamatorias y RANKL

Materiales y métodos

Cultivo de bacterias

B. abortus S2308 (*B. abortus* o *B. abortus* WT) y sus mutantes isogénicas *B. abortus virB10* polar (Δ *virB10*), *B. abortus bpe005* (Δ *bpe005*), *B. abortus bpe275* (Δ *bpe275*), *B. abortus bpe123* (Δ *bpe123*) (cedidas por el Dr. Diego Comerci UNSAM) y la mutante rugosa denominada RB51 fueron crecidas durante 18 hs en 10 ml de medio tripteína de soja en agitación constante de 150 rpm a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron por 15 min a 6000g a 4 °C y fueron lavadas dos veces en 10 ml de buffer fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*). La concentración de bacterias en cultivo fue estimada comparando la densidad óptica a 600 nm con una curva estándar. Para preparar los inóculos, los cultivos fueron diluidos en PBS a la concentración deseada en base a la densidad óptica medida. La concentración precisa fue determinada por recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de agar tripteína de soja (TSA, de sus siglas en inglés *Tryptic Soy Agar*). Para obtener *B. abortus* muerta por calor (HKBA) las bacterias fueron lavadas 2 veces durante 10 minutos en PBS estéril. Las mismas fueron inactivadas por calentamiento a 70 °C durante 20 min, alicuotadas y conservadas a -70 °C hasta su utilización. La ausencia total de viabilidad de *B. abortus* luego de la inactivación por calor fue verificada por la ausencia de crecimiento bacteriano en placas de TSA. La manipulación de las bacterias viables fue realizada en instalaciones con un nivel de bioseguridad 3, localizados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, gracias a un convenio de colaboración establecido con el Dr. Horacio Salomón.

Cultivo celular

La línea celular inmortalizada de osteocitos murinos MLO-Y4 fue gentilmente cedida por la Dra. Lynda Bonewald (University of Missouri, Kansas City). Esta línea celular conserva las principales características de los osteocitos murinos: tienen baja actividad de la fosfatasa alcalina (ALP, de sus siglas en inglés *alkaline phosphatase*), alta secreción de osteocalcina, expresan grandes cantidades de Cx43, expresan osteopontina, CD44 y bajas cantidades de colágeno tipo I, no expresan el factor 2 específico de osteoblastos [315]. Las células MLO-Y4 fueron cultivadas en α -MEM (de sus siglas en inglés, *α -Minimum Essential Medium*, Gibco), 5% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 5% de newborn calf serum (Gibco), y suplementado con 2 mM de L-glutamina (Gibco), 100 U de penicilina/ml (Sigma-Aldrich), y 100 μ g de estreptomina/ml (Gibco).

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 fue usada como precursor de osteoclastos y la línea celular de macrófagos murinos J774.A1 fue utilizada para obtener sobrenadantes de cultivo

infectados. Ambas líneas celulares fueron obtenidas de ATCC (de sus siglas en inglés, *American Type Culture Collection*). Las células RAW 264.7 fueron cultivadas en α -MEM, 10% de SFB (Natocor), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Las células J774.A1 fueron cultivadas en DMEM (de sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) con 10% de SFB y suplementado como se describió previamente.

La línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1 fue cultivada en α -MEM con 10% de SFB y suplementado como se describió previamente.

Los linfocitos B se obtuvieron de bazo de ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, usando un kit de aislamiento por selección negativa (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células B aisladas se confirmó posteriormente mediante citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-CD19 acoplado a R-ficoeritrina (PE) o anti-B220 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y fue alrededor del 80% (Figura A) La viabilidad de las células fue de hasta un 95%, según se midió mediante un ensayo de exclusión de azul tripán. Las células B fueron cultivadas en RPMI 1640 con 10% de SFB y suplementado como se describió previamente. Los protocolos de trabajo utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina), expediente n° 3720/14.

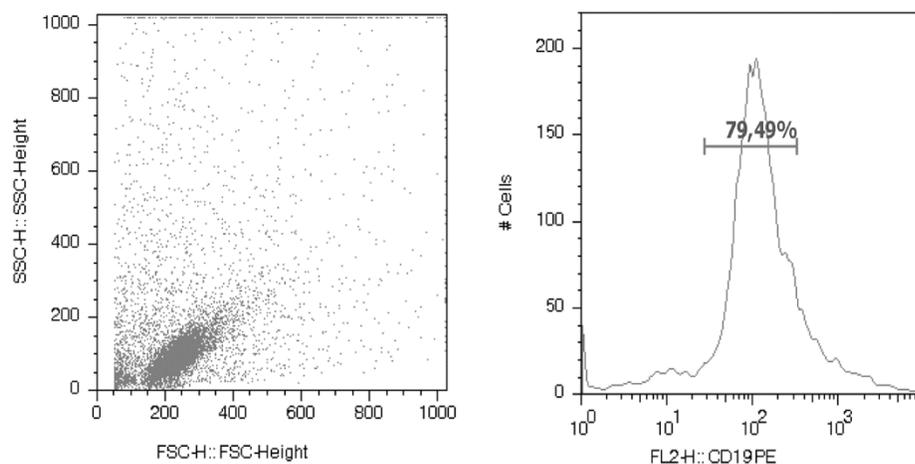


Figura A: Evaluación por citometría de flujo de la pureza de los linfocitos B purificados de bazo de ratón.

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Infección celular

Las células MLO-Y4 y las MC3T3-E1 fueron cultivadas a una densidad de $1,3 \times 10^5$ células/pocillo, las J774.A1 a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y los linfocitos B purificados de bazo de ratón se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células/pocillo durante 24 hs, en placas de 24 pocillos en medio completo sin antibióticos y fueron infectadas con *B. abortus* a las multiplicidades de infección (MOI, de sus siglas en inglés, *Multiplicity Of Infection*) 100, 250, 500 y 1000 en el caso de los osteocitos MLO-Y4 y los linfocitos B, MOI 100 y 1000 para los osteoblastos y a MOI 100 para los macrófagos de la línea J774.A1.

Una vez dispensada la suspensión de bacterias, las placas fueron centrifugadas durante 10 min a 2000 rpm y luego incubadas por 2 hs a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células fueron lavadas y luego incubadas con el medio adecuado para cada tipo celular, suplementado con 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomina para eliminar las bacterias extracelulares.

Para evaluar la actividad de las MMPs en los sobrenadantes de cultivo, las células fueron incubadas en medio sin SFB (el SFB contiene α2-macroglobulina, un inhibidor de las MMPs [316, 317]) y suplementado con 0,01% de albúmina sérica bovina (BSA, de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*, Gibco), aminoácidos no esenciales (Gibco), 0,1% de glucosa (Baker Analyzed), 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomina para eliminar a las bacterias extracelulares. Este medio de cultivo permitió el crecimiento sostenido de las células, así como también la producción de citoquinas en los mismos niveles que utilizando el medio con SFB.

Para evaluar la replicación intracelular de *B. abortus*, las células infectadas fueron lavadas y lisadas a distintos tiempos post-infección (2, 4, 24 y 48 hs) con 0,2% (vol/vol) de tritón X-100. El número de bacterias viables intracelulares fue determinado mediante el recuento de UFC/ml a partir de diluciones seriadas al décimo en placas de TSA.

Estimulación con medio condicionado

Los sobrenadantes de cultivo de los osteocitos y, de los macrófagos y linfocitos B infectados a MOI 100 con *B. abortus* fueron recolectados a las 24 hs post-infección, esterilizados por filtración, utilizando un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,22 µm y almacenados a -70 °C hasta ser utilizados para estimular otros tipos celulares.

Zimografía

La actividad gelatinasa de las MMPs fue evaluada mediante el método de Hibbs et. al. con modificaciones [140, 318-320]. La técnica consistió en la siembra de 20 μ l de sobrenadante de cultivo mezclado con 5 μ l de buffer de siembra [0,25 M tris (pH 6,8), 50% de glicerol, 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), y azul de bromofenol] en un gel de SDS-PAGE (de sus siglas en inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 10% conteniendo 1 mg de gelatina (Sigma-Aldrich)/ml. Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con 500 mM tris-HCl (pH 7,5)- 2,5% tritón X-100 durante 45 min en agitación, luego con 500 mM tris-HCl (pH 7,5)- 2,5% tritón X-100- 5 mM CaCl₂- 10 mM ZnCl₂ por 45 min y por último con 50 mM tris-HCl (pH 7,5)- 10 mM CaCl₂- 200 mM NaCl durante 24 hs a 37 °C. La incubación con estos buffers permite la desnaturalización/renaturalización de las MMPs promoviendo su actividad. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie y decolorados con 10% de ácido acético y 25% de isopropanol. Las bandas sin teñir indicaron la presencia de actividad gelatinolítica, y la identificación de la enzima involucrada (MMP-9 o MMP-2) se determinó por comparación con un marcador de peso molecular. Como control positivo se utilizó PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, de sus siglas en inglés *Phorbol-12-Myristato 13-Acetato*).

Medición de la concentración de citoquinas

Las citoquinas murinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , RANKL y la quemoquina quimioattractante de queratinocitos (CXCL1, KC) fueron medidas en los sobrenadantes de cultivo de las células infectadas o estimuladas con la bacteria muerta por calor (HKBA). Los sobrenadantes fueron obtenidos a las 8 hs post-infección para la determinación de TNF- α y a las 24 hs post-infección para el resto de los mediadores estudiados mediante ELISA sándwich, usando anticuerpos monoclonales específicos según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences).

Evaluación de la muerte celular por apoptosis

Los osteocitos fueron infectados con *B. abortus* a diferentes MOIs (100, 250, 500 y 1000). Luego de 24 hs, el porcentaje de células apoptóticas fue evaluado por tinción con Anexina V-FITC (ImmunoTools) y con Ioduro de propidio, el análisis se realizó por citometría de flujo. La apoptosis también fue analizada por microscopía de fluorescencia luego de marcar las células con la técnica de TUNEL (de sus siglas en inglés, *Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*) utilizando el kit fluorescein-FragEL DNA fragmentation detection kit (Calbiochem) o con el colorante nuclear Hoechst

33342 (Sigma-Aldrich). Como control positivo de apoptosis se utilizó paraformaldehído (PFA) al 4% o 200 μ M de peróxido de hidrógeno.

Ensayo de formación de osteoclastos

Para evaluar la formación de osteoclastos, células RAW 264.7 fueron cultivadas en vidrios de 100 mm de diámetro a una densidad de 200 células/pocillo en α -MEM, 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin y 30 ng/ml de M-CSF (de sus siglas en inglés *Macrophage colony-stimulating factor*) recombinante murino por 3 días para inducir la diferenciación de los precursores de osteoclastos. Posteriormente se cultivaron por 7 días en medio completo que contenía 30 ng/ml de M-CSF y 0,2 ml de sobrenadantes de cultivo de osteocitos MLO-Y4 o de células B infectadas con *B. abortus* o sobrenadantes de células B estimuladas con HKBA. Como control positivo células RAW 264.7 fueron tratadas con 50 ng/ml de TNF- α o RANKL recombinante murino. Para identificar los osteoclastos, las células se fijaron en PFA al 4% y se tiñeron para determinar la actividad de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (de sus siglas en inglés TRAP, *Tartrate-resistant acid phosphatase*) utilizando el acid phosphatase, leukocyte (TRAP) kit (Sigma-Aldrich). Las células TRAP-positivas y multinucleadas (más de tres núcleos) se definieron como osteoclastos y el número se determinó por recuento en microscopio.

En los ensayos de neutralización de TNF- α los sobrenadantes de los osteocitos infectados como se describió previamente fueron tratados con 20 μ g/ml de anticuerpo neutralizante anti-TNF- α (clon Mab1, BD Biosciences) o su control de isotipo (clon 107.3, BD Biosciences). Los ensayos de neutralización de RANKL se realizaron utilizando 50 ng/ml del antagonista natural de RANKL, osteoprotegerina (OPG).

Análisis de la expresión de Cx43 por inmunofluorescencia

Para determinar la expresión de Cx43 se realizó inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células MLO-Y4 fueron sembradas a una densidad de 4×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Los cultivos de MLO-Y4 infectados o estimulados con sobrenadantes de macrófagos infectados fueron fijados con 4% de PFA por 20 min a temperatura ambiente, lavados 3 veces con PBS y permeabilizados con 0,3% de tritón X-100 durante 10 min. Luego se realizó el bloqueo con solución de BSA al 1% por 1 h. Las células fueron incubadas durante 18 hs a 4 °C con anticuerpo anti-Cx43 de ratón (Invitrogen) diluido en PBS-Tween al 0,1%. Luego las células fueron incubadas por 4 hs a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488 (Invitrogen). La tinción nuclear se realizó durante 30 min a temperatura ambiente con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, de sus siglas en inglés *4',6-diamidino-2-*

phenylindole). Los cubreobjetos fueron montados en PBS-glicerina [9:1 (vol/vol)] y fueron analizados en un microscopio de fluorescencia.

Obtención de ARN mensajero (ARNm) y RT-qPCR (de sus siglas en inglés, *quantitative reverse transcription-PCR*)

El ARN de las células infectadas o estimuladas con sobrenadantes de monocitos infectados se extrajo utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research). 1 µg de ARN se sometió a transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa inversa Improm-II (Promega). El análisis de PCR se realizó con un sistema de detección de PCR en tiempo real Mx3000P (Stratagene) usando SYBR green como colorante fluorescente de unión al ADN. Los pares de primers utilizados para la amplificación fueron los siguientes:

Gen	Secuencia de primers
Cx43	F5'-TACCACGCCACCACCGGCCCA-3' R5'-GGCATTGGCTGTCGTCAGGGAA-3'
Integrina-α	F5'-GAATGGCGAAGGAAACTCTGAAA-3' R5'-ATAAACTGAGACTGCTGGGTGCT-3'
Integrina-β	F5'-CCACCTTCACCAATATCAC-3' R5'-CCAAATCCCACCCATACAC-3'
CD44	F5'-GGATTCATCCCAACGCTAT-3' R5'-ACTCGCCCTTCTTGCTGT-3'
E11/gp38	F5'-CGACCAGTTTCTAACACCTGCCTTCT-3' R5'-CTGTCCCAGCAACTGAGTCCC-3'
β-actina	F5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3' R5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'

El protocolo de amplificación para Cx43 consistió en 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 58 °C durante 30 seg, y 72 °C durante 60 seg. Para Integrina-α fue de 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 51 °C durante 30 seg, y 72 °C durante 60 seg. Para Integrina-β y CD44 fue de 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 55 °C durante 30 seg, y 72 °C durante 60 seg. Para E11/gp38 y β-actina fue de 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg, 60 °C durante 30 seg, y 72 °C durante 60 seg. Los niveles relativos de expresión se calcularon como $ER = 2^{-\Delta CT}$ y se normalizaron de acuerdo al nivel de β-actina.

Western blotting

Las células MLO-Y4 y las células MC3T3-E1 ($1,3 \times 10^5$ células) fueron infectadas con *B. abortus*, a MOI 100 y 1000. A las 24 o 48 hs las células fueron lavadas y lisadas por incubación en 0,2 ml de buffer frío conteniendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 1% de SDS, 1% de tritón X-100, 1% de

deoxicolato de sodio, 100 µg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de estreptomicina, 0,2% de azida y una combinación de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Luego, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C. La concentración proteica fue determinada utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific Pierce). Cantidades iguales de proteína (70 µg) de cada tratamiento fueron resueltas en un gel SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham GE Healthcare) por 1 h a 300 mA y la misma fue bloqueada con una solución al 5% de leche en TBS 0,05% de tween-20 durante 18 hs a 4 °C.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-LC3B (2775s, Cell Signaling), anticuerpo anti-Beclin-1 (sc-10086, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo anti-p62 (clon 864807, R&D systems) o anticuerpo anti-β-actina (clon C4, Santa Cruz Biotechnology) durante 18 hs a 4 °C. Se lavó la membrana 3 veces con una solución 0,05% de Tween-20 en buffer Tris salino (TBS, de sus siglas en inglés *Tris-Buffered Saline*) y se la incubó por 1 h con un anticuerpo secundario anti-IgG especie específico conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Luego, la inmunoreactividad fue detectada por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific Pierce). Las bandas proteicas fueron visualizadas utilizando placas radiográficas Kodak Medical X-Ray General Purpose Film. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas utilizando el software Image J (National Institutes of Health).

Inhibición de la autofagia

Para evaluar el papel de la autofagia en la modulación de las funciones de los osteoblastos, las células MC3T3-E1 ($1,3 \times 10^5$ células/pocillo) fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 en presencia o no de los inhibidores bafilomicina A1 (Sigma-Aldrich) o cloroquina (Sigma-Aldrich); ambos actúan inhibiendo la maduración de los autofagosomas a autolisosomas [321, 322]. La bafilomicina A1 fue empleada a una concentración de 200 nM y la cloroquina a 50 µM en un volumen final de 0,5 ml. Luego de 24 hs o 72 hs, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para analizar la producción de MMPs por zimografía, la deposición de colágeno mediante tinción con Rojo Sirio y la deposición de calcio mediante tinción con Alizarina Roja.

Determinación de la deposición de colágeno

La deposición de colágeno fue evaluada en cultivos de MC3T3-E1 tratados con inhibidores de autofagia a los 7 días post-infección mediante tinción con Rojo Sirio, un colorante aniónico que posee alta

afinidad por las fibras de colágeno [323]. El colorante fue disuelto a una concentración de 0,1% en ácido pírico acuoso saturado. Las células fueron teñidas con 1 ml de la solución de Rojo Sirio por pocillo durante 18 hs en agitación suave. Para un análisis semicuantitativo el colorante unido fue disuelto en 200 μ l de NaOH 0,1 N durante 30 min en agitación. La solución fue transferida a placas de microtitulación y se midió la densidad óptica (DO) con un lector de placas a 550 nm contra el blanco hidróxido de sodio 0,1 N.

Determinación de la deposición de calcio

Los osteoblastos infectados y tratados con los inhibidores de autofagia fueron teñidos con 2% de Alizarina Roja. Para realizar un análisis semicuantitativo las células fueron incubadas con ácido acético al 10% durante 30 min en agitación. Se levantaron las células, se calentaron a 85 °C durante 10 min y se centrifugaron a 20000 xg por 15 min. Se tomó el sobrenadante y se neutralizó el pH con hidróxido de amonio al 10%. La solución fue transferida a placas de microtitulación para medir la DO a 405 nm.

Expresión de RANKL en linfocitos B

Para determinar la expresión de RANKL, los linfocitos B infectados con *B. abortus* fueron lavados 24 hs post-infección con 1% solución fisiológica-SFB fría (el frío disminuye la endocitosis de proteínas de membrana y el SFB disminuye el plegado inespecífico) e incubados con anticuerpo anti-RANKL de ratón unido a ficoeritrina (PE) (clon IK22/5 Bio-Legend) o el control de isotipo durante 30 min en hielo. A continuación, las células se lavaron y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan usando el software CellQuest (ambos de BectoneDickinson, Franklin Lakes, NJ).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Tukey, usando el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos están presentados como la media \pm error estándar (SEM).

Capítulo 1

La infección por *B. abortus* modula la expresión de Cx43, integrinas y moléculas accesorias en osteocitos e induce osteoclastogénesis a través de un mecanismo que involucra a RANKL y TNF- α .

INTRODUCCIÓN

Los osteocitos son las células que corresponden al estadio de diferenciación final de los osteoblastos y residen embebidas en la matriz ósea mineralizada. Los osteocitos son células residentes permanentes del hueso, con una vida media de 25 años, y constituyen más del 95% de las células en la matriz ósea [324].

Durante muchos años, los osteocitos han sido considerados células relativamente inactivas con un papel desconocido en el hueso. Sin embargo, los osteocitos no sólo son las células óseas más abundantes del hueso; sino que también son los reguladores centrales de la diferenciación y de la actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos durante la remodelación ósea [256, 262, 325-327], actúan como reguladores tanto de la homeostasis del fósforo [328] como del calcio [329], son células mecanosensoriales que coordinan la respuesta del esqueleto a la carga o descarga [330] además de ser células endocrinas capaces de actuar sobre otros tejidos [331, 332]. Los osteocitos secretan M-CSF y RANKL, ambos necesarios para la diferenciación y activación de los osteoclastos [327]. El M-CSF está implicado principalmente en estimular la replicación de los progenitores de osteoclastos, mientras que RANKL es responsable de estimular su diferenciación [333]. Los osteocitos además de ser reguladores de la formación y activación de osteoclastos [334], también regulan la formación ósea modulando la función de los osteoblastos [335, 336]. Estas funciones las realizan a través de uniones comunicantes “uniones gap” [337]. Estas uniones contribuyen a la mecano-traducción en el hueso regulando la diferenciación ósea debida a señales biofísicas, tales como el flujo de fluido, la deformación del sustrato o efectos electrocinéticos desde una célula y en última instancia transmitirla a la red celular. La familia de las conexinas comprende aproximadamente 21 proteínas con alta homología entre ellas. Cada molécula de conexina está formada por cuatro dominios transmembrana, 2 dominios extracelulares, una secuencia intracelular [338, 339] y terminales amino y carboxilo. Cx43 es la proteína de “unión gap” más abundante en la membrana de los osteocitos [337]. Las “uniones gap” están formadas por el acoplamiento de hemicanales o conexones a partir de dos células adyacentes que permiten el movimiento pasivo de moléculas pequeñas de una célula a otra. En las células del hueso, cada conexón está formado por seis subunidades de Cx43 [266]. En distintos trabajos de investigación se ha demostrado la participación de Cx43 en la modulación de la respuesta de las células óseas. Los ratones deficientes en Cx43 tienen mayor número de osteoclastos y una mayor resorción ósea [340, 341]. Los estudios *in vitro* revelaron que las células MLO-Y4 deficientes en Cx43 muestran un aumento en la relación RANKL/OPG en comparación con

los niveles de células MLO-Y4 control, lo que indica que la pérdida de Cx43 en los osteocitos promueve la osteoclastogénesis [267, 341].

Por otra parte, se ha demostrado que los ratones que carecen de Cx43 en osteoblastos/osteocitos o sólo en osteocitos muestran un mayor número de osteocitos apoptóticos [267].

Las integrinas también pueden vincular la red celular del citoesqueleto con la matriz extracelular y contribuir a la modulación de la respuesta de las células óseas frente a distintos estímulos [342]. Las integrinas son determinantes esenciales de la supervivencia celular y, en muchos casos, la prevención o alteración de la adhesión de las integrinas desencadena una forma de apoptosis conocida como anoikis [115]. De esta manera se ha demostrado que la muerte celular de los osteocitos es importante para la progresión de la enfermedad y la pérdida ósea [343].

La glicoproteína transmembrana E11 / gp38 es específica de osteocitos. Es la proteína que se expresa más tempranamente durante la transición de osteoblastos a osteocitos y, por lo tanto, puede considerarse como un impulsor de este proceso osteocitogénico. E11 / gp38 está presente en los osteocitos en la matriz recién formada (osteóide), así como en los huesos mineralizados [344]. Esta glicoproteína es necesaria para el alargamiento de los procesos dendríticos en respuesta al estrés de cizallamiento / corte del flujo de fluido. Como la formación de dendritas es un proceso activo, E11 / gp38 puede ser crítico no solo para la formación de dendritas sino también para la función y viabilidad de los osteocitos y, por lo tanto, esencial para la función ósea normal. Además está implicado en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular [345].

CD44 es una glicoproteína transmembrana con funciones de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Si bien se expresa en una amplia variedad de tipos celulares, en osteocitos tiene una alta expresión, actuando como un receptor de matriz. Posee capacidad para unir macromoléculas de matriz, como la fibronectina, el colágeno y el hialuronato [346]. Participa en muchos procesos celulares entre los que se incluyen el crecimiento celular, supervivencia, diferenciación y movilidad. La alteración o disrupción en la expresión de CD44 contribuye a numerosas condiciones patológicas [347].

Como mencionamos, la brucelosis osteoarticular es la localización más común de la enfermedad activa en el hombre. Si bien, está documentado que *Brucella* causa pérdida ósea, los mecanismos moleculares implicados no han sido completamente dilucidados aún. Decidimos estudiar entonces la interacción de *Brucella* con los osteocitos. Estas células, secretan numerosos factores que regulan la diferenciación de

los osteoclastos y de los osteoblastos. Durante un proceso patológico, como la infección por *B. abortus*, la función de estas células puede ser alterada. Esto puede llevar a la destrucción ósea mediante diversos mecanismos los cuales involucrarían el aumento en la expresión de MMPs, inducción de osteoclastogénesis y la alteración de la función de los osteocitos. Para ello, decidimos estudiar la respuesta de los osteocitos frente a la infección con *B. abortus* usando como modelo la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4. Además, nos planteamos estudiar la interacción entre los osteocitos y los macrófagos que podrían ser atraídos al sitio de infección, por constituir este tipo celular el nicho de multiplicación preferencial de la bacteria.

