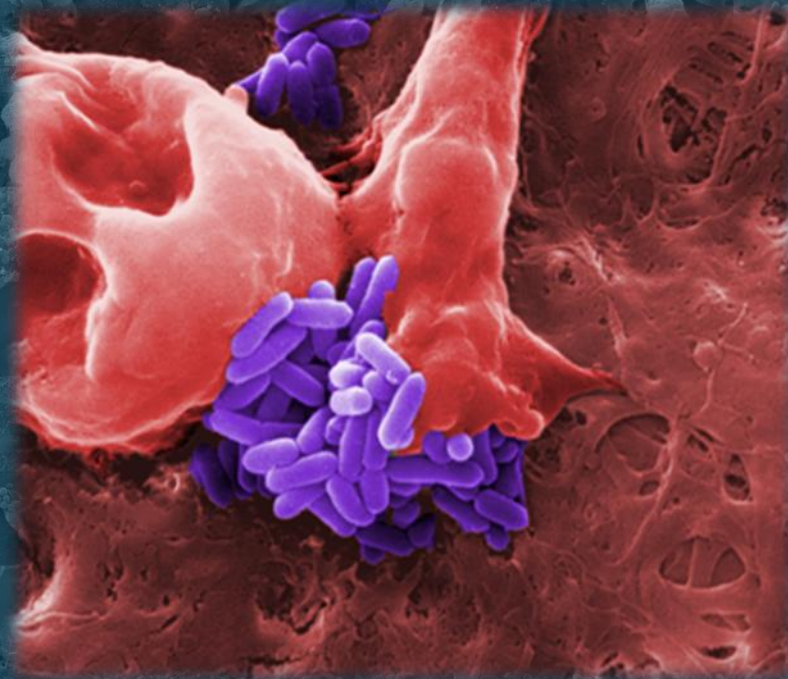


UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
Facultad de Medicina
Dpto. De Fisiología y Farmacología

**“EL CULTIVO ORGANOTÍPICO TRIDIMENSIONAL
DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL COMO MODELO
PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA CEREBRAL
FRENTE A *LISTERIA MONOCYTOGENES*”**



SARA REMUZGO MARTÍNEZ
Santander, 2014



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

“El cultivo organotípico tridimensional de sistema nervioso central como modelo para el estudio de la respuesta cerebral frente a *Listeria monocytogenes*”

**Tesis doctoral presentada por Sara Remuzgo Martínez
para optar al título de Doctora por la Universidad de Cantabria**

Director de Tesis: José Ramos Vivas

Santander, Abril de 2014

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a un contrato predoctoral del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla y a los proyectos CP08/00100 del Instituto de Salud Carlos III y PS09/00466 del Fondo de Investigaciones Sanitarias

ÍNDICE

Abreviaturas, acrónimos y símbolos	1
Resumen/Summary	4
INTRODUCCIÓN	8
1. <i>LISTERIA</i>	8
1.1. Posición taxonómica del género <i>Listeria</i>	8
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.1. Características biológicas	10
1.2.2. Ciclo intracelular y factores de virulencia.....	13
1.3. Listeriosis.....	17
1.3.1. Vías de infección.....	18
1.3.2. Tratamiento y profilaxis.....	19
1.3.3. Modelos experimentales para el estudio de listeriosis	20
1.3.3.1. Modelos animales.....	20
1.3.3.2. Cultivos celulares.....	22
2. INFECCIONES BACTERIANAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	24
2.1. La barrera hematoencefálica.....	26
2.2. Mecanismos de entrada al SNC por microorganismos.....	28
2.3. Listeriosis en el SNC.....	30
2.3.1. Invasión del SNC por <i>L. monocytogenes</i>	31
3. INMUNIDAD CONTRA LA INFECCIÓN DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	32
3.1. Respuesta inmunitaria innata en el SNC.....	32
3.1.1. Origen y función de las células inmunitarias innatas residentes en el SNC	33
3.1.2. Receptores celulares	34
3.1.3. Respuesta inmunitaria del SNC frente a la infección por <i>L. monocytogenes</i>	35
3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa.....	36
3.3. Mecanismos de evasión del sistema inmunitario	38
3.3.1. Autofagia.....	38
4. MODELO ORGANOTÍPICO DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	41
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	46

