



**Universidad**  
Zaragoza



Expresión diferencial de las Proteínas de fase aguda  
en ratón causada por infección crónica con *Brucella*  
*suis* e infección aguda por *Brucella microti*

Trabajo Fin de Máster

Isabel Franco Castillo

Máster en Biología Molecular y Celular  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias

Junio 2015

Los Dres. María Iturralde y Fermín Lampreave, Profesores Titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza y la Dra. M<sup>a</sup> Pilar Jiménez de Bagües, investigadora del C.I.T.A.

CERTIFICAN:

Que la Memoria del Trabajo Fin de Máster titulado “Expresión diferencial de las Proteínas de fase aguda en ratón causada por infección crónica con *Brucella suis* e infección aguda por *Brucella microti*” presentada por Isabel Franco, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de esta Universidad bajo nuestra dirección, y reúne los requisitos para ser presentada por su autor como Trabajo Fin de Master.

Zaragoza, 23 de Junio de 2015

Fdo. María Iturralde Navarro

Fdo. M<sup>a</sup> Pilar Jiménez de Bagües

Fdo. Fermín Lampreave Palacios

# Resumen

La brucelosis es una zoonosis de amplia distribución en nuestro país, que causa unas grandes pérdidas económicas en nuestra ganadería y produce más de un millar de casos humanos anualmente. En los últimos años se han descrito nuevas especies de *Brucella* consideradas como patógenos emergentes. Es necesario definir su virulencia así como estudiar su posible utilización como cepa vacunal para la profilaxis de la brucelosis animal. Una de estas últimas cepas descubiertas es *Brucella microti*, que ha sido descrita como patógeno del topillo.

En este estudio se ha mostrado como altamente virulenta en un modelo murino puesto a punto en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) de Zaragoza. Se han realizado dos infecciones, comparando *B. microti* con la cepa de referencia *B. suis*. La mayor virulencia de *B. microti* produjo una infección aguda en ratón, a diferencia de la cepa de referencia *B. suis*, que provocó una infección crónica. La respuesta contra el lipopolisacárido bacteriano en la cepa de referencia (*B. suis*) apareció a los 28 días de infección.

Con el objetivo de determinar si una infección por *Brucella* se puede monitorizar en suero y diferenciar entre una infección aguda (*B. microti*) y una infección crónica (*B. suis*) se han cuantificado nueve proteínas de fase aguda. Las proteínas de fase aguda aumentan o disminuyen en respuesta a un daño tisular o una infección que representan una amenaza para la integridad del organismo mediante alteraciones en los mecanismos homeostáticos, provocando una respuesta de fase aguda. Las diferencias en la virulencia se han reflejado en una respuesta diferente por parte del huésped. De las nueve proteínas cuantificadas, se han confirmado como proteínas de fase aguda cinco de ellas (haptoglobina, SAA, GPA, hemopexina e ITIH4). También se observó un aumento de la CRP e ICP en la infección por *B. microti* y un aumento de la transferrina en la infección por *B. suis*. La Apo A1 no varió en ninguna de las infecciones. Por todo ello es posible diferenciar una infección aguda (*B. microti*) de una infección crónica (*B. suis*) en estas condiciones experimentales.

# Abstract

*Brucellosis is a widespread zoonosis in our country, which causes heavy economic losses on our livestock and generates more than one thousand human cases annually. In the last few years there have been described new Brucella species, considered as emerging pathogens. It is necessary to define its virulence and to study its possible use as a vaccine strain for prophylaxis of animal brucellosis. One of the latest discovered strains is Brucella microti, which has been described as vole pathogen.*

*In this study Brucella microti has been shown to be highly virulent in a mouse model developed at the Center for Research and Food Technology of Aragon (CITA) of Zaragoza. There have been performed two infections, comparing B. microti with the reference strain B. suis. The enhanced virulence of B. microti produced an acute infection in mice, in contrast with the reference strain B. suis, which produced a chronic infection. The response to bacterial lipopolysaccharide in the reference strain (B. suis) appeared at day 28 of infection.*

*In order to determine if a Brucella infection can be monitored in serum and discriminate between an acute (B. microti) and a chronic (B. suis) infection, there have been quantified nine acute-phase proteins. The acute-phase proteins are increased or decreased in response to tissue damage or infection that poses a threat to the integrity of the organism by alterations in the homeostatic mechanisms, causing an acute phase response. Differences in virulence have been reflected in a different response from the host. Five of the nine proteins quantified have been confirmed as acute-phase proteins (haptoglobin, SAA, GPA, hemopexin and ITIH4). There was also remarkable that CRP and PCI proteins were increased during the B. microti infection, and the increase of transferrin during B. suis infection was also observed. Apo A1 keep unchanged in any infections. Therefore, it is possible to differentiate acute infection (B. microti) of chronic infection (B. suis) in these experimental conditions.*

## **ABREVIATURAS**

- ACTH:** Hormona adrenocorticotropa (*Adrenocorticotropic hormone*)
- ApoA1:** Apolipoproteína A1 (*Apolipoprotein A1*)
- BAB:** Base de agar sangre (*Blood agar base*)
- BSA:** Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)
- CRP:** Proteína C reactiva (*C reactive protein*)
- DS:** Desviación Estándar
- D.O.:** Densidad óptica
- ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- GPA:**  $\alpha$ 1-Glicoproteína ácida ( *$\alpha$ 1-glycoprotein acid*)
- Hb:** Hemoglobina (*Hemoglobin*)
- Hp:** Haptoglobina (*Haptoglobin*)
- Hx:** Hemopexina (*Hemopexin*)
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoproteins*)
- IL-1:** Interleuquina-1 (*Interleukin-1*)
- IL-6:** Interleuquina-6 (*Interleukin-6*)
- ICP:** Inhibidor de la  $\alpha$ 1-cisteína proteasa ( *$\alpha$ 1-cysteine proteinase inhibitor*)
- Ig:** Inmunoglobulina (*immunoglobulin*)
- ITI4:** Cadena pesada 4 del inhibidor de la tripsina inter- $\alpha$  (*Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 4*)
- LCAT:** Lecitina colesterol acil transferasa (*Lecithin-cholesterol acyltransferase*)
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoproteins*)
- LIF:** Factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia inhibitory factor*)
- LPS:** Lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide*)
- PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
- PEG:** Polietilenglicol (*Polyethyleneglicol*)
- PFA/APP:** Proteína/s de fase aguda (*Acute phase protein/s*)
- PGE2:** Prostaglandina E2 (*Prostaglandin E2*)
- Pig-MAP:** Principal proteína de fase aguda en cerdos (*Major acute phase protein in pigs*)
- P.I.:** Post-infección
- RFA/APR:** Respuesta de fase aguda (*Acute phase response*)
- SAA:** Amiloide A sérico (*Serum amyloid A*)
- SDS:** Dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)
- TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*Transforming growth factor-  $\beta$* )
- TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*Tumor necrosis factor- $\alpha$* )
- Tf:** Transferrina (*Transferrin*)
- UFC/CFU:** Unidades formadoras de colonias (*Colony-forming unit*)
- UR:** Unidades Relativas

# Índice

<b>1. Antecedentes y objetivos</b> .....	7
<b>2. Introducción</b> .....	10
2.1. Brucelosis.....	10
2.1.1. <i>Brucella microti</i> .....	11
2.1.2. <i>Brucella suis</i> .....	11
2.2. Respuesta de fase aguda .....	13
2.2.1. Proteínas de fase aguda.....	16
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	23
3.1. Material biológico .....	23
3.1.1. Infección con <i>Brucella</i> .....	23
3.1.2. Análisis de la replicación bacteriana <i>in vivo</i> .....	24
3.2. Cuantificación y análisis de proteínas .....	24
3.2.1. Inmunodifusión doble de Ouchterlony.....	24
3.2.2. Inmunodifusión radial simple de Mancini .....	25
3.2.3. Cuantificación de proteína total.....	25
3.2.4. Técnicas electroforéticas .....	26
3.2.4.1. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)</i> .....	26
3.2.4.2. <i>Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa</i> .....	27
3.2.4.3. <i>Inmunodetección de proteínas mediante Western blot</i> .....	28
3.2.5. Cuantificación proteica mediante ensayos ELISA.....	29
3.3. Análisis estadístico .....	30
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	31
4.1. Cinética de la infección bacteriana .....	31
4.2. Detección de inmunoglobulinas IgG anti-LPS.....	32
4.3. Cuantificación de proteína total .....	32
4.4. Proteínas de fase aguda .....	33
4.4.1. Apolipoproteína A1 .....	34

4.4.2. Inhibidor de $\alpha$ 1-Cisteína proteasa.....	35
4.4.3. Proteína C reactiva .....	36
4.4.4. Cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- $\alpha$ .....	38
4.4.5. Transferrina.....	40
4.4.6. Haptoglobina.....	41
4.4.7. $\alpha$ -1-Glicoproteína ácida .....	43
4.4.8. Proteína amiloide A sérica .....	44
4.4.9. Hemopexina .....	46
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>50</b>

# 1. Antecedentes y objetivos

La brucelosis es una zoonosis de amplia distribución en nuestro país, que causa unas grandes pérdidas económicas en nuestra ganadería y produce más de un millar de casos humanos anualmente. La gestión sanitaria de la brucelosis humana está directamente relacionada con la eliminación de la brucelosis animal por lo que la investigación orientada al desarrollo de una mejor profilaxis animal servirá también para erradicar la brucelosis en humanos.

En los últimos años se han descrito nuevas especies de *Brucella* de diferentes hospedadores marinos y roedores de las que se desconoce su virulencia y capacidad de transmisión a los animales domésticos de interés económico y al hombre. Estas nuevas cepas son consideradas como patógenos emergentes y se hace necesario definir su virulencia. Además, también es posible su utilización como posible cepa vacunal para la profilaxis de la brucelosis animal.

Una de estas últimas cepas (*B. microti*) ha sido descrita como patógeno del topillo y por datos anteriores a este estudio se conoce que es altamente virulenta (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón de Zaragoza). Se desconocen los factores de virulencia implicados en dicha patogenicidad, así como los mecanismos de los roedores para su control.

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

En nuestro laboratorio se tiene amplia experiencia en la respuesta de las proteínas de fase aguda en distintas especies, porcina, bovina y en rata. En este trabajo se

aborda por primera vez la respuesta de estas proteínas en una infección experimental en ratón con *Brucella*.

La hipótesis de este trabajo ha sido determinar si las proteínas de fase aguda en ratón servirían para monitorizar la infección por *Brucella* y distinguir entre una infección aguda (*B. microti*) de una crónica (*B. suis*).

El objetivo principal de este trabajo ha sido: Determinar las proteínas de fase aguda en ratón y su posible uso como biomarcadores de infección por *Brucella suis* y *Brucella microti*.

Los objetivos parciales se resumen en:

1. Realización de las infecciones con *B. suis* y *B. microti* en ratones BALB/c. En los días 0 (previo a la infección) y los días 1, 3, 7, 14, 21 (*B. microti*) y 3, 5, 7, 14, 28, 56, 84 (*B. suis*) post-infección se han recogido las siguientes muestras: hígado, bazo y suero sanguíneo.
  - a) Monitorización de la infección mediante cultivos de bacterias de muestras de hígado y bazo para calcular las Unidades Formadoras de Colonias (CFU).
  - b) Estudio de la evolución del peso del hígado y el bazo durante la infección.
2. Estudio de la evolución de los niveles séricos de las proteínas de fase aguda.
  - a. Las descritas como proteínas de fase aguda positiva en ratón: La haptoglobina, la hemopexina, el amiloide sérico (SAA), y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (GPA).
  - b. Las proteínas de dudosa clasificación en ratón: proteína C reactiva (CRP), Apolipoproteína A1 (Apo A1).
  - c. De fase aguda negativa, Transferrina y
  - d. Dos proteínas poco o nada estudiadas en ratón, una proteína descrita como principal proteína de fase aguda en rata, el inhibidor de la  $\alpha_1$ -Cisteína proteasa y la cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- $\alpha$  (ITI4).

- Los métodos utilizados para cuantificar las proteínas han sido: Western blot seguido de inmunoprecipitación, inmunodifusión radial (Mancini) y/o ELISA dependiendo de la reactividad de los antisueros disponibles. En el caso de los ELISAS, de su eficacia y disponibilidad en el mercado.
3. Estudio de la evolución de los niveles séricos de las proteínas totales por el método Bradford.
  4. Detección de anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de *B. abortus* inducidos por infección de *B. suis* y *B. microti*.

## 2. Introducción

### 2.1. Brucelosis

El género *Brucella* es un cocobacilo Gram negativo, intracelular facultativo, que se replica en el medio interno de los trofoblastos, macrófagos y células dendríticas [1] y que resulta patogénico para gran variedad de mamíferos, incluyendo rumiantes y humanos. Causa infertilidad y pérdidas reproductivas con predilección por causar placentitis, neumonía fetal, y mastitis [2]. Esta bacteria es el agente etiológico de la brucelosis, la zoonosis bacteriana más importante en todo el mundo [3].

El género *Brucella* se compone de varias especies que difieren esencialmente en las especificidades de su hospedador. Los tres patógenos humanos más a menudo asociados con brucelosis son *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus*. Desde principios de 1960 se han identificado otras cinco especies: *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella Ceti* y *Brucella pinnipedialis*. Recientemente, una novena especie se ha añadido a este género, *Brucella microti*, aislada de un pequeño roedor extendido en Eurasia. *B. microti* había sido identificado erróneamente como *Ochrobactrum intermedio*, un patógeno oportunista filogenéticamente relacionado con las especies de *Brucella* [4]. Recientemente, *B. microti* ha sido aislado de muestras de suelo y de zorros rojos [5]. Hasta la fecha, sin embargo, el potencial de patogenicidad de *B. microti* para el ganado y los seres humanos sigue siendo desconocido.

Las especies de *Brucella* se caracterizan en “lisas” y “rugosas” en función del aspecto de su membrana externa. Esta diferencia se basa en el tipo de lipopolisacárido (LPS) que predomina en dicha membrana. El LPS-S (*smooth*) predomina en las cepas de *Brucella* lisas, y el LPS-R (*rough*) predomina en las cepas rugosas [2].

El aspecto clave de la virulencia de *Brucella* es su capacidad para replicarse dentro de su célula huésped, principalmente macrófagos, y de escapar del sistema inmune del huésped. De hecho, en la infección experimental in vitro de los macrófagos por las especies de *Brucella* se ha considerado un buen modelo de la interacción entre el patógeno y la célula huésped [6]. Existe un modelo murino de infección por especies

de *Brucella* bien establecida; a pesar de la ausencia de síntomas típicos de la brucelosis o de muerte, la replicación de *Brucella* en el bazo y el hígado, así como la infección crónica, se ha documentado [7].

### **2.1.1. *Brucella microti***

Fue identificada por primera vez en 1999 en la República Checa, aislada del topillo común, *Microtus arvalis*. Los topillos infectados por *B. microti* mostraban extremidades edematosas, linfadenomegalia, drenaje de abscesos subcutáneos, orquitis, esplenomegalia, hepatomegalia y granulomas hepáticos.

El estudio comparativo de la infección por varias especies de *Brucella* en dos modelos de ratón, reveló que *B. microti* es una cepa altamente patógena para ratones y mata a ambas cepas C57BL/6 y BALB/c a dosis más bajas y más rápidamente que *B. suis* [8]. Esta capacidad patogénica aumentada de *B. microti* se correlacionó con una capacidad de replicación mucho mayor en macrófagos de ratón que la de otras especies de *Brucella* estudiadas. Estos resultados sugieren que *B. microti* es un nuevo patógeno emergente que puede representar una herramienta más relevante que otras especies de *Brucella*, tales como *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* para el estudio de la inmunidad en modelos murinos de brucelosis [9]. Otro estudio realizado con ratones deficientes en células T, B y/o NK reveló que tanto las células T como las B cooperan en el control de la replicación *B. microti* en el bazo y en el hígado [10]. Por otra parte, se descubrió que en ausencia de células T y B, la actividad de células NK está implicada de forma crítica en la supervivencia de los ratones, lo que sugiere que las células NK no sólo se activan durante la infección por *Brucella* sino que también participan en el control de este patógeno *in vivo*. Estos hallazgos indicaron que se requieren tanto respuesta humoral (la generación de anticuerpos por las células B) como celular (actividad de las células T y NK) para controlar eficientemente el patógeno intracelular *B. microti* en ratones [8].

