



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL ARN LARGO NO
CODIFICANTE MALAT-1 EN MACRÓFAGOS MURINOS
INFECTADOS POR *Brucella abortus***

POR SEBASTIÁN GABRIEL RUIZ SANHUEZA

Tesis presentada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/patrocinante:
Dr. Ángel Alejandro Oñate Contreras
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Junio, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



AGRADECIMIENTOS

Un sentido agradecimiento a todos los Profesores y Profesoras que aportaron a mi formación como Bioquímico. Al Profesor Ángel Oñate, por abrirme las puertas a un área que me apasiona, por apoyar mi proyecto y aportar siempre con su experiencia y conocimiento. A mis amigos, compañeros y todas las personas que me acompañaron durante este proceso, por todos los momentos que pasamos juntos y que siempre atesoraré.

Finalmente, agradezco a mi familia, a mis padres, mis hermanas, tías y padrinos, por ser mi mayor apoyo y motivación, y por confiar en mí siempre. Muchas Gracias.



TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN:	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Brucelosis: generalidades.....	1
1.2. Especies del género <i>Brucella</i>	1
1.3. Transmisión de la enfermedad y manifestaciones clínicas	2
1.4. Epidemiología.....	3
1.5. Patogénesis de la enfermedad	5
1.6. Evasión del sistema inmune	6
1.7. Ciclo de vida intracelular.....	8
1.8. Activación de los macrófagos	10
1.9. ARNs largos no codificantes como reguladores transcripcionales en el desarrollo de la inmunidad.....	12
1.10. ARN largo no codificante Malat-1 y su rol en la polarización de los macrófagos.....	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo general:	18
3.2. Objetivos específicos:.....	18
4. METODOLOGÍA.....	19
4.1. Objetivo 1: Determinar cambios en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 en macrófagos murinos infectados por <i>Brucella abortus</i> 2308.....	19
4.1.1 Cultivo celular y bacteriano.....	19
4.1.2. Ensayo de infección.....	19
4.1.3. Extracción de ARN	20
4.1.4. Evaluación de la expresión relativa.....	20
4.2. Objetivo 2: Caracterizar el fenotipo inducido por la infección de <i>Brucella abortus</i> 2308 en un modelo murino de macrófagos.....	22
4.2.1. Detección de Citoquinas	22

4.2.2. Caracterización fenotípica	23
4.3. Objetivo 3: Evaluar la función del ARN largo no codificante Malat-1, a través del silenciamiento de su expresión relativa, en el proceso de polarización de macrófagos murinos y en la supervivencia intracelular de <i>Brucella abortus</i> 2308.....	23
4.3.1. Silenciamiento de Malat-1 a través de ARN de interferencia	23
4.3.2. Ensayo de supervivencia intracelular.....	25
5. PLAN DE TRABAJO.....	26
6. TRABAJO EN PROGRESO	27
7. RECURSOS DISPONIBLES:	33
8. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:	35
8.1. Personal técnico y/o de apoyo.....	35
8.2. Gastos de operación.....	35
8.3. Equipamiento	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Cuantificación de la expresión relativa de Malat-1 pag. 27

Figura 2. Concentración de citoquinas cuantificado a través de ELISA sándwich

pag. 30



ÍNDICE DE TABLAS

4-1. Secuencia de Partidores.	pag. 21
5-1. Carta Gantt	pag. 26
6-1. Rangos de Optimización	pag. 31
6-2. Concentración de ARN extraído	pag. 32
8-1. Personal	pag. 35
8-2. Gastos de operación general	pag. 35
8-3. Gastos en equipamiento	pag. 37
8-4. Gastos en infraestructura y mobiliario	pag. 37



RESUMEN:

Las bacterias del género *Brucella* son el agente etiológico de la Brucelosis, una de las zoonosis más extendidas a nivel mundial. Focalizándose principalmente en países de bajos ingresos, esta enfermedad produce un elevado costo socioeconómico en el área ganadera y representa un grave problema sanitario por su transmisión al ser humano. *Brucella spp.* es un patógeno sigiloso que invade la mucosa epitelial de las vías aéreas y digestivas provocando una débil respuesta pro-inflamatoria, estableciendo su nicho replicativo en los macrófagos del huésped, inhibiendo su apoptosis y alterando su capacidad bactericida e interacción con los demás componentes de la respuesta inmune. Estas capacidades efectoras están determinadas por un proceso de activación fuertemente regulado a nivel transcripcional, conocido como polarización de macrófagos.

En la última década, los ARNs largos no codificantes han surgido como potenciales blancos terapéuticos en el estudio de diversas patologías, debido a su rol como reguladores transcripcionales en un número creciente de procesos biológicos. Investigaciones recientes identificaron al ARN largo no codificante Malat-1 como un regulador transcripcional fundamental en el proceso de polarización de macrófagos, relacionándose estrechamente con la capacidad efectora de estas células. El presente proyecto tiene como objetivo determinar la función de Malat-1 en el proceso de activación de macrófagos murinos infectados

por *Brucella abortus*, para lo cual se caracterizará fenotípicamente a dos líneas celulares de macrófagos murinos a través de la producción de citoquinas y la expresión de marcadores de membrana en relación a la expresión relativa de Malat-1. Además, se realizará un análisis funcional de Malat-1 silenciando su actividad en macrófagos murinos previo a la infección, con el objetivo de determinar cambios en el fenotipo y capacidad bactericida de estas células.

A través de estas determinaciones, se espera comprobar que Malat-1 aumenta su expresión en macrófagos infectados por *Brucella abortus* de manera crucial para su correcta activación y capacidad bactericida, aportando una nueva capa de complejidad al estudio de la polarización de macrófagos y representando un enfoque novedoso en el estudio de la Brucelosis, con la posibilidad de extrapolar estos resultados al estudio de otras enfermedades infecciosas.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Brucelosis: generalidades

Brucella es un género de bacterias gram-negativas compuesto por cocobacilos intracelulares facultativos, pertenecientes al filo de α -proteobacteria (Moreno *et al.*, 1990). Son el agente causante de brucelosis, una infección bacteriana crónica que afecta principalmente al ganado bovino, equino, porcino, ovino y caprino; así como a diversas especies de mamíferos, incluyendo al ser humano (Castro *et al.*, 2005). Esta enfermedad corresponde a una de las zoonosis más distribuidas a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012), generando un impacto negativo a nivel de salud pública, así como también cuantiosas pérdidas económicas en el área ganadera (Pal, 2017).

1.2. Especies del género *Brucella*

Actualmente se han identificado diversas especies dentro del género *Brucella*, caracterizándolas en función de la especificidad del huésped que infectan y sus propiedades antigénicas. Bajo estos parámetros, podemos identificar el grupo de especies de *Brucella* consideradas clásicas: *B. abortus* (ganado bovino), *B. melitensis* (hembra ovina y caprinos), *B. suis* (porcinos), *B. canis* (cánidos), *B. ovis* (macho ovino) y *B. neotomae* (roedores de campo) (Castro *et al.*, 2005). Además de las especies de *Brucella* aisladas desde mamíferos marinos: *B. ceti* (cetáceos) y *B. pinnipedialis* (pinnípedos) (Foster *et al.*, 2007), y las recientemente identificadas: *B. microti* (roedores), *B. inopinata* (aislada desde un

implante mamario), *B. vulpis* (zorro rojo) y *B. papionis* (babuinos) (Scholz *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009; Whatmore *et al.*, 2014; Scholz *et al.*, 2016). Sumado a esto, nuevos estudios han descrito cepas de *Brucella* spp. aisladas en anfibios, lo que ampliaría el rango de infección natural de este género (Whatmore *et al.*, 2015, Soler-Lloréns *et al.*, 2016). Desde un punto de vista clínico, las especies más relevantes para el ser humano son *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. canis* (Pappas, 2010).

1.3. Transmisión de la enfermedad y manifestaciones clínicas

Los brotes de Brucelosis bovina, provocados por *B. abortus*, están asociados con la muerte fetal, aborto e infertilidad en el ganado, además del nacimiento de terneros débiles (Gökçen y Eskiizimirliler, 1998; Al-ani *et al.*, 2004). Considerada como una enfermedad ocupacional, las principales vías de transmisión al ser humano corresponden al contacto directo con animales infectados o sus secreciones, a través de erosiones o cortes en la piel, por medio de la inhalación o inoculación de aerosoles infectados y por el consumo de productos no pasteurizados (Trujillo *et al.*, 1994). Las manifestaciones clínicas en humanos son similares a los de la gripe, presentando síntomas inespecíficos como malestar general, fatiga y fiebre; mientras que en su fase crónica puede afectar a cualquier órgano o tejido del cuerpo, siendo las más comunes las complicaciones osteoarticulares, neurológicas y urogenitales (Alsubaje *et al.*, 2005). El régimen de tratamiento corresponde al uso de dos o más antibióticos (Pappas *et al.*, 2005), siendo la recomendación más común la utilización de

doxiciclina y rifampicina combinadas durante 6 semanas, puesto que la monoterapia presenta una mayor tasa de reincidencia de la enfermedad (Agalar *et al.*, 2005). Sin embargo, aún con el tratamiento correcto, las tasas de recaída se encuentran entre el 5 y 30% de los pacientes (Solera, 2010), y actualmente no existen vacunas aprobadas para combatir la infección en humanos (Xie *et al.*, 2018)

1.4. Epidemiología

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la brucelosis humana se focaliza principalmente en países de bajos ingresos, razón por la cual se ha clasificado como una de las principales enfermedades transmitidas por animales en categoría de “desatendidas” (Franc *et al.*, 2018). La prevalencia varía según el país, alcanzando niveles elevados en las zonas en que se considera una enfermedad endémica; principalmente Oriente Medio, la región Mediterránea y algunas regiones de África, Asia y Latinoamérica (Pappas *et al.*, 2006). De difícil detección, la falta de datos respecto a la incidencia real de la enfermedad dificulta el control y seguimiento de la misma (Fournier *et al.*, 2015). Debido a esto, la principal estrategia de prevención corresponde a la eliminación de la enfermedad en los animales que actúan como vector hacia el ser humano, cortando así la cadena de transmisión. La erradicación de la brucelosis en el ganado se ha dado con éxito en algunos países desarrollados, a través de la implementación de políticas públicas enfocadas a la vacunación y el sacrificio de animales infectados (Godfroid y Kasbohrer, 2002). Por el contrario, en países

donde la brucelosis es endémica, la enfermedad en humanos continúa siendo un problema de salud pública. En China, por ejemplo, se notificaron 530.048 casos de brucelosis humana entre los años 2004 y 2018, alcanzando un punto máximo de prevalencia de 4,22 casos cada 100.000 habitantes en 2014 (Peng *et al.*, 2020). Mientras que la Unión Europea, una zona donde la brucelosis animal se considera mayormente controlada, reportó una prevalencia de 0,09 casos cada 100.000 habitantes durante 2017, tasa que se ha mantenido estable desde 2013 (ECDC, 2019).

