

El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico

Mirta B. Aréstegui*
Catalina Gualtieri S.*
Javier Domínguez**
Graciela Scharovsky O.***

Abstract

Non-specific resistance is a fundamental component of the host immune response. The mononuclear phagocytic system (MPS) is part of innate resistance effector mechanisms, and is involved in several homeostatic, inflammatory and immunologic events. Mononuclear phagocytes (MNP), which are cells belonging to the MPS, play a central role in the main functions of multicellular organisms. Its early interaction with pathogens determines the evolution of the infection. Bacteria, which can resist intracellular death, survive and multiply within the cells of the MPS, are considered endocellular parasites. *Brucella* genus that infects humans as well as several animal species is an endocellular pathogen. The vast majority of these microorganisms includes mechanisms genetically coded that enable them to invade and to survive within the host cells. In the present review, characteristics of *Brucella* genus are described; special reference is dedicated to its antigenic composition, virulence factors, as well as its genomic structure and the control of gene expression. Interaction between MPS and *Brucella* spp, and the effector mechanisms of MNP, mainly, plus the generation of oxygen and nitrogen radicals, the limitation in iron availability and cytokine production are analyzed. The control of infection is explained by cell mediated immunity and the phenomena of natural resistance is also taken into consideration.

Key words: BRUCELLA SPP, MONONUCLEAR PHAGOCYtic SYSTEM, MACROPHAGES, PHAGOCYtic ACTIVITY, GENOMIC STRUCTURE, CELL MEDIATED IMMUNITY, NATURAL RESISTANCE.

Resumen

La resistencia inespecífica representa una parte esencial de la respuesta inmune del huésped. El sistema mononuclear fagocítico (SMF), que forma parte de los mecanismos efectores de la resistencia innata, está involucrado en numerosos eventos homeostáticos, inflamatorios e inmunológicos. Los fagocitos mononucleares (FMN), integrantes del SMF, tienen destacada participación en las principales funciones de los organismos multicelulares. Su interacción temprana con los patógenos determina el curso de la infección. Las bacterias que pueden resistir la muerte intracelular, sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del SMF, son consideradas parásitos intracelulares. El género *Brucella*, que infecta al hombre y a diversas especies animales, es un patógeno intracelular. La mayoría de estos microorganismos tienen mecanismos especiales, genéticamente codificados, para invadir las células del huésped y sobrevivir dentro de ellas. En la presente revisión se describen las características del género *Brucella* haciendo especial referencia a su composición antigénica, a los factores de virulencia, así como a su estructura genómica y al control de la expresión génica. Se analizan tanto la interacción entre los FMN y *Brucella* spp, como los mecanismos

Recibido el 16 de agosto de 2000 y aceptado el 29 de enero de 2001.

* Cátedra de Sueros y Vacunas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario, Ovidio Lagos y ruta 33 (2170), Casilda, Santa Fe, Argentina.

** Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, INIA, Carretera de la Coruña, Km 7.5, Madrid, 28040, España.

*** Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, 3100 (2000), Rosario, Argentina.

efectores de los FMN, principalmente, generación de radicales de oxígeno y de nitrógeno, limitación de la disponibilidad de hierro y producción de citocinas. Se explica la participación de la inmunidad mediada por células en el control de la infección y el fenómeno de la resistencia natural a la brucelosis.

Palabras clave: BRUCELLA SPP, SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTICO, MACRÓFAGOS, ACTIVIDAD FAGOCÍTICA, ESTRUCTURA GENÓMICA, INMUNIDAD CELULAR, RESISTENCIA NATURAL.

Introducción

El sistema inmune (SI) juega un papel importante en la conservación de la salud. El término respuesta inmune (RI) se utiliza para describir una serie de eventos dinámicos que ocurren in vivo, en los SI innato/constitutivo y adaptativo/inducible, originados por una alteración de la homeostasis de los tejidos.¹ La resistencia inespecífica representa una parte esencial de la RI del huésped en la que actúa de manera destacada el SMF.

El sistema mononuclear fagocítico (SMF) está compuesto por una población celular muy heterogénea, distribuida en todo el organismo e involucrada en numerosos eventos homeostáticos, inflamatorios e inmunológicos. Su amplia distribución provee defensa inmediata contra elementos extraños.²

Los fagocitos mononucleares (FMN), integrantes del SMF, actúan en la defensa de los organismos multicelulares frente a patógenos microbianos. Pueden llevar a cabo una gran variedad de funciones que incluyen fagocitosis, destrucción de los agentes patógenos, células tumorales o células envejecidas, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos durante la fase de inducción de la respuesta inmune específica, producción de citocinas y citotoxicidad en la fase efectora de esta respuesta.^{3,4} Su interacción temprana con los patógenos determina el curso de la infección. Un conjunto complejo de condiciones microambientales, incluyendo citocinas y productos microbianos, controlan la función dinámica de estas células.