### **2.1.2. *Brucella suis***

Descrita por primera vez en 1914 a partir de un feto abortado de cerdo en Indiana, esta especie tiene varios biotipos que pueden variar en cuanto a la especificidad del hospedador y/o fenotipo [11]. Los biotipos 1, 2 y 3 infectan principalmente cerdos

domésticos y salvajes y jabalíes. El biotipo 1 se encuentra más frecuentemente en América del Sur y Asia. Los biotipos 1 y 3 se han descrito en los Estados Unidos, Australia, y China [12]. El biotipo 2 es la cepa más común en Europa [13]. Los biotipos 1, 2, y 4 pueden ser transmitidas de cerdos a ganado vacuno [14]. El biotipo 2 difiere de los otros biotipos y fue aislado de liebres europeas (*Lepus capensis*) en Alemania, Suiza, Francia y Dinamarca [12]. Al principio se pensó que podía ser una mutación de *B. abortus* o *B. melitensis* ya que en ese tiempo la brucelosis porcina no existía en Francia y *B. suis* no había sido aislado de los animales domésticos. Ahora se conoce que el biotipo 2 puede establecer un reservorio de la infección en liebres y transmitirse horizontalmente para cerdos y ganado vacuno. Aunque *B. suis* es patógena en el ganado bovino y porcino, no es zoonótica.

El aborto en cerdos infectados con *B. suis* es mucho menos común que el aborto en bovinos infectados con *B. abortus*. Sin embargo, el aborto puede ser el único signo clínico observado en cerdas infectadas con *B. suis*. La pérdida fetal temprana puede pasar desapercibida y aparecer como infertilidad [15]. El aborto generalmente ocurre durante el segundo o tercer mes de gestación, y es común el nacimiento de lechones muertos o débiles [16]. Las placentas de cerdas con abortos han sido descritas como hiperémicas y edematosas, con nódulos miliares amarillentos y purulentos [17].

La orquitis (inflamación de uno o ambos testículos) en jabalíes se caracteriza generalmente por la ampliación unilateral o bilateral que puede ser irregular y abultada. En los casos crónicos, los testículos afectados pueden ser pequeños y presentar atrofia [16]. También se ha observado artritis con cojera y parálisis posterior ocasional tanto en machos como en hembras [17].

En renos, el biotipo 4 de *B. suis* causa abortos, mortinatos, terneros débiles, retención de placenta, orquitis, epididimitis, metritis, mastitis, artritis, higromas, linfadenitis, y nefritis [18]. Sin embargo, con la infección experimental de ganado vacuno con este biotipo 4 cursa con ausencia de signos clínicos o lesiones, aunque puede causar respuestas seropositivas en ensayos estándar de brucelosis [19].

## 2.2. Respuesta de fase aguda

Ante situaciones que representan una amenaza, como estrés, infecciones, quemaduras, cirugía mayor, crecimiento tumoral, alteraciones inmunológicas o agentes químicos que provocan daño tisular, se induce una serie de procesos fisiológicos y metabólicos muy complejos que se conocen en su conjunto como respuesta de fase aguda (RFA). Esta respuesta incluye la activación de la respuesta inmune a través de los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida. El papel principal de la respuesta inmune adquirida es el desarrollo de la respuesta humoral y celular específica, pero al inicio de la agresión, la supervivencia del individuo depende de la habilidad de su respuesta inmune innata para combatir las causas de la enfermedad. La RFA es un proceso dinámico que envuelve cambios sistémicos y metabólicos proporcionando un mecanismo de defensa temprana no específica contra el agresor antes de alcanzar la respuesta inmune adquirida [20].

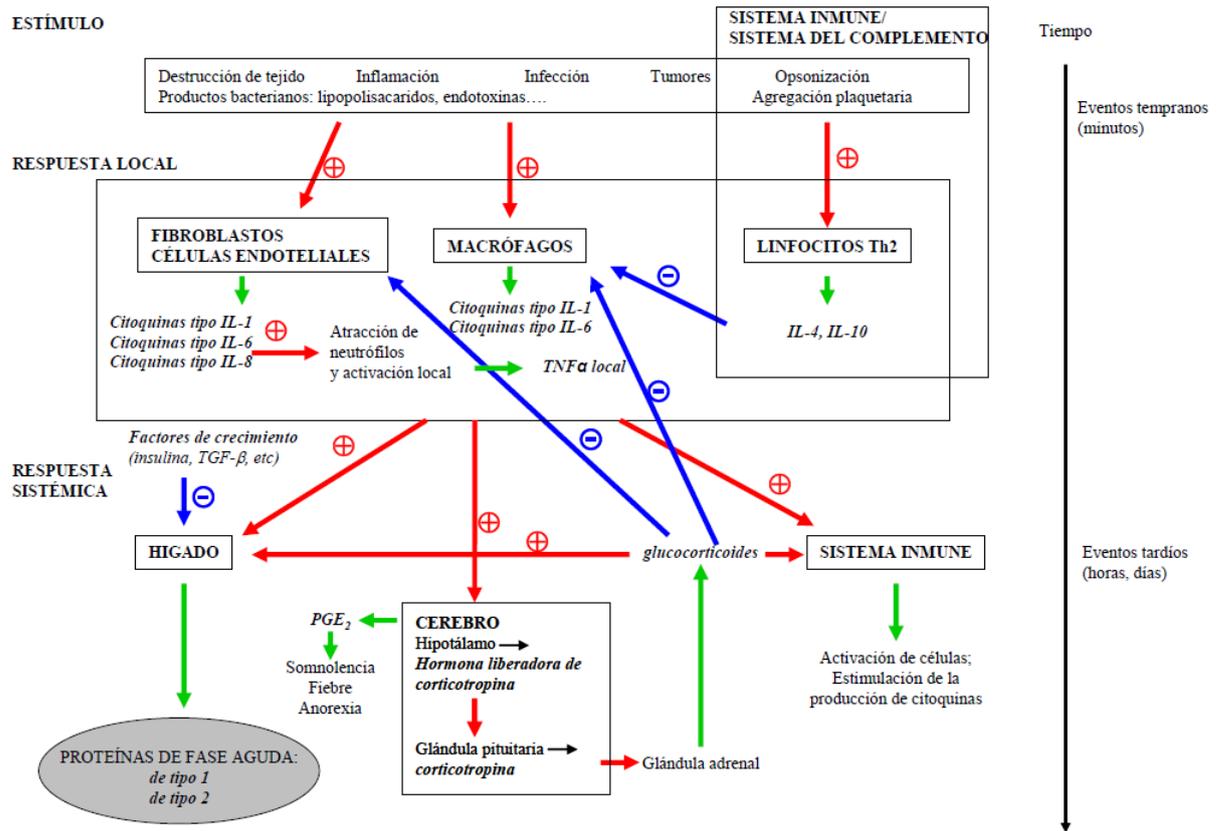
Pocas horas después de iniciarse el proceso se observan cambios en un gran número de procesos metabólicos, endocrinos y fisiológicos (Tabla 1)[21]. Se observan cambios en el calibre, permeabilidad y flujo vasculares. Se produce acreción de leucocitos a las zonas inflamadas y se activan las vías de coagulación y del complemento. El tejido inflamado y el sistema vascular circundante liberan citoquinas, que actúan sobre diferentes órganos diana, dando lugar a una reacción sistémica [22]. Una de las principales manifestaciones clínicas es la aparición de fiebre, que refleja un reajuste del centro de termorregulación [23]. Se produce también un aumento de granulocitos en la sangre y un incremento en la síntesis de varias hormonas como la insulina, el glucagón, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la aldosterona, la vasopresina, la tiroxina, y la hormona del crecimiento entre otras [24]. Asimismo, se modifican las concentraciones séricas de algunos iones como cobre, hierro y zinc [25] y disminuyen los niveles de vitamina A y  $\alpha$ -tocoferol [26]. Los principales cambios metabólicos observados son el incremento del catabolismo de proteínas y de la gluconeogénesis. Se produce balance negativo de nitrógeno con pérdida de masa muscular y disminución de la lipogénesis observándose un descenso del colesterol asociado a las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) y un descenso general de esta última fracción de lipoproteínas [27]. El hígado sufre alteraciones de tamaño,

ultraestructura y actividad metabólica [24]. En este órgano, que es responsable de la síntesis de la mayor parte de proteínas plasmáticas, la síntesis y secreción de varias de estas proteínas se modifica considerablemente. Estas proteínas se denominan de fase aguda (PFA)[28]. La clasificación de estas proteínas y la regulación de su expresión se abordan más extensamente en el apartado 2.2.1.

**Tabla 1. Cambios fisiológicos tras la RFA[21].**

<b>Cambios neuroendocrinos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fiebre, pérdida de apetito y somnolencia</li> </ul>
<b>Cambios metabólicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta el catabolismo proteico</li> <li>• Síntesis/inhibición hepática de las Proteínas de Fase Aguda</li> <li>• Aumenta la lipogénesis hepática</li> <li>• Aumenta la lipólisis del tejido adiposo</li> <li>• Disminuye la masa ósea</li> <li>• Pérdida de músculo y balance negativo del nitrógeno</li> <li>• Aumenta la gluconeogénesis</li> <li>• Disminuye la actividad lipoprotein lipasa en músculo y tejido adiposo</li> <li>• Hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia</li> </ul>
<b>Cambios hematopoyéticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia (en enfermedades crónicas)</li> <li>• Leucocitosis</li> <li>• Trombocitosis</li> </ul>
<b>Cambios en constituyentes plasmáticos no proteicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipozincemia, hipoferremia, hipercupremia</li> <li>• Aumentan las concentraciones plasmáticas de retinol y glutatión</li> </ul>

En la cascada de eventos que se desarrollan durante la RFA interviene de forma destacada el sistema monocito/macrófago (Figura 1) [20]. Este sistema celular, activado por distintos factores, libera una serie de mediadores, entre ellos las citoquinas de la familia de la interleuquina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral (TNF), que son de particular importancia en la iniciación de la siguiente cascada de reacciones en los fibroblastos y células endoteliales. Esta primera oleada de citoquinas puede actuar tanto localmente, activando células estromales, como a distancia. Sin embargo, hace falta una segunda onda de citoquinas, mediada principalmente por la interleuquina-6 (IL-6), liberadas por los fibroblastos y células endoteliales activadas, para amplificar la señal y desencadenar la respuesta celular de fase aguda [29].



**Figura 1.** Representación esquemática de la respuesta de fase aguda [20]. En cursiva: sustancias biológicamente activas (hormonas, citoquinas, etc.). Flechas en rojo: efecto estimulador sobre el órgano o tejido señalado. Flechas en azul: efecto inhibitorio sobre el órgano o tejido señalado. Flechas en verde: muestra las sustancias secretadas (en cursiva) o un efecto (no cursiva) causado por la sustancia que le precede.

Las células endoteliales ya mencionadas desempeñan en esta respuesta un papel fundamental: al activarse aumenta la expresión en su superficie de moléculas de adhesión. Estas interactúan con los leucocitos circulantes, disminuyendo su movimiento, y facilitando su trasvase al tejido dañado [30]. Asimismo, la liberación por parte del tejido inflamado de diversos mediadores tales como especies reactivas de oxígeno, ácido nítrico o productos de la cascada del ácido araquidónico, contribuye a la dilatación y aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos. La frecuente manifestación de dolor se debe a moléculas como la bradiquina y otras quininas, liberadas de los quinínógenos por la calicreína durante la activación de la cascada de coagulación [31].

Las citoquinas liberadas durante la inflamación actúan también a distancia, dando lugar a una reacción sistémica. Estas citoquinas tienen un profundo efecto

neuroendocrino al estar presentes, junto con sus receptores cognitivos, en el sistema neuroendocrino y en el cerebro. En especies animales de laboratorio, se ha observado que dichas citoquinas modulan el metabolismo de los carbohidratos, grasa y sustratos proteicos, regulando el flujo hipotálamo-pituitario y actuando sobre el cerebro para reducir la ingesta de comida [32]. La fiebre está mediada, entre otros factores, por IL-6, IL-1 y TNF, a través de la inducción de la prostaglandina E2 (PGE2) [33]. Además, la IL-1 y la IL-6 median también la generación del ACTH, y en consecuencia la producción de cortisol [34]. Esto proporciona un mecanismo de regulación negativa, puesto que los corticoides inhiben la expresión de citoquinas [35]. Estas citoquinas, y otros mediadores, desencadenan igualmente la RFA hepática.

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

En los animales de experimentación se ha estudiado la RFA utilizando un amplio rango de inductores que abarcan desde la inducción aséptica de la inflamación con sustancias químicas, lipopolisacáridos (LPS), proteínas y peptidoglicanos bacterianos, infecciones con agentes diversos como virus, bacterias, micobacterias y hongos o mediante implantación de tumores [36], revisado en [20]. Un modelo ampliamente utilizado es la producción aséptica de inflamación por la inyección de aceite de trementina u otras sustancias localmente inflamatorias.

### **2.2.1. Proteínas de fase aguda**

La RFA afecta tanto a la síntesis como al catabolismo de la mayoría de las proteínas plasmáticas. El término “proteínas de fase aguda” (PFA) se utiliza para designar a las proteínas plasmáticas cuya concentración se modifica al menos un 25% debido a los estímulos inflamatorios [24]. El incremento de la concentración de las PFA positivas va acompañado de un descenso en los niveles plasmáticos de otras proteínas séricas conocidas como PFA negativas. La magnitud de los cambios de concentración experimentados por las PFA varía enormemente de una proteína a otra [28].

Gran parte del conocimiento de las PFA se refiere a la especie humana y a especies empleadas en su estudio experimental como la rata y el ratón [37]. En la especie humana, las PFA bien caracterizadas son la proteína C reactiva (CRP), la proteína amiloide A sérica (SAA), la haptoglobina (Hp), el fibrinógeno, la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (GPA), el inhibidor de proteasas  $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-antitripsina), la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, los componentes C3 y C4 del complemento, los quinínógenos, la ferritina, los factores de coagulación y algunos inhibidores de proteasas de la familia del inhibidor de tripsina inter  $\alpha$  (ITI) como la cadena pesada 4 de la familia ITI (ITIH4) [28], [29]. Entre las PFA negativas en la especie humana son bien conocidas la prealbúmina o transtirretina, la transferrina, la albúmina, la proteína fijadora de retinol, la fetuína y la apolipoproteína A1 (Apo A1) [29], [38].

En general, en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento, existe un incremento en la síntesis de la haptoglobina, los fibrinógenos, la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (a excepción del cerdo [39]) y una reducción en la síntesis de la albúmina, la transtirretina y la transferrina (a excepción del pollo [40]) durante la RFA. Por el contrario, la CRP, las proteínas amiloides séricas A y P, y la  $\alpha$ 2-macroglobulina muestran grandes diferencias de una especie a otra. Las principales PFA descritas en ratón se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Principales PFA descritas en ratón**

Proteína	Concentración normal	Concentración en RFA
<b>Haptoglobina</b>	0,01-0,02mg/ml[41]	1-2,5 mg/ml[41]
	0-0,1 mg/ml[42]	0,3-2 mg/ml[42]
	ND[43]	1,5 mg/ml[43]
	ND[44]	2 mg/ml[44]
	ND[45]	4 mg/ml[45]
<b>SAA</b>	0,01-0,025 mg/ml[41]	0,15-0,30 mg/ml[41]
	<0,02 mg/ml[42]	0,08 mg/ml[42]
	ND[45]	1 mg/ml[45]
<b>GPA</b>	0,25 mg/ml[41]	1 mg/ml[41]
	0,4 mg/ml[45]	1,2 mg/ml[45]
<b>Hemopexina</b>	0,55-1,25 mg/ml[46]	ND[46]
	ND[42], [47]	4X[42], [47]

**NOTA:** ND hace referencia a “No Descrito” en el artículo.

Las PFA varían mucho en sus características fisicoquímicas, sus capacidades funcionales y actividades biológicas. Las proteínas plasmáticas, al ser proteínas de

secreción, se sintetizan inicialmente con una secuencia de 15-40 aminoácidos en su extremo N-terminal, que constituye el llamado péptido señal [48]. La mayoría de ellas poseen carbohidratos unidos covalentemente a la cadena polipeptídica. Se piensa que estos glicanos desempeñan un papel importante en fenómenos de reconocimiento, como los que regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

La RFA es un mecanismo defensivo que se considera muy importante para superar el periodo que sigue a la agresión y conseguir la destrucción del agente infeccioso, la eliminación del tejido dañado y la reparación del órgano afectado. Es razonable suponer que las PFA desempeñen una función especialmente necesaria durante este proceso, idea que viene avalada por importantes funciones metabólicas y fisiológicas.

La **proteína C reactiva (CRP)** fue la primera PFA caracterizada como tal [49] y uno de los ejemplos más destacados de este tipo de proteínas en humanos. Durante la fase aguda la concentración de la CRP puede aumentar cientos de veces desde sus niveles normales (inferiores a 5 µg/ml). Se ha observado un aumento de la CRP durante la fase aguda en rata, en la especie bovina y en perro [50]. En el ratón la concentración de CRP es muy baja (inferior a 2 µg/ml) tanto en el suero normal como en el de fase aguda [51], [52]. La CRP pertenece al grupo de proteínas conocidas como pentraxinas, de las cuales se han encontrado proteínas homólogas en todos los mamíferos. Consta de una asociación no covalente de 5 subunidades, de 25 KDa cada una, dispuestas en forma de anillo pentagonal y a diferencia de la mayoría de las PFA, no es una glicoproteína [50], [52]. El nombre de CRP proviene de su capacidad para unirse al polisacárido C de las bacterias del género *Pneumococcus*. La CRP se ha conservado durante el curso de la evolución, lo que indica su importancia biológica. Juega un papel importante en la protección frente a la infección, dada su capacidad de opsonizar bacterias, activar la cascada del complemento, mediar la fagocitosis o inducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias. También interviene en la eliminación del tejido dañado, lo que previene la autoinmunización y regula la respuesta inflamatoria [53].

