



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

BIOLOGÍA CELULAR

“Efecto de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Brucella melitensis* sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donadores sanos”

T E S I S

Que presenta

IBT. OLIN MEDINA CHÁVEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOLOGÍA CELULAR

Director de la Tesis

DR. JOSÉ LEOPOLDO FLORES ROMO

Ciudad de México

Febrero, 2018

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Leopoldo Flores Romo.

El autor de este trabajo fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de becario 630216

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leopoldo Flores por haberme aceptado en su laboratorio, por sus críticas constructivas hacia mi trabajo, por ser un gran ejemplo a seguir y por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Manolo y al Dr. Navarro por aceptar ser mis asesores, por sus críticas y correcciones a mi trabajo.

A Luis, por introducirme en este arte oscuro que es la inmunología, por sus enseñanzas, su apoyo y confianza, Gracias.

A Erick, por dejarme desarrollar este proyecto junto a él por los buenos y malos momentos, por donar las OMVs que sin esta gran acción el proyecto no hubiera sido posible.

Al laboratorio 15, a Juanita, Mariana, Eli, Edith, Isis, Felipe, Yola, por sus risas, ideas, compañerismo y por todos los buenos momentos que hicieron la maestría más llevadera.

A mis amigas de la maestría, Ivette y Pati, por haber hecho la maestría más agradable y divertida, por su amistad, confianza y apoyo.

A Ámbar, por su amistad incondicional, por su apoyo en todo momento, por sus consejos, por su confianza, sus críticas y risas. Gracias Ámbar

A Raúl, por su amor, comprensión, apoyo, paciencia, críticas, por su compañía y por ser un gran amigo en el que puedo confiar siempre. Gracias por todo pequeño.

A mis papás Richard y Rosa, por su apoyo a lo largo de toda mi vida, por su amor incondicional, por su comprensión, por su educación que me ha hecho ser una buena persona y principalmente por creer en mí como nadie lo ha hecho. Gacio de corazón.

A mi hermana Nahui, por ser mi mejor amiga, por sus palabras de aliento todo el tiempo, por su amor gordo que me da siempre, por los momentos de felicidad y tristeza que tenemos juntas, por sus loqueras, sus consejos, y principalmente por ser la mejor hermana que uno podría tener. Gacio emano, te amo.

Índice

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
1. BRUCELOSIS	8
2. INFECCIÓN DE <i>BRUCELLA</i>	10
2.1. Adherencia/Invasión:.....	10
2.2. Establecimiento.....	11
2.3. Diseminación.....	12
3. RESPUESTA INMUNE CONTRA BRUCELOSIS EN HUMANO	13
4. VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMVs).....	16
4.1. Formación de las OMVs	16
4.2. Funciones de las OMVs	17
4.3. Interacción entre OMVs y células del sistema inmune	19
4.4. OMVs como posibles vacunas.....	20
ANTECEDENTES.....	21
ANTECEDENTE DIRECTO	21
JUSTIFICACIÓN.....	22
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
OBJETIVO.....	23
METODOLOGÍA.....	24
RESULTADOS.....	26
VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ESTIMULADAS CON OMVs DE <i>BRUCELLA MELITENSIS</i>	26
EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN.	27
INDUCCIÓN DE CITOCINAS	50
¿OMVs COMO INMUNOMODULADORES?	53
CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA.....	60
DETERMINACIÓN DE DAÑO CELULAR Y APOPTOSIS	70
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIÓN	80
PERSPECTIVAS	80
APÉNDICE	81
BIBLIOGRAFÍA.....	90

Índice de tablas y figuras

Figura 1: Incidencia de Brucelosis en México; Año 2000 2011.....	10
Figura 2: Tráfico intracelular de <i>Brucella</i> spp. en la célula hospedero.....	13
Figura 3: Porcentaje de PBMCs viables	26
Figura 4: Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de activación CD69	28
Figura 5: Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de activación CD86	30
Figura 6: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de activación CD69	32
Figura 7: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de activación CD86	34
Figura 8: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de activación CD69	36
Figura 9: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de activación CD86	38
Figura 10: Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de inhibición PD-1	40
Figura 11: Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de inhibición PDL-1	42
Figura 12: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de inhibición PD-1	43
Figura 13: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de inhibición PDL-1	45
Figura 14: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de inhibición PD-1	48
Figura 15: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de inhibición PDL-1	49
Tabla 1: Concentración de citocinas de sobrenadante de cultivo de PBMCs	51
Figura 16: Determinación de la concentración de citocinas de sobrenadante de cultivo de PBMCs	52
Figura 17: Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación CD69	54
Figura 18: Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación CD86	56
Figura 19: Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de inhibición PD-1	57
Figura 20: Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación PDL-1	59
Figura 21: PBMCs en cultivo estimuladas con las OMVs de <i>B. melitensis</i>	61
Figura 22: Citoesqueleto de actina de PBMCs estimuladas con OMVs de <i>B. melitensis</i> durante 2 horas	63
Figura 23: Citoesqueleto de tubulina de PBMCs estimuladas con OMVs de <i>B. melitensis</i> durante 2 horas	65
Figura 24: Citoesqueleto de actina de PBMCs estimuladas con OMVs de <i>B. melitensis</i> durante 6 horas	67
Figura 25: Citoesqueleto de tubulina de PBMCs estimuladas con OMVs de <i>B. melitensis</i> durante 6 horas	69
Figura 26: Porcentaje de linfocitos y monocitos H2AX+ y PARP+	70

Abreviaturas

APCs= Células presentadoras de antígeno (Antigen-presenting cells)
BCV= Vacuola contenedora de Brucella (Brucella-containing vacuoles)
CCCP= Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CD69= Early activation antigen
CD86= B7-2, marcador de activación
DCs= Células dendríticas
ER= Retículo endoplásmico
INF- γ = Interferón gamma
LPS= Lipopolisacárido
ME= Membrana externa
OMVs= Vesículas de membrana externa
PD-1= Programmed death-1
PD-L1= Programmed death- ligand 1
PHA= Fitohemaglutinina
T4SS= Sistema de secreción tipo 4, por sus siglas en ingles
TLRS= Receptores tipo Toll, por sus siglas en inglés
TNF-A= Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

La brucelosis es una zoonosis causada por algunas especies del género *Brucella*, se caracteriza por ser una enfermedad crónica ya que *Brucella* cuenta con diversos mecanismos para evadir el sistema inmunológico del hospedero y permanecer por largos periodos dentro de éste. En el presente trabajo se estudió la respuesta de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs: Linfocitos T, linfocitos B y monocitos) de donadores sanos, ante la presencia de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Brucella melitensis*. Se analizó el porcentaje de células que expresaron las moléculas de activación CD69, CD86 y las moléculas pro-inhedoras PD-1 y PDL-1; se cuantificó en el sobrenadante de cultivo de PBMCs la concentración de citocinas de respuesta Th1, Th2 y Th17 y se analizó si las OMVs inducían apoptosis o daño al DNA en PBMCs, todo esto por citometría de flujo. Además se observó la estructura del citoesqueleto de las células estimuladas con las vesículas por inmunofluorescencia. Los resultados muestran una modulación de la expresión de moléculas de activación e inhibición en las células mononucleares por parte de las OMVs, así como un aumento en la concentración de IL-10, IL-6 y TNF- γ , por otro lado IL-17 disminuyó considerablemente. Se observaron cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina en las células estimuladas con las vesículas. Con dichos resultados, creemos que las OMVs de *B. melitensis* podrían actuar como un mecanismo más de infección y evasión del sistema inmune, que podrían ayudar a que *Brucella* escape de la degradación lisosomal, o que modulen la activación de las célula hospedero, así como la secreción de citocinas proinflamatorias.

Abstract

Brucellosis is a zoonosis caused by some species of the genus *Brucella*, which is characterized as a chronic disease because *Brucella* has several mechanisms to evade the host's immune system and stay for long periods of time within it. In the present work we analyzed the response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs: T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes) in presence of outer membrane vesicles (OMVs) of *Brucella melitensis*. The percentage of cells expressing the activation molecules CD69, CD86 and the inhibition molecules PD-1 and PDL-1 were analyzed; the concentration of Th1, Th2 and Th17 response cytokines was quantified and it was analyzed whether OMVs induced apoptosis or DNA damage in PBMCs, all by flow cytometry. In addition the structure of the cytoskeleton of the cells stimulated with *Brucella* vesicles was observed by immunofluorescence. The results show a modulation in the expression of activation and inhibition molecules in the mononuclear cells by the OMVs, as well as an increase in the concentration of IL-10, IL-6 and TNF- γ , on the other hand IL-17 decreased considerably. Changes were observed in microfilaments and microtubules in cells stimulated with *Brucella* vesicles. With these results, we believe that the OMVs of *B. melitensis* could act as a further mechanism of infection and evasion of the immune system, which could help *Brucella* escape the lysosomal degradation, or modulate the activation of the host cells, as well as secretion of proinflammatory cytokines.

Introducción

1. Brucelosis

La Brucelosis, también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante o fiebre mediterránea, es una infección causada por bacterias del género *Brucella*. La brucelosis es una enfermedad zoonótica que se transmite al humano bajo ciertas condiciones y es endémica en muchos países de América latina, Asia, Medio Oriente y el Mediterráneo. La infección en animales causa enormes pérdidas económicas ya que en las hembras preñadas ocasiona aborto durante el tercer trimestre de embarazo, además de un decremento en la producción de leche y una reducida tasa de reproducción en el ganado (1). La brucelosis se trasmite a humanos mediante el consumo de productos lácteos no pasteurizados (especialmente leche "bronca" y quesos "frescos"), por contacto con animales infectados, a través del contacto directo con partes de animales infectados como la placenta infectada producto del aborto ocasionado, por la inoculación a través de laceraciones en piel y mucosas y por la inhalación de aerosoles (2). Se ha estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que 500,000 nuevos casos de brucelosis se producen anualmente, por lo que es una de las zoonosis más frecuentes en todo el mundo (1). La dosis infectiva es muy baja (hasta 100 bacterias) y se dice que es una enfermedad ocupacional ya que ciertos grupos como: granjeros, veterinarios, trabajadores en mataderos, personal de laboratorios y otros que trabajen con animales y sus productos de consumo, se encuentran en mayor riesgo de contraerla. La brucelosis es una enfermedad generalizada puede durar, días, meses o en ocasiones hasta un año o más si no se trata adecuadamente (3).

Brucella spp., son bacterias Gram negativas, no esporuladas, intracelulares facultativas, no móviles (2). El género *Brucella* consta de 11 especies de acuerdo a la variación antigénica y el huésped primario: *Brucella melitensis* (ovejas y cabras), *B. suis* (cerdos), *B. abortus* (bovinos), *B. ovis* (ovejas), *B. canis* (perros), *B. neotomae* (ratas del desierto), *B. ceti* (delfines, ballenas), *B. pinnipedialis* (foca), *B. microti* (roedores), *B. vulpis* (zorro rojo) y *B. inopinata* de la cual no se sabe hasta la fecha cual es el huésped animal preferencial (4, 5). *B. melitensis* es la especie más virulenta hasta ahora descrita para el humano. En el ser humano los agentes más frecuentes de infección son *B. melitensis* en un 98% y en un 2% *B. abortus* (3).

Para el diagnóstico de la brucelosis humana, el método estándar es el aislamiento de la bacteria a partir de muestras de sangre o tejido, el cual requiere largos periodos de incubación y muy frecuentemente este proceso no es exitoso. El cultivo de médula ósea se considera el estándar de

oro para el diagnóstico, ya que la concentración relativamente alta de *Brucella* hace que sea más fácil detectarla. Además, muchos ensayos de PCR se han desarrollado para el diagnóstico como el PCR-AMOS o el PCR Bruce-Ladder (6). Sin embargo, las pruebas serológicas son las más frecuentemente usadas como un método de diagnóstico; la aglutinación con antígeno brucelar y rosa de bengala, la prueba de aglutinación lenta estándar (SAT) y fijación de complemento son de las pruebas más comunes para el diagnóstico (7,8)

Existen muchas similitudes entre la brucelosis humana y la animal, tales como la persistencia de la bacteria en los tejidos del sistema fagocítico mononuclear, incluyendo el bazo, el hígado, los ganglios linfáticos y la médula ósea. El período de incubación varía entre 1 y 5 semanas, y la infección por *Brucella* puede ser asintomática o sintomática. Los síntomas de la brucelosis son inespecíficos; la mayoría de los pacientes presentan fiebre elevada, dolor de cabeza, debilidad, sudor abundante, anorexia, escalofríos, pérdida de peso y malestar generalizado, las manifestaciones patológicas de la brucelosis en humanos son la meningitis, endocarditis, espondilitis y artritis (9).

En México la Brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica. En el periodo de 2007-2011 se registraron 12,214 casos de Brucelosis con un promedio anual de 2,443 casos en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1.7 por 100 000 habitantes y en el año 2011 se registraron 3,436 casos, con una incidencia de 3.1, lo anterior representa un incremento en la incidencia del 77% para el 2011 con respecto a 2007 (Figura 1). Se estima que entre un 20 y 60% de los casos se presentan complicaciones osteoarticulares y se observan afecciones genitourinarias entre 2 a un 20% de los casos. La tasa de letalidad sin tratamiento puede llegar a ser hasta del 2%, y por lo general esto como consecuencia de la endocarditis secundaria a infecciones por *B. melitensis* (3).

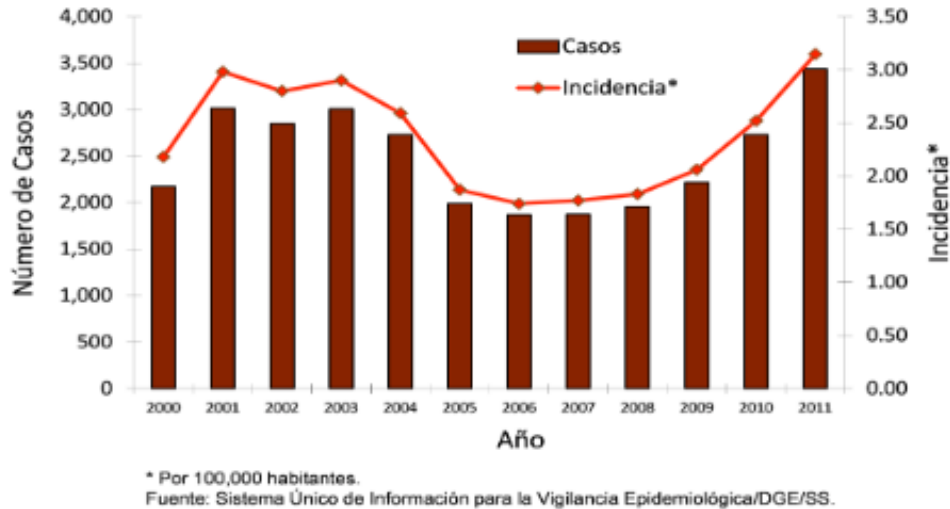


Figura 1: Incidencia de Brucelosis en México; Año 2000-2011.

2. Infección de *Brucella*

Brucella es capaz de entrar y replicarse eficientemente en diversas células, incluyendo, células epiteliales, trofoblastos, células dendríticas y macrófagos. Una vez que la bacteria es internalizada, esta es capaz de redireccionar el tráfico intracelular inhibiendo o retardando la fusión del fagosoma con el lisosoma y así evitar su degradación. El ambiente intracelular de las células del hospedero mantiene una reproducción bacteriana extensa, lo que permite la expansión de la bacteria y una transmisión subsecuente a nuevas células hospederas, el sitio blanco para la replicación de la bacteria dentro de la célula es el retículo endoplásmico (ER) (11, 12). El mecanismo específico que usa *Brucella* para dificultar la fusión con el lisosoma no ha sido claramente dilucidado. Se estima que un 90% de la bacteria internalizada por los macrófagos es eliminada y el resto logra alcanzar su nicho de replicación, sobrevivir y proliferar (12,13). La habilidad de *Brucella* de sobrevivir y replicarse dentro de la célula hospedera es en esencia la causa de la enfermedad. Adicionalmente, la sobrevivencia de *Brucella* dentro del macrófago se considera la causa del establecimiento de infecciones crónicas que permiten a la bacteria escapar de los mecanismos de defensa del hospedero (10).

Brucella para llevar a cabo una infección exitosa requiere 4 pasos: la adherencia a la célula hospedero, la invasión, el establecimiento y la diseminación.

2.1. Adherencia/Invasión:

Los mecanismos de entrada de *Brucella* a la célula hospedera siguen poco caracterizadas y algunos datos son contradictorios. Sin embargo, la interacción temprana entre *Brucella* y la célula hospedera

es decisiva para la sobrevivencia intracelular. En macrófagos y células epiteliales, la adhesión de *Brucella* parece ser mediada por receptores que contienen residuos de ácido siálico que interactúan con la proteína de superficie 41 de *Brucella* (SP41). De manera interesante, se ha visto que *Brucella* se une a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y vitronectina, lo que podría contribuir a la colonización en tejido (14).

La invasión de *Brucella* no induce cambios en la membrana de la célula hospedero, ni la activación o maduración de macrófagos o células dendríticas. En macrófagos las cepas lisas de *Brucella* pueden unirse a la membrana celular, ya sea por la vía clásica de los FcR (receptores de anticuerpo), por receptores de nectina y receptores scavenger así como por otras moléculas de receptor desconocidas. La bacteria es ingerida por fagocitosis zipper-like con la intervención de lipid rafts y el reclutamiento de filamentos de actina. De igual manera en células epiteliales, cepas lisas de *Brucella* se unen a sitios de la membrana y penetran sin inducir cambios notables en la membrana como pedestales, agujeros recubiertos, o espirales como ocurre con otras bacterias Gram-negativas (15). Tanto en células fagocíticas como no fagocíticas la entrada de *Brucella* depende del citoesqueleto de actina y parcialmente de la red de microtúbulos, además las GTPasas pequeñas Rho, Rac y Cdc42 son necesarias para la invasión, especialmente Cdc42, ya que esta es reclutada directamente y activada en el sitio de entrada (16).

2.2. Establecimiento

Una vez dentro de la célula, *Brucella* reside en una vacuola, la cual se le designa con el nombre de BCV (Vacuole containing- *Brucella*). Durante los primeros minutos después de la invasión, la BCV interactúa con compartimentos del endosoma temprano adquiriendo marcadores como EEA1 (Early endosomal antigen) y la proteína de unión a GTP, Rab5 (17). Progresivamente la BCV adquiere la proteína LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1) y después de 4 horas (post infección) permanece con este marcador, además se sugiere que la BCV no se une a compartimentos del endosoma tardío. Mientras la BCV va perdiendo la proteína LAMP1, adquiere marcadores del retículo endoplásmico (ER) como calreticulina, calnexina y la proteína Sec61. La presencia de ribosomas y la enzima glucosa 6-fosfatasa (presente en el lumen de ER) en el BCV, confirma la fusión con el ER (18,19). Después de la internalización, el BCV se acidifica a un pH de 4.0 a 4.5 esta acidificación es importante ya que, si esto no sucede, *Brucella* es incapaz de replicarse intracelularmente. La razón de esto es que el ambiente ácido provee una señal inductora para el sistema de secreción tipo 4 (T4SS VirB), un factor de virulencia crucial para la replicación intracelular

de *Brucella* en los macrófagos y las DCs (20). Se piensa que el T4SS VirB puede limitar el grado de fusión con el lisosoma o actuar para excluir marcadores del endosoma tardío a través de la liberación de efectores. Hasta ahora, seis substratos del T4SS han sido reportados, incluyendo los efectores coreguladores virB A y C (VceA y VceC) y cuatro efectores putativos de *Brucella* (BPEs) BPE123, BPE275, BPE005, BPE043. La mayoría de estos sustratos de T4SS contienen dominios eucarióticos-like, sugiriendo una interacción con las proteínas en el hospedero infectado, pero sus blancos intracelulares y su papel en la evasión de la degradación lisosomal siguen sin conocerse (21). Una vez que *Brucella* alcanza su nicho replicativo dentro del hospedero, ocurre una extensa replicación sin que se produzca mucha interrupción en la integridad celular del hospedero. El mecanismo que asegura que *Brucella* inicie la fusión con el ER permanece desconocido. Se sabe que el contacto inicial con el ER, se lleva a cabo en el sitio de salida de ER (ERES) donde la BCV interacciona con el complejo Sar1/COPII (Figura 2) (19).

2.3. Diseminación

Una vez que se alcanzan altos números de bacteria dentro de la célula hospedero no se sabe cómo la bacteria sale y se disemina a otras células. Una posible hipótesis señala que para evadir el sistema inmune y sobrevivir dentro del hospedero, muchas bacterias Gram-negativas tienen la habilidad de alterar la estructura del LPS, por ejemplo, la variación entre cepas lisas-rugosas (22). Esto sugiere que la diseminación célula-célula podría ser ocasionada por la inducción de muerte celular debido a la aparición espontánea de variantes rugosas a partir de *Brucella* lisa. Otra explicación posible es que la célula hospedero aloja una gran cantidad de bacterias hasta un punto donde esta se rompe y libera las bacterias produciendo una respuesta inflamatoria lo que ocasiona que lleguen más células al sitio de infección (23).

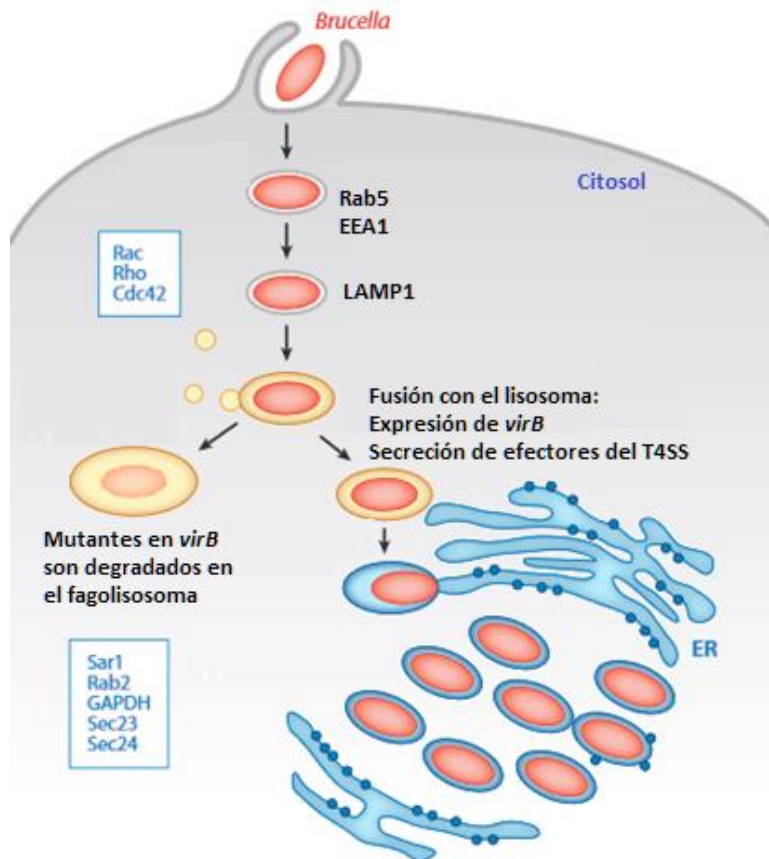


Figura 2: Tráfico intracelular de *Brucella* spp. en la célula hospedadora. Imagen modificada de Vidya L. Atluri et al. (2011)

3. Respuesta inmune contra brucelosis en humano

Tradicionalmente, la respuesta inmune del hospedero está dividida funcionalmente en inmunidad innata (no específica) e inmunidad adaptativa (específica). El sistema inmune innato está compuesto por: barreras anatómicas (como la piel y capas internas del epitelio), moléculas secretadas (quimiocinas, citocinas, sistema del complemento, opsoninas) células fagocíticas (neutrófilos, monocitos/macrófagos, células dendríticas) y células linfoides innatas (linfocitos NK, y linfocitos T $\gamma\delta$). En cuanto a la inmunidad adaptativa, esta comprende: linfocitos T, (involucrados en la producción de citocinas, y citotoxicidad) y los linfocitos B productores de anticuerpos (24). El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos y depende en gran medida de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs: TLRs, NLRs, CLRs, RLRs) presentes en una gran variedad de células (macrófagos, DCs, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos B, etc), que detectan estructuras evolutivamente conservadas en los patógenos, denominadas

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: lipopolisacáridos [LPS], peptidoglicanos, lipoproteínas, DNA). Tras la unión con los PAMP, los PRRs desencadenan cascadas de señalización intracelulares que culminan en la expresión de una variedad de moléculas, que en conjunto dirigen la respuesta del huésped y es un requisito previo para la subsecuente activación y la conformación de la inmunidad adaptativa. Los macrófagos y las células dendríticas son células fagocíticas que alertan a otras células del sistema inmune, entre estas células, algunas son capaces de responder inmediatamente como linfocitos NK, y linfocitos T $\gamma\delta$, para evitar el establecimiento de los parásitos dentro del hospedero. Los macrófagos, células dendríticas y los linfocitos B, representan las células profesionales presentadoras de antígeno (APCs), que tras la internalización del patógeno, procesan al patógeno y presentan péptidos antigénicos del patógeno, asociado a las moléculas principales de histocompatibilidad MHC-II y MHC-I, las cuales se unen y son reconocidos por el TCR (T cell-receptor) de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ (respectivamente) que desencadena una respuesta inmune adaptativa. A diferencia de otros tipos de linfocitos, los linfocitos T $\alpha\beta$, y los linfocitos B necesitan más tiempo para inducir una inmunidad adquirida o específica y sus repuestas puede llevar a diferentes vías (por ejemplo, la diferenciación Th1 versus Th2). La inmunidad adquirida depende directamente de señales inducidas durante la respuesta innata las cuales son más o menos eficientes dependiendo de la influencia de diferentes especies bacterianas (25,26)

Cabe resaltar que los mecanismos de la respuesta inmune contra la brucelosis pueden diferir de acuerdo al hospedero, la especie de *Brucella* o la cepa. Después de la infección con *Brucella* spp., los humanos generalmente tienen un periodo de latencia de 2 a 4 semanas antes que se presenten los síntomas de la brucelosis. (19).

Las células dendríticas de humano son susceptibles a la infección de *Brucella* y son un buen nicho para su replicación. *Brucella* es capaz de interferir en la fisiología de las células dendríticas, particularmente en el proceso de maduración. La baja activación y maduración de las células dendríticas infectadas por *Brucella* es caracterizada por un bajo número de MHC-II en la superficie celular, una baja expresión de moléculas coestimuladoras, y una baja secreción de citocinas proinflamatorias. Eventualmente estos eventos afectan la presentación de antígeno de las células dendríticas a los linfocitos T. Además, se ha observado que las células dendríticas de humano, infectadas con *Brucella* liberan bajas cantidades de IL-12 y TNF- α y no son activadas significativamente (27).

Estudios recientes demuestran que, durante la primera fase de la enfermedad, los linfocitos B, producen IL-10 y TGF- β los cuales atenúan la respuesta Th1 mediada por INF- γ y de esta manera se promueve la persistencia de la infección. Además se ha propuesto que el LPS de *Brucella* induce la expresión de IL-10 en células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) (28).

Durante la etapa aguda de la brucelosis en humanos, se encuentran activados tanto linfocitos T CD4+ como CD8+ y se desarrolla de manera predominante una respuesta inflamatoria, pero solo la población CD8+ persiste en pacientes con brucelosis crónica, además hay un incremento del receptor IL-2 en la superficie de linfocitos, así como un incremento moderado de IL-6, IL-8, INF- γ , pero no de IL-4 ni de TNF- α o IL-1 β (29, 30). Sin embargo, con la progresión de la infección la respuesta inmune cambia a una respuesta tipo Th2 induciendo una fuerte respuesta de anticuerpos e inhibiendo varias funciones de las células fagocíticas (31).

Se ha descrito que *Brucella* obstruye la producción de TNF- α en macrófagos humanos, además, en pacientes en etapas agudas de la infección se observa una disminución en la actividad citotóxica de los linfocitos NK, la cual no está relacionada a una disminución en el número de células. Se demostró *in vitro* que estas células matan a macrófagos infectados con *Brucella*, y se propone que juegan un papel importante en controlar el desarrollo intramacrofágico de la bacteria, y probablemente como una fuente de INF- γ (32, 33).

Se encontró que pacientes infectados con *B. melitensis* poseían un mayor número de linfocitos T $\gamma\delta$ en circulación, las cuales abaten el crecimiento intracelular de *Brucella* en macrófagos, a través de la secreción de citocinas, quimiocinas y por la actividad citolítica (34).

Aproximadamente entre un 10% y 30% de los pacientes con brucelosis desarrolla la enfermedad crónica. Pacientes con brucelosis crónica manifiestan una respuesta Th1 deficiente además de anergia en linfocitos T. Varios estudios clínicos han reportado que pacientes con brucelosis crónica presentan una disminución en la producción *in vitro* de IFN- γ e IL-2 en PBMCs, y una elevada producción de TGF- β en suero. De igual manera, la quimiotaxis y fagocitosis de células polimorfonucleares de humano en respuesta a antígenos de *Brucella* esta disminuida en pacientes con brucelosis, y también disminuye la proporción de linfocitos T CD4+ en periferia que expresa el receptor IL-2 en los reincidentes de brucelosis crónica. Además, en etapas de brucelosis crónica hay un decremento en los linfocitos CD4+ CD25+ y en CD4+ CD28+ comparado con la etapa aguda (19).

Las bacterias patógenas han desarrollado numerosas estrategias para liberar factores de virulencia hacia células eucariotas hospederas. Actualmente se ha demostrado que además de los nueve sistemas de secreción hasta ahora descritos, algunas bacterias pueden liberar vesículas de membrana externa (OMVs; por sus siglas en inglés) como un mecanismo de secreción de proteínas y otros componentes.

4. Vesículas de membrana externa (OMVs)

Las OMVs son partículas esféricas entre 20-250 nm de diámetro y son liberadas por bacterias Gram negativas de manera natural durante todas las fases de crecimiento, sin embargo, se demostró que en *E. coli*, *Vibrio cholerae*, y *B. melitensis* la producción máxima de vesículas es durante el final de la fase logarítmica de crecimiento (35). Se sabe que tanto bacterias patógenas como no patógenas secretan estas vesículas. Algunas de las bacterias en las cuales se ha descrito la secreción de OMVs son: *E. coli*, *Shigella* spp., *Neisseria* spp., *Bacteroides* spp.; *Pseudomonas aeruginosa*; *Helicobacter pylori*, *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Xenorhabdus* y *Borrelia burgdorferi*. Se ha observado la producción de OMVs en diversos ambientes: biofilms, superficies sólidas, ambientes fluidos, en ambientes intracelulares durante infecciones e incluso en tejidos de pacientes o animales infectados. Análisis bioquímicos y proteómicos han demostrado que las OMVs contienen una gran variedad de componentes bacterianos como DNA, RNA, lipopolisacárido (LPS), proteínas, enzimas, peptidoglicana y componentes periplásmicos (35, 36, 37).

La liberación de proteínas vía OMVs, ofrece varias ventajas sobre los otros mecanismos de secreción ya que la proteína localizada en el lumen de las vesículas no sufre degradación enzimática en el medio extracelular. En consecuencia, se ha pensado que las vesículas son capaces de transportarse distancias largas donde los antígenos de OMVs podrían dispersarse a sitios lejanos de la colonización como la orina, sangre y órganos (38).

4.1. Formación de las OMVs

Las OMVs son liberadas de la membrana externa (ME) por un proceso de extrusión o blebbing (proceso denominado para la formación y liberación de OMVs) al medio exterior. Es importante remarcar que el proceso por el cual las OMVs son liberadas de las bacterias Gram negativas no altera el arreglo natural de la membrana externa, manteniéndola intacta (39).

Se han propuesto tres modelos para poder explicar la formación de las OMVs.

Modelo 1: Este modelo se basa en que hay significativamente una cantidad menor de lipoproteínas en las OMVs. Las OMVs son formadas cuando la ME se expande más rápido que la capa de peptidoglicano. Esto ocasiona desuniones de los peptidoglicanos a la ME debido a la deficiencia de enlaces con lipoproteínas. Si el crecimiento asimétrico continúa, las áreas que no se encuentran unidas se abultan y son liberadas en forma de OMVs (39).

Modelo 2: Las OMVs se forman cuando los productos liberados por el recambio de la capa de peptidoglicano, no son eficientemente internalizados por la bacteria al citoplasma para ser degradados y reutilizados, lo que ocasiona que se acumule y genere un abultamiento local de la ME. El movimiento mecánico de la ME ocasiona la liberación de dichos productos en las OMVs (40).

Modelo 3: Se propuso un modelo de formación de OMVs basado en la repulsión de cargas ocasionadas por las cargas negativas del LPS B, lo que genera inestabilidad de la membrana y un abultamiento que daría inicio a la formación de OMVs. Las OMVs de *P. aeruginosa* contienen principalmente LPS de tipo B que posee una carga neta negativa, lo que ocasiona la formación de las OMVs, en lugar del tipo A que posee una carga neutra. Además, en cepas de *Salmonella* y *P. aeruginosa*, con un LPS incompleto hay una mayor producción de OMVs (41).

4.2. Funciones de las OMVs

Se propone que las OMVs confieren ventajas a las bacterias parentales tanto en las funciones fisiológicas como patológicas, ya que se ha observado que participan en la transferencia de DNA, en la competencia entre bacterias, modulando la respuesta inmune del hospedero y facilitando la sobrevivencia de la bacteria durante condiciones de estrés (42).