MATERIAL Y MÉTODOS48

1. CEPAS BACTERIANAS	48
1.1. Condiciones de cultivo y conservación.....	49
1.2. Caracterización de las cepas de <i>Listeria</i>	50
2. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	56
2.1. Realización de cultivos organotípicos tridimensionales (3D-OC).....	56
2.2. Aislamiento de células primarias.....	59
3. ENSAYOS REALIZADOS CON CULTIVOS ORGANOTÍPICOS Y CÉLULAS PRIMARIAS.....	61
3.1. Cultivo bacteriano para las infecciones.....	61
3.2. Infecciones en el modelo <i>ex vivo</i> de SNC.....	61
3.3. Infecciones <i>in vitro</i> de células primarias.....	62
3.4. Extracción de ARN	62
3.5. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	64
3.6. Expresión de genes utilizando matrices de PCR cuantitativa en tiempo real	65
3.7. Análisis de datos y estadística.....	80
3.8. Análisis de citocinas mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	81
3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	82
3.10. Microscopía óptica de cortes semifinos.....	82
3.11. Microscopía de fluorescencia en células primarias.....	83
3.12. Microscopía confocal en células primarias.....	85

RESULTADOS.....86

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>LISTERIA</i>	86
1.1. Amplificación por PCR de la listeriolisina O	86
1.2. Prueba CAMP.....	87
1.3. Identificación bacteriana mediante secuenciación parcial del ARNr 16S	89
1.4. Marcaje de las cepas de <i>Listeria</i>	91
1.5. Elección de la cepa para las infecciones <i>in vitro</i>	92
1.6. Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> HUMV-4251	93
2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA INTERACCIÓN DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> CON EL TEJIDO CEREBRAL	94
2.1. SEM de tejidos no infectados (control)	94
2.2. Análisis de la infección a lo largo del tiempo mediante SEM.....	99
2.3. Microscopía óptica.....	119
3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE SNC.....	121
3.1. Regulación temporal de la expresión de genes de respuesta inmunitaria	121
3.1.1. Verificación de los productos de qRT-PCR	129
3.1.2. Expresión post-transcripcional de citocinas proinflamatorias	131
3.2. Expresión de genes relacionados con la autofagia	133

4. SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN EL TEJIDO CEREBRAL.....	137
5. ESTUDIOS DE INFECCIÓN CON CÉLULAS PRIMARIAS.....	139
5.1. Análisis microscópico de la interacción <i>L. monocytogenes</i> – células primarias.....	139
5.1.1. Estudio del tropismo celular de <i>L. monocytogenes</i>	151
5.2. Expresión de genes de la respuesta inmunitaria	154
DISCUSIÓN	156
1. EL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE SNC COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA LISTERIOSIS CEREBRAL.....	156
2. UTILIZACIÓN DE LA qRT-PCR PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA.....	160
3. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA DESENCADENADA EN EL SNC FRENTE A LA INFECCIÓN POR <i>L. MONOCYTOGENES</i>	161
4. AUSENCIA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL NÚCLEO DE LA AUTOFAGIA EN EL MODELO ORGANOTÍPICO DE SNC INFECTADO CON <i>L. MONOCYTOGENES</i>	174
5. TROPISMO CELULAR DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	177
6. LIMITACIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO.....	180
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXOS.....	200
ANEXO 1. Tablas suplementarias	200
ANEXO 2. Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis	246

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

Ac	Anticuerpo
ActA	Actina A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal o ribosómico
AS	Agar sangre
ASC	Proteína con dominio CARD
BHE	Barrera hematoencefálica
BHI	Infusión de cerebro corazón
BHIA	Agar de infusión de cerebro corazón
BHIB	Líquido de infusión de cerebro corazón
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BME	Medio Basal Eagle
BSA	Albúmina de suero bovino
CAMP	Test de Christie, Atkins y Muench-Petersen
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CCL2/MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
C _t	Ciclo crítico o threshold
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio Dulbecco's Modified Eagle
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros de longitud de onda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gramos
GDI	Gen de interés
GFP	Proteína verde fluorescente
GW	Glicina – Triptófano
h	Hora/Horas
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