La **proteína amiloide A sérica (SAA, 12 KDa)** es una PFA principal en ratón [54] y otras especies de mamíferos como el perro, caballo, conejo y vaca entre otros [20],

[29]. El término SAA designa a una familia de proteínas polimórficas, codificadas por múltiples genes, de bajo peso molecular y que se encuentran presentes en el suero en forma de complejos con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Durante la fase aguda el SAA se une a las HDL más densas, denominadas HDL<sub>3</sub>, desplazando a la Apo A1, lo que modifica el transporte y metabolismo del colesterol [55]. El SAA aumenta la capacidad de unión de las HDL<sub>3</sub> a los macrófagos, a la vez que disminuye su capacidad de interaccionar con los hepatocitos [56]. Asimismo, se ha visto que el SAA inhibe la fiebre inducida por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y la síntesis de prostaglandina E2 en el ratón, por lo que se ha propuesto que esta proteína desempeña un papel regulador negativo de dichas citoquinas [38]. Además de estas funciones parece inhibir la respuesta a los antígenos mediada por linfocitos, interfiere en la agregación plaquetaria e induce la migración y adhesión de las células T y la migración, adhesión e infiltración al tejido de los monocitos y los leucocitos polimorfonucleares [55].

La **haptoglobina (Hp, 34-40 KDa)** es una glicoproteína que aparece en la fracción de  $\alpha$ 2 globulinas presente en el plasma de todas las especies de mamíferos estudiadas. Se trata de una de las tres proteínas plasmáticas involucradas en la conservación y transporte de hemoglobina y sus metabolitos, junto con la transferrina y la hemopexina [57]. La función biológica de la Hp se asocia con su capacidad para formar complejos estables, en proporción 1:1, con la hemoglobina [58]. De esta forma, puede controlar la disponibilidad del hemo circulante, impedir las pérdidas excesivas de hierro por excreción en la orina y reducir el daño oxidativo asociado a la hemólisis [59]. El complejo haptoglobina-hemoglobina es reconocido por CD163, un receptor específico que se encuentra en los macrófagos, y es eliminado por los fagocitos. Otras actividades biológicas atribuidas a esta proteína son la estimulación de la angiogénesis, inhibición de la catepsina B, hemaglutinación viral, modulación de la función de los macrófagos, estimulación de la formación de prostaglandina E2, inhibición de la producción de superóxidos y el aumento intracelular de calcio en los neutrófilos [60]. La Hp es una PFA en la mayoría de las especies estudiadas incluyendo la humana, ratón, rata, vaca, conejo, gato, caballo y perro [20], [29], [61]. Tanto en ratón como en la especie bovina, la concentración de Hp en suero normal es muy baja y aumenta decenas de veces durante la fase aguda [61]. En la oveja se define como la PFA más

importante y su concentración puede aumentar más de 130 veces tras infecciones experimentales [62].

La **cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- $\alpha$  (ITIH4, 120 KDa)** se ha descrito como PFA en la especie humana, en rata y en ratón, aunque en esta última especie hay muy pocos estudios [63]. En la especie porcina es donde se han observado mayores cambios, por lo que también recibe el nombre de PigMap (Major acute phase protein in pigs) [64]. Pertenece a una familia que comprende una serie de proteínas plasmáticas que generalmente se ensamblan a partir de dos proteínas precursoras: una cadena ligera (bikunina) y una o dos cadenas pesadas. La familia de las cadenas pesadas (ITIHs) consta de al menos 6 miembros: ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4, ITIH5 [65] e ITIH5-likeo ITIH5L [66]. Se han identificado variantes de todas las cadenas ITIHs originadas por splicing alternativos de los genes correspondientes y mutaciones puntuales en los genes ITIH. La bikunina, denominada así porque contiene dos dominios inhibidores de proteasas tipo Kunitz, se une a las cadenas pesadas H1, H2 y H3 antes de que éstas sean liberadas a la circulación sanguínea [67]. Sin embargo, la ITIH4 carece de la secuencia consenso de unión a bikunina, por lo que existe como una molécula libre en el plasma y no posee la actividad inhibidora característica de las proteínas de esta familia [64]. Durante la fase aguda, los miembros de la familia ITI están regulados de manera diferente [68].

La  **$\alpha$ 1-glicoproteína ácida (GPA, 41 KDa)** tiene especial importancia en el metabolismo de drogas y psicotrópicos de carácter básico [69] y parece desempeñar una función inmunomoduladora. La GPA inhibe la activación de los neutrófilos y aumenta la secreción de los receptores antagonistas de IL-1 por los macrófagos [70]. Además podría aumentar la eliminación del lipopolisacárido uniéndose directamente a él y neutralizando así su toxicidad [71]. También inhibe la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos y la actividad de las células naturales asesinas (NK) [72]. Los glicanos de la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida participan en las funciones de esta proteína [73]. Esta proteína aumenta y se considera PFA en todas las especies de mamíferos estudiadas [29] a excepción del cerdo [39]. Su incremento en ratón se ha estudiado por diversos autores [41], [42], [47].

La **hemopexina (Hx, 57 KDa)** es una PFA sintetizada por los hepatocitos. Su concentración se ve incrementada en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . Además de expresarse en el plasma, se ha observado que se expresa en el cerebro humano y de ratón y en la retina neural, y puede ser inducida en los nervios periféricos en respuesta a una lesión. La Hx se une al grupo hemo libre con alta afinidad (Kd <1 pM), previniendo daño tisular y endotelial. Estudios posteriores han demostrado que juega un papel anti-inflamatorio gracias a su capacidad para modular la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [74].

El **inhibidor de la  $\alpha$ 1-cisteína proteasa (ICP, 68 KDa)** se describe como PFA en la especie humana y la rata. Se han visto niveles aumentados de ICP en ratas deficientes en proteínas o vitamina E. También se han descrito aumentos significativos de esta proteína durante la inducción de diabetes experimental y durante la inflamación inducida por trementina [75].

La **transferrina (Tf, 80 KDa)** es una PFA negativa implicada en el transporte de hierro [76]. Su papel en la respuesta inmune innata parece estar relacionado con el secuestro de los iones férricos para prevenir que los patógenos y parásitos lo usen como nutriente [77]. La transferrina es considerada como PFA negativa en varias especies como la humana, la rata y el ratón, en vacas y en caballos [78]. Sin embargo, la concentración de esta proteína aumenta en respuesta a las inflamaciones inducidas experimentalmente en pollos [40] y en conejos [29].

La **apolipoproteína A1 (Apo A1, 28 KDa)** es la apolipoproteína más abundante en el plasma y el principal constituyente proteico de las HDL maduras y de los quilomicrones nacientes. La Apo A1 se ha definido como PFA negativa en humanos y se ha comprobado que también lo es en muchas otras especies como el mono, el cerdo y la especie bovina [38]. Sin embargo, en ratón posee un comportamiento contradictorio. Se han descrito tanto aumentos [42], [47] como disminuciones [79] de su concentración. La principal función fisiológica de la Apo A1 ha sido siempre asociada con el transporte lipídico. Es la proteína mayoritaria de la fracción de HDL y actúa como cofactor de la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) capaz de esterificar el colesterol [80]. Existen numerosas publicaciones que la relacionan con procesos que

tienen lugar durante la RFA y le adjudican propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, anticoagulantes [81], además de considerarla un inhibidor de la agregación y toxicidad del péptido amiloide beta [82].

La información existente sobre PFA negativas en distintas especies es mucho más escasa que la referente a las PFA positivas. Los cambios que sufren estas proteínas también suelen ser menores, y disminuyen su concentración en torno al 50%, aunque en situaciones más severas los descensos pueden ser mayores. El descenso de la concentración de varias proteínas plasmáticas durante los procesos de fase aguda se ha explicado por la necesidad de tener una disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de PFA positivas durante la respuesta sistémica. Esta explicación reduce el papel de las PFA negativas, que serían menos esenciales para la defensa del huésped, aunque este hecho no se ha demostrado. Sin embargo, se conoce que varias PFA negativas tienen función anti-inflamatoria, lo que explicaría su descenso durante la inflamación producida en la RFA.

En general, la magnitud de la RFA está relacionada con la severidad del proceso inflamatorio y la extensión de la enfermedad. La cinética de la inducción es variable entre las distintas proteínas de fase aguda aunque la rapidez y la magnitud del cambio suelen ir parejas [51]. El incremento de la concentración plasmática de las proteínas de fase aguda se debe fundamentalmente a un aumento de la velocidad de síntesis, como ha sido demostrado in vitro empleando cortes y cultivos tisulares, mediante perfusión de órganos y mediante estudios in vivo [28]. Las modificaciones en el catabolismo y la síntesis extrahepática generalmente tienen poca influencia en el fenómeno. Aunque se ha encontrado síntesis de algunas proteínas de fase aguda en células distintas a los hepatocitos como los monocitos, células endoteliales, fibroblastos o adipocitos [83], [84], su aportación a las concentraciones plasmáticas es pequeña.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material biológico

Se utilizaron ratones BALB/c proporcionados por Janvier. La experimentación animal se llevó a cabo de acuerdo a las guías de la Federación para Asociaciones Científicas de Animales de Laboratorio y fue aprobada por comités éticos locales de experimentación animal (I111/2010/2 y I106/2010/2). Se utilizaron 50 ratones que se distribuyeron en tres grupos: 4 ratones se utilizaron como control, 18 ratones se infectaron con *B. microti* y 28 ratones se infectaron con *B. suis*. El sacrificio se realizó por asfixia en cámara de CO<sub>2</sub>. Se obtuvo la sangre por punción torácica y se extrajeron el bazo y el hígado de forma aséptica. El sacrificio se realizó en grupos de cuatro ratones (n=4) los siguientes días post-infección:

- Para ratones infectados por *B. microti*: 1, 3, 7, 14, 21 días post-infección
- Para ratones infectados por *B. suis*: 3, 5, 7, 14, 28, 56, 84 días post-infección

La sangre obtenida por punción torácica se centrifugó a 2000 G durante 15 minutos. El sobrenadante se traspasó a tubos de centrifuga con filtro (*Ultrafree Centrifugal Filters*, Durapore 0.22 µm) y se centrifugó a 12000 G durante 4 minutos para obtener un suero libre de bacterias. Este suero estéril se alicuotó y se congeló a -20°C.

#### 3.1.1. Infección con *Brucella*

Para preparar la concentración bacteriana adecuada para inyectar a los ratones se tomó una porción del cultivo de bacterias previamente sembrado en placas de agar BAB [85] (aproximadamente 18 horas antes de la preparación de la dosis) y se diluyó en un eppendorf con un volumen no superior a 900 µl de PBS (*DPBS*, Pan-Biotech). Una vez bien resuspendido se tomó un volumen al azar y se diluyó en 4,5 ml de PBS. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm. Con la D.O. obtenida se recalculó el volumen necesario para obtener una D.O. de 0,200 nm, que corresponde a 10<sup>9</sup> bacterias. Una vez obtenida la suspensión adecuada (10<sup>9</sup> bacterias) se tomaron 500 µl y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en 8 tubos con 4,5 ml de PBS. Para verificar que la dosis inyectada es la correcta se dispensaron gotas de 25 µl en placas de agar BAB (por

duplicado) de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ . También se sembraron por extensión 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  para verificar el fenotipo (liso y/o rugoso) de las bacterias mediante tinción con cristal violeta.

La infección se realizó por inyección intraperitoneal a una dosis final de  $10^4$ . Para ello se tomó la dilución inmediata superior a la dosis que se quiere infectar y se inyectaron 100  $\mu$ l de esta dilución. A los ratones control se les inyectó 100  $\mu$ l de PBS.

### 3.1.2. Análisis de la replicación bacteriana *in vivo*

El bazo y el hígado extraídos se guardaron en una bolsa estéril para determinar la carga bacteriana. Se determinó el peso de cada uno de los órganos y se homogenizaron con un Stomacher® añadiendo 1 ml de PBS (DPBS, Pan-Biotech) para el bazo y 2 ml para el hígado. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones en PBS y se sembraron 100  $\mu$ l de cada dilución en placas de agar BAB. Las diluciones dependerán del tiempo de infección bacteriana de cada ratón. Se incubaron estas placas durante 24-48 horas a 37°C y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} UFC = 10 \times N^{\circ} \text{ colonias} \times \text{Dilución} \times \text{Volumen de homogenización} \\ \times \text{Factor de corrección de peso}$$

## 3.2. Cuantificación y análisis de proteínas

### 3.2.1. Inmunodifusión doble de Ouchterlony

La inmunodifusión doble se realizó según el método de Ouchterlony [86]. En primer lugar se vertió sobre el cristal de un portaobjetos una solución de agarosa (*Agarose*, Sigma) al 1% en agua y se dejó secar completamente (primera capa). Una vez finalizado este proceso se preparó el gel de agarosa al 1% en veronal (*Barbital*, Sigma) 0,025 M; pH 8,2, se hirvió la mezcla y se dejó atemperar a 56°C durante unos 10 minutos, se añadió azida sódica (*Sodium azide*, Sigma) al 0,1% y se vertió con ayuda de una pipeta sobre el porta. Una vez gelificado se troquelaron los pocillos donde se introducirá la muestra. Los pocillos donde se añadirá la muestra se disponen en forma de roseta rodeando un pocillo central que contendrá el antisuero. Para favorecer una difusión correcta se nivelaron los portas dentro de una cámara húmeda. En cada

pocillo se pusieron 15 µl de muestra o de antisuero (en el pocillo central). La difusión se dejó transcurrir durante 24 horas en la cámara húmeda a 4°C. Después de la difusión, se realizaron varios lavados a los geles durante al menos 48 horas con PBS (NaCl 1.54 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM) con azida al 0,1%. Por último se secaron los geles en la estufa a 37°C y se tiñeron con una solución del colorante azul de Coomassie (0,5 g/l Azul de Coomassie (*Brilliant Blue R*, Sigma) en ácido acético glacial (*Acetic Acid Glacial*, Panreac) al 6%, metanol (*Methanol*, Sigma) al 45% y agua al 49%) durante 5-10 minutos. Para observar bien los inmunoprecipitados se lavaron los geles con una solución decolorante (ácido acético glacial al 10%, metanol al 25%, glicerol (*Glycerol*, Sigma) al 2% y agua al 63%).

### 3.2.2. Inmunodifusión radial simple de Mancini

La concentración de la transferrina en el suero de ratón se determinó por inmunodifusión radial por el método de Mancini, que consiste en la preparación de un gel conteniendo el antisuero elegido. Se troquelan pocillos y en ellos se añaden las muestras problema.

Se prepararon las primeras capas sobre los portas. El gel se preparó al 1% de agarosa (*Agarose*, Sigma), 3% Polietilenglicol (*Polyethyleneglicol 3.350*, Sigma), 0,1 % azida sódica (*Sodium azide*, Sigma) (que se añade después de hervir la mezcla) en veronal 0,025 M; pH 8,2. En primer lugar se hirvió la solución que contiene agarosa al 1% y PEG al 3%, y se dejó atemperar a 56°C, momento en el cual se añadió 0,1% de azida sódica y el antisuero α-transferrina de ratón al 2%. Se vertió el gel sobre el cristal y se dejó solidificar. Una vez gelificado se troquelaron los pocillos y se añadió la muestra (5 µl de suero de ratón diluido 1/40 y 1/80). Para poder cuantificar la transferrina se realizaron diluciones seriadas de transferrina pura (*Transferrin from mouse*, Sigma), con las que se hizo una recta de calibrado.

### 3.2.3. Cuantificación de proteína total

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford [87]. Como estándar se utilizó una solución de albúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) 2 mg/ml a partir de la cual se prepararon las correspondientes diluciones seriadas. Se utilizó una placa de 96 pocillos en los que se añadieron 160 µl de reactivo

Bradford y 40 µl de muestra, a una dilución final 1/3000 en PBS (NaCl 1.54 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM), y se procedió a la lectura a 620 nm.