RESULTADOS

B. abortus infecta y se multiplica intracelularmente en la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4

En primer lugar evaluamos la capacidad de *B. abortus* de invadir y multiplicarse en la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4. Para ello las células fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. A distintos tiempos post-infección las células fueron lisadas para determinar el número de bacterias viables intracelulares mediante el recuento de UFC en placas de TSA. Los ensayos de infección demostraron que la bacteria es internalizada y puede multiplicarse en las células MLO-Y4. Como control, infectamos en paralelo una línea celular de macrófagos murinos (J774.A1) ya que había sido demostrado que *B. abortus* puede infectar y multiplicarse en éstas células. A todos los tiempos evaluados, el número de bacterias fue mayor en células J774.A1 que en células MLO-Y4 (**Figura 1**). Este resultado es consistente ya que se ha demostrado que los macrófagos son el principal nicho replicativo de *Brucella* [108, 348].

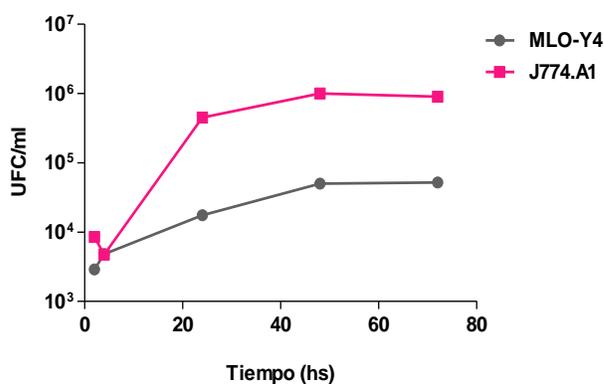


Figura 1. *B. abortus* infecta y se multiplica intracelularmente en la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4. Los osteocitos (MLO-Y4) y los macrófagos (J774.A1) fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100) durante 2 hs, luego fueron incubados en medio de cultivo con antibiótico para eliminar a las bacterias extracelulares. Las UFC intracelulares fueron evaluadas en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección (2, 4, 24, 48 y 72 hs).

La infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP-2, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas en osteocitos murinos

Muchos mediadores moleculares solubles como MMPs, RANKL y/o las citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 han demostrado ser importantes en la inducción de la osteoclastogénesis en condiciones patológicas [95, 110-112]. Además, las quemoquinas podrían contribuir al daño óseo atrayendo células inflamatorias al sitio de infección. Por lo tanto, decidimos investigar la capacidad de los osteocitos para secretar MMPs, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas frente a la infección

con *B. abortus*. Como se muestra en la **Figura 2** la infección con *B. abortus* indujo un aumento significativo en la expresión de MMP-2 medida por zimografía utilizando como matriz gelatina y en la expresión de RANKL, TNF- α e IL-6 de una manera dependiente de la MOI utilizada (**Figura 2A-E**). La infección por *B. abortus* no indujo la secreción de IL-1 β por parte de los osteocitos (no mostrado). Por otro lado, la secreción de la quemoquina CXCL1 (KC) también fue inducida por la infección de manera dependiente de la MOI utilizada (**Figura 2F**). Estos resultados indican que *B. abortus* puede infectar y multiplicarse en los osteocitos induciendo la secreción de los diferentes mediadores proinflamatorios y proosteoclastogénicos.

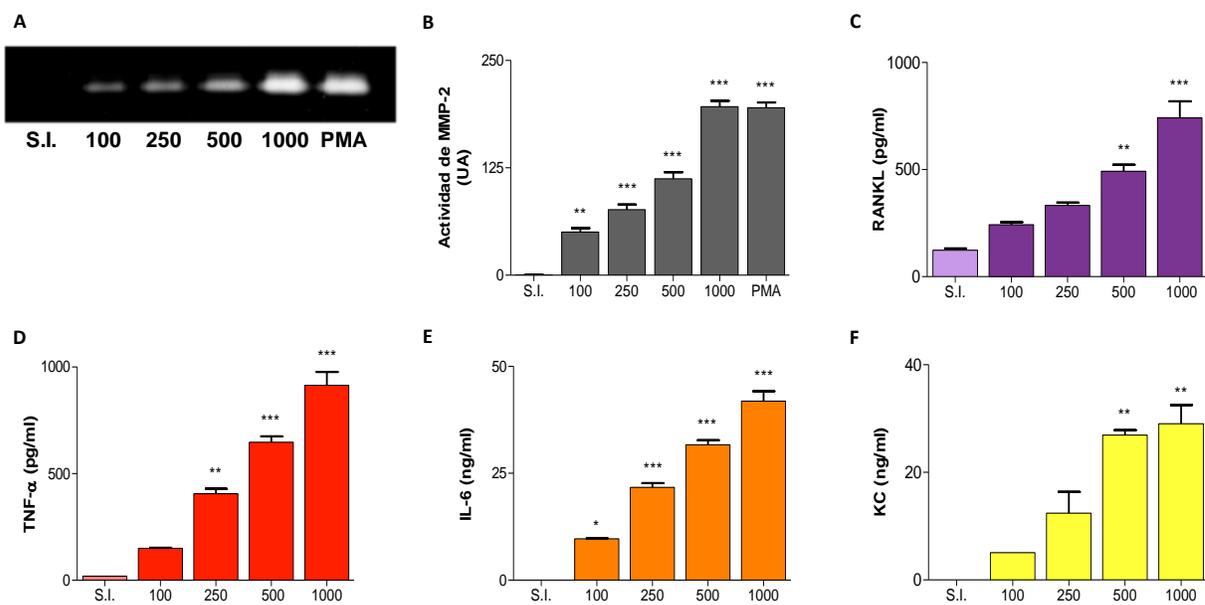


Figura 2. La infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP-2, RANKL, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas en osteocitos murinos. Las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* a diferentes MOI (100, 250, 500, 1000), a las 24 hs post-infección se determinó la actividad de MMP-2 por zimografía (A). Análisis densitométrico de tres experimentos independientes realizados como se describe para A (B). Los niveles de RANKL, TNF- α , IL-6 y KC fueron evaluados por ELISA en sobrenadantes de cultivo recolectados a las 24 hs (RANKL, L-6 y KC) o a las 8 hs (TNF- α) (C, D, E, F). PMA: control positivo. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.). UA: unidades arbitrarias.

La infección con *B. abortus* redujo la expresión de Cx43 pero no modificó la expresión de integrina- α y - β , E11 / gp38 y CD44

Los osteocitos se encuentran embebidos en la matriz extracelular mineralizada del hueso, y se conectan con los osteoblastos presentes en la superficie del hueso y con los osteocitos vecinos a través de conexiones, estos son hemicanales que atraviesan la membrana lipídica formados por la unión de seis

conexinas [266]. Cx43 es la proteína más abundante de la membrana de osteocitos, y es la que se encuentra formando los conexones los cuales facilitan el pasaje de distintos factores involucrados principalmente en la sobrevivencia celular [267].

Para determinar si la infección modula la expresión de Cx43 en los osteocitos, las células se infectaron con *B. abortus* y se determinó la expresión del gen de Cx43 a nivel de ARNm por RT-qPCR, y la expresión de la proteína Cx43 se evaluó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos. La infección con *B. abortus* redujo la expresión tanto del ARNm como de la proteína de Cx43 (**Figuras 3A, B**), indicando que la infección podría alterar la unión de los osteocitos.

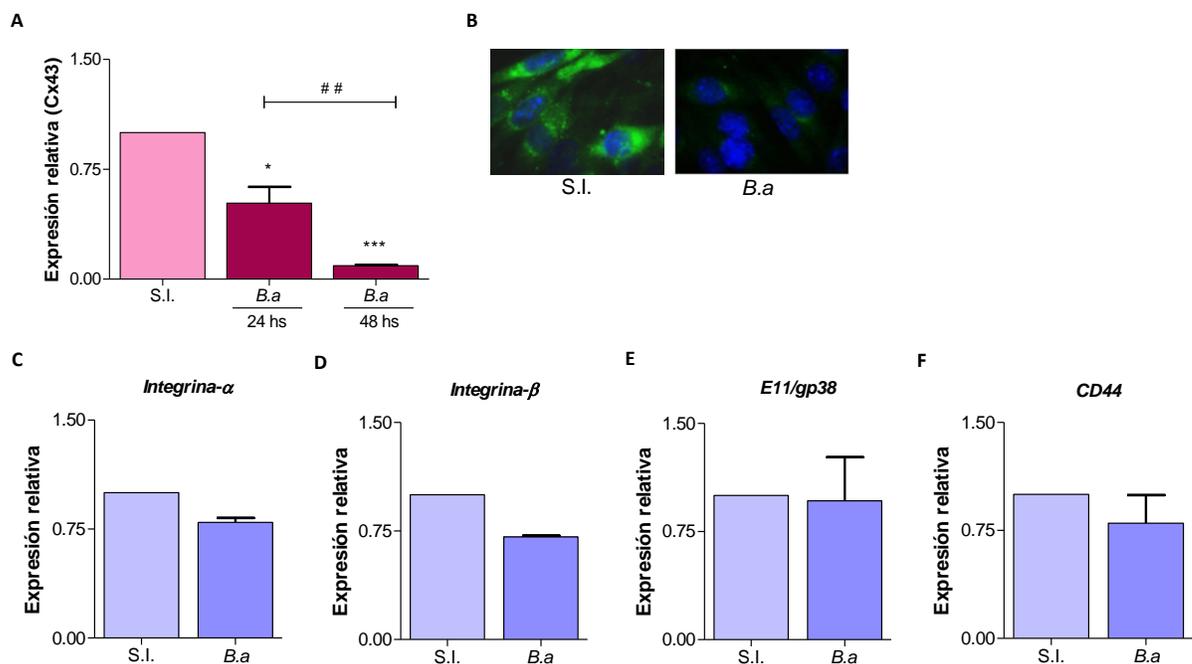


Figura 3. La infección con *B. abortus* redujo la expresión de Cx43 pero no modificó la expresión de Integrina- α y - β , E11/gp38 y CD44. La expresión relativa del gen de Cx43 se evaluó mediante la técnica de RT-qPCR en células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) o infectadas con *B. abortus* (*B.a*) a las 24 o 48 hs post-infección (**A**). La expresión de la proteína Cx43 se evaluó a las 48 hs post-infección por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-Cx43 (Cx43) los núcleos fueron teñidos con (DAPI) (núcleos) (**B**). Los niveles de expresión relativa de los genes de Integrina- α (**C**), Integrina- β (**D**), E11/gp38 (**E**), CD44 (**F**) fueron evaluados por RT-qPCR a las 24 y 48 hs luego del estímulo. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.); ## = $p < 0.01$.

Por otra parte, las integrinas pueden vincular el citoesqueleto celular con la matriz extracelular [114] y son esenciales, junto a otras moléculas accesorias, para la supervivencia de la célula [115]. Realizamos experimentos para determinar si la infección con *B. abortus* podía afectar la expresión de las integrinas y moléculas accesorias. Nuestros resultados indicaron que la infección con *B. abortus* no modificó la expresión del ARNm de integrina- α y - β , E11 / gp38 y CD44 (**Figura 3C-F**).

Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inhiben la expresión de Cx43, integrina- α y - β , E11 / gp38 y CD44

Los macrófagos constituyen el principal nicho replicativo de *Brucella*, contribuyendo de este modo a la cronicidad de la infección. Estos al ser infectados por *B. abortus* secretan citoquinas proinflamatorias [117, 118] las cuales pueden tener diferentes efectos sobre la expresión de Cx43, integrinas y las moléculas accesorias expresadas en otros tipos celulares. Decidimos, entonces, estudiar que ocurre con la expresión de Cx43, integrina- α , integrina- β y las moléculas accesorias E11 / gp38, CD44 de los osteocitos frente al estímulo con sobrenadantes de macrófagos murinos infectados. Para esto, se infectaron macrófagos murinos de la línea celular J774.A1 con *B. abortus* (100:1), 24 hs luego de la infección los sobrenadantes fueron recolectados y se utilizaron para estimular osteocitos por 24 y 48 hs. A continuación se evaluó por RT-qPCR la expresión de las diferentes moléculas. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inhibieron la expresión del ARNm de las integrinas- α y - β y de la molécula CD44, y en menor medida la expresión del ARNm de E11 / gp38 (**Figuras 4A-D**). También inhibió la expresión de Cx43 a nivel de ARNm y de proteína (**Figura 4E, F**). La magnitud de la inhibición fue mayor a las 48 hs después del tratamiento para las integrinas- α y - β . En cambio, la expresión de CD44 mostró una mayor inhibición a las 24 hs y su expresión se restableció a los niveles basales a las 48 hs. Los sobrenadantes de macrófagos no infectados no tuvieron efecto sobre la expresión de estas moléculas.

Teniendo en cuenta que Cx43 y las integrinas están implicadas en mecanismos de detección y señalización en respuesta a fuerzas mecánicas, diferenciación de osteoclastos, migración de osteoclastos, apoptosis de osteocitos y secreción de MMPs [119, 349] estos resultados sugieren que los mediadores secretados por los macrófagos infectados por *B. abortus* podrían alterar la homeostasis ósea modulando la expresión de Cx43, integrinas y moléculas accesorias en osteocitos.

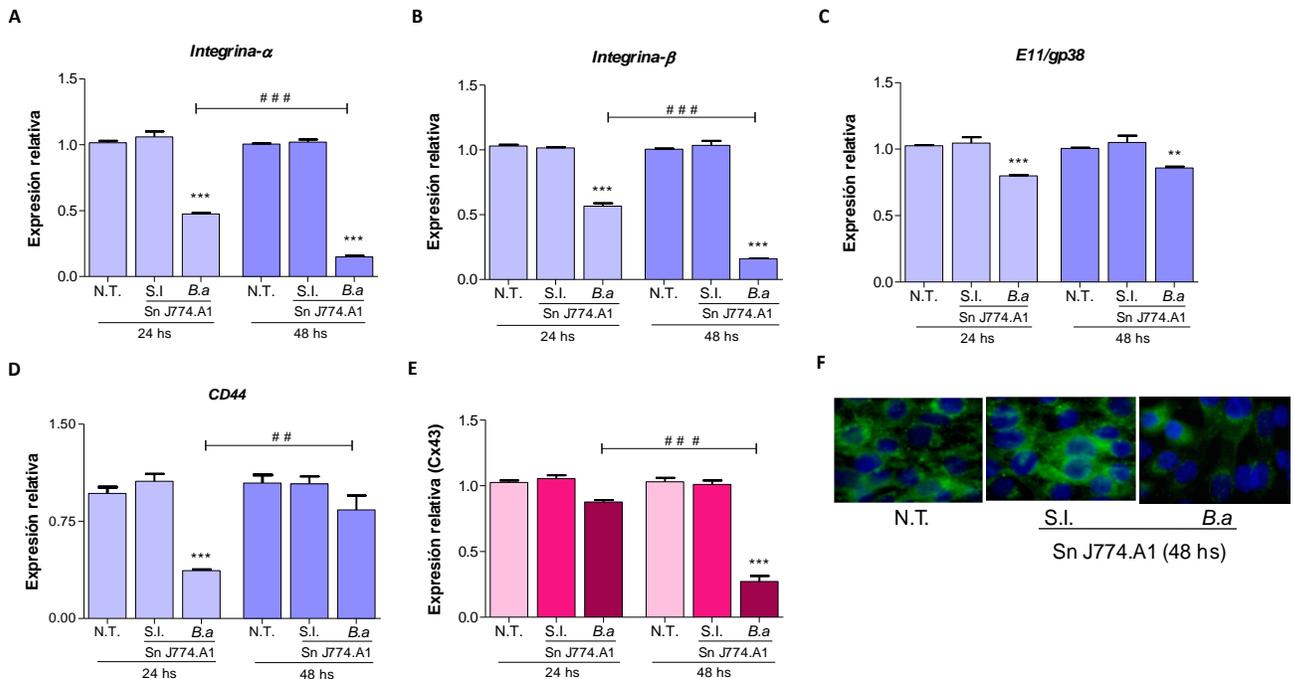


Figura 4. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inhiben la expresión de Cx43, Integrina- α y - β , E11/gp38 y CD44. Las células MLO-Y4 fueron estimuladas con sobrenadantes (Sn) de macrófagos murinos (J774.A1) sin infectar (S.I.) o infectados con *B. abortus* (B.a) en proporción 1:2. Los niveles de expresión relativa de los genes de Integrina- α (A), Integrina- β (B), E11/gp38 (C), CD44 (D) y Cx43 (E) fueron evaluados por RT-qPCR a las 24 y 48 hs luego del estímulo. La producción de Cx43 se evaluó a las 48 hs luego del estímulo por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos anti-Cx43 (Cx43) los núcleos fueron teñidos con (DAPI) (núcleos) (F). ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ versus el control no tratado (N.T.). ## = $p < 0.01$; ### = $p < 0.001$.

La infección con *B. abortus* no induce apoptosis de los osteocitos

Los ratones que carecen de Cx43 en osteoblastos y osteocitos o sólo en osteocitos muestran un aumento de la apoptosis de los osteocitos [113]. Teniendo en cuenta que la infección con *B. abortus* reduce la expresión de Cx43, decidimos investigar si la infección afecta la viabilidad de los osteocitos. Con este fin, las células MLO-Y4 fueron infectadas a MOI 1000 durante 2 hs, luego de haber realizado un lavado con el objetivo de eliminar las bacterias que no fueron internalizadas, los cultivos fueron incubados en medio con antibióticos. A las 24 hs post-infección la apoptosis fue evaluada por tinción de los núcleos con Hoechst 33342 y posterior evaluación por microscopía de fluorescencia y mediante la técnica de TUNEL. Las células fueron tratadas con PFA al 4% o 200 μ M de H_2O_2 como control positivo. Los resultados indicaron que la infección de las células MLO-Y4 con *Brucella* no induce apoptosis ya que no observamos diferencias significativas ($p > 0.05$) en el número de células apoptóticas entre las células infectadas y los controles sin infectar mediante la tinción con Hoechst 33342 (Figura 5A, B) y la técnica de TUNEL (Figura 5A, C).

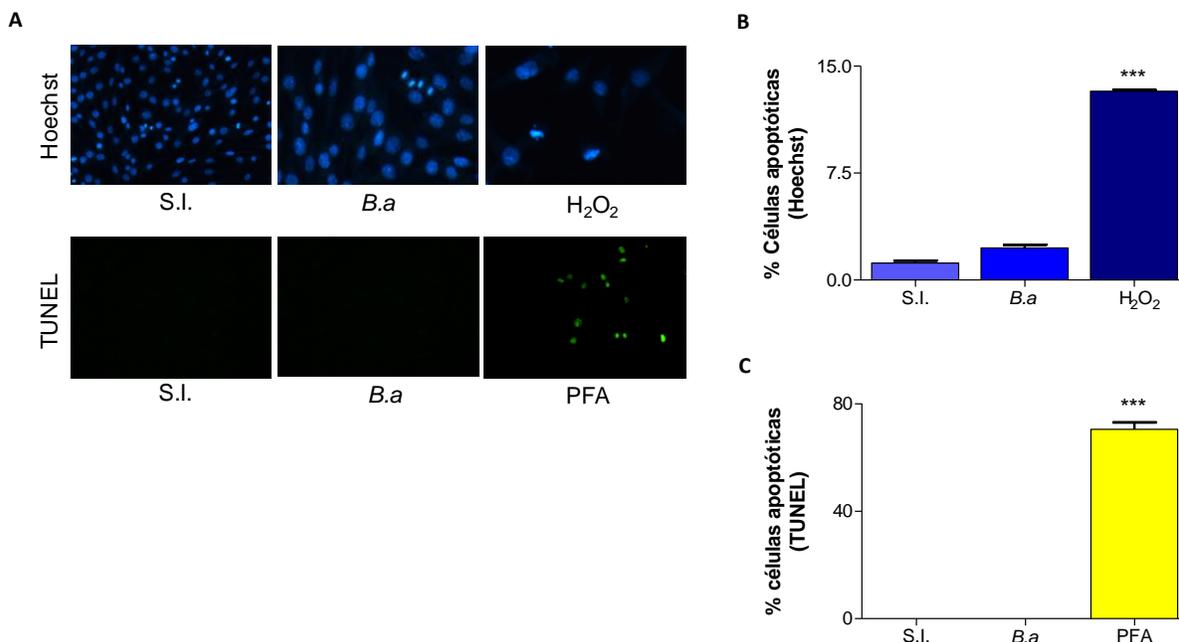


Figura 5. La infección con *B. abortus* no induce apoptosis de los osteocitos. Las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* (*B.a*) a MOI 1000 o fueron tratadas con 200 μ M de H₂O₂ o PFA al 4% como control positivo. Luego de 24 hs las células fueron teñidas con Hoechst 33342 o con TUNEL (A) y evaluadas por microscopía de fluorescencia. La cuantificación de células apoptóticas fue realizada calculando el porcentaje de células positivas para Hoechst 33342 (B) y TUNEL (C). *** =p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inducen apoptosis de los osteocitos

Debido a que los sobrenadantes de los macrófagos murinos infectados con *B. abortus* inhiben la expresión tanto de Cx43 como de las integrinas y las moléculas accesorias, también implicadas en la viabilidad celular, evaluamos que ocurría con la sobrevivencia celular en aquellos osteocitos estimulados con los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus*. Para ello, nuevamente utilizamos como modelo la línea celular de macrófagos murinos J774.A1 y analizamos el efecto de las citoquinas secretadas por los macrófagos infectados con *B. abortus* sobre la apoptosis de los osteocitos. Para cumplir con este objetivo, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos infectados con *B. abortus* a las 24 hs post-infección para posteriormente estimular a los osteocitos durante 24 hs. Luego las células fueron teñidas con Anexina V-FITC/Ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Los resultados fueron corroborados mediante la técnica de TUNEL y por morfología nuclear mediante la tinción de los núcleos con Hoechst 33342 y posterior evaluación por microscopía de fluorescencia. Como control positivo de apoptosis, las células fueron tratadas con 200 μ M de H₂O₂. Los osteocitos estimulados con los sobrenadantes de macrófagos infectados con *B. abortus* exhibieron una unión de anexina V-FITC

significativamente mayor que las células tratadas con los sobrenadantes de macrófagos no infectados o las células no tratadas (**Figura 6A**), lo que sugiere un efecto proapoptótico de los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *Brucella*. La ocurrencia de la apoptosis fue confirmada por morfología nuclear mediante tinción de núcleos con Hoechst 33342 (**Figura 6B, C**) y ensayo de TUNEL (**Figura 6B, D**). Estos resultados demostraron que los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inducen la apoptosis de los osteocitos, contribuyendo de este modo al daño óseo.

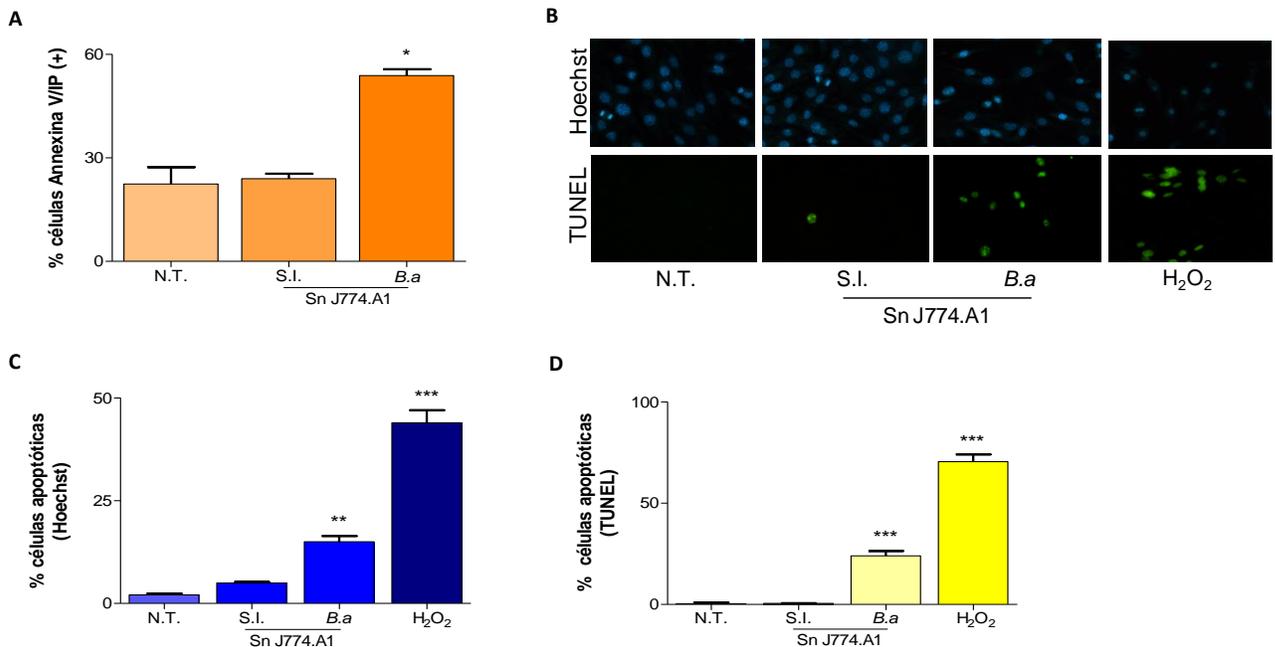


Figura 6. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* inducen apoptosis de los osteocitos. Las células MLO-Y4 fueron tratadas con sobrenadantes de cultivo (Sn) (en proporción 1:2) de macrófagos murinos (J774.A1) sin infectar (S.I.) o infectados con *B. abortus* (B.a), 24 hs después del estímulo la apoptosis fue evaluada por tinción con anexina V / IP y posterior análisis por citometría de flujo. La ocurrencia de la apoptosis fue confirmada con la tinción de núcleos con Hoechst 33342 y la técnica de TUNEL y posterior microscopía de fluorescencia (**B**). La cuantificación de células apoptóticas fue realizada calculando el porcentaje de células positivas para anexina V-FITC (**A**) Hoechst 33342 (**C**) y TUNEL (**D**). N.T.: No tratado. * = p<0.05; ** = p<0.01; *** = p<0.001 versus el sobrenadante (S.I.).

Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis

Los osteoclastos juegan un papel importante en la reabsorción ósea ya que son las células encargadas de la degradación de la matriz ósea. Estas células se originan a partir de la fusión de células precursoras que pertenecen al linaje monocitos/macrófagos en la médula ósea [350, 351]. Este proceso está mediado por RANKL, pero bajo condiciones inflamatorias podría ser mediado por citoquinas proinflamatorias [110]. Para determinar si los factores producidos por los osteocitos infectados con *B. abortus* podrían inducir la formación de osteoclastos, los macrófagos pertenecientes a la línea celular RAW 264.7 (que se

utilizan habitualmente como precursores de osteoclastos) se cultivaron en medio suplementado con M-CSF por 3 días para estimular la diferenciación de los precursores de osteoclastos, luego los precursores fueron estimulados con sobrenadantes de osteocitos infectados con *B. abortus* (MOI 1000) a diferentes diluciones, en presencia de M-CSF por 7 días. Para determinar la presencia de osteoclastos las células fueron teñidas para revelar la presencia de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Las células multinucleadas (más de tres núcleos) TRAP positivas fueron definidas como osteoclastos, y el número de osteoclastos fue determinado por recuento al microscopio.

Los precursores de osteoclastos estimulados con los sobrenadantes de osteocitos infectados con *B. abortus*, en presencia de M-CSF, se diferencian a osteoclastos maduros (células multinucleadas, TRAP positivas) de manera dosis dependiente (**Figura 7A, B**). Estos resultados indican que los mediadores presentes en el sobrenadante de los osteocitos infectados con *B. abortus* promueven la formación de osteoclastos.

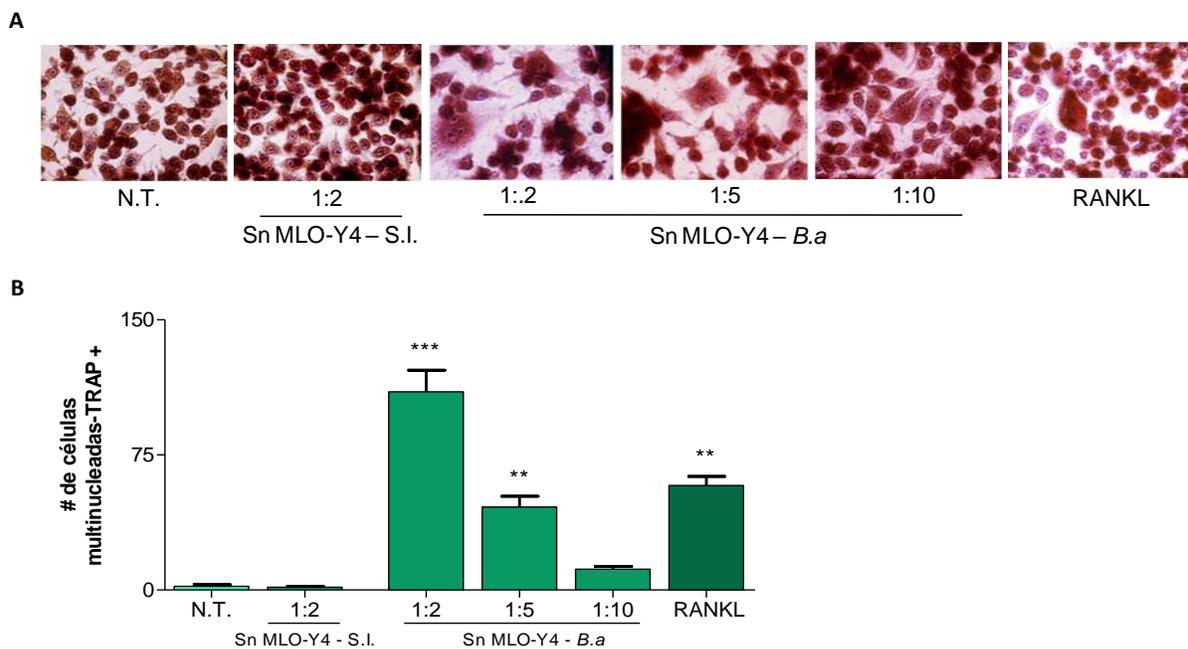


Figura 7. Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis.

Los precursores de osteoclastos (RAW 264.7) fueron estimulados con sobrenadantes de cultivo (Sn) de células MLO-Y4 infectadas con *B. abortus* (*B.a*) (en proporción 1:2, 1:5 ó 1:10) o con Sn (en proporción 1:2) de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) junto con M-CSF (30 ng/ml). Después de 7 días, la osteoclastogénesis se determinó mediante la cuantificación de células multinucleadas, TRAP positivas. Se tomaron imágenes digitales representativas por microscopía óptica (**A**), y se identificaron y contaron células multinucleadas TRAP positivas (**B**). RANKL se utilizó como control positivo (50 ng/ml). N.T.: No tratado. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$ versus el sobrenadante (S.I.).

B. abortus induce la secreción de TNF- α por parte de los osteocitos mediante un mecanismo que depende de la presencia de un SST4 (VirB) funcional

Dado que el sistema de secreción de tipo cuatro (SST4) VirB de *B. abortus* ha sido implicado en la inducción de respuestas inflamatorias durante la infección [127, 129], se realizaron experimentos para determinar el papel del SST4 en la secreción de TNF- α , RANKL e IL-6, por parte de los osteocitos. Con este fin, las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* WT o con la mutante isogénica deficiente en el SST4, $\Delta virB10$ a diferentes MOI, luego de las 8 o 24 hs post-infección, los sobrenadantes de los osteocitos infectados fueron recolectados y mediante la técnica ELISA se midió la expresión de TNF- α , RANKL e IL-6 respectivamente. Los resultados indicaron que la mutante $\Delta virB10$ fue incapaz de inducir la expresión de TNF- α por parte de los osteocitos infectados (**Figura 8A, B**). Sin embargo, los niveles de RANKL e IL-6 inducidos por la mutante fueron similares a los inducidos por la bacteria WT (**Figura 8C-F**). Concluimos entonces que *B. abortus* induce la secreción de TNF- α mediante un mecanismo dependiente del SST4.

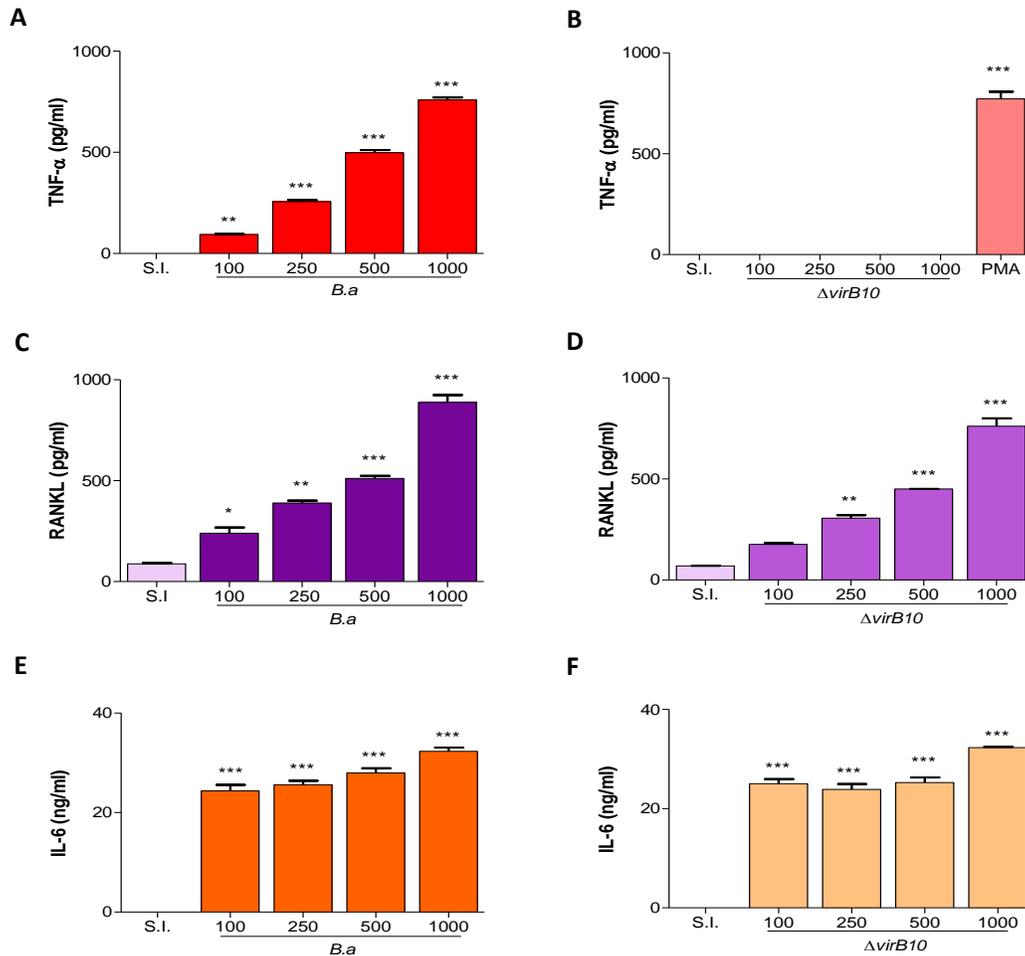


Figura 8. *B. abortus* induce la secreción de TNF- α por parte de los osteocitos mediante un mecanismo que depende de la presencia de un SST4 (VirB) funcional. Los niveles de TNF- α (A y B), RANKL (C y D) e IL-6 (E y F) fueron medidos en sobrenadantes de cultivo de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.), infectadas a diferentes MOI (100, 250, 500, 1000) con *B. abortus* WT (*B.a*), o la mutante $\Delta virB10$ por ELISA a las 8 hs post-infección (TNF- α) y a las 24 hs post-infección (RANKL e IL-6). PMA, se utilizó como control positivo. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis a través de RANKL y TNF- α

Las citoquinas RANKL y TNF- α son abundantes en aquellos sitios de inflamación y erosión ósea [352]. Debido a que estas citoquinas son potentes inductores de osteoclastogénesis podrían inducir sinérgicamente la osteoclastogénesis a través de mecanismos cooperativos [352]. Dado a que estas citoquinas fueron secretadas por los osteocitos tras la infección con *B. abortus*, en primer lugar, se realizaron experimentos para determinar la contribución de estas citoquinas en la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus*. Con este fin, se cultivaron

precursores de osteoclastos (macrófagos pertenecientes a la línea celular RAW 264.7) con M-CSF para estimular su diferenciación, luego de 3 días fueron estimulados con los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TNF- α u OPG y la osteoclastogénesis se evaluó mediante la presencia de células multinucleadas, TRAP positivas. En comparación con las células no tratadas, la neutralización con el anticuerpo anti-TNF- α redujo significativamente la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *Brucella*. Además, OPG también redujo significativamente la formación de osteoclastos con respecto a los osteocitos infectados no tratados (**Figura 9**). Estos resultados, en conjunto indican que las citoquinas RANKL y TNF- α secretadas por los osteocitos infectados son las involucradas en la inducción de osteoclastogénesis.

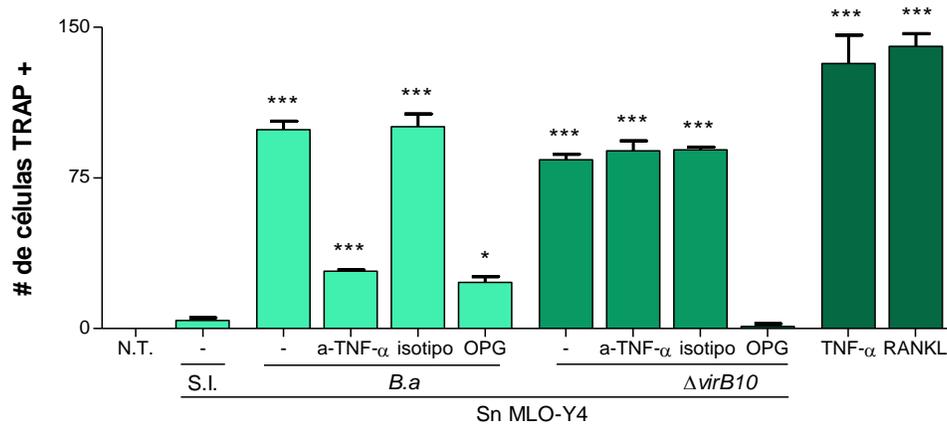


Figura 9. Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* o la mutante $\Delta virB10$ inducen osteoclastogénesis a través de RANKL y TNF- α . Los precursores de osteoclastos fueron estimulados con sobrenadantes de cultivo (Sn) (en proporción 1:2) de células MLO-Y4 infectadas con *B. abortus* (*B.a*), con Sn de células MLO-Y4 infectadas con la mutante $\Delta virB10$ o Sn de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.) junto con M-CSF. Los sobrenadantes de las células MLO-Y4 infectadas se pre-incubaron con OPG, un anticuerpo específico neutralizante anti-TNF- α , o el control de isotipo. Luego de 7 días, la osteoclastogénesis se determinó mediante la cuantificación de células multinucleadas, TRAP positivas. RANKL (50ng/ml) y TNF- α (50ng/ml) se utilizaron como control positivo. N.T.: No tratado. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ versus el sobrenadante S.I.

Los sobrenadantes de los osteocitos infectados con la mutante $\Delta virB10$ inducen osteoclastogénesis a través de RANKL

En condiciones inflamatorias no solo RANKL sino las citoquinas proinflamatorias son inductoras de osteoclastogénesis y dentro de estas últimas, TNF- α es la principal citoquina involucrada [275, 353] por lo tanto, se realizaron experimentos para determinar el papel del SST4 en la inducción de

osteoclastogénesis. Con este fin, se utilizaron los sobrenadantes de los osteocitos infectados con la cepa mutante $\Delta virB10$ para determinar si son capaces de inducir la diferenciación de osteoclastos a partir de sus precursores en presencia de M-CSF. Nuestros resultados indicaron que los sobrenadantes de los osteocitos infectados con la mutante $\Delta virB10$, que no inducen la secreción de TNF- α , fueron capaces de inducir la diferenciación de osteoclastos de manera similar a la inducida por los sobrenadantes de los osteocitos infectados con *B. abortus* WT. Cuando los experimentos de osteoclastogénesis se realizaron en presencia de OPG, la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de los osteocitos infectados con la mutante $\Delta virB10$ se redujo a niveles basales (**Figura 9**).

El SST4 es un factor de virulencia imprescindible para la sobrevivencia intracelular de *Brucella* en distintos tipos celulares [125, 138, 143]. Es por esto que decidimos evaluar si los resultados obtenidos con la bacteria mutante para el SST4 eran debidos a la ausencia de un SST4 funcional o a la incapacidad de la mutante de multiplicarse intracelularmente. Para esto las células fueron infectadas a MOI 100 durante 2 hs con *B. abortus* WT, la mutante para el SST4 ($\Delta virB10$), y con una cepa rugosa denominada RB51 (mutante rugosa para el LPS de *B. abortus*) la cual posee un SST4 funcional pero no es capaz de multiplicarse intracelularmente [354]. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. A distintos tiempos post-infección las células fueron lisadas para determinar el número de bacterias viables intracelulares mediante el recuento de UFC en placas de TSA. Por otro lado, los sobrenadantes de las células infectadas con las diferentes bacterias fueron recolectados a las 8 hs post-infección para luego, mediante la técnica ELISA evaluar la producción de TNF- α .

En concordancia a lo ya descrito en otros tipos celulares tanto *B. abortus* WT como la mutante $\Delta virB10$ y la cepa rugosa RB51 fueron capaces de infectar a los osteocitos. Sin embargo, solo *B. abortus* WT pudo sobrevivir intracelularmente y multiplicarse, generando una infección estable (**Figura 10A**). Al evaluar la producción de TNF- α por parte de los osteocitos infectados, se observó que tanto la bacteria WT como la cepa rugosa RB51 eran capaces de inducir niveles similares de dicha citoquina (**Figura 10B**). Indicando que la inducción de la expresión de TNF- α es independiente de la replicación bacteriana, pero dependiente de un SST4 funcional.

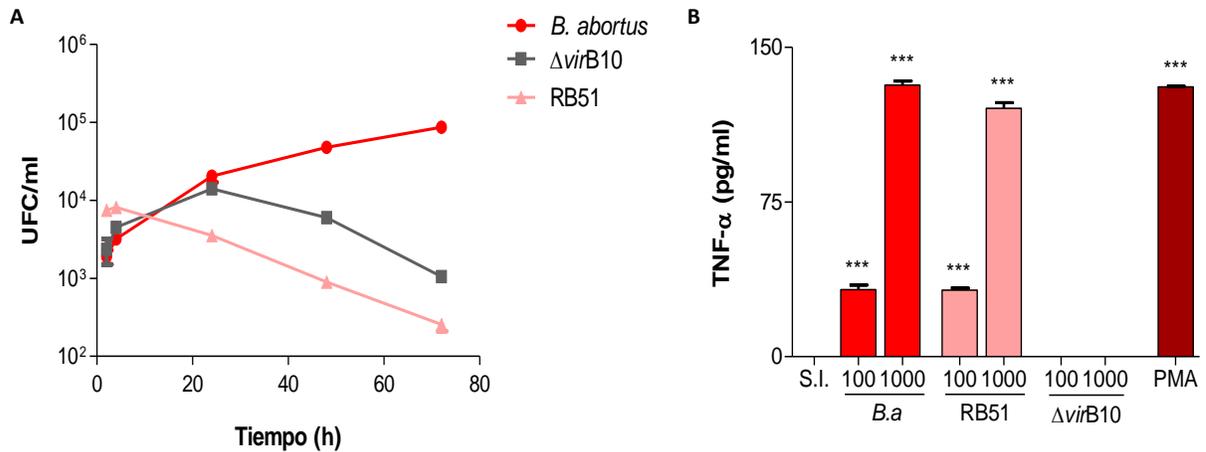


Figura 10. La mutante rugosa de *B. abortus* RB51 no replica en osteocitos, pero si induce la expresión de TNF- α . Las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* WT (*B. abortus*) y con las mutantes RB51 y $\Delta virB10$ durante 2 hs, luego los cultivos fueron incubados en medio con antibióticos para eliminar las bacterias extracelulares y a las 2, 4, 24, 48 y 72 hs post-infección se determinaron las UFC intracelulares (**A**). Los niveles de TNF- α fueron medidos en sobrenadantes de cultivo de células MLO-Y4 sin infectar (S.I.), infectadas con *B. abortus* WT (*B.a*), o las mutantes RB51 o $\Delta virB10$ por ELISA a las 8 hs post-infección (**B**). PMA, se utilizó como control positivo. ***= $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

Las mutantes de *B. abortus* para las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275 inducen la expresión de TNF- α

Recientemente han sido identificadas las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275, las cuales son translocadas por el SST4 en la célula hospedadora durante la infección con *B. abortus* [139]. Debido a que el SST4 tiene un papel fundamental en la inducción de la expresión de TNF- α por parte de los osteocitos nos propusimos investigar la relevancia de los efectores BPE005, BPE123 y BPE275 en dicho fenómeno. Para llevar a cabo este objetivo, las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* WT y las mutantes isogénicas $\Delta bpe005$, $\Delta bpe123$ y $\Delta bpe275$, la producción de TNF- α se evaluó por ELISA. Los resultados revelaron que las mutantes para los diferentes efectores estudiados inducen la expresión de TNF- α en niveles similares a *B. abortus* WT, indicando que estas proteínas efectoras no se encuentran involucradas en la inducción de la expresión de TNF- α por parte de *Brucella* en los osteocitos (**Figura 11**).

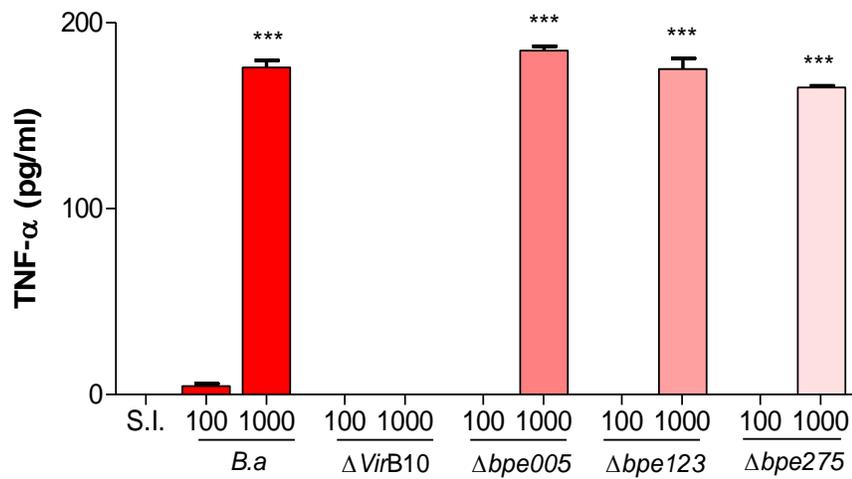


Figura 11. Las mutantes de *B. abortus* para las proteínas BPE005, BPE123 y BPE275 inducen la expresión de TNF- α . Las células MLO-Y4 fueron infectadas a distintas MOI con *B. abortus* WT (*B.a*) y con las mutantes Δ bpe005, Δ bpe123 y Δ bpe275, a las 8 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de TNF- α por ELISA. ***= $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

DISCUSIÓN

La brucelosis osteoarticular es la complicación más común de la enfermedad activa en el hombre [23, 303, 307, 355, 356]. En el presente capítulo, se estudió el papel desempeñado por los osteocitos en esta forma de la enfermedad. Si bien los osteocitos son las células más abundantes del hueso [256], su función fue desconocida durante mucho tiempo. En parte, porque los osteocitos están embebidos en la matriz ósea mineralizada y no son accesibles para su purificación en un número razonable. El establecimiento de la línea celular MLO-Y4 ha hecho posible los diferentes experimentos ya que estas células conservan las características fenotípicas de los osteocitos [315, 357]. Hemos estudiado el papel desempeñado por los osteocitos en la brucelosis osteoarticular, ya que estas células han sido reconocidas como mediadores centrales implicados en la homeostasis de los osteoblastos y los osteoclastos, la cual se ve interrumpida en la enfermedad inflamatoria ósea de origen infeccioso o no infeccioso [358].

B. abortus puede invadir y multiplicarse en los osteocitos. La capacidad de *B. abortus* para invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro de los osteocitos está en concordancia con resultados previos que demuestran su capacidad para replicarse en otras células no fagocíticas, incluyendo hepatocitos, astrocitos, sinoviocitos y osteoblastos [83, 84, 319, 359]. Nuestros resultados indican que la infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP-2, RANKL y citoquinas proinflamatorias. La actividad de las MMPs es necesaria durante la respuesta inmune contra la infección, ya que estas enzimas colaboran en la migración celular y escinden ciertos precursores de citoquinas para generar sus formas activas. Sin embargo, el aumento patológico de la actividad de estas enzimas puede llevar al daño del tejido. De hecho, se ha demostrado la presencia de niveles localmente aumentados de MMPs en varias enfermedades osteoarticulares, incluyendo afecciones reumáticas (artritis reumatoide, osteoartritis y espondiloartritis) y artritis infecciosa tal como la observada en la enfermedad de Lyme [360-362].