Hly	Hemolisina
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
IL/IL	Interleucina
IFN	Interferones
InIA	Internalina A
InIB	Internalina B
IPAF	Factor activador de proteasas del enzima conversor de IL-1 β
IRF3	Factor regulador de interferón de tipo 3
Kb	Kilobases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LLO	Listeriolisina O
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Regiones ricas en leucina
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	mililitro
mm	Milímetro
mM	milimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
nm	nanómetro
NF-KB	Factor nuclear KB
NLR	Receptores tipo NOD
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NOD	Dominio de oligomerización de nucleótidos
ON	Óxido nítrico
PAF	Paraformaldehído
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PrfA	Factor regulador positivo A
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
qPCR	PCR cuantitativa

<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLAPs	Fagosomas espaciosos conteniendo <i>Listeria</i>
SNC	Sistema nervioso central
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
spp.	Varias especies
Tª	Temperatura
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFCs	Unidades formadoras de colonias
y cols.	y colaboradores
3D	Tridimensionales
3D-OC	Cultivos organotípicos tridimensionales
Δ	Delección
ΔC_t	Delta C_t
$\Delta\Delta C_t$	Doble delta C_t
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro

Resumen

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, causante de infecciones alimentarias, que puede llegar a ocasionar enfermedades invasivas en humanos y animales, debido a su capacidad para atravesar las barreras del hospedador. A diferencia de otras bacterias alimentarias, *L. monocytogenes* tiene un especial tropismo por el sistema nervioso central (SNC), donde puede producir meningitis, encefalitis, abscesos cerebrales y romboencefalitis. Aunque su incidencia anual está descendiendo, las altas tasas de mortalidad (hasta el 30%) asociadas a listeriosis son todavía un problema clínico.

Como *L. monocytogenes* es un organismo modelo para la Microbiología Celular, Inmunología y para estudios de interacción hospedador-patógeno, resulta interesante utilizar esta bacteria para el estudio de las interacciones con las células del SNC en un contexto tisular.

Apenas se han utilizado cultivos organotípicos tridimensionales (3D-OC) de cerebro para el análisis de la interacción entre las bacterias y células del tejido cerebral. Por ello, en esta Tesis Doctoral, hemos estudiado por primera vez la infección de 3D-OC obtenidos de cerebros de rata con *L. monocytogenes*.

Los 3D-OC de SNC conservan su estructura intacta y representan un modelo experimental ampliamente utilizado en biología molecular, neurogénesis, electrofisiología, inmunohistoquímica, y para la realización de infecciones experimentales con diferentes patógenos.

En el presente trabajo hemos examinado la infección del tejido cerebral con una cepa clínica de *L. monocytogenes* mediante distintos tipos de microscopía. La microscopía electrónica de barrido ha revelado cómo las células de microglía después de la infección son reclutadas rápida y masivamente a la superficie de los explantes. Tras la fagocitosis, estas células parecen actuar como caballos de Troya, liberando a las bacterias en el interior del tejido cerebral. También, describimos por primera vez ciclos de fagocitosis microglial, muerte celular necrótica y retirada de restos celulares.

Además, a través de la utilización de matrices de PCR en tiempo real, hemos cuantificado a nivel transcripcional 84 genes implicados en las respuestas inmunitaria y de autofagia del hospedador frente a la infección.

Inmediatamente después de la infección por *L. monocytogenes*, la mayor parte de los genes sobreexpresados codificaban moléculas involucradas en respuestas Th1, siendo miembros de la familia de interleucinas (IL)-1 las señales inmunomoduladoras más frecuentes. Tras 5 horas (h) de infección, *L. monocytogenes* causaba un incremento sustancial en la expresión de los genes Tlr1, Tlr2 y Tlr10, y en los genes de sus vías de señalización. A las 12 y 24 h después de la

infección, todavía se detectaba una elevada regulación génica en el tejido cerebral. La alta expresión de algunas citocinas como Il-1, Tnf y Ccl2 y de otros mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico, podría estar provocando una respuesta inmunitaria exacerbada en el cerebro. Interesantemente, la sobreexpresión del ARNm Camp en nuestro modelo sugiere que rCRAMP (un péptido antimicrobiano) podría jugar un papel en la inmunidad innata del SNC contra *L. monocytogenes*, lo que podría llevar al desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras.