En Chile, los primeros esfuerzos sistemáticos para lograr el control de la enfermedad se remontan a 1975, con la elaboración del “Proyecto de Salud animal” a través del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), y en la década de los 90, con el programa de erradicación de la brucelosis bovina; que contemplaba acciones de vigilancia, saneamiento de predios infectados, inmunización de terneras, entre otros. Estas políticas públicas han logrado disminuir la prevalencia de brucelosis en el ganado, incluso declarando la erradicación de la enfermedad en la Región de Magallanes y la Región de Aysén (Martinez, 2013). Sin embargo, aún existen brotes en las zonas del país donde se considera una enfermedad endémica, particularmente en el área comprendida entre la Región Metropolitana y la Región de Los Lagos, reportándose 23 nuevas cuarentenas en predios durante el año 2019 según datos del SAG. La prevalencia de la enfermedad en humanos es baja en el territorio nacional, reportándose una

incidencia promedio de 0,55 casos por 100mil habitantes durante el periodo comprendido entre los años 2001 y 2011 (Martínez, 2013).

A pesar de los esfuerzos para lograr la erradicación de la brucelosis en la mayoría de los países desarrollados, la epidemiología de la enfermedad cambia constantemente, variando su distribución geográfica a medida que emergen, o reemergen, nuevos focos de la misma (Zhou *et al.*, 2020; Bagheri Nejad *et al.*, 2020). Parte de los factores que explican estos brotes guardan relación con procesos migratorios y la expansión de la ganadería (Enkelmann *et al.*, 2020; Ducrotoy *et al.*, 2015), pero también con el descubrimiento de nuevos reservorios de *Brucella* en la fauna salvaje, los que podrían disminuir la efectividad de los programas de erradicación (Kamath *et al.*, 2016). De igual manera, nuevas cepas aisladas desde animales marinos y anfibios presentan una mayor adaptación a las condiciones ambientales, además de tener la capacidad de invadir especies mamíferas terrestres. Por esta razón, actualmente se estudia su potencial patológico ante la posibilidad de que estas cepas amplíen su rango de infección a otras especies o transfieran sus características a otras bacterias del género *Brucella* a través de elementos móviles (Jiménez de Bagüés *et al.*, 2010; Al Dahouk *et al.*, 2017, El-Sayed *et al.*, 2018).

1.5. Patogénesis de la enfermedad

El proceso infeccioso de *Brucella* spp inicia con la invasión de los tejidos del huésped a través de la mucosa epitelial, principalmente en las vías respiratorias

y el tracto intestinal (López-Santiago *et al.*, 2019). Dichas áreas anatómicas cuentan con barreras físicas y químicas que impiden la colonización de las bacterias, sin embargo, *Brucella* presenta diversos factores de virulencia que permiten su adaptación a estos microambientes. En este contexto, son clave la actividad de proteínas con actividad ureasa e hidrolasa, que otorgan resistencia al pH ácido característico del estómago y a la actividad bactericida de las sales biliares (Sangari *et al.*, 2010; Delpino *et al.*, 2007). En las vías respiratorias, los principales mecanismos de defensa corresponden a distintos péptidos con actividad antimicrobiana secretados por las células epiteliales, sin embargo, *Brucella* expresa la proteína inhibitoria PliC, que le otorga resistencia a la b-defensina 2 y también distintas lisozimas humanas (Um *et al.*, 2013).

Brucella también expresa diversas adhesinas que permiten la unión a las células epiteliales (Czibener *et al.*, 2013), en un proceso que induce una reorganización de su cito-esqueleto que favorece la entrada de la bacteria (Rosseti *et al.*, 2012). Ocurrido este proceso, *Brucella* tiene la capacidad de formar un nicho replicativo y sobrevivir en las células epiteliales y modular su función (Rosseti *et al.*, 2012).

1.6. Evasión del sistema inmune

Brucella spp. es un patógeno que utiliza una estrategia “sigilosa” de infección, razón por la cual no presenta factores de virulencia clásicos, tales como exotoxinas, cápsula, flagelos funcionales, fimbrias, plásmidos de virulencia, inductores de apoptosis o LPS endotóxicos (Byndloss y Tsolis *et al.*, 2016). En

cambio, la persistencia de la bacteria depende de su capacidad para evitar la detección por parte del sistema inmune, protegerse frente a la capacidad bactericida del huésped y modular su respuesta (Ke *et al.*, 2015).

Una vez ocurre la invasión de los tejidos, *Brucella* se trasloca rápidamente a través del epitelio produciendo un bajo nivel de toxicidad y una respuesta inmune de baja actividad pro-inflamatoria (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Martirosyan *et al.*, 2011). Presenta una especial resistencia a la acción bactericida de los neutrófilos, uno de los primeros componentes de la respuesta inmune innata, e incluso induce su muerte de manera prematura (Barquero-Calvo *et al.*, 2015). Además, tiene la capacidad de subvertir el proceso de reconocimiento y señalización de macrófagos y células dendríticas a través de un LPS “no clásico”, que presenta características especiales que se consideran un factor de virulencia (Lapaque *et al.*, 2005). En *Brucella*, este componente bacteriano involucrado de manera fundamental en la respuesta inmune frente a bacterias gram negativas, presenta modificaciones estructurales que disminuyen la afinidad por su receptor, lo que a su vez reduce sus cualidades endotóxicas (Conde-Alvarez *et al.*, 2012). Las propiedades químicas distintivas del LPS de *Brucella* también se han asociado con su resistencia a otros efectores de la respuesta inmune innata, incluyendo péptidos antimicrobianos y la activación del complemento (Hoffmann *et al.*, 1983; Conde-Alvarez *et al.*, 2012).

1.7. Ciclo de vida intracelular

El factor clave en el éxito de *Brucella* spp corresponde a su habilidad para sobrevivir y replicar dentro de células fagocíticas, principalmente macrófagos, los que constituyen su principal nicho replicativo (Jones y Winter, 2012). Esto se debe a distintas adaptaciones que le permiten resistir las condiciones adversas del medio intracelular de estas células, lo que incluye proteasas, pH ácido, especies reactivas de oxígeno y bajos niveles de nutrientes (Pratt *et al.*, 2015; Glowacka *et al.*, 2018). La internalización de la bacteria se lleva a cabo por fagocitosis, mediada por dos mecanismos diferentes: El primero responde a la bacteria opsonizada, la cual será internalizada a través de los receptores del complemento, mientras que *Brucella* no opsonizada lo hará a través de la interacción con receptores de fibronectina y lecnita (Campbell *et al.*, 1994). Este proceso es fundamental, puesto que la opsonización de las bacterias mejora la capacidad bactericida de los macrófagos (Eze *et al.*, 2000). Por su parte, la internalización de *Brucella* no opsonizada se lleva a cabo a través de balsas lipídicas, las que además contribuyen al tráfico intracelular de la bacteria (Xavier *et al.*, 2010).

Durante la internalización, las bacterias se mantienen dentro de compartimientos llamado vacuolas contenedoras de *Brucella* (BCV), las que atraviesan un proceso de maduración a través de la interacción controlada con endosomas tempranos y tardíos, además de lisosomas, propios de la vía endosomal (Starr *et al.*, 2008). Esta interacción deriva en la adquisición de diversos marcadores

endocíticos, primero tempranos y progresivamente tardíos (Bellaire *et al.*, 2005; Celli *et al.*, 2003), y en la acidificación de la BCV (Starr *et al.*, 2008). Esta disminución del pH juega un rol fundamental para el ciclo de vida intracelular de *Brucella*, puesto que desencadena la expresión de genes bacterianos asociados a su supervivencia, además de uno de los principales determinantes de la patogenicidad de esta bacteria, el sistema de secreción VirB Tipo IV (T4SS) (Boschiroli *et al.*, 2002). Este complejo macromolecular actúa traslocando proteínas efectoras desde la envoltura bacteriana hacia el citosol de las células huésped con diversas funciones, resultando fundamental para la supervivencia intracelular de *Brucella* y el establecimiento de una infección crónica (Boschiroli *et al.*, 2002). T4SS induce la pérdida de marcadores endosomales y permite el establecimiento del nicho replicativo de la bacteria a través de la interacción del BCV con estructuras del retículo endoplásmico, dando inicio a la replicación bacteriana (Celli *et al.*, 2003). La última etapa consiste en la remodelación del BCV a través de la interacción con estructuras de membrana en forma de “medialuna”, dando origen a las BCV autofágicas, que se forman a través de la activación de un conjunto de maquinarias moleculares asociadas a la autofagia y que se relacionan estrechamente con el proceso de salida de la bacteria desde la célula, dando lugar a nuevos procesos infecciosos (Starr *et al.*, 2012).