### 3.2.4. Técnicas electroforéticas

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

La separación electroforética de las proteínas presentes en el suero se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE (dodecilsulfato sódico-poliacrilamida). El sistema utilizado para este fin fue el Mini Protean III de BioRad y las disoluciones necesarias para preparar el gel fueron las siguientes:

- **Disolución stock de acrilamida-bisacrilamida** (*Acrylamide/bis-acrylamide 30% Solution*, Sigma): acrilamida 30 %: bisacrilamida 0.8 % (p/v), que se almacenó protegida de la luz a 4º C.
- **Tampón de electroforesis 10x**: Tris-HCl 250 mM pH 8,6, glicina (*Glycine*, Sigma) 1,92 M, SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*, Sigma) 1 % (p/v).
- **Tampón del gel separador (resolving)**: Tris-HCl (*Trizma Hydrochloride*, Sigma) 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, EDTA 8 mM.
- **Tampón del gel concentrador (stacking)**: Tris-HCl 0,5 M pH=6,8, SDS 10%, EDTA 8 mM.
- **Tampón de carga 3x**: Glicerol 10 %, Tris- HCl 60mM pH=6,8, EDTA 20 mM, SDS 2 % (p/v), azul de bromofenol (*Bromophenol blue*, Sigma) 0,005 % (p/v), β-mercaptoetanol (*2-Mercaptoethanol*, Sigma) 5 % (v/v).
- **APS** (*Ammonium Persulfate*, Sigma) 10%
- **TEMED** (*Tetramethylethylenediamine*, Sigma)

La preparación de 5 ml de gel separador del 10% y/o 12%, y 2,5 ml de gel concentrador, se realizó de la siguiente manera (Tabla 3):

**Tabla 3**

Componente	Stacking	Resolving 10%	Resolving 12%
AA:BA (30%)	325 µl	1,65 ml	2 ml
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	630 µl	-	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,25 ml	1,25 ml
H <sub>2</sub> O destilada	1,5 ml	2,01 ml	1,67 ml
SDS 10%	25 µl	50µl	50 µl
APS 10%	100µl	100 µl	100 µl
TEMED	10µl	10µl	10 µl
<b>Total</b>	<b>2,5 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>

**Tabla 3.** Composición de las disoluciones para la preparación de los geles separador (*resolving*) (10 y 12%) y concentrador (*stacking*) para electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.

Se utilizaron cristales de 0,75 mm de espesor de BioRad. El gel separador se vertió entre los cristales que forman el soporte, dejando unos 2 cm para el gel concentrador, espacio que se cubrió con etanol, evitando así la formación de menisco y la entrada de oxígeno que dificultaría la polimerización. Una vez polimerizado el gel se eliminó el etanol y se vertió el gel concentrador. Finalmente, se insertó el peine con cuidado y se retiró cuando el gel hubo polimerizado. La preparación de las muestras se realizó mezclando 14µl de suero con 7 µl de tampón de carga 3X y se introdujo durante 10 minutos en un termo-bloque a 100°C para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente se llenó la cubeta con tampón de electroforesis 1X y se procedió a cargar las muestras y un marcador de pesos moleculares (Thermo Scientific™ Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. Rango de 10kDa hasta 260 kDa). La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 20 mA por gel y 180 V.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas (apartado 3.2.4.2.).

#### **3.2.4.2. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-C extra*, Amersham-Biosciences) mediante un sistema de transferencia semiseca (*Trans-Blot SD semidry transfer cell*, Bio-Rad). Tras sumergir la nitrocelulosa y el gel durante 5 minutos en el tampón de transferencia (TRIS (*Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane*, Panreac) 25mM, glicina (*Glycine*, Sigma) 192mM, SDS

(*Sodium Dodecyl Sulphate*, Sigma) 3,5 mM, metanol (*Methanol*, Sigma) 20%, pH 8.3) se colocó sobre el ánodo una capa de papel de filtro grueso (Whatman) humedecida con el tampón de transferencia, sobre ella la nitrocelulosa, a continuación el gel y por último otra capa de papel de filtro, evitando que se formasen burbujas de aire entre las distintas capas. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje de 20V y un amperaje de 0,04 A durante 1 hora. La detección de las proteínas fijadas a la nitrocelulosa se realizó utilizando anticuerpos específicos (Western blot apartado 3.2.4.3.). El gel se tiñó con Azul de Coomassie (*Brilliant Blue R*, Sigma) una vez finalizada la transferencia para comprobar que las proteínas se habían transferido a la membrana de nitrocelulosa correctamente. La tinción se efectuó por inmersión de los geles durante 1 hora en una solución de azul de Coomassie (*Brilliant Blue R*, Sigma) y se dejaron destiñendo toda la noche en una solución decolorante que contenía 10% de ácido acético glacial (*Acetic Acid Glacial*, Panreac), 25% de metanol (*Methanol*, Sigma), 2% de glicerol (*Glycerol*, Sigma) y 63% de agua.

#### **3.2.4.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot**

Tras la transferencia de proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa (apartados 3.2.4.1 y 3.2.4.2), la detección específica de cada proteína se realizó según el método descrito por Towbin [88] con alguna modificación detallada a continuación. Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon incubando durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con una solución de leche en polvo al 5% (p/v) en tampón B (NaCl (*Sodium Chloride for analysis*, Panreac) 0,12 M, TRIS/HCl (*Trizma Hydrochloride*, Sigma) 0,01 M, Tween-20 (*Tween20 for synthesis*, Panreac) 0,5% (p/v), pH 8 y azida sódica (*Sodium azide*, Sigma) al 0,1%). Seguidamente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos, con agitación vigorosa, con tampón B. Posteriormente se incubaron durante 1 hora con el correspondiente antisuero, disuelto en tampón B con leche en polvo al 2,5% (p/v). La dilución óptima se determinó en cada caso y se resume en la Tabla 4. Finalizada la incubación se lavó 3 veces con tampón B del mismo modo descrito anteriormente. A continuación las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, marcado con peroxidasa (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma) y diluido 1/20.000 en tampón B con leche en polvo al 2,5%

(p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación suave. Tras lavar con el tampón B 3 veces, los inmunocomplejos se detectaron mediante la reacción de la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario con un sustrato comercial (HRP (Horseradish Peroxidase) Substrate, Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate), que se dejó reaccionar durante 1:30 minutos. A continuación, se colocaron las membranas en un Cassette (*X ray film cassette*) y se revelaron en films (*CL-XPosure Film*, Thermo Scientific). Se utilizó una solución reveladora (100ml Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma) + 350 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) y una solución fijadora (100 ml Kodak processing chemicals for autoradiography films (Sigma) + 400 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), en la que se sumergieron los films (*CL-XPosure Film*, Thermo Scientific) de revelado. Estos films se escanearon y se determinó las UR (Unidades Relativas) con el programa ImageJ.

**Tabla 4**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>
Anti-ITI4	1/2000
Anti-Transferrina	1/5000
Anti-ICP	1/3000
Anti-haptoglobina	1/1000*
Anti-GPA	1/2000
Anti-ApoA1	1/250
Anti-CRP	1/500

\*La dilución de la haptoglobina se modificó en el último ensayo de Western blot a una dilución 1/3000 para *B. microti* y 1/2000 para *B. suis*.

### 3.2.5. Cuantificación proteica mediante ensayos ELISA

Se utilizaron kits ELISA de la casa comercial ICL (Immunology Consultants Laboratory, INC) para cuantificar las siguientes proteínas:

- Haptoglobina (Mouse Haptoglobin ELISA Kit, catálogo E-90HPT)
- Proteína amiloide A sérica (SAA)(Mouse SAA ELISA Kit, catálogo E-90SAA)
- Hemopexina (Mouse Hemopexin ELISA Kit, catálogo E-90HX)

Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

En ausencia de un kit para la determinación de la GPA de ratón de la casa comercial ICL, se utilizaron dos kits de las casas comerciales YHbiosearch y Elabscience®, pero ninguno de ellos resultó adecuado para cuantificar esta proteína.

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-LPS inducidos por la infección de *B. microti* y *B. suis* se realizó un ELISA descrito en [89].

### **3.3. Análisis estadístico**

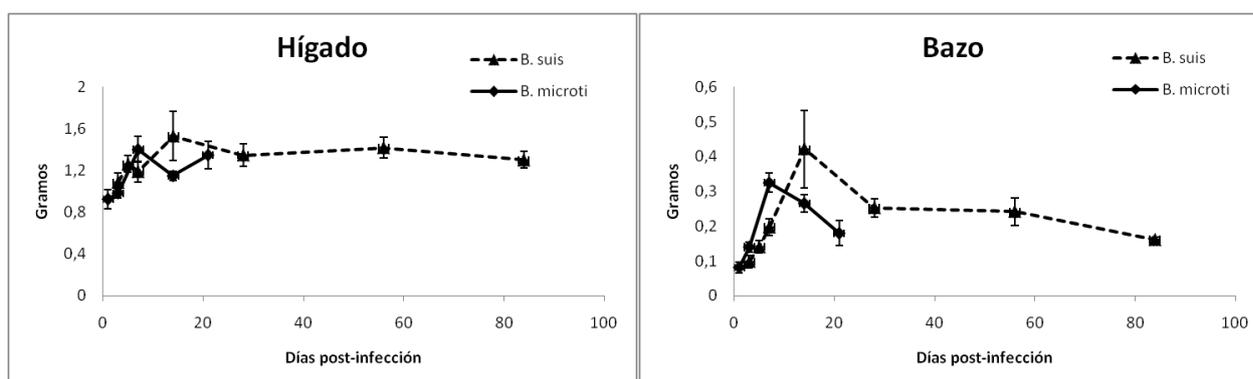
Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 16.0. Para cada infección, la significación de los datos de concentración de las proteínas se ha evaluado para cada día experimental post-infección comparándolo con el día previo a la infección (día cero). Se realizó un test ANOVA seguido de un test post-hoc, Dunnett o Games-Howell dependiendo de si las varianzas son iguales o difieren, respectivamente. Las diferencias entre la cepa *B. suis* con la cepa *B. microti* se compararon los distintos días post-infección por T-de Student. \*\* $P \leq 0.001$ , \* $P \leq 0.05$ .

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Cinética de la infección bacteriana

Con el fin de evaluar la evolución de la infección se determinó la carga bacteriana de dos órganos, hígado y bazo. Para ello, en primer lugar se pesó el órgano y posteriormente se realizó un cultivo del tejido, como se explica en el apartado 3.1.

#### *Peso de hígado y bazo*



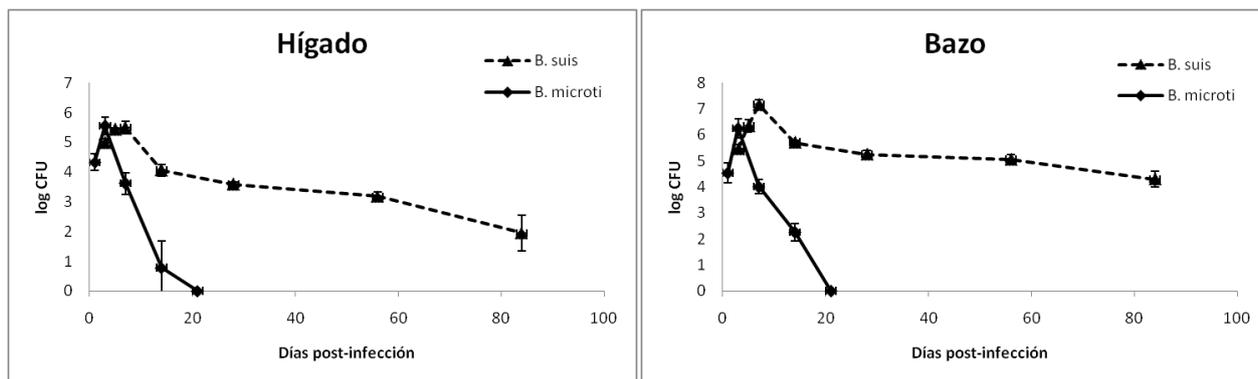
**Figura 2.** Evolución del peso del hígado y bazo de los ratones (n=4) durante la infección por *B. microti* (—) o *B. suis* (---).

En la figura 2 se puede observar que, tanto el peso del hígado como del bazo de ratones infectados con *B. suis*, aumenta el día 14 de la infección, mientras que para los órganos de ratones infectados con *B. microti* este aumento sucede el día 7. Tanto para la infección por *B. microti* como por *B. suis*, el peso del hígado no consigue recuperarse mientras que el del bazo prácticamente recupera los valores iniciales.

#### *Carga bacteriana en hígado y bazo*

La carga bacteriana se determinó, como se explica en el apartado 3.1.2., realizando un cultivo del tejido y contando las unidades formadoras de colonias (CFU).

Como se puede observar en la figura 3, *B. microti* presenta el punto máximo de carga bacteriana al día 3 de la infección, mientras que *B. suis* lo hace al día 7. Es destacable que, mientras los ratones infectados con *B. microti* consiguen erradicar por completo la infección, los ratones infectados con *B. suis* permanecen en un estado crónico y no consiguen eliminar la bacteria de su organismo. Esto se debe a que *B. microti* produce una infección aguda mientras que *B. suis* provoca una infección crónica.

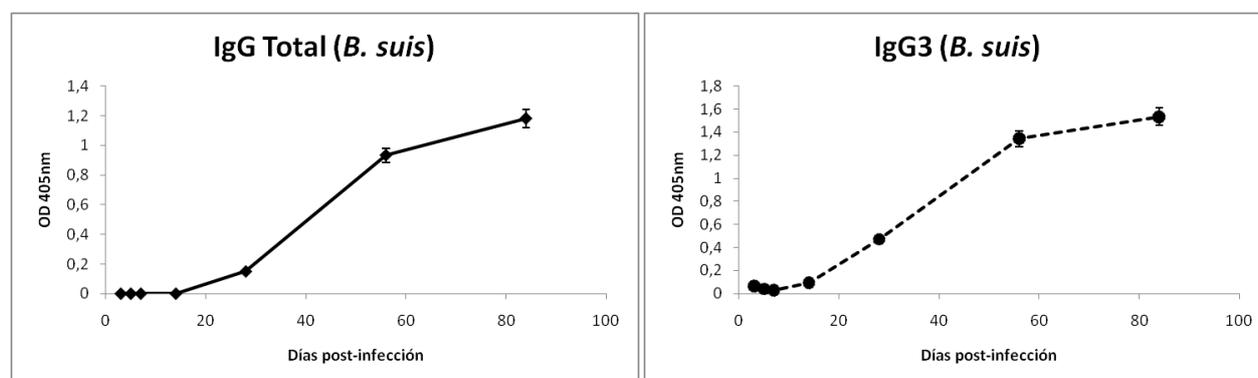


**Figura 3.** Evolución de las unidades formadoras de colonias (CFU), expresadas en logaritmo, del hígado y bazo de los ratones (n=4) durante la infección por *B. microti* (—) o *B. suis* (---).

## 4.2. Detección de inmunoglobulinas IgG anti-LPS

La respuesta de Inmunoglobulinas totales y de la IgG3 fue paralela (figura 4), comenzó a ser evidente en el día 28 post-infección y se incrementó progresivamente hasta el final del experimento en la infección con *B. suis*.

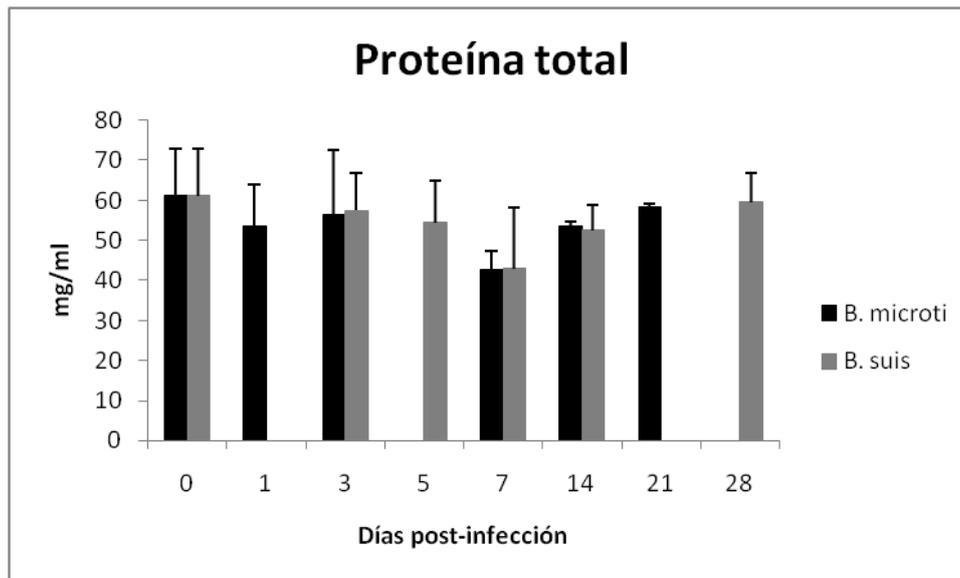
En la infección por *B. microti* no se detectó ningún tipo de Ig probablemente porque su aparición es tardía y el experimento con *B. Microti* solo se realizó hasta el día 21.



**Figura 4.** Título de anticuerpos contra el Lipopolisacárido de *B. abortus*. Se determinaron por ELISA las Ig totales (—) y la IgG3 (---) en sueros diluidos 1/50 a distintos días de infección por *B. suis* y por *B. microti*.