RANKL es una molécula homotrimérica que se expresa en la membrana de los osteoblastos, que estimula la diferenciación de los osteoclastos y está involucrada en la reabsorción ósea. En condiciones patológicas, el aumento de los niveles de expresión de RANKL conduce a la destrucción ósea [363]. Además, en estas condiciones, no solo RANKL sino también, las citoquinas proinflamatorias podrían contribuir al daño óseo, induciendo osteoclastogénesis [95, 364-366]. En las enfermedades óseas inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea, las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 han demostrado ser importantes para la progresión de la enfermedad y la osteoclastogénesis [95, 110, 364-366]. Nuestros resultados utilizando OPG y el anticuerpo neutralizante anti-TNF- α indican que RANKL

y TNF- α son las citoquinas claves implicadas en la osteoclastogénesis inducida por osteocitos infectados con *B. abortus*. Además, se demostró que la secreción de TNF- α depende de la expresión de un SST4 funcional. Esto va en concordancia con resultados previos obtenidos por otros en donde han demostrado que este sistema de secreción está implicado en la respuesta inflamatoria inducida por la infección por *B. abortus* [127, 129].

Los canales formados por Cx43, el miembro más abundante de la familia de proteínas conexas expresada en células óseas, median la comunicación entre los osteocitos y entre los osteocitos y las células de la superficie ósea [367]. En otros estudios se ha demostrado que la delección de Cx43 en osteoblastos y osteocitos o solo en osteocitos resulta en un incremento de la apoptosis de los osteocitos corticales [267]. Las integrinas y las moléculas accesorias también controlan el destino y la función de las células al influir no sólo en su proliferación y diferenciación, sino también en la apoptosis [368]. La infección por *B. abortus* redujo la expresión de Cx43 pero no modificó la expresión de las integrinas y las moléculas accesorias (E11 / gp38 y CD44), lo que dio como resultado la ausencia de apoptosis. Sin embargo, teniendo en cuenta que los monocitos/macrófagos son el principal nicho de multiplicación de *Brucella*, se llevaron a cabo experimentos para determinar si los macrófagos infectados con *B. abortus* podrían modular la expresión de Cx43, integrinas y moléculas accesorias en osteocitos. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* redujeron significativamente la expresión de Cx43, integrinas y moléculas accesorias, con la consecuente muerte de células apoptóticas. Las interacciones célula-matriz constituyen un aspecto fundamental de la biología de las células esqueléticas y desempeñan papeles esenciales en la homeostasis ósea. Estas interacciones están predominantemente mediadas por las integrinas, que reconocen y unen sustratos específicos (por ejemplo, fibronectina y colágeno tipo I, ambos constituyentes abundantes de la matriz ósea) y transmiten información desde la matriz extracelular al compartimento intracelular [369]. Cuando las uniones entre las integrinas y la matriz extracelular se alteran se desencadena una forma de apoptosis conocida como anoikis. Los resultados obtenidos indican que es necesaria tanto la reducción de la expresión de las integrinas y moléculas accesorias; involucradas en el anclaje de las células a la matriz extracelular; como la de Cx43 para inducir la apoptosis en osteocitos. Por otro lado, durante la infección directa de los osteocitos, *Brucella* podría estar modulando factores apoptóticos y anti-apoptóticos como ocurre en otros tipos celulares [296, 370].

En conjunto, los resultados del presente capítulo indican que *B. abortus* puede dañar la función de los osteocitos y la viabilidad celular directa e indirectamente, contribuyendo a la destrucción ósea y articular observada en pacientes con complicaciones osteoarticulares de la brucelosis.

Capítulo II

B. abortus modula la función de los osteoblastos a través de la activación de la vía autofágica.

INTRODUCCIÓN

La autofagia es un proceso catabólico esencial para mantener la homeostasis celular que está conservado evolutivamente en las células eucariotas. La vía autofágica tiene un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación, supervivencia y en la homeostasis celular y es crítica en la respuesta al estrés provocado por la falta de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia, altas temperaturas y las infecciones por patógenos [371-374]. Asimismo está involucrada en la remoción de organelas y proteínas innecesarias o dañadas para mantener la homeostasis intracelular [375, 376]. El material citoplasmático es capturado en una estructura vesicular de doble membrana (autofagosoma) que posteriormente sufre un proceso de maduración al fusionarse con los lisosomas (autofagolisosomas) y tanto la membrana interna como el contenido luminal de las vesículas es degradado por las enzimas hidrolíticas lisosomales [372, 377-381].

La autofagia es un mecanismo dinámico que puede dividirse en diferentes etapas secuenciales: selección y reconocimiento del material a ser degradado, formación del autofagosoma, fusión con los lisosomas, degradación del contenido y liberación de las macromoléculas originadas [376]; se encuentra altamente regulada por una familia de proteínas denominadas Atg (del inglés autophagy-related), las cuales están organizadas funcionalmente en complejos macromoleculares y participan en las distintas etapas del proceso [375, 376, 382].

En condiciones fisiológicas hay un nivel basal de autofagia, por lo tanto es necesario un mecanismo eficiente para inducir su activación frente a condiciones de estrés celular [377]. El principal modulador de la vía es la serina / treonina proteína quinasa TOR que regula negativamente al complejo de iniciación conformado por ULKs-Atg13-FIP200 [376, 383]. Con respecto al material a ser degradado, la autofagia puede clasificarse en no selectiva, cuando los componentes citoplasmáticos son secuestrados por el autofagosoma de forma inespecífica, y en autofagia selectiva, que consiste en la degradación de sustratos específicos como organelas, gotas lipídicas y proteínas ubiquitinadas [376, 377, 384]. En este último caso, p62 tiene un papel fundamental ya que se une a proteínas poli o mono ubiquitinadas mediante su dominio de asociación a ubiquitina y por otro lado, interactúa con LC3; por lo tanto, p62 es constitutivamente degradada y vincula los blancos proteicos ubiquitinados con la autofagia para su degradación [385-388].

La formación del autofagosoma comienza con la membrana de aislamiento o fagóforo que se origina principalmente del RE, es la fase más compleja del proceso y requiere el reclutamiento de múltiples

proteínas Atg y una precisa coordinación entre ellas [376, 389]. La nucleación de la membrana de aislamiento inicial esta llevada a cabo por el complejo de fosfatidilinositol-3 quinasa de clase III (PI3K) compuesto por la PI3K Vps15, Atg14 y Beclin-1 [390-392]. Este complejo genera fosfatidilinositol-3-fosfato, el cual promueve la nucleación del autofagosoma y en conjunto con otras proteínas Atg que son atraídas al autofagosoma en formación, reclutan a dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina [383, 393, 394]. Uno de ellos es el de Atg12-Atg5-Atg16 y consiste en la conjugación covalente de Atg12 y Atg5 mediante la actividad de Atg7 y Atg10 que actúan como enzimas E1 y E2 respectivamente; luego Atg12-Atg5 interactúa con Atg16 y se acoplan a la membrana del autofagosoma en formación [395, 396]. El segundo sistema implica la conjugación de fosfatidiletanolamida a LC3 por la acción consecutiva de la proteasa Atg4, de la enzima de tipo E1 Atg7 y la de tipo E2 Atg3. La conjugación lipídica conlleva a la conversión de LC3 soluble (LC3-) a la forma asociada a la membrana del autofagosoma (LC3-II). LC3-II es ampliamente utilizado como marcador de autofagia porque su lipidación y reclutamiento específico a la membrana de los autofagosomas provee un cambio en su distribución e incrementa su movilidad electroforética respecto de LC3-I [321, 395].

La autofagia aumenta durante la diferenciación y mineralización de los osteoblastos. La supresión de la autofagia conduce a una formación ósea deficiente debida a la diferenciación defectuosa de los osteoblastos y a una disminución en su proliferación. Estos datos sugieren la incapacidad de las células mesenquimales precursoras de osteoblastos para pasar del estadio de proliferación inicial al estadio de mineralización [292, 293]. Resultados obtenidos por Pantovic y colaboradores revelaron que tanto la autofagia temprana mediada por la inhibición de mTOR dependiente de MAPK, así como la activación tardía de la señalización Akt/mTOR, son necesarios para la óptima diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos [397].

Por otro lado, estudios realizados utilizando cloroquina y 2-metiladenina revelaron que la autofagia es requerida en los estadios de diferenciación terminal de los osteoblastos, pero no en los estadios iniciales de diferenciación [292]. Si bien se ha demostrado que la disrupción de la autofagia trae como resultado la pérdida de masa ósea debida a la reducción de la deposición de matriz orgánica y mineral como consecuencia de la disminución de la diferenciación y actividad de los osteoblastos, el papel que desempeña la autofagia en la función de los osteoblastos durante una infección bacteriana es desconocido.

Los osteocitos que como mencionamos, son el estadio de diferenciación terminal de los osteoblastos, sufren un aumento en el proceso autofágico que se produce durante esta transición de osteoblastos a osteocitos debido a la necesidad de reciclar más rápidamente las organelas y preservar los nutrientes, mientras que la célula desarrolla sus prolongaciones citoplasmáticas ricas en actina y se ajusta a un ambiente con menores niveles de oxígeno [398, 399].

Considerando que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio [400] y en el capítulo I de este trabajo, ha sido demostrado que *B. abortus* es capaz de invadir y multiplicarse en osteoblastos y osteocitos, induciendo la secreción de citoquinas, quemoquinas y MMPs, que pueden mediar parte del daño óseo observado durante la brucelosis osteoarticular; y que además como resultado de esta infección la deposición de matriz orgánica y mineral por parte de los osteoblastos está inhibida, y la funcionalidad de los osteocitos alterada, decidimos estudiar si la vía autofágica estaba involucrada en la modulación de estos fenómenos durante la infección por *B. abortus*.

RESULTADOS

La infección con *B. abortus* no induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteocitos

Evaluamos en primer lugar si la bacteria es capaz de activar la vía autofágica en los osteocitos. Para alcanzar este objetivo, analizamos la expresión de LC3-II (forma lipidada de LC3-I), cuyo nivel se correlaciona con el número de autofagosomas, por estar asociado específicamente a su membrana y no a otras estructuras vesiculares [401, 402]; también analizamos la presencia de Beclin-1, proteína clave en el ensamblaje del autofagosoma [376].

Las células MLO-Y4 fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. Luego de 24 hs, se obtuvieron extractos celulares totales y se realizó western blotting para analizar la expresión de LC3-II (16 kDa) y Beclin-1 (60 kDa). Como se muestra en la **Figura 12**, la infección con la bacteria no modifica la expresión de LC3-II (**Figura 12A, B**) como tampoco la de Beclin-1 (**Figura 12A, C**).

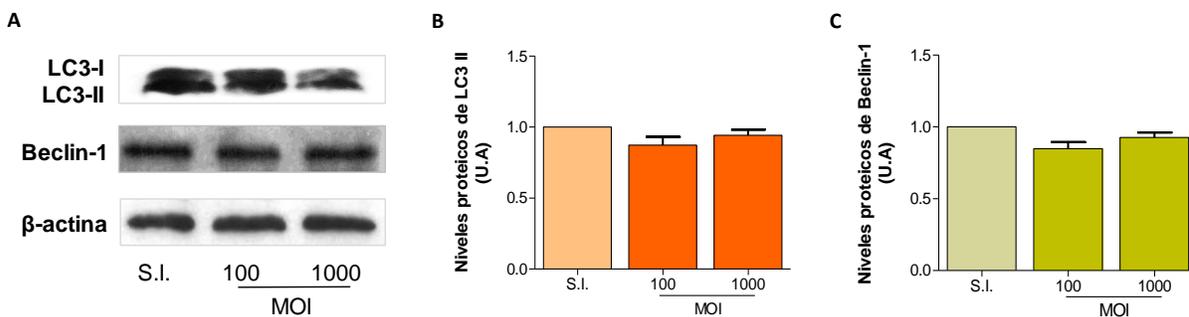


Figura 12. La infección con *B. abortus* no induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteocitos. Las células MLO-Y4 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 con *B. abortus*, a las 24 hs post-infección se obtuvieron extractos celulares totales y se evaluó la expresión de LC3-II (16 kDa) y Beclin-1 (60 kDa), por western blotting, como control de carga se utilizó β-actina (**A**). Análisis densitométrico de los niveles proteicos de LC3-II (**B**) y Beclin-1 (**C**) de dos experimentos independientes mediante el software Image J.

Los osteocitos se encuentran embebidos en la matriz mineralizada del hueso, este es un ambiente hipóxico y pobre en nutrientes por lo que los niveles de actividad autofágica son elevados en condiciones fisiológicas [398, 403]. Nuestros resultados indican que la infección por *B. abortus* no modula la activación de la vía autofágica de las células MLO-Y4.

La infección con *B. abortus* induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteoblastos

Como mencionamos, los osteocitos constituyen el estadio de diferenciación final de los osteoblastos. Por otro lado, se ha demostrado que durante la osteoblastogénesis la activación de la vía autofágica está implicada en la deposición de matriz mineral y orgánica [292, 293] y en nuestro laboratorio hemos demostrado que la infección por *B. abortus* inhibe la deposición de matriz orgánica y mineral por parte de los osteoblastos [400]. Por lo tanto, decidimos evaluar si la infección por *B. abortus* puede modular la activación de la vía autofágica en los osteoblastos. Para llevar a cabo este objetivo, los osteoblastos murinos de la línea MC3T3-E1 fueron infectados con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 por 2 hs. Luego de 24 hs, se obtuvieron extractos celulares totales y se realizó western blotting para analizar la expresión de LC3-II (16 kDa), Beclin-1 (60 kDa) y p62 (62 kDa). La infección con *B. abortus* indujo la expresión de LC3-II (**Figura 13A, B**) y de Beclin-1 (**Figura 13A, C**), además las células infectadas presentaron niveles más bajos de p62 respecto de los controles sin infectar (**Figura 13A, D**). Estos resultados indican que *B. abortus* activa la vía autofágica en los osteoblastos.

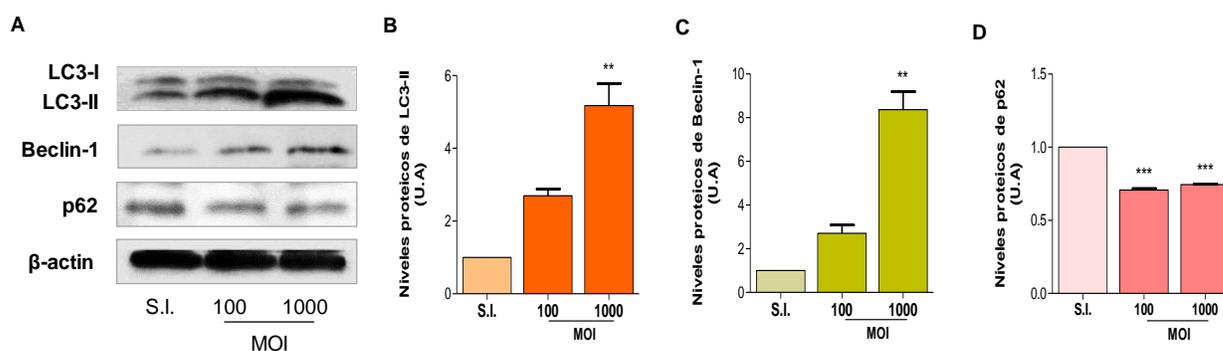


Figura 13. La infección con *B. abortus* induce la expresión de LC3-II y Beclin-1 en osteoblastos. Las células MC3T3.E1 fueron infectadas a MOI 100 y MOI 1000 con *B. abortus*, a las 24 hs post-infección se obtuvieron extractos celulares totales y se evaluó la expresión de LC3 II (16 KDa), Beclin-1 (60 KDa) y p62 (62KDa) por western blotting, como control de carga se utilizó β -actina (**A**). Análisis densitométrico de los niveles proteicos de LC3-II (**B**), Beclin-1 (**C**) y p62 (**D**) de dos experimentos independientes mediante el software Image J. U.A: unidades arbitrarias. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

La inhibición de la deposición de matriz ósea inducida por la infección con *B. abortus* en osteoblastos depende de la vía autofágica

Como mencionamos, en nuestro laboratorio demostramos que la infección con *B. abortus* inhibe la diferenciación de los osteoblastos, puesta en evidencia mediante la inhibición de la deposición de matriz orgánica y mineral [400]. Decidimos evaluar entonces, si la vía autofágica está implicada en la inhibición de la deposición de matriz ósea por parte de los osteoblastos, inducida por la infección con *B. abortus*.

Para ello, las células MC3T3-E1 fueron infectadas con *B. abortus* a MOI 100 y 1000 en presencia o no de bafilomicina A1 o cloroquina, dos compuestos que inhiben la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas, y a los 7 días post-infección cuantificamos la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio y la deposición de calcio por tinción con Alizarina Roja de las monocapas celulares. Además, recolectamos los sobrenadantes de cultivo a las 24 hs post-infección para evaluar la actividad de MMP-2 por zimografía.

En presencia de bafilomicina A1 o de cloroquina la infección con *B. abortus* no es capaz de inhibir la deposición de colágeno (**Figura 14A**) como tampoco la deposición de calcio (**Figura 14B**). Por otro lado, el tratamiento con los inhibidores de autofagia disminuye la expresión de MMP-2 inducida en los osteoblastos por la infección con *B. abortus* (**Figura 14C**). Estos resultados indican que la autofagia podría estar implicada en la modulación de la función de los osteoblastos durante la infección por *B. abortus*.

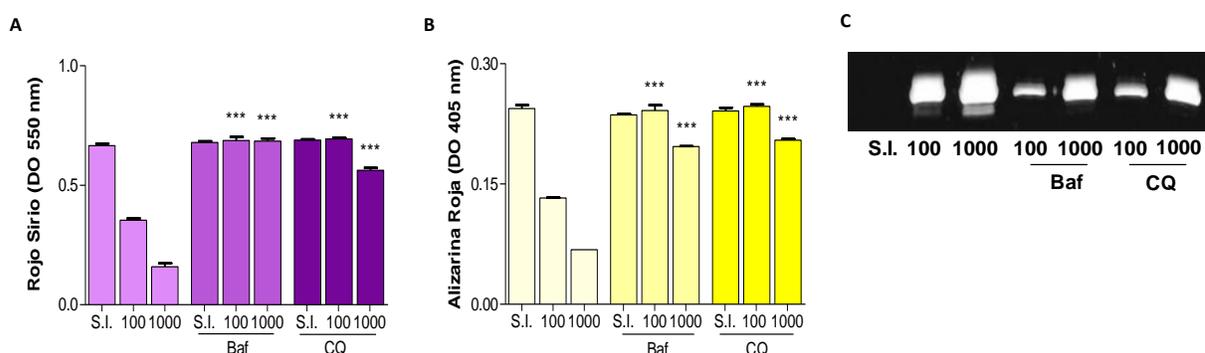


Figura 14. La inhibición de la deposición de matriz ósea inducida por la infección con *B. abortus* en osteoblastos depende de la vía autofágica. Las células MC3T3-E1 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 con *B. abortus* en presencia o no de los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 (Baf) o cloroquina (CQ) y a los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (**A**). La deposición de calcio se cuantificó por tinción con Alizarina Roja a partir de la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 405 nm (**B**). A las 24 hs post-infección se recolectaron los sobrenadantes de cultivo para evaluar la producción de MMP-2 por zimografía (**C**). S.I.: Sin infectar. ***= $p < 0.001$ versus los controles sin tratar.

La replicación de *Brucella* no está implicada en la inhibición de la función de los osteoblastos

B. abortus es capaz de invadir las células interactuando primero con endosomas tempranos; luego desvía la vía de maduración de los autofagosomas y utiliza un sistema de transporte retrógrado para acceder al RE, donde se produce la replicación masiva [96].

Debido a que las proteínas asociadas a la autofagia serían necesarias para la biogénesis de la vacuola replicativa de *B. abortus*, decidimos evaluar si el tratamiento con bafilomicina A1 y cloroquina inhibe la

replicación de *B. abortus*. Para llevar a cabo este objetivo, las células MC3T3-E1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia o no de los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 o cloroquina durante 2 hs. Las UFC intracelulares fueron evaluadas en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección. Los resultados obtenidos demostraron que tanto bafilomicina A1 como cloroquina inhiben la multiplicación de *B. abortus* (**Figura 15**). Esto podría indicar que la reversión del efecto de *B. abortus* sobre la función de los osteoblastos podría deberse a la inhibición de la multiplicación de la bacteria.

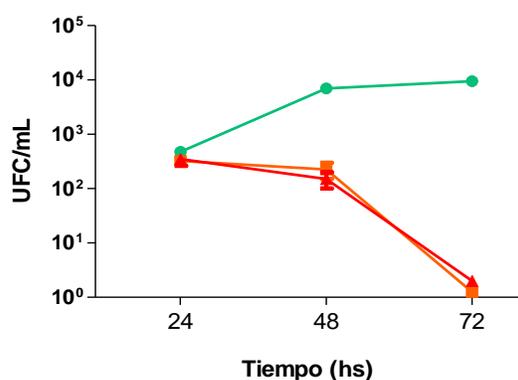


Figura 15. La replicación de *Brucella* no está implicada en la inhibición de la función de los osteoblastos. Las células MC3T3-E1 fueron infectadas con *B. abortus* en presencia de los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 (Baf) o cloroquina (CQ) o sin tratamiento como control (N.T.: no tratado). Las UFC intracelulares fueron evaluadas en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hs).

Nos propusimos, entonces, estudiar si la multiplicación de *Brucella* tiene algún papel en la inhibición de la función de los osteoblastos. Para llevar a cabo este objetivo, los osteoblastos se infectaron con una mutante rugosa de *B. abortus* denominada *B. abortus* RB51; la cual es incapaz de multiplicarse intracelularmente en distintos tipos celulares [122, 124, 354]. La infección se realizó en presencia o no de bafilomicina A1. El número de bacterias viables intracelulares fue evaluado en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hs). Nuestros resultados indican que *B. abortus* RB51 no fue capaz de multiplicarse en los osteoblastos y la presencia de bafilomicina A1 no afectó el número de UFC intracelulares (**Figura 16A**). Además, evaluamos la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio y la deposición de calcio por tinción con Alizarina Roja de las monocapas celulares a los 7 días post-infección. Estos resultados demostraron que la reversión del efecto inhibitorio sobre la función de los osteoblastos inducida por la infección con *B. abortus* no depende de la multiplicación intracelular de la bacteria (**Figura 16B, C**).

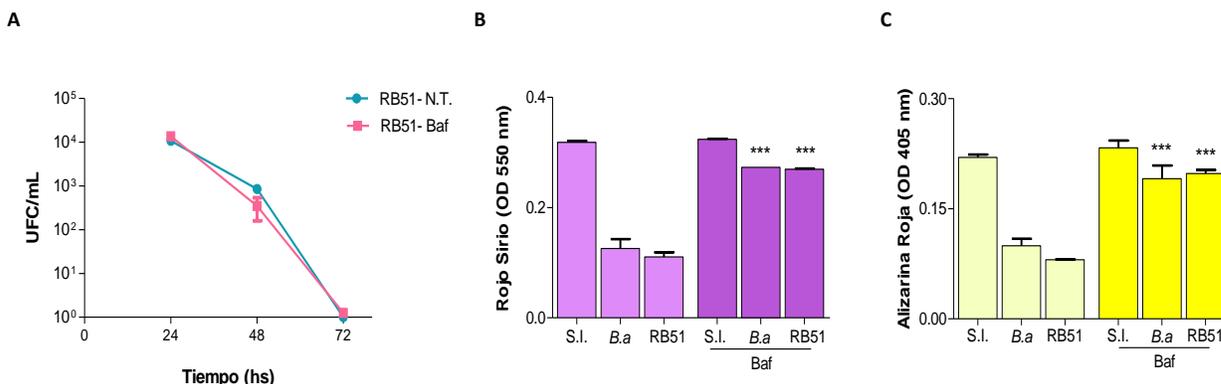


Figura 16. La replicación de *Brucella* no está implicada en la inhibición de la función de los osteoblastos. Las células MC3T3-E1 fueron infectadas con la mutante rugosa RB51 en presencia o no del inhibidor de autofagia bafilomicina A1 (Baf). Las UFC intracelulares fueron evaluadas en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hs) (A). Las células MC3T3-E1 fueron infectadas a MOI 1000 con *B. abortus* (B.a) o la mutante RB51 en presencia o no del inhibidor de autofagia bafilomicina A1 (Baf), a los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (B). La deposición de calcio se cuantificó por tinción con Alizarina Roja a partir de la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 405 nm (C). S.I.: Sin infectar. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$ versus los controles sin tratar.