4.2.1. OMV en la interacción bacteria-bacteria

Las bacterias pueden usar sus vesículas de membrana externa para interactuar con bacterias vecinas y por lo tanto modular el ambiente microbiano y a las bacterias en sí. Dicha interacción permite incrementar la diversidad genética de las bacterias a través de la transferencia horizontal de genes. Además, las OMVs pueden actuar de diversas maneras en la interacción bacteria-bacteria como en la formación de biofilms, en el quorum sensing, y en la competencia entre bacterias. Se reportó que *P. aeruginosa* usa sus OMVs para transportar moléculas de quorum sensing. Además, las OMVs contribuyen a la formación de biofilms al actuar como sitios de nucleación. Con respecto a la competencia entre bacterias se ha reportado que las OMVs pueden matar otras bacterias, como es el caso de *P. aeruginosa* que libera OMVs que contienen murein hidrolasas que degradan los peptidoglicanos de la pared celular matando tanto bacterias Gram negativas como Gram-positivas

(43). Por otro lado, *Lysobacter sp.* libera OMVs con endopeptidasas que lisan a otras bacterias Gram negativas (40). Las OMVs pueden ayudar en la sobrevivencia de las bacterias, un ejemplo de ello son las OMVs de *P. aeruginosa* que contienen β -lactamasa, que interviene en la supervivencia transitoria de las bacterias vecinas susceptibles a los antibióticos (44).

4.2.2. OMVs en la interacción bacteria-hospedero

Se ha demostrado que las OMVs interaccionan con células del hospedero como células epiteliales, células del sistema inmune (neutrófilos, células dendríticas y macrófagos) y con células distantes a los sitios posibles de infección como células endoteliales, plaquetas, y osteoblastos. La interacción bacteria-hospedero mediada por las OMVs podría resultar en varias respuestas, desde respuestas no inmunogénicas, hasta el desarrollo de respuesta proinflamatorias o de citotoxicidad, dependiendo del tipo de célula blanco, la especie de la bacteria y la cantidad de vesículas (45).

Basados en el papel de las OMVs como vehículos de entrega de factores de virulencia o moduladores de la respuesta inmune, estudios in vitro han demostrado la asociación de adhesinas en las OMVs, involucradas en la adherencia de las vesículas a la célula hospedero. Potencialmente, las OMVs pueden unirse a células epiteliales y completar la internalización entre la bacteria y las células de mamíferos.

Las OMVs internalizadas podrían iniciar cambios en la expresión de receptores de superficie en las células epiteliales para aumentar la habilidad de unión de la bacteria a la célula blanco (46).

Las OMVs presentan varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) como LPS y porinas, por lo tanto, las OMVs podrían inducir fuertes repuestas inflamatorias al reconocerse estos PAMPS por los PRRs. (45). Además de desarrollar una respuesta pro-inflamatoria se ha reportado que las OMVs modulan la respuesta inmune al iniciar respuestas inflamatorias, las cuales reclutan células al sitio de infección, y posteriormente limitando dicha inflamación, disminuyendo la capacidad del hospedero para eliminar al patógeno y favoreciendo la sobrevivencia de este. Tal es el caso de *Pophyromonas gingivalis*, que empaqueta factores de virulencia en las OMVs llamados "gingipains", proteasas que degradan citocinas a fin de desregular la inflamación y respuesta inmune del hospedero (47)

Las OMVs usan múltiples mecanismos para entrar a las células hospederas, los cuales puedan estar regulados por el tamaño y la heterogeneidad del contenido de las OMVs, el modo de entrada de las OMVs en células no fagocíticas mas reportado involucra lipid rafts. Algunos ejemplos de OMVs de

patógenos que se sabe entran a células epiteliales vía lipid rafts son: *Haemophilus influenzae* (48), *P. aeruginosa* (49), *Porphyromonas gingivalis* y *C. jejuni* (50). Por otro lado, la entrada a las células del hospedero también puede ser independiente de lipid rafts, como las OMVs de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que entran a las células epiteliales usando endocitosis dependiente de dinamina y las OMVs de *H. pylori* pueden endocitarse en células epiteliales gástricas por una vía dependiente de clatrin (51).

4.3. Interacción entre OMVs y células del sistema inmune

En cuanto a las interacciones entre las OMVs y células del sistema inmune se ha descrito que las OMVs pueden modular de diversas maneras la función de los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y linfocitos, esto dependiendo de su origen bacteriano y su composición en sus determinantes de virulencia; por ejemplo la estimulación de neutrófilos humanos con OMVs de *N. meningitidis* resulta en la producción de TNF e IL-1B y en el aumento en la expresión de CXCL8, CCL3, y CCL4 (52). Por otro lado OMVs de *E. coli* uropatógena, que contienen la toxina CNF1 (factor citotóxico necrotizante) impiden la fagocitosis de los neutrófilos (53).

Se ha demostrado que algunas OMVs inducen NETs (trampas extracelulares de neutrófilos) como las OMVs de *N. meningitidis*, sin embargo, la formación de nets por los neutrófilos inducida por las OMVs de *N. meningitidis* facilita la colonización bacteriana (54), y la estimulación de monocitos y macrófagos con OMVs de *N. meningitidis* inducen la producción de CCL2, CCL3 y Rantes, CXCL8, IL-1B, IL-6, IL-10, TNF, así como también aumentan la expresión de HLA-DR y las moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y las moléculas de adhesión como ICAM en macrófagos (55). De manera similar las OMVs de *H. pylori* promueven la producción de IL-6 por PBMCs (human peripheral blood mononuclear cells) (56).

En células dendríticas, OMVs de *Salmonella spp.* inducen la expresión de moléculas como CD86 y MHC de clase II y la producción de TNF y IL-12, además de promover el desarrollo de una respuesta protectora de linfocitos B y T (57). De manera similar, OMVs de *N. meningitidis* inducen la maduración de DCs caracterizada por el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, MHC de clase II y la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (58).

Además de inducir un efecto proinflamatorio, las OMVs pueden inducir un perfil antiinflamatorio que beneficie al patógeno de origen o que promueva infecciones bacterianas secundarias. Por ejemplo OMVs de *H. pylori* inducen la producción IL-10 una citocina inmunosupresora que limita la inflamación y facilita la sobrevivencia bacteriana (56). Por otro lado, OMVs de *P. gingivalis* facilitan

la pérdida de la expresión de CD14 en macrófagos, convirtiendo a estas células incapaces de responder a la señalización de TLR4 inducida por la estimulación secundaria de LPS de *E. coli* (59).

En cuanto a la interacción de OMVs con linfocitos B, se ha visto que la inmunización con OMVs genera fuertes respuestas de anticuerpos específicos IgG e IgA en el suero o en los compartimentos de la mucosa (60, 61). Por otro lado, algunas evidencias sugieren que las OMVs pueden suprimir la respuesta de los linfocitos T, por ejemplo OMVs de *H. pylori* suprimen la respuesta de estas células al inducir apoptosis mediante la vía de las caspasas (56). De manera similar, las proteínas OPA presentes en las OMVs de *N. meningitidis* inhiben la activación de linfocitos T y la proliferación para crear una zona de inmunosupresión en el sitio de infección (62).

4.4. OMVs como posibles vacunas

Las OMVs tienen muchas propiedades intrínsecas que las hacen atractivas como candidatos para vacunas debido a que son altamente estables cuando se exponen a diferentes temperaturas y tratamientos, no se auto replican y contienen muchos componentes inmunogénicos de la bacteria parental asociados a la superficie de la membrana (63,64). La habilidad de las OMVs de activar el sistema inmune innato, provee a estas nanopartículas su propia actividad "adyuvante", capaces de aumentar la respuesta de células T y de anticuerpos (65). Al mismo tiempo las OMVs, son muy versátiles debido a que pueden ser modificadas para que en ellas se expresen antígenos de interés y pueden ser manipuladas para reducir el efecto tóxico o pirógeno del LPS (endotoxicidad) (66). Se ha visto que las OMVs pueden inducir una respuesta inmune protectora con la producción de anticuerpos IgG e IgA cuando son inoculados intramuscular e intranasal. Recientemente, las OMVs de *N. meningitidis* se han aplicado en la preparación de vacunas para humanos y son capaces de proteger contra infecciones de meningococo del grupo B (67).

Antecedentes

Se ha demostrado que las vesículas de membrana externa (OMVs) liberadas por algunas bacterias Gram-negativas ejercen efectos inmunomoduladores que favorecen el establecimiento de la infección. Pollak y colaboradores, evaluaron la interacción de OMVs de *B. abortus* con células epiteliales (HeLa) y monocitos humanos (THP-1), ellos demostraron que las OMVs marcadas con FITC se internalizaban por endocitosis mediada por clatrina por ambos tipos de células. Además, se observó una disminución significativa en la producción de TNF- α e IL-8 mediado por la estimulación de TLRs con diversos ligandos, incluyendo LPS de *E. coli*, Pam3Cys y flagelina-33 (agonistas de TLR1-TLR2 y TLR5, respectivamente) en células THP-1 pre-incubadas previamente con OMVs de una cepa virulenta de *B. abortus* (68).

Antecedente directo

Avila C. y col. en 2012 demostraron que OMVs purificadas de *B. melitensis* de dos cepas, una silvestre (16M) y otra mutante (VTRM1), inducían altos niveles de expresión de IL-12, TNF- α , y de INF- γ en células dendríticas de la médula ósea de ratón. Además en comparación con el grupo control, los ratones inmunizados intramuscularmente con dichas OMVs fueron protegidos ante el reto con la cepa virulenta *B. melitensis* 16M (69).

Justificación

Actualmente se está estudiando el papel que desempeñan las OMVs de bacterias patógenas en la interacción con las células eucariotas. Por lo tanto, consideramos relevante conocer el tipo de respuesta que las OMVs de *B. melitensis* son capaces de generar en células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs), lo cual ayudará a entender parte de los mecanismos de cómo estas estructuras participan en la infección.

Pregunta de investigación

La interacción entre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con OMVs de *B. melitensis*:

- ¿Induce daño celular?
- ¿Provoca cambios en la expresión de moléculas de activación o en las moléculas de inhibición?
- ¿Se induce la producción de citocinas de respuesta Th1/Th2/Th17?
- ¿Provoca cambios en la morfología de las células, especialmente en la estructura del citoesqueleto?

Objetivo

Evaluar si la interacción in vitro de OMVs de *B. melitensis* con PBMCs humanos induce cambios en la viabilidad celular, en la expresión de marcadores de activación e inhibición, en la secreción de citocinas, morfología celular, así como cambios en el citoesqueleto.

Objetivos particulares

En PBMCs de sujetos sanos estimulados con OMVs de dos cepas de *B. melitensis* (16M y VTRM1), utilizando microscopía y citometría de flujo multiparamétrica:

1. Analizar la viabilidad celular
2. Analizar la expresión de las moléculas de activación (CD69, CD86) e inhibición (PD-1, PD-L1).
3. Cuantificar la concentración de citocinas (IL-17, TNF- α , INF- γ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2) en el sobrenadante del cultivo de PBMCs
4. Evaluar posibles cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina
5. Analizar daño al DNA y/o apoptosis

Metodología

1. Viabilidad

Se estimularon las PBMCs durante 24 horas con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 µg/mL) de OMVs de dos cepas de *B. melitensis*, una cepa silvestre (16M) y una cepa mutante (VTRM1: carente de antígeno O del LPS) y se realizó un ensayo de viabilidad por citometría de flujo utilizando Fixable viability dye eFluor 450 (eBiosciencie).

2. Expresión de moléculas de activación e inhibición en PBMCs

Se obtuvo sangre de sujetos sanos en tubos con heparina y se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por medio de gradiente de ficoll, posteriormente se cultivaron 1×10^6 células en placas de 24 pozos con medio RPMI suplementado y se les incubó por 12, 24 y 48 horas con las OMVs de las cepas 16M y VTRM1 de *B. melitensis* (1, 10 y 25 µg/mL). Como control positivo se utilizó fitohemaglutinina (PHA) (5 µg/mL) y OMVs de *Aeromonas hydrophila* (10 µg/mL) y como control negativo se incubaron células sólo en medio de cultivo, sin estimular (SE). Los estímulos se realizaron por 12, 24 y 48 horas, una vez pasado dicho tiempo, se realizó tinción multiparamétrica con anticuerpos para identificar a los linfocitos T (anti-CD3), linfocitos B (anti-CD19) y monocitos (anti-CD91) y para evaluar la expresión de moléculas de activación (anti-CD69 y anti-CD86) y moléculas de inhibición (anti-PD1 y anti-PDL1), y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo LRSFortessa (BD). Se adquirieron 30,000 eventos que fueron analizados con el software FlowJo v.10.

OMVs como inmunoreguladores: Las células se estimularon ya sea con PHA o OMVs de *B. melitensis* durante 12 horas y posteriormente se co-cultivaron con OMVs y/o PHA, respectivamente durante 24 horas y se procedió a realizar la tinción multiparamétrica antes mencionada para las moléculas de activación e inhibición.

3. Ensayo de CBA

Se analizó la concentración de citocinas en el sobrenadante de las células estimuladas con las condiciones antes mencionadas al tiempo de 24 horas con el BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit

4. Cambios en el citoesqueleto de actina y tubulina

Las células se cultivaron durante 24, 12, 6 y 2 horas con 25 µg/mL de OMVs de *B. melitensis*, posteriormente, se adhirieron las células en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se fijaron con

PFA al 1%, se permeabilizaron (Tritón 0.5%) y se tiñeron con el colorante Faloidina Rhodaminada para marcar el citoesqueleto de actina, y se utilizó un anticuerpo anti-tubulina para teñir el citoesqueleto de tubulina. Las tinciones se analizaron en el microscopio confocal leica.

5. Daño al DNA y/o apoptosis:

Las PBMC se estimularon con las OMVs de las cepas 16M y VTRM1 de *B. melitensis* (1, 10 y 25 µg/mL) como control positivo se utilizó CCCP (5 µg/mL) y OMVs de *Aeromonas hydrophila* (10 µg/mL) y como control negativo se dejaron células sin estimular (SE) durante 24 horas; posteriormente se realizó tinción con anticuerpos anti-pH2AX (pS139) los cuales identifican a la molécula H2AX fosforilada, la cual recluta y localiza proteínas de reparación del ADN a los sitios dañados de ADN promoviendo la reparación al ADN. También se utilizaron anticuerpos anti PARP (Asp124) (poli [ADP-ribosa] de la polimerasa), ya que durante la apoptosis la caspasa-3 escinde PARP que resulta en su inactivación y en la incapacidad de las células para reparar el daño al ADN.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio del programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc ©2013) versión 5.1, una vez que los datos pasaron las pruebas de normalidad se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con una prueba posterior de Tukey con una P mínima de 0.001 y P máxima de 0.05

Resultados

Viabilidad de las células estimuladas con OMVs de *Brucella melitensis*

El primer acercamiento que se realizó para estudiar los posibles efectos que las OMVs podrían producir en las PBMCs fue detectar si las OMVs tenían efecto citotóxico en las células. Se observó que el estímulo de OMVs de la cepa mutante no tienen efecto citotóxico sobre las células ya que los porcentajes de células vivas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $97.3 \pm 0.6 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $96.9 \pm 0.4 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $96.1 \pm 0.8 \%$) son similares a los porcentajes de las células sin estimular ($97.5 \pm 0.7\%$). Con el estímulo de OMVs de la cepa silvestre, los porcentajes de células vivas decrecen conforme aumenta la concentración de OMVs, sin embargo, los porcentajes de células vivas se mantienen altos. (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $97.3 \pm 0.9 \%$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $95.5 \pm 1.2 \%$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $93.1 \pm 1.6 \%$). Con el estímulo de PHA ($88.8 \pm 3.4 \%$) se observa un mayor porcentaje de células muertas, este cambio es significativo con respecto a las células sin estimular.

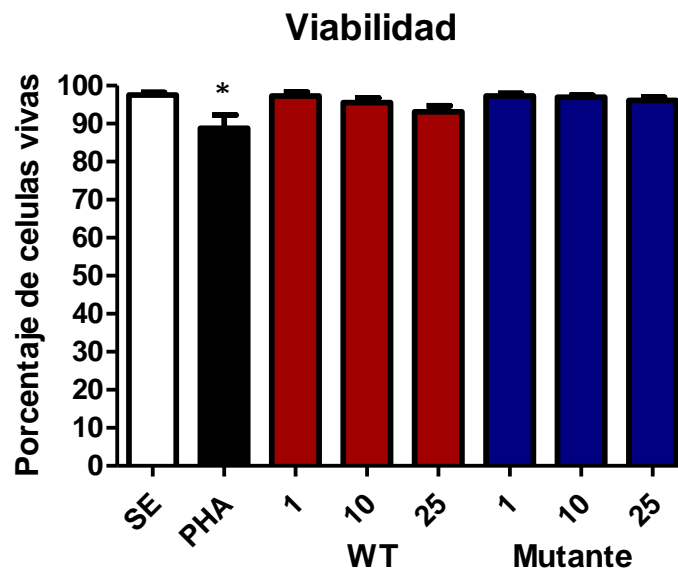


Figura 3: **Porcentaje PBMCs viables.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); por 24 h . Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Expresión de las moléculas de activación e inhibición.

El porcentaje de linfocitos T que expresaron la molécula CD69 en las células sin estimular al tiempo de 12 horas fue de $4.2 \pm 0.3 \%$, sin embargo no hubo diferencias significativas con los porcentajes de linfocitos T CD69+ en las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la cepa silvestre 16M ($4.9 \pm 2.0 \%$, $7.8 \pm 4.7 \%$, $8.5 \pm 4.6 \%$, respectivamente) con respecto a las células sin estimular; dichos porcentajes son similares cuando las células se estimularon con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa mutante VTRM1 ($4.1 \pm 1.4 \%$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $6.0 \pm 2.9 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $9.3 \pm 4.8 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células estimuladas con PHA y OMVs de *A. hydrophila*, mostraron un mayor porcentaje de linfocitos T que expresaron la molécula CD69 comparado con las células que fueron estimuladas con OMVs, ($69.17 \pm 1.8 \%$ y $17.7 \pm 4.8 \%$, respectivamente) (Figura 4 a).

A las 24 horas, las células sin estimular, presentaron un porcentaje de $5.3 \pm 1.4 \%$ de linfocitos T CD69+. No hubo cambios significativos al comparar dicho porcentaje con las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M, ($7.5 \pm 2.1 \%$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $9.2 \pm 3.7 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $9.3 \pm 3.0 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De igual manera, tampoco hubo cambios significativos al comparar con las células estimuladas a las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa mutante VTRM1 ($4.4 \pm 0.9 \%$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $9.1 \pm 4.7 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $12.0 \pm 5.8 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Con los estímulos de PHA y OMVs de *A. hydrophila* el porcentaje de linfocitos T que expresaron la molécula CD69 fue mayor comparado con las células estimuladas con OMVs de *B. melitensis*, dichos porcentajes fueron $71.8 \pm 5.8 \%$ y $21.8 \pm 3.4 \%$, respectivamente (Figura 4 b).

A las 48 horas se observó que el porcentaje de linfocitos T positivos para CD69 en las células estimuladas con OMVs de la cepa silvestre 16M fueron $8.2 \pm 5.0 \%$, $9.6 \pm 5.5 \%$, 11.04 ± 5.7 , a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMVs respectivamente, y los porcentajes para las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron $7.8 \pm 3.9 \%$, 9.1 ± 4.6 y $11.1 \pm 6.7 \%$; observamos que no hay cambios significativos entre los porcentaje de Linfocitos T CD69+ estimulados con OMVs (ni de la cepa mutante ni de la silvestre) comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($5.3 \pm 1.7 \%$) (Figura 4 c). Dichos resultados nos muestran que OMVs de las dos cepas, no inducen cambios en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD69+ comparado con las células sin estimular, esto a las concentraciones usadas y a los tiempos analizados.

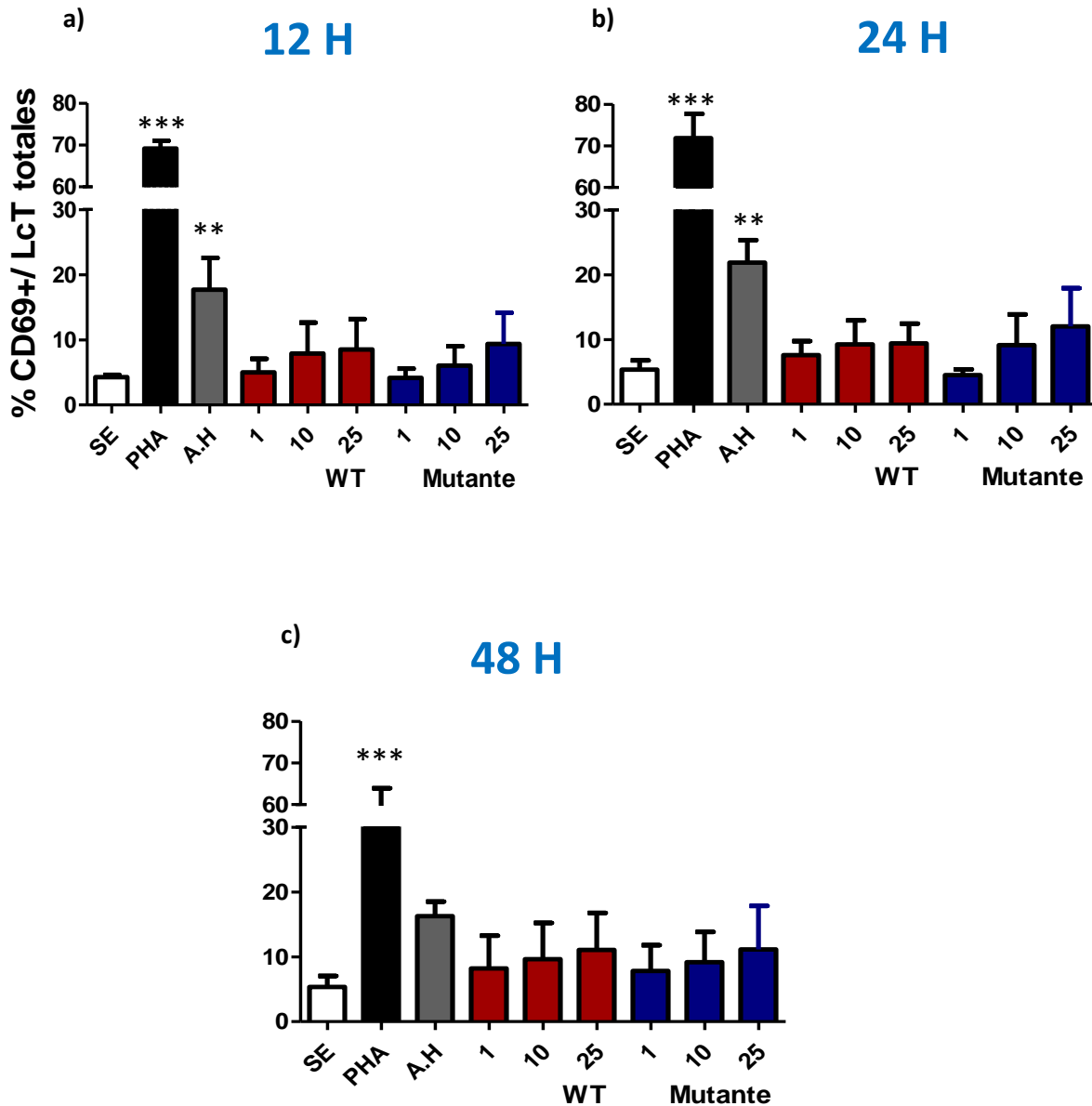


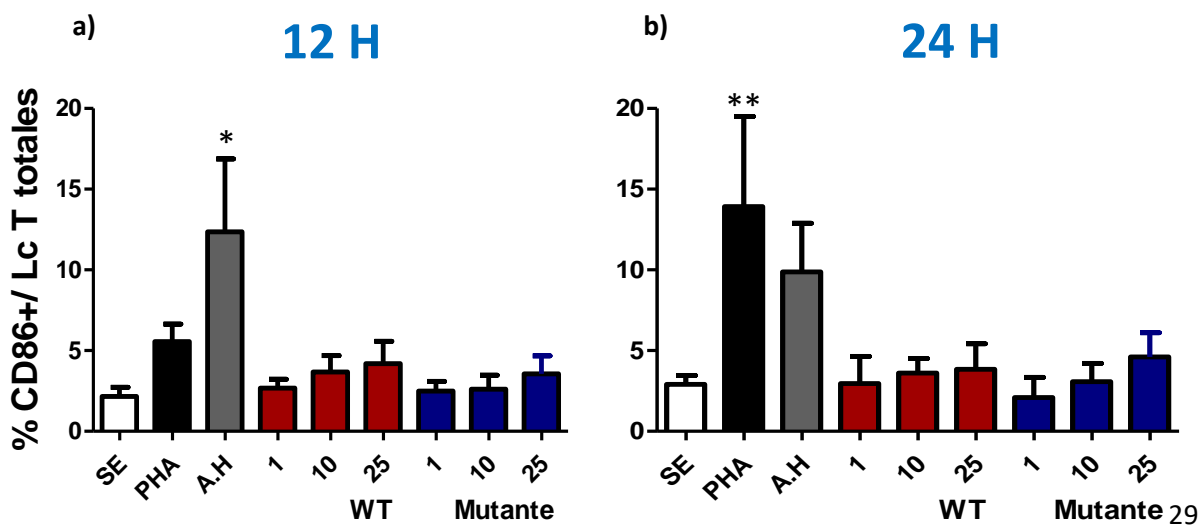
Figura 4: Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de activación CD69. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T que expresaron la molécula de activación CD86 en las células sin estimular fue de $2.1 \pm 0.5 \%$, al tiempo de 12 horas, mientras que los porcentajes de linfocitos T que expresaron dicha molécula en las células estimuladas con OMVs de la cepa silvestre, fueron, $2.6 \pm 0.5 \%$, $3.6 \pm 1.0 \%$, $4.1 \pm 1.3 \%$ a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

respectivamente; y los porcentajes de linfocitos T CD86+ en las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron de $2.4 \pm 0.5 \%$, $2.6 \pm 0.8 \%$, y $3.5 \pm 1.1 \%$. Dichos resultados muestran que, con respecto a las células sin estimular, no hay diferencias significativas cuando las células son estimuladas con OMVs de cualquiera de las dos cepas. Con los estímulos de PHA y OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes de linfocitos T que expresaron CD86 fueron, $5.5 \pm 1.0 \%$ y $12.3 \pm 4.5 \%$, respectivamente (Figura 5 a).

La expresión en la superficie de los linfocitos T de la molécula CD86 a las 24 horas con los estímulos de las vesículas de *B. melitensis* tuvo los siguientes resultados: para la cepa silvestre 16M $2.9 \pm 1.6 \%$ ($1 \mu\text{g/mL}$), $3.6 \pm 0.9 \%$ ($10 \mu\text{g/mL}$) y $3.8 \pm 1.5 \%$ ($25 \mu\text{g/mL}$) y para la cepa mutante VTRM1, $2.1 \pm 1.2 \%$ ($1 \mu\text{g/mL}$), $3.0 \pm 1.1 \%$ ($10 \mu\text{g/mL}$), $4.6 \pm 1.4 \%$ ($25 \mu\text{g/mL}$). Las células sin estimular presentaron un porcentaje de linfocitos T que expresaron la molécula CD86 de $2.9 \pm 0.5 \%$, y las estimuladas con PHA y OMVs de *A. hydrophila* fueron, $13.9 \pm 5.5 \%$ y $9.8 \pm 3.0 \%$, respectivamente. Se observa que no hubo cambios significativos en los porcentajes de linfocitos T CD86+, con los estímulos de OMVs con respecto al control negativo (Figura 5 b).

A las 48 horas observamos que no hay cambios significativos entre los porcentajes de Linfocitos T CD86+ estimulados con las OMVs (ni de la cepa mutante ni de la silvestre) comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($2.2 \pm 0.2 \%$) (Figura 5 c). Estos resultados nos muestran que el estímulo de las vesículas de *B. melitensis* no induce cambios en la expresión de la molécula de activación CD86 en linfocitos T, dicha expresión se mantiene similar a las células sin estimular, y este efecto se observa a los diferentes tiempos evaluados.



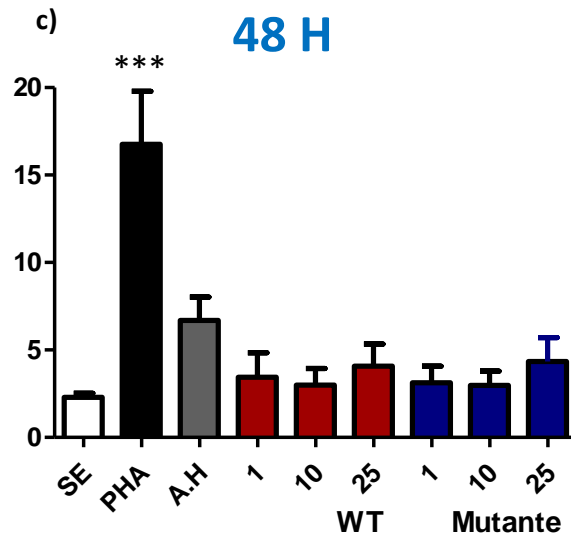


Figura 5: **Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de activación CD86.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Con respecto a los linfocitos B que expresaron a la molécula CD69, al tiempo de 12 horas, el porcentaje de las células sin estimular fue de $20.5 \pm 4.2 \%$ mientras que el porcentaje cuando las células eran estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16 M, a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fueron $43.27 \pm 9.0 \%$ y $45.1 \pm 11.3 \%$, respectivamente, dos veces más comparado con las células sin estimular. Los porcentajes de las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron $25.2 \pm 5.1 \%$, $29.2 \pm 7.2 \%$, y $39.7 \pm 7.0 \%$ respectivamente y no hubo cambios significativos con respecto a las células sin estimular. Las células estimuladas con PHA y las OMVs de *A. hydrophila*, mostraron un mayor porcentaje de linfocitos B CD69+ comparado con las células sin estimular ($64.1 \pm 2.6 \%$ y $53.7 \pm 9.6 \%$, respectivamente) (Figura 6, a).

A las 24 horas, las células sin estimular, presentaron un porcentaje de $14.0 \pm 2.2 \%$ de linfocitos B CD69+. Al comparar dicho porcentaje con los porcentajes de linfocitos B CD69+ de las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M ($29.1 \pm 13.1 \%$, $29.4 \pm 6.9 \%$, $37.4 \pm 5.2 \%$) se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos, pero sí una tendencia a ser mayores. Tampoco hubo cambios significativos al comparar las células estimuladas con la cepa mutante VTRM1 ($17.57 \pm 3.9 \%$, $21.9 \pm 5.8 \%$, $30.4 \pm 5.9 \%$). En cambio, con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* el porcentaje fue significativamente mayor comparado con las células sin estimular, dichos porcentajes fueron, $77.2 \pm 2.8 \%$ y $70.0 \pm 3.2 \%$, respectivamente (Figura 6 b).

A las 48 horas se observó que el porcentaje de linfocitos B CD69+ en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16M fue $22.3 \pm 0.9 \%$, $33.1 \pm 8.2 \%$, 45.4 ± 8.2 , a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMVs, respectivamente. Por otro lado, los porcentajes para las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron $19.37 \pm 0.7 \%$, 28.5 ± 4.6 y $35.6 \pm 8.4 \%$; observamos que hubo una tendencia a ser mayor el porcentaje de linfocitos B CD69+ con los estímulos de las OMVs de las dos cepas, pero solo el estímulo con las OMVs de la cepa silvestre a la mayor concentración fue significativo comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($14.9 \pm 1.3 \%$) (Figura 6 c).

Dichos resultados nos muestran que hay una tendencia a ser mayor el porcentaje de los linfocitos B CD69+ principalmente con el estímulo de las vesículas la cepa silvestre (16M) a los diferentes tiempos y este efecto parece ser directamente proporcional a la concentración de OMVs.