La autofagia se ha descrito en ensayos de cultivos celulares *in vitro* como un mecanismo inmunitario protector frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo, en nuestro modelo, los genes del núcleo de la autofagia no estaban modulados por la infección, a pesar de la presencia de la intensa actividad fagocítica en la superficie del tejido cerebral. Por lo tanto, en nuestro modelo, la autofagia podría desempeñar un papel clave en la homeostasis del tejido dañado en lugar de tener un papel inmunológico relevante.

Finalmente, a nivel celular, hemos estudiado la interacción de *Listeria* con células primarias obtenidas de los cultivos organotípicos. El patógeno muestra un gran tropismo por las células microgliales, diferenciadas del resto de células del cerebro por una morfología claramente ameboide.

Los cultivos organotípicos *ex vivo* utilizados en este trabajo constituyen una herramienta versátil para estudiar, en condiciones experimentalmente controladas, una gran variedad de vías biológicas relevantes en la fase cerebral de la listeriosis y podrían ser utilizados fácilmente para el estudio de interacciones hospedador – patógeno en otros microorganismos neurotrópicos relevantes.

Summary

Listeria monocytogenes is a Gram positive bacterium that causes food-borne infections and can potentially cause invasive diseases in humans and animals because of its ability to cross human barriers. Unlike most food-borne pathogens, *L. monocytogenes* has a particular tropism for the central nervous system (CNS), where it can produce meningitis, encephalitis, brain abscess and rhombencephalitis. Although annual incidence is decreasing, the high mortality rates (up to 30%) associated with listeriosis are still a health problem.

Since *L. monocytogenes* is a model organism for Cellular Microbiology, Immunology and host-pathogen interaction studies, it is interesting to use this bacterium for interactions with CNS cells in a tissue context.

Tridimensional organotypic slice cultures (3D-OC) have been rarely used to analyze the interaction between bacteria and brain tissue cells. Therefore, in this Doctoral Thesis, we studied for the first time the infection of 3D-OC from rat brains with *L. monocytogenes*.

3D-OC from CNS maintain their intact structure and represent a widely used experimental model for molecular biology, neurogenesis, electrophysiology, immunohistochemical and experimental infections with different pathogens.

In this work, we examined brain tissue infection with a clinical isolate of *L. monocytogenes* through different types of microscopy. Scanning electron microscopy has revealed how microglial cells are recruited quickly and massively to the surface of tissue after infection. After bacterial engulfment, these cells appear to act as Trojan horses, delivering bacteria inside the cerebral tissue. Also, we describe for the first time cycles of microglial phagocytosis, necrotic cell death and the removal of cell debris.

Furthermore, through the use of arrays of real time PCR, we quantified at the transcriptional level 84 genes involved in the host immune response and autophagy against infection.

Shortly after infection by *L. monocytogenes*, most up-regulated genes were those that encode molecules involved in Th1 responses, so the most abundant immunomodulatory signals were members of the interleukin (IL)-1 family. After 5 hours (h) of infection, *L. monocytogenes* caused a substantial increase in the gene expression of Tlr1, Tlr2 and Tlr10, and downstream genes of the TLR signaling pathways. At 12 and 24 h post-infection, an elevated gene regulation was still detected in brain tissue. The high expression of some cytokines such as IL-1, Tnf and Ccl2 and other proinflammatory mediators such as nitric oxide, might be causing an exacerbated immune response in the brain. Interestingly, the upregulation of Camp mRNA in