## 4.3. Cuantificación de proteína total

Se cuantificó la concentración de proteína total en los sueros de los ratones pre y post-infección mediante el método de Bradford. Los datos obtenidos se resumen en la figura 5.



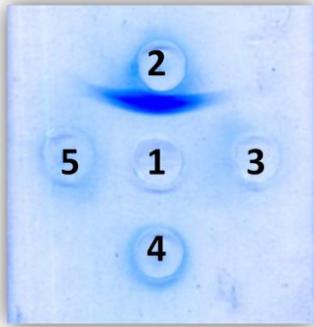
**Figura 5. Evolución de la concentración de proteína total presente en los sueros de ratón.** Se cuantificó por Bradford la concentración de proteína total, mg/ml, presente en los sueros de ratón (n=4) infectados con *B. microti* (negro) y *B. suis* (gris) a los diferentes días de infección. Las barras verticales representan la DS.

Aunque aparentemente se observó una disminución de la concentración de proteína hacia el día 7 en las dos infecciones experimentales, estos datos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.4. Proteínas de fase aguda

Las diferencias observadas en la forma de infectar y de replicarse de *B. microti* y *B. suis* se traducirán en diferentes respuestas por parte del huésped, lo que llevará a una diferente expresión de proteínas.

En el laboratorio se dispone de una gran batería de antisueros para PFA de cerdo y rata, y de un antisuero anti-transferrina de ratón. En primer lugar se testaron por Ouchterlony (figura 6) para determinar si estos antisueros poseían reactividad cruzada frente a las muestras de ratón. Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos para todos los antisueros de cerdo y de rata, dando únicamente un resultado positivo el antisuero anti-transferrina de ratón.



**Figura 6. Inmunodifusión doble de Ouchterlony.** Se testaron por inmunodifusión doble de Ouchterlony los sueros de ratón (1) frente a distintos antisueros: 2) anti-transferrina de ratón; 3) anti-GPA de rata; 4) anti-ITIH4 de rata; 5) anti-ICP de rata.

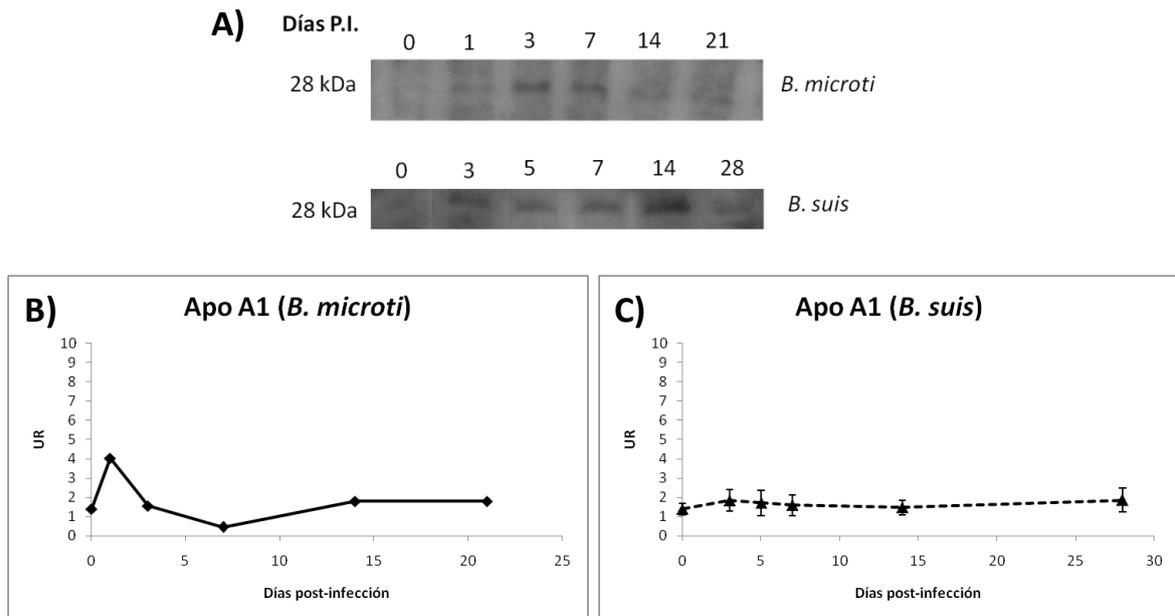
A continuación se probó la capacidad de detección de las PFA de ratón de estos antisueros de cerdo y rata por Western blot. Se probaron contra siete proteínas (Apo A1, ICP, CRP, ITIH4, transferrina, haptoglobina y GPA) y se cuantificaron las UR como se describe en Materiales y Métodos.

Para determinar la concentración exacta de las PFA que modificaban considerablemente su expresión por Western blot se utilizaron kits ELISA comerciales (para haptoglobina y GPA). También se determinaron por ELISA comercial la SAA y la hemopexina, proteínas de las que no se disponía antisuero y que están descritas como importantes en el ratón [54], [74].

#### 4.4.1. Apolipoproteína A1

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes días de la infección por *B. microti* y por *B. suis* (figura 7B y 7C), a pesar del aparente incremento de concentración el día 1 de la infección por *B. microti*. Estos resultados son preliminares, ya que la técnica es susceptible de mejora. El antisuero, a pesar de que reconoce la Apo A1, no proporciona resultados reproducibles.

Como se ha explicado en la introducción, la Apolipoproteína A1 se ha descrito como PFA negativa en una serie de mamíferos, sin embargo, en ratón posee un comportamiento contradictorio, ya que se han observado tanto aumentos [42], [47] como disminuciones [79] de su concentración. A pesar de que los resultados obtenidos son preliminares, no parece que esta proteína (Apo A1) en ratón presente características de una proteína de fase aguda.

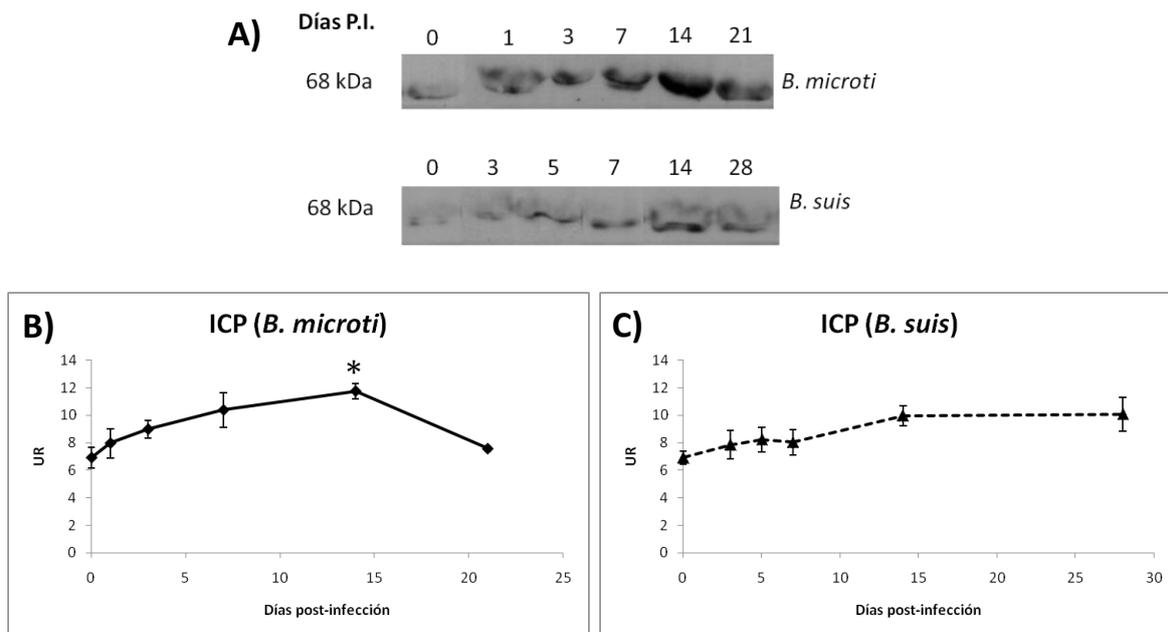


**Figura 7. Evolución de la Apo A1 en sueros de ratón a distintos días post-infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*. Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-Apo A1 de cerdo (dilución 1/250) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000). Evolución de las unidades relativas de la proteína ApoA1 durante la infección por *B. microti* (B) y *B. suis* (C).

#### 4.4.2. Inhibidor de $\alpha$ 1-Cisteína proteasa

Como se aprecia en la figura 8, se observó que la ICP sufría un leve aumento a lo largo de la infección por *B. microti*, con un máximo el día 14 de la infección. En la infección por *B. suis*, sin embargo, los niveles de esta proteína permanecieron constantes. Solo se obtuvieron diferencias significativas el día 14 de la infección por *B. microti*, probablemente debido al carácter de infección aguda de esta cepa.

Aunque los valores de ICP los días 7 y 14 son mayores en *B. microti* que en *B. suis*, el análisis estadístico entre la infección por *B. microti* y *B. suis* no mostró diferencias significativas.



**Figura 8. Evolución de la ICP en sueros de ratón a distintos días post-infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*. Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-ICP de rata (dilución 1/3000) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000). Evolución de las unidades relativas de la proteína ICP durante la infección por *B. microti* (B) y *B. suis* (C). \* $P \leq 0,05$ , diferencias estadísticamente significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.

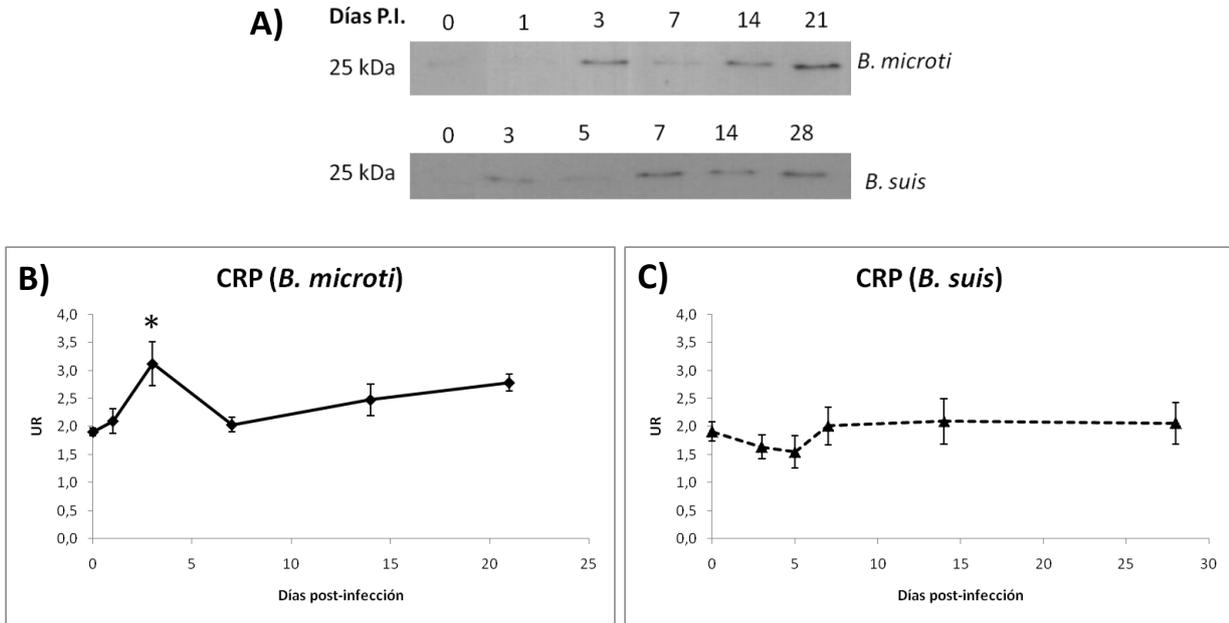
El Inhibidor de  $\alpha$ 1-Cisteína proteasa (ICP) es una proteína descrita como proteína principal de fase aguda positiva en rata [75]. En ratón se ha observado que sufre un leve aumento durante la infección por *B. microti*.

#### 4.4.3. Proteína C reactiva

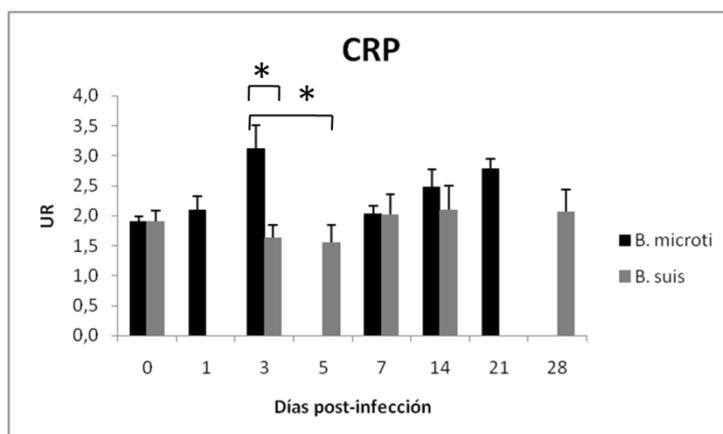
En la figura 9C se puede apreciar que la infección por *B. suis* no modificó la concentración de la CRP, pero no ocurre lo mismo cuando se infectó con *B. microti*. Esta cepa de *Brucella* causa una infección aguda y provocó un aumento significativo en la concentración de la proteína el día 3 de la infección, disminuyendo hasta alcanzar los valores normales a partir de este día.

Comparando los datos obtenidos entre ambas cepas de *Brucella* (figura 10) se confirmó que en el día tres de la infección por *B. microti* la proteína CRP sufre un aumento significativo en la concentración en el suero de ratón con respecto a la

concentración de dicha proteína el día 3 y 5 de la infección por *B. suis*. Por lo tanto, esta proteína es una proteína de fase aguda positiva, pero únicamente en el caso más extremo, para una infección aguda (*B. microti*), y no para una infección crónica (*B. suis*).



**Figura 9. Evolución de la CRP en sueros de ratón a distintos días post-infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*. Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (12%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-CRP (dilución 1/500) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000). Evolución de las unidades relativas de la proteína CRP durante la infección por *B. microti* (B) y *B. suis* (C). \* $P \leq 0,05$ , diferencias estadísticamente significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.



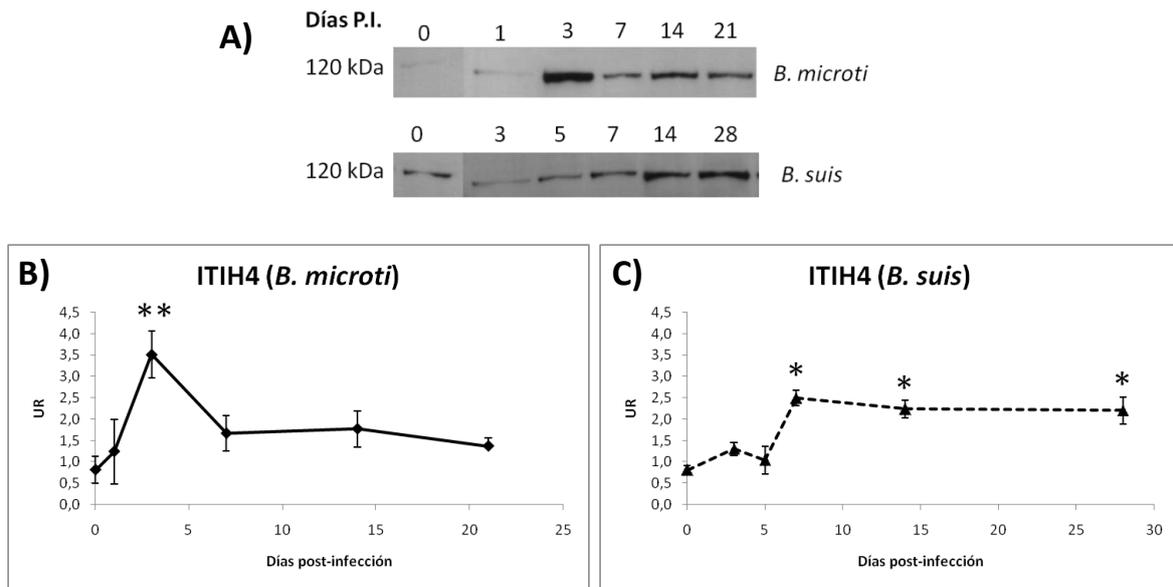
**Figura 10. Comparación de la respuesta de la CRP entre la infección por *B. microti* (negro) y la de *B. suis* (gris).** Se compararon los valores de la proteína en los distintos días post-infección entre una y otra cepa. \* $P \leq 0,05$ , indica diferencias estadísticamente significativas entre *B. microti* y *B. suis* calculadas por T-Student.

La CRP se considera PFA positiva en distintos animales, entre ellos la rata [50], y en ratón se ha descrito como una proteína presente a muy baja concentración, tanto en el suero normal como en el de fase aguda [51], [52]. En este estudio se ha observado que la concentración de la CRP era muy baja tanto en suero normal (día 0) como en suero de ratones infectados, siendo la cepa más virulenta *B. microti* la que induce un aumento en su concentración al inicio de la infección (día 3 post-infección).