La inhibición de la autofagia una vez iniciado el proceso de diferenciación no revierte el efecto inhibitorio sobre la función de los osteoblastos inducido por la infección con *B. abortus*

La autofagia es requerida para la diferenciación terminal de los osteoblastos pero no en los estadios iniciales de la diferenciación [292]. La inhibición de la autofagia podría dar como resultado pérdida de masa y densidad ósea debido a la disminución de la diferenciación y actividad de los osteoblastos. Sin embargo, la importancia del flujo autofágico para la secreción de la matriz ósea y el papel de la autofagia en la función de los osteoblastos durante la infección bacteriana son desconocidos. Por lo tanto, nos preguntamos, qué ocurriría con la deposición de matriz ósea por parte de los osteoblastos si la autofagia es inhibida tardíamente durante la infección por *B. abortus*. Para evaluar esto las células MC3T3-E1 fueron infectadas con *B. abortus*, y 72 hs post-infección fueron tratadas con los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 o cloroquina. A los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio y la deposición de calcio se cuantificó por tinción con Alizarina Roja. Nuestros resultados indicaron que la inhibición de la autofagia 72 hs después de la infección no fue capaz de revertir el efecto inhibitorio inducido por la infección con *B. abortus* sobre la función de los osteoblastos. La inhibición tardía de la autofagia inhibe la deposición de la matriz ósea en células no infectadas y

exacerba la inhibición inducida por la infección (**Figura 17A, B**). Estos resultados indican que la autofagia es necesaria en etapas tardías en la deposición de matriz mineral y orgánica en condiciones fisiológicas.

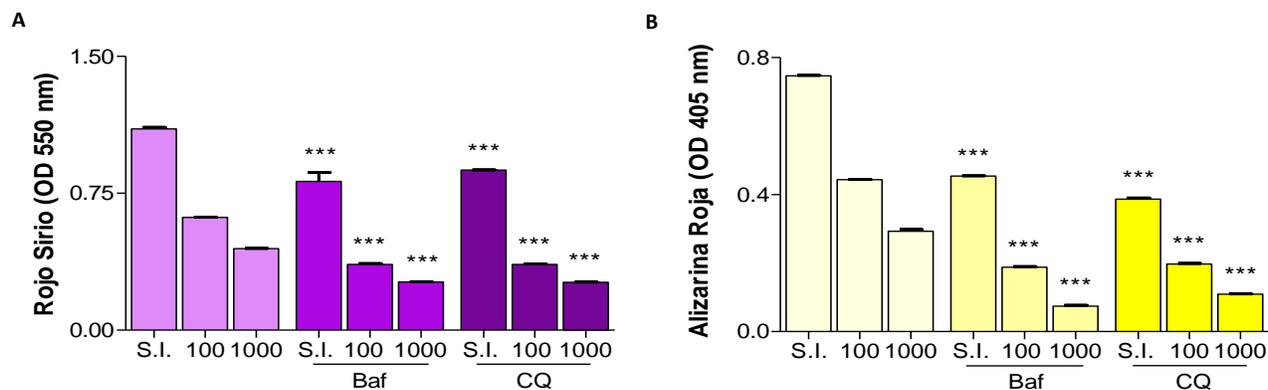


Figura 17. La inhibición de la autofagia una vez iniciado el proceso de diferenciación no revierte el efecto inhibitorio sobre la función de los osteoblastos inducida por la infección con *B. abortus*. Las células MC3T3-E1 fueron infectadas a MOI 100 y 1000 con *B. abortus*. A las 72 hs post-infección las células fueron tratadas con los inhibidores de autofagia bafilomicina A1 (Baf) o cloroquina (CQ), a los 7 días post-infección se cuantificó la deposición de colágeno por tinción con Rojo Sirio mediante la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 550 nm (**A**). La deposición de calcio se cuantificó por tinción con Alizarina Roja a partir de la disolución del colorante unido y posterior lectura de la densidad óptica (DO) a 405 nm (**B**). S.I.: Sin infectar. ***= $p < 0.001$ versus los controles sin tratar.

DISCUSIÓN

La brucelosis osteoarticular es la presentación más común de la enfermedad activa en los humanos. Las tres formas más comunes de la afección osteoarticular son; espondilitis, sacroileítis y artritis periférica. Esta última es la más común y afecta las rodillas, las caderas, los tobillos y las muñecas en el contexto de la infección aguda [16]. El daño óseo puede atribuirse a la acción directa de las bacterias o a un proceso inmunopatológico debido a la inflamación desencadenada por la repuesta inmune frente a la infección [310].

La autofagia no solo está implicada en la respuesta adaptativa a la inanición, el control de calidad de las proteínas y organelas intracelulares, el antienvjecimiento, la supresión de la formación de tumores, la eliminación de microorganismos intracelulares y la presentación de antígenos, sino que cada vez hay más pruebas de que desempeña papeles importantes en la diferenciación y el desarrollo celular [292].

Los osteocitos son el estadio de diferenciación terminal de los osteoblastos. Durante esta transición, la autofagia es esencial ya que las células experimentan un cambio distintivo de forma, el cual está acompañado por una reducción sustancial en el contenido y el tamaño de organelas celulares [248, 398, 404-407]. Se supone que un aumento en el proceso autofágico se produce durante esta transición de osteoblastos a osteocitos debido a la necesidad de reciclar más rápidamente las organelas y preservar los nutrientes, mientras que la célula desarrolla sus prolongaciones citoplasmáticas ricas en actina y se ajusta a un ambiente con menores niveles de oxígeno [398, 399]. Debido a que los osteocitos viven en un ambiente hipóxico y potencialmente pobre en nutrientes, se cree que bajo estas condiciones la autofagia juega un papel importante en la supervivencia de los osteocitos [398]. Experimentos realizados *in vitro* han demostrado que los osteocitos poseen una actividad autofágica mayor tras sufrir privación de nutrientes e hipoxia, condiciones similares a las encontradas en los osteocitos *in vivo*. En concordancia con esto, en experimentos *in vivo* se observó un aumento de la expresión de LC3 [403].

La mineralización ósea está asociada con la inducción de autofagia. La disminución en la actividad de la vía autofágica en osteoblastos disminuye su capacidad de mineralización. La microscopía electrónica de transmisión y la obtención de imágenes de células vivas sugieren que las vacuolas autofágicas podrían servir como vehículos para secretar cristales de apatita en el espacio extracelular [408]. Además de un efecto directo sobre la mineralización, la deficiencia de autofagia en osteoblastos desencadena un

desequilibrio entre osteoblastos y osteoclastos que resulta en un fenotipo de baja masa ósea debido a un aumento en la secreción de RANKL [293].

El objetivo del presente capítulo fue determinar si las células óseas, osteocitos y osteoblastos, presentan alteraciones en la activación de la vía autofágica durante la infección con *B. abortus*. Demostramos que *Brucella* inhibe la deposición de matriz ósea caracterizada por la disminución de la deposición de colágeno y calcio, y un incremento en la secreción de MMP-2 mediante un mecanismo relacionado con la inducción de autofagia en los osteoblastos.

Los ensayos realizados en osteocitos indicaron que la infección por *B. abortus* no modula la vía autofágica en este tipo celular. Esto puede deberse a que los niveles basales de autofagia en estas células son elevados debido a que están adaptadas para sobrevivir en un ambiente carente de nutrientes y oxígeno y por lo tanto la vía se encuentra fuertemente activada en condiciones fisiológicas normales. La línea celular murina de osteocitos MLO-Y4 conserva estas características fisiológicas aun cuando son cultivadas en condiciones normales de oxígeno y nutrientes [398, 403].

Cuando evaluamos la activación de la vía autofágica en osteoblastos infectados por *B. abortus* observamos un aumento en la expresión de Beclin-1, una proteína central en la etapa de nucleación, y de LC3-II, la única proteína que se encuentra en la membrana de los autofagosomas ya formados [409, 410]. Además del incremento en el número de autofagosomas, las células infectadas con *B. abortus* presentaron niveles más bajos de p62, que se une a las proteínas poliubiquitinadas que van a ser degradadas por esta vía [411, 412], respecto de los controles sin infectar demostrando que hay un aumento del flujo autofágico en los osteoblastos infectados.

La autofagia se encuentra involucrada en la diferenciación y mineralización de los osteoblastos [292, 293], por otro lado resultados de nuestro laboratorio demostraron que la infección por *B. abortus* inhibe la deposición de matriz por parte de los osteoblastos [400]. Los resultados obtenidos para la deposición de matriz mineral y orgánica en presencia de los inhibidores de la vía; bafilomicina A1 y cloroquina; en estadios tempranos de la infección, indicaron que estos fueron capaz de revertir la inhibición inducida por *B. abortus* en la deposición de matriz por parte de los osteoblastos. El tratamiento con los inhibidores de autofagia además disminuyo la expresión de MMP-2 inducida en los osteoblastos por *B. abortus*. Esto indica que la autofagia está implicada en la modulación de la función de los osteoblastos durante la infección por *B. abortus*.

Cuando se evaluó la capacidad de *B. abortus* de multiplicarse intracelularmente en presencia de bafilomicina A1 o cloroquina, observamos que el tratamiento con los inhibidores reprime la capacidad de la bacteria de multiplicarse intracelularmente, esto podría explicar la reversión del efecto inhibitorio inducido por *B. abortus* sobre la deposición de matriz. Sin embargo, los ensayos realizados en presencia de bafilomicina A1 con la mutante rugosa; *B. abortus* RB51 la cual es incapaz de multiplicarse intracelularmente, demostraron que la reversión del efecto inhibitorio sobre la función de los osteoblastos inducido por *B. abortus* no depende de la multiplicación intracelular de la bacteria.

La autofagia es requerida para la diferenciación terminal de los osteoblastos pero no en los estadios iniciales de la diferenciación [292]. El tratamiento con los inhibidores de autofagia en etapas tardías de la infección por *B. abortus* (72 hs post-infección), dio como resultado la inhibición de la deposición de la matriz ósea en células no infectadas y exacerbó la inhibición inducida por la infección.

En resumen, los resultados del presente capítulo indican que la infección de los osteoblastos con *B. abortus* induce un aumento en la activación de la vía autofágica, la cual en etapas tempranas de la infección se encontraría involucrada en el fenómeno de inhibición de la deposición de calcio y colágeno inducido por *B. abortus*, y en etapas tardías está comprometida en la formación ósea, particularmente en la deposición de matriz mineral y orgánica.

Capítulo III

Los linfocitos B infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis.

INTRODUCCIÓN

Brucella tiene la capacidad de crear un nicho replicativo dentro de los macrófagos, por lo que éstas células han sido postuladas como las principales responsables de la infección crónica [94, 99]. Sin embargo, aunque los linfocitos B tienen una baja capacidad fagocítica en comparación con las células fagocíticas profesionales [413], internalizan *Mycobacterium tuberculosis* [414], *Staphylococcus aureus* [413] y *B. abortus* [415] facilitando el establecimiento de la infección. Los linfocitos B activados tienen una larga vida útil, y la infección por *B. abortus* activa dichas células [415].

Esto sugiere que los linfocitos B podrían ser un nicho de supervivencia para *Brucella* contribuyendo a la cronicidad de la infección [415]. Las lesiones crónicas en los huesos y en las articulaciones, ocasionadas por la infección por *Brucella*, revelan de forma característica, a nivel histológico, una respuesta inflamatoria con diferentes grados de destrucción ósea y la presencia de linfocitos infiltrantes [23]. Aunque la principal función de los linfocitos B es producir inmunoglobulinas dirigidas contra agentes patógenos; también pueden contribuir a la respuesta innata del huésped mediante la secreción de MMPs y citoquinas [416, 417].

Los linfocitos B maduros tienen la capacidad de migrar hacia los tejidos lesionados y al sitio de la inflamación [418]. Este proceso está mediado, al menos en parte, por la capacidad de los linfocitos B para secretar MMPs que degradan la matriz extracelular facilitando la migración celular [419, 420]. Sin embargo, el incremento exacerbado en los niveles de MMPs, debido a la inflamación excesiva después de la infección puede causar daño tisular. En varias enfermedades osteoarticulares, incluyendo condiciones reumáticas (artritis reumatoide, osteoartritis y espondiloartritis) y en artritis infecciosa como la observada en la enfermedad de Lyme se ha demostrado la presencia de niveles localmente incrementados de MMPs [360-362].

Durante las enfermedades óseas inflamatorias crónicas, RANKL y las citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 han sido importantes para la progresión de la enfermedad y la pérdida ósea [364-366, 421, 422]. Estas citoquinas pueden ser secretadas por los linfocitos B activados y contribuir a la aceleración de la resorción ósea [423-426]. Esta contribución al daño óseo por mediadores inflamatorios provenientes de los linfocitos B se ha demostrado que está involucrada en el desarrollo de la artritis inflamatoria, como así también en la enfermedad periodontal [224, 425].

El aumento en la expresión de RANKL observado en la artritis reumatoidea puede atribuirse, al menos en parte, a la expansión de linfocitos B de memoria activados como parte del proceso de la enfermedad. La subpoblación de linfocitos B de memoria que expresan la molécula FcRL4; miembro de una familia de proteínas transmembrana con potencial inmunorregulador, expresan altos niveles de RANKL [427, 428]. Las células que poseen la proteína FcRL4 se encuentran en el epitelio de la cripta y en las regiones perifoliculares de las amígdalas palatinas, los tejidos linfoides intestinales, los ganglios linfáticos mesentéricos y la sinovia inflamada de pacientes con artritis reumatoidea [427-429]. La expresión de RANKL en la superficie de los linfocitos B periféricos de pacientes con artritis reumatoidea induce la diferenciación de osteoclastos *in vitro*. Estos resultados sugieren que el papel de los linfocitos B en la homeostasis ósea depende tanto del estado de desarrollo como del medio inflamatorio [430].

Los pacientes con HIV presentan osteopenia. Se ha demostrado que hay un incremento en la expresión de RANKL en las células B de sangre periférica en los pacientes infectados. Esto podría estar favoreciendo la osteoclastogénesis y la resorción ósea. Los análisis detallados de subpoblaciones de linfocitos B sugirieron que el aumento de RANKL por parte de los linfocitos B fue el resultado de la contribución de todas las subpoblaciones de linfocitos B en el contexto de la infección por VIH [431].

En el capítulo I del presente trabajo hemos demostrado que *B. abortus* puede infectar y sobrevivir dentro de osteocitos, y que esta infección provoca la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas. Estas últimas atraen células inmunes al sitio de la infección y contribuyen a la amplificación de esa respuesta que podría estar involucrada en las manifestaciones osteoarticulares de la brucelosis [319, 432, 433]. Por lo tanto, parece concebible postular que los linfocitos B infiltrantes, presentes en el microambiente inflamatorio generado por la bacteria, podrían activar y promover la generación de osteoclastos; las únicas células capaces de degradar el hueso. Para investigar esta hipótesis, hemos desarrollado un modelo *in vitro*, en el cual los linfocitos B obtenidas del bazo de ratón, infectados con *B. abortus* fueron utilizados para estudiar si podían modular la diferenciación a osteoclastos de precursores de monocitos derivados de médula ósea.

RESULTADOS

***B. abortus* es capaz de invadir pero no de multiplicarse en los linfocitos B**

En primer lugar evaluamos la capacidad de *B. abortus* de invadir y multiplicarse en los linfocitos B. Para ello los linfocitos B purificados de bazo de ratón fueron infectados con *B. abortus* a MOI 100 durante 2 hs. Luego de realizar un lavado a fin de remover las bacterias que no lograron ser internalizadas, las células fueron incubadas en medio completo suplementado con antibióticos. A distintos tiempos post-infección las células fueron lisadas para determinar el número de bacterias viables intracelulares mediante el recuento de UFC en placas de TSA. Los ensayos de infección demuestran que la bacteria es internalizada y sobrevive dentro de los linfocitos B pero no es capaz de multiplicarse como ocurre en los macrófagos infectados con *Brucella in vitro* (Figura 18) Por lo tanto, podemos concluir que los linfocitos B infectados por *Brucella* no constituyen un nicho de multiplicación para la bacteria y el número de bacterias viables internalizadas permanece en un número constante entre las 2 y 72 hs post-infección.

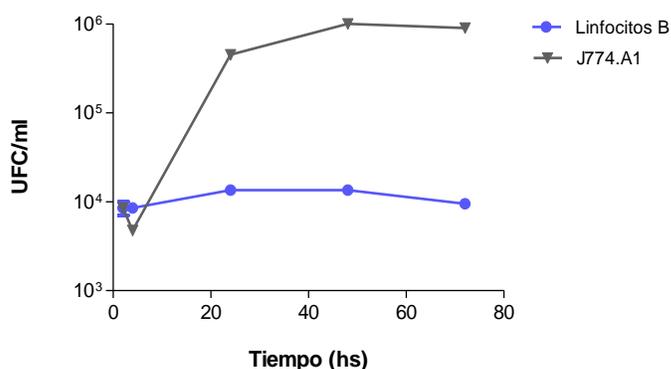


Figura 18. *B. abortus* es capaz de invadir pero no de multiplicarse en los linfocitos B. Los linfocitos B purificados y los macrófagos (J774.A1) fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100) durante 2 hs, luego fueron incubadas en medio de cultivo con antibiótico para eliminar a las bacterias extracelulares. Las UFC intracelulares fueron evaluadas en los lisados celulares obtenidos a diferentes tiempos post-infección (2, 4, 24, 48 y 72 hs).

Los linfocitos B infectados por *B. abortus* secretan mediadores proinflamatorios

En la inflamación que acompaña a las enfermedades óseas, las MMPs, RANKL y las citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 participan de la degradación ósea [364, 421, 434]. Los linfocitos B maduros activados tienen la capacidad de migrar al tejido lesionado y al sitio de inflamación [418] y secretar MMPs y citoquinas [416, 417].

Evaluamos entonces, la capacidad de los linfocitos B infectados con *B. abortus* de secretar MMPs y diferentes citoquinas. La infección con *B. abortus* indujo la secreción de MMP-9, TNF- α e IL-6 de una manera dependiente de la MOI utilizada (**Figura 19A-D**). Además y teniendo en cuenta que RANKL es la principal citoquina involucrada en la osteoclastogénesis y que se expresa en la superficie unida a la membrana y además puede ser secretada, se investigó si la infección con *B. abortus* induce la expresión de RANKL en los linfocitos B. Con este fin, la expresión de RANKL en la superficie celular se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-RANKL de ratón unido a ficoeritrina (PE) y se determinó la expresión de RANKL soluble en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los resultados obtenidos indicaron que la infección con *B. abortus* induce la expresión de RANKL de superficie en los linfocitos B (**Figura 19E**). El análisis cuantitativo de la expresión de RANKL en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con *B. abortus* reveló que *B. abortus* induce la secreción de RANKL soluble (**Figura 19F**). En conjunto, nuestros resultados indican que la infección de los linfocitos B con *B. abortus* induce la secreción de mediadores inflamatorios y osteoclastogénicos, lo que podría contribuir a la destrucción ósea.

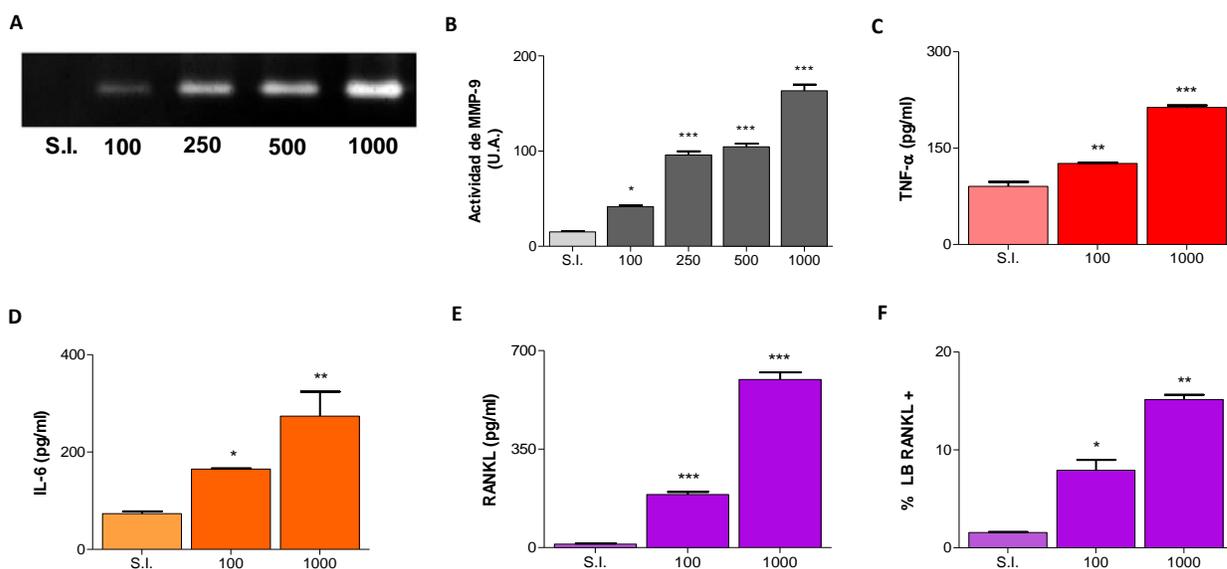


Figura 19. Los linfocitos B infectados con *B. abortus* secretan mediadores proinflamatorios. Los linfocitos B purificados fueron infectados con *B. abortus* a diferentes MOI, a las 24 hs post-infección se determinó la actividad de MMP-9 por zimografía (**A**). Análisis densitométrico de tres experimentos independientes realizados como se describe para el panel A (**B**). Los niveles de TNF- α , IL-6 y RANKL fueron evaluados por ELISA en sobrenadantes de cultivo recolectados a las 8 hs (TNF- α) o a las 24 hs (IL-6, RANKL) (**C, D, E**). La expresión de RANKL en membrana se evaluó mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-RANKL de ratón unido a ficoeritrina (PE) (**F**). U.A: unidades arbitrarias. *= p<0.05; **= p<0.01; ***= p<0.001 versus el control sin infectar (S.I.).

Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos B infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis vía RANKL

Los osteoclastos juegan un papel importante en la resorción ósea. El proceso de osteoclastogénesis es mediado por RANKL, pero bajo condiciones inflamatorias podría estar mediado por citoquinas proinflamatorias, en conjunto con M-CSF [435]. Para determinar si los factores producidos por los linfocitos B infectados con *B. abortus* podían inducir la formación de osteoclastos, se realizaron ensayos *in vitro* usando como precursores de osteoclastos, macrófagos pertenecientes a la línea celular RAW 264.7. Los precursores se cultivaron en medio suplementado con M-CSF por 3 días para estimular su diferenciación, luego fueron tratados con sobrenadantes de linfocitos B infectados con *B. abortus* (MOI 1000) en presencia de M-CSF por 7 días. La diferenciación a osteoclastos fue determinada como la presencia de células multinucleadas (más de 3 núcleos) que presentan actividad de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Los sobrenadantes de linfocitos B infectados con *B. abortus* indujeron la diferenciación de osteoclastos, mientras que no se vio un aumento de la diferenciación cuando los precursores fueron estimulados con los sobrenadantes de los linfocitos B no infectados. El tratamiento con OPG inhibió a niveles basales la osteoclastogénesis inducida por los sobrenadantes de las células B infectadas por *B. abortus*. (**Figura 20**). Estos resultados indican que los linfocitos B infectados con *B. abortus* pueden promover la formación de osteoclastos a partir de las células precursoras.

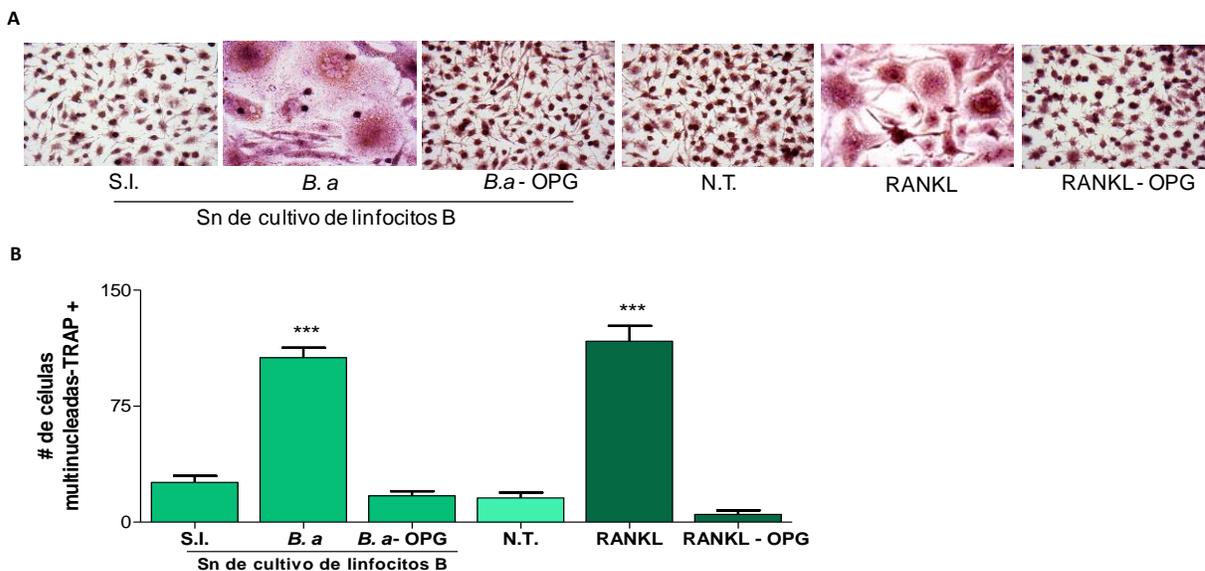


Figura 20. Los sobrenadantes de cultivo de los linfocitos B infectados con *B. abortus* inducen osteoclastogénesis vía RANKL. Los precursores de osteoclastos fueron estimulados en presencia de M-CSF con sobrenadantes de cultivo (Sn) (en proporción 1:2) de linfocitos B infectados con *B. abortus* (*B.a*), de linfocitos B sin infectar (S.I.) o no fueron tratadas (N.T.). Para inhibir RANKL, los experimentos se realizaron en presencia de OPG. Después de 7 días, la osteoclastogénesis se determinó mediante la generación de células multinucleadas TRAP positivas. Se tomaron imágenes digitales representativas por microscopía óptica (**A**), y se identificaron y contaron células multinucleadas TRAP positivas (**B**). RANKL se utilizó como control positivo. ***= $p < 0.001$ versus células tratadas con sobrenadantes infectados pre-incubados con OPG (B.a-OPG).