A diferencia de otros patógenos intracelulares, la salida de la bacteria no resulta en la lisis de las células infectadas, por el contrario, *Brucella* tiene la capacidad de inhibir la apoptosis en monocitos y macrófagos, manteniendo así su nicho

replicativo (Cui *et al.*, 2014). De igual manera, se ha determinado que *Brucella* tiene la capacidad de modular la respuesta de estas células, afectando la producción de citoquinas claves para el desarrollo de la respuesta inmune y la eliminación de patógenos (Czyż *et al.*, 2017) además de inducir cambios metabólicos que están relacionados a la activación de los macrófagos (Czyż *et al.*, 2017), inhibiendo la correcta activación de monocitos y macrófagos en infecciones crónicas a través de mecanismos que aún no se han clarificado completamente (Wang *et al.*, 2017).

1.8. Activación de los macrófagos

La activación de los macrófagos depende de los distintos estímulos a los que estén expuestos en un determinado microambiente, adquiriendo capacidades funcionales especiales y adoptando un fenotipo característico a través de una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas, en un proceso que recibe el nombre de polarización (Mantonavi *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2014). A raíz de esto, es posible identificar dos grandes sub-grupos de macrófagos según su fenotipo:

La vía clásica, activada por citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de origen bacteriano, induce en los macrófagos un fenotipo M1 (Adams y Hamilton, 1984), caracterizados por la producción de óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintasa, especies reactivas de oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α (Klimp *et al.*, 2002), que aumentan la capacidad

citotóxica de los macrófagos y su efecto antiproliferativo, así como también un aumento en moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II y distintos marcadores de membrana que están involucrados en la presentación efectiva de antígenos (Mantonavi *et al.*, 2004)

Por otro lado, la activación por la vía alternativa de los macrófagos, inducida por citoquinas del tipo anti-inflamatorio como IL-4 e IL-13, complejos inmunes, células fúngicas, parásitos y moléculas antiinflamatorias como TGF- β , IL-10 y glucocorticoides (Murray *et al.*, 2014; Mantonavi *et al.*, 2004), provoca la polarización a macrófagos con un perfil M2, enfocado a la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos (Gordon *et al.*, 2010). Esta función se desarrolla a través de un fenotipo caracterizado por su producción de citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 y TGF- β , componentes de la matriz extracelular y factores angiogénicos y quimiotácticos, además de la disminución de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Mantonavi *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2010; Bohlsón *et al.*, 2014). Estos macrófagos también aumentan su capacidad endocítica y fagocítica, la expresión del receptor de manosa (CD206) y no son capaces de producir óxido nítrico, cambios que los vuelven incapaces de controlar el desarrollo de patógenos intracelulares (Gordon *et al.*, 2010).

La diversidad y plasticidad en términos de fenotipo y función son características fundamentales en los macrófagos (Biswas y Mantonavi, 2010). Estas células tienen la capacidad de re-polarizarse, cambiando su fenotipo funcional cuando los estímulos de su microambiente varían (Bosco, 2019). En relación a estas

capacidades inherentes de los macrófagos, se ha determinado que, frente a diversos estímulos, estas células activan diversos programas transcripcionales, lo que indica que el espectro de activación es más amplio (Xue *et al.*, 2014), donde los macrófagos no adoptan exclusivamente un solo perfil, si no que se presentan en estados intermedios entre los fenotipos M1 y M2 propios para cada estímulo diferente (Mosser y Edwards, 2008). Caracterizar los mecanismos moleculares que regulan el proceso de polarización de los macrófagos y sus distintos fenotipos ha sido uno de los principales objetivos en el estudio de la biología y función de estas células, puesto que su alteración se asocia al desarrollo de diversas patologías (Tugal *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

1.9. ARNs largos no codificantes como reguladores transcripcionales en el desarrollo de la inmunidad

Los ARN no codificantes (ncARN) se definen como moléculas de ARN funcionales que no son traducidos en proteínas, pero actúan regulando la expresión génica en diversos procesos biológicos fundamentales (Batista y Chang, 2013). Representan una parte importante de la transcripción, puesto que se estima que tan solo el 2% de los transcritos de ARN producidos en este proceso es traducido en proteínas (Palazzo y Gregory, 2014). Los ncARN pueden clasificarse bajo diversos criterios, tales como su ubicación, función y tamaño. Un subtipo de estas moléculas, llamados ARNs largos no codificantes (LncARNs), han cobrado relevancia durante la última década, debido a que cumplen un rol crítico en la regulación de procesos tales como la proliferación

celular, apoptosis y diferenciación celular (Hu *et al.*, 2013), además de modular la respuesta celular tanto fisiológica como patológica (Maass *et al.*, 2014).

Se clasifica como LncARN a aquellos ncARN superiores a 200 pares de bases (Pelechano y Steinmetz, 2014), y estos se pueden subdividir según su biogénesis, estructura o mecanismo de acción (Dahariya *et al.*, 2019). La mayoría de los LncARN son producidos por la enzima ARN polimerasa II, por lo que comparten características estructurales con los ARN mensajeros, tales como la poliadenilación y el casquete (Quinn y Chang, 2016). En los últimos años, se ha descrito que los LncARN también están involucrados en la regulación de la respuesta inmune y el desarrollo de la inflamación (Atianand y Fitzgerald, 2014; Elling *et al.*, 2016), observándose que su desregulación contribuye al desarrollo de enfermedades inflamatorias y a una respuesta inmune aberrante (Carpenter, 2016).

Al analizar los mecanismos de acción de LncARNs relacionados a la inmunidad, se descubrió que están localizados cerca de genes que codifican para proteínas que varían su expresión relativa durante el desarrollo de la respuesta inmune (Ilott *et al.*, 2014), regulando su expresión génica (Krawczyk y Emerson, 2014; Li *et al.*, 2013). Similar a las proteínas, se especula que los LncARN presentan dominios de unión a proteínas y/o secuencias de ARN o ADN, siendo este el mecanismo de acción de la mayoría de los LncARN relacionados a la inmunidad (Yang *et al.*, 2014; Heward y Lindsay, 2014). Se ha demostrado que estos actúan impidiendo la unión entre proteínas y ADN o entre proteínas, así como también

interactuando con miembros de la familia de las ribonucleoproteínas nucleares (Carpenter *et al.*, 2013), y complejos modificadores de la cromatina (Rosseto *et al.*, 2013), para reprimir o activar la expresión de estos genes. Evidencia emergente indica que los LncARNs actúan como reguladores transcripcionales importantes en la respuesta de monocitos y macrófagos (Heward y Lindsay, 2014). Además, se ha logrado identificar diversos LncARN involucrados directamente en la regulación del proceso de polarización de macrófagos (Hu *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016).

1.10. ARN largo no codificante Malat-1 y su rol en la polarización de los macrófagos

Dentro del grupo de LncARN implicados en la activación de macrófagos, se encontró que Malat-1, un LncARN altamente conservado entre especies de mamíferos en términos de secuencia y estructura (Johnsson *et al.*, 2014), participa activamente en la regulación del proceso de activación de macrófagos (Masoumi *et al.*, 2018). En un estudio reciente (Cui *et al.*, 2019), se describió que Malat-1 presenta una expresión diferencial en los distintos estados de activación de macrófagos; aumentando al tratar las células con LPS, promoviendo una activación del tipo proinflamatoria, y disminuyendo en macrófagos de tipo anti-inflamatorios inducido con IL-4. En un modelo de macrófagos “knockdown”, a través de la metodología de ARN de interferencia para Malat-1, estas células disminuyeron su producción de citoquinas pro-inflamatorias al ser tratadas con LPS y presentaron una disminución en su capacidad bactericida frente a

Escherichia coli. Además, estos macrófagos presentaban una mayor expresión de marcadores del tipo M2 al ser tratados con IL-4 en relación a macrófagos sin tratamiento, indicando que el silenciamiento de Malat-1 promueve este fenotipo (Cui *et al.*, 2019). A través de la secuenciación del ARN de macrófagos knockdown para Malat-1, se determinó que uno de sus principales blancos transcripcionales en el proceso de polarización de macrófagos es la proteína Clec16a, la cual aumenta su expresión en células tratadas con LPS de forma similar a Malat-1, además de atenuar la producción de citoquinas proinflamatorias al disminuir su expresión, lo que entrega importantes antecedentes del posible mecanismo de acción de Malat-1 (Cui *et al.*, 2019). Finalmente, en el mismo estudio se generaron ratones knockout para Malat-1 en células mieloides, los cuales demostraron una disminución en la inflamación sistémica inducida por LPS y macrófagos alveolares con un fenotipo M2 aumentado en el contexto de una fibrosis pulmonar, lo que, en conjunto a los experimentos anteriores, indica que Malat-1 cumple un papel importante en la regulación del proceso de activación de estas células (Johnsson *et al.*, 2014).

En síntesis, explorar el rol de los ARNs largos no codificantes durante el proceso de polarización de macrófagos infectados por *Brucella abortus* representa un enfoque novedoso para el estudio de esta enfermedad, aportando nuevos puntos de interés en el desarrollo de la inmunidad innata mediada por macrófagos, con la posibilidad de extrapolar estos resultados al desarrollo de otras patologías infecciosas, así como también el resto de funciones que cumplen los macrófagos

para mantener la homeostasis del organismo. Esto debido a que existe poca información sobre la función de los LncARN en el desarrollo de la respuesta inmune y los mecanismos involucrados en la eliminación de patógenos (Hadjicharalambous y Lindsay, 2019).

A partir de lo anteriormente expuesto, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se relaciona el proceso de polarización de macrófagos infectados con *Brucella abortus* con la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 y la posterior sobrevivencia intracelular de la bacteria?