Las bacterias que pueden resistir la muerte intracelular, sobreviviendo y multiplicándose dentro de las células del SMF, son consideradas parásitos intracelulares. El género *Brucella*, que infecta al hombre y a diversas especies animales, representa un patógeno intracelular que pertenece al subgrupo α -2 de las proteobacterias.⁵ La mayoría de estos microorganismos tienen mecanismos especiales, genéticamente codificados, para invadir las células del huésped y sobrevivir dentro de ellas. Las bacterias patógenas explotan una variedad de nichos en el huésped que le permiten sobrevivir. La principal característica de las bacterias de vida intracelular consiste en su capacidad de establecer una infección estable en el huésped. Los mecanismos que utilizan para evadir las defensas antimicrobianas del

huésped aún no están totalmente aclarados. La capacidad de las bacterias intracelulares de sobrevivir y crecer en los FMN del huésped, depende de su habilidad para evadir su actividad bactericida.⁶ Algunos microorganismos, como *Brucella*, han desarrollado estrategias para modificar el medio intracelular, de tal manera que sea más apropiado para sobrevivir.^{7,8}

La enfermedad que induce esta bacteria en el hombre y en los animales domésticos se denomina brucelosis. Esta enfermedad posee gran impacto tanto en la salud pública como en la producción pecuaria, constituyendo una barrera para el comercio de animales y de subproductos de origen animal, lo cual afecta la economía de los países que aún no la han podido erradicar.

La incidencia y prevalencia de la enfermedad varía entre países; la brucelosis bovina es aún una enfermedad muy extendida en algunos países de África, Asia, América y Europa (fundamentalmente Rusia),⁸ mientras que la infección con *B. melitensis* está emergiendo como un serio problema en la salud pública de países en desarrollo. En Argentina, *Brucella suis* representa la mayor causa de brucelosis en el hombre.⁹ La infección en humanos depende de los reservorios animales;¹⁰ usualmente se produce por el contacto con animales infectados, sus carcasas, o por el consumo de productos infectados.

Características del género *Brucella*

Composición antigénica y factores de virulencia del género *Brucella*

Los componentes superficiales de la bacteria son claramente críticos en la primera etapa de la interacción entre el huésped y el parásito. La fagocitosis de la bacteria por parte de los FMN no profesionales del huésped, ocurre como consecuencia del alto grado de afinidad entre las invasinas del microorganismo y los receptores del huésped.¹¹ Una vez que la bacteria ha alcanzado el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia; por ejemplo, la interferencia en la formación del fagolisosoma y modificación del tránsito intracelular.¹² El lipopolisacárido (LPS), que forma parte de la pared celular de *Brucella sp.*,¹³ tiene probablemente un papel sustancial en la adherencia y supervivencia intracelular.⁸

Además, es portador de los antígenos inmunodominantes de *Brucella*, por lo que se le considera responsable de la activación de los linfocitos B (LB) y de la inducción de la respuesta inmune humoral;¹⁴ en muchos casos es causante de los síntomas de choque séptico por la actividad endotóxica de la *Brucella*. La capacidad del LPS para inducir choque depende del lípido A y se origina por la avidez de las moléculas para unirse a las "proteínas de unión al LPS" (LBP) y al receptor CD14 de los FMN, estimulando en estas células la producción de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8); éstos son los mediadores de la mayoría de los síntomas del choque séptico. El LPS se diferencia en su estructura química y actividad biológica de bacterias enteropatógenas comunes. No está estabilizado por cationes divalentes y contiene menor carga negativa y menor cantidad de ácido 2 ceto-3-deoxioctónico fosfato (Kdo) que el LPS de otras bacterias, disminuyendo así su susceptibilidad a la acción de péptidos catiónicos bactericidas.¹⁵ El LPS de *Brucella* en fase lisa presenta en su extremo terminal moléculas de manosa que favorecen la adherencia a los FMN del huésped a través de los receptores de manosa. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa,¹⁶ y este hecho, junto al tropismo por el eritritol, explica la avidez de *Brucella* spp por el útero grávido. Otros lípidos, como los que contienen ornitina, la presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa y los ácidos grasos de cadena larga del lípido A, contribuyen a la resistencia contra sustancias bactericidas. Las proteínas externas de membrana exponen una región hidrofílica con una secuencia RGD, que es utilizada por la bacteria como mecanismo de entrada a la célula huésped a través de los receptores de integrina, que se encuentran en las células dendríticas de la piel y mucosas.¹⁷ Las integrinas participan en la interacción intercelular y con la matriz extracelular, y están involucradas en la fagocitosis.¹⁸ Este hecho puede explicar la penetración de *Brucella* a través de la piel intacta.¹⁹ Sobre la pared celular, el peptidoglicano está asociado con las proteínas externas de membrana de la bacteria y actúa también como factor de virulencia al interferir con la capacidad bactericida del suero y permitir a la bacteria resistir a los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos (Ac) y el complemento (C).¹⁷

Los antígenos solubles participan fundamentalmente en la supervivencia intracelular y en la multiplicación bacteriana. Los nucleótidos cíclicos GMPc y AMPc, liberados por *Brucella*, inhiben la desgranulación y la liberación de la enzima mieloperoxidasa de las células fagocíticas. Todas las proteínas inducidas específicamente dentro de la célula son consideradas como factores de virulencia; entre ellas se encuentran las enzimas superoxidodismutasa y catalasa, las cuales detoxifican O_2^- y H_2O_2 respectivamente. La expresión de estas

enzimas es controlada por reguladores que detectan las concentraciones de O_2^- y H_2O_2 intracelulares.

Las proteínas de choque térmico también juegan un papel importante en la colonización del macrófago. La acumulación de este tipo de proteínas permite la adaptación de la bacteria al aumento de la temperatura, al pH bajo y a otros factores de estrés microambientales, e incluso conserva las funciones de la célula bacteriana y es esencial para la multiplicación bacteriana. Se ha identificado una proteína de 70kDa como el chaperón molecular DnaK, que es requerido para el crecimiento de la bacteria en las células del huésped y está involucrado en la virulencia de esta bacteria.²⁰ La producción de proteínas de choque térmico ha sido descrita en *B. abortus* y *B. suis* en respuesta al estrés oxidativo y al pH ácido in vitro.