B. abortus muerta por calor (HKBA) induce la secreción de TNF- α e IL-6, pero no de RANKL en linfocitos B

A continuación, decidimos evaluar si la viabilidad bacteriana era necesaria para inducir una respuesta proinflamatoria durante la infección de los linfocitos B, para ello las células fueron estimuladas con HKBA para luego estudiar la expresión de RANKL, TNF- α e IL-6 por parte de los linfocitos B. El estímulo de los linfocitos B con HKBA indujo la secreción de TNF- α e IL-6 (**Figura 21A, B**). Por otro lado, HKBA fue incapaz de inducir la expresión de RANKL por parte de los linfocitos B (**Figura 21C**) y en consecuencia no se observó osteoclastogénesis (**Figura 21D, E**).

Estos resultados indican que aunque HKBA fue capaz de inducir la producción de TNF- α e IL-6, no pudo inducir la expresión de RANKL, lo que sugiere que la inducción de la expresión de RANKL y la consecuente osteoclastogénesis requiere la viabilidad de la bacteria.

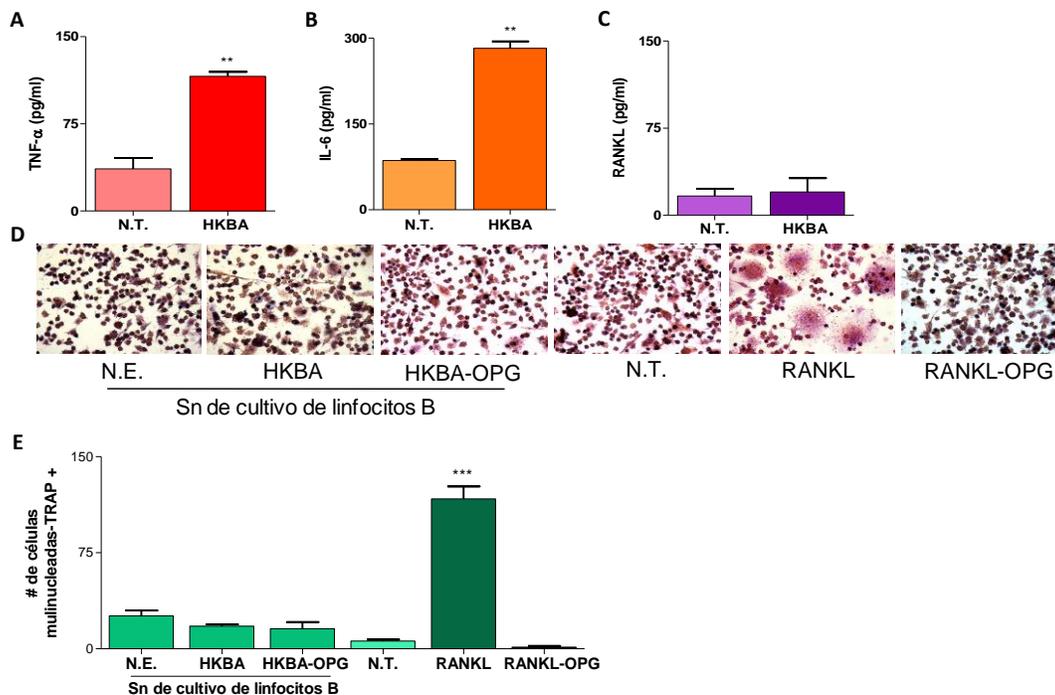


Figura 21. *B. abortus* muerta por calor (HKBA) induce la secreción de TNF- α e IL-6, pero no de RANKL en linfocitos B. Los linfocitos B se estimularon con HKBA (1×10^9 bacterias / ml). La determinación de TNF- α (A), IL-6 (B) y RANKL (C) se realizó por ELISA a las 8 hs post-estímulo (TNF- α) y a las 24 hs post-estímulo (IL-6 y RANKL) en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B estimulados. Los precursores de osteoclastos fueron estimulados en presencia de M-CSF con sobrenadantes (Sn) de cultivo de linfocitos B tratados con HKBA (en proporción 1:2) o con sobrenadantes de cultivo de linfocitos B no estimulados (N.E.) (en proporción 1:2) o no tratados (N.T.). Para inhibir RANKL, los experimentos se realizaron en presencia de OPG. Después de 7 días, se determinó la osteoclastogénesis mediante la generación de células multinucleadas TRAP positivas y se tomaron imágenes digitales representativas mediante microscopía óptica (D). Las células multinucleadas TRAP positivo fueron identificadas y contadas (E). RANKL se utilizó como control positivo. **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$ versus el control no tratado (N.T.).

Los macrófagos no inducen un aumento en la expresión de RANKL en linfocitos B durante la infección con *B. abortus*

Los factores de virulencia de *Brucella* estimulan a los macrófagos para inducir la proliferación de los linfocitos B [436]. Por lo tanto, decidimos realizar experimentos para determinar si además, los macrófagos podían mejorar la expresión de RANKL por parte de los linfocitos B durante la infección con *B. abortus*. Para este fin se estimularon los linfocitos B con sobrenadantes de cultivo de macrófagos infectados con *B. abortus* o, alternativamente, se infectaron cocultivos de macrófagos y linfocitos B con *B. abortus*. A continuación se analizó la expresión de RANKL en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos B tratados con sobrenadantes de cultivo de macrófagos infectados con *B. abortus*; y en los sobrenadantes de los cocultivos infectados por *B. abortus*. La evaluación de RANKL en sobrenadantes de cultivo fue posible, ya que se ha demostrado previamente que los macrófagos no secretan RANKL en respuesta a la

infección con *B. abortus* [432]. Los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* no fueron capaces de inducir la secreción de RANKL por parte de los linfocitos B (**Figura 22A**).

Además, los cocultivos de los macrófagos y los linfocitos B no indujeron un incremento en la secreción de RANKL por parte de los linfocitos B durante la infección con *B. abortus* (**Figura 22B**). En conjunto, estos resultados indican que los macrófagos no contribuyen a la inducción de la expresión de RANKL por los linfocitos B durante la infección con *B. abortus*.

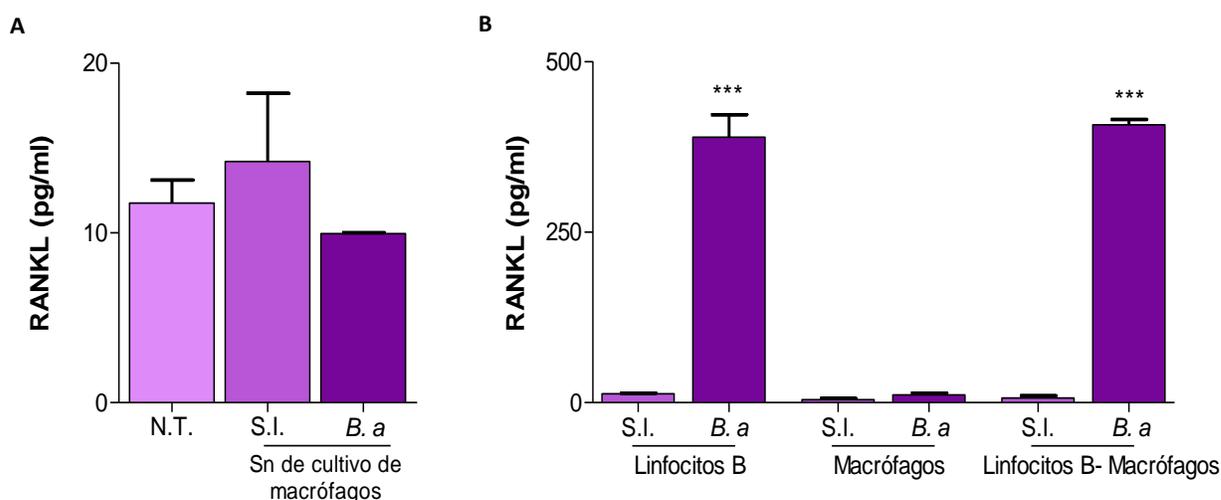


Figura 22. Los macrófagos no inducen la expresión de RANKL en linfocitos B durante la infección con *B. abortus*. Los linfocitos B fueron estimulados con sobrenadantes de cultivo (Sn) (en proporción 1:2) de los macrófagos infectados con *B. abortus* (*B.a*) o con sobrenadantes de cultivo de macrófagos sin infectar (S.I.). La expresión de RANKL se midió en sobrenadante de cultivo mediante ELISA a las 24 hs luego del estímulo (**A**). Cocultivos de macrófagos y linfocitos B (en proporción 1:10) se infectaron con *B. abortus* a MOI 100 y la expresión de RANKL se determinó mediante ELISA a las 24 hs post-infección (**B**). ***= $p < 0.001$ versus el control sin infectar (S.I.).

DISCUSIÓN

Las células del sistema inmune y del sistema óseo participan en importantes interacciones reguladoras [437]. Los linfocitos B son responsables de la generación y producción de anticuerpos, que permiten a un individuo desarrollar respuestas específicas y de memoria frente a una amenaza de infección. Además de esta función inmune, los linfocitos B tienen una estrecha y multifacética relación con las células óseas, si bien esta contribución es menor durante el remodelado óseo normal, los linfocitos B activados desempeñan un importante rol en las enfermedades inflamatorias que afectan el hueso [429]. Debido a que la infiltración de los linfocitos B en los huesos y las articulaciones es una característica de la patología osteoarticular ocasionada por *Brucella* [306-309], es esencial estudiar como los linfocitos B modulan la resorción ósea durante la brucelosis osteoarticular.

En este capítulo, estudiamos el papel desempeñado por los linfocitos B en el daño óseo causado por la infección por *B. abortus*. Nuestros resultados indican que la infección con *B. abortus* de los linfocitos B induce la expresión de MMP-9, RANKL y citoquinas proinflamatorias. Los aumentos en los niveles de MMPs proporcionan a los linfocitos B maduros la capacidad de migrar a los tejidos lesionados y el sitio de la inflamación [418], el aumento en los niveles de MMPs ha sido reportado en varias enfermedades osteoarticulares lo que sugiere que las MMPs pueden estar involucradas en el daño asociado en esta patología [360-362]. Como mencionamos, se ha demostrado que los linfocitos B activados inducen la osteoclastogénesis [438]. En otras patologías osteoarticulares se ha demostrado que los linfocitos B infiltrantes expresan RANKL. En pacientes con artritis reumatoidea se observó un aumento en el número de linfocitos B que expresan RANKL. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de RANKL en la superficie de los linfocitos B periféricos de pacientes con artritis reumatoidea induce la diferenciación de osteoclastos *in vitro*. Además, estudios realizados con ratones infectados con *Porphyromonas gingivalis*, como modelo de la patología periodontal, revelaron un aumento significativo en el número de linfocitos B gingivales que expresan RANKL [439, 440]. Recientemente se ha documentado que la infección por el VIH provoca una pérdida ósea significativa y deterioro del esqueleto, dando lugar a fracturas. La expresión de RANKL se incrementa en linfocitos B de memoria y de sangre periférica en individuos infectados por VIH, con la consecuente disminución en la expresión de OPG, molécula que contrarresta la actividad de RANKL, y por lo tanto ayuda a prevenir la pérdida ósea [431].

Por lo que el papel de los linfocitos B en la homeostasis ósea depende tanto del estado de desarrollo como del medio inflamatorio [430]. Tras la activación a través del receptor de células B (BCR) y CD40, los

linfocitos B de memoria predominantemente expresan RANKL, esta expresión se ve aumentada en presencia de IFN- γ pero es suprimida por la citoquina IL-21 [441].

RANKL estimula la diferenciación de los osteoclastos y es clave en la resorción ósea. Bajo condiciones patológicas, los niveles de expresión de este mediador conducen a la destrucción ósea [363]. Además, las citoquinas proinflamatorias podrían contribuir también al daño óseo, induciendo la osteoclastogénesis [364-366, 422, 434]. Nuestros resultados demostraron que OPG (receptor señuelo de RANKL), administrada exógenamente, fue capaz de inhibir la formación de osteoclastos a niveles basales. Esto indica que RANKL es la principal citoquina implicada en la osteoclastogénesis inducida por los linfocitos B infectados con *B. abortus*. La capacidad de *B. abortus* para inducir la expresión de RANKL en linfocitos B está relacionada con su capacidad para inducir la expresión de esta molécula en otras células óseas, incluyendo sinoviocitos, osteoblastos y osteocitos [296, 400, 433].

Los linfocitos B tienen la capacidad de responder a agonistas de TLR [442]. La producción de TNF- α e IL-6 por linfocitos B en respuesta a *B. abortus* no depende de la viabilidad bacteriana, ya que estas citoquinas también fueron inducidas por la exposición a HKBA, lo que sugiere que un componente bacteriano estructural está involucrado en la inducción de estas citoquinas. Sin embargo, HKBA fue incapaz de inducir la producción de RANKL y la consecuente osteoclastogénesis. Esto indica que la viabilidad bacteriana es necesaria para la inducción de la expresión de RANKL por parte de los linfocitos B.

Los macrófagos / monocitos son el principal nicho replicativo de *Brucella*. Los macrófagos también pueden mediar la proliferación de linfocitos B durante la infección por *Brucella* [436]. Sin embargo, los macrófagos no pudieron contribuir a la osteoclastogénesis inducida por linfocitos B infectados con *B. abortus*, ya que no aumentaron los niveles de expresión de RANKL por parte de los linfocitos B, tanto cuando ambas células fueron cocultivadas, como cuando se usaron sobrenadantes de macrófagos infectados con *B. abortus* para estimular a los linfocitos B.

En resumen, los resultados de este capítulo indican que la infección con *B. abortus* puede activar a los linfocitos B induciendo la expresión de RANKL, y contribuyendo de esta forma a la destrucción ósea y articular observada en pacientes con brucelosis.

Conclusión general

CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo demostramos que *B. abortus* es capaz de invadir y multiplicarse en la línea celular de osteocitos murinos MLO-Y4. La infección de los osteocitos induce la secreción de MMP-2, citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6) y RANKL; siendo esta última la principal citoquina involucrada en la diferenciación de osteoclastos maduros en condiciones fisiológicas. Además, los osteocitos producen frente a la infección la quemoquina CXCL1/KC, lo que contribuiría al reclutamiento de neutrófilos al foco infeccioso favoreciendo el proceso inflamatorio. Durante la infección por *B. abortus* demostramos que no solo el aumento de RANKL sino también la citoquina TNF- α generan un desbalance en la homeostasis del hueso induciendo la diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros con la consecuente degradación del hueso. Demostramos además, que la inducción de la secreción de TNF- α depende de la expresión de un SST4 funcional por parte de la bacteria.

Los estudios realizados en osteocitos sobre la modulación de la expresión de Cx43; la molécula involucrada en la formación de conexiones a través de los cuales se produce el pasaje de factores de sobrevida; revelaron que la infección con *B. abortus* reduce la expresión de dicha molécula; sin embargo la expresión de las integrinas y moléculas accesorias evaluadas involucradas en el anclaje de las células a la matriz extracelular, no se vio modificada por la infección. Al evaluar la interacción entre los osteocitos y los macrófagos observamos que los sobrenadantes de los macrófagos infectados con *B. abortus* reducen la expresión tanto, de Cx43, como de las integrinas y moléculas accesorias estudiadas en los osteocitos.

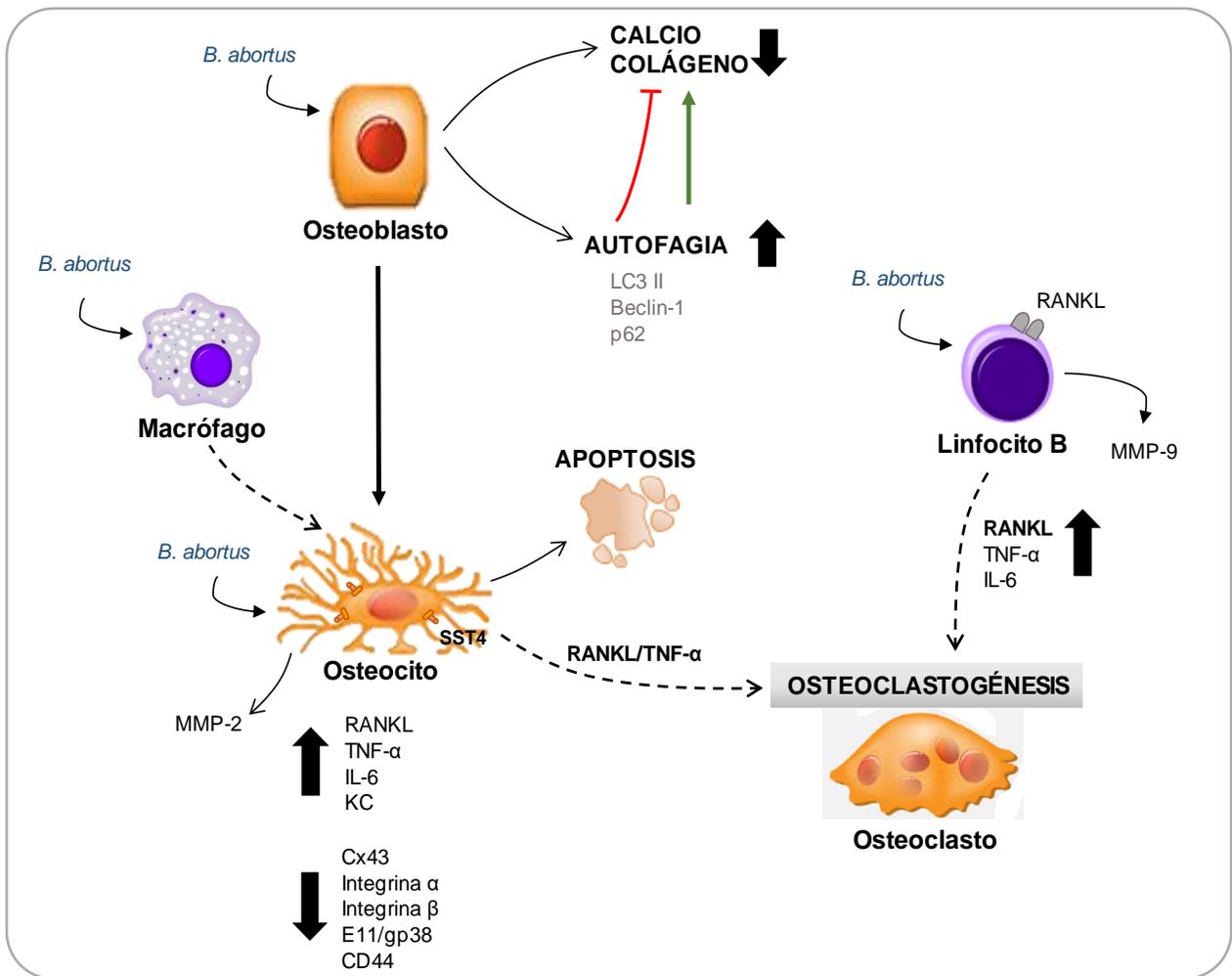
El análisis de la muerte por apoptosis de las células infectadas, indicó que *B. abortus* no es capaz de inducir la muerte celular. Sin embargo el estímulo con los sobrenadantes de los macrófagos indujo la muerte por apoptosis de los osteocitos.

La infección por *B. abortus* no induce la activación de la vía autofágica en osteocitos. Los osteocitos corresponden al estadio terminal de diferenciación de los osteoblastos. En condiciones fisiológicas la vía autofágica está asociada al proceso de diferenciación y mineralización de los osteoblastos. La infección con *B. abortus* induce la expresión de los marcadores de autofagia Beclin-1 y LC3-II y reduce la expresión de p62. Al bloquear la vía (bafilomicina A1 y cloroquina) en etapas tempranas de la infección se revierte el efecto inhibitorio sobre la deposición de matriz inducido por la infección. Sin embargo, cuando la inhibición de la vía se realiza en etapas tardías de la infección el efecto inhibitorio sobre la deposición de

matriz inducido por *B. abortus* se ve exacerbado, por otro lado, el bloqueo de la vía en células no infectadas, también tiene un efecto inhibitorio sobre la deposición de matriz respecto a los controles sin tratar. Por lo tanto la vía autofágica en etapas tempranas de la infección se encontraría involucrada en la inhibición del efecto producido por *B. abortus* sobre la deposición de matriz, y en etapas tardías está comprometida en la formación ósea, particularmente en la deposición de matriz mineral y orgánica.

La infección por *B. abortus* no solo podría mediar el daño óseo por su acción directa sobre las células del hueso sino también indirectamente a través de células que son atraídas al sitio de infección. El infiltrado de linfocitos B en los huesos y las articulaciones es una característica de la patología osteoarticular ocasionada por *Brucella*. En este contexto los resultados indicaron que la infección de los linfocitos B con *B. abortus* induce un aumento en la expresión de MMP-9, RANKL tanto unido a membrana como soluble, así como también un aumento en la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6. Además, el aumento en la expresión de RANKL se vio relacionado con la inducción de la diferenciación de precursores de osteoclastos en osteoclastos maduros y la consecuente osteoclastogénesis. Por otro lado, el estímulo de los linfocitos B con sobrenadantes de macrófagos infectados con *B. abortus* o el cocultivo de linfocitos B y macrófagos infectado no moduló la expresión de RANKL por lo que los macrófagos no se encuentran involucrados en la inducción de la expresión de RANKL por parte de los linfocitos B.

En conjunto estos resultados indican que *B. abortus* crea un microambiente proinflamatorio y proosteoclastogénico el cual contribuye a la destrucción ósea y articular observada en pacientes con complicaciones osteoarticulares de la brucelosis, mediante la modificación de la función y la viabilidad de los osteocitos directa e indirectamente, activando la vía autofágica la cual se encuentra involucrada en la deposición de matriz mineral y orgánica por parte de los osteoblastos y por la activación de los linfocitos B infiltrantes en el microambiente inflamatorio generado por la bacteria los cuales expresan niveles elevados de RANKL.



Esquema 1: Modelo representativo de las conclusiones de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Young, E.J., *Human brucellosis*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(5): p. 821-42.
2. Moral, M., *Diagnóstico de brucelosis: Guía para el equipo de salud N°12, D.d.E.-M.d.S.d.I.N. Argentina, Editor. 2013: Buenos Aires. 2013.*
3. Kaufmann, A.F., M.I. Meltzer, and G.P. Schmid, *The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?* Emerg Infect Dis, 1997. **3**(2): p. 83-94.
4. Samartino, L.E., *Brucellosis in Argentina*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 71-80.
5. Pappas, G., et al., *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 91-9.
6. Seleem, M.N., S.M. Boyle, and N. Sriranganathan, *Brucellosis: a re-emerging zoonosis*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 392-8.
7. Dean, A.S., et al., *Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(10): p. e1865.
8. Lucero, N.E., et al., *Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(4): p. 496-503.
9. Poester, F.P., V.S. Goncalves, and A.P. Lage, *Brucellosis in Brazil*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 55-62.
10. Abriata, G.e.a., *Boletín Epidemiológico Periódico N°33: Edición Especial Brucelosis*. 2005.
11. SENASA, *PREVALENCIA DE BRUCELOSIS CAPRINA EN LA PAMPA, EN EL AÑO 2013 sns N.º 7, enero-marzo de 2015 ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar* 2015.
12. Russo, A.M., et al., *[Epidemiology of caprine and ovine brucellosis in Formosa province, Argentina]*. Rev Argent Microbiol, 2016. **48**(2): p. 147-53.
13. Robles, C., et al., *Encuesta serológica sobre Brucelosis en caprinos de la provincia de Mendoza. Revista Veterinaria Argentina, 2006*. 2006.
14. Benitez, E.N., E.A. Salem, and N. Fortuna, *Brucelosis caprina y humana en el departamento de Rivadavia, provincia de Salta, Argentina. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, . 1980*.
15. López, G., et al., *Brucelosis ovina en Argentina. Revista Veterinaria Argentina*. 2010.
16. Pappas, G., et al., *Brucellosis*. N Engl J Med, 2005. **352**(22): p. 2325-36.
17. Al Dahouk, S., et al., *Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp*. Clin Lab, 2003. **49**(9-10): p. 487-505.
18. Bricker, B.J., *PCR as a diagnostic tool for brucellosis*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 435-46.
19. Carrillo, C. and E. Gotuzzo, *Brucellosis. Revista de Medicina Experimental*. **14**(1). 1997.
20. Robles, C., *Brucelosis Caprina, I.N.d.T.A.C.R.P. Norte., Editor. Buenos Aires Argentina*. 2009.
21. Yang, X., et al., *Progress in Brucella vaccine development*. Front Biol (Beijing), 2013. **8**(1): p. 60-77.