2. HIPÓTESIS

“La infección por *Brucella abortus* inducirá un fenotipo pro-inflamatorio en macrófagos murinos, asociado a un aumento en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1, crucial para la eliminación de la bacteria”



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

“Relacionar el proceso de polarización de macrófagos murinos infectados por *Brucella abortus* 2308 con la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 y evaluar cómo afecta la sobrevivencia intracelular de la bacteria”

3.2. Objetivos específicos:

1. Determinar cambios en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 en macrófagos murinos infectados por *Brucella abortus* 2308.
2. Caracterizar el fenotipo inducido por la infección de *Brucella abortus* 2308 en un modelo murino de macrófagos.
3. Evaluar la función del ARN largo no codificante Malat-1, a través del silenciamiento de su expresión relativa, en el proceso de polarización de macrófagos murinos y en la supervivencia intracelular de *Brucella abortus* 2308.

4. METODOLOGÍA

4.1. Objetivo 1: Determinar cambios en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 en macrófagos murinos infectados por *Brucella abortus* 2308.

4.1.1 Cultivo celular y bacteriano

Las líneas celulares de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) y J774A.1 (ATCC® TIB-67™) se cultivarán en placas de 6 pocillos en medio de eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (ambos provistos por Gibco) a 37°C con aire humedecido y 5% CO₂ hasta 80% de confluencia. Las células serán co-cultivadas con LPS (invitrogen) e IL-4 (Inmuno-Biomédica) para inducir los grupos de control correspondientes a un fenotipo pro-inflamatorio y reparador respectivamente (Huang *et al.*, 2018). La cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 se obtendrá de nuestro cepario. Todo el trabajo con bacterias vivas se realizará en instalaciones de bioseguridad nivel 2. Los cultivos se realizarán en agar *Brucella* a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas. El traspaso se realizará utilizando caldo *Brucella* (ambos medios provistos por AndesImport) cultivado en las mismas condiciones.

4.1.2. Ensayo de infección

Se realizará un recuento de macrófagos vivos por el método de azul de tripano (Strober, 2001) hasta obtener aproximadamente 10⁶ células. Estas serán

infectadas usando una multiplicidad de infección (MOI) de 1:100 (Smith *et al.*, 2013) y se cultivarán a 37°C con aire humedecido y 5% de CO₂ durante 4, 8, 12, 24 y 48 horas.

4.1.3. Extracción de ARN

El ARN total se extraerá utilizando el método de Trizol (Chomczynski, 1993). Para esto, las células serán centrifugadas a 800rpm durante 10 minutos eliminando el sobrenadante para luego resuspender en PBS 1x. Posterior a esto, se centrifugarán a 7500rpm por 25 segundos, se eliminará el sobrenadante nuevamente y se agregarán 250µL de PBS 1x, 750µL de Trizol (Invitrogen) y 200µL de cloroformo para centrifugar a 12000rpm por 10 minutos. Del producto se colectará la fase acuosa para agregarle 500µL de isopropanol y se centrifugará nuevamente a 12000rpm por 15 minutos. Se eliminará el sobrenadante y se agregará etanol al 75%. Finalmente se centrifugará a 7500rpm por 5 minutos, se eliminará el sobrenadante y se resuspenderá el producto en 10µL de agua libre de ARNasa (Invitrogen). La concentración y pureza del ARN extraído será analizado en placas de nanogotas, midiendo 2µL de muestra en un equipo Tecan Infinite M200 (Aranda *et al.*, 2009).

4.1.4. Evaluación de la expresión relativa

La expresión relativa de Malat-1, IL-6, IL-1β, IL-10, TNF-α y TGF-β será cuantificada a través del método de RT-qPCR (Bustin y Nolan, 2004) en un equipo Agilent Technologies AriaMx Real Time PCR system. La secuencia de

los partidores se muestra en la tabla 1-1, mientras que la expresión de mRNA será normalizada con la expresión de GAPDH de ratón.

Tabla 4-1. Secuencia de Partidores.

Nombre del partidor	Secuencia del partidor
Malat-1	5'-CATGGCGGAATTGCTGGTA-3' 5'-CTGCCAACAGCATAGCAGTA-3'
IL-1b	5'-GTA CTCCAGAAGACCAGAGG-3' 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'
IL-6	5'-CTGGAGCCCACCAAGAACGA-3' 5'-GCCTCCGACTTGTGAAGTGGT-3'
IL-10	5'-CCAGTACAGCCGGGAAGACA-3' 5'-GAAGGCAGTCCGCAGCTCTA-3'
TNF- α	5'-CCAGGCAGGTTCTGTCCCTT3' 5'-ATAGGCACCGCCTGGAGTTC-3'
TGF- β	5'-GCCACTGCCCATCGTCTACT.3' 5'-CACTTGCAGGAGCGCACAAT-3'

Para generar el ADN copia a partir del ARN mensajero se usará el kit “máxima first strand cDNA Synthesis for RT-qPCR, with dsDNase” (Thermo Cientific). Primero se mezclarán y centrifugarán los componentes, para luego incubarlos por 2 minutos a 37°C en un termociclador, se agregará el mix de reacción 5x, el mix máxima de enzima y el agua libre de nucleasa, se mezclarán y centrifugarán. Finalmente, se incubarán por 10 minutos a 25°C seguido por 15 minutos a 50°C. Para el protocolo de qPCR se utilizará el reactivo “Takyon Rox SYBR MasterMix dTTP Blue” (Eurogentec), se preparará el mix de reacción según lo indica el

fabricante. Luego se agregarán 2,5µL del ADN de copia generado anteriormente en la placa de PCR y se agregarán 17,5 µL del mix de reacción. Finalmente, los ciclos se realizarán según indica el fabricante.

4.2. Objetivo 2: Caracterizar el fenotipo inducido por la infección de *Brucella abortus* 2308 en un modelo murino de macrófagos.

4.2.1. Detección de Citoquinas

Los niveles de IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-10 y TGF- β serán cuantificados a partir del sobrenadante de los cultivos de macrófagos infectados con *Brucella abortus* a través del método de Elisa Sandwich (Huang *et al.*, 2018). Los kits de reactivos son provistos por Inmuno-Biomedica Ltda. Para esto se sensibilizará la placa con 100µL/pocillo de anticuerpo de captura y se incubará durante la noche a 4°C. Luego, se aspirarán los pocillos y lavarán 3 veces con 250µL/pocillo de tampón de lavado y se secarán. Posteriormente, se bloquearán los pocillos con 200µL de diluyente ELISA/ELISPOT (1x) a temperatura ambiente por 1 hora. Luego se generará una curva de calibrado para cada citoquina y se agregarán en las placas en sus pocillos correspondientes, de igual manera que con las muestras. Finalizado el proceso, la placa se sellará e incubará durante 2 horas, se lavará y se agregará 100µL/pocillos de anticuerpo de detección, se sellará y se incubará durante 1 hora. Finalmente, se repetirá el proceso de lavado y se agregará estreptavidina-HRP diluida (Invitrogen), y posterior a sellar, incubar y lavar, se

agregará solución TMB 1 (Invitrogen) y se incubará por 15 minutos. Finalmente, la cuantificación se realizará a 450nm en un equipo Biotek ELx50.

4.2.2. Caracterización fenotípica

Para caracterizar el fenotipo adoptado por los macrófagos se analizarán los distintos grupos por citometría de flujo. Con este objetivo se utilizará el marcador CD11b, característico de macrófagos, así como CD86 y CD206, característicos de los fenotipos M1 y M2 respectivamente (Huang *et al.*, 2018). La estrategia a utilizar será determinar primero la población de células viables a través de un marcador, para luego determinar los eventos positivos para CD11b y finalmente un análisis fenotípico de CD86 vs CD206.

4.3. Objetivo 3: Evaluar la función del ARN largo no codificante Malat-1, a través del silenciamiento de su expresión relativa, en el proceso de polarización de macrófagos murinos y en la supervivencia intracelular de *Brucella abortus* 2308.

4.3.1. Silenciamiento de Malat-1 a través de ARN de interferencia

Para evaluar funcionalmente el rol de Malat-1 durante el proceso de polarización inducida por *Brucella abortus* se silenciará su expresión, utilizando la metodología de ARN de interferencia (SiARN), para luego caracterizar el fenotipo adoptado por este modelo silenciado. Este objetivo se llevará a cabo con el kit comercial “Silencer™ siRNA Starter Kit” (Invitrogen), que incluye el reactivo de transfección siPORT NeoFX, los ARN de interferencia a utilizar en los grupos de

control y dos métodos para la detección del silenciamiento. En resumen, se prepararán las soluciones de SiARN-Malat1, SiARN-GAPDH como control positivo del silenciamiento y SiARN-negativo (sin blanco en la célula) como control negativo según detalla el fabricante, además de preparar un grupo de células que se transfectan de manera “simulada”, sin agente de transfección ni SiARN. Estas células serán tratadas con tripsina y resuspendidas en medio de crecimiento normal. En paralelo se preparará el reactivo de transfección siPORT NeoFx, diluyéndolo con medio Opti-MEM I en un tubo cónico, para luego incubarlo por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se procederá a diluir la solución de SiARN correspondiente a cada grupo en medio Opti-MEM I y se mezclará con el reactivo de transfección recién preparado, dejando incubar por 10 minutos, formando un complejo SiARN/SiPORT NeoFx que será depositado en una placa de cultivo según corresponda a cada grupo. Finalmente se agregarán las células resuspendidas para incubarlas a 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo se procederá a reemplazar el medio con medio de cultivo fresco. Completado el proceso se verificará visualmente la morfología de las células en busca de evidencia de efectos citotóxicos importantes a través de la observación microscópica. Posterior a este paso, se monitoreará la efectividad del experimento a través de la metodología de Western Blot, para detectar cambios en la presencia de la proteína GAPDH, y de RT-qPCR para determinar cambios en su expresión relativa. De igual manera se determinarán cambios en la expresión relativa de Malat-1 en el grupo correspondiente. La cantidad de

células a utilizar y el volumen de los reactivos serán determinados a través de un proceso de estandarización según las indicaciones del fabricante, el anticuerpo monoclonal Anti-GAPDH y los partidores para su detección son provistos por el kit comercial, mientras que el ARN de interferencia para el silenciamiento de Malat-1 corresponde a una secuencia pre-diseñada por Invitrogen Silencer, según sus estándares de especificidad y efectividad.