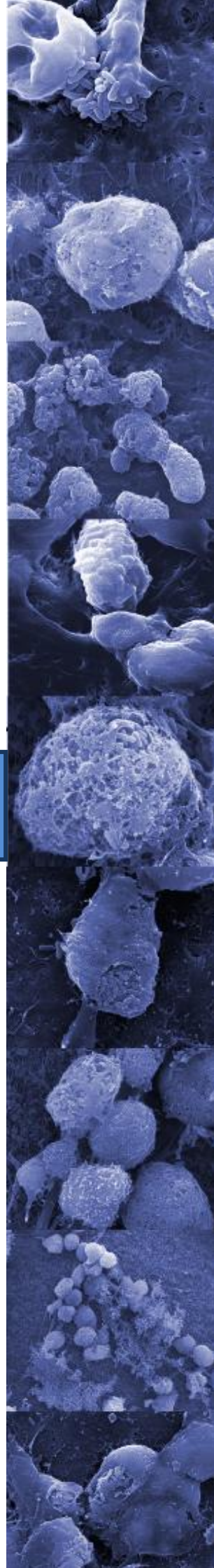
our model suggests that rCRAMP (an antimicrobial peptide) could play a role in the innate immunity of the CNS against *L. monocytogenes*, which could lead to the development of new neuroprotective therapies.

Autophagy has been described in *in vitro* cell culture assays as a protective immune mechanism against *L. monocytogenes*. However, we found that the core autophagy gene expression is not modulated by the infection, despite the presence of intense microglial phagocytic activity on the brain tissue surface. Therefore, in our model, autophagy could play a role in the homeostasis in the damaged brain tissue instead of an immune-relevant pathway.

Finally, at the cellular level, we have studied the interaction of *Listeria* with primary cells obtained from organotypic cultures. The pathogen shows a great tropism for microglia, differentiated by a typical amoeboid morphology.

The *ex vivo* organotypic cultures used here constitute a versatile tool to study, in experimentally controlled conditions, a large variety of biological pathways relevant to the cerebral phase of bacterial listeriosis and they could be easily used for the study of host-pathogen interactions in other relevant neurotropic microorganisms.

Introducción



1. **LISTERIA**

Listeria es un género de bacterias Gram positivas que pueden encontrarse en el suelo, agua, alimentos, animales y algunas plantas. Entre las especies que constituyen este género, *Listeria monocytogenes* es la única patógena para el ser humano, y es la causa de infecciones que reciben en su conjunto el nombre de listeriosis. La listeriosis es extremadamente seria, ya que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 30%), que se incrementa en los individuos más susceptibles de padecer enfermedad, como recién nacidos, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas.

1.1. Posición taxonómica del género *Listeria*

El género bacteriano *Listeria* pertenece a la división Firmicutes, se caracteriza por tener un bajo contenido en guanina – citosina (~38%) y estar relacionado estrechamente con los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus* y la especie *Bacillus subtilis* (Vázquez-Boland y cols., 2001; Cossart, 2007).

Actualmente, se considera que este género comprende ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* (*L. murrayi*), *L. marthii* y *L. rocourtiae*. Las dos últimas fueron descritas en 2010 (Graves y cols., 2010; Leclercq y cols., 2010), por lo que toda la literatura existente hasta ese año consideraba que el género *Listeria* estaba compuesto por 6 especies. Muy recientemente, se ha propuesto la existencia de una especie nueva de *Listeria*, *L. weihenstephanensis* (Lang Halter y cols., 2013). De las 8 especies reconocidas actualmente, sólo *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son patógenas, considerándose a *L. ivanovii* como un patógeno animal y a *L. monocytogenes* como un patógeno animal y humano. Hay que señalar, además, que se han descrito infecciones esporádicas en humanos ocasionadas por otras especies de *Listeria*, como *L. grayi* y *L. seeligeri* (Fajardo Olivares y cols., 2008).