22. Galinska, E.M. and J. Zagorski, *Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms*. Ann Agric Environ Med, 2013. **20**(2): p. 233-8.
23. Madkour, M.M., *Madkour's Brucellosis. Brucellosis: Overview. (2° Edition)*. 2001, Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
24. Sanitaria, S.N.d.S.y.C.A.D.d.P., *Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la republica argentina*. 2014.
25. Young, E.J., *An overview of human brucellosis*. Clin Infect Dis, 1995. **21**(2): p. 283-9; quiz 290.
26. Lulu, A.R., et al., *Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases*. Q J Med, 1988. **66**(249): p. 39-54.
27. Edward J. Young, M.J.C., *Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects, in Immunology and pathophysiology of human brucellosis*. 1989.
28. Turan, H., et al., *Osteoarticular involvement among 202 brucellosis cases identified in Central Anatolia region of Turkey*. Intern Med, 2011. **50**(5): p. 421-8.
29. Mehanic, S., et al., *Osteoarticular manifestations of brucellosis*. Med Arch, 2012. **66**(3 Suppl 1): p. 24-6.
30. Moreno, E., A. Cloeckert, and I. Moriyon, *Brucella evolution and taxonomy*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 209-27.
31. Whatmore, A.M., *Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(6): p. 1168-84.
32. Michaux-Charachon, S., et al., *Genome structure and phylogeny in the genus Brucella*. J Bacteriol, 1997. **179**(10): p. 3244-9.
33. Jumas-Bilak, E., et al., *Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus Brucella*. Mol Microbiol, 1998. **27**(1): p. 99-106.
34. Foster, G., et al., *Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 11): p. 2688-93.
35. Scholz, H.C., et al., *Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008. **58**(Pt 2): p. 375-82.
36. Scholz, H.C., et al., *Isolation of Brucella microti from mandibular lymph nodes of red foxes, Vulpes vulpes, in lower Austria*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009. **9**(2): p. 153-6.
37. Scholz, H.C., et al., *Isolation of Brucella microti from soil*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1316-7.
38. De, B.K., et al., *Novel Brucella strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(1): p. 43-9.
39. Scholz, H.C., et al., *Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection*. Int J Syst Evol Microbiol, 2010. **60**(Pt 4): p. 801-8.
40. Tiller, R.V., et al., *Identification of an unusual Brucella strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 23.
41. Whatmore, A.M., et al., *Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.)*. Int J Syst Evol Microbiol, 2014. **64**(Pt 12): p. 4120-8.

42. Scholz, H.C., et al., *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016. **66**(5): p. 2090-8.
43. Eisenberg, T., et al., *Isolation of potentially novel Brucella spp. from frogs*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. **78**(10): p. 3753-5.
44. Fischer, D., et al., *Abscesses associated with a Brucella inopinata-like bacterium in a big-eyed tree frog (Leptopelis vermiculatus)*. *J Zoo Wildl Med*, 2012. **43**(3): p. 625-8.
45. Whatmore AM, D.E.-J., Stubberfield E, Muchowski J, et al., *Isolation of Brucella from a White's tree frog (Litoria caerulea)*. *JMM Case Reports* 2015.
46. Soler-Llorens, P.F., et al., *A Brucella spp. Isolate from a Pac-Man Frog (Ceratophrys ornata) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. **6**: p. 116.
47. Kimura, M., et al., *Isolation of Brucella inopinata-Like Bacteria from White's and Denny's Tree Frogs*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2017. **17**(5): p. 297-302.
48. Franco, M.P., et al., *Human brucellosis*. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(12): p. 775-86.
49. Pappas, G., *The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats*. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. **36 Suppl 1**: p. S8-11.
50. Brew, S.D., et al., *Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal*. *Vet Rec*, 1999. **144**(17): p. 483.
51. Sohn, A.H., et al., *Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp.* *Emerg Infect Dis*, 2003. **9**(4): p. 485-8.
52. Fernandez-Prada, C.M., et al., *Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis*. *Infect Immun*, 2003. **71**(4): p. 2110-9.
53. Wattam, A.R., et al., *Comparative genomics of early-diverging Brucella strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway*. *MBio*, 2012. **3**(5): p. e00246-11.
54. Zygmunt, M.S., et al., *Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging Brucella species*. *Clin Vaccine Immunol*, 2012. **19**(9): p. 1370-3.
55. Muhldorfer, K., et al., *The role of 'atypical' Brucella in amphibians: are we facing novel emerging pathogens?* *J Appl Microbiol*, 2017. **122**(1): p. 40-53.
56. Moriyon, I. and I. Lopez-Goni, *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis*. *Int Microbiol*, 1998. **1**(1): p. 19-26.
57. Beveridge, T.J., *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(16): p. 4725-33.
58. Lapaque, N., et al., *Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(1): p. 60-6.
59. Qureshi, N.e.a., *Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of Brucella abortus*. *Journal of Endotoxin Research.*, 1994: p. 1: p. 137-148.
60. Cardoso, P.G., et al., *Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system*. *Microb Cell Fact*, 2006. **5**: p. 13.

61. Freer, E., et al., *Heterogeneity of Brucella abortus lipopolysaccharides*. Res Microbiol, 1995. **146**(7): p. 569-78.
62. Cloeckaert, A., et al., *Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 229-47.
63. Winter, A.J., *Outer membrane proteins of Brucella*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987. **138**(1): p. 87-9.
64. Douglas, J.T., et al., *Porins of Brucella species*. Infect Immun, 1984. **44**(1): p. 16-21.
65. Bae, J.E., G.G. Schurig, and T.E. Toth, *Mice immune responses to Brucella abortus heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified Brucella abortus recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens*. Vet Microbiol, 2002. **88**(2): p. 189-202.
66. Winter, A.J., et al., *Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of Brucella abortus combined with trehalose dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants*. Infect Immun, 1983. **42**(3): p. 1159-67.
67. Bowden, R.A., et al., *Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of Brucella melitensis (Omp25) expressed in Escherichia coli*. J Med Microbiol, 1998. **47**(1): p. 39-48.
68. Goolab, S., et al., *Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in Brucella*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 1189.
69. Zhou, L., et al., *On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **163**(2): p. 223-8.
70. Gamazo, C. and I. Moriyon, *Release of outer membrane fragments by exponentially growing Brucella melitensis cells*. Infect Immun, 1987. **55**(3): p. 609-15.
71. Lamontagne, J., et al., *Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus*. J Proteome Res, 2007. **6**(4): p. 1519-29.
72. Pollak, C.N., et al., *Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50214.
73. Dubray, G. and M. Plommet, *[Structure and constituents of Brucella. Characterization and biological properties of the fractions]*. Dev Biol Stand, 1976. **31**: p. 68-91.
74. Roest, H.P., et al., *Isolation and characterization of ropA homologous genes from Rhizobium leguminosarum biovars viciae and trifolii*. J Bacteriol, 1995. **177**(17): p. 4985-91.
75. Vizcaino, N., et al., *DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of Brucella spp.: identification of a 1.7-kb inversion in Brucella cetaceae and of a 15.1-kb genomic island, absent from Brucella ovis, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide*. Microbes Infect, 2004. **6**(9): p. 821-34.
76. Martinez de Tejada, G. and I. Moriyon, *The outer membranes of Brucella spp. are not barriers to hydrophobic permeants*. J Bacteriol, 1993. **175**(16): p. 5273-5.
77. Hancock, R.E., R. Siehnel, and N. Martin, *Outer membrane proteins of Pseudomonas*. Mol Microbiol, 1990. **4**(7): p. 1069-75.

78. Martinez de Tejada, G., et al., *The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides*. Infect Immun, 1995. **63**(8): p. 3054-61.
79. Adams, L.G., *The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 553-61.
80. de Figueiredo, P., et al., *Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1505-17.
81. Castaneda-Roldan, E.I., et al., *Adherence of Brucella to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues*. Cell Microbiol, 2004. **6**(5): p. 435-45.
82. Delpino, M.V., C.A. Fossati, and P.C. Baldi, *Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp.* Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 984-95.
83. Delpino, M.V., et al., *Brucella-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses*. J Hepatol, 2010. **53**(1): p. 145-54.
84. Garcia Samartino, C., et al., *Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis*. Am J Pathol, 2010. **176**(3): p. 1323-38.
85. Detilleux, P.G., B.L. Deyoe, and N.F. Cheville, *Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro*. Infect Immun, 1990. **58**(7): p. 2320-8.
86. Arriola Benitez, P.C., et al., *Brucella abortus induces collagen deposition and MMP-9 down-modulation in hepatic stellate cells via TGF-beta1 production*. Am J Pathol, 2013. **183**(6): p. 1918-27.
87. Goenka, R., et al., *B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium Brucella abortus*. J Infect Dis, 2012. **206**(1): p. 91-8.
88. Velasquez, L.N., et al., *Brucella abortus induces apoptosis of human T lymphocytes*. Microbes Infect, 2012. **14**(7-8): p. 639-50.
89. Rossetti, C.A., K.L. Drake, and L.G. Adams, *Transcriptome analysis of HeLa cells response to Brucella melitensis infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the Brucella pathogenesis*. Microbes Infect, 2012. **14**(9): p. 756-67.
90. Rossetti, C.A., et al., *Systems biology analysis of Brucella infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81719.
91. Watarai, M., et al., *Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to Brucella abortus infection of mice*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4818-25.
92. Watarai, M., *Interaction between Brucella abortus and cellular prion protein in lipid raft microdomains*. Microbes Infect, 2004. **6**(1): p. 93-100.
93. Caron, E., et al., *Live Brucella spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes*. Infect Immun, 1994. **62**(12): p. 5267-74.
94. Bellaire, B.H., R.M. Roop, 2nd, and J.A. Cardelli, *Opsonized virulent Brucella abortus replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3702-13.

95. Rolan, H.G. and R.M. Tsolis, *Mice lacking components of adaptive immunity show increased Brucella abortus virB mutant colonization*. Infect Immun, 2007. **75**(6): p. 2965-73.
96. Pizarro-Cerda, J., et al., *Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5711-24.
97. Chaves-Olarte, E., et al., *Activation of Rho and Rab GTPases dissociates Brucella abortus internalization from intracellular trafficking*. Cell Microbiol, 2002. **4**(10): p. 663-76.
98. Celli, J., et al., *Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 545-56.
99. Jiang, X. and C.L. Baldwin, *Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus*. Infect Immun, 1993. **61**(1): p. 124-34.
100. Starr, T., et al., *Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment*. Traffic, 2008. **9**(5): p. 678-94.
101. O'Callaghan, D., et al., *A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis*. Mol Microbiol, 1999. **33**(6): p. 1210-20.
102. Boschirolì, M.L., et al., *The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1544-9.
103. Delrue, R.M., et al., *Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking*. Cell Microbiol, 2001. **3**(7): p. 487-97.
104. den Hartigh, A.B., et al., *VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of Brucella in the reticuloendothelial system*. J Bacteriol, 2008. **190**(13): p. 4427-36.
105. Celli, J., S.P. Salcedo, and J.P. Gorvel, *Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1673-8.
106. Fugier, E., et al., *The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for Brucella replication*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000487.
107. Starr, T., et al., *Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(1): p. 33-45.
108. Celli, J., *The changing nature of the Brucella-containing vacuole*. Cell Microbiol, 2015. **17**(7): p. 951-8.
109. Burns, D.L., *Type IV transporters of pathogenic bacteria*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(1): p. 29-34.
110. Fronzes, R., et al., *Structure of a type IV secretion system core complex*. Science, 2009. **323**(5911): p. 266-8.
111. Lacerda, T.L., S.P. Salcedo, and J.P. Gorvel, *Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(1): p. 45-51.
112. Sieira, R., et al., *A homologue of an operon required for DNA transfer in Agrobacterium is required in Brucella abortus for virulence and intracellular multiplication*. J Bacteriol, 2000. **182**(17): p. 4849-55.

113. den Hartigh, A.B., et al., *Differential requirements for VirB1 and VirB2 during Brucella abortus infection*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5143-9.
114. Guzman-Verri, C., et al., *The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12375-80.
115. Trokter, M., et al., *Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems*. Curr Opin Struct Biol, 2014. **27**: p. 16-23.
116. Lee, J.J., et al., *Interplay between clathrin and Rab5 controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of Brucella abortus within HeLa cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(39): p. 28049-57.
117. Comerchi, D.J., et al., *Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole*. Cell Microbiol, 2001. **3**(3): p. 159-68.
118. Kim, S., et al., *Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of Brucella abortus deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3020-7.
119. Sun, Y.H., et al., *virB-Mediated survival of Brucella abortus in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4826-32.
120. Hong, P.C., R.M. Tsolis, and T.A. Ficht, *Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4102-7.
121. Kahl-McDonagh, M.M., et al., *Evaluation of novel Brucella melitensis unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis*. Vaccine, 2006. **24**(24): p. 5169-77.
122. Radhakrishnan, G.K., et al., *Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9892-8.
123. Ahmed, W., K. Zheng, and Z.F. Liu, *Establishment of Chronic Infection: Brucella's Stealth Strategy*. Front Cell Infect Microbiol, 2016. **6**: p. 30.
124. Ke, Y., et al., *Type IV secretion system of Brucella spp. and its effectors*. Front Cell Infect Microbiol, 2015. **5**: p. 72.
125. de Jong, M.F., H.G. Rolan, and R.M. Tsolis, *Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella*. Cell Microbiol, 2010. **12**(9): p. 1195-202.
126. Barquero-Calvo, E., et al., *Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e631.
127. Roux, C.M., et al., *Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice*. Cell Microbiol, 2007. **9**(7): p. 1851-69.
128. Rolan, H.G. and R.M. Tsolis, *Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to Brucella abortus infection*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3207-13.
129. Gomes, M.T., et al., *Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to Brucella abortus infection*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3629-38.

130. de Jong, M.F., et al., *Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system*. Mol Microbiol, 2008. **70**(6): p. 1378-96.
131. de Barsy, M., et al., *Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2*. Cell Microbiol, 2011. **13**(7): p. 1044-58.
132. Salcedo, S.P., et al., *BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 28.
133. Sengupta, D., et al., *Subversion of innate immune responses by Brucella through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 956-64.
134. Salcedo, S.P., et al., *Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e21.
135. Cirl, C., et al., *Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 399-406.
136. Snyder, G.A., et al., *Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the Brucella protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 669-79.
137. Alaidarous, M., et al., *Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by Brucella Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 654-68.
138. Li, W., et al., *Brucella TIR-like protein TcpB/Btp1 specifically targets the host adaptor protein MAL/TIRAP to promote infection*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **477**(3): p. 509-14.
139. Marchesini, M.I., et al., *In search of Brucella abortus type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system*. Cell Microbiol, 2011. **13**(8): p. 1261-74.
140. Arriola Benitez, P.C., et al., *The Effector Protein BPE005 from Brucella abortus Induces Collagen Deposition and Matrix Metalloproteinase 9 Downmodulation via Transforming Growth Factor beta1 in Hepatic Stellate Cells*. Infect Immun, 2015. **84**(2): p. 598-606.
141. Marchesini, M.I., et al., *A T4SS Effector Targets Host Cell Alpha-Enolase Contributing to Brucella abortus Intracellular Lifestyle*. Front Cell Infect Microbiol, 2016. **6**: p. 153.
142. Myeni, S., et al., *Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003556.
143. Dohmer, P.H., et al., *Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival*. Cell Microbiol, 2014. **16**(3): p. 396-410.
144. Fainboim, L.a.J.G., *Introducción a la Inmunología Humana*. 6 ed. 2011.
145. Golding, B., et al., *Immunity and protection against Brucella abortus*. Microbes Infect, 2001. **3**(1): p. 43-8.
146. Jiang, X., et al., *Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide*. Cell Immunol, 1993. **151**(2): p. 309-19.
147. Dorneles, E.M., et al., *Immune response triggered by Brucella abortus following infection or vaccination*. Vaccine, 2015. **33**(31): p. 3659-66.

148. Billard, E., et al., *High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens Brucella suis, B. abortus, and B. melitensis*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8418-24.
149. Papadopoulos, A., et al., *Brucella discriminates between mouse dendritic cell subsets upon in vitro infection*. Virulence, 2016. **7**(1): p. 33-44.
150. Zwerdling, A., et al., *Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus*. Microbes Infect, 2008. **10**(12-13): p. 1346-54.
151. Dornand, J., et al., *Impairment of intramacrophagic Brucella suis multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2303-11.
152. Gao, N., et al., *Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to Brucella abortus*. Innate Immun, 2011. **17**(2): p. 152-63.
153. Fernandes, D.M., R. Benson, and C.L. Baldwin, *Lack of a role for natural killer cells in early control of Brucella abortus 2308 infections in mice*. Infect Immun, 1995. **63**(10): p. 4029-33.
154. Salmeron, I., et al., *Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(5): p. 764-70.
155. Zwerdling, A., et al., *Brucella abortus activates human neutrophils*. Microbes Infect, 2009. **11**(6-7): p. 689-97.
156. Barquero-Calvo, E., et al., *Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen Brucella abortus*. PLoS Pathog, 2013. **9**(2): p. e1003167.
157. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.
158. Campos, M.A., et al., *Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to Brucella abortus infection in mice*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 176-86.
159. Weiss, D.S., et al., *MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of Brucella abortus*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 5137-43.
160. Giambartolomei, G.H., et al., *Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed Brucella abortus*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4635-42.
161. Huang, L.Y., et al., *Heat-killed Brucella abortus induces TNF and IL-12p40 by distinct MyD88-dependent pathways: TNF, unlike IL-12p40 secretion, is Toll-like receptor 2 dependent*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1441-6.
162. Macedo, G.C., et al., *Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control Brucella abortus infection*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 1080-7.
163. Copin, R., et al., *MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5182-91.
164. Oliveira, F.S., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and -2 play no role in controlling Brucella abortus infection in mice*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 861426.
165. de Almeida, L.A., et al., *MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN-beta induction in response to Brucella abortus infection*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23135.

166. Zhan, Y. and C. Cheers, *Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to Brucella abortus infection*. Infect Immun, 1995. **63**(4): p. 1387-90.
167. Zhan, Y., Z. Liu, and C. Cheers, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus by different mechanisms*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2782-6.
168. Zhan, Y., A. Kelso, and C. Cheers, *Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts*. Immunology, 1993. **80**(3): p. 458-64.
169. Rittig, M.G., et al., *Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of Brucella induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1045-55.
170. Zaitseva, M., et al., *Human peripheral blood T cells, monocytes, and macrophages secrete macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta following stimulation with heat-inactivated Brucella abortus*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 3817-26.
171. Zhan, Y. and C. Cheers, *Endogenous gamma interferon mediates resistance to Brucella abortus infection*. Infect Immun, 1993. **61**(11): p. 4899-901.
172. Murphy, E.A., et al., *Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice*. Immunology, 2001. **103**(4): p. 511-8.
173. Brandao, A.P., et al., *Host susceptibility to Brucella abortus infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 589494.
174. Fernandes, D.M., et al., *Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent Brucella abortus strain 2308*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **16**(3-4): p. 193-203.
175. Radhakrishnan, G.K. and G.A. Splitter, *Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from Brucella melitensis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **397**(1): p. 59-63.
176. Elzer, P.H., et al., *Antibody-mediated protection against Brucella abortus in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19*. Immunology, 1994. **82**(4): p. 651-8.
177. Oliveira, S.C. and G.A. Splitter, *CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2551-7.
178. Escola, J.M., et al., *The O-chain of Brucella abortus lipopolysaccharide induces SDS-resistant MHC class II molecules in mouse B cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(2): p. 1230-6.
179. Splitter, G.A. and K.M. Everlith, *Brucella abortus regulates bovine macrophage-T-cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression*. Infect Immun, 1989. **57**(4): p. 1151-7.
180. Zhan, Y. and C. Cheers, *Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria in vitro*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 720-3.

181. Zaitseva, M.B., et al., *Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated Brucella abortus*. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2720-8.
182. Skendros, P. and P. Boura, *Immunity to brucellosis*. Rev Sci Tech, 2013. **32**(1): p. 137-47.
183. Giambartolomei, G.H., et al., *Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis*. J Infect Dis, 2002. **186**(2): p. 252-9.
184. Akbulut, H.H., et al., *Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005. **45**(2): p. 253-8.
185. Rafiei, A., et al., *Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease*. J Infect, 2006. **53**(5): p. 315-24.
186. Rodriguez-Zapata, M., et al., *Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function*. Infect Immun, 2010. **78**(7): p. 3272-9.
187. Skendros, P., G. Pappas, and P. Boura, *Cell-mediated immunity in human brucellosis*. Microbes Infect, 2011. **13**(2): p. 134-42.
188. Durward, M.A., et al., *Discordant Brucella melitensis antigens yield cognate CD8+ T cells in vivo*. Infect Immun, 2010. **78**(1): p. 168-76.
189. Durward, M., et al., *Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34925.
190. Martirosyan, A., et al., *In vivo identification and characterization of CD4(+) cytotoxic T cells induced by virulent Brucella abortus infection*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82508.
191. Barrionuevo, P., et al., *Brucella abortus induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses*. Cell Microbiol, 2013. **15**(4): p. 487-502.
192. Barrionuevo, P., et al., *Brucella abortus inhibits IFN-gamma-induced FcgammaRI expression and FcgammaRI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages*. Microbes Infect, 2011. **13**(3): p. 239-50.
193. Barrionuevo, P., et al., *Brucella abortus inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2*. Infect Immun, 2008. **76**(1): p. 250-62.
194. Bertotto, A., et al., *Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection*. Eur J Immunol, 1993. **23**(5): p. 1177-80.
195. Kilic, S.S., et al., *Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis*. Clin Exp Med, 2009. **9**(2): p. 101-4.
196. Skyberg, J.A., et al., *Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21978.
197. Ottones, F., et al., *V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of Brucella suis in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7133-9.

198. Dudal, S., et al., *Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against Brucella suis*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5533-9.
199. Diaz, R., et al., *Surface antigens of smooth brucellae*. J Bacteriol, 1968. **96**(4): p. 893-901.
200. Montaraz, J.A., et al., *Protection against Brucella abortus in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies*. Infect Immun, 1986. **51**(3): p. 961-3.
201. Cloeckaert, A., et al., *Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of Brucella*. J Med Microbiol, 1991. **34**(3): p. 175-80.
202. Jimenez de Bagues, M.P., et al., *Vaccination with Brucella abortus rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of Brucella abortus, Brucella melitensis, and Brucella ovis*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 4990-6.
203. Ho, M. and C. Cheers, *Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with Brucella abortus*. J Infect Dis, 1982. **146**(3): p. 381-7.
204. Skyberg, J.A., et al., *IFN-gamma-deficient mice develop IL-1-dependent cutaneous and musculoskeletal inflammation during experimental brucellosis*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(2): p. 375-87.
205. Fernandes, D.M. and C.L. Baldwin, *Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus*. Infect Immun, 1995. **63**(3): p. 1130-3.
206. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
207. Eriksen, E.F., *Cellular mechanisms of bone remodeling*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(4): p. 219-27.
208. Bassett, J.H. and G.R. Williams, *Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance*. Endocr Rev, 2016. **37**(2): p. 135-87.
209. Andersen, T.L., et al., *A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 239-47.
210. Sims, N.A. and T.J. Martin, *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 481.
211. Frost, H.M., *Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling*. Calcif Tissue Res, 1969. **3**(3): p. 211-37.
212. Kular, J., et al., *An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level*. Clin Biochem, 2012. **45**(12): p. 863-73.
213. Raggatt, L.J. and N.C. Partridge, *Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling*. J Biol Chem, 2010. **285**(33): p. 25103-8.
214. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
215. Roodman, G.D., *Advances in bone biology: the osteoclast*. Endocr Rev, 1996. **17**(4): p. 308-32.
216. Li, Z., K. Kong, and W. Qi, *Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(2): p. 345-50.