En microambientes deficientes en hierro, la bacteria produce sideróforos, que son moléculas quelantes del hierro, ellas facilitan su obtención.²¹

Bases genéticas de *Brucella* y control de la expresión génica

El género *Brucella* spp presenta una estructura genómica de dos cromosomas.^{5,22} Estudios cromosómicos de cuatro biovariedades de *B. suis* sugieren que el género *Brucella* emerge de un ancestro común con un solo cromosoma, similar al del biotipo tres de *B. suis*. La estructura génica de *B. suis* biotipo uno es similar a la de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis* y *B. neotomae*. Los biotipos dos y cuatro de *B. suis* difieren en el tamaño de sus dos cromosomas con respecto a las otras biovariedades.

Las bases genéticas de la virulencia de *Brucella* aún no han sido totalmente estudiadas.²³ Tanto la supervivencia intracelular como los genes implicados en la patogénesis y en las señales con las cuales interacciona con las células del huésped están en discusión. Se han identificado genes de virulencia involucrados en la supervivencia intracelular, en la biosíntesis del LPS, genes que codifican factores involucrados en la regulación de la expresión génica y enzimas que participan en las vías biosintética o metabólica de la bacteria.

El género *Brucella* es altamente homogéneo. Todos sus miembros muestran más de 95% de homología, por lo que se le clasifica como un género monoespecífico. Estudios con PCR de determinadas secuencias, seguidos de análisis de restricción, han dado evidencia de la existencia de polimorfismos en ciertos genes tales como: *omp2*, *dnaK*, *htr* y *ery*. El gen *omp2* es taxonómicamente importante porque determina sensibilidad a las tinciones, uno de los métodos utilizados para la tipificación de las distintas biovariedades de *Brucella*. El gen *dnaK* de *B. melitensis*, responsable de la síntesis del chaperón Dna K, es cortado en dos fragmentos por la endonucleasa Eco Rv, mientras que genes de otras

especies producen un fragmento simple. El gen *ery* está perdido en la cepa 19 de *B. abortus*. Esto último explica su mayor grado de atenuación.⁸

Los patógenos bacterianos expresan sus genes de virulencia sólo cuando son requeridos por las condiciones ambientales adversas. La expresión de los factores de virulencia está controlada por sensores específicos, los cuales le permiten a las bacterias intracelulares, ante los cambios de pH, pO_2 , osmolaridad, temperatura, N_2 o fosfato, expresar el factor apropiado en una vía coordinada. Estos sensores incluyen los sistemas PhoP/PhoQ y la proteína de choque térmico 70.²⁰

Interacción entre los fagocitos mononucleares y *Brucella* spp

Fagocitosis

La fagocitosis representa el proceso utilizado por los FMN y PMN (polimorfonucleares neutrófilos), para ingerir y eliminar las partículas mayores a $0.5 \mu m$, tales como los agentes infecciosos y las células envejecidas.²⁴

El tipo de fagocitosis, la naturaleza del receptor involucrado y la activación de la célula son variables críticas. Los FMN pueden secretar moléculas antimicrobianas o descargar estos productos en el fagosoma donde se encuentran los patógenos después de la fagocitosis.

Los FMN poseen sobre su superficie una plétora de moléculas que actúan como receptores específicos de superficie para varios ligandos. Las brucelas han desarrollado diversas estrategias para infectar a los FMN a través de algunos de los receptores mencionados, y no ser destruidas por sus mecanismos bactericidas. Una de las estrategias desarrolladas consiste en la unión a moléculas de superficie celular, como los miembros de la familia de receptores de integrinas. La activación del sistema inmune innato, e incluso la del sistema inmune específico, se inicia cuando el patógeno se une a receptores de las células inmunes.²⁵ Se ha sugerido que estos receptores poseen especificidad de unión para moléculas superficiales de algunos microorganismos (por ejemplo, LPS y glucanos). La unión del patógeno al receptor dispara la activación de las células inmunes inespecíficas y los mecanismos efectoras que estas células emplean, como la fagocitosis.²⁶

Muchas proteínas solubles y unidas a membrana, incluidos los receptores de manosa y de LPS (CD14), actúan como moléculas de reconocimiento. Los receptores de complemento CR1 y CR3, que reconocen los fragmentos C3b y C3bi, median la fagocitosis de parásitos intracelulares, tales como *Mycobacterium*, *Brucella*, *Legionella pneumophila* y *Leishmania*.²⁷ La unión a CR de partículas cubiertas con fragmentos de componentes C3 del complemento puede proveer al patógeno de una

vía segura de entrada y de permanencia en el FMN, ya que no dispara la combustión oxidativa y la liberación de metabolitos tóxicos de O_2 . La combustión oxidativa tiene una presencia significativa en los procesos antimicrobianos.