La secuenciación del genoma de cepas de distintas especies del género *Listeria* ha permitido caracterizar y clasificar las especies que lo constituyen (Ramaswamy y cols., 2007). Filogenéticamente, se han establecido dos grupos para clasificar a todas las especies, uno de ellos formado por *L. grayi* y *L. rocourtiae*; y el otro compuesto por el resto de especies. En este segundo grupo, se han establecido dos divisiones, una de ellas formada por *L. welshimeri* y tres es-

pecies estrechamente relacionadas: *L. monocytogenes*, *L. marthii* y *L. innocua*; y otra división que contiene a *L. seeligeri* y *L. ivanovii*. La mayoría de los estudios sobre filogenia están de acuerdo en la existencia de estos dos grupos, pero la localización de *L. welshimeri* crea discusión, ya que algunos la consideran más cercana a *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (Torres y cols., 2005; den Bakker y cols., 2010; Leclercq y cols., 2010) (Figura 1). *L. innocua* es la especie que presenta más similitud con *L. monocytogenes*, ya que ambas tienen un alto grado de homología en la secuencia del ARN ribosomal (ARNr) 16S y también desde el punto de vista metabólico y genético (Milillo y cols., 2012). La secuencia del 16S de *L. weihenstephanensis* presenta un mayor parecido con *L. rocourtiae* que con el resto de especies de *Listeria* (Lang Halter y cols., 2013). En general, todos los miembros del género *Listeria* tienen un genoma altamente conservado y las diferencias ocasionadas por la pérdida o ganancia de genes a través de transferencia horizontal son debidas posiblemente a consecuencias fenotípicas, por ejemplo, a la distinta necesidad de algunas especies de *Listeria* para adquirir genes de resistencia a metales tóxicos presentes en el medio ambiente, o a bacteriocinas, antimicrobianos frecuentemente producidos por bacterias del ácido láctico en los alimentos (den Bakker y cols., 2010; Orsi y cols., 2011). Aunque se han identificado plásmidos en las especies del género *Listeria*, todos los factores de virulencia se encuentran en el cromosoma y están organizados, en su mayoría, en unidades genéticas discretas, conocidas como islas de patogenicidad (Vázquez-Boland y cols., 2001).

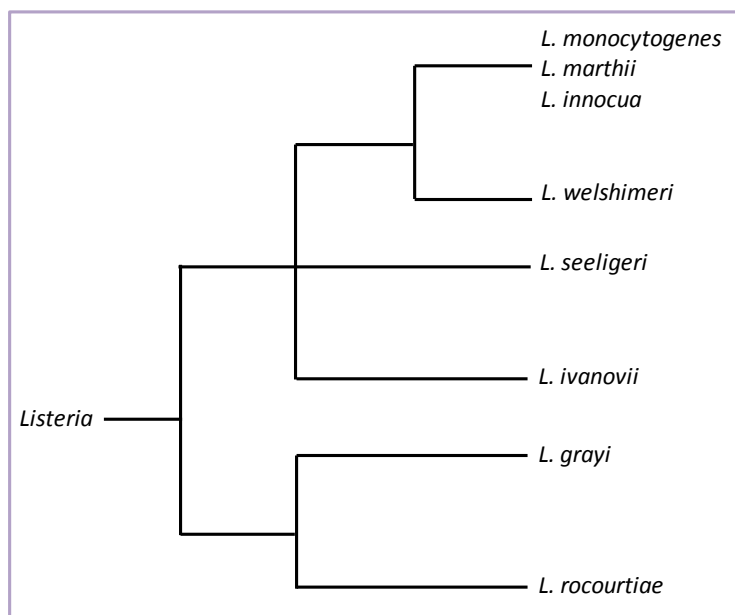


Figura 1. Relación filogenética entre las especies de *Listeria*.

1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes fue descubierta por E.G.D. Murray en 1926, cuando estudiaba una epidemia que afectaba a conejos y cerdos de Guinea, en Inglaterra (Cossart, 2007). Esta bacteria tenía la capacidad de estimular la producción de monocitos en conejos produciendo monocitosis y por ello recibió el nombre de *Bacterium monocytogenes*. Poco después, se la denominó *Listeria monocytogenes*, en honor al cirujano inglés Joseph Lister (Pamer, 2004). En 1928, se estudiaron los primeros casos de infecciones en humanos y durante mucho tiempo, se la consideró como una bacteria zoonótica. Durante la segunda mitad del siglo XX, la listeriosis empezó a ser considerada una infección humana, explicada en parte por los cambios en la alimentación y por la introducción de terapias inmunosupresoras (Disson y Lecuit, 2012). Desde 1980, pasó a considerarse como uno de los patógenos de transmisión alimentaria más virulentos, ya que el primer brote de listeriosis humana debido al consumo de comida contaminada ocasionó una alta tasa de mortalidad (Cossart, 2007; Lecuit, 2007). La principal razón por la que esta bacteria causa enfermedades severas es su capacidad para inducir su propia fagocitosis por las células animales, seguida por una rápida multiplicación y dispersión a otras células adyacentes. Los factores de virulencia que posee le permiten aprovecharse de las defensas del hospedador, cruzar las barreras epiteliales y evadir el sistema inmunitario humoral.