217. Jurdic, P., et al., *Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3-4): p. 195-202.
218. Matsubara, T., et al., *Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. **489**(4): p. 472-476.
219. Takahashi, N., et al., *Regulation of osteoclast polarization*. Odontology, 2007. **95**(1): p. 1-9.
220. Vaananen, H.K. and M. Horton, *The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 8): p. 2729-32.
221. Hodge, J.M., M.A. Kirkland, and G.C. Nicholson, *Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis*. J Cell Biochem, 2007. **102**(3): p. 759-68.
222. Horwood, N.J., et al., *Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(1): p. 144-50.
223. Takayanagi, H., et al., *Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(2): p. 259-69.
224. Kawai, T., et al., *B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 987-98.
225. Yasuda, H., et al., *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
226. Anusuya, G.S., et al., *Bone morphogenetic proteins: Signaling periodontal bone regeneration and repair*. J Pharm Bioallied Sci, 2016. **8**(Suppl 1): p. S39-S41.
227. Centrella, M., T.L. McCarthy, and E. Canalis, *Transforming growth factor-beta and remodeling of bone*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(9): p. 1418-28.
228. Hayden, J.M., S. Mohan, and D.J. Baylink, *The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 93S-98S.
229. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
230. Martin, T.J., et al., *Communication between ephrinB2 and EphB4 within the osteoblast lineage*. Adv Exp Med Biol, 2010. **658**: p. 51-60.
231. Zhao, C., et al., *Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis*. Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 111-21.
232. Ryu, J., et al., *Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling*. EMBO J, 2006. **25**(24): p. 5840-51.
233. Ishii, M., et al., *Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 524-8.
234. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(2): p. 289-302.
235. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.

236. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
237. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
238. Hu, H., et al., *Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development*. Development, 2005. **132**(1): p. 49-60.
239. Karner, C.M., et al., *Wnt Protein Signaling Reduces Nuclear Acetyl-CoA Levels to Suppress Gene Expression during Osteoblast Differentiation*. J Biol Chem, 2016. **291**(25): p. 13028-39.
240. Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li, *TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(2): p. 272-88.
241. Wu, M., G. Chen, and Y.P. Li, *TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. Bone Res, 2016. **4**: p. 16009.
242. Malone, J.D., et al., *Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents*. J Cell Biol, 1982. **92**(1): p. 227-30.
243. Li, X., et al., *Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33098-106.
244. Wang, J., et al., *Dose-dependence of PTH-related peptide-1 on the osteogenic induction of MC3T3-E1 cells in vitro*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(17): p. e6637.
245. van Driel, M. and J. van Leeuwen, *Vitamin D endocrinology of bone mineralization*. Mol Cell Endocrinol, 2017.
246. Moutsatsou, P., E. Kassi, and A.G. Papavassiliou, *Glucocorticoid receptor signaling in bone cells*. Trends Mol Med, 2012. **18**(6): p. 348-59.
247. Pacifici, R., *Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade*. Endocrinology, 1998. **139**(6): p. 2659-61.
248. Bonewald, L.F., *The amazing osteocyte*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(2): p. 229-38.
249. Marotti, G., *The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition*. Ital J Anat Embryol, 1996. **101**(4): p. 25-79.
250. Noble, B.S., *The osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 106-11.
251. Franz-Odenaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*. Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 176-90.
252. Parfitt, A.M., *Bone-forming cells in clinical conditions Hall BK, editor*. Vol. Bone, volume 1: the osteoblast and osteocyte. 1990.
253. Aubin, J.E., *Advances in the osteoblast lineage*. Biochem Cell Biol, 1998. **76**(6): p. 899-910.
254. Tanaka-Kamioka, K., et al., *Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(10): p. 1555-68.
255. Kalajzic, I., et al., *In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology*. Bone, 2013. **54**(2): p. 296-306.
256. Lanyon, L.E., *Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling*. Calcif Tissue Int, 1993. **53 Suppl 1**: p. S102-6; discussion S106-7.

257. Cowin, S.C., L. Moss-Salentijn, and M.L. Moss, *Candidates for the mechanosensory system in bone*. J Biomech Eng, 1991. **113**(2): p. 191-7.
258. Klein-Nulend, J., et al., *Mechanosensation and transduction in osteocytes*. Bone, 2013. **54**(2): p. 182-90.
259. Price, C., et al., *Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(2): p. 277-85.
260. Stern, A.R. and D.P. Nicoletta, *Measurement and estimation of osteocyte mechanical strain*. Bone, 2013. **54**(2): p. 191-5.
261. Tatsumi, S., et al., *Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction*. Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 464-75.
262. Nakashima, T., et al., *Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1231-4.
263. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone*. J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
264. Tomkinson, A., et al., *The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(8): p. 1243-50.
265. Tomkinson, A., et al., *The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 3128-35.
266. Loisel, A.E., J.X. Jiang, and H.J. Donahue, *Gap junction and hemichannel functions in osteocytes*. Bone, 2013. **54**(2): p. 205-12.
267. Bivi, N., et al., *Deletion of Cx43 from osteocytes results in defective bone material properties but does not decrease extrinsic strength in cortical bone*. Calcif Tissue Int, 2012. **91**(3): p. 215-24.
268. Hayer, S., et al., *CD44 is a determinant of inflammatory bone loss*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 903-14.
269. Takayanagi, H., *Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 292-304.
270. Paiva, K.B.S. and J.M. Granjeiro, *Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **148**: p. 203-303.
271. Mor, A., S.B. Abramson, and M.H. Pillinger, *The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction*. Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 118-28.
272. Lou, J., et al., *Activation of MMPs in Macrophages by Mycobacterium tuberculosis via the miR-223-BMAL1 Signaling Pathway*. J Cell Biochem, 2017.
273. Chakrabarti, S., J.M. Zee, and K.D. Patel, *Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(1): p. 214-22.
274. Scholtyssek, C., G. Kronke, and G. Schett, *Inflammation-associated changes in bone homeostasis*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012. **11**(3): p. 188-95.

275. Azuma, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4858-64.
276. Mucci, J.M., et al., *Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF-alpha*. Gene, 2012. **509**(1): p. 51-9.
277. Courbon, G., et al., *Tumor Necrosis Factor Alpha Overexpression Induces Mainly Osteoclastogenesis at the Vertebral Site*. Calcif Tissue Int, 2017. **100**(6): p. 575-584.
278. Kudo, O., et al., *Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism*. Bone, 2003. **32**(1): p. 1-7.
279. Wu, Q., et al., *IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro*. Cell Physiol Biochem, 2017. **41**(4): p. 1360-1369.
280. Nakashima, T., et al., *Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 768-75.
281. Yeo, L., et al., *Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(11): p. 2022-8.
282. Nakashima, T. and H. Takayanagi, *Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems*. J Clin Immunol, 2009. **29**(5): p. 555-67.
283. Ishimi, Y., et al., *IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption*. J Immunol, 1990. **145**(10): p. 3297-303.
284. Gowen, M., et al., *An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro*. Nature, 1983. **306**(5941): p. 378-80.
285. Boyce, B.F., et al., *Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice*. Endocrinology, 1989. **125**(3): p. 1142-50.
286. Jimi, E., et al., *Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells*. Exp Cell Res, 1999. **247**(1): p. 84-93.
287. Arend, W.P. and J.M. Dayer, *Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1990. **33**(3): p. 305-15.
288. Ginaldi, L. and M. De Martinis, *Osteoimmunology and Beyond*. Curr Med Chem, 2016. **23**(33): p. 3754-3774.
289. Kotake, S. and Y. Nanke, *Effect of TNFalpha on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(3): p. 1209-13.
290. Tang, T.T., et al., *The Lyme Disease Pathogen Borrelia burgdorferi Infects Murine Bone and Induces Trabecular Bone Loss*. Infect Immun, 2017. **85**(2).
291. Claro, T., et al., *Staphylococcus aureus protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18748.
292. Liu, F., et al., *Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(11): p. 2414-30.
293. Nollet, M., et al., *Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis*. Autophagy, 2014. **10**(11): p. 1965-77.

294. Alarcon, G.S., et al., *The arthritis of brucellosis: a perspective one hundred years after Bruce's discovery*. J Rheumatol, 1987. **14**(6): p. 1083-5.
295. Johnson, E.W., Jr. and L.A. Weed, *Brucellar bursitis*. J Bone Joint Surg Am, 1954. **36-A**(1): p. 133-9.
296. Scian, R., et al., *Brucella abortus invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through RANKL expression*. Infect Immun, 2013. **81**(6): p. 1940-51.
297. Wallach, J.C., et al., *Prepatellar bursitis due to Brucella abortus: case report and analysis of the local immune response*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 12): p. 1514-8.
298. Shaalan, M.A., et al., *Brucellosis in children: clinical observations in 115 cases*. Int J Infect Dis, 2002. **6**(3): p. 182-6.
299. Rajapakse, C.N., *Bacterial infections: osteoarticular brucellosis*. Baillieres Clin Rheumatol, 1995. **9**(1): p. 161-77.
300. Al-Eissa, Y.A., *Brucellosis in Saudi Arabia: Past, present and future*. Ann Saudi Med, 1999. **19**(5): p. 403-5.
301. Chelli Bouaziz, M., et al., *Spinal brucellosis: a review*. Skeletal Radiol, 2008. **37**(9): p. 785-90.
302. Tekkok, I.H., et al., *Brucellosis of the spine*. Neurosurgery, 1993. **33**(5): p. 838-44.
303. Solera, J., et al., *Brucellar spondylitis: review of 35 cases and literature survey*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(6): p. 1440-9.
304. Geyik, M.F., et al., *Musculoskeletal involvement of brucellosis in different age groups: a study of 195 cases*. Swiss Med Wkly, 2002. **132**(7-8): p. 98-105.
305. Kelly, P.J., et al., *Brucellosis of the bones and joints. Experience with thirty-six patients*. JAMA, 1960. **174**: p. 347-53.
306. Ibero, I., P. Vela, and E. Pascual, *Arthritis of shoulder and spinal cord compression due to Brucella disc infection*. Br J Rheumatol, 1997. **36**(3): p. 377-81.
307. Gotuzzo, E., et al., *Articular involvement in human brucellosis: a retrospective analysis of 304 cases*. Semin Arthritis Rheum, 1982. **12**(2): p. 245-55.
308. Kasim, R.A., et al., *Brucella infection in total hip replacement: case report and review of the literature*. Scand J Infect Dis, 2004. **36**(1): p. 65-7.
309. Press, J., et al., *Leukocyte count in the synovial fluid of children with culture-proven brucellar arthritis*. Clin Rheumatol, 2002. **21**(3): p. 191-3.
310. Giambartolomei, G.H., P.C. Arriola Benitez, and M.V. Delpino, *Brucella and Osteoarticular Cell Activation: Partners in Crime*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 256.
311. Turgut, M., A.T. Turgut, and U. Kosar, *Spinal brucellosis: Turkish experience based on 452 cases published during the last century*. Acta Neurochir (Wien), 2006. **148**(10): p. 1033-44; discussion 1044.
312. El-Desouki, M.I. and R.S. Benjamin, *Diagnostic value of quantitative sacroiliac joint scintigraphy in brucellosis*. Clin Nucl Med, 1999. **24**(10): p. 756-8.
313. Bollow, M., et al., *Early sacroiliitis in patients with spondyloarthropathy: evaluation with dynamic gadolinium-enhanced MR imaging*. Radiology, 1995. **194**(2): p. 529-36.

314. Koubaa, M., et al., *Spinal brucellosis in South of Tunisia: review of 32 cases*. Spine J, 2014. **14**(8): p. 1538-44.
315. Kato, Y., et al., *Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(12): p. 2014-23.
316. Sorokin, L., *The impact of the extracellular matrix on inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(10): p. 712-23.
317. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
318. Hibbs, M.S., et al., *Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2493-500.
319. Scian, R., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with Brucella abortus*. Infect Immun, 2011. **79**(1): p. 192-202.
320. Giambartolomei, G.H., et al., *Brucella abortus-infected macrophages modulate T lymphocytes to promote osteoclastogenesis via IL-17*. Am J Pathol, 2012. **181**(3): p. 887-96.
321. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-26.
322. Yamamoto, A., et al., *Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells*. Cell Struct Funct, 1998. **23**(1): p. 33-42.
323. Tullberg-Reinert, H. and G. Jundt, *In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate*. Histochem Cell Biol, 1999. **112**(4): p. 271-6.
324. Parfitt, A.M., *The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory*. Clin Orthop Relat Res, 1977(127): p. 236-47.
325. Winkler, D.G., et al., *Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist*. EMBO J, 2003. **22**(23): p. 6267-76.
326. van Bezooijen, R.L., et al., *Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 805-14.
327. Zhao, S., et al., *MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(11): p. 2068-79.
328. Clinkenbeard, E.L., et al., *Conditional Deletion of Murine Fgf23: Interruption of the Normal Skeletal Responses to Phosphate Challenge and Rescue of Genetic Hypophosphatemia*. J Bone Miner Res, 2016. **31**(6): p. 1247-57.
329. Qing, H., et al., *Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(5): p. 1018-29.
330. Bonewald, L.F. and M.L. Johnson, *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*. Bone, 2008. **42**(4): p. 606-15.
331. Bonewald, L.F., *The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2017. **46**(1): p. 1-18.

332. Dallas, S.L., M. Prideaux, and L.F. Bonewald, *The osteocyte: an endocrine cell ... and more*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(5): p. 658-90.
333. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
334. O'Brien, C.A., T. Nakashima, and H. Takayanagi, *Osteocyte control of osteoclastogenesis*. *Bone*, 2013. **54**(2): p. 258-63.
335. Prideaux, M., D.M. Findlay, and G.J. Atkins, *Osteocytes: The master cells in bone remodelling*. *Curr Opin Pharmacol*, 2016. **28**: p. 24-30.
336. Chen, H., T. Senda, and K.Y. Kubo, *The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis*. *Med Mol Morphol*, 2015. **48**(2): p. 61-8.
337. Donahue, H.J., *Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation*. *Bone*, 2000. **26**(5): p. 417-22.
338. Yancey, S.B., et al., *The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains*. *J Cell Biol*, 1989. **108**(6): p. 2241-54.
339. Yeager, M. and N.B. Gilula, *Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels*. *J Mol Biol*, 1992. **223**(4): p. 929-48.
340. Watkins, M., et al., *Osteoblast connexin43 modulates skeletal architecture by regulating both arms of bone remodeling*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(8): p. 1240-51.
341. Zhang, Y., et al., *Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23516.
342. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(11): p. 793-805.
343. Weinstein, R.S., R.W. Nicholas, and S.C. Manolagas, *Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(8): p. 2907-12.
344. Prideaux, M., et al., *Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36786.
345. Zhang, K., et al., *E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(12): p. 4539-52.
346. Hughes, D.E., D.M. Salter, and R. Simpson, *CD44 expression in human bone: a novel marker of osteocytic differentiation*. *J Bone Miner Res*, 1994. **9**(1): p. 39-44.
347. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: from adhesion molecules to signalling regulators*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(1): p. 33-45.
348. Roop, R.M., 2nd, et al., *Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche*. *Mol Microbiol*, 2004. **52**(3): p. 621-30.
349. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(8): p. 354-60.
350. Scheven, B.A., J.W. Visser, and P.J. Nijweide, *In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population*. *Nature*, 1986. **321**(6065): p. 79-81.

351. Ibbotson, K.J., et al., *Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells*. J Cell Biol, 1984. **99**(2): p. 471-80.
352. Zhang, Y.H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 563-8.
353. Kobayashi, K., et al., *Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 275-86.
354. Schurig, G.G., et al., *Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus*. Vet Microbiol, 1991. **28**(2): p. 171-88.
355. Aydin, M., et al., *Scintigraphic findings in osteoarticular brucellosis*. Nucl Med Commun, 2005. **26**(7): p. 639-47.
356. Khateeb, M.I., et al., *Brucella arthritis: a study of 96 cases in Kuwait*. Ann Rheum Dis, 1990. **49**(12): p. 994-8.
357. Bonewald, L.F., *Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4*. J Bone Miner Metab, 1999. **17**(1): p. 61-5.
358. Nakashima, T., H. Tomita, and S. Chitose, *Evidence of the local immune status in the human larynx*. Adv Otorhinolaryngol, 2011. **72**: p. 100-2.
359. Scian, R., et al., *Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by Brucella abortus infection through production and induction of matrix metalloproteinases*. Infect Immun, 2011. **79**(9): p. 3619-32.
360. Behera, A.K., et al., *Induction of host matrix metalloproteinases by Borrelia burgdorferi differs in human and murine lyme arthritis*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 126-34.
361. Rengel, Y., C. Ospelt, and S. Gay, *Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(5): p. 221.
362. Vandooren, B., et al., *Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(9): p. 2942-53.
363. Suda, T., et al., *The molecular basis of osteoclast differentiation and activation*. Novartis Found Symp, 2001. **232**: p. 235-47; discussion 247-50.
364. Nair, S.P., et al., *Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions*. Infect Immun, 1996. **64**(7): p. 2371-80.
365. Wei, S., et al., *IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 282-90.
366. Kotake, S., et al., *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(1): p. 88-95.
367. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 188-92.
368. Streuli, C.H., *Integrins and cell-fate determination*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 171-7.

369. Dejaeger, M., et al., *Integrin-Linked Kinase Regulates Bone Formation by Controlling Cytoskeletal Organization and Modulating BMP and Wnt Signaling in Osteoprogenitors*. J Bone Miner Res, 2017.
370. Eskra, L., A. Mathison, and G. Splitter, *Microarray analysis of mRNA levels from RAW264.7 macrophages infected with Brucella abortus*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1125-33.
371. Klionsky, D.J., *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 7-18.
372. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
373. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
374. Ravikumar, B., et al., *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1383-435.
375. Lamb, C.A., T. Yoshimori, and S.A. Tooze, *The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(12): p. 759-74.
376. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
377. Kuma, A. and N. Mizushima, *Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(7): p. 683-90.
378. Rubinsztein, D.C., *The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 780-6.
379. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
380. Cecconi, F. and B. Levine, *The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death*. Dev Cell, 2008. **15**(3): p. 344-57.
381. Deretic, V., *Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 53-62.
382. Cuervo, A.M. and F. Macian, *Autophagy, nutrition and immunology*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(1): p. 2-13.
383. Choi, A.M., S.W. Ryter, and B. Levine, *Autophagy in human health and disease*. N Engl J Med, 2013. **368**(7): p. 651-62.
384. Flores-Toro, J.A., et al., *Autophagy in the liver: cell's cannibalism and beyond*. Arch Pharm Res, 2016. **39**(8): p. 1050-61.
385. Bjorkoy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
386. Pohl, C. and S. Jentsch, *Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 65-70.
387. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(33): p. 24131-45.
388. Noda, N.N., et al., *Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy*. Genes Cells, 2008. **13**(12): p. 1211-8.

389. Hohfeld, J., *Autophagy: Press and Push for Destruction*. *Curr Biol*, 2016. **26**(15): p. R703-5.
390. He, C. and B. Levine, *The Beclin 1 interactome*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 140-9.
391. Gallagher, L.E., L.E. Williamson, and E.Y. Chan, *Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms*. *Cells*, 2016. **5**(2).
392. Kim, J., et al., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(2): p. 132-41.
393. Suzuki, K., et al., *The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation*. *EMBO J*, 2001. **20**(21): p. 5971-81.
394. Suzuki, K., et al., *Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization*. *Genes Cells*, 2007. **12**(2): p. 209-18.
395. Maiuri, M.C., et al., *Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(9): p. 741-52.
396. Mizushima, N., et al., *Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 9): p. 1679-88.
397. Pantovic, A., et al., *Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Bone*, 2013. **52**(1): p. 524-31.
398. Manolagas, S.C. and A.M. Parfitt, *What old means to bone*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(6): p. 369-74.
399. Piemontese, M., et al., *Low bone mass and changes in the osteocyte network in mice lacking autophagy in the osteoblast lineage*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 24262.
400. Scian, R., et al., *Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation*. *Infect Immun*, 2012. **80**(7): p. 2333-45.
401. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. *Science*, 2004. **306**(5698): p. 990-5.
402. Luo, S. and D.C. Rubinsztein, *Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL*. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(2): p. 268-77.
403. Zahm, A.M., et al., *Bone cell autophagy is regulated by environmental factors*. *Cells Tissues Organs*, 2011. **194**(2-4): p. 274-8.
404. Marotti, G., A.Z. Zallone, and M. Ledda, *Number, size and arrangement of osteoblasts in osteons at different stages of formation*. *Calcif Tissue Res*, 1976. **21 Suppl**: p. 96-101.
405. Pajevic, P.D., et al., *Osteocyte biology and space flight*. *Curr Biotechnol*, 2013. **2**(3): p. 179-183.
406. Dallas, S.L. and L.F. Bonewald, *Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1192**: p. 437-43.
407. Buenzli, P.R., *Osteocytes as a record of bone formation dynamics: a mathematical model of osteocyte generation in bone matrix*. *J Theor Biol*, 2015. **364**: p. 418-27.
408. Azari, F., et al., *Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification*. *J Struct Biol*, 2008. **162**(3): p. 468-79.

409. Kabeya, Y., et al., *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. EMBO J, 2000. **19**(21): p. 5720-8.
410. Mizushima, N., *Methods for monitoring autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(12): p. 2491-502.
411. Micsenyi, M.C., et al., *Lysosomal membrane permeability stimulates protein aggregate formation in neurons of a lysosomal disease*. J Neurosci, 2013. **33**(26): p. 10815-27.
412. Rusten, T.E. and H. Stenmark, *p62, an autophagy hero or culprit?* Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 207-9.
413. Shibuya, A., et al., *Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 441-6.
414. Lombardi, G., et al., *Epstein-Barr virus-transformed B cells process and present Mycobacterium tuberculosis particulate antigens to T-cell clones*. Cell Immunol, 1987. **107**(2): p. 281-92.
415. Goenka, R., et al., *B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus*. J Infect Dis, 2011. **203**(8): p. 1136-46.
416. Viau, M. and M. Zouali, *B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity*. Clin Immunol, 2005. **114**(1): p. 17-26.
417. Milner, E.C., et al., *Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity?* Springer Semin Immunopathol, 2005. **26**(4): p. 433-52.
418. Savino, W., et al., *Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 951-61.
419. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Plasma-cell homing*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 822-9.
420. Melamed, D., et al., *Modulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion in B lymphopoiesis*. Int Immunol, 2006. **18**(9): p. 1355-62.
421. Haynes, D.R., *Bone lysis and inflammation*. Inflamm Res, 2004. **53**(11): p. 596-600.
422. Merkel, K.D., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 203-10.
423. Kanematsu, M., et al., *Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegrin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(7): p. 1321-9.
424. Manabe, N., et al., *Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2625-31.
425. Schett, G., *Osteoimmunology in rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(1): p. 210.
426. Hayer, S., et al., *B-cell infiltrates induce endosteal bone formation in inflammatory arthritis*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(10): p. 1650-60.
427. Yeo, L., et al., *Expression of FcRL4 defines a pro-inflammatory, RANKL-producing B cell subset in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(5): p. 928-35.
428. Ehrhardt, G.R., et al., *Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1807-17.

429. Horowitz, M.C., J.A. Fretz, and J.A. Lorenzo, *How B cells influence bone biology in health and disease*. Bone, 2010. **47**(3): p. 472-9.
430. Meednu, N., et al., *Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(4): p. 805-16.
431. Titanji, K., et al., *Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004497.
432. Delpino, M.V., et al., *Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to Brucella abortus infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF-alpha production*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(2): p. 285-98.
433. Pesce Viglietti, A.I., et al., *Brucella abortus Invasion of Osteocytes Modulates Connexin 43 and Integrin Expression and Induces Osteoclastogenesis via Receptor Activator of NF-kappaB Ligand and Tumor Necrosis Factor Alpha Secretion*. Infect Immun, 2015. **84**(1): p. 11-20.
434. Lu, M. and A.B. Rabie, *Matrix metalloproteinase-9 regulates graft bone resorption*. Angle Orthod, 2006. **76**(4): p. 598-604.
435. Ukai, T., et al., *Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to bacterial stimulation requires Toll-like receptor 2-dependent tumor necrosis factor-alpha production*. Infect Immun, 2008. **76**(2): p. 812-9.
436. Spera, J.M., et al., *A Brucella virulence factor targets macrophages to trigger B-cell proliferation*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20208-16.
437. Takayanagi, H., *The unexpected link between osteoclasts and the immune system*. Adv Exp Med Biol, 2010. **658**: p. 61-8.
438. Choi, Y., et al., *Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2179-88.
439. Oliver-Bell, J., et al., *Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody*. Mol Oral Microbiol, 2015. **30**(2): p. 160-9.
440. Han, X., et al., *Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(3): p. 190-6.
441. Ota, Y., et al., *Generation mechanism of RANKL(+) effector memory B cells: relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2016. **18**: p. 67.
442. Hua, Z. and B. Hou, *TLR signaling in B-cell development and activation*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(2): p. 103-6.