4.3.2. Ensayo de supervivencia intracelular

Posterior a la transfección de las células con el ARN de interferencia y el ensayo de infección con *Brucella abortus* 2308, se aplicará 30 µg/mL de gentamicina para eliminar las bacterias del medio extracelular, para luego lisar las células utilizando desoxicolato de sodio 0,5% en PBS. Para realizar el recuento se sembrarán diluciones seriadas (Hoben y Somasegaran, 1982) en placas de agar Brucella, realizando un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para calcular el porcentaje de sobrevivencia intracelular en un grupo de macrófagos control y un grupo knockdown para Malat-1 a 12, 24 y 48 horas.

A través del silenciamiento de Malat-1 esperamos demostrar que su expresión es esencial para una correcta polarización de macrófagos murinos, lo que a su vez es fundamental para efectuar su acción bactericida.

5. PLAN DE TRABAJO

Tabla 5-1. Carta Gantt.

Objetivos específicos: Actividades / meses	6	12	18	24
Objetivo 1: Determinar cambios en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 en macrófagos murinos infectados por Brucella abortus 2308.				
a) Cultivo celular y bacteriano	x	x	x	x
b) Ensayo de infección	x	x	x	
c) Extracción de ARN	x	x		
d) Evaluación de la expresión relativa	x	x		
Objetivo 2: Caracterizar el fenotipo inducido por la infección de Brucella abortus 2308 en un modelo murino de macrófagos				
a) Detección de citoquinas		x	x	x
b) Caracterización fenotípica		x	x	x
Objetivo 3: Evaluar la función del ARN largo no codificante Malat-1, a través del silenciamiento de su expresión relativa, en el proceso de polarización de macrófagos murinos y en la supervivencia intracelular de Brucella abortus 2308.				
a) Silenciamiento de Malat-1 a través de ARN de interferencia		x	x	x
b) Ensayo de supervivencia intracelular		x	x	x
Fecha presentación Informe Final: 31 marzo de 2023				

6. TRABAJO EN PROGRESO

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo determinaron que el ARN largo no codificante Malat-1 aumenta su expresión en células RAW 264.7 infectadas con *Brucella abortus* RB51 y *Brucella abortus* 2308 muertas por calor a 6 horas de infección. Para realizar este experimento, se utilizó la metodología de RT-qPCR para medir cambios en la expresión relativa del ARN largo no codificante Malat-1 en la línea celular RAW 264.7, en el contexto de una infección con *Brucella abortus* 2308, *Brucella abortus* 2308 muerta por calor y *Brucella abortus* RB51. Para esto se utilizó un grupo control de macrófagos no inducidos, además de un grupo de macrófagos estimulados con LPS (0.1 uM) y un grupo de macrófagos estimulados con IL-4 (0.1 uM). La extracción de ARN se realizó a través del método de trizol, a partir del cual se midió la expresión relativa de Malat-1 a 1 y 6 horas de infección.

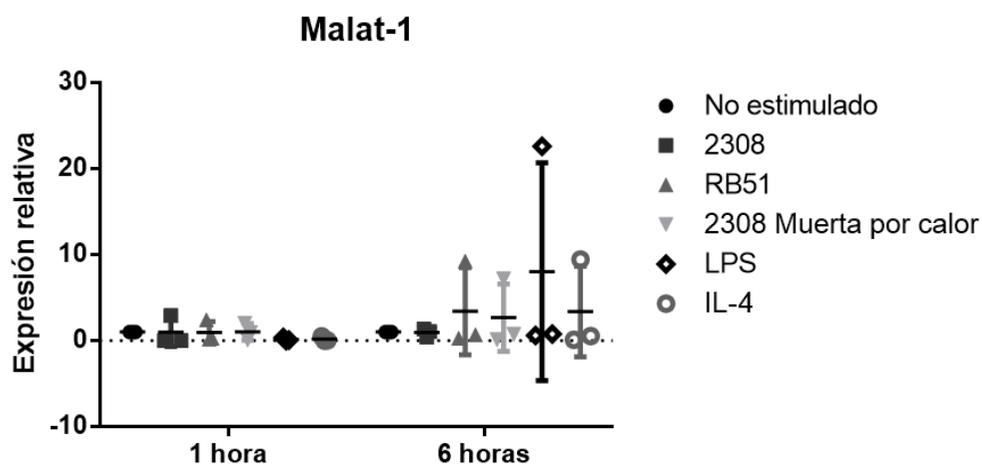


Fig. 2: Cuantificación de la expresión relativa de Malat-1. Se muestran los niveles de expresión relativa en células RAW 264.7 sin tratamiento (control), infectadas con

B.abortus 2308, *B.abortus* 2308 muertas por calor, *B.abortus* RB51, co-cultivadas con LPS y co-cultivadas con IL-4 durante 1 y 6 horas post-tratamiento. Como gen de referencia se utilizó GAPDH y se normalizó su expresión usando células sin tratamiento.

A 1 hora de estimulación se detectó una disminución en la expresión relativa de Malat-1 en células RAW 264-7 estimuladas con LPS e IL-4, sin cambios significativos en los grupos infectados con *Brucella*. A partir de las 6 horas, se observa un marcado aumento en el grupo estimulado con LPS e IL-4. De igual manera, la expresión de Malat-1 aumentó en células RAW 264.7 infectadas con *Brucella abortus* 2308 muertas por calor y *Brucella abortus* RB51 a 6 horas de infección, a diferencia de la cepa silvestre 2308. Esta expresión diferencial de Malat-1 en células infectadas con *Brucella abortus* RB51 puede tener relación con las características estructurales propias de las cepas rugosas, cuyo LPS carece del antígeno O, un factor de virulencia clave para la supervivencia de *Brucella*. Se ha reportado que esta cepa presenta una menor capacidad para sobrevivir la actividad bactericida de los macrófagos (Clapp et al., 2011). Además, en términos generales, las variantes rugosas de *Brucella* presentan una mayor eliminación intracelular en macrófagos asociado a una mayor activación de estas células en comparación con cepas lisas, como *Brucella abortus* 2308 (Fernandez-Prada et al., 2001; Fernandez-Prada et al., 2003; Rittig et al., 2003).

El aumento de la expresión relativa de Malat-1 detectado en células RAW 264.7 infectadas con *Brucella abortus* 2308 muertas por calor podría indicar que la viabilidad de la bacteria es determinante para la activación de este ARN largo no

codificante. Este fenómeno podría explicarse debido a que, aunque las bacterias muertas por calor mantienen sus componentes estructurales, el tráfico intracelular de *Brucella* y el éxito de su infección depende de la capacidad de la bacteria para controlar la interacción de la vacuola contenedora de *Brucella* y los componentes de la vía endosomal, así como también la expresión de factores de virulencia propios de *Brucella* (Starr *et al.*, 2008; Boschioli *et al.*, 2002), lo que podría relacionarse con cambios en la activación de los macrófagos. Sin embargo, estos datos corresponden a resultados previos cuya dispersión dificultan su interpretación, presentando valores que escapan de la tendencia, lo que podría indicar un error humano en su realización. Para determinar cambios en la expresión relativa de Malat-1 asociados a la infección por *Brucella abortus* es necesario repetir estos experimentos y ampliar los tiempos de infección.

En relación al objetivo 2, se midió la producción y secreción de citoquinas con el objetivo de caracterizar el fenotipo funcional adoptado por la línea celular RAW 264.7 frente a la infección con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308. Para esto, se realizó un ensayo de infección utilizando una MOI de 100 según lo descrito en la metodología. Para completar este experimento se utilizó un grupo control de macrófagos no infectados, además de un grupo de macrófagos estimulados con 100ng/mL de LPS para inducir un fenotipo pro-inflamatorio M1 y un grupo de macrófagos estimulados con 20ng/mL de IL-4 para inducir un fenotipo anti-inflamatorio M2. Completado este proceso, se recolectó el sobrenadante de

estos cultivos a las 8 y 12 horas para realizar un ensayo de ELISA para determinar la concentración de IL-6, TNF- α , IL-10 y TGF- β .

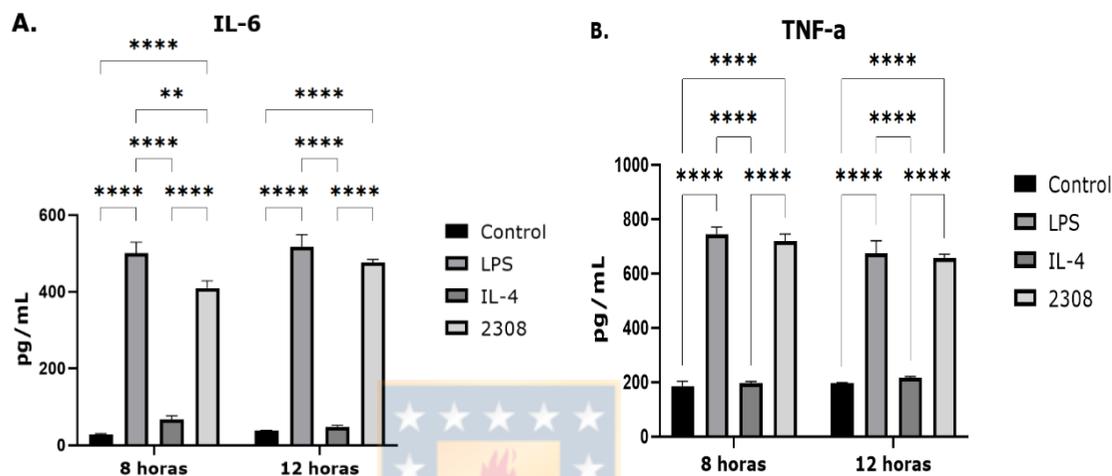


Fig. 1 Concentración de citoquinas cuantificado a través de ELISA sándwich. Se muestra la concentración de citoquinas expresada en pg/mL a partir del sobrenadante de células RAW 264.7 sin tratar (control), co-cultivadas con LPS, co-cultivadas con IL-4 e infectados con *B. abortus* 2308. (A) Concentración de IL-6 en el sobrenadante de células RAW 264.7 a 8 y 12 horas post-tratamiento. (B) Concentración de TNF- α en el sobrenadante de células RAW 264.7 a 8 y 12 horas post-tratamiento.