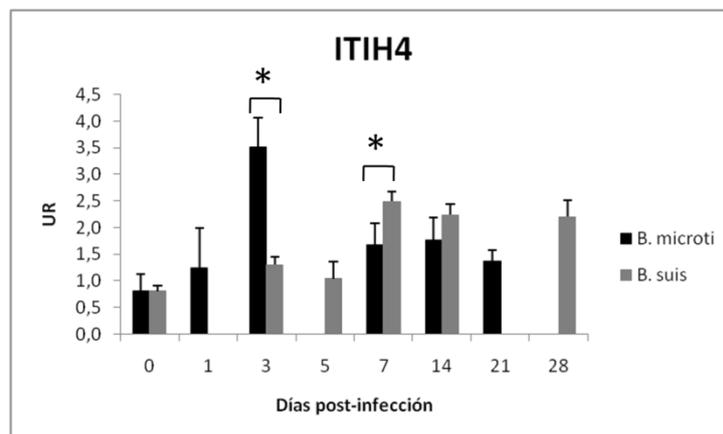
#### 4.4.4. Cadena pesada 4 del inhibidor de tripsina inter- $\alpha$

Se observaron diferencias significativas el día 3 de la infección por *B. microti* y los días 7, 14 y 28 de la infección por *B. suis*. Como se observa en la figura 11B, la infección por *B. microti* aumentó la concentración de ITIH4 unas 4 veces al inicio de la infección, alcanzando un máximo de concentración el día 3, día a partir del cual descendió la concentración de ITIH4 a valores normales. La infección por *B. suis* (figura 11C) aumentó la concentración de ITIH4 unas 3,5 veces a partir del día 7, y se mantuvo constante hasta el día 28.

El análisis comparativo entre ambas cepas (figura 12) reveló diferencias significativas a los días 3 y 7 post-infección de *B. microti* y *B. suis*. Estas diferencias se deben a que el aumento de la ITH4 se produce más rápido en la infección por *B. microti* al ser una cepa que provoca una infección aguda y una respuesta del huésped más rápida.



**Figura 11. Evolución de la ITIH4 en sueros de ratón a distintos días post-infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*. Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un antisuero primario anti-ITIH4 de rata (dilución 1/2.000) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000). Evolución de las unidades relativas de la proteína ITIH4 durante la infección por *B. microti* (B) y *B. suis* (C). \*\* $P \leq 0,001$  \* $P \leq 0,05$ , diferencias estadísticamente significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.



**Figura 12. Comparación de la respuesta de la ITIH4 entre la infección por *B. microti* (negro) y la de *B. suis* (gris).** Se compararon los valores de la proteína en los distintos días de infección entre una y otra cepa. \* $P \leq 0,05$ , indica diferencias estadísticamente significativas entre *B. microti* y *B. suis* calculadas por T-Student.

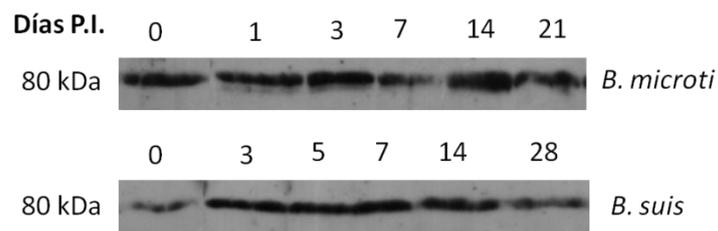
En la literatura se ha descrito a la ITIH4 como PFA positiva en humano, rata, cerdo y ratón, aunque en esta última especie hay muy pocos estudios [63]. Con los resultados

obtenidos en este estudio se puede afirmar que esta proteína constituye una proteína de fase aguda positiva en ratón.

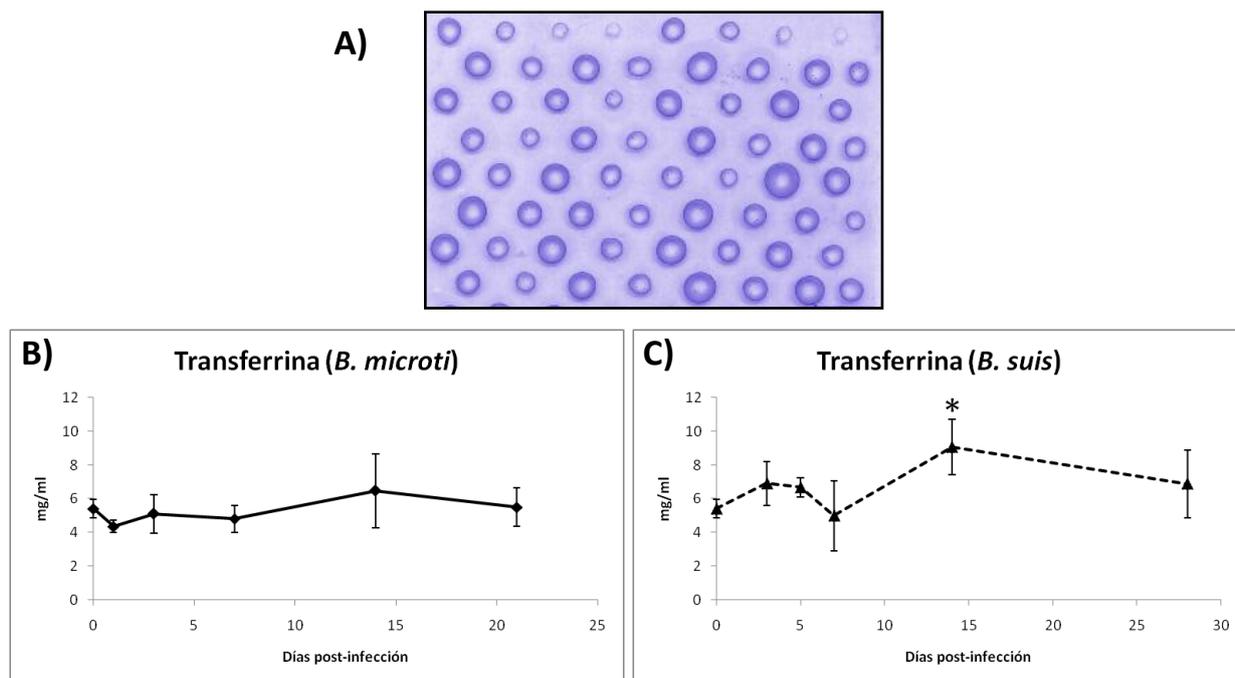
#### 4.4.5. Transferrina

Como ilustra la figura 13, no se observaron cambios significativos en la concentración de transferrina a lo largo de la infección por *Brucella*. Para confirmar estos datos, y debido a la disponibilidad de un antisuero anti-transferrina de ratón, se realizó un Mancini (figura 14A) con los sueros de ratón. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14B y 14C.

El análisis de la transferrina por Mancini confirmó los datos obtenidos de ambas infecciones por Western blot. El análisis estadístico realizado solo proporcionó diferencias significativas para el día 14 de la infección por *B. suis* (figura 14C). No se observaron diferencias significativas entre las cepas.



**Figura 13. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*.** Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-Transferrina (dilución 1/5.000) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000).



**Figura 14. Evolución temporal de la respuesta de transferrina en suero de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Inmunodifusión radial simple de Mancini. Los sueros de ratón (n=4), diluidos 1/40 y 1/80, se testaron por Mancini con el antisero anti-transferrina al 2%, como se describe en materiales y métodos. Evolución de la concentración de transferrina en suero de ratón durante la infección con *B. microti* (B) y *B. suis* (C). La concentración de la proteína (mg/ml) en los sueros de ratón (n=4) se determinó por Mancini como se ha descrito en materiales y métodos. \* $P \leq 0,05$ , diferencias significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.

En general, los autores [78] describen la transferrina como PFA negativa en ratón, y en este estudio se podría considerar como una PFA positiva.

#### 4.4.6. Haptoglobina

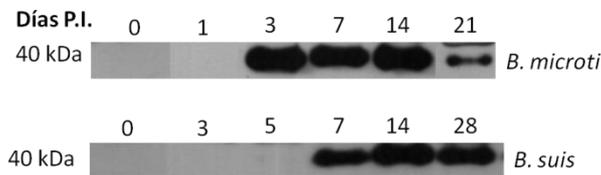
Como se aprecia en la figura 15, la haptoglobina es la proteína que más diferencias muestra a lo largo de la infección. Mediante el análisis de Western blot (figura 15) se observó que la infección por *B. microti* inducía un aumento de esta proteína mucho más rápido que *B. suis*, empezando a los 3 días con *B. microti* y a los 7 días con *B. suis*.

Para confirmar los resultados obtenidos por Western blot se utilizó el kit ELISA "Mouse Haptoglobin ELISA Kit, E-90HPT", de la casa comercial ICL (Immunology Consultants Laboratory, INC) (figura 16). Se observó que la infección por *B. microti* inducía un aumento de la concentración de haptoglobina de 1,4 veces el día 3, con diferencias significativas para los días 3 y 7 post-infección. La infección por *B. suis*

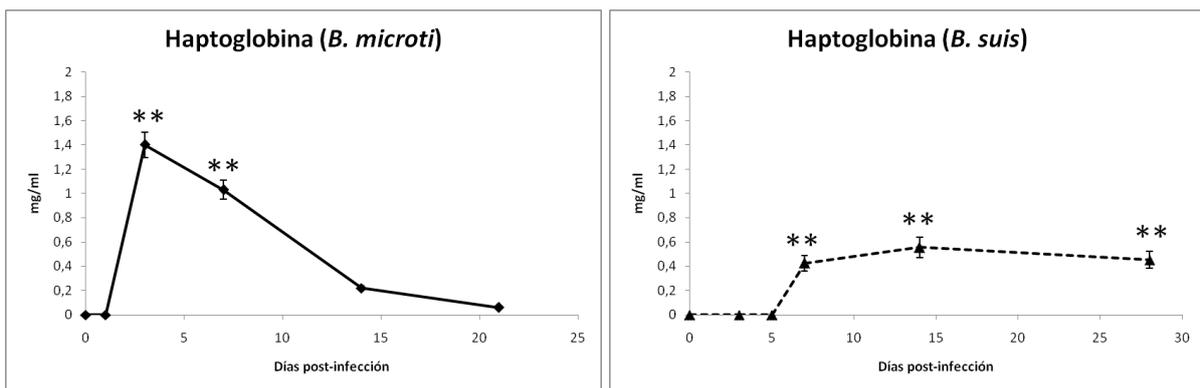
indujo un aumento menor (0,5 veces) y más tardío (día 7), con diferencias significativas para los días 7, 14 y 28 post-infección.

En ambos casos se recuperaron los niveles normales de haptoglobina. Para *B. microti* la recuperación total se produjo hacia el día 21 y para *B. suis* hacia el día 84 de la infección (solo se muestran los resultados de *B. suis* hasta el día 28 de la infección, pero se cuenta con los datos de todos los días).

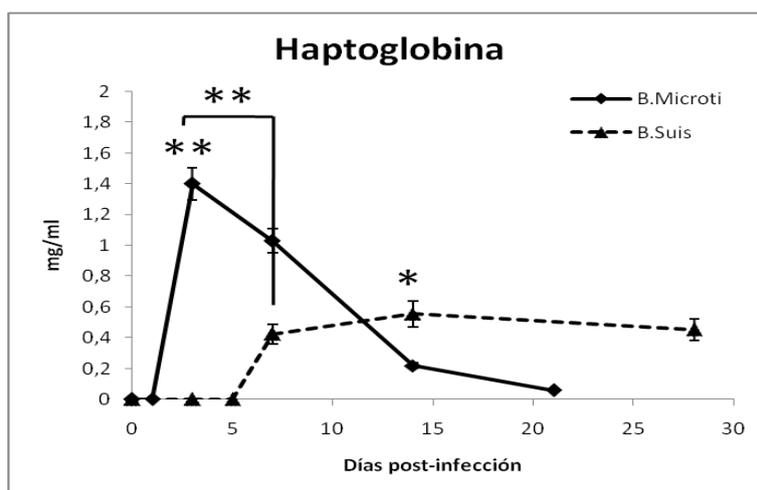
Con el análisis comparativo entre cepas (figura 17) se observaron diferencias significativas a los días 3 y 7 post-infección, y entre el día 3 de la infección por *B. microti* y el día 5 de la infección por *B. suis*.



**Figura 15. Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*.** Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (12%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-Haptoglobina (dilución 1/3000 para *B. microti* 1/2000 para *B. suis*) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000).



**Figura 16. Evolución temporal de la respuesta de haptoglobina en suero de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. microti* y *B. suis*.** La concentración de la proteína (mg/ml) en los sueros de ratón (n=4) se determinó por ELISA según las instrucciones del fabricante.  $**P \leq 0,001$ , diferencias significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett (*B. microti*) ó Games-Howell (*B. suis*) post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.



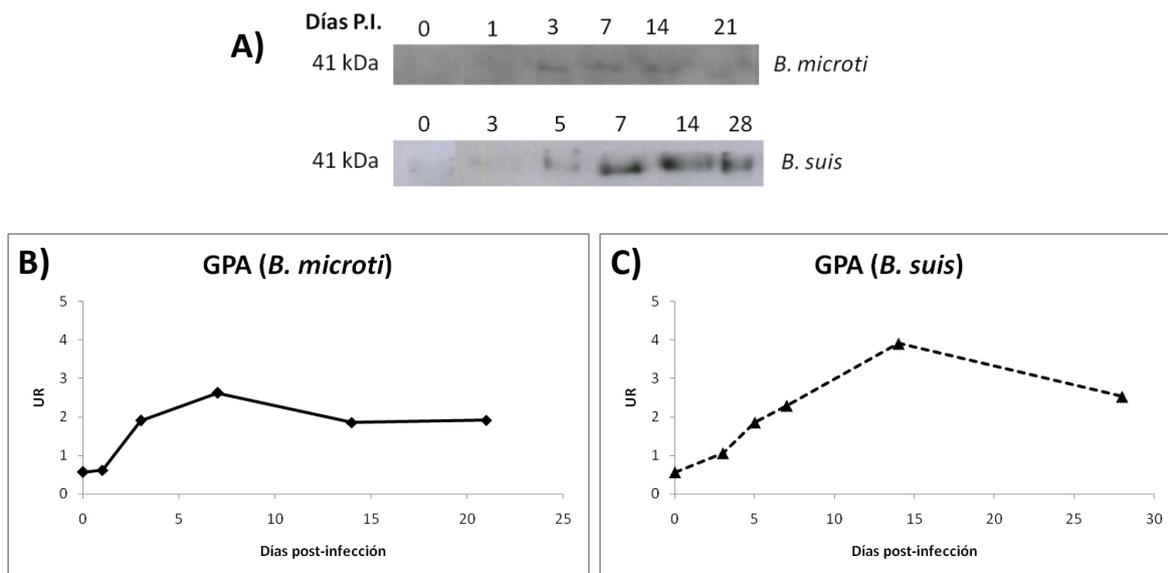
**Figura 17. Comparación de la respuesta de la haptoglobina entre la infección por *B. microti* (—) y la de *B. suis* (---).** Se compararon los valores de la proteína en los distintos días de infección entre una y otra cepa. \*\* $P \leq 0,001$  \* $P \leq 0,05$ , indica diferencias estadísticamente significativas entre *B. microti* y *B. suis* calculadas por T-Student.

En este estudio la haptoglobina es una de las proteínas más importantes en la fase aguda del ratón, lo que está de acuerdo con otros estudios [30], [46].

#### 4.4.7. $\alpha$ -1-Glicoproteína ácida

La GPA aumentó más en *B. suis* que en *B. microti*, siendo este aumento más temprano en *B. microti* (7 días) que en *B. suis* (14 días). Debido a que la reactividad del antisuero utilizado no fue suficientemente reproducible en los sueros disponibles, estos resultados se consideraron como preliminares. Aparentemente, la concentración de GPA aumentó levemente durante el transcurso de la infección (figura 18), siendo la infección por *B. suis* la que indujo un aumento mayor.

Por lo tanto se utilizó a un kit comercial ELISA para determinar la concentración de la GPA en estos sueros. Se probaron dos Kits ELISA de las casas comerciales YHbiosearch y Elabscience®, pero con ninguno de ellos se detectó la proteína. La casa comercial ICL con la que se obtuvieron resultados para otras PFA no disponía de un kit para detectar la GPA.



**Figura 18. Evolución de la GPA en sueros de ratón a distintos días post-infección con *B. microti* y *B. suis*.** A) Western blot de sueros de ratón infectados con *B. microti* y *B. suis*. Los sueros de ratón (n=4) recogidos en los distintos días de infección (0, 1, 3, 7, 14 y 21 para *B. microti* y 0, 3, 5, 7, 14 y 28 para *B. suis*) diluidos 1/20 se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó con un antisuero primario anti-GPA (dilución 1/2.000) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (dilución 1/20.000). Evolución de las unidades relativas de la proteína GPA durante la infección por *B. microti* (B) y *B. suis* (C).