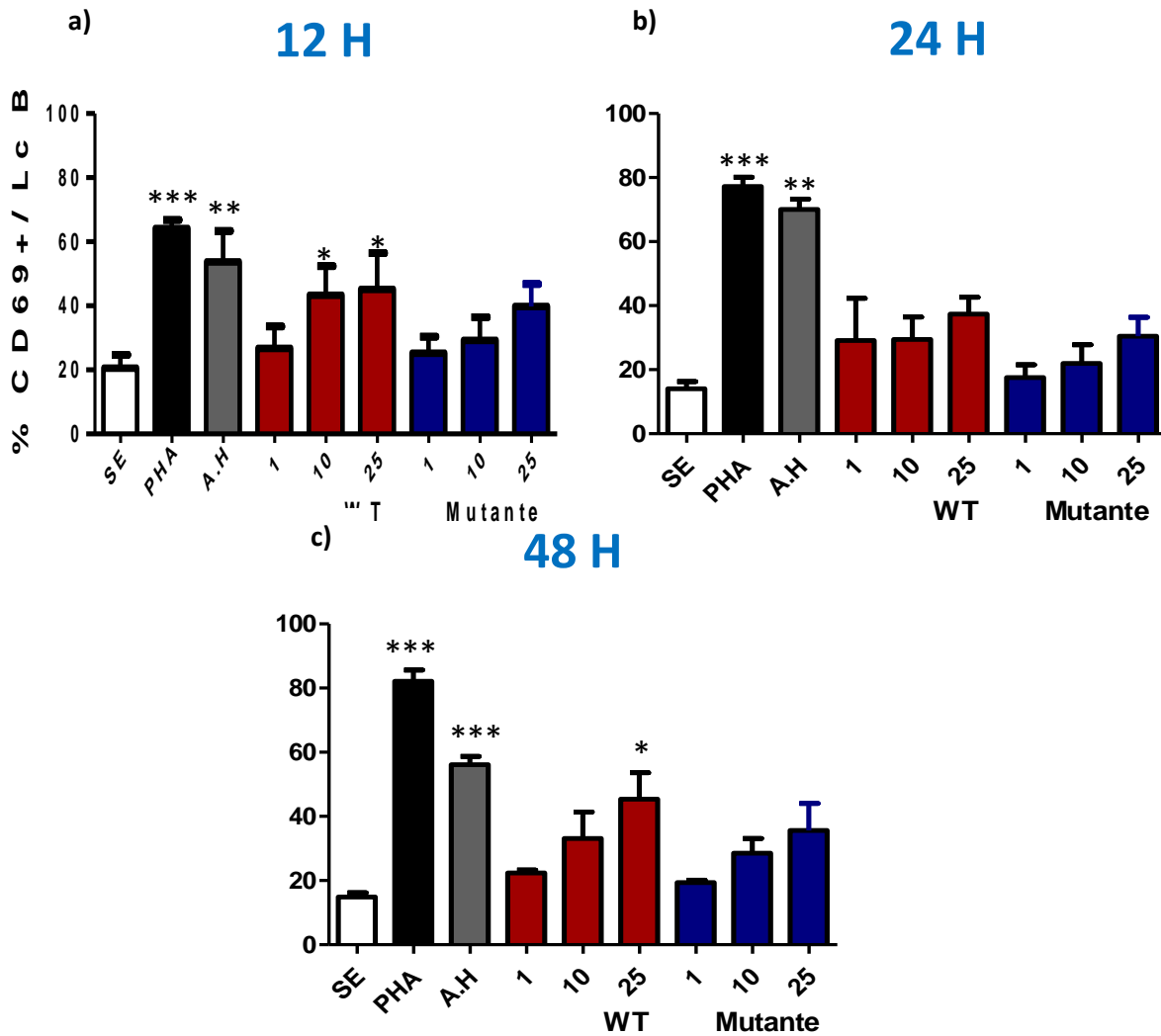


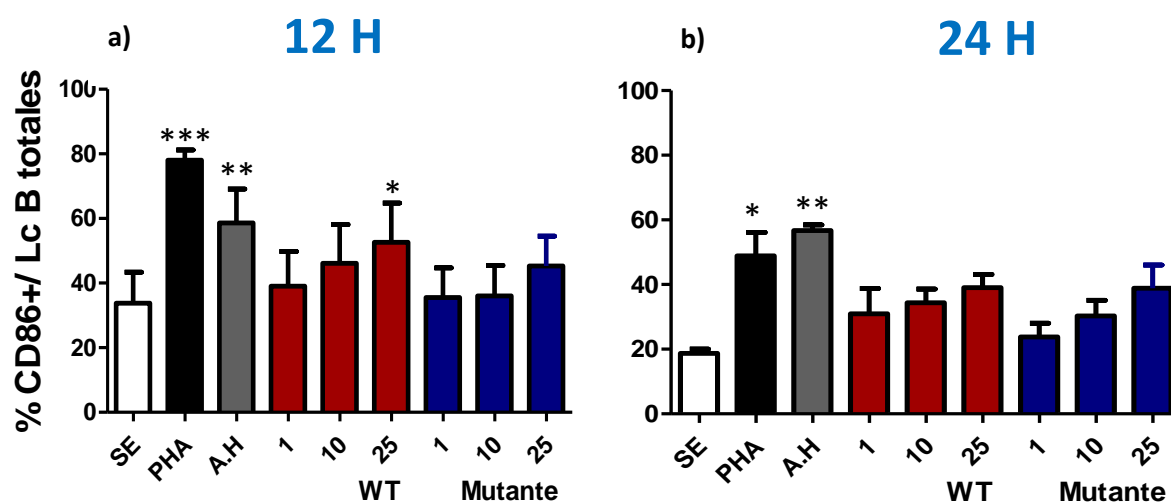
Figura 6: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de activación CD69. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a) 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes.

El porcentaje de linfocitos B que expresaron la molécula de activación CD86 en las células sin estimular fue de $33.8 \pm 9.5\%$, al tiempo de 12 horas, mientras que los porcentajes de expresión de dicha molécula en las células que se estimularon con las OMVs de la cepa silvestre 16M fueron de, $39.0 \pm 10.9\%$, $46.1 \pm 12.0\%$, $52.6 \pm 12.1\%$ (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente), de los cuales solo fue significativamente mayor la expresión del marcador CD86 con la concentración más alta. Los porcentajes de los linfocitos B CD86+ en las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron de $35.5 \pm 9.24\%$, $36.0 \pm 9.4\%$, y $45.2 \pm 9.2\%$ (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente).

Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* el porcentaje fue de $78.0 \pm 3.1\%$ y $58.6 \pm 10.4\%$ (Figura 7 a).

Al tiempo de 24 horas, los estímulos de las vesículas de *B. melitensis* presentaron los siguientes porcentajes de linfocitos B CD86+: los estímulos con la cepa silvestre 16M fueron, $30.9 \pm 7.8\%$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $34.4 \pm 4.2\%$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y $39.03 \pm 4.0\%$ (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y para la cepa mutante VTRM1, $23.8 \pm 4.2\%$ (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $30.3 \pm 4.7\%$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $38.8 \pm 7.1\%$ (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células sin estimular presentaron un porcentaje de $18.7 \pm 1.2\%$, y las estimuladas con PHA y OMVs de *A. hydrophila* fueron, $48.8 \pm 7.2\%$ y $56.7 \pm 1.7\%$, respectivamente (Figura 7 b). Se observó que no hubo cambios significativos en los porcentajes de linfocitos B CD86+, con los estímulos de OMVs con respecto al control negativo.

A las 48 horas observamos que hubo una ligera tendencia a ser mayor el porcentaje de linfocitos B CD86+ con los estímulos de las OMVs de ambas cepas, siendo significativos solo a la concentración de 10 ($60.7 \pm 6.0\%$) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($68.3 \pm 4.5\%$) con las OMVs de la cepa silvestre (16M), y con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($61.1 \pm 3.3\%$) para la cepa mutante (VTRM1) fue significativo comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($36.10 \pm 6.4\%$) (Figura 7 c).



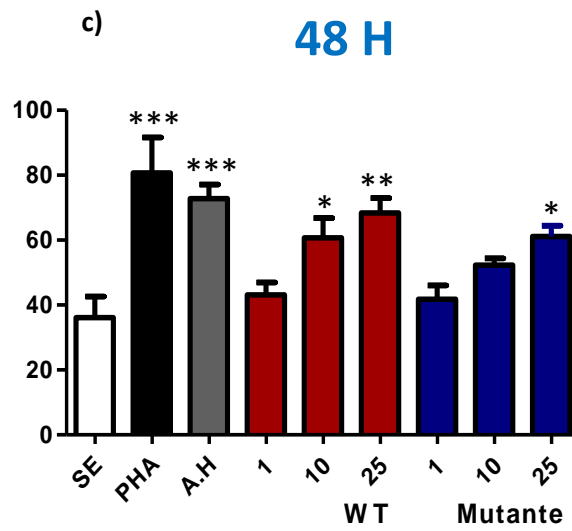


Figura 7: **Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de activación CD86.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a) , 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Con respecto a los monocitos que expresaron la molécula CD69 en las células sin estimular, el porcentaje fue $47.9 \pm 7.3 \%$, al tiempo de 12 horas, y no hubo diferencias significativas con los porcentajes de monocitos CD69+ en las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M y de la cepa mutante VTRM1. Las células estimuladas con PHA y las OMVs de *A. hydrophila*, mostraron porcentaje de, $86.5 \pm 9.1 \%$ y $72.0 \pm 9.5 \%$, respectivamente (Figura 8 a).

A las 24 horas, las células sin estimular, presentaron un porcentaje de $43.7 \pm 8.9 \%$ de monocitos CD69+. No hubo cambios significativos al comparar dicho porcentaje con las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M, donde los porcentajes fueron de $57.1 \pm 11.8 \%$, $48.6 \pm 8.9 \%$, $37.5 \pm 2.6 \%$. De igual manera, tampoco hubo cambios significativos al comparar con las células estimuladas con la cepa mutante VTRM1 ($50.5 \pm 5.2 \%$, $47.03 \pm 4.7 \%$, $43.1 \pm 5.9 \%$). Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes fueron $86.2 \pm 9.8 \%$ y $21.8 \pm 3.4 \%$, respectivamente, a las 24 h (Figura 8 b).

De igual modo no se observaron cambios en la expresión de CD69 en las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de ambas cepas a las 48 h (Figura 8 c).

Dichos resultados muestran que las OMVs de *B. melitensis* de las dos cepas, no inducen cambios en cuanto al porcentaje de monocitos CD69+ comparado con las células sin estimular, esto a las concentraciones usadas y a los tiempos analizados.

Por otro lado, el porcentaje de monocitos CD86+ en las células sin estimular fue de $69.0 \pm 2.4 \%$, al tiempo de 12 horas, mientras que el porcentaje en las células que se estimularon con las OMVs de la cepa silvestre 16M fue significativamente menor a la concentración de $25 \mu\text{g/mL}$ con un porcentaje de, $37.07 \pm 12.8 \%$, mientras que las concentraciones de 1 y $10 \mu\text{g/mL}$ los porcentajes fueron, $52.3 \pm 6.0 \%$, $42.6 \pm 13.3 \%$, respectivamente; y los porcentaje de los monocitos CD86+ en las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron, $60.3 \pm 8.8 \%$, $44.4 \pm 5.0 \%$, y $36.8 \pm 12.1 \%$, donde se muestra una tendencia a disminuir la expresión de la molécula CD86 en monocitos, cuando aumenta la concentración de OMVs. Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes de monocitos CD86+ fueron, $47.07 \pm 5.1 \%$ y $54.2 \pm 15.5 \%$, respectivamente (Figura 9, a).

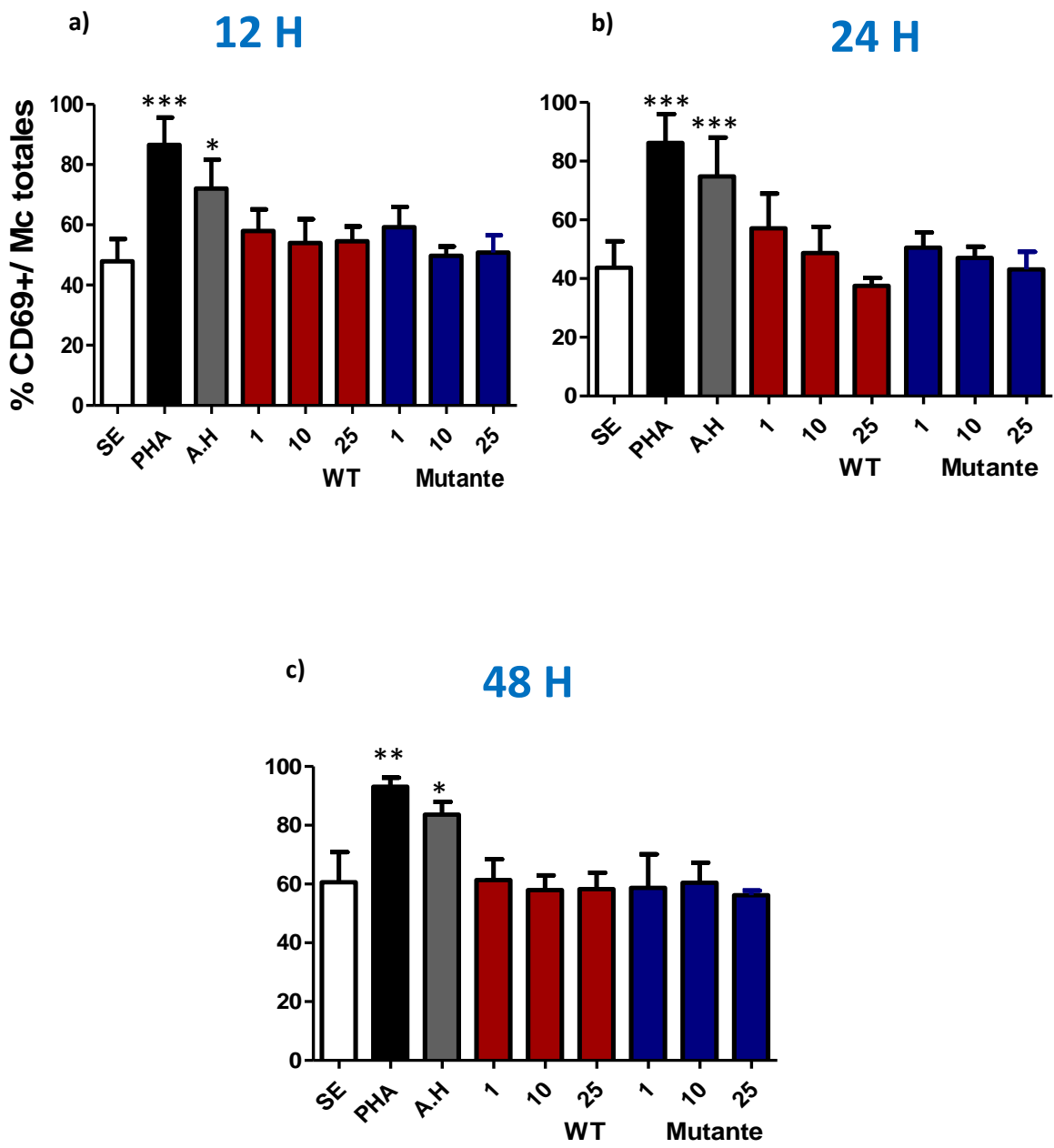


Figura 8: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de activación CD69. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; barra gris), por 12 h (a) y 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Con respecto a los monocitos que expresaron la molécula de activación CD86 en las células sin estimular fue $71.8 \pm 4.5 \%$ al tiempo de 24 horas, mientras que con los estímulos de las OMVs de la cepa silvestre 16M a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostraron una expresión de la molécula CD86 en monocitos significativamente menor ($39.2 \pm 12.7 \%$ y $29.1 \pm 9.9 \%$, respectivamente)

mientras que la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no indujo cambio significativo en dicha expresión (57.9 ± 4.4). Con el estímulo de las OMVs de la cepa mutante VTRM1 no hubo cambios significativos, pero si se vió una tendencia disminuir la expresión de la molécula CD86 en monocitos, cuando aumenta la concentración de OMVs ($61.5 \pm 10.6 \%$, $48.5 \pm 10.55 \%$, $39.8 \pm 12.0 \%$). Las células estimuladas con PHA y OMVs de *A. hydrophila* presentaron porcentajes de, $13.9 \pm 5.5 \%$ y $9.8 \pm 3.0 \%$, respectivamente (Figura 9 b).

A las 48 horas, comparado con el porcentaje de monocitos CD86+ en las células sin estimular ($66.3 \pm 16.1 \%$) se observa un porcentaje significativamente menor en los monocitos estimulados con las OMVs de la cepa silvestre a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($26.8 \pm 6.7 \%$ y $26.5 \pm 6.8 \%$) al igual que para las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante a la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($34.7 \pm 7.7 \%$). algo interesante es que a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMVs de la cepa mutante, el porcentaje de monocitos CD86+ ($63.3 \pm 1.9 \%$) se mantiene muy similar al porcentaje de las células sin estimular (Figura 9 c).

Estos resultados nos indican que el estímulo de las OMVs de Brucella, disminuye el porcentaje de monocitos CD86+ y este cambio se observa a los diferentes tiempos analizados principalmente con las OMVs de la cepa silvestre (16M) a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

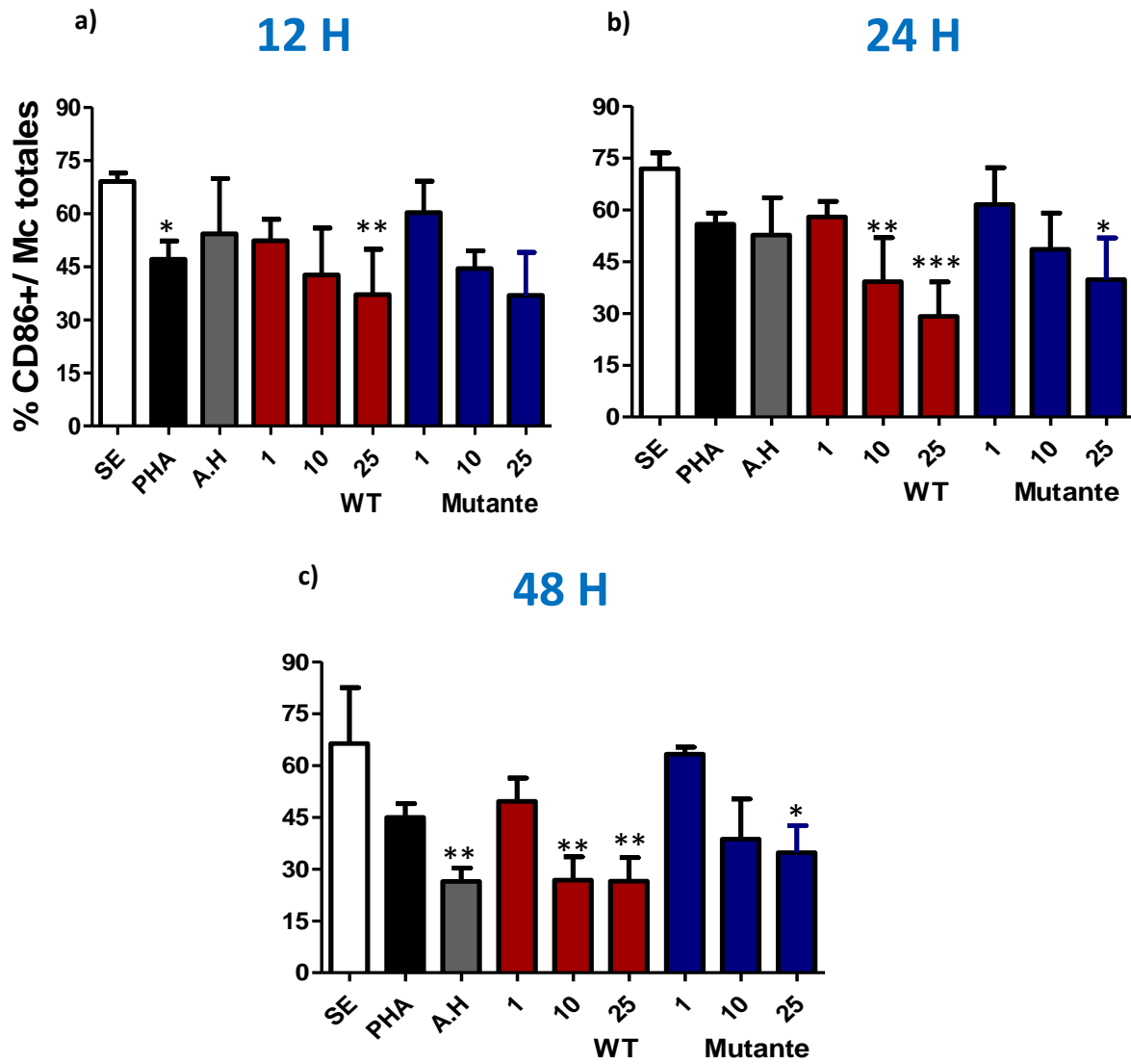


Figura 9: **Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de activación CD86.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Se evaluaron las moléculas de inhibición, el receptor PD-1 y su ligando PDL-1. Se sabe que la expresión de PD-1 y su ligando ha sido utilizada por una variedad de microorganismos para atenuar la inmunidad antimicrobiana y facilitar la infección crónica, esto debido a que la interacción entre estas moléculas modula la señalización del TCR resultando en baja producción de citocinas, de factores de sobrevivencia y baja proliferación de dichas células (70, 71).

Los resultados que obtuvimos al analizar la presencia de las moléculas en superficie de los PBMCs, fue que no observamos cambios significativos en el porcentaje de linfocitos T PD1+ cuando las células se estimularon durante 12 horas con las diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de la cepa silvestre 16M ($4.2 \pm 1.7 \%$, $6.1 \pm 2.1 \%$ y $6.4 \pm 2.6 \%$) y de la cepa mutante VTRM ($3.9 \pm 1.4 \%$, $3.9 \pm 1.0 \%$ y $6.2 \pm 0.9 \%$) comparado con las células sin estimular ($3.7 \pm 1.0 \%$). Con respecto a las células sin estimular, los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* indujeron porcentajes significativamente mayores de linfocitos T positivos para PD-1, los cuales fueron, $12.0 \pm 4.2 \%$ y $9.9 \pm 2.2 \%$, respectivamente (Figura 10 a).

A las 24 horas, las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M indujeron porcentajes de linfocitos T PD-1+ ($3.4 \pm 1.1 \%$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $4.6 \pm 1.5 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $5.8 \pm 1.7 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) próximos al porcentaje de las células sin estimular (3.1 ± 0.9), lo mismo ocurrió con el estímulo de las OMVs de la cepa mutante donde los porcentajes fueron $3.3 \pm 1.0 \%$ a la concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $3.9 \pm 1.0 \%$ para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y $5.5 \pm 2.0 \%$ para 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* indujeron porcentajes significativamente mayores de linfocitos T positivos para PD-1, ($12.8 \pm 2.4 \%$ y $10.0 \pm 2.4 \%$, respectivamente) (Figura 10 b).

A las 48 horas se observó que el porcentaje de linfocitos T PD-1+ en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16M fue $6.2 \pm 2.8 \%$, $6.1 \pm 1.7 \%$, 6.4 ± 2.2 , a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMVs respectivamente y los porcentajes para las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron $5.7 \pm 1.8 \%$, 5.8 ± 2.3 y $7.0 \pm 2.3 \%$. Observamos, que no hay cambios significativos entre los porcentajes de Linfocitos T PD-1+ estimulados con las OMVs (ni de la cepa mutante ni de la silvestre) comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($5.3 \pm 1.7 \%$) (Figura 10 c).

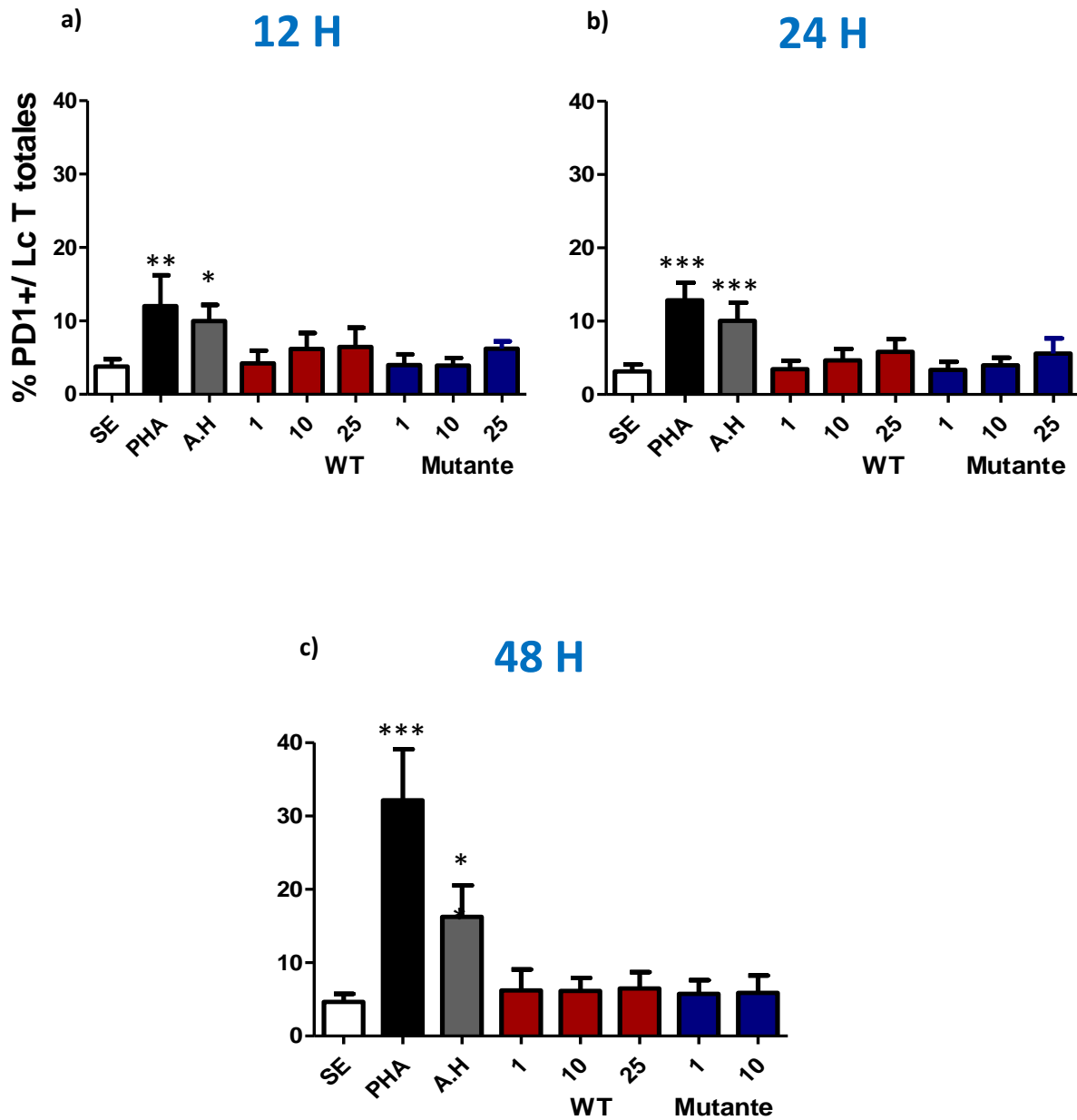


Figura 10: **Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de inhibición PD-1.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Las células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

El porcentaje de linfocitos T que expresaron el ligando PDL-1 en las células sin estimular al tiempo de 12 horas fue, $16.5 \pm 8.5 \%$, comparando dicho porcentaje con los porcentajes obtenidos en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre ($9.4 \pm 6.2 \%$, $9.5 \pm 3.4 \%$ y $11.7 \pm 6.2 \%$) y la cepa mutante ($9.0 \pm 6.7 \%$, $8.8 \pm 5.1 \%$ y $9.0 \pm 2.9 \%$) de *B. melitensis* a las diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente), no hubo cambios significativos en el porcentaje de linfocitos T PDL1+. El estímulo de PHA indujo un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T PD-1+ ($69.0 \pm 3.2 \%$) comparado con las células sin estimular, y el porcentaje de linfocitos T PD-1+ en las células estimuladas con las OMVs de *A. hydrophila* fue $13.1 \pm 4.9 \%$. (Figura 11 a).

A las 24 horas, las células sin estimular, presentaron un porcentaje de $16.4 \pm 8.8 \%$ de linfocitos T PDL-1+. No hubo cambios significativos al comparar dicho porcentaje con las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M, donde los porcentajes fueron de $8.3 \pm 3.5 \%$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $14.0 \pm 5.8 \%$; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $20.8 \pm 10.5 \%$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De igual manera, tampoco hubo cambios significativos al comparar con las células estimuladas con la cepa mutante VTRM1 ($10.3 \pm 4.3 \%$, $13.6 \pm 6.1 \%$ y $13.7 \pm 5.9 \%$). Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes de linfocitos T que expresaron el ligando PDL-1, fueron $74.0 \pm 6.9 \%$ y $17.1 \pm 3.1 \%$, respectivamente (Figura 11 b).

A las 48 horas, vimos que el porcentaje de Linfocitos T PDL-1+ estimulados con las OMVs de *Brucella* de las dos cepas no variaba con respecto a las células sin estimular ($4.7 \pm 1.7 \%$). Y estos porcentajes fueron, $7.0 \pm 1.9 \%$, $9.6 \pm 2.4 \%$ y $10.9 \pm 2.9 \%$ a las concentraciones de 1, 10 y 15 (respectivamente) de OMVs de la cepa silvestre, y para la cepa mutante fueron $5.6 \pm 2.3 \%$, $6.9 \pm 2.6 \%$ y $9.4 \pm 3.5 \%$ (Figura 11 c).

Estos resultados nos muestran que las OMVs de las dos cepas de *Brucella*, no inducen cambios en el porcentaje de linfocitos T PDL-1+ comparado con las células sin estimular, esto a los diferentes tiempos analizados y con las diferentes concentraciones utilizadas.

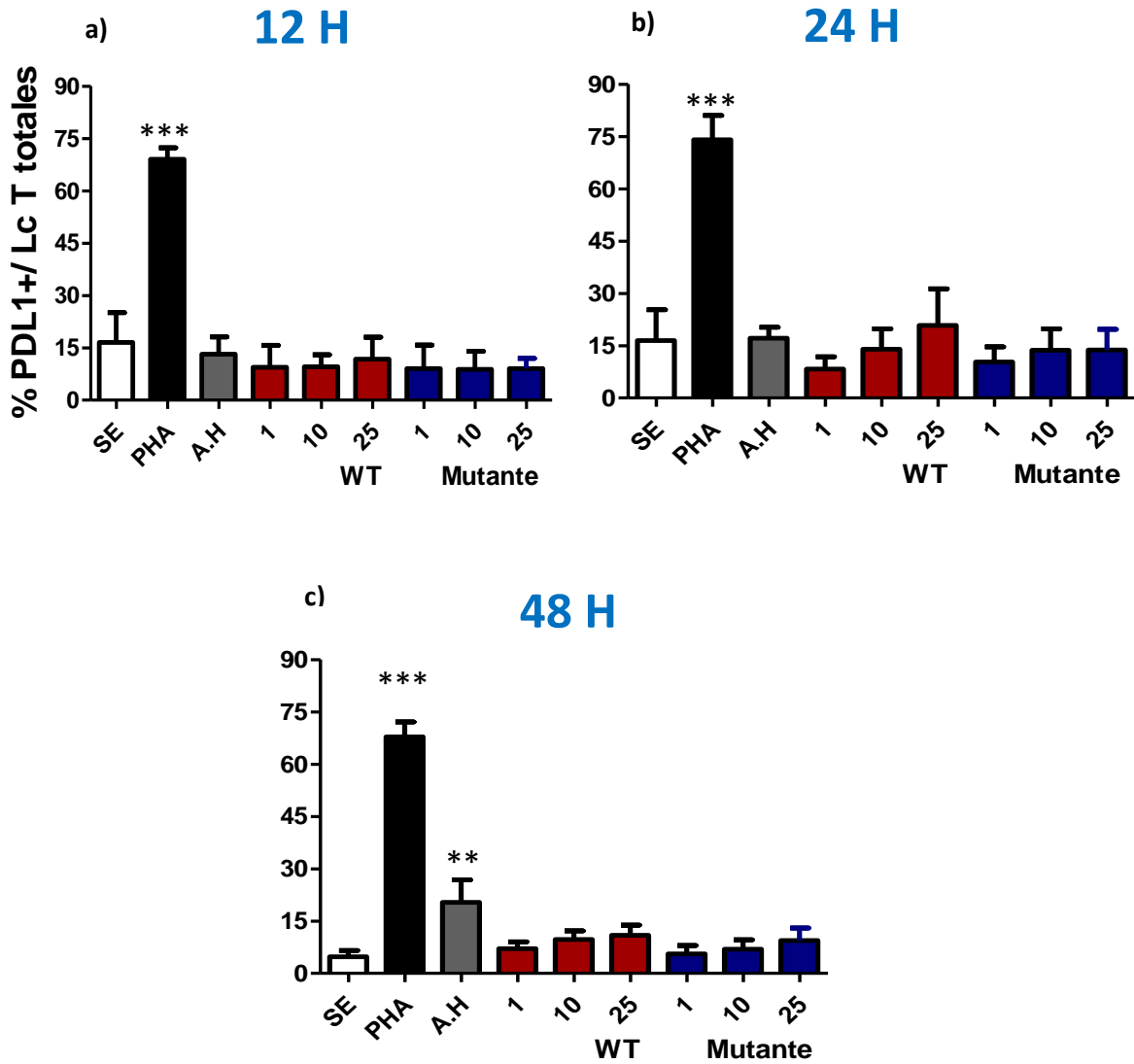


Figura 11: **Porcentaje de linfocitos T que expresan el marcador de inhibición PDL-1.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

El porcentaje de linfocitos B que expresaron el receptor PD-1 en las células sin estimular al tiempo de 12 horas fue de 14.9 ± 2.1 %, mientras que los porcentajes de expresión de dicha molécula en las células que se estimularon con las OMVs de la cepa silvestre fueron de, 13.7 ± 2.1 %, 14.33 ± 3.0 %, 16.3 ± 2.0 % a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, mientras que las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante VTRM1 los porcentajes fueron 12.8 ± 1.6 %, 13.9 ± 1.6 %, y 14.9 ± 1.7 %. No hubo cambios significativos en los porcentajes de expresión de linfocitos B PD-1+, con los estímulos de OMVs con respecto al control negativo. Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes linfocitos B PD-1+ fueron 29.0 ± 2.5 % y 14.8 ± 2.8 % (Figura 12 a).