1.2.1. Características biológicas

Listeria monocytogenes es un bacilo pequeño (de unos 0,4 por 1,5 μm), anaeróbico e intracelular facultativo, no formador de esporas, no encapsulado y móvil (Vázquez-Boland y cols., 2001). Se ha descrito, además, que puede tener desde un flagelo (Figura 2) hasta 5 ó 6 flagelos peritricos. Si bien, esta característica es dependiente de la temperatura, ya que la expresión de la flagelina (proteína principal de los flagelos) está reprimida a temperaturas próximas a 37°C (Peel y cols., 1988; Dussurget, 2008).

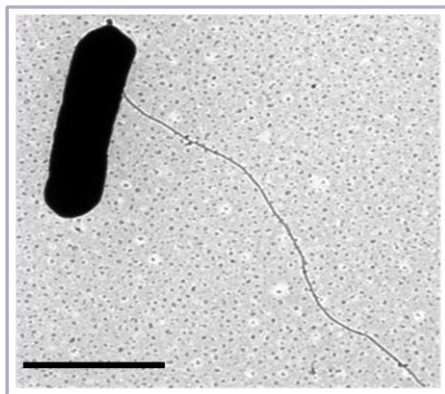


Figura 2. Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión del bacilo *L. monocytogenes* mostrando un único flagelo. Aumentos, $\times 20000$. La barra de escala indica 2 μm . Imagen tomada de Remuzgo-Martínez y Ramos-Vivas, 2013.

L. monocytogenes es una bacteria psicrotrofa, capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, desde los 4°C hasta los 45°C. En el medio ambiente, se distribuye de forma muy heterogénea, y puede encontrarse en animales domésticos y salvajes (vacas, ovejas, cabras, caballos, cerdos, perros, gatos, conejos, roedores), pájaros, peces, anfibios, reptiles, insectos, en el suelo, en aguas subterráneas o residuales, o en la vegetación en descomposición donde vive como saprófito facultativo (Lecuit, 2007; Ramaswamy y cols., 2007). En cuanto a los alimentos, *L. monocytogenes* se ha aislado en carnes, pescados y vegetales crudos, leche y productos lácteos hechos con leche no pasteurizada, mariscos, pollo, quesos blandos, embutidos y comidas preparadas (Lecuit, 2007). Por este motivo, *L. monocytogenes* supone un problema para la industria del procesado de alimentos, ya que puede persistir durante largos períodos de tiempo sobre superficies en contacto con alimentos, e incluso formar biopelículas en ellas (Kushwaha y Muriana, 2009). Además, también es muy resistente a la acidez, salinidad, presencia de metales, condiciones bajas de oxígeno y cambios de temperatura en el ambiente (Freitag y cols., 2009).

Puede sobrevivir en el intestino de humanos, animales y pájaros durante largos períodos de tiempo sin causar infección. Sin embargo, es un patógeno oportunista en personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, ancianos y recién nacidos. Se estima que entre un 3 y un 10% de la población es portadora asintomática de *Listeria* en el intestino (Doyle, 2001).