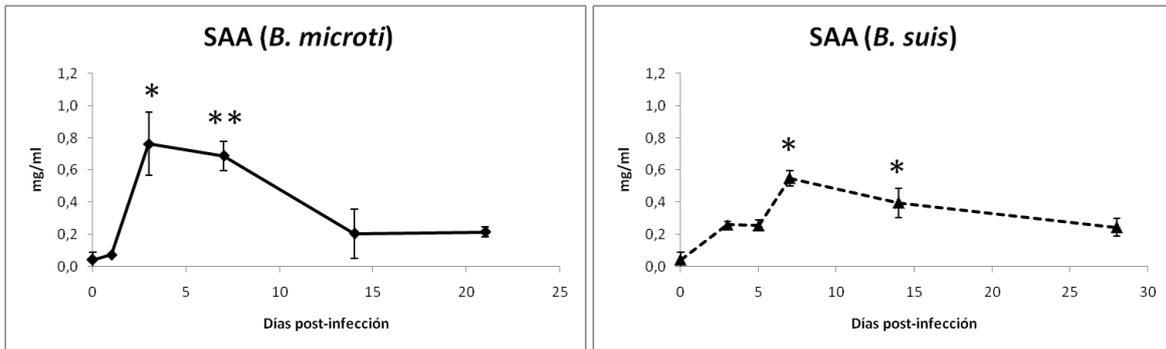
En la literatura está descrito un aumento de la GPA durante la fase aguda en ratón [41], [42], [47], lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos.

#### 4.4.8. Proteína amiloide A sérica

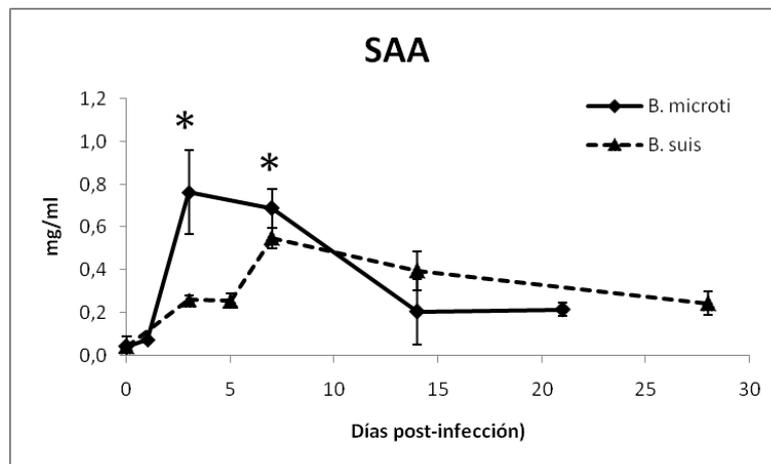
Para medir la concentración de SAA en suero de ratón se utilizó el kit ELISA “Mouse SAA ELISA Kit, E-90SAA”, de la casa comercial ICL (Immunology Consultants Laboratory, INC).

En la figura 19 se observa que la infección por *B. microti* elevó la concentración de SAA 0,76 veces el día 3 post-infección. Se obtuvieron diferencias significativas los días 3 y 7 post-infección, que representan el máximo de concentración de SAA en la infección por *B. microti*. La infección por *B. suis* produjo este aumento hacia el día 7 post-infección y fue algo menor (<0,6 veces). Se obtuvieron diferencias significativas los días 7 y 14 post-infección.

En el análisis comparativo entre ambas cepas (figura 20) se observaron diferencias significativas a los días 3 y 7 post-infección. La cepa *B. microti* indujo una respuesta aguda mucho más rápida, que se tradujo en un aumento del SAA mayor y más rápido que el provocado por la infección por *B. suis*. Los niveles de SAA no se recuperaron en ninguna de las infecciones.



**Figura 19. Evolución temporal de la respuesta de SAA en suero de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. microti* y *B. suis*.** La concentración de la proteína (mg/ml) en los sueros de ratón (n=4) se determinó por ELISA según las instrucciones del fabricante. \*\* $P \leq 0,001$  \* $P \leq 0,05$ , diferencias significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Games-Howell post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.



**Figura 20. Comparación de la respuesta de la SAA entre la infección por *B. microti* (—) y la de *B. suis* (---).** Se compararon los valores de la proteína en los distintos días de infección entre una y otra cepa. \* $P \leq 0,05$ , indica diferencias estadísticamente significativas entre *B. microti* y *B. suis* calculadas por T-Student.

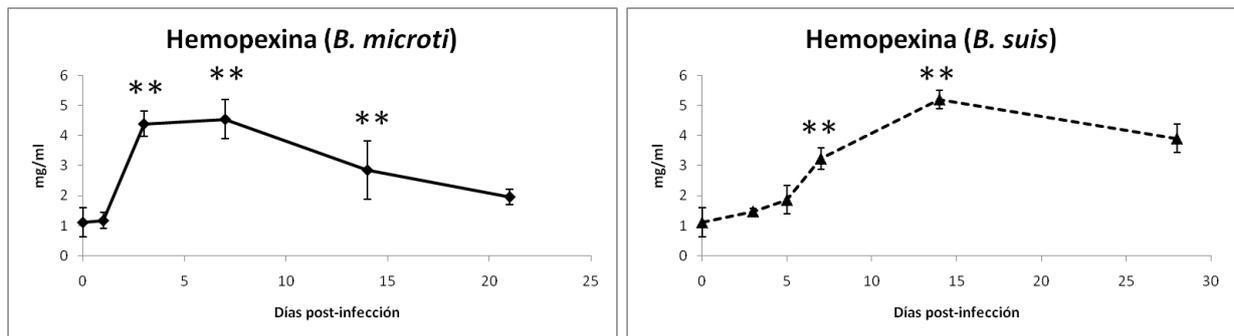
Con los resultados obtenidos se puede afirmar que la SAA constituye una PFA positiva en ratón, como se ha descrito en la literatura [54].

#### 4.4.9. Hemopexina

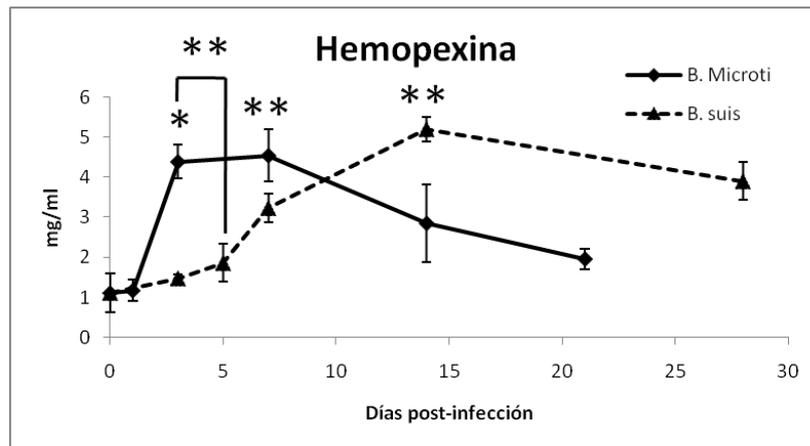
Para medir la concentración de hemopexina presente en los sueros de ratón se utilizó el kit ELISA "Mouse Hemopexin ELISA Kit, E-90HX", de la casa comercial ICL (Immunology Consultants Laboratory, INC).

Como se observa en la figura 21, ambas cepas de *Brucella* indujeron un incremento en la concentración de hemopexina. La infección por *B. microti* indujo este aumento hacia el día 3 post-infección, se mantuvo constante hasta el día 7 y comenzó a descender. Se observaron diferencias significativas los días 3, 7 y 14 de la infección por *B. microti*. La infección por *B. suis* produjo un aumento de la concentración de hemopexina más gradual, con un máximo el día 14 post-infección. Se observaron diferencias significativas los días 7 y 14 de la infección por *B. suis*.

El análisis comparativo (figura 22) permitió observar las diferencias en la expresión de hemopexina, que se debieron fundamentalmente a distinta capacidad infectiva de las cepas de *Brucella*. Esto hizo que el aumento de hemopexina se produjera antes en la infección por *B. microti* (que comenzó hacia el día 3 y se mantuvo hasta el día 7) que en la infección por *B. suis*, que comenzó a aumentar hacia el día 7 con un máximo de concentración el día 14. Se han observado diferencias significativas entre cepas el día 3, 7 y 14, y entre el día 3 de *B. microti* y el día 5 de *B. suis*. También se ha observado que en ninguna de las infecciones se consiguieron recuperar los valores normales de concentración de hemopexina.



**Figura 21. Evolución temporal de la respuesta de hemopexina en suero de ratón antes (día 0) y después de la infección con *B. microti* y *B. suis*.** La concentración de la proteína (mg/ml) en los sueros de ratón (n=4) se determinó por ELISA según las instrucciones del fabricante.  $**P \leq 0,001$ , diferencias significativas referidas al día cero analizadas por ANOVA seguidas de Dunnett (*B. microti*) ó Games-Howell (*B. suis*) post-hoc test. Las barras verticales corresponden a la DS.



**Figura 22. Comparación de la respuesta de la hemopexina entre la infección por *B. microti* (—) y la de *B. suis* (---).** Se compararon los valores de la proteína en los distintos días de infección entre una y otra cepa. \*\* $P \leq 0,001$  \* $P \leq 0,05$ , indica diferencias estadísticamente significativas entre *B. microti* y *B. suis* calculadas por T-Student.

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que la hemopexina es una PFA positiva en ratón, como se ha descrito en la literatura [74].

Con estos resultados se puede confirmar que las proteínas de fase aguda (PFA) más relevantes en las infecciones por *Brucella* estudiadas son la ITIH4, la haptoglobina, la GPA, la SAA y la hemopexina. La infección más virulenta provocada por *B. microti* produjo un aumento de estas PFA más temprano y más acusado que la infección por *B. suis*, lo que coincide con lo descrito en la literatura para otro tipo de situaciones de inflamación o estrés [8].

## 5. Conclusiones

1. La infección realizada con *B. suis* se puede considerar como crónica pues los ratones no consiguen eliminar las bacterias en el periodo estudiado (3 meses) mientras que la de *B. microti* es una infección aguda ya que a los 21 días se han eliminado las bacterias tanto de hígado como de bazo.
2. El tipo de infección se refleja en la evolución del peso del hígado y del bazo que alcanza su máximo a los 14 días con *B. suis* y 7 días antes con *B. microti*.
3. El tipo de infección se refleja en la evolución de las CFU cuyo máximo se alcanza a los 3 días, tanto en hígado como en bazo, con *B. microti* y más tardíamente, a los 7 días, en *B. suis*.
4. Se detectó respuesta de Inmunoglobulinas totales y de IgG3 al día 28 post-infección en infección por *B. suis* pero no hubo respuesta en *B. Microti*.
5. Se han estudiado sueros de ratón normales e infectados con *B. suis* y *B. Microti* mediante técnicas electroforéticas e inmunoquímicas. La concentración de la haptoglobina y SAA se elevó de 0 hasta 1,4 y 0,76, respectivamente y el aumento de la hemopexina, GPA e ITIH4 fue entre 6 y 4 veces durante la respuesta de fase aguda.
6. La evolución de la concentración de las PFA permite distinguir el tipo de infección. El pico máximo de concentración se alcanza antes en la infección producida por *B. microti*, a los 3 días, que con *B. suis*, a los 7 días para SAA e ITIH4 y a los 14 días con haptoglobina y GPA. También los valores máximos de concentración de estas PFA fueron mayores para *B. microti* que para *B. suis*.
7. El tiempo de aparición de la concentración máxima de la hemopexina se retrasa con respecto a las anteriores, apareciendo a los 7 días en *B. microti* y a los 14 días en *B. suis*.

8. La concentración de Apo A1 no varió en la infección por *B. suis*, por tanto, en este contexto no se puede considerar proteína de fase aguda, ni negativa ni positiva.
9. En los sueros de ratones infectados con *B. microti* (pero no con *B. suis*) se obtuvo un aumento significativo (1,5x) de la CRP y (2x) del inhibidor de la  $\alpha_1$ -Cisteína proteasa los días 3 y 14 de la infección, respectivamente.
10. La infección con *B. suis* produjo un aumento de transferrina de 1,7 veces el día 14 post-infección pero este aumento no se produjo con *B. microti*.
11. La concentración de proteína total en suero tiene tendencia a disminuir en el día 14 en ambas infecciones, aunque esta variación no fue significativa.

## 5. Conclusions

1. *Infection with B. suis can be considered as chronic since mice can't eliminate the bacteria in the studied period (3 months) while B. microti causes an acute infection where bacteria from liver and spleen are removed at day 21.*
2. *The type of infection is reflected in the evolution of the weight of the liver and spleen that peaks at 14 days with B. suis and 7 days earlier with B. microti.*
3. *The type of infection is reflected in the evolution of the CFU whose maximum is reached after 3 days in both liver and spleen, with B. microti and later on, at day 7, in B. suis.*
4. *Total immunoglobulin and IgG3 response at day 28 post-infection was detected in B. suis infection, but there was no response in B. microti infection.*
5. *There have been studied sera of normal mice and infected with B. suis and B. microti by electrophoretic and immunochemical techniques. The concentration of haptoglobin and SAA rose from 0 to 1,4 and 0,76 , respectively, and the increase of hemopexina, GPA and ITIH4 was between 6 and 4 times during the acute phase response.*
6. *The evolution of the concentration of the PFA allows discriminating the type of infection. The peak concentration is reached before in the infection caused by B. microti, at day 3, that the peak reached with B. suis, at day 7 for SAA and ITIH4 and day 14 with haptoglobin and GPA. Also the maximum concentration values of these PFA were higher for B. microti that for B. suis.*
7. *The time of occurrence of the maximum concentration of the hemopexin is delayed respect to the proteins above, appearing at 7 days in B. microti and at day 14 in B. suis.*
8. *Apo A1 didn't change in B. suis infection. Therefore, in this context this protein cannot be regarded as a acute-phase protein, neither positive or negative.*
9. *In the sera of mice infected with B. microti (but not B. suis) a significant increase (1,5x) of CRP and (2x)  $\alpha$ 1-cysteine proteinase inhibitor was observed at days 3 and 14 of the infection, respectively.*

10. *B. suis* infection resulted in a 1,7 times transferrin increase on day 14 post-infection, but this increase did not occur with *B. microti*.
11. The total protein concentration in serum tends to decrease on day 14 in both infections, although this change was not significant.

## 6. Bibliografía

- [1] M. J. Grillá, J. M. Blasco, J. P. Gorvel, I. Moriyán, and E. Moreno, "What have we learned from brucellosis in the mouse model?," *Vet. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–35, 2012.
- [2] S. C. Olsen and M. V Palmer, "Advancement of Knowledge of Brucella Over the Past 50 Years.," *Vet. Pathol.*, no. June, 2014.
- [3] M. P. Franco, M. Mulder, R. H. Gilman, and H. L. Smits, "Human brucellosis," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 7, no. 12, pp. 775–786, Jun. 2015.
- [4] H. C. Scholz, Z. Hubalek, I. Sedláček, G. Vergnaud, H. Tomaso, S. Al Dahouk, F. Melzer, P. Kämpfer, H. Heubauer, A. Cloeckaert, M. Maquart, M. S. Zygmunt, A. M. Whatmore, E. Falsen, P. Bahn, C. Göllner, M. Pfeffer, B. Huber, H. J. Busse, and K. Nöckler, "Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, no. 2, pp. 375–382, 2008.
- [5] H. C. Scholz, E. Hofer, G. Vergnaud, P. Le Fleche, A. M. Whatmore, S. Al Dahouk, M. Pfeffer, M. Krüger, A. Cloeckaert, and H. Tomaso, "Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria.," *Vector Borne Zoonotic Dis.*, vol. 9, no. 2, pp. 153–6, Apr. 2009.
- [6] S. Kohler, V. Foulongne, S. Ouahrani-Bettache, G. Bourg, J. Teyssier, M. Ramuz, and J.-P. Liautard, "The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 24, pp. 15711–6, Nov. 2002.
- [7] N. Bosseray, M. Plommet, and J. De Rycke, "[Development of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella and Brucella suis* infection infection in mice to a chronic stage and cure].," *Ann. Rech. Vet.*, vol. 13, no. 2, pp. 153–61, Jan. 1982.
- [8] M. P. Jiménez de Bagüés, S. Ouahrani-Bettache, J. F. Quintana, O. Mitjana, N. Hanna, S. Bessoles, F. Sanchez, H. C. Scholz, V. Lafont, S. Köhler, and A. Occhialini, "The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection.," *J. Infect. Dis.*, vol. 202, no. 1, pp. 3–10, 2010.
- [9] A. Müllbacher, M. Regner, Y. Wang, E. Lee, M. Lobigs, and M. Simon, "Can we really learn from model pathogens?," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 10, pp. 524–528, Jun. 2015.
- [10] M. P. J. de Bagüés, A. de Martino, J. F. Quintana, A. Alcaraz, and J. Pardo, "Course of infection with the emergent pathogen *Brucella microti* in Immunocompromised mice," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 10, pp. 3934–3939, 2011.
- [11] Alton GG, "Animal Brucellosis," *Brucella suis*, pp. 412–422, 1990.
- [12] S. J. Cutler, A. M. Whatmore, and N. J. Commander, "Brucellosis--new aspects of an old disease.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, no. 6, pp. 1270–81, Jan. 2005.
- [13] D. Fretin, M. Mori, G. Czaplicki, C. Quinet, B. Maquet, J. Godfroid, and C. Saegerman, "Unexpected *Brucella suis* biovar 2 Infection in a dairy cow, Belgium.," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 12, pp. 2053–4, Dec. 2013.