Brucella y muchos otros patógenos intracelulares no provocan la liberación de especies reactivas de O_2 después de su entrada a los fagocitos mononucleares, cuando no están opsonizados, o están opsonizados sólo con el complemento. Por el contrario, cuando la bacteria está opsonizada con anticuerpos e ingresa al FMN a través de los receptores Fc, induce la producción de especies reactivas de oxígeno.²⁸ Los receptores Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (FcγR) están involucrados en la depuración de complejos inmunes. La fagocitosis de patógenos unidos a Ac favorece la presentación antigénica, generación de reactivos intermediarios del O_2 y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.²⁹ Este receptor es particularmente importante en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares. La unión a integrinas y receptores FcγR inicia una compleja vía de señales de transmembrana que contribuye a la activación de variadas funciones efectoras como combustión oxidativa y desgranulación.^{8,28}

La capacidad de evadir a las moléculas tóxicas de oxígeno podría ser importante para su supervivencia intracelular, ya que la *Brucella* es susceptible a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Asimismo, es relativamente resistente a los superóxidos porque puede almacenar abundante cantidad de superóxido-dismutasa. Además, la supervivencia intracelular de *Brucella* le provee protección contra los mecanismos humorales de defensa.⁶ Una vez que ha sido fagocitada, la bacteria desarrolla otras estrategias de supervivencia que pueden incluir, desde interferencia con los múltiples procesos que ocurren en el fagolisosoma, hasta el tránsito seguro dentro del compartimiento citosólico.¹² El fagosoma no se fusiona con el lisosoma, e incluso no se acidifica a pH tan bajos, característicos de la mayoría de los fagosomas.²⁴ Pueden utilizar el citoesqueleto, tanto para el movimiento como para la diseminación intracelular.¹² Young et al.³⁰ han mostrado que tanto las cepas virulentas como las atenuadas son rápidamente fagocitadas sólo después de la opsonización. Estudios de interacción entre macrófagos de la glándula mamaria y cepas rugosas y lisas de *B. abortus* sugieren que son rápidamente fagocitadas cuando son opsonizadas con C' o anticuerpos específicos; estos resultados concuerdan con los realizados con la línea celular humana U937, que también incrementa el porcentaje de ingestión después de la opsonización con IgG.³¹ Los estudios de porcinos libres de infección e infectados naturalmente con *B. suis* y desafiados in vitro con *B. suis* cepa 1330 o con *M. Bovis*, realizados por el equipo de investigación en FMN, muestran que la actividad fagocítica con bac-

terias opsonizadas es significativamente mayor que con bacterias sin opsonizar.³²

Combustión oxidativa y producción de radicales de oxígeno

Los mecanismos efectores de los FMN incluyen: Generación de radicales de oxígeno (ROI), producción de radicales de nitrógeno (RNI), limitación de la disponibilidad de hierro, acidificación del fagosoma, fusión del fagolisosoma y producción de citocinas. La mayoría de estos mecanismos se inducen sólo por una activación apropiada.⁸ Esta observación concuerda con los experimentos que muestran la necesidad de una señal producida por receptores Fcγ de los FMN murinos, para que ocurra una regulación postranscripcional de NO sintetasa inducible (iNOS).^{33,34} En los FMN, los mecanismos de muerte dependientes del oxígeno juegan un importante papel en los procesos antibacterianos. Estudios preliminares sobre el efecto de *Brucella* en la combustión oxidativa indican que la ingestión no induce la producción de ROI. Estos experimentos fueron realizados con bacterias sin opsonizar. Por el contrario, las brucelas expuestas a antisuero son capaces de inducir la liberación de cantidades significativas de O₂. La NADPH oxidasa, activada por IFN-γ y por la unión IgG/FcR, inicia la producción de ROI. Esta reacción también es dependiente de Fe. Los monocitos sanguíneos, pero no los macrófagos tisulares, poseen mieloperoxidasa (MPO), que permite la halogenación de las proteínas microbianas.^{1,35} El sistema MPO de los FMN, que es uno de los principales sistemas bactericidas oxígeno-dependiente encontrado en los mamíferos, es estimulado por la invasión de microorganismos. La estimulación induce un aumento de la reducción de oxígeno y liberación de radicales superóxido dentro del fagolisosoma. Los nucleótidos cíclicos producidos por *Brucella* inhiben la desgranulación de los neutrófilos y la liberación de la enzima MPO, necesaria para producir reactivos haluros.³⁵

Muerte mediada por intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN)

La producción de óxido nítrico (NO) y de peroxinitrito (ONOO⁻) actúa como un potente mecanismo antimicrobiano. La generación de NO es catalizada por la iNOS en los macrófagos de ratón. Su inducción es controlada por estímulos exógenos como el INF-γ y LPS bacteriano en esta especie. En rumiantes, la expresión de iNOS en los monocitos y FMN se produce frente a distintos estímulos. Los FMN de otras especies (hombre, cabra, cerdo y conejo), tratados previamente con los activadores mencionados anteriormente, disminuyen la expresión de iNOS y generan menor cantidad de nitrito y nitrato que los FMN