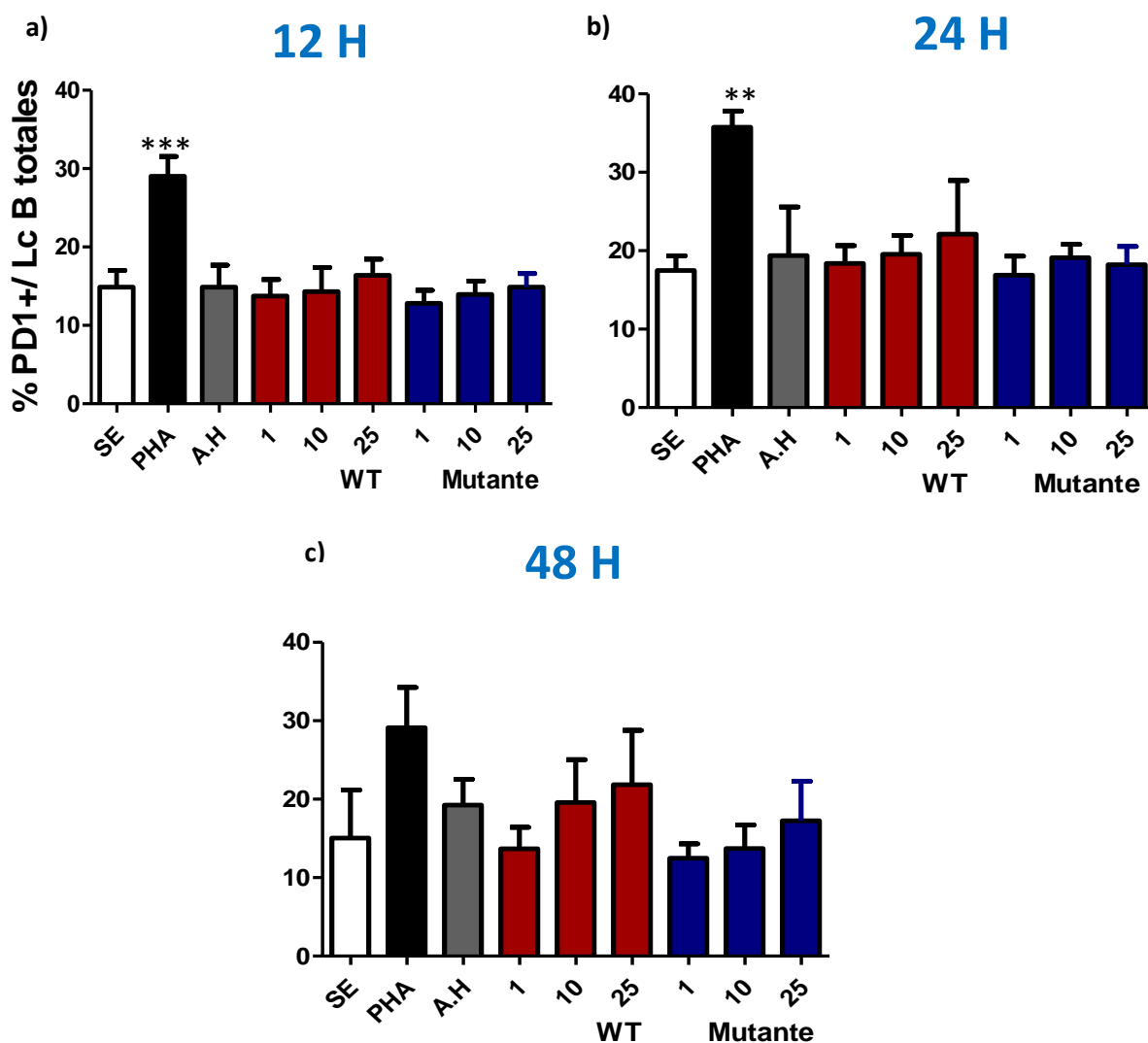


Figura 12: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de inhibición PD-1. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; barra gris), por 12 h (a) 24 h (b) y 48h (c). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Los linfocitos B que expresaron el receptor PD-1 en el tiempo de 24 horas con los estímulos de las vesículas de *B. melitensis* tuvieron los siguientes porcentajes: los estímulos con la cepa silvestre 16M fueron, $18.3 \pm 2.2 \%$ ($1 \mu\text{g/mL}$), $19.5 \pm 2.3 \%$ ($10 \mu\text{g/mL}$) y $22.1 \pm 6.8 \%$ ($25 \mu\text{g/mL}$) y para la cepa mutante VTRM1 $16.9 \pm 2.4 \%$ ($1 \mu\text{g/mL}$), $19.1 \pm 1.7 \%$ ($10 \mu\text{g/mL}$), $18.2 \pm 2.4 \%$ ($25 \mu\text{g/mL}$). Las células sin estimular presentaron un porcentaje de expresión de $17.47 \pm 1.8 \%$, y las estimuladas con PHA y OMVs de *A. hydrophila* fueron, $35.7 \pm 2.0 \%$ y $19.3 \pm 6.2 \%$, respectivamente (figura 12 b). Se observa que no hubo cambios significativos en los porcentajes de linfocitos B PD-1+, con los estímulos de OMVs con respecto al control negativo.

A las 48 horas, se observó que no hubo cambios significativos en cuanto al porcentaje de linfocitos B PD-1+ cuando las células fueron estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre de *Brucella* (16M: $13.6 \pm 2.7 \%$, $19.6 \pm 5.4 \%$ y $21.8 \pm 6.9 \%$) ni con OMVs de la cepa mutante (VTRM1: $12.4 \pm 1.8 \%$, $13.7 \pm 2.9 \%$ y $17.2 \pm 5.0 \%$) comparado con las células sin estimular ($15.0 \pm 6.1 \%$) (Figura 12 c). Estos resultados nos muestran que el Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de inhibición PD-1 en superficie en células estimuladas con las OMVs de las dos cepas de *Brucella*, se mantienen similares al porcentaje de linfocitos B PD-1+ en las células sin estimular.

El porcentaje de linfocitos B que expresaron el ligando PDL-1 en las células sin estimular fue de 30.9 ± 8.1 al tiempo de 12 horas, mientras que los porcentajes de linfocitos B que expresaron dicha molécula en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16M, fueron, $20.7 \pm 1.9 \%$, $34.6 \pm 10.6 \%$ y $42.5 \pm 14.3 \%$ a las concentraciones de 1, 10 y $25 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los porcentajes de los linfocitos B PDL-1+ en las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron de $17.9 \pm 3.1 \%$, $27.3 \pm 8.9 \%$, y $36.4 \pm 9.3 \%$, dichos resultados muestran que con respecto a las células sin estimular, no hay diferencias significativas cuando las células son estimuladas con las OMVs de las dos cepas. Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes linfocitos B que expresaron PDL-1 fueron, $72.9 \pm 7.4 \%$ y $49.1 \pm 5.0 \%$, respectivamente (Figura 13 a).

A las 24 horas, el porcentaje de linfocitos B que expresaron el ligando PDL-1 en las células sin estimular fue de $40.5 \pm 7.1 \%$, mientras que los porcentajes de linfocitos B que expresaron dicha molécula en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16M, fueron, $26.9 \pm 2.5 \%$; $1 \mu\text{g/mL}$, $39.4 \pm 6.1 \%$; $10 \mu\text{g/mL}$, $50.0 \pm 1.9 \%$; $25 \mu\text{g/mL}$ y en las células estimuladas con las OMVs de la cepa mutante VTRM1 los porcentajes fueron de $31.5 \pm 2.0 \%$, $36.7 \pm 5.6 \%$, y $38.3 \pm 6.1 \%$. Con los

estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes de linfocitos B que expresaron PDL-1 fueron $88.8 \pm 3.5\%$ y $72.4 \pm 4.2\%$ respectivamente (Figura 13 b).

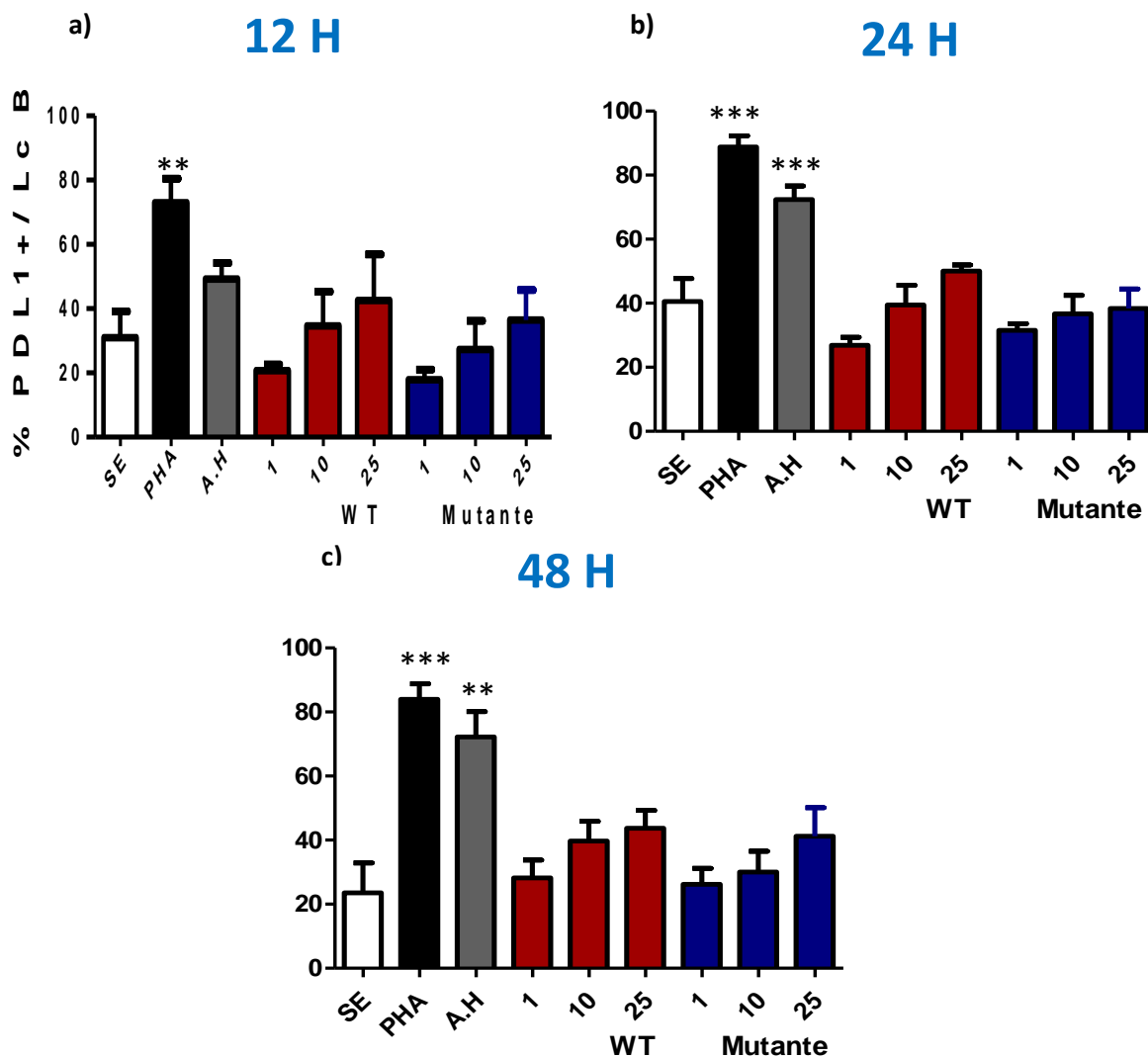


Figura 13: Porcentaje de linfocitos B que expresan el marcador de inhibición PDL-1. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

A las 48 horas, con respecto al porcentaje de las células sin estimular ($28.1 \pm 5.5 \%$) se observa una ligera tendencia a ser mayor el porcentaje de linfocitos B PDL-1+ con los estímulos de las OMVs de Brucella de la cepa silvestre 16M ($28.2 \pm 5.5\%$; $1 \mu\text{g/mL}$, $39.7 \pm 6.1 \%$; $10 \mu\text{g/mL}$, $43.7 \pm 5.5\%$; $25 \mu\text{g/mL}$, mientras que en las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 los porcentajes fueron: $26.1 \pm 5.0 \%$, $30.0 \pm 6.6 \%$ y $41.17 \pm 8.9 \%$) (Figura 13 c).

Se observa que a los tiempos analizados, el estímulo de las vesículas no induce cambios significativos en cuanto al porcentaje de linfocitos B PDL-1 + comparado con las células sin estimular.

Comparado con las células sin estimular ($56.1 \pm 17.3 \%$) no hubo cambios significativos en el porcentaje de monocitos PD1+ cuando las células se estimularon durante 12 horas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M ($29.2 \pm 2.1 \%$, $29.2 \pm 4.6 \%$ y $30.3 \pm 8.1 \%$, respectivamente), ni tampoco con el estímulo de OMVs de la cepa mutante VTRM1 ($41.3 \pm 4.5 \%$, $26.3 \pm 2.5 \%$ y $28.8 \pm 4.0 \%$, respectivamente). Con respecto a las células solo en medio de cultivo, los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* indujeron porcentajes significativamente mayores de linfocitos T positivos para PD-1, los cuales fueron, $45.4 \pm 5.2 \%$ y $56.0 \pm 5.6 \%$, respectivamente (Figura 14 a).

A las 24 horas, las células sin estimular presentaron un porcentaje de $40.8 \pm 11.7 \%$ de monocitos PD1+. Al comparar dicho porcentaje con los de las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M ($26.1 \pm 8.2 \%$, $21.6 \pm 5.8 \%$ y $24.4 \pm 8.8 \%$) se observó que hubo una tendencia a ser menores los porcentajes pero el cambio solo fue significativo a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lo mismo ocurrió con las células estimuladas con OMVs la cepa mutante VTRM1 ($21.3 \pm 6.7 \%$, $21.2 \pm 5.4 \%$, $22.2 \pm 6.4 \%$). Con los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* los porcentajes de expresión en monocitos PD1+ fueron, $37.9 \pm 5.8 \%$ y $51.2 \pm 5.3 \%$, respectivamente (Figura 14 b).

Al tiempo de 48 horas, el estímulo de las OMVs de la cepa silvestre 16M induce un menor porcentaje de monocitos que expresan PD-1 en superficie ($24.3 \pm 4.3 \%$, $18.3 \pm 4.4 \%$ y $25.6 \pm 8.5 \%$), esto comparado con las células sin estimular ($40.1 \pm 5.0 \%$); lo mismo se observa con el estímulo de las OMVs de la cepa mutante VTRM1 ($26.0 \pm 3.4 \%$, $18.5 \pm 2.5 \%$, $20.17 \pm 4.1 \%$) (Figura 14 c).

No hubo cambios significativos en el porcentaje de monocitos PDL1+ cuando las células se estimularon durante 12 horas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M ($48.3 \pm 2.5 \%$, $47.6 \pm 11.6 \%$, y $62.2 \pm 14.5 \%$) y de la cepa mutante VTRM1 ($54.5 \pm 3.8 \%$, $43.4 \pm 7.0 \%$ y $57.0 \pm 8.5 \%$), comparado con las células sin estimular ($66.1 \pm 12.5 \%$). Con respecto a las células solo en medio de cultivo, los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* indujeron porcentajes significativamente mayores de monocitos positivos para PDL-1, los cuales fueron: $81.2 \pm 8.4 \%$ y $54.5 \pm 9.2 \%$, respectivamente (Figura 15 a).

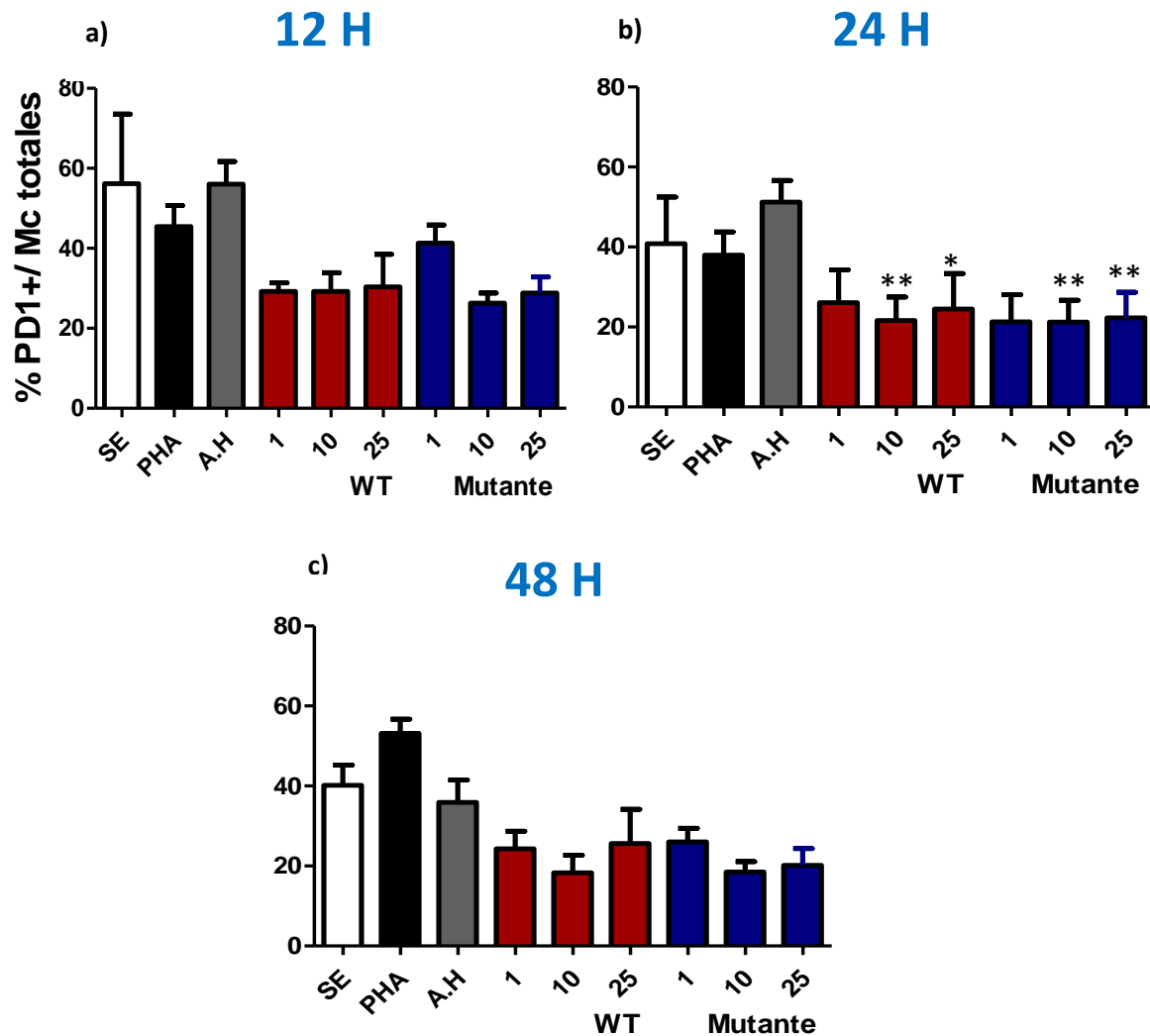


Figura 14: Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de inhibición PD-1. PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; barra gris), por 12h (A) y 24h (B). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

A las 24 horas, las células estimuladas con las diferentes concentraciones de OMVs de la cepa silvestre 16M indujeron porcentajes de monocitos PDL-1+ (82.3 \pm 11.2 %, 84.7 \pm 6.7 %, y 90.6 \pm 3.6 %) próximos al porcentaje de las células sin estimular (90.4 \pm 2.1), lo mismo ocurrió con el estímulo de las OMVs de la cepa mutante donde los porcentajes fueron 85.6 \pm 5.9 % a la concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 84.3 \pm 5.2 % para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 86.0 \pm 5.7 % para 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los estímulos de PHA y las OMVs de *A. hydrophila* indujeron porcentajes de 98.2 \pm 1.7 % y 85.5 \pm 2.9 % respectivamente) (Figura 15 b). A las 48 horas se observó que el porcentaje de monocitos positivos para PDL-1 en las células

estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre 16M fueron $88.4 \pm 2.3\%$, $71.6 \pm 3.3\%$, $64.4 \pm 7.8\%$, a las concentraciones de 1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OMVs y los porcentajes para las células estimuladas con OMVs de la cepa mutante VTRM1 fueron $72.2 \pm 2.5\%$, $81.7 \pm 4.6\%$, $68.8 \pm 7.9\%$; se observó que no hay cambios significativos entre los porcentaje de monocitos PDL-1+ estimulados con las OMVs (ni de la cepa mutante ni de la silvestre) comparado con el porcentaje de las células sin estimular ($69.4 \pm 8.4\%$) (Figura 15 c)

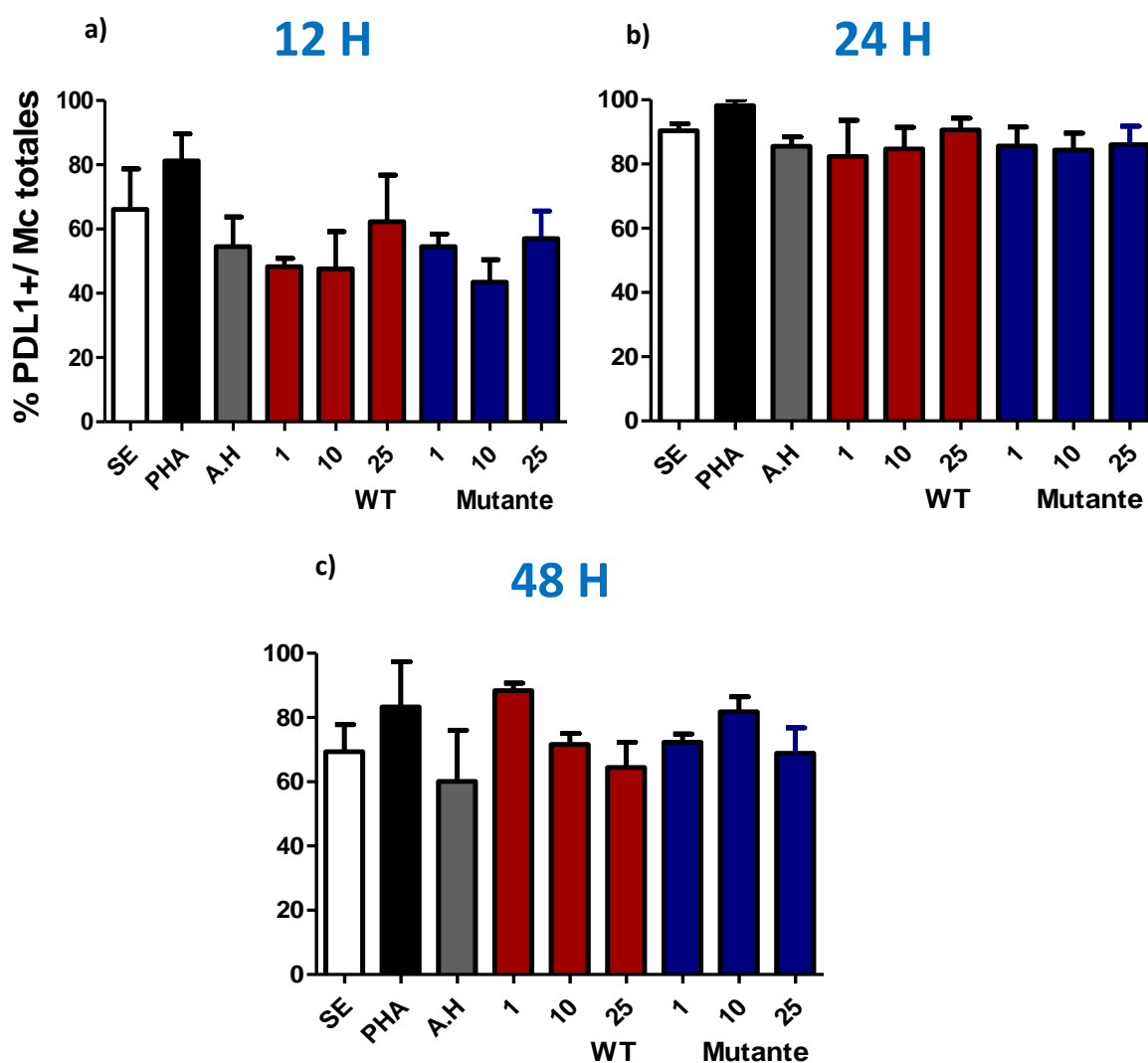


Figura 15: **Porcentaje de monocitos que expresan el marcador de inhibición PDL-1.** PBMCs fueron tratados con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; barra gris), por 12 h (a), 24 h (b) y 48 h (c). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Inducción de citocinas

Posteriormente nos interesó evaluar si las OMVs inducían un determinado perfil de citocinas en las PBMCs.

Se observó que la cantidad de INF- γ presente en el sobrenadante de las células estimuladas con las OMVs no incrementa significativamente comparado con las células sin estimular (Figura 16 a; Tabla 1).

La concentración de TNF- α presente en el sobrenadante de las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre (16M) tiende a ser 20 veces mayor comparado con las células sin estimular. Del mismo modo, se vio un aumento en la concentración de TNF- α cuando las células se estimularon con las OMVs de la cepa mutante (VTRM1), principalmente con la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 16 b Tabla 1).

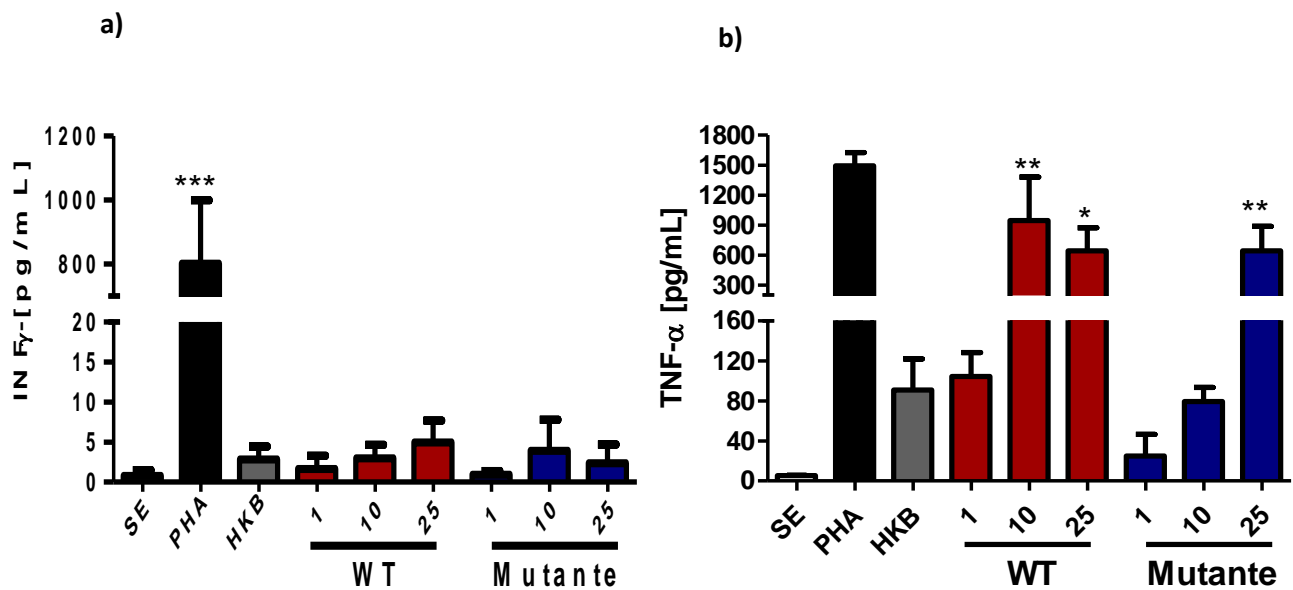
Los niveles de IL-10 en las células estimuladas con las vesículas de la cepa 16M tienden a aumentar comparado con las células sin estímulo. Además, se observó un cambio significativamente mayor con el estímulo de la cepa VTM1 a la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, comparado con las células sin estimular. (Figura 16 c; Tabla 1).

Interesantemente los niveles de IL-6 aumentaron drásticamente con todas las condiciones. Sin embargo, al comparar la concentración de IL-6 en las células sin estimular con las células estimuladas con las OMVs, hubo un aumento significativo cuando las células se estimularon con las OMVs de la cepa silvestre (16M) a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, y con las OMVs de la cepa mutante (VTRM1) a la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ comparado con las células sin estimular (Figura 16, d; Tabla 1).

Se encontró que los niveles de IL-17 fueron significativamente menores en las células estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre (10 y 25 $\mu\text{g/mL}$) y con la cepa mutante (25 $\mu\text{g/L}$) con respecto a las células sin estimular (Figura 16 e; Tabla 1).

Tabla 1: Concentraciones de citocinas (IL-17, INF- γ , TNF, IL-10, IL-6) en sobrenadante de PBMCs estimuladas con las OMVs de *B. melitensis*.

Estímulo/Citocina	IL-17 [pg/mL]	INF- γ [pg/mL]	TNF [pg/mL]	IL-10 [pg/mL]	IL-6 [ng/mL]
SE	285.1 \pm 71.5	0.76 \pm 0.72	5.4 \pm 0.2	8.20 \pm 2.9	1.33 \pm 0.60
PHA	249.4 \pm 50.3	801.0 \pm 198.6	1493 \pm 131.6	296.3 \pm 112.4	20.81 \pm 4.6
HKB	107.4 \pm 40.6	2.8 \pm 1.6	91.03 \pm 31.0	317.0 \pm 109.5	26.3 \pm 5.1
WT					
1	82.2 \pm 18.9	1.6 \pm 1.6	104.5 \pm 23.9	105.2 \pm 34.2	28.11 \pm 8.7
10	6.3 \pm 6.3	2.9 \pm 1.6	943.9 \pm 435.6	112.8 \pm 33.9	49.2 \pm 9.3
25	19.3 \pm 7.9	4.9 \pm 2.7	641.7 \pm 231.1	93.3 \pm 35.5	40.3 \pm 10.2
Mutante					
1	59.8 \pm 29.5	0.92 \pm 0.45	25.01 \pm 21.4	28.42 \pm 23.3	5.6 \pm 4.9
10	83.2 \pm 29.6	3.9 \pm 3.8	79.44 \pm 14.0	191.4 \pm 20.3	22.8 \pm 6.4
25	40.6 \pm 13.4	2.3 \pm 2.3	641.1 \pm 246.6	407.9 \pm 79.8	47.3 \pm 7.5



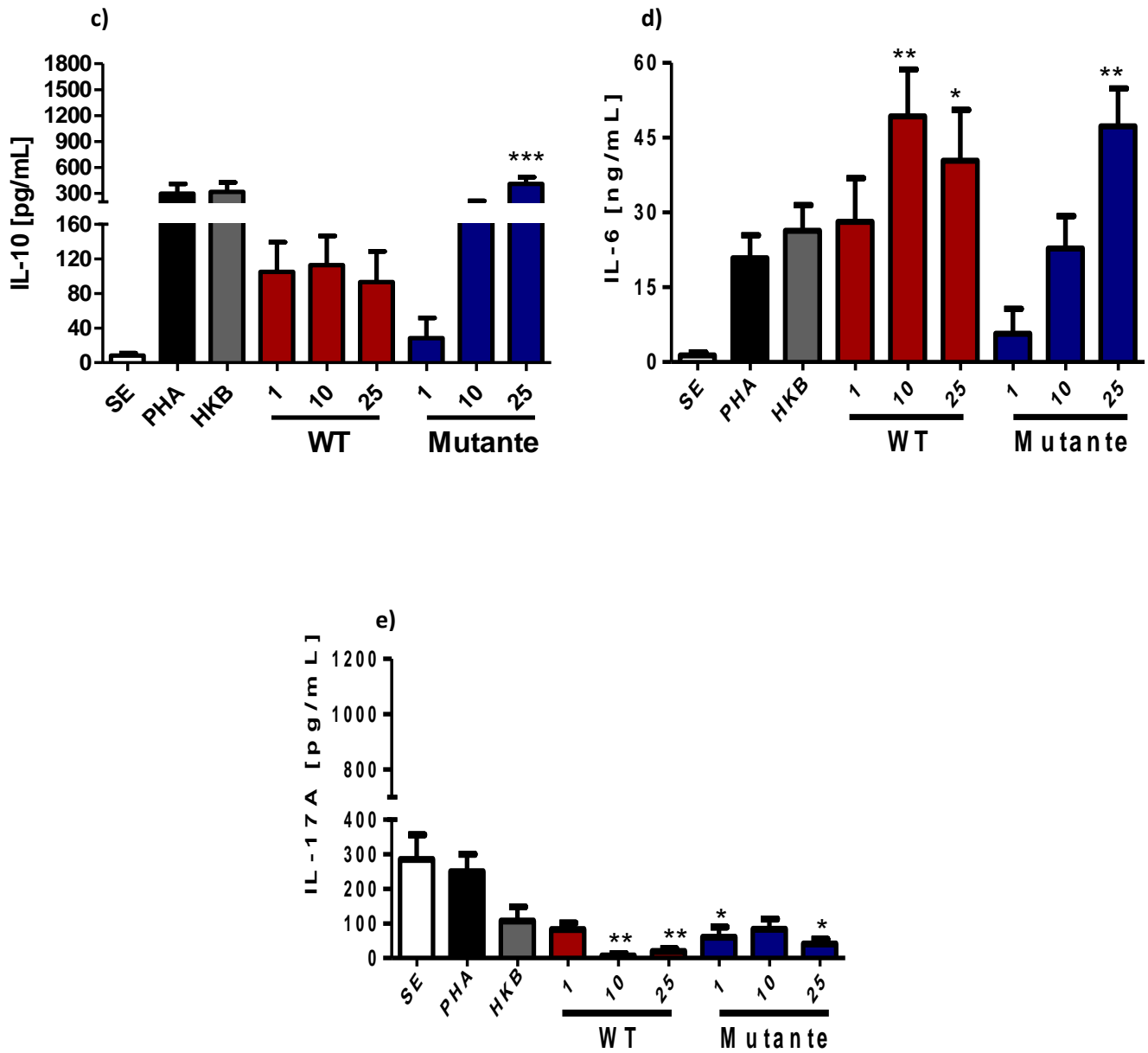


Figura 16: **Determinación de la concentración de citocinas.** PBMCs fueron estimuladas a diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g/mL}$) con las OMVs de *B. melitensis* de las dos cepas (mutante y silvestre), se extrajo el sobrenadante y se analizó en este los niveles de citocinas (a) INF- γ , (b) TNF- α , (c) IL-10, (d) IL-6 (e) IL-17 a las 24 h. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

¿OMVs como inmunomoduladores?