- [14] J. M. B. Musser, A. L. Schwartz, I. Srinath, and K. A. Waldrup, "Use of serology and bacterial culture to determine prevalence of *Brucella* spp. in feral Swine (*sus scrofa*) in proximity to a beef cattle herd positive for *Brucella suis* and *Brucella abortus*," *J. Wildl. Dis.*, vol. 49, no. 2, pp. 215–20, Apr. 2013.
- [15] P. Nicoletti, "A short history of brucellosis.," *Vet. Microbiol.*, vol. 90, no. 1–4, pp. 5–9, Dec. 2002.
- [16] L. M. HUTCHINGS, A. L. DELEZ, and C. R. DONHAM, "Brucellosis in swine; reproduction studies with naturally infected sows and boars.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 7, no. 25, pp. 388–94, Oct. 1946.
- [17] Z. Cvetnić, S. Spicić, J. Tončić, D. Majnarić, M. BeniĆ, D. Albert, M. Thiébaud, and B. Garin-Bastuji, "Brucella suis infection in domestic pigs and wild boar in Croatia.," *Rev. Sci. Tech.*, vol. 28, no. 3, pp. 1057–67, Dec. 2009.
- [18] L. B. Forbes and S. V Tessler, "Transmission of brucellosis from reindeer to cattle.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 203, no. 2, pp. 289–94, Jul. 1993.
- [19] L. B. Forbes and S. V Tessler, "Evaluation of cattle for experimental infection with and transmission of *Brucella suis* biovar 4.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 222, no. 9, pp. 1252–6, May 2003.
- [20] H. H. Petersen, J. P. Nielsen, and P. M. H. Heegaard, "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry.," *Vet. Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 163–87, Jan. .
- [21] F. Cecilian, A. Giordano, and V. Spagnolo, "The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins.," *Protein Pept. Lett.*, vol. 9, no. 3, pp. 211–23, Jun. 2002.
- [22] H. Baumann and J. Gauldie, "The acute phase response.," *Immunol. Today*, vol. 15, no. 2, pp. 74–80, Feb. 1994.
- [23] C. A. Dinarello and S. M. Wolff, "Molecular basis of fever in humans.," *Am. J. Med.*, vol. 72, no. 5, pp. 799–819, May 1982.
- [24] I. Kushner, "The phenomenon of the acute phase response.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 389, pp. 39–48, Jan. 1982.
- [25] J. H. Verheijden, A. S. van Miert, A. J. Schotman, and C. T. van Duin, "Plasma zinc and iron concentrations as measurements for evaluating the influence of endotoxin-neutralizing agents in *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis.," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 724–8, Apr. 1982.
- [26] S. M. Filteau, "Vitamin A and the acute-phase response.," *Nutrition*, vol. 15, no. 4, pp. 326–8, Apr. 1999.
- [27] W. Khovidhunkit, M.-S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold, and C. Grunfeld, "Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host.," *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 7, pp. 1169–96, Jul. 2004.
- [28] A. Koj and A. Dubin, "On the hormonal modulation of acute-phase plasma protein synthesis in perfused rat liver.," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 21, no. 2, pp. 159–67, Jan. 1974.
- [29] A. Mackiewicz, "Acute phase proteins and transformed cells.," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 170, pp. 225–300, Jan. 1997.

- [30] L. A. Lasky, "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.," *Science*, vol. 258, no. 5084, pp. 964–9, Nov. 1992.
- [31] S. J., *Mediators of the Inflammatory Process*. 1989.
- [32] R. W. Johnson, "Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view.," *J. Anim. Sci.*, vol. 75, no. 5, pp. 1244–55, May 1997.
- [33] C. Biddle, "The neurobiology of the human febrile response.," *AANA J.*, vol. 74, no. 2, pp. 145–50, Apr. 2006.
- [34] Y. Naitoh, J. Fukata, T. Tominaga, Y. Nakai, S. Tamai, K. Mori, and H. Imura, "Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 155, no. 3, pp. 1459–63, Sep. 1988.
- [35] H. Besedovsky, A. del Rey, E. Sorkin, and C. A. Dinarello, "Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones.," *Science*, vol. 233, no. 4764, pp. 652–4, Aug. 1986.
- [36] T. Thomas and G. Schreiber, "Acute-phase response of plasma protein synthesis during experimental inflammation in neonatal rats.," *Inflammation*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, Mar. 1985.
- [37] T. Andus, V. Gross, T. A. Tran-Thi, G. Schreiber, M. Nagashima, and P. C. Heinrich, "The biosynthesis of acute-phase proteins in primary cultures of rat hepatocytes.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 133, no. 3, pp. 561–71, Jul. 1983.
- [38] D. M. Steel and A. S. Whitehead, "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein," *Immunol. Today*, vol. 15, no. 2, pp. 81–88, Feb. 1994.
- [39] F. Lampreave, N. González-Ramón, S. Martínez-Ayensa, M. A. Hernández, H. K. Lorenzo, A. García-Gil, and A. Piñeiro, "Characterization of the acute phase serum protein response in pigs.," *Electrophoresis*, vol. 15, no. 5, pp. 672–6, May 1994.
- [40] H. Xie, G. R. Huff, W. E. Huff, J. M. Balog, P. Holt, and N. C. Rath, "Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens.," *Poult. Sci.*, vol. 81, no. 1, pp. 112–20, Jan. 2002.
- [41] "Abdinasir\_JAnVetAdv-2012.pdf." .
- [42] E. Gianazza, E. Vegeto, I. Eberini, C. Sensi, and I. Miller, "Neglected markers: Altered serum proteome in murine models of disease," *Proteomics*, vol. 12, no. 4–5, pp. 691–707, 2012.
- [43] P. D. Eckersall, J. W. Gow, C. McComb, B. Bradley, J. Rodgers, M. Murray, and P. G. E. Kennedy, "Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice," *Parasitol. Int.*, vol. 50, no. 1, pp. 15–26, 2001.
- [44] R. M. Ngure, P. David Eckersall, F. W. Jennings, J. M. Burke, M. J. Stear, P. G. E. Kennedy, and M. Murray, "Major acute phase response of haptoglobin and serum amyloid-P following experimental infection of mice with *Trypanosoma brucei brucei*," *Parasitol. Int.*, vol. 46, no. 4, pp. 247–254, 1997.
- [45] E. Fattori, M. Cappelletti, P. Costa, C. Sellitto, L. Cantoni, M. Carelli, R. Faggioni, G. Fantuzzi, P. Ghezzi, and V. Poli, "Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 4, pp. 1243–1250, 1994.

- [46] T. Ishiguro, K. Imanishi, and I. Suzuki, "Hemopexin levels in mice.," *Int. J. Immunopharmacol.*, vol. 6, no. 3, pp. 241–4, Jan. 1984.
- [47] R. Wait, G. Chiesa, C. Parolini, I. Miller, S. Begum, D. Brambilla, L. Galluccio, R. Ballerio, I. Eberini, and E. Gianazza, "Reference maps of mouse serum acute-phase proteins: Changes with LPS-induced inflammation and apolipoprotein A-I and A-II transgenes," *Proteomics*, vol. 5, no. 16, pp. 4245–4253, 2005.
- [48] A. Devillers-Thiery, T. Kindt, G. Scheele, and G. Blobel, "Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, no. 12, pp. 5016–20, Dec. 1975.
- [49] T. J. Abernethy and O. T. Avery, "THE OCCURRENCE DURING ACUTE INFECTIONS OF A PROTEIN NOT NORMALLY PRESENT IN THE BLOOD : I. DISTRIBUTION OF THE REACTIVE PROTEIN IN PATIENTS' SERA AND THE EFFECT OF CALCIUM ON THE FLOCCULATION REACTION WITH C POLYSACCHARIDE OF PNEUMOCOCCUS.," *J. Exp. Med.*, vol. 73, no. 2, pp. 173–82, Jan. 1941.
- [50] F. C. de Beer, M. L. Baltz, E. A. Munn, A. Feinstein, J. Taylor, C. Bruton, J. R. Clamp, and M. B. Pepys, "Isolation and characterization of C-reactive protein and serum amyloid P component in the rat.," *Immunology*, vol. 45, no. 1, pp. 55–70, Jan. 1982.
- [51] I. Kushner, "The acute phase response: an overview.," *Methods Enzymol.*, vol. 163, pp. 373–83, Jan. 1988.
- [52] M. B. Pepys and M. L. Baltz, "Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein.," *Adv. Immunol.*, vol. 34, pp. 141–212, Jan. 1983.
- [53] C. Mold, W. Rodriguez, B. Rodic-Polic, and T. W. Du Clos, "C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc gamma R.," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 12, pp. 7019–25, Dec. 2002.
- [54] P. D. Gorevic, Y. Levo, B. Frangione, and E. C. Franklin, "Polymorphism of tissue and serum amyloid A (AA and SAA) proteins in the mouse.," *J. Immunol.*, vol. 121, no. 1, pp. 138–40, Jul. 1978.
- [55] A. Artl, G. Marsche, S. Lestavel, W. Sattler, and E. Malle, "Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 763–72, Mar. 2000.
- [56] R. Kisilevsky and L. Subrahmanyam, "Serum amyloid A changes high density lipoprotein's cellular affinity. A clue to serum amyloid A's principal function.," *Lab. Invest.*, vol. 66, no. 6, pp. 778–85, Jun. 1992.
- [57] B. H. Bowman, D. R. Barnett, J. B. Lum, and F. Yang, "Haptoglobin.," *Methods Enzymol.*, vol. 163, pp. 452–74, Jan. 1988.
- [58] J. Javid and J. C. Liang, "The hemoglobin-haptoglobin bond. I. Dissociation of the complex and recovery of the native haptoglobin in an affinity chromatography system.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 82, no. 6, pp. 991–1002, Dec. 1973.
- [59] F. Yang, D. J. Haile, F. G. Berger, D. C. Herbert, E. Van Beveren, and A. J. Ghio, "Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 284, no. 2, pp. L402–9, Feb. 2003.

- [60] W. Köhler and O. Prokop, "Relationship between haptoglobin and Streptococcus pyogenes T4 antigens.," *Nature*, vol. 271, no. 5643, p. 373, Jan. 1978.
- [61] C. R. Young, P. D. Eckersall, P. K. Saini, and L. H. Stanker, "Validation of immunoassays for bovine haptoglobin.," *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 1–13, Nov. 1995.
- [62] M. Pépin, P. Pardon, F. Lantier, J. Marly, D. Levieux, and M. Lamand, "Experimental Corynebacterium pseudotuberculosis infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation.," *Vet. Microbiol.*, vol. 26, no. 4, pp. 381–92, Feb. 1991.
- [63] X. Duan, D. Yarmush, F. Berthiaume, A. Jayaraman, and M. L. Yarmush, "Immunodepletion of albumin for two-dimensional gel detection of new mouse acute-phase protein and other plasma proteins," *Proteomics*, vol. 5, no. 15, pp. 3991–4000, 2005.
- [64] N. González-Ramón, M. A. Alava, J. A. Sarsa, M. Piñeiro, A. Escartin, A. Garcia-Gil, F. Lampreave, and A. Piñeiro, "The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120.," *FEBS Lett.*, vol. 371, no. 3, pp. 227–30, Sep. 1995.
- [65] M. Himmelfarb, E. Klopocki, S. Grube, E. Staub, I. Klamann, B. Hinzmann, G. Kristiansen, A. Rosenthal, M. Dürst, and E. Dahl, "ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer.," *Cancer Lett.*, vol. 204, no. 1, pp. 69–77, Feb. 2004.
- [66] H. F. Clark, A. L. Gurney "The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment.," *Genome Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 2265–70, Oct. 2003.
- [67] J. P. Salier, P. Rouet, G. Raguenez, and M. Daveau, "The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation.," *Biochem. J.*, vol. 315 ( Pt 1, pp. 1–9, Apr. 1996.
- [68] M. Daveau, P. Rouet, M. Scotte, L. Faye, M. Hiron, J. P. Lebreton, and J. P. Salier, "Human inter-alpha-inhibitor family in inflammation: simultaneous synthesis of positive and negative acute-phase proteins.," *Biochem. J.*, vol. 292 ( Pt 2, pp. 485–92, Jun. 1993.
- [69] R. Belaiba, P. Riant, S. Urien, F. Brée, E. Albengres, J. Barré, and J. P. Tillement, "Blood binding and tissue transfer of drugs: the influence of alpha 1 acid glycoprotein binding.," *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 300, pp. 287–305, Jan. 1989.
- [70] T. Fournier, N. Medjoubi-N, and D. Porquet, "Alpha-1-acid glycoprotein.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1482, no. 1–2, pp. 157–71, Oct. 2000.
- [71] D. F. Moore, M. R. Rosenfeld, P. M. Gribbon, C. P. Winlove, and C. M. Tsai, "Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis.," *Inflammation*, vol. 21, no. 1, pp. 69–82, Feb. 1997.
- [72] Y. Okumura, J. Kudo, T. Ikuta, S. Kurokawa, H. Ishibashi, and H. Okubo, "Influence of acute-phase proteins on the activity of natural killer cells.," *Inflammation*, vol. 9, no. 2, pp. 211–9, Jun. 1985.
- [73] S. D. Shiyan and N. V. Bovin, "Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein.," *Glycoconj. J.*, vol. 14, no. 5, pp. 631–8, Aug. 1997.
- [74] S. Rolla, G. Ingoglia, V. Bardina, L. Silengo, F. Altruda, F. Novelli, and E. Tolosano, "Acute-phase protein hemopexin is a negative regulator of Th17 response and experimental autoimmune encephalomyelitis development.," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 11, pp. 5451–9, Dec. 2013.

- [75] J. B. C. A. Sites, "Rat  $\alpha$ -Cysteine Proteinase Inhibitor," 1983.
- [76] B. JH., "Transferrins. In Metalloproteins," vol. Vol. Part , 1985.
- [77] J. H. Law, "Insects, oxygen, and iron.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 292, no. 5, pp. 1191–5, Apr. 2002.
- [78] M. Werner, "Serum protein changes during the acute phase reaction.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 25, no. 2, pp. 299–305, Aug. 1969.
- [79] V. G. Cabana, N. Feng, C. A. Reardon, J. Lukens, N. R. Webb, F. C. de Beer, and G. S. Getz, "Influence of apoA-I and apoE on the formation of serum amyloid A-containing lipoproteins in vivo and in vitro.," *J. Lipid Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 317–25, Feb. 2004.
- [80] M. Wang and M. R. Briggs, "HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance.," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 1, pp. 119–37, Jan. 2004.
- [81] P. J. Barter, S. Nicholls, K.-A. Rye, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, and A. M. Fogelman, "Antiinflammatory properties of HDL.," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 8, pp. 764–72, Oct. 2004.
- [82] R. P. Koldamova, I. M. Lefterov, M. I. Lefterova, and J. S. Lazo, "Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity.," *Biochemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 3553–60, Mar. 2001.
- [83] A. R. Aldred, B. Southwell, and G. Schreiber, "Extrahepatic synthesis of acute phase proteins and their functions.," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 30, no. 4, pp. 223–32, Jan. 1992.
- [84] C. Lecchi, G. Avallone, M. Giurovich, P. Roccabianca, and F. Ceciliani, "Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues.," *Vet. J.*, vol. 180, no. 2, pp. 256–8, May 2009.
- [85] M. R. S. Agar, "Interpretación de resultados Conservación y caducidad Control de calidad Precauciones Materiales requeridos pero no proporcionados Limitaciones de uso Procedimiento Referencias," p. 613.
- [86] O. OUCHTERLONY, "In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria.," *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 186–91, Jan. 1948.
- [87] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–54, May 1976.
- [88] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [89] I. H. Nymo, J. Godfroid, K. Åsbakk, a K. Larsen, C. G. das Neves, R. Rødven, and M. Tryland, "A protein A/G indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-Brucella antibodies in Arctic wildlife.," *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 25, no. 3, pp. 369–375, 2013.