de ratones o bovinos no estimulados.³⁶ Además, se ha observado, en células peritoneales adherentes de rata, que el S-LPS y el lípido A de *B. abortus* y *B. melitensis* inducen niveles menores de producción de NO que el producido por el LPS de *E. coli*. La participación de iNOS ha sido confirmada midiendo el aumento de la expresión de iNOS ARNm e iNOS proteína. Estos resultados indicarían la expresión de patrones diferenciales de iNOS y una regulación in vitro específica de especie.³¹ Asimismo, estos hallazgos ayudan a explicar: 1) La infección aguda de *Brucella* en ratones; 2) la baja frecuencia del choque séptico en la brucelosis humana y animal; y 3) la supervivencia prolongada de *Brucella* en sus huéspedes. En el ratón, el NO favorece la eliminación de *Brucella* siempre que estén presentes IFN-γ y anticuerpos antibrucelas; por ejemplo, después de la expresión de la inmunidad específica. Ensayos realizados con macrófagos peritoneales activados in vitro han mostrado que la producción de NO podría suprimirse por la acción de una proteína estimuladora de macrófagos (PEM). La pérdida del receptor de PEM (STK/RON), ocasionó el aumento de la producción de NO por macrófagos activados in vitro e in vivo. La regulación negativa de la respuesta de los macrófagos debida a la expresión de la proteína PEM y el receptor de tirosinquinasa (MSP/STK) ocurre en parte por la inhibición de señales coestimuladoras que cooperan con el INF-γ en la activación.³⁷

Limitación de la disponibilidad de hierro

El hierro es un elemento crucial para la supervivencia de las bacterias intracelulares. El hierro es transportado por transferrina a través de los receptores de transferrina y almacenado dentro de las células unido a ferritina.²¹ Uno de los mecanismos bactericidas de los macrófagos consiste en el almacenamiento del hierro que es el obtenido de las transferrinas. Después de la acidificación de la vesícula, el hierro se disocia y se reduce. La expresión de receptores de transferrina sobre el macrófago está correlacionada con el almacenamiento de hierro dentro de la célula.

Producción de citocinas

Las citocinas producidas por los FMN durante la fagocitosis de la *Brucella* son de gran importancia, ya que determinan el tipo de respuesta inmune contra la bacteria.^{38,39} La respuesta Th1/Th2 resultante es determinada, en parte, por los macrófagos durante su interacción con la *Brucella*.⁴⁰

Diferentes citocinas están involucradas en la regulación de la actividad de los macrófagos;^{41,42} éstas incluyen IFN-γ, IL-12 y TNF-α. El papel fisiológico de estas citocinas fue estudiado en numerosos ensayos de neutralización in vivo, con anticuerpos monoclonales específicos

para cada citocina. Mientras que TNF- α e INF- γ parecen ser las citocinas más críticas en la resistencia específica y natural, la IL-12 tiene una participación destacada en el control oportuno de la infección.⁴³⁻⁴⁵ Havell ha propuesto que TNF- α es un factor esencial en el desarrollo de la resistencia del huésped contra la infección de *L. monocytogenes* y que la resistencia disminuye en ratones infectados cuando se les inyecta anticuerpos contra TNF- α . En el sobrenadante de macrófagos infectados con *B. abortus* viva se encontraron concentraciones significativamente menores de TNF- α que en los infectados con *B. suis* muerta.⁴⁶⁻⁴⁸ Los resultados obtenidos con macrófagos peritoneales de ratones infectados revelaron un incremento en la expresión de TNF- α inducido sólo por *Brucella* vivas. Sin embargo, después de la infección de la línea celular humana U937 o de monocitos sanguíneos con *B. suis* viva, no se observaron cantidades detectables de TNF- α en el sobrenadante del cultivo.⁴⁷ Bajo las mismas condiciones, *B. suis* muerta indujo la producción significativa de TNF- α . La adición de TNF- α exógeno restringe el crecimiento intracelular de *Brucella*. Este fenómeno, observado en los ensayos con las cepas de *Brucella*, es evidencia de que *Brucella* libera un factor que inhibe específicamente la expresión de TNF- α en macrófagos humanos activados, contribuyendo de esta manera a la evasión de las defensas antimicrobianas.⁴⁶ En ensayos realizados con FMN de porcinos procedentes de granjas libres de infección e infectados con *B. suis*, cuando se desafiaron con *B. suis* viva, se indujo mayor producción de TNF- α que con *B. suis* muerta en la granja libre, a diferencia de los resultados obtenidos en otras especies.⁴⁷

De igual manera, el desafío con *B. suis* viva de FMN de animales de la granja infectada produjo TNF- α en cantidades menores que el producido por FMN de los animales de la granja libre.⁴⁸ Este fenómeno se invirtió cuando se desafiaron con brucelas muertas. Se comparó, además, la producción de TNF- α de FMN de cerdos seronegativos y seropositivos a las técnicas de brucelosis de la granja infectada, desafiados con *B. suis* viva. Las técnicas diagnósticas utilizadas fueron: BPA (técnica del antígeno tamponado en placa), rosa de bengala y prueba lenta en tubo (Wright), con y sin 2-ME. Los animales seronegativos produjeron cantidades significativamente mayores de TNF- α que los seropositivos.⁴⁸ Este comportamiento explicaría, por lo menos en parte, la resistencia a la infección de los animales pertenecientes al grupo seronegativo de la granja infectada. Asimismo, el menor nivel de TNF- α , producido por FMN de cerdos seropositivos podría explicarse, como lo sugiere Liautard,³¹ por la presencia de un receptor específico de especie o de individuos, para un factor proteínico inhibidor de la expresión de TNF- α producido por *Brucella* viva como uno de los mecanismos de evasión de las defensas antimicrobianas del huésped.