Al encontrar que las OMVs de *B. melitensis* no inducían grandes cambios en cuanto a las moléculas de activación e inhibición en las PBMCs, y al parecer se desarrolla un perfil antiinflamatorio con dicho estímulo, nos preguntamos si tal vez este efecto era producto de algún mecanismo propio de las OMVs, que de alguna forma estuviera apagando respuestas tanto de inhibición como de activación. Para resolver esto, primero se activaron los PBMCs con el estímulo de PHA (mitógeno) durante 12 horas, y posteriormente se reestimularon con las OMVs de ambas cepas a la concentración de 25 µg/mL durante 24 horas, para observar si este segundo estímulo con las vesículas ocasionaba algún cambio en cuanto a los porcentajes de células positivas para las moléculas de activación e inhibición. Del mismo modo, se decidió usar las OMVs como primer estímulo durante 12 horas y al PHA como segundo estímulo durante 24 horas, para posteriormente analizar el cambio en los porcentajes de células positivas para las moléculas de activación e inhibición.

Se observó que cuando las OMVs de las dos cepas (mutante y silvestre) fueron el estímulo previo a la adición de PHA, los porcentajes de linfocitos T que expresaron la molécula CD69 en superficie (26.87 ± 5.49 %; 16M-PHA y 14.14 ± 6.98 %; VTRM-PHA) fueron mayores con respecto a los porcentajes de células que solo se estimularon con las OMVs (2.73 ± 0.44 %; 16M, 1.71 ± 0.25 %; VTRM1). Sin embargo, el mayor porcentaje de linfocitos T CD69+ se observó con las células estimuladas con PHA (37.37 ± 0.94 %). Cuando las células se estimularon con PHA como primer estímulo y luego con las OMVs, el porcentaje de linfocitos T CD69+ (14.13 ± 0.38 %; PHA-16M, 14.50 ± 1.47 %; PHA-VTRM1) disminuye significativamente esto comparado con el estímulo de PHA control. Es decir, las OMVs disminuyen casi a la mitad la activación generada por el PHA (Figura 17 a). Se observa que cuando los PBMC se estimulan primero con las OMVs (16M y VTRM1) y luego con PHA aumenta el porcentaje de linfocitos B CD69+ (78.00 ± 7.07 %; 16M-PHA y 62.93 ± 7.78 %; VTRM1-PHA) comparado con los estímulos de las OMVs control (11.30 ± 1.44 %; 16M, 3.33 ± 0.38 %; VTRM1). Por otro lado se observó que comparado con el PHA control (73.23 ± 3.4 %) el porcentaje de linfocitos B que expresan CD69 en superficie disminuye cuando las OMVs se adicionan después del PHA (49.33 ± 3.75 %; PHA-16M, 56.17 ± 1.25 %; PHA-VTRM1), sin embargo, este efecto solo es significativo con las OMVs de la cepa silvestre (16M) como segundo estímulo (Figura 17 b). En monocitos se observa que cuando se estimula primero con OMVs y después con PHA se observa que aumenta el porcentaje de monocitos CD69+ (52.07 ± 8.99 %; 16M-PHA % y 58.87 ± 15.8 %; VTRM1-PHA), comparado con el estímulo donde sólo se administran las OMVs (32.63 ± 1.88 %; 16M, 33.03

$\pm 2.10 \%$; VTRM1), e incluso dichos porcentajes son mayores que el porcentaje generado por el estímulo de PHA control ($43.63 \pm 1.12 \%$). Por otro lado, se observa que disminuye el porcentaje de células CD69+ cuando las células estimuladas con PHA y reciben el segundo estímulo con OMVs de la cepa mutante ($33.40 \pm 2.15 \%$) comparado con el porcentaje de PHA ($43.63 \pm 1.12 \%$) (Figura 17 c).

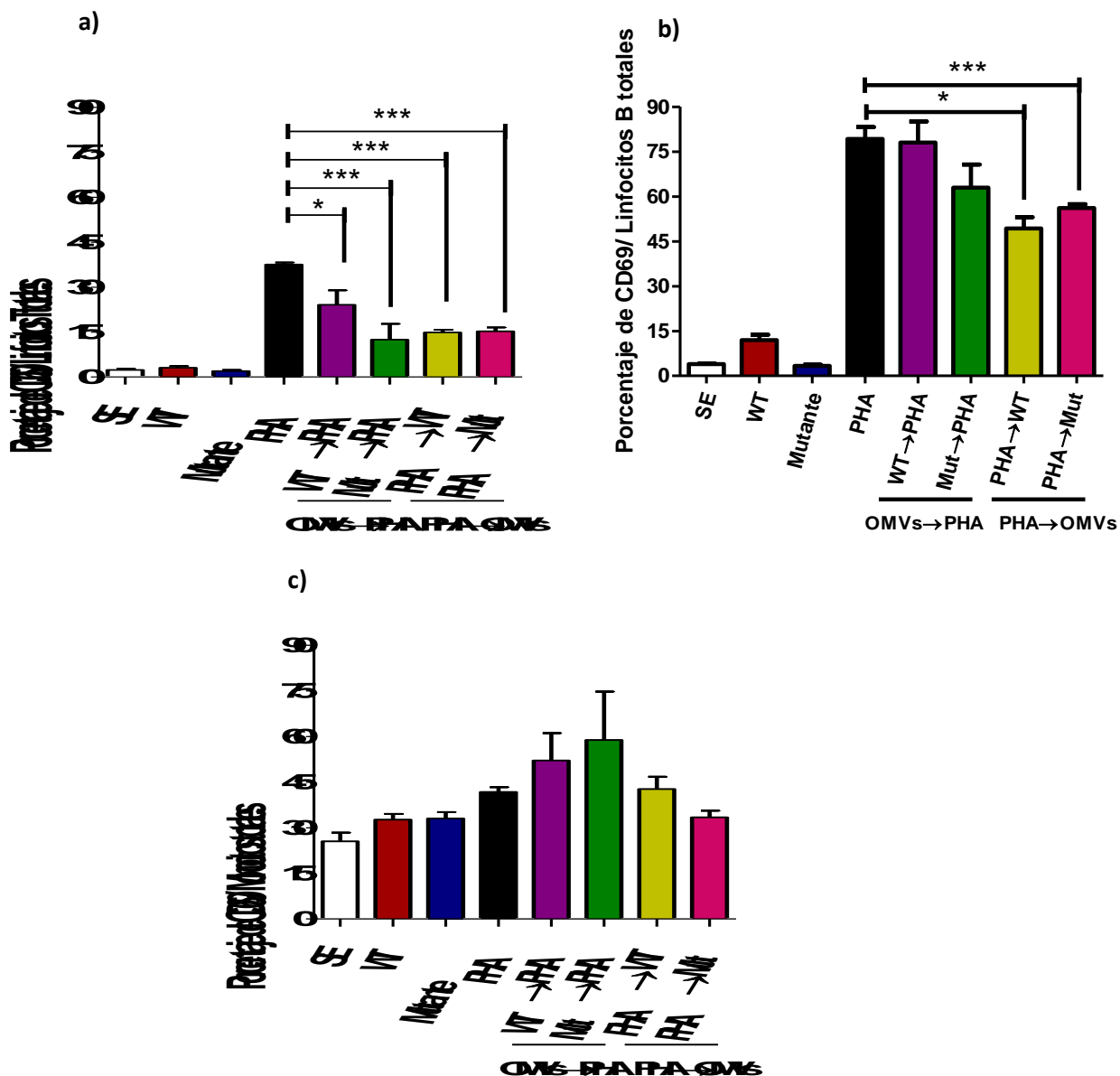
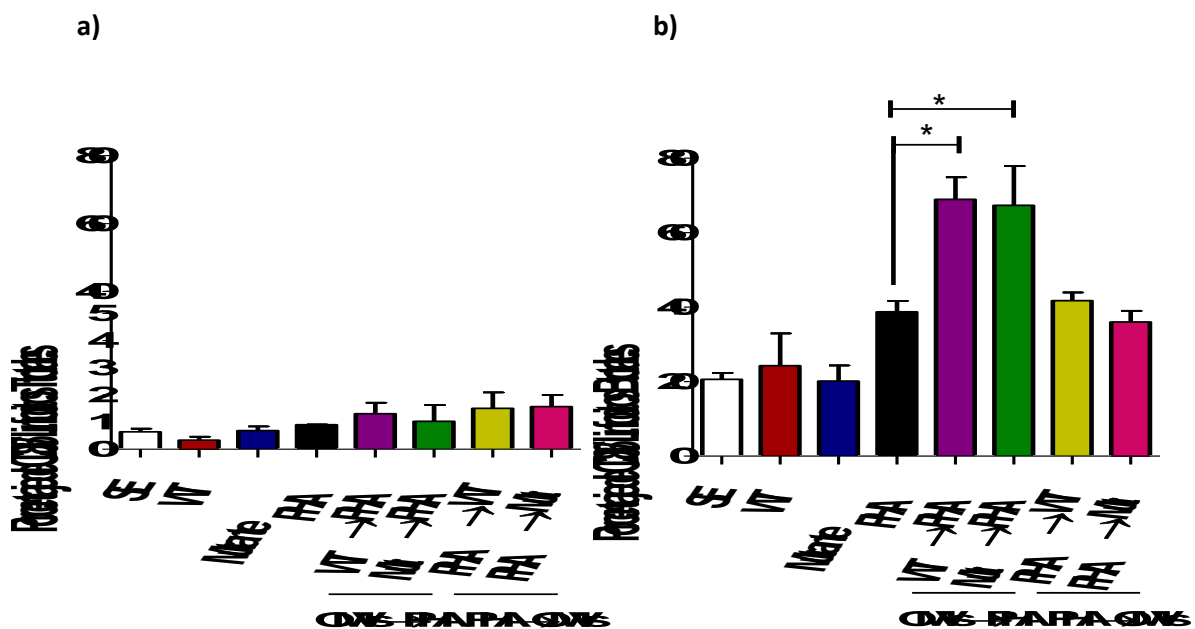


Figura 17: **Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación CD69.** PBMCs tratadas con $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 como primer estímulo durante 12 horas y re estimuladas con $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ PHA (barra negra y roja, respectivamente) por 24 horas; PBMCs tratadas con $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA por 12 horas y re estimuladas con $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barra gris y naranja, respectivamente) por 24 horas. Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. (a) Linfocitos T, (b) Linfocitos B y (c) Monocitos. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Al analizar la expresión de la molécula CD86 en las PBMCs, se observó que cuando el estímulo de las OMVs (de la cepa silvestre y mutante) se ponía antes que el PHA había un ligero aumento en el porcentaje de linfocitos T CD86+ (1.31 ± 0.40 %; 16M-PHA y 1.03 ± 0.59 %; VTRM1-PHA) con respecto al porcentaje de células T CD86+ estimuladas con OMVs (0.34 ± 0.12 %; 16M, y 0.69 ± 0.15 %; VTRM1). También se observó un ligero aumento en el porcentaje de linfocitos T CD86+ cuando las células se estimularon previamente con PHA y después con las OMVs (1.50 ± 0.58 ; PHA-16M y 1.57 ± 0.43 ; PHA-VTRM1) comparado con el porcentaje de células estimuladas únicamente con PHA (0.91 ± 0.005 %), sin embargo estos cambios no son significativos estadísticamente (Figura 18 a). Por otro lado, cuando las células se estimularon primero con las OMVs y después con PHA, el porcentaje de linfocitos B fue aproximadamente 2 veces mayor (68.93 ± 5.97 %; 16M-PHA y 67.33 ± 10.5 %; VTRM1-PHA) comparado con el estímulo donde solo se adicionan las OMVs (16M: 34.73 ± 9.05 %; VTM1: 20.17 ± 4.18 %). Los porcentajes de linfocitos B CD86+ de las células que se les administró OMVs como segundo estímulo (41.77 ± 2.17 %; PHA-16M y 36 ± 3.00 %; PHA-VTRM1) no varían con respecto al porcentaje obtenido con PHA (38.77 ± 2.91 %) (Figura 18 b). En monocitos se observó que fue menor el porcentaje de células CD86+ con todos los estímulos (PHA: 7.66 ± 0.78 %; 16M: 8.70 ± 2.17 %; VTRM1: 9.45 ± 1.03 %; 16M-PHA: 7.23 ± 2.03 %; VTRM1-PHA: 5.51 ± 0.68 %; PHA-16M: 5.05 ± 1.84 %; PHA-VTRM1: 2.91 ± 0.73 %), esto comparado con las células sin estimular (14.00 ± 1.88 %) (Figura 18 c).



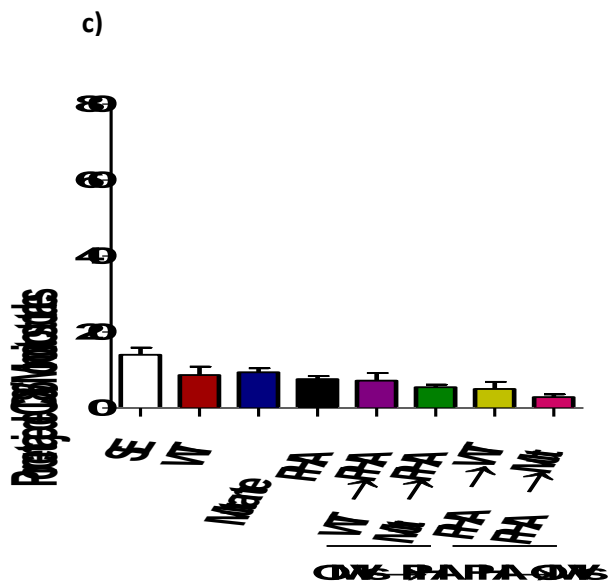


Figura 18: **Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación CD86.** PBMCs tratadas con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 como primer estímulo durante 12 horas y re estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA (barra negra y roja, respectivamente) por 24 horas; PBMCs tratadas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA por 12 horas y re estimuladas con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barra gris y naranja, respectivamente) por 24 horas. Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. (a) Linfocitos T, (b) Linfocitos B y (c) Monocitos. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Con respecto al porcentaje de células PD1+, cuando se estimulan los PBMCs con las OMVs de *B. melitensis* y después se re estimulan con PHA, se observa que disminuye el porcentaje de los linfocitos T PD1+ (7.36 ± 2.04 %; 16M-PHA y 8.53 ± 1.62 %; VTRM1-PHA), comparado con las células estimuladas sólo con las OMVs (16M: 1.46 ± 0.08 %; VTRM1: 1.54 ± 0.28 %). Los porcentajes de linfocitos T PD-1+ de las células que se les administró OMVs como segundo estímulo (22.13 ± 3.23 %; PHA-16M y 23.00 ± 1.20 %; PHA-VTRM1) tienden a ser ligeramente mayores comparado con el porcentaje de células estimuladas únicamente con PHA (17.87 ± 1.43 %) (Figura 19 a). En los linfocitos B, se observó que cuando los estímulos fueron las OMVs seguidas de PHA aumentó en el porcentaje de células PD1+ (29.77 ± 6.19 %; 16M-PHA y 19.60 ± 4.95 %; VTRM1-PHA) comparado con el estímulo donde solo se usaron OMVs (16M: 6.69 ± 0.54 %; VTRM1: 4.51 ± 0.19 %). Del mismo modo, cuando se estimulan las PBMCs con PHA y después con las OMVs de *B. melitensis* de las dos cepas, los porcentajes de linfocitos B PD-1+ (47.97 ± 2.75 %; PHA-16M, 45.93 ± 0.81 %; PHA-VTRM1) aumentan casi el doble comparado con el estímulo donde solo se administró PHA (22.40 ± 1.47 %) (Figura 19 b). En monocitos, se observó que aumenta ligeramente el porcentaje de células PD-1+ cuando las OMVs de las dos cepas se administran como primer estímulo (45.93 ± 6.14 %; 16M-PHA y 35.37 ± 7.99 %; VTRM1-PHA), comparado con el porcentaje de monocitos PD-1 + generado sólo

con el estímulo de OMVs (16M: 24.67 ± 3.30 %; VTRM1: 28.43 ± 7.39 %). Cuando la reestimulación fue con las OMVs, se observa que el porcentaje de monocitos PD-1+ (72.07 ± 2.10 %; PHA-16M y 71.53 ± 3.47 %; PHA-VTRM1) aumenta comparado con el porcentaje generado por PHA control (56.23 ± 3.63 %) sin embargo este aumento no es significativo (Figura 19 c).

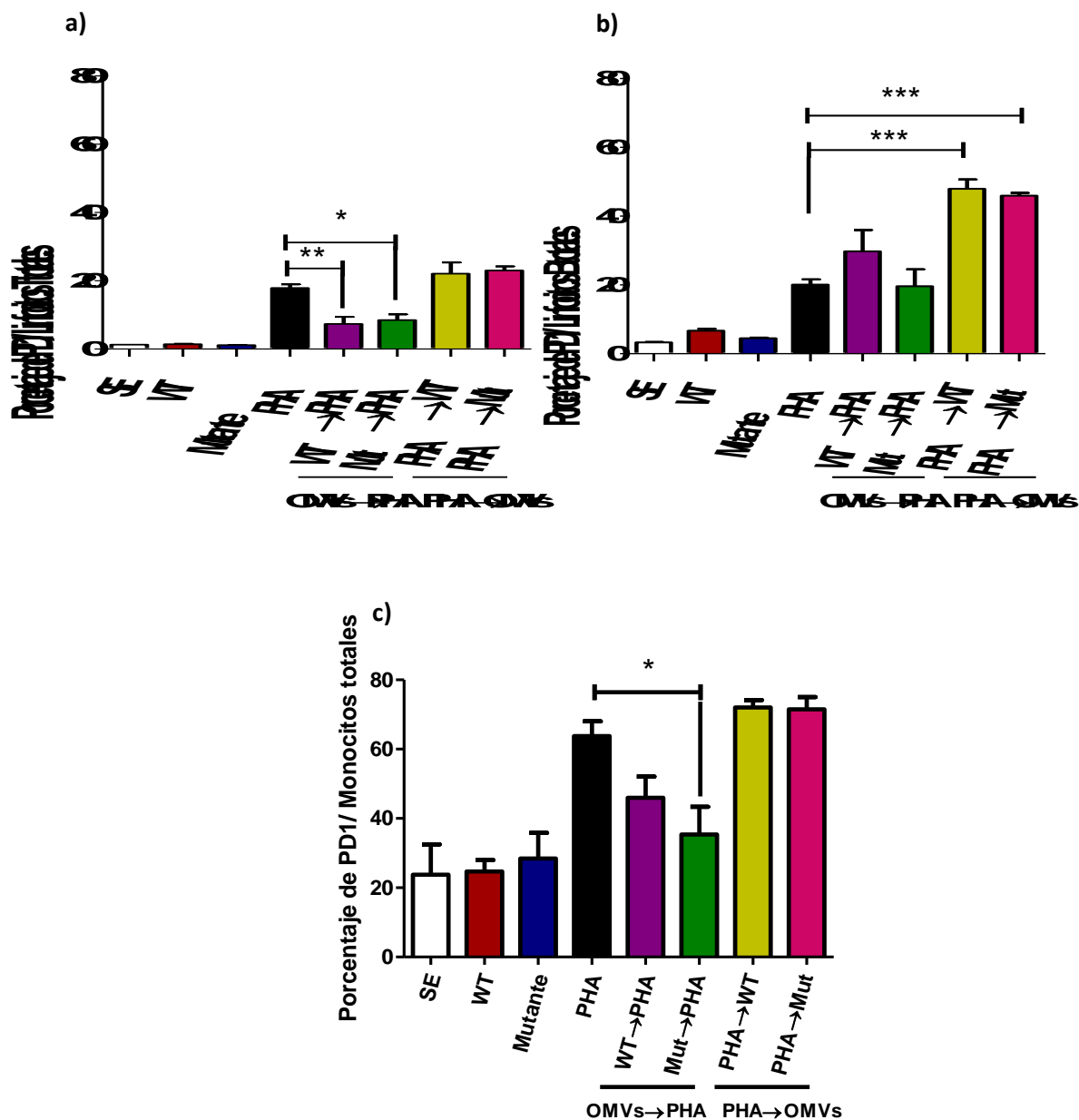
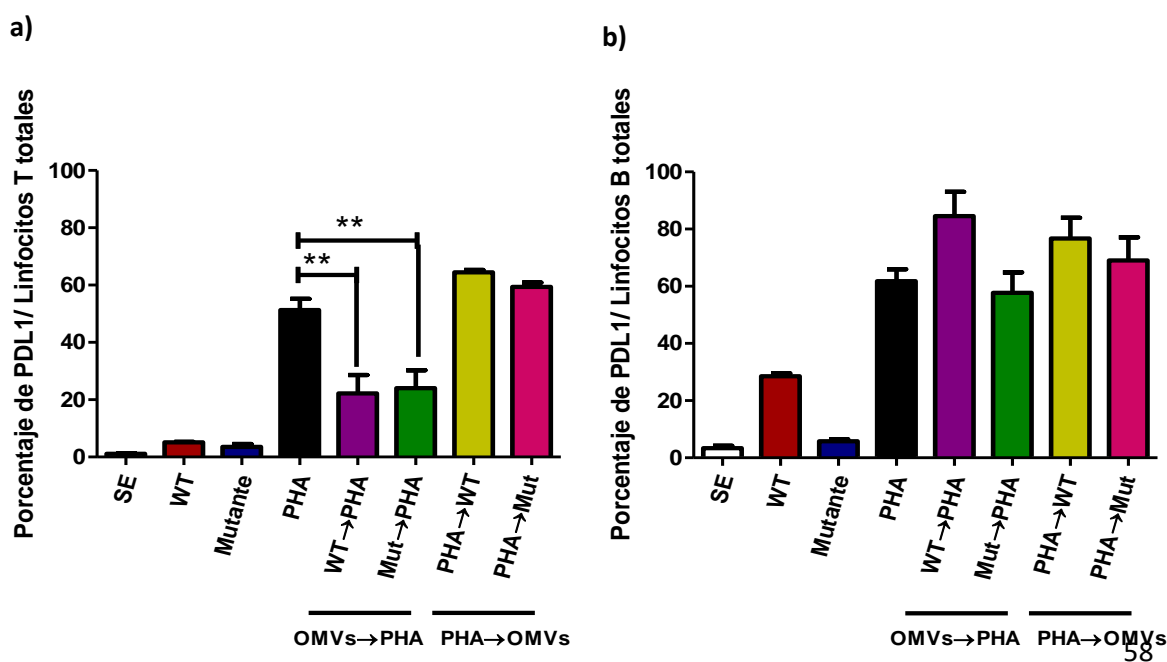


Figura 19: **Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de inhibición PD-1.** PBMCs tratadas con $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 como primer estímulo durante 12 horas y re estimuladas con $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ PHA (barra negra y roja, respectivamente) por 24 horas; PBMCs tratadas con $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA por 12 horas y re estimuladas con $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barra gris y naranja, respectivamente) por 24 horas. Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. (a) Linfocitos T, (b) Linfocitos B y (c) Monocitos. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Cuando las PBMCs se estimularon con las OMV de *B. melitensis* y después con PHA, se observa que en los linfocitos T, aumenta la frecuencia de células PDL-1 (22.20 ± 6.46 %; 16M-PHA y 24.03 ± 6.27 % VTRM1-PHA) comparado con el porcentaje que se obtuvo cuando las células son estimuladas solo con las OMVs (16M: 5.13 ± 0.15 %; VTRM1: 3.52 ± 0.99 %). De igual modo se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos T PDL-1+ cuando el segundo estímulo fueron las OMVs (64.47 ± 0.78 %; PHA-16M y 59.37 ± 1.53 %; PHA-VTRM1) comparado con el porcentaje de células estimuladas únicamente con PHA (56.90 ± 3.53 %) (Figura 20 a). Además, se observó que cuando el primer estímulo fueron las OMVs hubo un aumento en el porcentaje de linfocitos B PDL-1+ (84.53 ± 8.53 %; 16M-PHA y 57.70 ± 7.13 %; VTRM1-PHA) comparado con el porcentaje de linfocitos B PDL-1+ donde solo se estimuló con OMVs (16M: 28.53 ± 0.96 %; VTRM1: 5.76 ± 0.66 %). Por otro lado, cuando se estimularon las PBMCs con PHA y después con las OMVs, los porcentajes de linfocitos B PDL-1+ aumentan ligeramente (76.67 ± 7.27 %; PHA-16M y 69.07 ± 8.09 %; PHA-VTRM1) comparado con el porcentaje de células estimuladas solo con PHA (61.77 ± 4.18 %) (Figura 20 b). Para los monocitos, se observó que hay una disminución en el porcentaje de células PDL-1+ cuando el primer estímulo fueron las OMVs y después con PHA (42.20 ± 5.60 %; 16M-PHA y 44.73 ± 17.8 %; VTRM1-PHA) comparado con el estímulo de OMVs (16M: 14.29 ± 5.29 %; VTRM1: 13.01 ± 3.25 %). Se observó que el porcentaje de monocitos PDL-1+ de las células estimuladas únicamente con PHA (89.40 ± 6.90 %) es ligeramente menor al porcentaje de células CD91+ PDL-1+ estimuladas previamente con las OMVs y después con PHA (91.90 ± 2.21 %; 16M-PHA y 93.90 ± 1.65 %; VTRM1-PHA) (Figura 20 c).



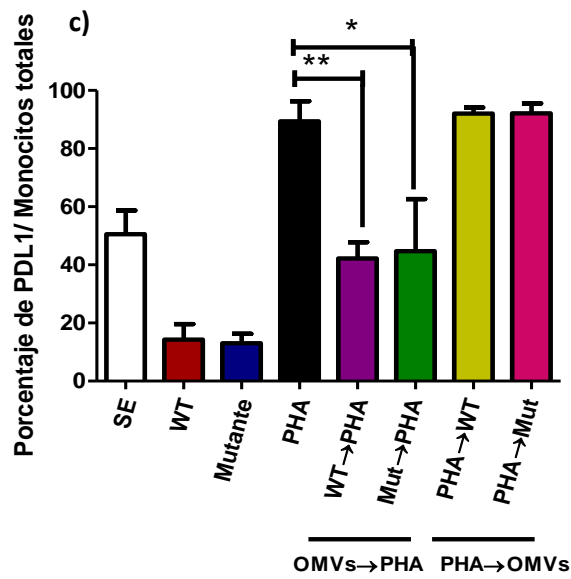


Figura 20: **Porcentaje de PBMCs que expresan el marcador de activación PDL-1.** PBMCs tratadas con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 como primer estímulo durante 12 horas y re estimuladas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA (barra negra y roja, respectivamente) por 24 horas; PBMCs tratadas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA por 12 horas y re estimuladas con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M y VTRM1 (barra gris y naranja, respectivamente) por 24 horas. Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas. (a) Linfocitos T, (b) Linfocitos B y (c) Monocitos. Los resultados son el promedio SEM de 3 experimentos independientes

Cambios en la morfología

Se observó que con el estímulo de las vesículas de *B. melitensis* las células en cultivo presentaban agregados celulares comparado con las células sin estimular (células dispersas en el cultivo y con un tamaño menor) (Figura 21) a las 24 horas del cocultivo. Este efecto fue más evidente con la concentración más alta de OMVs. Para realizar un análisis más profundo de los cambios en la morfología y estructura de las células se realizaron inmunofluorescencias para evaluar el citoesqueleto de actina y α -tubulina en los PBMCs estimulados con las OMVs de *B. melitensis*. (Figura 22-25).

A las dos horas de estimulación con las OMVs de la cepa silvestre (16M) de *B. melitensis*, con la tinción de faloidina-DAPI, se observaron agregados de células, con algunas protrusiones como lamelipodios y filopodios, algo que no se observó en las células sin estimular donde no se observaron agregados de células, y estas células presentaron formas uniformes, redondas, donde la distribución de la actina es cortical; además, en las células estimuladas con OMVs, el citoplasma se extiende un poco más comparado con las células sin estimular, donde casi no se aprecia el citoplasma. (Figura 22 a y 22 c). Con el estímulo de la cepa mutante (VTRM1), a las dos horas, también se observaron agregados, ligeras protrusiones y la distribución de actina fue cortical principalmente (Figura 22 d). En las células estimuladas con PHA, las células presentaron protrusiones aún más marcadas comparadas con las observadas en las células estimuladas con las OMVs de *B. melitensis* (Figura 22 b).

Con la tinción de tubulina-DAPI a las dos horas, no se diferenciaron bien los filamentos de tubulina, pero si se observó el centro organizador de microtúbulos en todas las condiciones. Cabe resaltar que no se observaron estructuras anormales de los filamentos de tubulina en las células estimuladas con las vesículas, comparado con las células sin estimular (Figura 23 a, 23 c y 23 d).

A las 6 horas del estímulo con las OMVs de *B. melitensis*, observamos a las células un poco más maltratadas comparado con el tiempo de 2 horas. En la tinción de faloidina-DAPI, en las PBMCs estimuladas con las OMVs de la cepa silvestre y mutante (16M y VTRM1) observamos células alargadas, con proyecciones del citoesqueleto de actina anormales, además, los núcleos se observaron con alteraciones de tamaño y forma (Figura 24 c, d), comparado con las células sin estimular (Figura 24 a). En las células estimuladas con PHA, se observaron zonas con mayor cantidad

de actina (juzgando por la intensidad de fluorescencia) cerca de la membrana celular, principalmente donde hay más aglomerados de células.

Con respecto al citoesqueleto de tubulina, a las 6 horas de estimulación con las OMVs de la cepa silvestre, observamos que en algunas células el centro organizador esta polarizado hacia la periferia y los núcleos se seguían observando irregulares (Figura 25 c), comparado con las células sin estimular (Figura 25 a). Con el estímulo de OMVs de la cepa mutante, los agregados mostraron algunas células con núcleos alargados (Figura 25 d).