Como se esperaba, la infección con *Brucella abortus* 2308 indujo un aumento en los niveles de TNF- α e IL-6 de manera significativa, con niveles comparables al grupo estimulado con LPS a 8 y 12 horas de infección. Niveles altos de ambas citoquinas son características del fenotipo M1 debido a su actividad pro-inflamatoria, concordantes a la estimulación con LPS.

De igual manera, se determinaron los niveles de IL-10 y TGF- β , dos citoquinas producidas de manera característica por macrófagos que adoptan un fenotipo M2 debido a su actividad anti-inflamatoria. La presencia de estas citoquinas era

esperable en el grupo estimulado con IL-4, pues se corresponde con un estímulo anti-inflamatorio, sin embargo, no se detectó en ninguno de los grupos de estudio.

Respecto al objetivo 3, se mantiene en curso la estandarización del kit comercial “Silencer™ siRNA Starter Kit” (invitrogen) para silenciar la expresión relativa de Malat-1 en células RAW 264.7. Con este objetivo, se utilizaron los rangos de optimización recomendados por el fabricante para el número de células a tratar y el volumen de reactivo a utilizar, según la siguiente tabla:

Tabla 6-1. Rangos de optimización.

	Número de Células (rango de optimización)	siPORT NeoFX (rango de optimización)	2 μM siARN Recomendado (rango de optimización)	Complejo siARN/siPORT NeoFX o medio Opti-MEM I para los controles
Cantidad por Transfección	2.4 x 10 ⁵ (1.2–3.6 x 10 ⁵)	5 μL (2–6 μL)	45 μL (7.5–45 μL)	600 μL

A partir de dichos valores, se diseñó un experimento utilizando un grupo de macrófagos transfectados con siARN-Malat-1 y tres grupos de control: macrófagos transfectados con siARN- GAPDH, macrófagos transfectados con siARN-negativo y macrófagos tratados con los reactivos según el protocolo, pero sin agente de transfección ni siARN. Finalizado el experimento, se determinó que no había presencia de alteraciones morfológicas importantes a través de una observación microscópica y se realizó una extracción de ARN según el método

de trizol. La concentración de ARN obtenida para cada muestra se midió utilizando un método de nanogota en un equipo Tecan Infinite M200, obteniéndose los resultados señalados a continuación en la tabla 1-4.:

Tabla 6-2. Concentración de ARN extraído.

Se muestra la concentración de ARN extraído por el método de trizol a partir de células RAW 264.7 tratadas con siARN Malat-1, siARN GAPDH, siARN negativo y Células tratadas sin agente de transfección ni siARN (M ϕ) expresada en ng/uL.

Muestra	Concentración ARN (ng/uL)
siMalat-1 (1)	227,64
siMalat-1 (2)	222,92
siMalat-1 (3)	374,68
siGAPDH (1)	320,28
siGAPDH (2)	525,7
siGAPDH (3)	235,64
siNEG (1)	192,84
siNEG (2)	332,68
siNEG (3)	436
M ϕ (1)	573,56
M ϕ (2)	648,8
M ϕ (3)	462,96

Los métodos para la detección del silenciamiento están en preparación.

7. RECURSOS DISPONIBLES:

El Laboratorio de Inmunología del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, cuenta con la infraestructura y el equipamiento necesarios para llevar a cabo el desarrollo de este proyecto, incluyendo:

- 1) Una sala de cultivo celular, equipada con un gabinete de flujo laminar, un microscopio invertido, un separador magnético para subpoblaciones (Miltenyi-Biotech), un refrigerador, una centrífuga con enfriamiento, tanque de nitrógeno líquido e incubadoras con CO₂.
- 2) Un Laboratorio de Bioseguridad tipo III con acceso restringido y contención microbiológica parcial para trabajar con agentes de riesgo del grupo III (Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados-Fondecyt-CONICYT). Este Laboratorio se encuentra equipado con incubadoras y gabinete de flujo laminar, donde son cultivadas las bacterias patógenas y se realizan los ensayos de infección.
- 3) Un laboratorio con equipamiento básico para realizar diversas técnicas inmunológicas. Este incluye: microscopios, dos congeladores -20°C, un congelador -80°C, pHmetro, Lector de placas Elisa Victor X3.
- 4) Un laboratorio con equipamiento básico para el desarrollo de técnicas moleculares, los que incluyen tres termocicladores, mini centrífuga con enfriamiento, dos congeladores -20°C, cámaras para electroforesis en geles

de agarosa y cámaras de electroforesis en gel de poliacrilamida con fuentes de poder, visualizador de geles con UV y un Sistema de PCR en tiempo-Real AriaMx.

5) Una sala de estudio/oficina para estudiantes asociados al laboratorio.

Además, dentro de las dependencias de la Universidad de Concepción se tendrá acceso a un equipo Tecan Infinite M200 y un citómetro de flujo de última generación BD LSR Fortessa X-20. Por último, el Departamento de Microbiología proporcionará las facilidades para la preparación de reactivos y medios de cultivo, además del sistema de esterilización de materiales.



8. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:

8.1. Personal técnico y/o de apoyo

Tabla 8-1. Personal.

Personas que ejercen funciones permanentes durante la ejecución del proyecto:

Personal Técnico	Horas de dedicación		Meses de dedicación		Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	
Investigador Principal	30	120	11	11	6.000
Técnico 1	22	88	11	11	4.000

Describa aquí las labores de cada personal técnico:

Personal 1 - Tareas: Esterilización de material, preparación de reactivos y medios de cultivo.

8.2. Gastos de operación

Tabla 8-2. Gastos de operación general.

Costo anual estimado de los subítem necesarios para una exitosa ejecución del proyecto.

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)
Materiales	Para llevar a cabo el Proyecto son necesarios suministros de oficina (tales como papel, lápices marcador, cartuchos de tinta, etc.), material fungible de laboratorio (tales como placas petri, tubos de ensayo, frascos de cultivo, pipetas serológicas, raspador de células, placas de cultivo etc), reactivos para	8.000	10.000

	la mantención de cultivos celulares y bacterianos, además de técnicas moleculares (medios de cultivo, suero fetal bovino, antibióticos, antimicóticos, agua libre de nucleasas, reactivo Trizol, reactivo de transfección, etc.) y kits comerciales y anticuerpos para realizar inmunoensayos y técnicas moleculares (Kit de ELISA, Takyon Mastermix, anticuerpos para citometría de flujo, “Silencer™ siRNA Starter Kit”, etc.)		
Capacitaciones			
Inscripción seminarios, congresos, talleres, etc.	Terminado el primer año se presentarán los resultados obtenidos en congresos de la especialidad como parte del proceso de discusión y apertura a otros miembros de la comunidad científica.		500
Publicaciones, Propiedad Intelectual e Industrial	Durante el segundo año se realizará una publicación científica con los resultados obtenidos en este proyecto. Algunas revistas científicas de interés en el área, como “Frontiers In Immunology”, tienen costos de publicación.		2.500
Material bibliográfico y suscripciones			
Gastos en difusión	La divulgación científica es un eje central de nuestro trabajo, por lo que se destinarán recursos para la organización de jornadas científicas destinadas a profesionales del área, estudiantes de pregrado y el resto de la comunidad.	2.000	2.000
Softwares			
Costos de garantías de boletas, pólizas y pagarés			
Reparación y arriendo de equipos			
Movilizaciones y traslados			
Atención de reuniones			
Otros gastos de operación			
TOTAL:		10.000	15.000

8.3. Equipamiento

Tabla 8-3. Gastos en equipamiento.

El monto solicitado incluye los gastos de importación, adecuación de espacios físicos, instalación y puesta en marcha, mantención, garantías y seguros.

	Nombre Equipamiento	Costo m(\$)	Fundamente solicitud
Año 1	TECAN Infinite® 200 PRO	15.000	Un equipo TECAN Infinite 200 propio facilitaría la cuantificación de ARN con bajos volúmenes de muestra, además de evaluar su pureza, lo que es fundamental para analizar resultados de una extracción de ARN y posterior qPCR.

Tabla 8-4. Gastos en infraestructura y mobiliario.

Indica el costo anual estimado solicitado para cada uno de los subítem, necesarios para una exitosa ejecución del proyecto.