El IFN- γ tiene importante participación en la resistencia adquirida a bacterias intracelulares.^{1,49} Su actividad está dirigida fundamentalmente hacia los FMN; estimula la actividad antimicrobiana, aumenta la muerte de los patógenos fagocitados y favorece el procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos mediante la cooperación con una segunda señal (provista por el LPS y el TNF- α endógeno), con el propósito de promover el aumento de la producción de citocinas que estimulan la inflamación, la producción de NO y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH). La producción de IFN- γ por los LT CD4⁺, CD8⁺ y γ/δ de los bovinos inmunizados contra brucelosis, es el mecanismo de protección más eficiente. Estudios *in vitro*, realizados en la especie bovina con células mononucleares de sangre periférica desafiados con *B. abortus* viva y muerta (cepa 2308), mostraron efectos moduladores de *Brucella*, tales como estimulación de la producción de IL-1 e inhibición de la producción de IL-2 e IFN- γ .³⁸

Supervivencia de *Brucella* en los FMN

La supervivencia de *Brucella* en FMN bovinos ha sido analizada mediante estudios *in vitro* por diversos autores.^{50,51} Las cepas lisas virulentas de *B. abortus* pueden crecer en cultivos de células mononucleares sanguíneas, macrófagos peritoneales, macrófagos de glándula mamaria y líneas celulares mamíferas. Se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia de *Brucella* en los FMN entre los animales de una misma especie, que podrían ser atribuidos a factores genéticos.⁸

Inmunidad mediada por células (IMC)

La IMC es la responsable del control de la infección. Los linfocitos T (LT) CD4⁺ median la activación de los macrófagos a través de la producción de IFN- γ y permiten la lisis de la brucela fagocitada. El agente infeccioso tiene una influencia decisiva en el tipo de citocinas producidas por los LTh (LT helper, o colaboradores, o ayudadores). Estas células provienen de un precursor denominado LTh₀, que de acuerdo con el estímulo recibido, se diferencia en LTh₁ o LTh₂. Los LTh₁ se caracterizan por la producción de IFN- γ e IL-2 y están asociados con la inmunidad de protección a bacterias intracelulares. Los LTh₂ producen IL-4 e IL-5 y son los responsables del control de infecciones con helmintos. Además, los LT CD8⁺, que pueden producir IFN- γ , lisan las células infectadas que son incapaces de producir por sí mismas la destrucción de la bacteria intracelular, permitiendo, de esta manera, que la bacteria sea fagocitada por un macrófago capacitado que pueda destruirla.

FMN y resistencia natural a la brucelosis

La inmunidad innata es dependiente fundamentalmente de la actividad de células con capacidad fagocítica (granulocitos/macrófagos) y de células NK (natural killer o asesinas naturales); la combustión oxidativa, las enzimas hidrolíticas y los reactivos haluros son los mecanismos antibacterianos más importantes del SMF, cuya actividad parece ser un punto determinante en la resistencia a la brucelosis. Los patógenos intracelulares sobreviven y se multiplican en los macrófagos, inhibiendo la fusión del fagolisosoma y evadiendo la exposición a las enzimas lisosomales, por lo que la fusión del fagolisosoma constituye una etapa clave en la actividad antibacteriana de las células parasitadas.

Se ha propuesto la participación de un factor genético del huésped⁸ en la respuesta oportuna a la infección de algunas cepas de ratones con patógenos intracelulares, tales como *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes* y *Leishmania donovani*.⁵² Esta regulación genética se manifiesta sólo en la fase inicial de la infección, en la cual las cepas susceptibles (S) se caracterizan por la proliferación bacteriana, y las cepas resistentes (R), por la inhibición de la proliferación.^{1,53,54}

La resistencia natural en brucelosis parece ser más compleja y de diferente origen. Se ha encontrado que en hembras bovinas no vacunadas, más de 30% de los animales son naturalmente resistentes a la infección por *Brucella*. La resistencia natural parece ser también, como en el ratón, el resultado del control oportuno de la supervivencia y el crecimiento de la bacteria por parte de los macrófagos. Las diferencias encontradas en la habilidad de los macrófagos para controlar la replicación de *Brucella abortus*, aun antes de la exposición de los animales al patógeno, apoyan este concepto.⁶ Se utilizaron bovinos naturalmente resistentes a *B. abortus*, para estudiar la herencia de los genes que regulan el control de la infección.⁵⁴ Estudios realizados en macrófagos de bovinos R y S han mostrado diversas diferencias en la expresión de genes de citocinas, las cuales se han relacionado con el control del crecimiento intracelular de *Brucella* en los diferentes grupos de animales.

Ensayos genéticos preliminares indican que dos genes controlan los fenotipos R y S. Estos dos genes se denominan Nramp-1 bovino (Bov Nramp1) y BoLA. Un homólogo del BovNramp1 ha sido identificado en otras especies como visón, alce, ciervo rojo, oveja, cabra y cerdo.⁵⁴ La resistencia temprana contra la infección de *M. Bovis*, BCG y *S. typhimurium*, es controlada en el ratón también por el gen Nramp.⁵⁵ Mediante técnicas de biología molecular se ha encontrado que este gen se expresa en macrófagos/monocitos, linfocitos T y B.^{56,57}