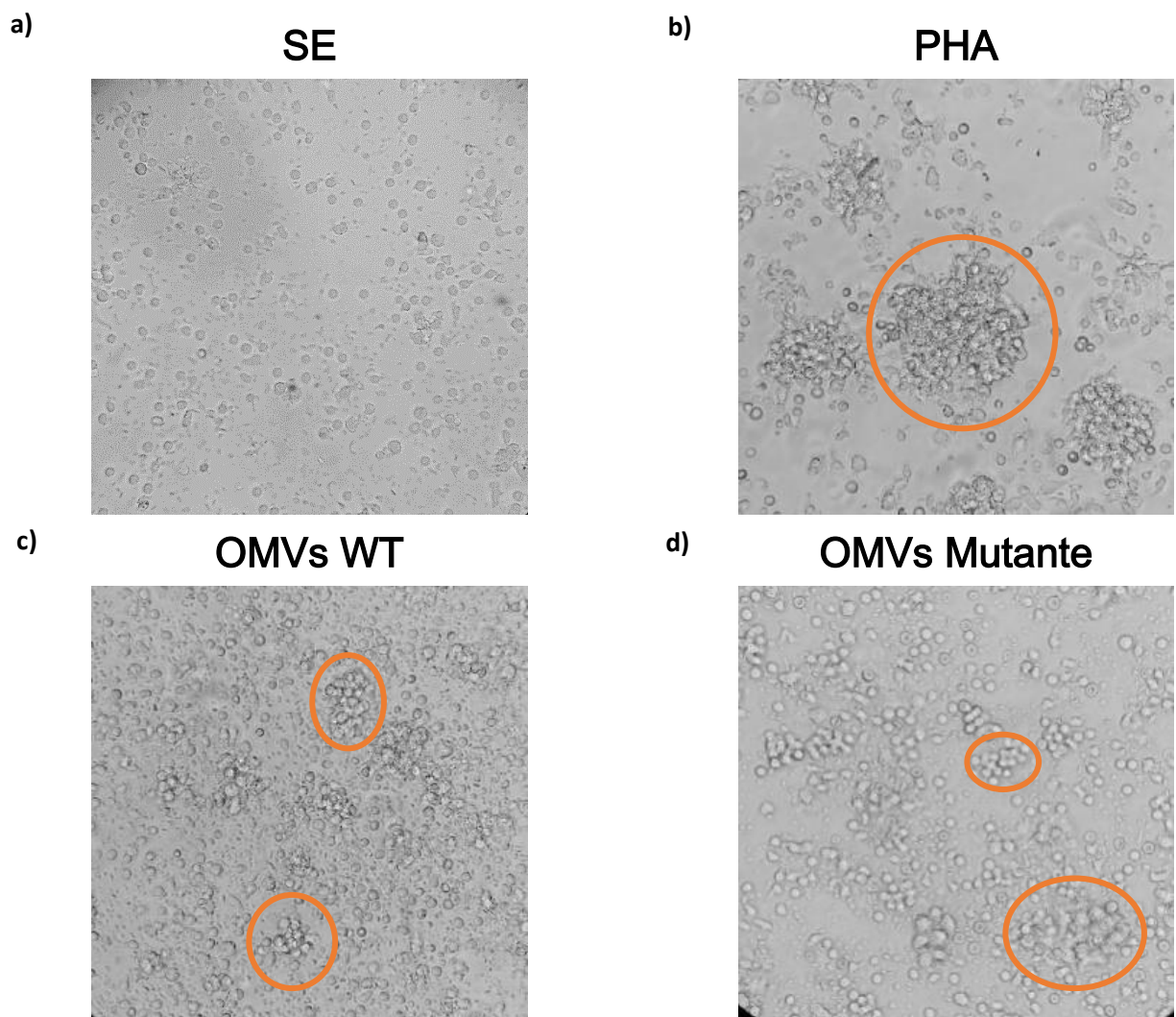
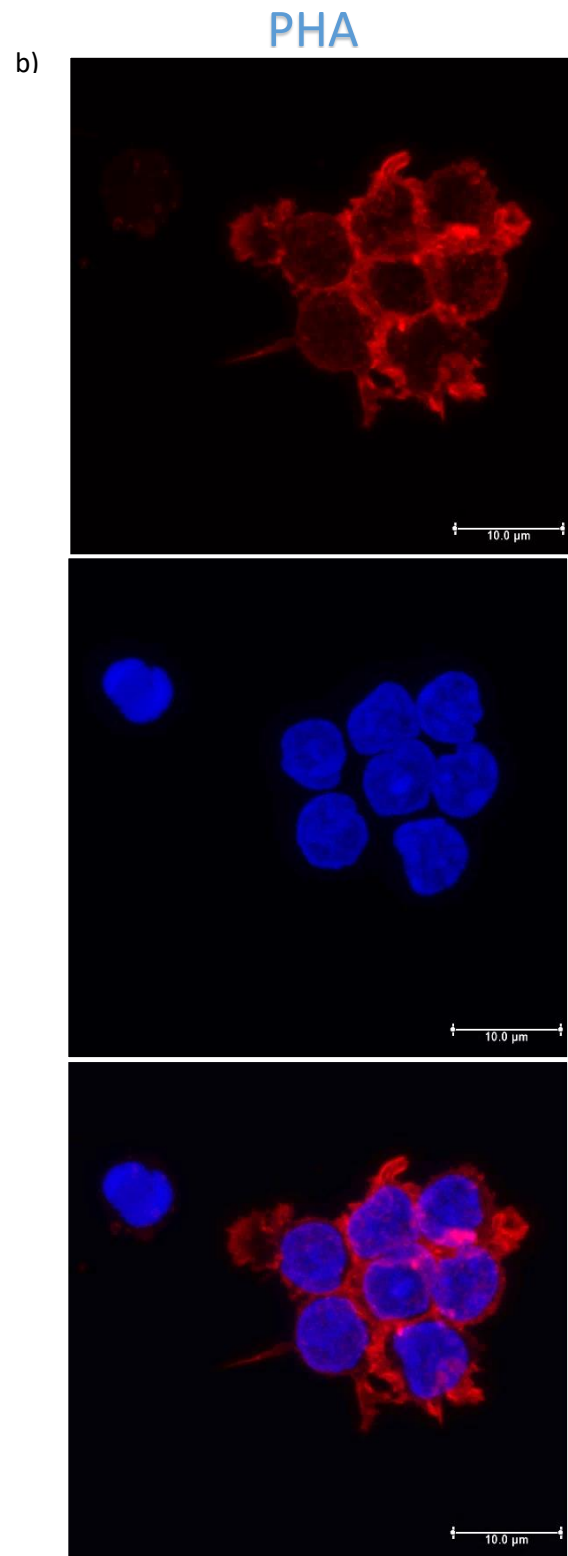
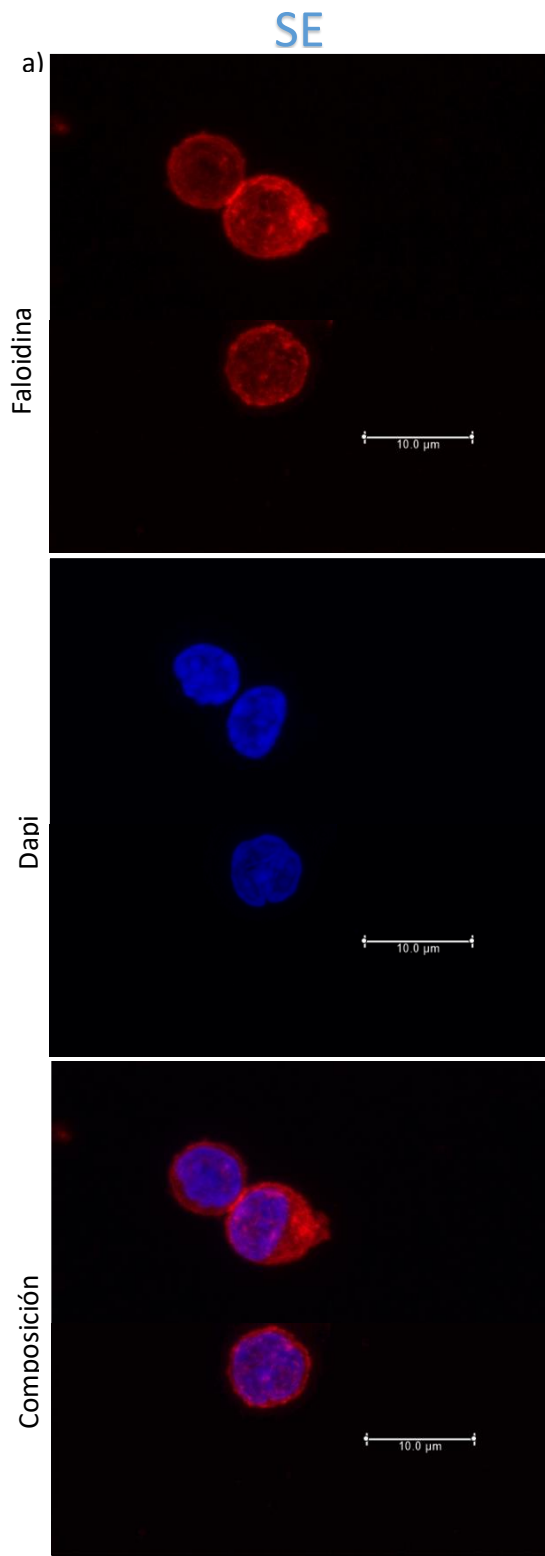


Figura 21: **PBMCs en cultivo estimuladas con las OMVs de *B. melitensis***. Se estimularon PBMCs durante 24h con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* de las cepas 16M (C) y VTRM1 (D); 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PHA; y como control negativo las células sin estimular (SE) (A).



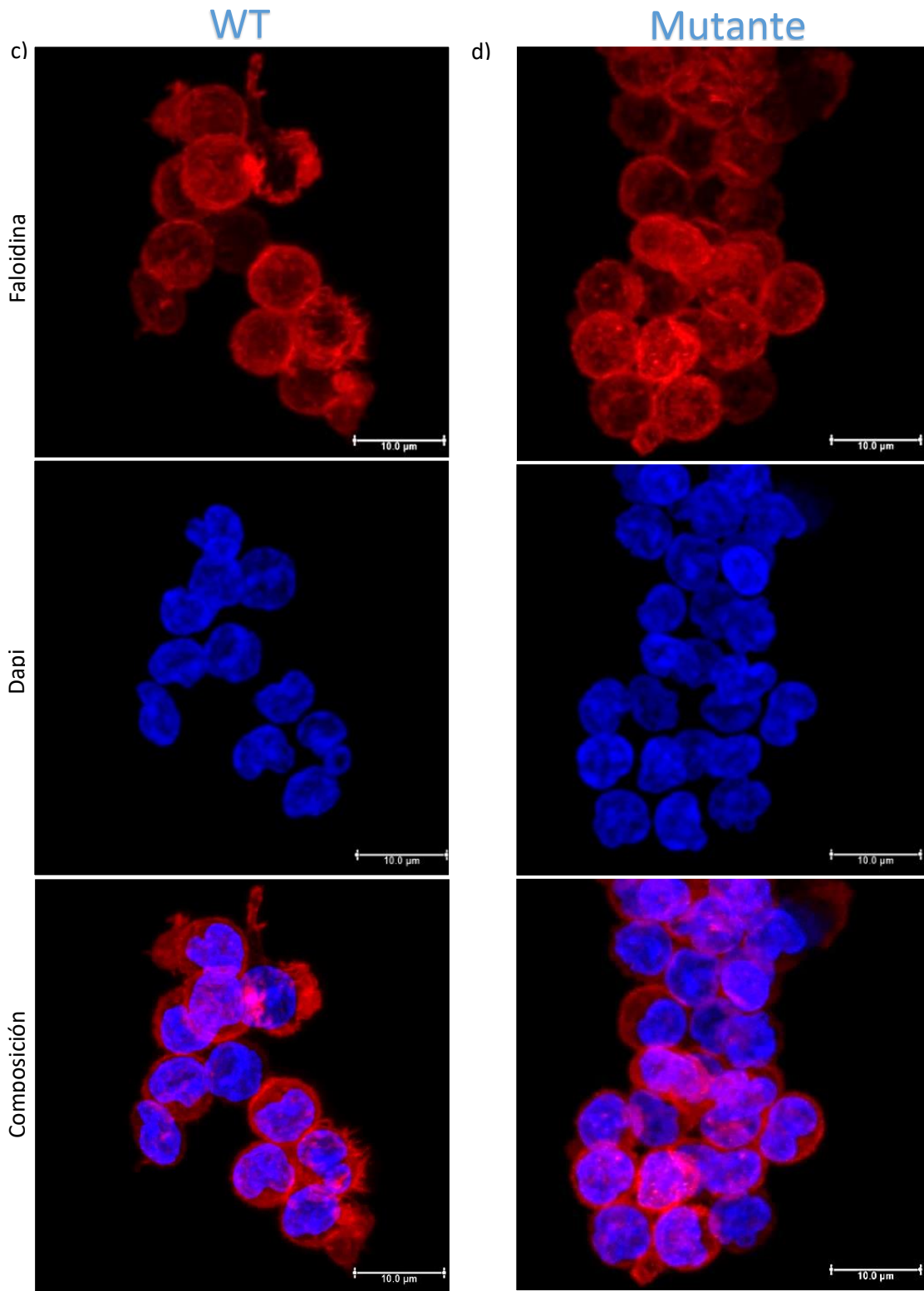
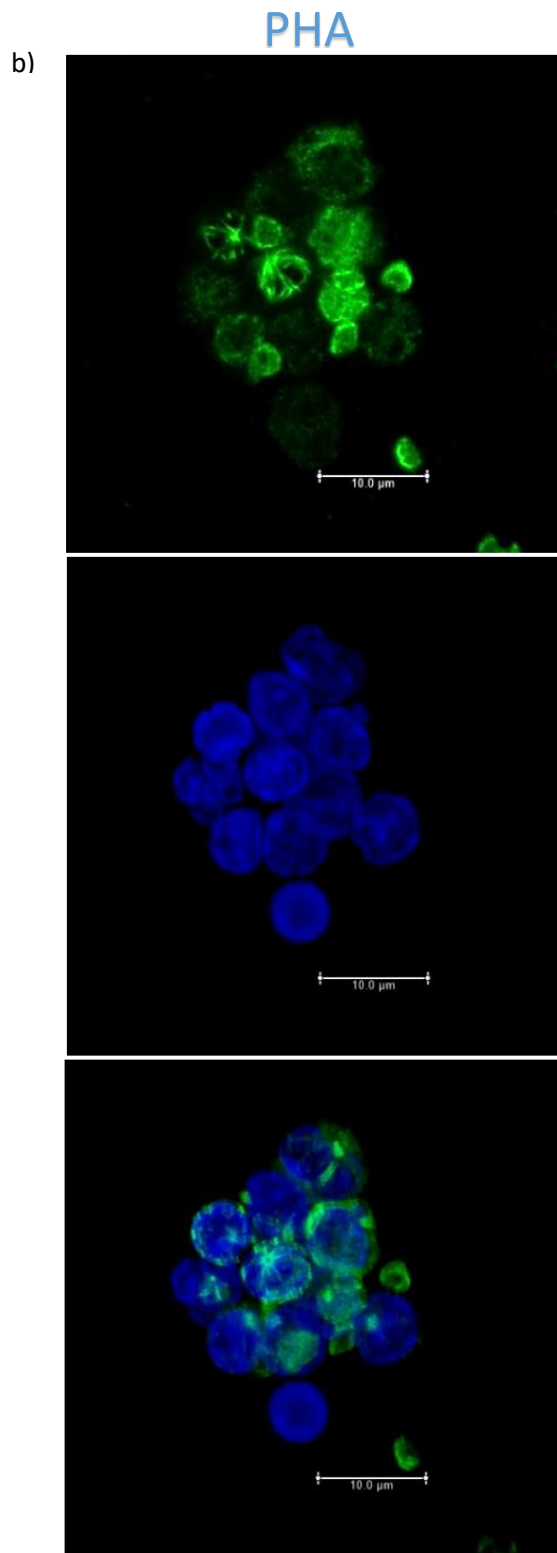
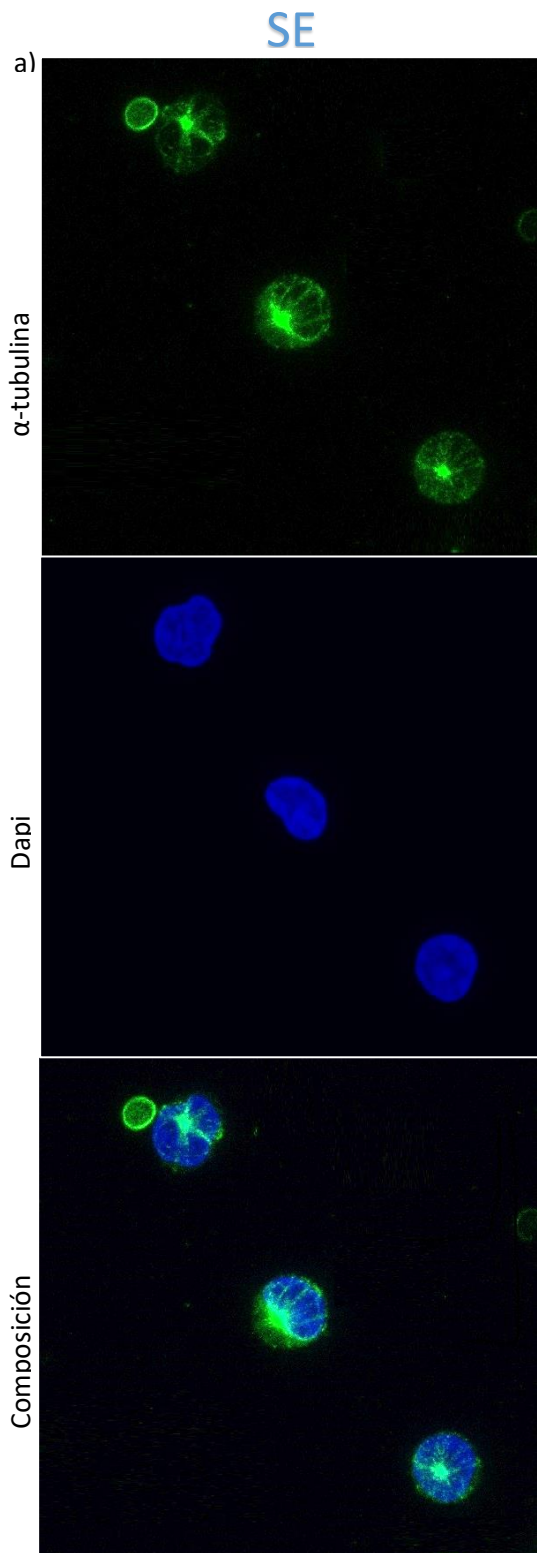


Figura 22: Citoesqueleto de actina de PBMCs estimuladas con OMVs de *B. melitensis*. PBMCs se estimularon con 25 μg/μL de OMVs de *B. melitensis* (16M y VTRM1) durante 2 horas y posteriormente se realizó una tinción con faloidina (citoesqueleto de actina) y dapi (núcleo) y se observó en el microscopio confocal. a) Células si estimular; b) PHA; c) OMVs WT (16M);d) OMVs mutante (VTRM1).



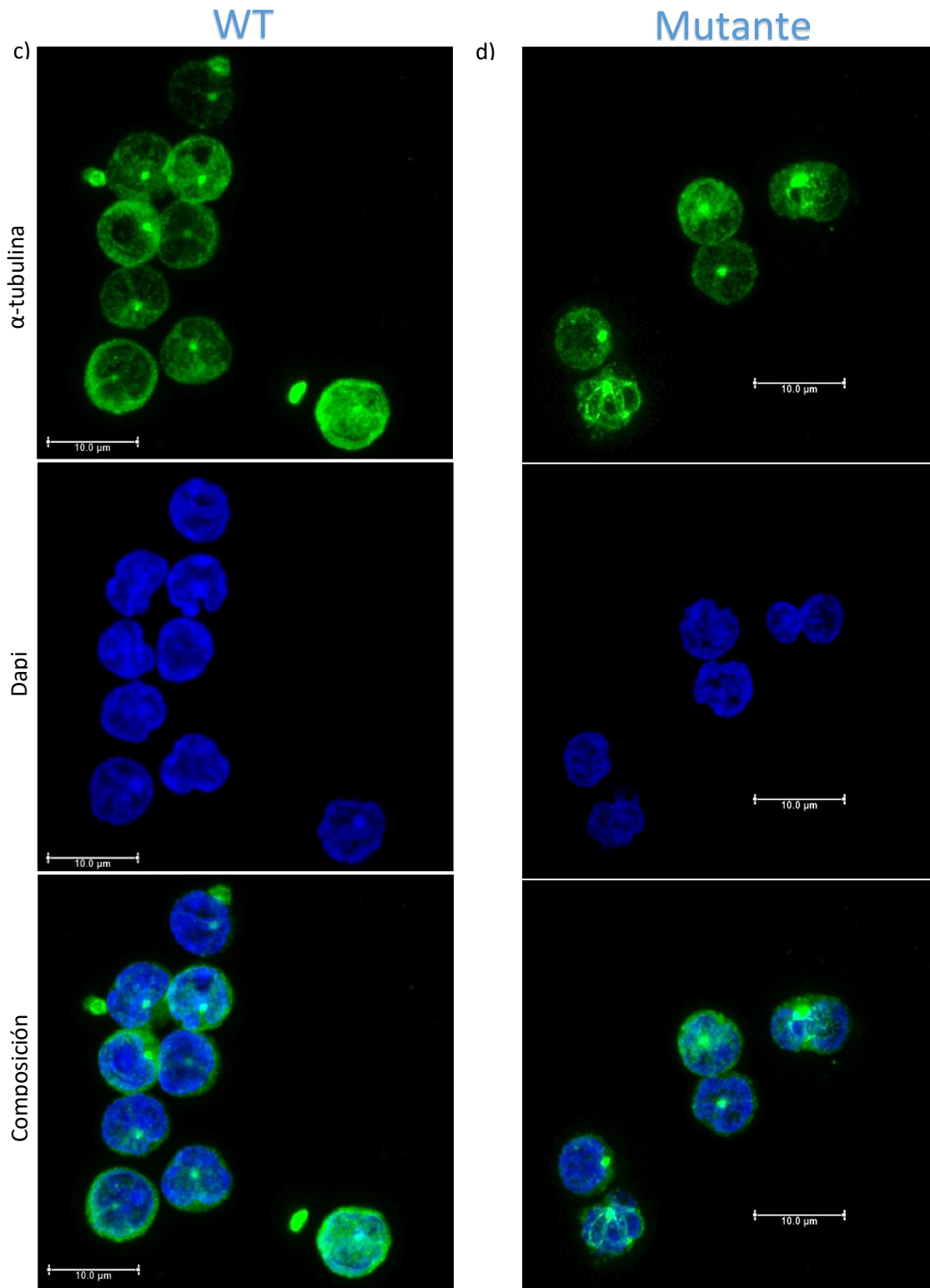
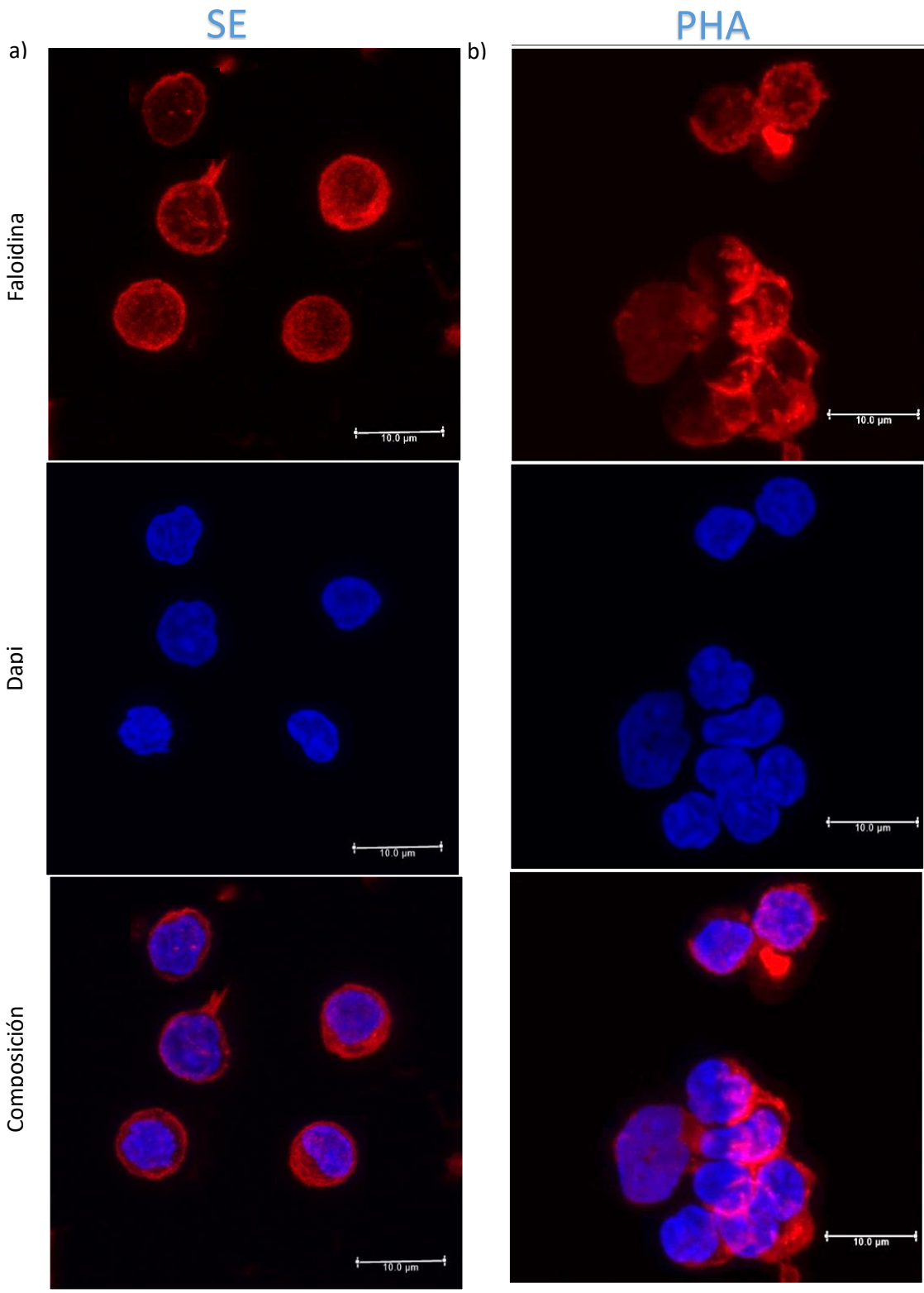


Figura 23: Citoesqueleto de tubulina de PBMCs estimuladas con OMVs de *B. melitensis*. PBMCs se estimularon con 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de OMVs de *B. melitensis* (16M y VTRM1) durante 2 horas y posteriormente se realizó una tinción con α -tubulina (citoesqueleto de tubulina) y dapi (núcleo) y se observó en el microscopio confocal. a) Células si estimular; b) PHA; c) OMVs WT (16M); d) OMVs mutante (VTRM1).



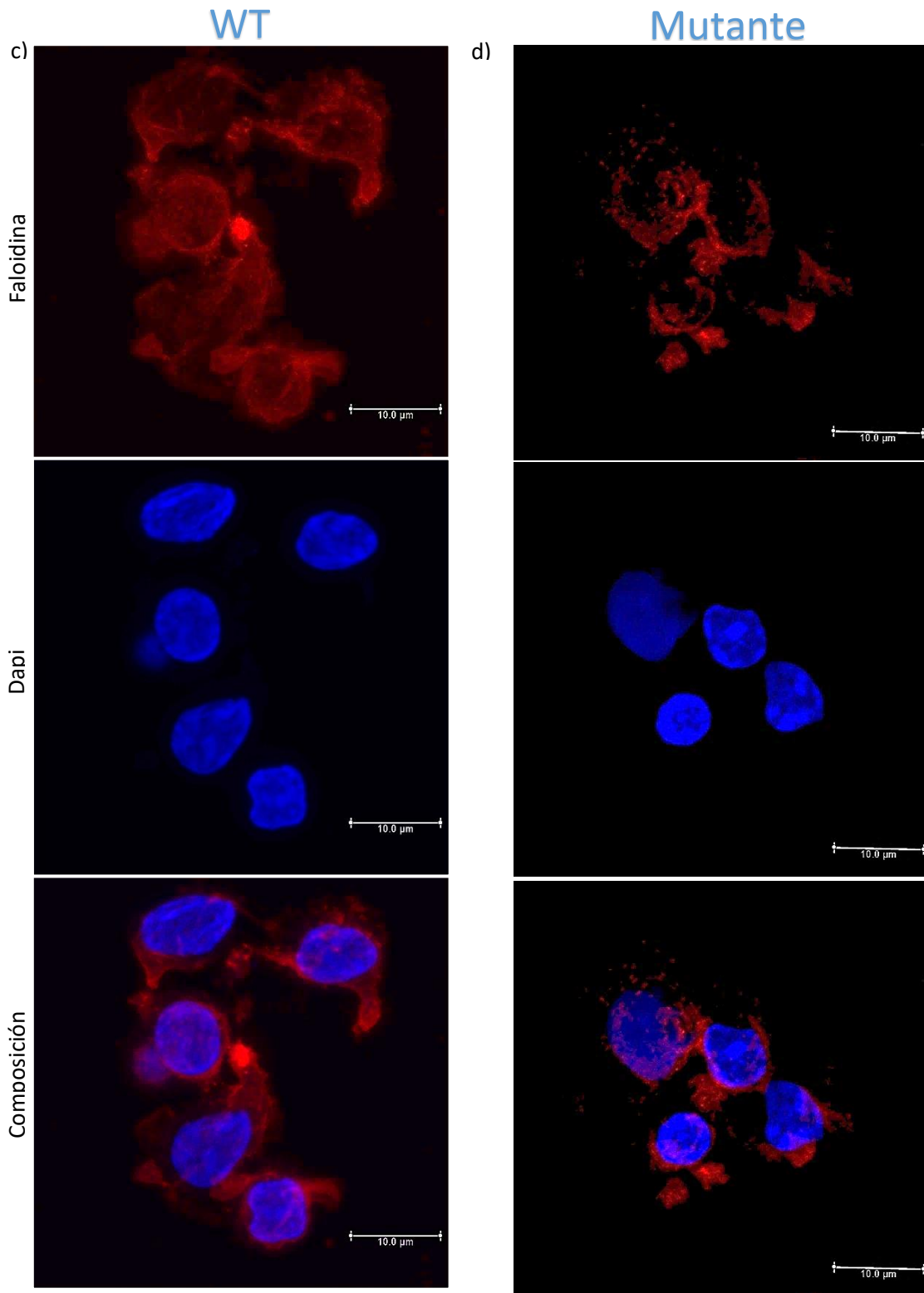
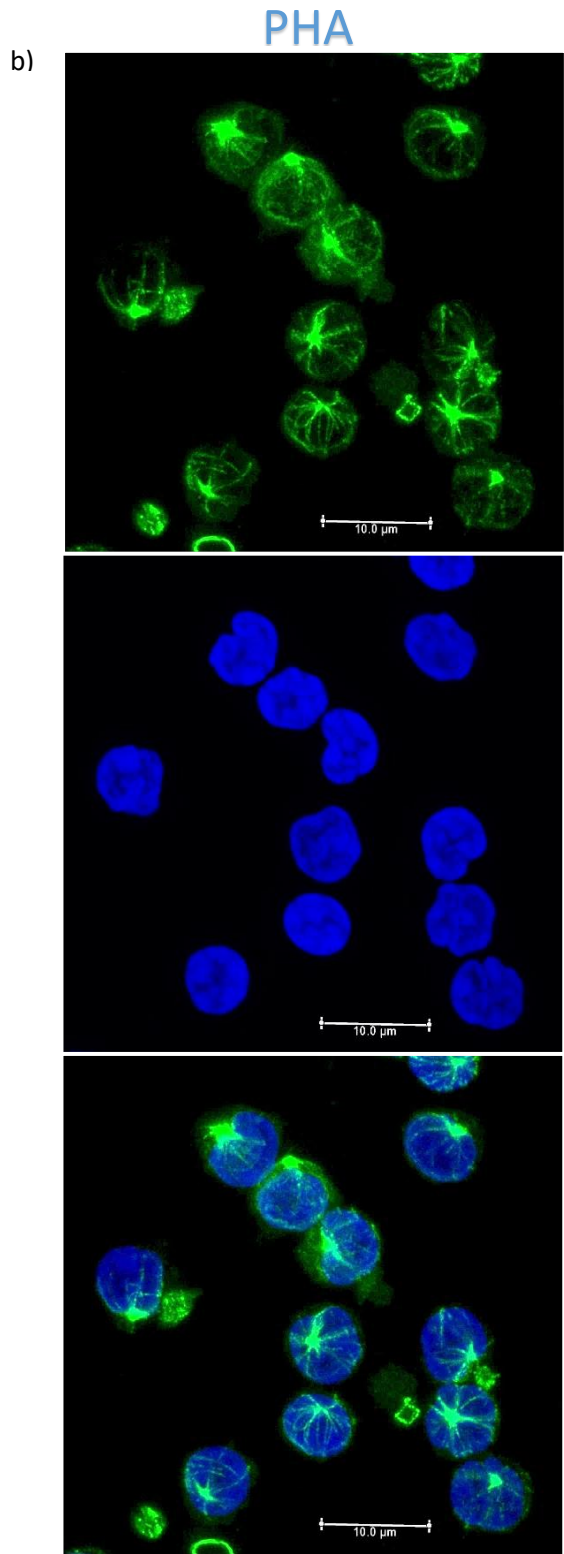
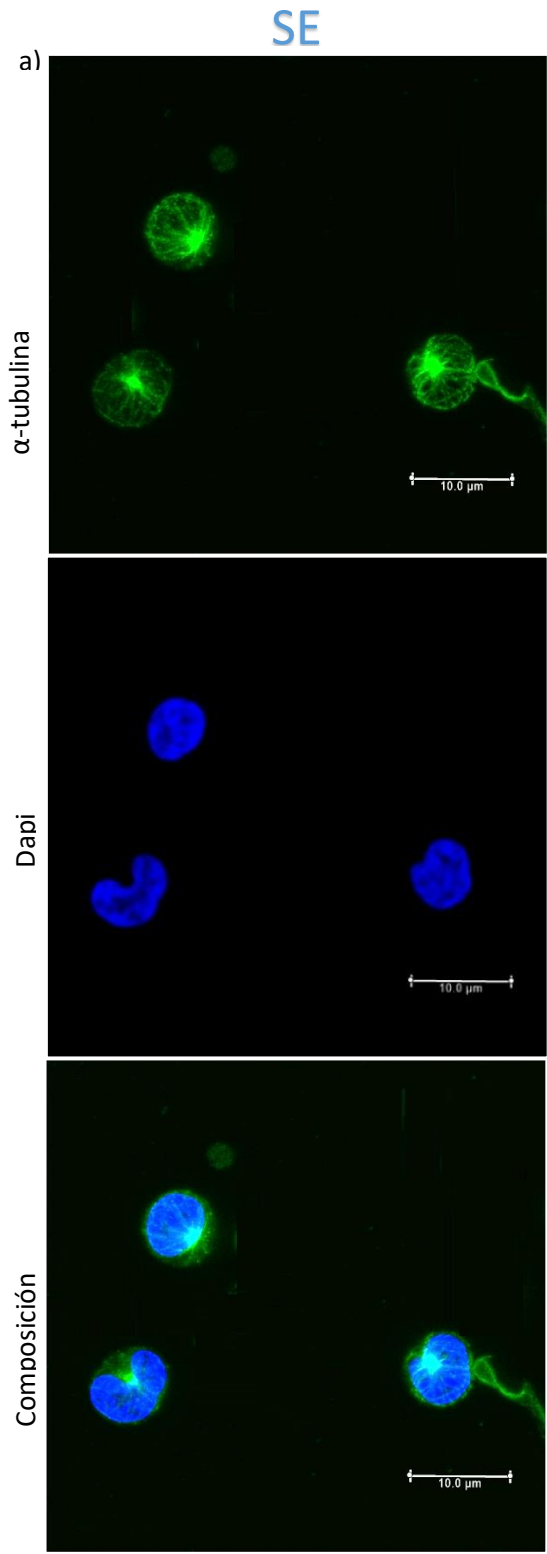


Figura 24: **Citoesqueleto de actina de PBMCs estimuladas con OMVs de *B. melitensis*.** PBMCs se estimularon con 25 µg/µL de OMVs de *B. melitensis* (16M y VTRM1) durante 6 horas y posteriormente se realizó una tinción con faloidina (citoesqueleto de actina) y dapi (núcleo) y se observó en el microscopio confocal. a) Células si estimular; b) PHA; c) OMVs WT (16M);d) OMVs mutante (VTRM1).