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)
Acondicionamiento de espacios físicos	Reparación del piso en la sala de alumnos.	1.000	

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.O. & Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 283–318
- Agalar, C., Usubutun, S., & Turkyilmaz, R. (1999). Ciprofloxacin and rifampicin versus doxycycline and rifampicin in the treatment of brucellosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 18(8), 535–538. <https://doi.org/10.1007/s100960050344>
- Al Dahouk, S., Köhler, S., Occhialini, A., Jiménez de Bagüés, M. P., Hammerl, J. A., Eisenberg, T., Vergnaud, G., Cloeckart, A., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Melzer, F., Drees, K. P., Foster, J. T., Wattam, A. R., & Scholz, H. C. (2017). *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. *Scientific reports*, 7, 44420. <https://doi.org/10.1038/srep44420>
- Al-Ani, F. K., El-Qaderi, S., Hailat, N. Q., Razziq, R., & Al-Darraji, A. M. (2004). Human and animal brucellosis in Jordan between 1996 and 1998: a study. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(3), 831–840. <https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1528>
- Alsubaje, S., Almuneef, M., Alshaalan, M., Balkhy, H., Albanyan, E., Alola, S., Alotaibi, B., & Memish, Z. (2005). Acute brucellosis in Saudi families: relationship between brucella serology and clinical symptoms. *Int J Infect Dis*; 9 (4): 218-24.
- Aranda, R., 4th, Dineen, S. M., Craig, R. L., Guerrieri, R. A., & Robertson, J. M. (2009). Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 10(4) concentration range. *Analytical biochemistry*, 387(1), 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.003>
- Atianand, M. K., & Fitzgerald, K. A. (2014). Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system, *Trends in Molecular Medicine*, vol. 20, no. 11, pp. 623–631.
- Bagheri Nejad, R., Krecek, R. C., Khalaf, O. H., Hailat, N., & Arenas-Gamboa, A. M. (2020). Brucellosis in the Middle East: Current situation and a pathway forward. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008071. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008071>
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., & Moreno, E. (2007). *Brucella*

abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PloS one*, 2(7), e631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631>

- Barquero-Calvo, E., Mora-Cartín, R., Arce-Gorvel, V., de Diego, J. L., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Buret, A. G., Gorvel, J. P., & Moreno, E. (2015). *Brucella abortus* Induces the Premature Death of Human Neutrophils through the Action of Its Lipopolysaccharide. *PLoS pathogens*, 11(5), e1004853. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004853>
- Batista, P. J., & Chang, H. Y. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152, 1298–1307.
- Bellaire, B. H., Roop, R. M., 2nd, & Cardelli, J. A. (2005). Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infection and immunity*, 73(6), 3702–3713. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3702-3713.2005>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896.
- Bohlon, S. S., O'Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M. M., & Fraser, D. A. (2014). Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Frontiers in immunology*, 5, 402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00402>
- Boschiroli, M., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, P., Ramuz, M., & O'Callaghan, D. (2002). The *Brucella suis virB* Operon is Induced Intracellularly in Macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1544-1549. Retrieved March 20, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/3057798>
- Bosco M. C. (2019). Macrophage polarization: Reaching across the aisle?. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 143(4), 1348–1350. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.12.995>
- Bustin, S.A., & Nolan T. (2004). Analysis of mRNA expression by real-time PCR. Horizon Scientific Press, 60 pp., online at <http://www.horizonpress.com/pcrbooks>
- Byndloss, M. X., & Tsolis, R. M. (2016). *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annual review of animal biosciences*, 4, 111–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111326>

- Byndloss, M., Paixao, T., Hartigh, A., Tsolis, R., & Santos, R. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4. 10.2174/1874318801004010109.
- Campbell, G. A., Adams, L. G., & Sowa, B. A. (1994). Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41(3-4), 295–306. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90103-1](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90103-1)
- Carpenter, S. (2016). Long noncoding RNA: novel links between gene expression and innate immunity. *Virus Research*, vol. 212, pp. 137–145.
- Carpenter, S., Aiello, D., Atianand, M. K., Ricci, E. P., Gandhi, P., Hall, L. L., Byron, M., Monks, B., Henry-Bezy, M., Lawrence, J. B., O'Neill, L. A., Moore, M. J., Caffrey, D. R., & Fitzgerald, K. A. (2013). A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6147), 789–792. <https://doi.org/10.1126/science.1240925>
- Castro, H., González, S., & Prat, M. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39. núm. 2, pp. 203-216
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*, 198(4), 545–556. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537
- Clapp, B., Skyberg, J. A., Yang, X., Thornburg, T., Walters, N., & Pascual, D. W. (2011). Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and th17 cell responses. *Infection and immunity*, 79(10), 4165–4174. <https://doi.org/10.1128/IAI.05080-11>
- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Manček-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Martirosyan, A., von Bargen, K., Grilló, M. J., Jerala, R., Brandenburg, K., Llobet, E., Bengoechea, J. A., Moreno, E., Moriyón, I., & Gorvel, J. P. (2012). The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002675. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002675>
- Corsetti, P. P., de Almeida, L. A., Gonçalves, A., Gomes, M., Guimarães, E. S., Marques, J. T., & Oliveira, S. C. (2018). miR-181a-5p Regulates TNF- α

- and miR-21a-5p Influences Gualynate-Binding Protein 5 and IL-10 Expression in Macrophages Affecting Host Control of *Brucella abortus* Infection. *Frontiers in immunology*, 9, 1331. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01331>
- Cui, G., Wei, P., Zhao, Y., Guan, Z., Yang, L., Sun, W., Wang, S., & Peng, Q. (2014). *Brucella* infection inhibits macrophages apoptosis via Nedd4-dependent degradation of calpain2. *Veterinary microbiology*, 174(1-2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.033>
- Cui, H., Banerjee, S., Guo, S., Xie, N., Ge, J., Jiang, D., Zörnig, M., Thannickal, V. J., & Liu, G. (2019). Long noncoding RNA Malat1 regulates differential activation of macrophages and response to lung injury. *JCI insight*, 4(4), e124522. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124522>
- Czibener, C., Merwaiss, F., Guaimas, F., Del Giudice, M. G., Serantes, D. A., Spera, J. M., & Ugalde, J. E. (2016). BigA is a novel adhesin of *Brucella* that mediates adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology*, 18(4), 500–513. <https://doi.org/10.1111/cmi.12526>
- Czyż, D. M., Willett, J. W., & Crosson, S. (2017). *Brucella abortus* Induces a Warburg Shift in Host Metabolism That Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of the Pathogen. *Journal of bacteriology*, 199(15), e00227-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00227-17>
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology*, 112, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>
- Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E., & Zinsstag, J. (2012). Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(10), e1865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001865>
- Delpino, M. V., Marchesini, M. I., Estein, S. M., Comerchi, D. J., Cassataro, J., Fossati, C. A., & Baldi, P. C. (2007). A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infection and immunity*, 75(1), 299–305. <https://doi.org/10.1128/IAI.00952-06>
- Ducrottoy, M., Ammary, K., Lbacha, H. A., Zouagui, Z., Mick, V., Prevost, L., Bryssinckx, W., Welburn, S., & Benkirane, A. (2015). Narrative overview of animal and human brucellosis in Morocco: ¿intensification of livestock production as a driver for emergence? *Infectious diseases of poverty*. <https://doi.org/10.1186/s40249-015-0086-5>

- Elling, R., Chan, J., and Fitzgerald, K. A. (2016). Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. *European Journal of Immunology*, vol. 46, no. 3, pp. 504–512.
- El-Sayed, A., & Awad, W. (2018). Brucellosis: Evolution and expected comeback. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6. 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008
- Enkelmann, J., Stark, K., & Faber, M. (2020). Epidemiological trends of notified human brucellosis in Germany, 2006-2018. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 93, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.019>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Brucellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- Eze M., Yuan L., Crawford R., Paravitana C., Hadfield T., Bhattacharjee A., Warren R., & Hoover D. (2000). Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infection and immunity*, 68(1), 257–263. <https://doi.org/10.1128/iai.68.1.257-263.2000>
- Fernandez-Prada, C. M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. G., et al. (2001). Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 69, 4407–4416. doi: 10.1128/IAI.69.7.4407-4416.2001
- Fernandez-Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop, R. M. II, Robertson, G. L., et al. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect. Immun.* 71, 2110–2119. doi: 10.1128/IAI.71.4.2110-2119.2003
- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 11), 2688–2693. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65269-0>
- Fournier, A., Young, I., Rajić, A., Greig, J., & LeJeune, J. (2015). Social and Economic Aspects of the Transmission of Pathogenic Bacteria between Wildlife and Food Animals: A Thematic Analysis of Published Research

- Knowledge. *Zoonoses and public health*, 62(6), 417–428. <https://doi.org/10.1111/zph.12179>
- Franc, K. A., Krecek, R. C., Häsler, B. N., & Arenas-Gamboa, A. M. (2018). Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC public health*, 18. 10.1186/s12889-017-5016-y
- Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish journal of microbiology*, 67(2), 151–161. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>
- Godfroid, J., & Käsbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 135–145. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00217-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00217-1)
- Gökçen S., & Eskiizimirliler S., (1998). Percentage of positive reactions for brucellosis found by the Bornova Veterinary Control and Research Institute in 1988–1997 in serum samples from cattle, sheep and goats in the Aegean provinces. *Vet. Kon ve Arast Enst Dergisi*, 23, 1–10
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Hadjicharalambous, M. R., & Lindsay, M. A. (2019). Long Non-Coding RNAs and the Innate Immune Response. *Non-coding RNA*, 5(2), 34. <https://doi.org/10.3390/ncrna5020034>
- Heward, J. A., & Lindsay, M. A. (2014). Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. *Trends Immunol* 35, 408–419.
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of Rhizobium spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Applied and environmental microbiology*, 44(5), 1246–1247. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.5.1246-1247.1982>
- Hoffmann, E. M., & Houle, J. J. (1983). Failure of Brucella abortus lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Veterinary immunology and immunopathology*, 5(1), 65–76. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(83\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0165-2427(83)90032-6)
- Hu, G., Gong, A. Y., Wang, Y., Ma, S., Chen, X., Chen, J., Su, C. J., Shibata, A., Strauss-Soukup, J. K., Drescher, K. M., & Chen, X. M. (2016). LincRNA-Cox2 Promotes Late Inflammatory Gene Transcription in Macrophages through Modulating SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling. *Journal*