Aunque su función aún no está totalmente dilucidada, estudios recientes sugieren que Nramp1 tiene un papel potencial en el transporte de iones, regulando la concentración intrafagosomal de Fe^{++} y otros cationes.⁵⁷ Este gen codifica para una proteína integral de membrana (NRMP1)⁵⁸ expresada en el compartimento lisosomal de los macrófagos y es reclutada en la membrana del fagosoma de los macrófagos infectados con bacterias intracelulares.⁵⁸ Este gen forma parte de una familia de genes conservados tanto en el hombre como en las bacterias. La conservación de homólogos de Nramp en especies procariotas y eucariotas sugiere un origen ancestral de un billón de años, una estructura conservada y función de transporte. El 37% de identidad entre la proteína NRMP1 del macrófago humano y su homólogo en *M. leprae* sugiere que el huésped y el parásito intracelular podrían competir por una sustancia esencial común para la supervivencia del microorganismo. A pesar de que el mecanismo por el cual Nramp1 confiere resistencia innata contra patógenos intracelulares aún no ha sido aclarado; basándose en las características de esta familia de proteínas se han sugerido varias hipótesis. Gruenheid y Gross⁵⁷ proponen que afectaría la replicación intrafagosomal modulando el contenido de cationes divalentes de este organelo. También se ha sugerido que transporta iones de Mn^{++} desde el medio extracelular al interior del citoplasma del macrófago.⁵⁶ Se ha encontrado además, que el pH del fagosoma es significativamente más ácido en células Nramp1⁺ que en células de ratones mutantes que han perdido el gen. Asimismo, fue asociado con el aumento de la fusión del fagosoma con el lisosoma. Estos datos apoyan la hipótesis de que Nramp1 afecta la replicación de las bacterias intracelulares modulando el pH del fagosoma.⁵⁹ La expresión del alelo de resistencia del gen Nramp1 está relacionado con la expresión de numerosos genes asociados con la activación del macrófago, incluyendo el locus del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH).⁶⁰

Perspectivas futuras

El avance efectuado en los últimos años en el estudio, en los ámbitos celular y molecular, de las interacciones del género *Brucella* con los huéspedes que infecta, ha permitido profundizar el conocimiento de la forma en que la bacteria ingresa en las células que parasita y de la respuesta que desencadena en cada especie infectada.

La utilización de los conocimientos obtenidos, junto con otros que surgirán de una mayor investigación en el tema, permitirá plantear estrategias concretas tendientes a la disminución de la incidencia de la brucelosis.

Referencias

1. Unanue E. Why Listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. *Immunol Rev* 1997;158:1-156.
2. Bullido R, Gomez de Moral M, Alonso F, Ezquerro A, Zapata A, Sanchez C, et al. Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. *Tissue Antigens* 1997;48:1-11.
3. Unanue ER. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1993:111-144.
4. Fainboim L, Satz ML, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 4^a ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres Gráfica Patricia, 1999:204-209.
5. Ugalde RA. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp common genes with other animal pathogens, plant pathogens and endosymbionts. *Microbes Infect* 1999;1:1211-1219.
6. Campbell G, Adams L. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophage and the use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;34:291-305.
7. Kaufmann S. Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol* 1993;2:129-163.
8. Adams G. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses. *Emerging Infect Dis* 1997;3:1-12.
9. Lucero NE. Diagnóstico microbiológico y redes de laboratorio. II Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes; 1998 abril 13-17; Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis, Ideográfica, 1998:68-71.
10. Done S, Warathall A, Broughton E, Spencer S. Brucellosis in swine. *Pig J* 1998;41:54-64.
11. Kaufmann S. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today* 1995;16:338-342.
12. Doherty P, Kaufmann S. Immunity to infection. Novel insights and new models in a time of rapid technological change. *Curr Opin Immunol* 1994;6:515-517.
13. Daffner J, Scotti M. Revisión sobre brucelosis bovina. Antígenos solubles de utilización en pruebas serológicas para diagnóstico complementario. *Therios* 1995;24:276-287.
14. Oñate A. Proteínas totales de *Brucella abortus* cepa 19 y sus contaminantes. *Arch Med Vet* 1989;21:103-108.
15. Folch H, Oñate A. Propiedades mitogénicas y caracterización de diferentes fracciones polisacáridas obtenidas de dos especies de *Brucella*. *Arch Med Vet* 1995;37:85-92.
16. Pontow S, Kery V, Stahl D. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992;137:221-241.
17. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;41:295-306.
18. Bullido R, Alonso F, Gomez del Moral M, Ezquerro A, Alvarez B, Ortuño E, Dominguez J. Monoclonal antibody 2F4/11 recognizes the α chain of porcine β_2 integrin involved in adhesion and complement mediated phagocytosis. *J Immunol Methods* 1996;195:125-134.
19. Alton GG. *Brucella* suis. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. Nepean, Canada: CRC Press, 1990:411-422.
20. Köler S, Teyssier J, Cloeckaert A, Rouot B, Liautard J. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella* suis within U937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* 1996;20:701-712.
21. Leonard B, Lopez-Goni I, Baldwin C. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects brucellae from killing by macrophages. *Vet Res* 1997;28:87-92.
22. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangement in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998;27:99-106.
23. Foulouge V, Bourg G, Cazevielle C, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D. Identification of *Brucella* suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* 2000;68:297-303.
24. Kaufmann S. Immunity to intracellular bacteria. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999:1335-1370.
25. Pearson A. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:20-28.
26. Allen L, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr Opin Immunol* 1996;8:36-40.
27. Horwitz MA. Interactions between macrophages and *Legionella pneumophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;181:265-283.
28. Rubel C, Marval P, Vermeulen M, Isturiz M, Palermo M. Lipopolysaccharide enhances Fc γ R-dependent functions in vivo through CD11b/CD18 up-regulation. *Immunology* 1999;97:429-437.
29. Ravetch J. Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 1997;9:121-125.
30. Young E, Borchert M, Kretzer F, Musher D. Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 1985;151:682-690.
31. Liautard JP, Gross A, Dornand J, Köhler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiol Sem* 1996;12:197-206.
32. Arestegui M, Gualtieri C, Delgado G, Perlo V, Scharovsky OG. Porcine phagocytic mononuclear system (PMS) activity in *Brucella* suis infected sows. *Biocell* 1999; 23:76.
33. Lopez-Urrutia L, Alonso A, Nieto M, Bayon Y, Orduna A, Sanchez-Crespo M. Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* induce nitric oxide synthesis in rat peritoneal macrophages. *Infect Immun* 2000;68:1740-45.
34. Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rouot B, Emanuelle C, Dornand J. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella* suis-infected murine macrophages. *Infect Immun* 1998;66:1309-1316.
35. Cooray R. Casein effects on myeloperoxidase-mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;51:55-65.
36. Jungi T, Adler H, Adler B, Thöny M, Krampe M, Peterhans E. Inducible nitric oxide synthase of macrophages. Present knowledge and evidence for species specific regulation. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:323-330.
37. Lin QP, Frint K, Ward J, Correll PH. Negative regulation of macrophage activation in response to IFN-gamma and lipopolysaccharide by the STK/ROK receptor tyrosin kinase. *J Immunol* 1999;163:6606-6613.
38. Stevens M, Olsen S. In vitro effects of live and killed *Brucella abortus* on bovine cytokine and prostaglandin E₂ production. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;40:149-161.
39. Splitter G, Everlith K. Regulates bovine macrophage-T-cell interaction by major histocompatibility complex