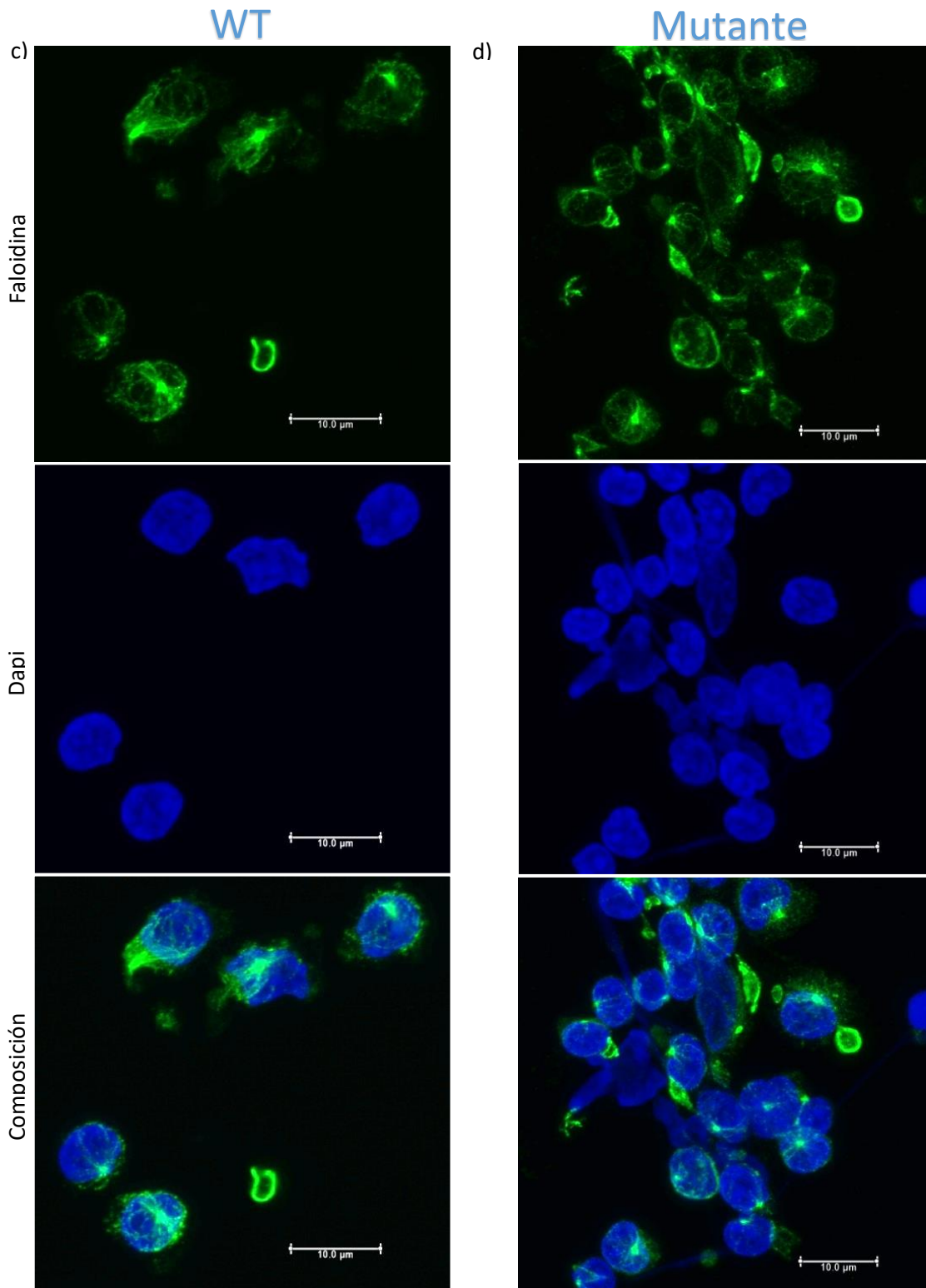


Figura 25: Citoesqueleto de tubulina de PBMCs estimuladas con OMVs de *B. melitensis*. PBMCs se estimularon con 25 µg/µL de OMVs de *B. melitensis* (16M y VTRM1) durante 6 horas y posteriormente se realizó una tinción con α-tubulina (citoesqueleto de tubulina) y dapi (núcleo) y se observó en el microscopio confocal. a) Células si estimular; b) PHA; c) OMVs WT (16M);d) OMVs mutante (VTRM1).

Determinación de daño celular y apoptosis

Al ver que las PBMCs estimuladas con las OMVs de *B. melitensis* presentaron núcleos irregulares y ciertas deformaciones en el citoplasma, se evaluó la capacidad de las OMVs para inducir un proceso de apoptosis o daño en el DNA, en tiempos más prolongados de incubación. Se decidió evaluar la fosforilación de la histona H2AX, que se sabe es un factor clave en el proceso de reparación del ADN ya que cuando ocurre daño del ADN, esta es fosforilada. Para determinar la apoptosis en las células, se evaluó la presencia de PARP-1 degradada ya que esta molécula es la primera en ser degradada por las caspasas, por lo tanto, se considera generalmente como un marcador de apoptosis.

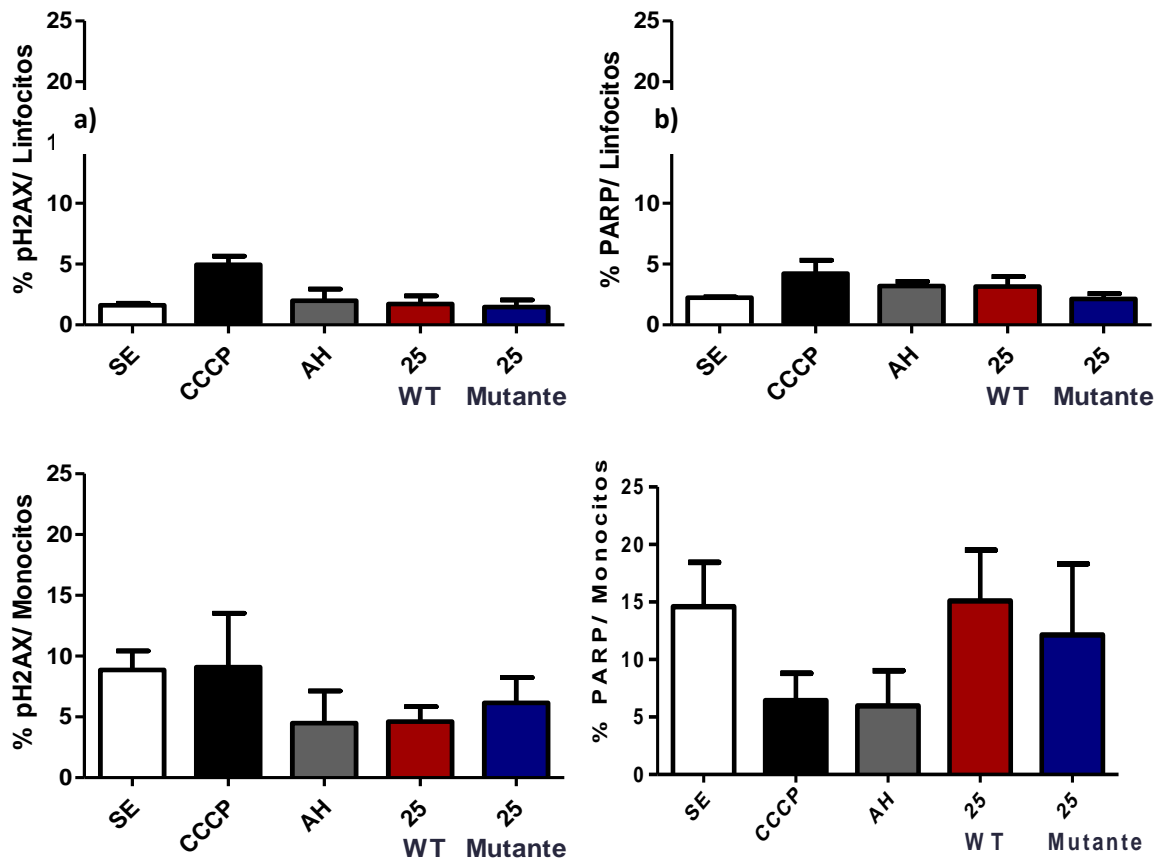


Figura 26: **Porcentaje de linfocitos y monocitos H2AX+ y PARP+.** PBMCs fueron estimulados por 24 horas con diferentes concentraciones (1, 10 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *B. melitensis* OMVs de las cepas 16M y VTRM1 (barras rojas y azules, respectivamente); CCCP (10 μL 10 mM; barra negra); OMVs de *A. hydrophila* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; barra gris), y se tiñeron con anti-pH2AX (a) y anti-PARP escindido en Asp214 (b). Células no estimuladas están indicadas con las barras blancas.

Los resultados que se obtuvieron al analizar la frecuencia de células positivas para H2AX fosforilada en linfocitos ($1.7 \pm 0.6 \%$) y monocitos ($4.6 \pm 1.2 \%$) estimulados con las OMVs de la cepa silvestre, no presentaron ningún cambio significativo comparado con las células sin estimular (linfocitos $1.6 \pm 0.1 \%$; monocitos $8.8 \pm 1.5 \%$). De igual modo las células con las OMVs de la cepa mutante (linfocitos $1.4 \pm 0.5 \%$; monocitos $6.1 \pm 2.0\%$). El porcentaje de células positivas para la molécula PARP escindida tampoco vario con respecto a las células sin estimular (linfocitos; $2.3 \pm 0.06 \%$ monocitos $14.5 \pm 3.8 \%$) cuando las células se estimularon con las OMVs de la cepa silvestre (linfocitos $3.1 \pm 0.8 \%$; monocitos $15.0 \pm 4.4 \%$) y de la cepa mutante (linfocitos $2.1 \pm 0.4 \%$; monocitos $12.1 \pm 6.1 \%$). Ello nos sugiere que las OMVS de las cepas de *B. melitensis* no inducen daño al DNA ni apoptosis en PBMCs.

Discusión

Se ha descrito que las OMVs de las bacterias patógenas Gram negativas pueden estar involucrados en la patogénesis durante el proceso infeccioso. Las OMVs se han involucrado en diversos mecanismos como regulación de la respuesta inmune del hospedero, transferencia de material genético, resistencia a antibióticos, respuesta a diversos tipos de estrés, etc.

Para poder dilucidar los procesos fisiológicos en los cuales pueden estar involucradas las OMVs, es importante identificar las proteínas que son transportadas por las vesículas tanto en su interior como en la superficie de la membrana (72). Se ha descrito que el proceso de selección de las proteínas presentes en las OMVs es selectivo y no depende de la abundancia de las proteínas en la bacteria (73).

Previamente en nuestro grupo de trabajo se identificaron las proteínas presentes en las OMVs de *B. melitensis* 16M (69) y recientemente se han identificado las proteínas presentes en las OMVs de una cepa rugosa mutante (VTRM1) de *B. melitensis* (datos no publicados).

Existe poca información acerca de la interacción y las posibles consecuencias inmunológicas que existen entre OMVs de *Brucella* con células humanas. Así como *Brucella* cuenta con diversos mecanismos para modular la respuesta inmunológica, nos preguntamos si las OMVs de *B. melitensis* podrían participar en la modulación de la respuesta inmune o en la interacción huésped-parásito tal y como se ha descrito que ocurre con otras bacterias patógenas Gram negativas (42,45,49).

Como parte de este trabajo, analizamos la capacidad de las OMVs de *B. melitensis* de inducir daño en las PBMCs. Se ha reportado que las OMVs de otras bacterias patógenas Gram negativas pueden inducir apoptosis en las células del hospedero. Por ejemplo: Se ha demostrado que OMVs de una cepa de *E. coli* O104:H4 contienen la toxina de Shiga 2a (Stx2a), enterotoxina de *Shigella*1, flagelina H4, entre otros componentes los cuales interactúan con células epiteliales intestinales humanas e inducen apoptosis vía activación de caspasa-9 (74). Algunas proteínas de *Brucella* inducen apoptosis como la Omp19 (previamente identificada en las OMVs de *B. melitensis*), la cual induce apoptosis dependiente de TNF α en linfocitos T (75). Nuestros resultados muestran que las OMVs de *B. melitensis* no inducen apoptosis, daño al DNA y no tienen efecto citotóxico en las PBMCs.

Se sabe que *Brucella* al ser una bacteria intracelular evita la apoptosis espontánea de monocitos humanos (76). La prevención de la apoptosis en monocitos requiere que la bacteria sobreviva dentro de las células infectadas. Además se ha visto que el LPS de *Brucella* está involucrado en la inhibición de la apoptosis en monocitos humanos (76). Lo que nos lleva a pensar que la gran cantidad de LPS presente en las OMVs puede participar en la inhibición de la apoptosis en los monocitos. Es posible que durante la infección con *brucella*, la liberación de OMVs prevenga la apoptosis, lo cual impediría que las células fagocíticas infectadas eliminen a la bacteria y esta última pueda seguir proliferando. En nuestros resultados, la presencia o ausencia del antígeno O del LPS no interfiere en la viabilidad de las células y tampoco causa algún daño al DNA o la inducción de apoptosis.

Una vez que se evaluó que el contacto con las OMVs de *B. melitensis* no causan daño a las PBMCs o muerte celular, se decidió evaluar la expresión de marcadores de activación como CD69 y CD86.

CD69 representa uno de los marcadores de activación temprana en linfocitos T y B, células NK, neutrófilos, eosinófilos y monocitos. La expresión de CD69 puede ser detectada 2-3 horas post-estimulación, alcanzando una máxima expresión a las 18-24 horas (77). Se ha descrito que la unión de CD69 con anticuerpos dirigidos a este receptor, resulta en la inducción de varias respuestas celulares, incluyendo la entrada de calcio en diferentes tipos de células, la agregación de plaquetas, la proliferación de células T, la producción de factor de necrosis tumoral (TNF), la citotoxicidad de células NK, la desgranulación de neutrófilos, y la producción de NO (Óxido nítrico) por los monocitos humanos (78).

CD86 se expresa en células T y B activadas, monocitos, macrófagos y células dendríticas y provee señales coestimuladoras eficientes a los linfocitos T para la proliferación, la producción de IL-2 y la generación de células citotóxicas, además, estimula a las células presentadoras de antígeno (APCs) a producir interleucinas, en especial IL-2 y IL-6 (79).

Nuestros resultados muestran que al estimular con las OMVs de *B. melitensis*, las células CD3+ no presentan cambios en el porcentaje de células positivas para las moléculas de activación (CD69 y CD86) de igual modo se observó un bajo porcentaje de monocitos que expresaban CD86 en superficie, lo cual nos resulta sorprendente ya que esperábamos una mayor expresión de CD86 debido a la gran variedad de antígenos presentes en las OMVs. Por otro lado, en los linfocitos B CD19+, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaban los marcadores de activación (CD69 y CD86). Es probable que la mayoría de los linfocitos B estimulados

por las OMVs se activen directamente por el contacto con antígenos propios de las vesículas, esto, a través de sus miles de receptores como TLRs (TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10) (80), NLRs (NOD1, NOD2, NALP1, NALP3, NAIP) (81) o moléculas como DEC-205 (receptor de lectina tipo C), lo cual podría inducir una mayor expresión de las moléculas CD69 y CD86.

Con respecto a las moléculas de inhibición, se sabe que la expresión de PD-1 y su ligando (PDL-1) ha sido utilizada por una variedad de microorganismos para atenuar la inmunidad antimicrobiana y facilitar la infección crónica, esto debido a que la interacción entre estas moléculas modulan la señalización del TCR resultando en la baja producción de citocinas, y una baja proliferación de dichas células. (70,71). Nuestros resultados muestran que el estímulo de OMVs no induce cambios en el porcentaje de células que expresan las moléculas de inhibición (PD-1 y PDL-1) en linfocitos T y B, sin embargo, en monocitos el porcentaje de células PD-1+ y PDL-1+ disminuye. Cabe resaltar que la ausencia del antígeno O del LPS en las OMVs de la cepa rugosa no es un factor importante en la inducción de moléculas de activación ni inhibición, ya que los pocos cambios observados con estas vesículas son similares a los vistos cuando está presente el antígeno O del LPS en las OMVs de la cepa lisa.

Otra posible explicación a la baja respuesta inducida por las OMVs, tal vez se deba a que *Brucella* ya sea muerta, viva o incluso fragmentos de membrana de la bacteria, contienen grandes cantidades de LPS (Br-LPS) que se sabe, es débil inductor de la activación en macrófagos y células dendríticas (19). Se ha observado que Br-LPS es capaz de modular la presentación de antígeno *in vivo*, ya que el Br-LPS de la bacteria viva o muerta que es ingerido por macrófagos, dura varios meses circulando en el cuerpo del ratón. Esto indica que el Br-LPS resiste la degradación intracelular por macrófagos. Como consecuencia, el Br-LPS es reciclado a la superficie de los macrófagos formando macrodominios (compuestos de: lipid rafts, la molécula MHC-II y el Br-LPS), donde una importante proporción del complejo MHC-II-péptido, es secuestrado en estos macrodominios en la superficie celular obstruyendo la interacción del complejo MHC-II-péptido y el TCR, impidiendo la presentación correcta de antígeno a los linfocitos T (81,82). Sin embargo, el proceso por el cual *Brucella* libera Br-LPS dentro de las células no se ha aclarado, pero se cree que se produce a través de la formación de fragmentos de vesículas de membrana externa enriquecidas en Br-LPS (83). Se cree que esta baja estimulación de la actividad y toxicidad de las APCs, provee una ventana de tiempo que permite el establecimiento de un nicho intracelular replicativo antes de que ocurra la activación correcta de la respuesta inmune adaptativa (19).

La respuesta inmune contra *Brucella spp.* se ha estudiado principalmente en modelos de ratón, y mucha evidencia demuestra que la producción de INF- γ mediado por la respuesta Th1 (INF- γ y TNF- α , principalmente), es crucial para el control de la infección con *Brucella*, de hecho, es bien sabido que ratones BALB/c que presentan una respuesta Th2, muestran una habilidad baja para controlar la infección por *Brucella* (84). Por otro lado, se sabe poco de la respuesta Th17 contra la brucelosis, pero se cree que esta citocina es importante para controlar la infección y eliminar a la bacteria, ya que esta citocina es necesaria para la inducción de INF- γ e IL-12 en macrófagos y células dendríticas (84, 85). El equilibrio entre las citocinas de las respuestas Th1/Th2/Th17 puede estar relacionado con la resistencia o susceptibilidad a la infección por *Brucella*.

Nuestros resultados muestran que con el estímulo de OMVs, disminuye la concentración de IL-17 en el sobrenadante de las PBMCs. IL-17 es una citocina pro-inflamatoria muy importante, producida por una variedad de células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, células NK, y NKT), la cual induce la producción de péptidos antimicrobianos, la activación del sistema del complemento, activa la respuesta de fase aguda y la secreción de citocinas como, TNF- α , IL-1 β e IL-6. Además, IL-17 media la inducción de INF- γ e IL-12, en macrófagos, enlazando la respuesta Th1 y Th17 *in vivo*. Por lo tanto, IL-17 juega un papel importante en la protección del hospedero contra infecciones (86). Se sabe que en infecciones pulmonares con *Mycobacterium tuberculosis*, se induce la producción de IL-17 en etapas tempranas y que esto da lugar a desarrollo de linfocitos T secretores de INF- γ (87). Además ratones deficientes de IL-17 infectados con BCG (bacilo de calmeth-guerin, cepa vacunal de *M. tuberculosis*) muestran una deficiencia en la formación de granulomas, lo que sugiere que IL-17 es requerido para un desarrollo eficiente de la respuesta Th1 (88). Por otro lado, en un modelo de brucelosis en ratón se encontró que la producción de IL-17 no aumenta con la infección con *Brucella* (84).

Dicho esto, creemos que la baja concentración de IL-17, generada por las OMVs de *Brucella melitensis* podría afectar la inducción correcta de una respuesta Th1 que es necesaria para controlar la infección por *Brucella*, lo cual correlaciona con lo observado en nuestros resultados, ya que al analizar la concentración de INF- γ con el estímulo de las OMVs, esta no aumenta ni disminuye la concentración de dicha citocina. Sabemos que la principal función de esta citocina es la activación de los macrófagos para que ejecuten mecanismos efectores para la eliminación de bacterias, como lo son la producción de especie reactivas de oxígeno (ROS), intermediarios reactivos de nitrógeno

(RNIs) y apoptosis (89). Además, INF- γ , aumenta la presentación de antígeno al inducir la expresión de moléculas MHC de clase II, promoviendo la diferenciación de linfocitos T CD4+, a una subpoblación Th1 (90). Por lo tanto, podríamos especular que las OMVs secretadas por *Brucella* actúan como un mecanismo más para escapar de la respuesta inmune y así, lograr la persistencia de la bacteria dentro del hospedero y con ello una infección crónica.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la concentración de TNF- α con el estímulo de las OMVs. Se sabe que TNF- α es una citocina proinflamatoria estrictamente controlada, los principales productores son macrófagos activados, linfocitos T, y células dendríticas. Actúan en unión con INF- γ estimulando la producción de especie reactivas de oxígeno (ROS), e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNIs). Además regula diversas funciones en varios tipos de células como la proliferación, diferenciación, apoptosis y estimula la migración de las células del sistema inmune al sitio de infección (91). Con respecto a la secreción de TNF- α en la infección con *Brucella*, se sabe que en el caso de células dendríticas humanas infectadas con *B. suis*, la secreción de TNF- α y la capacidad de presentar antígenos se ve abatida debido a la presencia de la proteína Omp25 presente en la membrana externa de *Brucella* (92). En otro estudio con células dendríticas infectadas con *B. abortus*, se observaron niveles bajos de TNF- α , un efecto relacionado a la activación incompleta de dichas células durante la infección de *Brucella* (93). Con OMVs de *B. abortus*, se observó que la preincubación con dichas vesículas inhibe la respuesta de TNF- α de células THP-1 a la estimulación con LPS de *E. coli* (agonista de TLR4), Pam3Cys (agonista de TLR2) y flagelina (agonista de TLR5); y esta misma preincubación de células THP-1 con OMV resultó en una inhibición significativa de la respuesta de TNF- α a la infección por *B. abortus* (68). Sin embargo, un estudio muestra que en macrófagos de ratones WT infectados con *B. abortus* aumenta la secreción de TNF- α , y este efecto es dependiente de la molécula MyD88 tras la activación de TLR2 (94).

Brucella utiliza la inducción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 para la evasión del sistema inmune. IL-10, inhibe la actividad microbicida de macrófagos contra *Brucella*, además es un antagonista de la actividad de IFN- γ , puede ser producido por linfocitos T CD4+, linfocitos B y macrófagos. (95). Se ha visto que en ratones infectados con *Brucella*, pequeñas cantidades de IL-10 son detectadas durante las primeras semanas de la fase aguda de la infección. Se cree que la síntesis endógena de IL-10 (incluso en pequeñas cantidades) podría regular la producción de INF- γ y la respuesta Th1. Además, los linfocitos B son una fuente importante de IL-10, y se ha observado que

ratones deficientes de linfocitos B son capaces de restringir la infección de *B. abortus* comparados con los ratones silvestres (96). Nuestros resultados muestran que la concentración de IL-10 es ligeramente mayor cuando las células son estimuladas con la OMVs, por lo tanto, la presencia de dicha citocina podría estar inhibiendo directamente la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 y la molécula de activación CD69 en los monocitos.

Algo muy interesante que observamos en nuestros resultados fue la presencia de IL-6 en grandes cantidades con el estímulo de las OMVs, se sabe que esta citocina tiene un papel tanto pro inflamatorio como anti inflamatorio. En varios modelos de ratón, se ha demostrado que la señalización clásica de IL-6 media la activación de vías antiinflamatorias, esta señalización consta de la unión de la citocina IL-6 con su receptor IL-6R localizado en la membrana de las células blanco. En cambio, la trans-señalización de IL-6 (el receptor IL-6R se encuentra de manera soluble) se ha observado en desordenes inflamatorios crónicos (97). No sabemos a ciencia cierta el papel que está desempeñando esta citocina con el estímulo de las OMVs, pero se ha observado que en células THP-1 (línea de monocitos humanos) infectadas con *Brucella suis* 503, se producen grandes cantidades de IL-6 además de otras citocinas proinflamatorias como IL-1, e IL-8. En los pacientes humanos hay un aumento del receptor de IL-2 en la superficie de los linfocitos, así como un aumento moderado de IL-6, IL-8, IFN- γ , pero no IL-4, TNF- α , o IL-1b (19)

Con esto resultados, nos interesó evaluar si las OMVs de *B. melitensis* poseen propiedades inmunoreguladoras, ya que se observa que el contacto de estas vesículas con las PBMCs mantiene un ambiente de baja inflamación (ya que IL-17 disminuye, INF- γ no cambia y aumenta IL-10) lo cual no es de sorprenderse ya que *Brucella* cuenta con diversos mecanismos para permanecer por largo tiempo dentro del hospedero sin ser detectada.

Nuestros resultados nos hacen pensar que las OMVs mantienen un perfil inhibitorio en las células que ya están activadas, disminuyendo las moléculas de activación y aumentando las moléculas de inhibición, ya que observamos que cuando los linfocitos T y B activados por el mitógeno (PHA) se ponen en contacto con las OMVs de *B. melitensis*, se modula de manera negativa dicha activación disminuyendo el porcentaje de linfocitos T y B CD69+; además, el porcentaje de linfocitos B PD1+ aumenta con la re-estimulación de OMVs, y el porcentaje de PDL1+ tiende a aumentar en los linfocitos T y B. Por lo tanto, esta regulación en las moléculas de activación e inhibición mediada por OMVs podría ser una estrategia para atenuar las respuestas inmunes, y evitar la eliminación de la bacteria. Sin embargo, comparando con el estímulo mitogénico (PHA control), observamos que la

pre incubación con OMVs tiende a incrementar el porcentaje de linfocitos B CD86+, y de monocitos CD69+, lo que nos sugiere que las OMVs no inactivan completamente a las células ya que éstas son capaces de responder ante un segundo estímulo como lo fue el PHA (mitógeno). Sin embargo disminuye el porcentaje de linfocitos T CD69+ PD-1+, PDL-1+. Se ha visto que la pre incubación con OMVs de *B. abortus* inhibe la respuesta de TNF- α y la respuesta de IL-8 de células THP-1 a la estimulación con LPS de *E. coli* (agonista de TLR4), Pam3Cys (agonista de TLR2) y flagelina (agonista de TLR5), además este tratamiento dio como resultado una reducción significativa de la expresión de MHC-II inducida por IFN- γ en monocitos THP-1, en comparación con las células que sólo fueron tratadas con IFN- γ (64). También se ha observado que en macrófagos altamente infectados con *Brucella*, estos no se activan significativamente durante los primeros días de infección liberando bajas cantidades de citocinas proinflamatorias (98). Sorprendentemente, estas células fagocíticas fuertemente infectadas con *Brucella* no son refractarias a la activación, ya que pueden activarse fácilmente con LPS enterobacteriano (99).

En cuanto a los cambios morfológicos en cultivo, pensamos que tal vez la formación de agregados celulares se deba a un aumento de expresión en las moléculas de adhesión, ya que se ha visto que OMVs de *B. abortus* inducen un aumento dependiente de la dosis en la expresión de ICAM-1 en células THP-1, lo que a su vez aumenta la adhesión de estas células a células endoteliales humanas (64). En este mismo estudio se observó que tanto la pre-incubación como la co-incubación con OMVs de *B. abortus* dan como resultado un mayor número de bacterias internalizadas en células THP-1. Lo cual sugiere que las OMV liberadas por *B. abortus* antes o durante la interacción con macrófagos producen un aumento significativo en la internalización de *Brucella* por dichas células, este aumento de la captación de la bacteria puede favorecer el establecimiento de *Brucella* dentro del hospedero (64).

Se decidió indagar más acerca de los cambios morfológicos en las células y ver si estos cambios eran resultado de la reorganización del citoesqueleto de actina o tubulina. Diversos procesos dependientes del citoesqueleto como son la adhesión mediada por integrinas, la formación de la sinapsis inmunológica (cluster de activación supramolecular central y periférico (cSMAC y pSMAC, respectivamente), el establecimiento de la polaridad de la células para la liberación de citocinas y la señalización intracelular, se requieren además, para iniciar y sustentar la activación de los leucocitos (101). El sistema de microtúbulos y actina, provee un esqueleto celular que es requerido para dirigir

estos procesos y fundamentalmente controlar la activación de las células en la interacción célula T-APC (102).

Mediante inmunofluorescencias observamos que las PBMCs estimuladas con las OMVs de *B. melitensis*, presentaban protrusiones en forma de lamelipodios y/o filopodios. Se sabe que durante la interacción célula T-APC se induce la polimerización explosiva de los monómeros de actina (F-actina) en forma de estructuras de lamelipodios, lo que incrementa el área de contacto (101). Sin embargo habría que hacer experimentos para saber si estas protrusiones son causa de la activación de las células o es debido a que las células están migrando o adhiriéndose a la superficie.

En algunos casos se ha visto la manipulación del citoesqueleto por proteínas de bacterias patógenas, como es el caso de las proteínas de *E. coli* que mimetizan las proteínas del hospedero para manipular el citoesqueleto de actina (103). Hasta ahora, no hay reportes acerca de la formación de filopodios durante la infección de *Brucella*. Sin embargo Felix y colaboradores en 2014, muestran que la proteína BtpA de *Brucella* (proteína que contiene un dominio TIR: que se sabe modula a la baja la maduración de células dendríticas e inhiben la activación de NFkB inducida por TLR), induce protrusiones ricas en actina (filopodios) en células HeLa, en un proceso dependiente de Cdc42. Se cree que el motivo WxxxE presente en esta proteína podría inducir la activación de GTPasas de manera similar a las proteínas que pertenecen a la familia de efectores del sistema de secreción tipo 3 T3SS WxxxE/SopE. La formación de filopodios, fibras de estrés y lamelipodios son fenotipos asociados con una activación selectiva de GTPasas como Cdc42, RhoA y Rac1 respectivamente (100).

Algo interesante que observamos, fue la deformación en los núcleos de las células estimuladas con OMVs, lo cual nos llevó a analizar si la estimulación con OMVs inducía daño al DNA o apoptosis en PBMCs, sin embargo, nuestros resultados muestran que no hay daño al DNA ni apoptosis. Por lo tanto no sabemos a qué se deba este cambio en la morfología nuclear de las células.

Conclusión

Las OMVs cuentan con la ventaja de pueden llegar a sitios distante con una gran cantidad de moléculas activas (como factores de virulencia), específicas y / o altamente concentradas.

La secreción de efectores a través de las OMVs podría ser otro mecanismo de *Brucella* para la evasión y modulación de sistema inmune.

La secreción de OMVs podría verse aumentada dentro de la célula hospedero con la acidificación que sufre la BCV (Brucella-containing vacuole) durante el transito vesicular hacia el retículo endoplásmico.

Brucella podría secretar las OMVs dentro y fuera de las células hospedero, que ayudarían a la bacteria a modular la activación de las células, así como la secreción de citocinas proinflamatorias. Evitando una respuesta correcta en contra de *Brucella* y así, propiciar el establecimiento y replicación de este.

Perspectivas

- Analizar si la integridad de las OMVs (su rompimiento o fragmentación) tiene efecto en la activación/inhibición de las células.
- Analizar la expresión de TLRs (TLR9, TLR6, TLR4 y TLR2) en células estimuladas con OMVs.
- Identificar el mecanismo de entrada de las OMVs (específicamente por lipid rafts; si es que lo hay).
- Analizar expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, LFA-1 y VLA-4).
- Analizar los cambios del citoesqueleto en un modelo de línea celular (línea de fibroblastos).