- of immunology (Baltimore, Md.: 1950), 196(6), 2799–2808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502146>
- Hu, G., Tang, Q., Sharma, S., Yu, F., Escobar, T. M., Muljo, S. A., Zhu, J., & Zhao, K. (2013). Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nature immunology*, 14(11), 1190–1198. <https://doi.org/10.1038/ni.2712>
- Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1784, 119–126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12
- Huang, Z., Luo, Q., Yao, F., Qing, C., Ye, J., Deng, Y., & Li, J. (2016). Identification of differentially expressed long non-coding RNAs in polarized macrophages. *Scientific Reports*, 6(1), 19705–19705. <https://doi.org/10.1038/srep19705>
- Ilott, N. E., Heward, J. A., Roux, B., Tsitsiou, E., Fenwick, P. S., Lenzi, L., Goodhead, I., Hertz-Fowler, C., Heger, A., Hall, N., Donnelly, L. E., Sims, D., & Lindsay, M. A. (2014). Long non-coding RNAs and enhancer RNAs regulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes. *Nature communications*, 5, 3979. <https://doi.org/10.1038/ncomms4979>
- Jiménez de Bagüés, M. P., Ouahrani-Bettache, S., Quintana, J. F., Mitjana, O., Hanna, N., Bessoles, S., Sanchez, F., Scholz, H. C., Lafont, V., Köhler, S., & Occhialini, A. (2010). The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection. *The Journal of infectious diseases*, 202(1), 3–10. <https://doi.org/10.1086/653084>
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grandér, D., & Morris, K. V. (2014). Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(3), 1063–1071. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.035>
- Jones, S. M., & Winter, A. J. (1992). Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 60:3011–3014.
- Kamath, P. L., Foster, J. T., Drees, K. P., Luikart, G., Quance, C., Anderson, N. J., Clarke, P. R., Cole, E. K., Drew, M. L., Edwards, W. H., Rhyan, J. C., Treanor, J. J., Wallen, R. L., White, P. J., Robbe-Austerman, S., & Cross, P. C. (2016). Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nature communications*, 7, 11448. <https://doi.org/10.1038/ncomms11448>

- Ke, Y., Wang, Y., Li, W., & Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 72. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00072>
- Klimp, H., De Vries, E. G. E., Scherphof, G. L., & Daemen, T. (2002). A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Review in Oncology/Hematology*, vol. 44, no. 2, pp. 143–161
- Krawczyk, M., & Emerson, B.M. (2014). p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF- κ B complexes. *Elife* 3, e01776
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*, 8(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003>
- Li, Z., Chao, T. C., Chang, K. Y., Lin, N., Patil, V. S., Shimizu, C., Head, S. R., Burns, J. C., & Rana, T. M. (2014). The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 1002–1007. <https://doi.org/10.1073/pnas.13137681117>
- López-Santiago, R., Sánchez-Argáez, A., Alba-Núñez, L., Baltierra Uribe, S., & Moreno-Lafont, M. (2019). Immune Response to Mucosal *Brucella* Infection. *Frontiers in Immunology*. 10. 10.3389/fimmu.2019.01759
- Maass, P. G., Luft, F. C., & Bähring, S. (2014). Long non-coding RNA in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 92(4), 337–346. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1131-8>
- Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martínez, P. (2013). Brucelosis humana: situación epidemiológica en Chile, 2001-2010. *Revista chilena de infectología*, 30(6), 653-659. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000600013>
- Martirosyan, A., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews*, 240(1), 211–234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x>

- Masoumi, F., Ghorbani, S., Talebi, F., Branton, W. G., Rajaei, S., Power, C., & Noorbakhsh, F. (2019). Malat1 long noncoding RNA regulates inflammation and leukocyte differentiation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 328, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.11.013>
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 3569–3576.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969.
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Negrón ME, Kharod GA, Bower WA, Walke H. Notes from the Field: Human *Brucella abortus* RB51 Infections Caused by Consumption of Unpasteurized Domestic Dairy Products — United States, 2017–2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019;68:185. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6807a6external icon>.
- Pal, M. (2017). Public Health and Economic Importance of Bovine Brucellosis: An Overview. *American Journal of Epidemiology and Infectious Diseases*. 5. 27-34. [10.12691/ajeid-5-2-2](https://doi.org/10.12691/ajeid-5-2-2).
- Palazzo, A. F., & Gregory, T. R. (2014). The case for junk DNA. *PLoS genetics*, 10(5), e1004351. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004351>
- Pappas G. (2010). The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International journal of antimicrobial agents*, 36 Suppl 1, S8–S11. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013>.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Brucellosis. *The New England journal of medicine*, 352(22), 2325–2336. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050570>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)

- Pelechano, V., & Steinmetz, L. M. (2013). Gene regulation by antisense transcription. *Nature reviews. Genetics*, 14(12), 880–893. <https://doi.org/10.1038/nrg3594>
- Peng, C., Li, Y., Huang, D., & Guan, P. (2020). Spatial-temporal distribution of human brucellosis in mainland China from 2004 to 2017 and an analysis of social and environmental factors. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 25. 10.1186/s12199-019-0839-z.
- Pratt, A. J., DiDonato, M., Shin, D. S., Cabelli, D. E., Bruns, C. K., Belzer, C. A., Gorringer, A. R., Langford, P. R., Tabatabai, L. B., Kroll, J. S., Tainer, J. A., & Getzoff, E. D. (2015). Structural, Functional, and Immunogenic Insights on Cu,Zn Superoxide Dismutase Pathogenic Virulence Factors from *Neisseria meningitidis* and *Brucella abortus*. *Journal of bacteriology*, 197(24), 3834–3847. <https://doi.org/10.1128/JB.00343-15>
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature reviews. Genetics*, 17(1), 47–62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
- Rittig, M. G., Kaufmann, A., Robins, A., Shaw, B., Sprenger, H., Gems, D., et al. (2003). Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1045–1055. doi: 10.1189/jlb.0103015
- Rossetti, C. A., Drake, K. L., & Adams, L. G. (2012). Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes and infection*, 14(9), 756–767. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.03.003>
- Rossetto, C. C., Tarrant-Elorza, M., Verma, S., Purushothaman, P., & Pari, G. S. (2013). Regulation of viral and cellular gene expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus polyadenylated nuclear RNA. *Journal of virology*, 87(10), 5540–5553. <https://doi.org/10.1128/JVI.03111-12>
- Sangari, F., Cayón, A., Seoane, A., & García-Lobo, J. (2010). *Brucella abortus* ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC microbiology*, 10, 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-107>
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H. J., & De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection.

- International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60(Pt 4), 801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>
- Scholz, H. C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S. A., Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., & Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 66(5), 2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>
- Scholz, H., Hubálek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M., Zygmunt, M., Whatmore, A., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H., & Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 58. 375-82. [10.1099/ijs.0.65356-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0).
- Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K., Liu, Y. P., & Splitter, G. A. (2013). *Brucella* induces an unfolded protein response via TcbB that supports intracellular replication in macrophages. PLoS pathogens, 9(12), e1003785. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003785>
- Soler Lloréns, P., Quance, C., Lawhon, S., Stuber, T., Edwards, J., Ficht, T., Robbe-Austerman, S., O'Callaghan, D., & Keriell, A. (2016). A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 6. 116. [10.3389/fcimb.2016.00116](https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00116)
- Solera J. (2010). Update on brucellosis: therapeutic challenges. International journal of antimicrobial agents, 36 Suppl 1, S18–S20. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.015>
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H. W., & Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. Cell host & microbe, 11(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002>
- Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A., & Celli, J. (2008). *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. Traffic (Copenhagen, Denmark), 9(5), 678–694. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x>
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. Current Protocols in Immunology. Appendix 3. pp. Appendix 3B.

- Trujillo, I. Z., Zavala, A. N., Caceres, J. G., & Miranda, C. Q. (1994). Brucellosis. *Infect Dis Clin North Am*; 8:225-241
- Tugal, D., Liao, X., & Jain, M. K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(6), 1135–1144. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>.
- Um, S. H., Kim, J. S., Kim, K., Kim, N., Cho, H. S., & Ha, N. C. (2013). Structural basis for the inhibition of human lysozyme by PliC from *Brucella abortus*. *Biochemistry*, 52(51), 9385–9393. <https://doi.org/10.1021/bi401241c>
- Wang, Y., Li, Y., Li, H., Song, H., Zhai, N., Lou, L., Wang, F., Zhang, K., Bao, W., Jin, X., Su, L., & Tu, Z. (2017). *Brucella* Dysregulates Monocytes and Inhibits Macrophage Polarization through LC3-Dependent Autophagy. *Frontiers in immunology*, 8, 691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00691>
- Whatmore, A. M., Dale, E.-J., Stubberfield, E., Muchowski, J., Koylass, M., Dawson, C., et al. (2015). Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Reports* 2:e000017. doi: 10.1099/jmmcr.0.000017
- Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Hubbard, G., & Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 12), 4120–4128. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0>
- Xie, J., Wang, J., Li, Z., Wang, W., Pang, Y., & He, Y. (2018). Ontology-Based Meta-Analysis of Animal and Human Adverse Events Associated With Licensed Brucellosis Vaccines. *Frontiers in pharmacology*, 9, 503. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00503>
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., Ulas, T., ... Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>
- Yang, L., Froberg, J. E., & Lee, J. T. (2014). Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends in biochemical sciences*, 39(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.002>
- Zhang, M., He, Y., Sun, X., Li, Q., Wang, W., Zhao, A., & Di, W. (2014). A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with

extended survival in ovarian cancer patients. *Journal of ovarian research*, 7, 19. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-19>

Zhou, K., Wu, B., Pan, H., Paudyal, N., Jiang, J., Zhang, L., Li, Y., & Yue, M. (2020). ONE Health Approach to Address Zoonotic Brucellosis: A Spatiotemporal Associations Study Between Animals and Humans. *Frontiers in veterinary science*, 7, 521. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00521>