- class II and interleukin-1 expression. *Infect Immun* 1989;57:1151-1157.
40. Splitter G, Oliveira S, Miller C, Ko J, Covert J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:309-319.
 41. Zhang L, Wang Ch. Induction of cytokine messenger RNA transcripts in mouse macrophages by *Listeria monocytogenes*, isolated from channel catfish. *Am J Vet Res* 1998;59:717-731.
 42. Vazquez-Torres A. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:170-192.
 43. Huang L, Krieg AM, Eller N, Scott D. Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. *Infect Immun* 1999;67:6257-6263.
 44. Svetic A, Jian Y, Lu P, Finkelman F, Gause W. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN- γ in CD4 T cells. *Int Immunol* 1993;5:877-883.
 45. Caron E, Gross A, Liautard JP, Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- α expression, active on human macrophage-like cells. *J Immunol* 1996;156:2885-2893.
 46. Caron E. Live *Brucella* spp fail to induce tumor necrosis factor a excretion upon infection of U 937 derived phagocytes. *Infect Immunol* 1994;62:5267-5274.
 47. Gualtieri C, Aréstequi M, Perlo V, Samartino L, Duglovitzky D, Scharovsky O. Secreción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) por células del sistema fagocítico mononuclear porcino infectado con *Brucella suis*. *Memorias del II Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Latinoamericano de Enfermedades Emergentes*; 1998 abril 14-17; Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis, 1998:157.
 48. Aréstequi M, Gualtieri C, Delgado G, Comba E, Scharovsky OG. Respuesta inmune a *Brucella suis* en porcinos. *Actas del 4º Seminario Internacional de Ciencias Avícolas*. Avícola 2000, Porcinos; 2000 mayo 10-12; Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires, Argentina: Cámara Argentina de Productores Avícolas, CAPIA, 2000:s/f
 49. Kantakamalakul W, Politis A, Marecki S, Sullivan T, Ozato K, Fenton M, Vogel S. Regulation of IFN consensus sequence binding protein expression in murine macrophages. *J Immunol* 1999;162:7417-7425.
 50. Arestegui M, Gualtieri C, Comba E, Delgado G, Scharovsky OG. MNC bactericidal activity from pigs naturally infected with *Brucella suis*. *Biocell* 2000;24:185.
 51. Qureshi T, Templeton J, Adams L. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;50:55-65.
 52. Ho MH, Cheers C. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection. IV. Genetic and cellular basis of resistance to chronic infection with *Brucella abortus*. *J Infect Dis* 1982;146:381-387.
 53. Adams G, Barthel R, Feng J, Qureshi T, Piedrahita J, Templeton J. Genes associated with innate killing of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* by macrophages from genetically resistant cattle. *Vet. Immunol Immunopathol* 1996;54:135.
 54. Templeton J, Feng J, Li Y, Quershi T, Izadjoo M, Adams G. Immunogenetics of innate resistance to brucellosis in ungulates. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:255-262.
 55. Zhang G, Wu H, Ross CR, Minton JE, Blech F. Cloning of porcine NRAM1 and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 1 beta: role of CD14 and mitogen activated protein kinases. *Infect Immunol* 2000;68:1886-1898.
 56. Bellamy R. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect* 1999;1:23-27.
 57. Gruenheid S, Gross P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nram1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:43-48.
 58. Kishi F, Yoshida T, Aiso S. Location of NRAM1 molecule on the plasma membrane and its association with microtubules. *Mol Immunol* 1996;33:1241-1246.
 59. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gross P, Grinstein S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nram1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 1998;188:351-64.
 60. Wajcicchowski W, De Sanctis J, Skamene E, Radziach D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the Nram1 gene. *J Immunol* 1999;163:2688-2696.