Apéndice

Apéndice 1. Preparación de reactivos y soluciones utilizadas

a) Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1x

- Tomar 5 mL de PBS 10x y diluir en 450 mL de agua inyectable

b) Medio RPM1 suplementado a 10% de SFB

- Suero fetal bovino (SFB)5 mL
- L-glutamina 100x (200mM)1 mL
- Penicilina 50 -100 UI/mL
- Estreptomicina 50 -100 Ug/ML
- HEPES (1M) 1 mL
- Medio RPM1 50 mL

c) Azul de tripano 0.4%

- Azul de tripano 4.0 g
- Solución salina 100 mL

d) Solución amortiguadora de FACS

- Albúmina sérica bovina (BSA) 0.1%
- Azida de sodio 0.01%
- PBS 1x..... 100 ML

e) Paraformaldehído 1%

- Paraformaldehído 4 g

Aforar a 100 mL de PBS 1x (no esteril), disolver mediante calentamiento. Diluir 5 mL de esta solución en 35 mL de PBS 1x para obtener una solución al 1%.

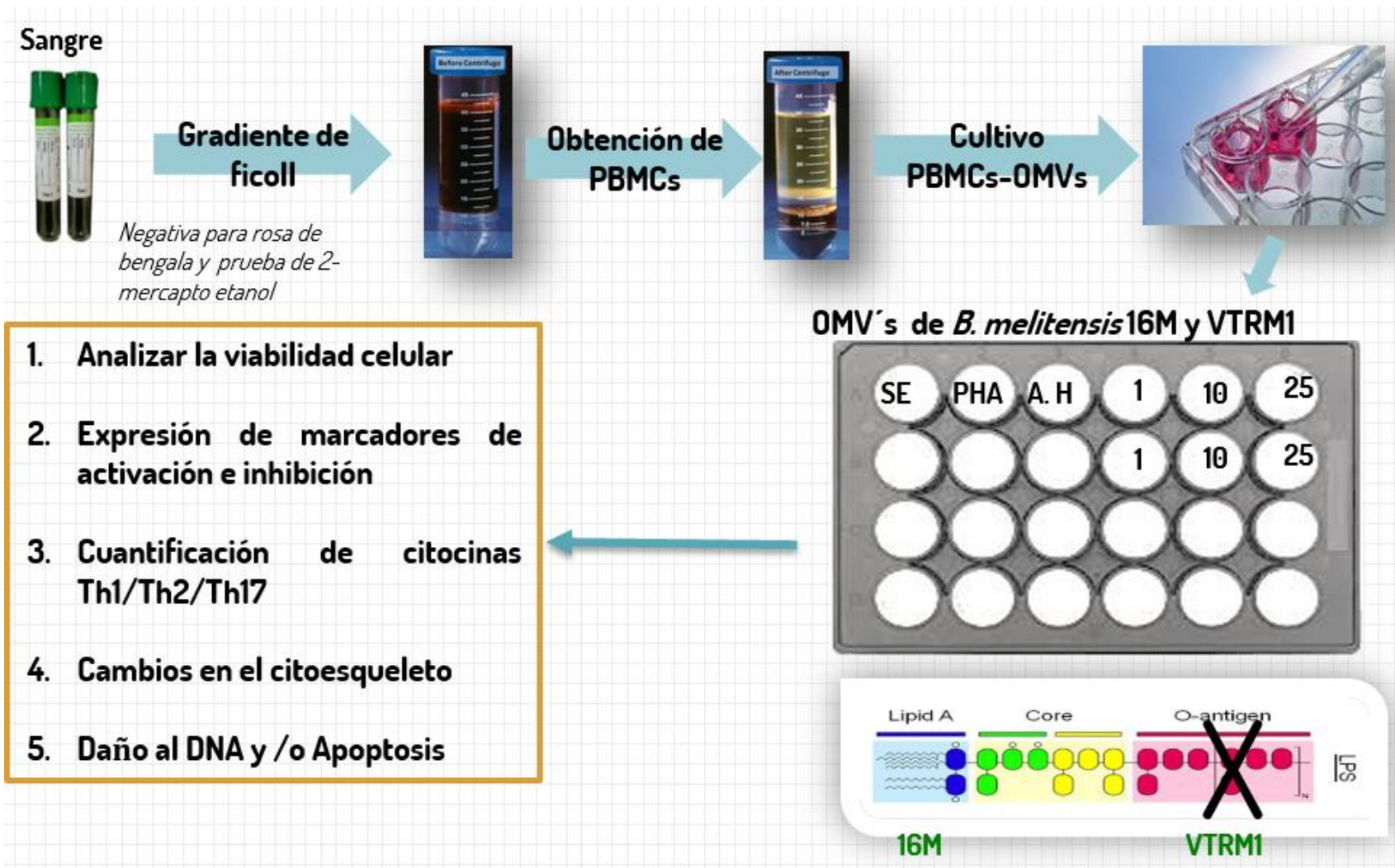
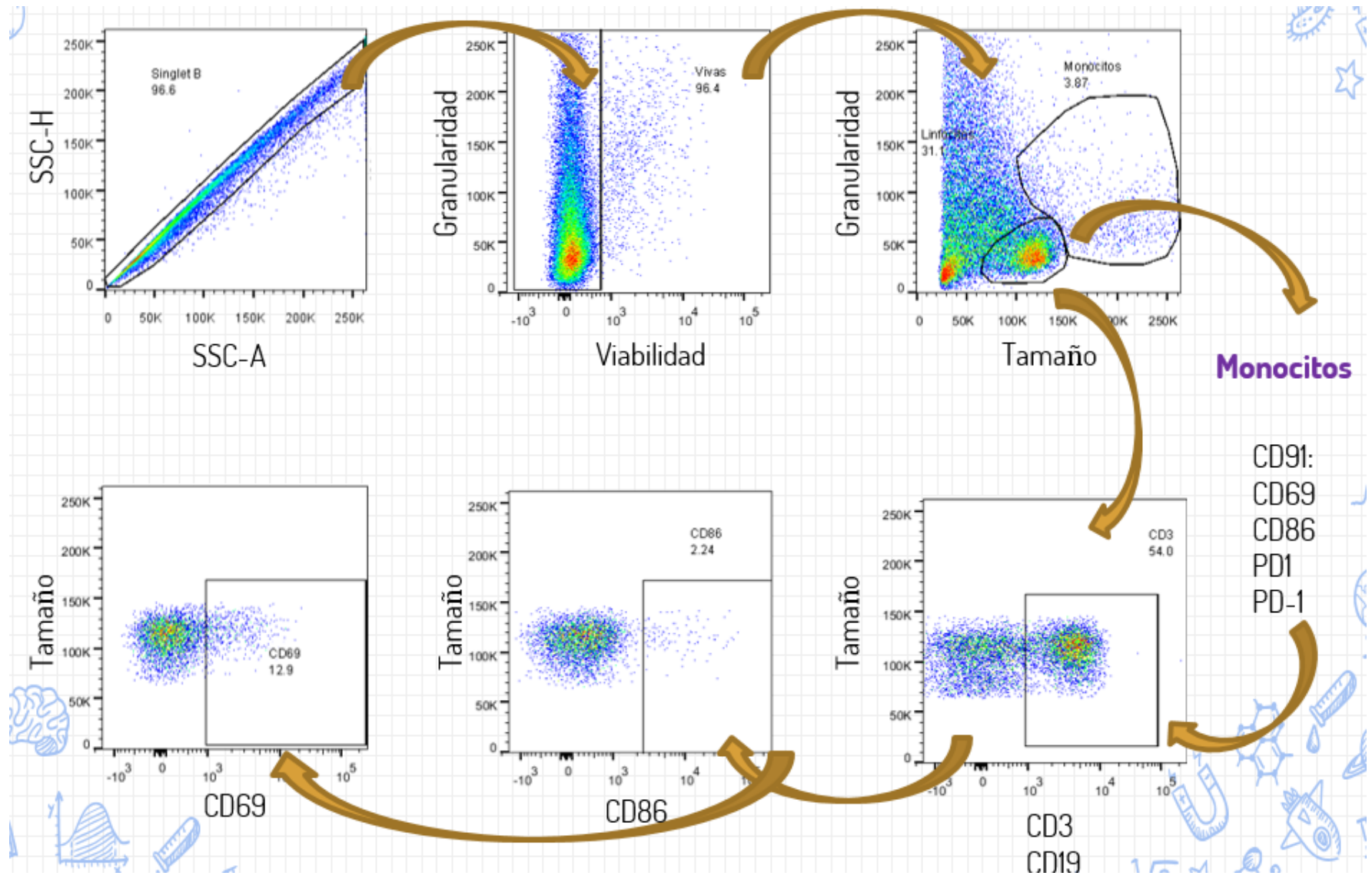


Figura 1: Esquema general de la estrategia experimental

Apéndice 3. Estrategia de análisis de citometría



Anexo 2: Estrategia de análisis de citometría de las poblaciones celulares y las moléculas a analizar

Apendice 4: A continuación se muestran las proteínas que se encontraron en las OMVs de la cepa 16M. Estos resultados son de análisis proteómicos que fueron amablemente compartidos por el Dr. Eric Ávila Calderón.

Localización subcelular	Locus Tag	Gen	C	BMEI0830	<i>bamA</i>
			C	BMEI0425	
C	BMEI1249	<i>omp25</i>	C	BMEI0402	
C	BMEI1305	<i>omp2b</i>	C	BMEI0402	
C	BME20236_I1222	<i>omp22</i>	C	BMEI1855	
C	BMEI0339	<i>tolB</i>	C	BMEI0015	
C	BMEI0796	<i>bcsP31</i>	C	BMEI0746	<i>rplA</i>
C	BMEI0454		C	BMEI0282	
C	BMEI0786		C	BMEI1265	
C	BMEI0542		C	BMEI1759	
C	BMEI1829		C	BMEI1048	<i>groL</i>
C	BMEI0441		C	BMEI0730	
C	BMEI1025		C	BMEI1306	<i>omp2a</i>
C	BME20236_I0968		C	BMEI1079	
C	BMEI0135	<i>omp19</i>	C	BMEI1369	
C	BMEI0287		C	BMEI0607	
C	BMEI0587	<i>bamD</i>	C	BMEI0785	
C	BMEI0435		C	BMEI0137	<i>mdh</i>
C	BMEI1584		C	BMEI1606	
C	BMEI0877		C	BMEI1380	<i>betA</i>
C	BMEI0334		C	BMEI1716	
C	BMEI0340	<i>omp16</i>	C	BMEI1242	
C	BMEI1214		C	BMEI0376	
C	BMEI0581	<i>sodC</i>	C	BMEI1521	
C	BMEI0692		C	BMEI0195	<i>clpB</i>
C	BMEI0657		C	BMEI0251	<i>atpD</i>

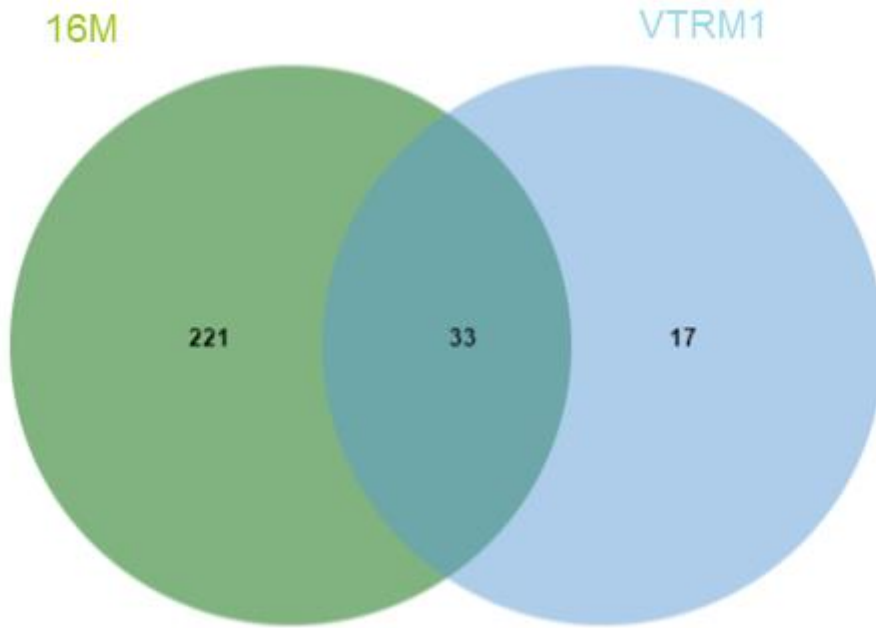
C	BMEI0305	<i>mrsP</i>	C	BMEI2027	
C	BMEI0673		C	BMEI1561	
C	BMEI1449		C	BMEI1837	
C	BMEI0243		C	BMEI0773	<i>rplR</i>
C	BMEI0844	<i>omp31</i>	C	BMEI0003	<i>rho</i>
C	BMEI1193		C	BMEI0138	<i>sucC</i>
C	BMEI1895		C	BMEI0017	<i>omp10</i>
C	BMEI0750	<i>rpoC</i>	C	BMEI1876	<i>dnaE2</i>
C	BMEI0758	<i>rplD</i>	C	BMEI1184	
C	BMEI0372		C	BMEI0590	
C	BMEI0745	<i>rplK</i>	C	BMEI1722	
C	BMEI1866		C	BMEI1911	
C	BMEI0096		C	BMEI0775	<i>rpmD</i>
C	BMEI1830		C	BMEI1042	
C	BMEI0513	<i>zwf</i>	C	BMEI0711	
C	BMEI1152		C	BMEI0154	
C	BMEI1202	<i>aspS</i>	C	BMEI0723	
C	BMEI0983		C	BMEI0431	
C	BMEI0338		C	BMEI0766	<i>rpsQ</i>
C	BMEI0742	<i>tufA</i>	C	BMEI1089	<i>argS</i>
C	BMEI1893		C	BMEI0852	
C	BMEI0550		C	BMEI0310	
C	BMEI0244	<i>tal</i>	C	BMEI1059	
C	BMEI1330	<i>htrA</i>	C	BMEI0601	
C	BMEI0263		C	BMEI1311	
C	BMEI0543		C	BMEI0779	<i>rpsM</i>
C	BMEI0223		C	BMEI0735	
C	BMEI1989		C	BMEI1135	

EC	BMEI0071		IM	BMEI1477	
EC	BMEI0764	<i>rplP</i>	IM	BMEI0411	
EC	BMEI1169	<i>rpsI</i>	IM	BMEI0867	
EC	BMEI0584		IM	BMEI0752	
EC	BMEI1453		IM	BMEI0328	
EC	BMEI0188	<i>ubiG</i>	IM	BMEI1026	
IM	BMEI0156	<i>rplS</i>	IM	BMEI0768	<i>rplX</i>
IM	BMEI0687		IM	BMEI0797	
IM	BMEI0961		IM	BMEI0613	
IM	BMEI0227	<i>rpsP</i>	IM	BMEI0091	
IM	BMEI0688		IM	BMEI1954	
IM	BMEI0070		IM	BMEI0734	
IM	BMEI0780	<i>rpsK</i>	IM	BMEI0577	<i>murD</i>
IM	BMEI0962		IM	BMEI1160	
IM	BMEI1120		IM	BMEI1069	<i>tig</i>
IM	BMEI1757		IM	BMEI0321	
IM	BMEI1175		IM	BMEI0756	<i>rpsJ</i>
IM	BMEI0123		IM	BMEI0823	<i>rpsB</i>
IM	BMEI0401		IM	BMEI0774	<i>rpsE</i>
IM	BMEI1961	<i>pnp</i>	IM	BMEI1481	<i>rpsR</i>
IM	BMEI0225	<i>ffh</i>	IM	BMEI0341	
IM	BMEI1076		IM	BMEI0782	<i>rplQ</i>
IM	BMEI0767	<i>rplN</i>	IM	BMEI1746	
IM	BMEI0284		IM	BMEI0950	
IM	BMEI0748	<i>rplL</i>	IM	BMEI0536	<i>bp26</i>
IM	BMEI1525		IM	BMEI0685	
IM	BMEI1440		OM	BMEI0738	
IM	BMEI1272	<i>cysS</i>	OM	BMEI0625	<i>ugpB</i>

OM	BMEI1047	<i>groS</i>	OM	BMEI1794	<i>ihfB</i>
OM	BMEI0989		OM	BMEI0180	
OM	BMEI0771	<i>rpsH</i>	OM	BMEI1246	
OM	BMEI0484		OM	BMEI1946	<i>mutM</i>
OM	BMEI1029		OM	BMEI0037	
OM	BMEI1078		OM	BMEI0763	<i>rpsC</i>
OM	BMEI0761	<i>rpsS</i>	OM	BMEI0214	
OM	BMEI1126		OM	BMEI1039	
OM	BMEI1494		P	BMEI0966	
OM	BMEI0005		P	BMEI1982	
OM	BMEI1097		P	BMEI2029	<i>ahcY</i>
OM	BMEI0770	<i>rpsN</i>	P	BMEI0887	<i>ppi</i>
OM	BMEI0139		P	BMEI2007	<i>rplT</i>
OM	BMEI1261	<i>pepA</i>	P	BMEI0744	<i>nusG</i>
OM	BMEI1818		P	BMEI0237	
OM	BMEI1890		P	BMEI0035	
OM	BMEI0393		P	BMEI1122	<i>purC</i>
OM	BMEI1467		P	BMEI1924	
OM	BMEI0762	<i>rplV</i>	P	BMEI0109	
OM	BMEI0788		P	BMEI0271	<i>mtgA</i>
OM	BMEI0249	<i>atpA</i>	P	BMEI0894	
OM	BMEI0561	<i>gcvP</i>	P		<i>tatB</i>
OM	BMEI0765	<i>rpmC</i>	P	BMEI0664	
OM	BMEI1811		P	BMEI0535	
OM	BMEI1065		P	BMEI0661	
OM	BMEI1709		P	BMEI0747	<i>rplJ</i>
OM	BMEI1860		P	BMEI0923	
OM	BMEI0364	<i>exbD</i>	P	BMEI1514	

P	BMEI1057	<i>rne</i>	P	BMEI0776	<i>rplO</i>
P	BMEI0874		P	BMEI0103	
P	BMEI0732		P	BMEI0034	<i>virB10</i>
P	BMEI1725		P	BMEI0661	<i>rpmG</i>
P	BMEI0679		P	BMEI1371	
P	BMEI1760		P	BMEI0641	
P	BMEI1962	<i>rpsO</i>	P	BMEI1294	
P	BMEI1672		P	BMEI1587	
P	BMEI0715		P	BMEI1686	
P	BMEI0945		P*	BMEI1726	
P	BMEI0084		P**	BMEI0824	<i>tsf</i>
P	BMEI0974	<i>rpiA</i>	S	BMEI0772	<i>rplF</i>
P	BMEI1775	<i>rph</i>	S	BMEI1941	<i>recF</i>
P	BMEI0552		S	BMEI0012	
P	BMEI0605		S	BMEI1170	
P	BMEI0516		S	BMEI2008	<i>rplM</i>
P	BMEI1697		S*	BMEI0435	
P	BMEI0595				
P	BMEI0567	<i>fbpC</i>			

En el análisis proteómico se obtuvo que las vesículas de las dos cepas compartían 33 proteínas



Bibliografía

1. G Pappas, P Papadimitriou, N Akritidis, L Christou, EV Tsianos. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 6 (2006), pp. 91–99.
2. MJ Corbel. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, 3 (1997), pp. 213–221
3. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis. Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología ISBN.Mexico Septiembre, 2012
4. Trujillo IZ, Zavala AN, Caceres JG, Miranda CQ. Brucellosis. *Infect Dis Clin North Am*, 8 (1994), pp. 225-241.
5. Jahans, K. L., G. Foster, and E. S. Broughton. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol*, 57 (1997) pp. 373–382.
6. López-Goñi I., et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol*, 46 (2008) pp. 3484–3487.
7. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. part ii: serological tests for brucellosis. *Clin lab*, 49 (2003) pp. 577-89.
8. Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol* 37 (1999) pp. 3437-42.
9. Young EJ. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* 5 (1983) pp. 821-842.
10. Jinkyung Ko, Gary A. Splitter. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis; Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol.* (2003) pp.65-78
11. Doganay, M., Aygen, B. Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis*, 7 (2003) pp. 173-182
12. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol*, 90 (2002) pp. 281-297.
13. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microb Infect* 2 (2000) pp.829-835.
14. Castaneda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall’Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón JA: Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol*, 6 (2004) pp. 435-445
15. K. von Bargen, J.P. Gorvel, S.P. Salcedo. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36 (2012), pp. 533–562
16. C. Guzmán-Verri, E. Chaves-Olarte, C. Von Eichel-Streiber, I. López-Goñi, M. Thelestam, S. Arvidson, J.P. Gorvel, E. Moreno. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. *J. Biol. Chem*, 276 (2001), pp. 44435–44443.
17. Delrue RM, et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3 (2001) pp. 487–497.
18. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9 (2008) pp. 678–694.
19. Martirosyan, A., Moreno, E. and Gorvel, J.-P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews*, 240 (2011) pp. 211–234
20. Porte F, Liautard JP, Kohler S. 1999. Early acidification of phagosomes containing essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.* 67:4041–47

21. M.I. Marchesini, C.K. Herrmann, S.P. Salcedo, J.P. Gorvel, D.J. Comerci. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell. Microbiol.*, 13 (2011), pp. 1261–1274.
22. Lukacova M., Barak I., Kazar J. Role of structural variations of polysaccharide antigens in the pathogenicity of Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (2008) pp. 200-206
23. Pei J., Kahl-McDonagh M., Ficht T. A. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2014) 4:23 pp. 1-9.
24. Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 5ª Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. (2013). Janeway Ch. A. Travers P. Walport M.
25. Janeway Ch. A. Travers P. Walport M. Shlomchik M.J. 2ª Ed. "Inmunología . "El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. (2003).
26. Parham Meter, Inmunología 2ª Edición Editorial Médica Panamericana,(2006)
27. Billard E, Dornand J, Gross A (2007) *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun* 75: 4980–4989.
28. Kariminia A., Kavoosy G., Khatami S., Zowghi E. & Ardestani S.K. (2002). – Study of interleukin-10 and interleukin-12 production in response to lipopolysaccharides extracted from two different *Brucella* strains. *Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis.*, 25, 85–93.
29. Akbulut H, Celik I, Akbulut A. Cytokine leves in patiens with brucellosis and their relations with the treatment. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25:387-390
30. Moreno-Lafont MC, et al. Antigen –specific activation and proliferation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes from brucellosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:340-347.
31. Rafiei A. Ardestani SK, Kariminia A, Keyhani A. Mohraz M, Amirkhani A. Dominant Th1 cytokine production in early onset on human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease. *J Infect* 2006; 53: 315-324.
32. Caron E, Peyrard T, Köhler S, Cabane S. Live *Brucella* spp. Fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun* 1994; 62: 5267-5274.
33. Salmeron I, Rodriguez-Zapata M, Salmeron O. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 764-770.
34. Bertotto AR, et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 1993; 23: 5533-5539.
35. Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:163-84.
36. Cambronne ED, Roy CR (2006) Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic* 7: 929–93
37. McBroom, A. J., and M. J. Kuehn. 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 63:545–558.
38. D.W. Dorward, T.G. Schwan, C.F. Garon, Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissue from infected ticks, mice, dogs, and humans, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 1162–1170 .
39. Beveridge T. J. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol*, 181, (1999) pp. 4725-4733
40. Li, Z. A. J. Clarke, and T. J. Bereridge. Gram- negative bacteria produce membrane vesicles wich are capable of killing oher bacteria. *J. Bacteriol.* 180 (1998) pp. 5478-5483

41. Sabra, W., H. Lunsdorf, and A. P. Zeng. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles and the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology* 149 (2003) 2789-2795.
42. M. J. Kuehn and N. C. Kesty, "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction," *Genes and Development*, vol. 19, no. 22, pp. 2645–2655, 2005.
43. Ciofu, Oana & J. Beveridge, T & Kadurugamuwa, Jagath & Walther-Rasmussen, Jan & Høiby, Niels. (2000). Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45. 9. 10.1093/jac/45.1.9.
44. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:593-656
45. Kaparakis-Liaskos, M. and Ferrero, R.L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* 15,375-387
46. Sangyong Lim and Hyunjin Yoon. Roles of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in Bacterial Virulence. *J. Bacteriol and Virol*, 45 (2015), pp.1 – 10
47. Mikolajczyk-Pawlinska, J., Travis, J. & Potempa, J. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett.* 440, 282–286 (1998).
48. Sharpe, S. W., Kuehn, M. J. & Mason, K. M. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection Immun.* 79, 4361–4369 (2011).
49. Bauman, S. J. & Kuehn, M. J. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.* 9, 26 (2009).
50. Furuta, N. et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun.* 77, 4187–4196 (2009).
51. Parker, H., Chitcholtan, K., Hampton, M. B. & Keenan, J. I. Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 78, 5054–5061 (2010)
52. Lapinet, J. A., Scapini, P., Calzetti, F., Perez, O. & Cassatella, M. A. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-8, macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 68, 6917–6923 (2000).
53. Davis, J. M., Carvalho, H. M., Rasmussen, S. B. & O'Brien, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect. Immun.* 74, 4401–4408 (2006).
54. Lappann, M. et al. In vitro resistance mechanisms of *Neisseria meningitidis* against neutrophil extracellular traps. *Mol. Microbiol.* 89, 433–449 (2013).
55. Tavano, R. et al. The membrane expression of *Neisseria meningitidis* adhesin A (NadA) increases the proimmune effects of MenB OMVs on human macrophages, compared with NadA- OMVs, without further stimulating their proinflammatory activity on circulating monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 86, 143–153 (2009).
56. Winter, J., Letley, D., Rhead, J., Atherton, J. & Robinson, K. *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect. Immun.* 82, 1372–1381 (2014).
57. Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C. & Cookson, B. T. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* 179, 7692–7701 (2007).
58. Durand, V. et al. Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine* 27, 1912–1922 (2009).

59. Duncan, L., Yoshioka, M., Chandad, F. & Grenier, D. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb. Pathog.* 36, 319–325 (2004).
60. Etchart, N. et al. Intranasal immunisation with inactivated RSV and bacterial adjuvants induces mucosal protection and abrogates eosinophilia upon challenge. *Eur. J. Immunol.* 36, 1136–1144 (2006).
61. Guthrie, T. et al. Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-extracted outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 72, 2528–2537 (2004).
62. Lee, H. S. et al. Neisserial outer membrane vesicles bind the coinhibitory receptor carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 and suppress CD4⁺ T lymphocyte function. *Infect. Immun.* 75, 4449–4455 (2007).
63. Arigita, C. et al. Stability of mono- and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Vaccine* 22, 629–642 (2004)
64. Veith, P. D. et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J. Proteome Res.* 13, 2420–2432 (2014).
65. Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C. & Cookson, B. T. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J. Immunol.* 179, 7692–7701 (2007).
66. Chen, D. J. et al. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 3099–3104 (2010).
67. Aghasadeghi, M. R. et al. Application of outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as a new adjuvant to induce strongly Th1-oriented responses against HIV-1. *Curr. HIV Res.* 9, 630–635 (2011).
68. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC (2012) Outer Membrane Vesicles from *Brucella abortus* Promote Bacterial Internalization by Human Monocytes and Modulate Their Innate Immune Response. *PLoS ONE* 7(11): e50214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050214>
69. Eric Daniel Avila-Calderón, Ahidé Lopez-Merino, Neeta Jain, et al., “Characterization of Outer Membrane Vesicles from *Brucella melitensis* and Protection Induced in Mice,” *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 352493, 13 pages, 2012
70. *Lieping Chen and Dallas B. Flies* (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews Immunology*. Volume 13, 227-242.
71. Jin HT., Ahmed R., Okazaki T. (2010) Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. In: Ahmed R., Honjo T. (eds) *Negative Co-Receptors and Ligands. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 350. Springer, Berlin, Heidelberg
72. Lee EY, Choi DS, Kim KP & Gho YS (2008) Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* 27: 535–555.
73. Haurat, M. F., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M., Dorobantu, L., Gray, M. R., Curtis, M. A., et al. (2011). Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 286, 1269–1276. doi: 10.1074/jbc.M110.185744
74. Kunsmann, Lisa et al. “Virulence from Vesicles: Novel Mechanisms of Host Cell Injury by *Escherichia Coli* O104:H4 Outbreak Strain.” *Scientific Reports* 5 (2015): 13252. *PMC*. Web. 26 Aug. 2017.
75. Velásquez, L.N., Delpino, M.V., Ibanez, A.E., Coria, L.M., Miraglia, M.C., Scian, R., et al. (2012) *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. *Microbes Infect* 14: 639–650
76. Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., Dornand, J., 2000. In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect. Immun.* 68, 342–351.

77. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994;15:479–483
78. Marzio, Mael, and Betz-Corradin (1999). CD69 and regulation of the immune function, *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 21(3), 565-582
79. Jaqueline M. Jill E (1999). CD28/CTLA4 and CD80/CD86 Families: Signaling and Function. *Immunologic' Research*. Humana Press Inc. 19:1 24 /1:1-24
80. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. Johana M Isaza-Correa, Zheng Liang, Anke van den Berg, Arjan Diepstra and Lydia Visser*
81. Forestier C, Moreno E, Meresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, Gorvel JP: Interaction of Brucella abortus lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect Immun* 1999, 67:4048-4054.
82. Forestier C, Moreno E, Pizarro-Cerda J, Gorvel JP: Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *J Immunol* 1999, 162:6784-6791
83. Barquero-Calvo E, Mora-Cartín R, Arce-Gorvel V, de Diego JL, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E et al. Brucella abortus induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004853.
84. Marie-Alice Vitry,^a Carl De Trez (2012). Crucial Role of Gamma Interferon-Producing CD4⁺ Th1 Cells but Dispensable Function of CD8⁺ T Cell, B Cell, Th2, and Th17 Responses in the Control of Brucella melitensis Infection in Mice. *Infect Immun*. 80(12): 4271–4280
85. Rasouli, Manoochehr & Asaei, Sadaf & Kalani, Mehdi & Kiany, Simin & Moravej, Ali. (2012). Interleukin-17A genetic variants can confer resistance to brucellosis in Iranian population. *Cytokine*. 61. . 10.1016/j.cyto.2012.10.012.
86. interleukyn-17 and its target genes: mechanism of interleukin -17 function in disease. Reiko M. Onishi and Sarah L. Gaffen. *Inmunology* 2010 129, 311-321
87. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. 2006;177:4662–9.
88. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette–Guerin infection. *J Immunol*. 2007;178:3786–96.
89. 56. Schreiber GH, Schreiber RD. Interferon- γ In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook*. 4th edition. chapter 24. Vol. 1. New York, NY, USA: Elsevier; pp. 567–601.
90. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling—regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Critical Care Medicine*. 2000;28(4, supplement):N3–N12.
91. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages Narayanan Parameswaran* and Sonika Patial. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010 ; 20(2): 87–103
92. E. Billard, J. Dornand, A. Gross, Interaction of Brucella suis and Brucella abortus rough strains with human dendritic cells, *Infect. Immun*. 75 (2007) 4980e4989.
93. Caron, E., Gross, A., Liautard, J. P., Dornand, J. (1996) Brucella species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- expression, active on human macrophage-like cells. *J. Immunol*. 156, 2885–2893.
94. Ukai, Takashi et al. "Macrophage-Elicited Osteoclastogenesis in Response to Bacterial Stimulation Requires Toll-Like Receptor 2-Dependent Tumor Necrosis Factor-Alpha Production ." *Infection and Immunity* 76.2 (2008): 812–819. *PMC*. Web. 25 Nov. 2017.

95. Svetic A, Jian YC, Lu P, Finkelman FD, Gause WC. 1993. Brucella abortus induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN-gamma in CD4+ T cells. *Int. Immunol.* 5:877-83
96. Goenka R, Parent MA, Elzer PH, Baldwin CL. 2011. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus. *J. Infect. Dis.* 203:1136-46
97. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Scheller J1, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):878-88.
98. Weiss DS, Takeda K, Akira S, Moreno E. MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2 is required for efficient clearance of Brucella abortus. *Infect Immun* 2005;73: 5137-5145
99. Barquero-Calvo E, et al. Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE* 2007; 2 e 631
100. Felix et al. The Brucella TIR domain containing proteins BtpA and BtpB have structural WxxxE motif important for protection against microtubule depolymerisation. *Cell communication and signaling* 2014, 12:53
101. Daniel D. Billadeau. Jeffrey C. Nolz and Timothy S. Gomez. Regulation of T-cell activation by cytoskeleton. *Nat. Rev. Imm.* 7, 2007 131-141.
102. Geiger, B., Rosen, D. & Berke, G. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J. Cell Biol.* 95, 137-143 (1982).
103. Navarro-Garcia, Fernando & Serapio-Palacios, Antonio & Ugalde, Paul & Tapia-Pastrana, Gabriela & Chavez-Dueñas, Lucia. (2013). Actin Cytoskeleton Manipulation by Effector Proteins Secreted by Diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes. *BioMed research international*. 2013. 374395. 10.1155/2013/374395.