L. monocytogenes consta de, al menos, cuatro linajes evolutivos (I,II,III y IV) con distinta capacidad para causar infección, debido a las diferentes características ecológicas, genéticas y fenotípicas que presentan. La mayoría de los aislados pertenecen a los linajes I y II, y se asocian

principalmente con casos clínicos e infecciones alimentarias, respectivamente. Los linajes III y IV son poco frecuentes, aislándose en su mayoría de animales (Orsi y cols., 2011). Según la reactividad de los anticuerpos (Ac) a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), se han descrito 17 serotipos de *L. monocytogenes* (Ramaswamy y cols., 2007). Sin embargo, los serotipos 1/2a (linaje II), 1/2b y 4b (linaje I) son los más comunes en infecciones humanas (Vázquez-Boland y cols., 2001). Entre estos tres, la mayoría de los brotes de listeriosis producidos hasta ahora pertenecen al serotipo 4b. Además, se considera que las cepas del serotipo 4b podrían ser las más virulentas, ya que su presencia es mayor en los pacientes que sufren meningoencefalitis, que en los pacientes que presentan solo bacteremia (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007).

La listeriosis es diagnosticada clínicamente cuando el microorganismo es aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otros sitios del organismo humano o animal que normalmente son estériles. Tiene un período de incubación largo (hasta 20-30 días) por lo que, en ocasiones, no se detecta en las primeras etapas de la infección, lo que retrasa el tratamiento antibiótico y dificulta su eliminación (Lecuit, 2007). Generalmente, se identifica de manera precisa por la detección de la listeriolisina O (LLO) (factor de virulencia específico de *L. monocytogenes*) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante pruebas serológicas (Lorber, 1997). Actualmente, existen una gran variedad de métodos para la detección e identificación de *L. monocytogenes* tanto en muestras humanas como de alimentos (Liu, 2008).

En el laboratorio, *L. monocytogenes* se cultiva fácilmente en placas de agar sangre (AS) donde produce una β -hemólisis incompleta, similar a la originada por estreptococos β -hemolíticos. Para su crecimiento en medio líquido, normalmente se utiliza el medio de cultivo Infusión de Cerebro Corazón (BHI), compuesto por carbohidratos, péptidos y oligopéptidos, necesarios para su metabolismo (Joseph y Goebel, 2007). Sus colonias son pequeñas, blanco-grisáceas (en placas de AS), catalasa positivas y oxidasa negativas. Además, *L. monocytogenes* fermenta la glucosa, produciendo principalmente ácido láctico pero no gas (Ramaswamy y cols., 2007). Es una bacteria Gram positiva, aunque, a veces, las cepas clínicas son variables a la prueba Gram y pueden parecer difteroides, cocos o diplococos (Lorber, 1997; Mylonakis y cols., 1998).

1.2.2. Ciclo intracelular y factores de virulencia

Listeria monocytogenes puede entrar, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas profesionales (macrófagos y neutrófilos) y no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y células dendríticas) debido a la expresión de factores de virulencia importantes. Tras la infección, la mayoría de éstos se activan a 37°C por PrfA (factor regulador positivo A), un termorregulador transcripcional clave en la patogénesis de *Listeria* (Dussurget, 2008). La señal que regula PrfA cuando *L. monocytogenes* se encuentra dentro de las células podría ser la disponibilidad de nutrientes (Freitag y cols., 2009). Los factores de virulencia involucrados en el ciclo de infección de *Listeria* se han revisado recientemente (Camejo y cols., 2011). El flagelo contribuye a la invasión de *L. monocytogenes*, pero éste no se correlaciona con su virulencia (O'Neil y Marquis, 2006).

A continuación, se explica de manera general el ciclo intracelular que sigue *Listeria* en las células animales (Figura 3):

1) En primer lugar, los macrófagos fagocitan a las bacterias a través de mecanismos dependientes o independientes de opsoninas (Drevets y cols., 2004a), mientras que en las células no fagocíticas, este proceso debe ser inducido por la bacteria (Doyle, 2001). En éstas últimas, las proteínas de invasión de la superficie de la bacteria, internalinas A y B (InIA y InIB), permiten su internalización (Lecuit, 2005). La InIA promueve la entrada sólo en células epiteliales de las barreras intestinal, fetoplacentaria y hematoencefálica; mientras que InIB está involucrada en la entrada en gran variedad de tipos celulares (como, por ejemplo, células epiteliales, endoteliales, hepatocitos y fibroblastos) (Pizarro-Cerdá y cols., 2012). Ambas proteínas están compuestas por una región N-terminal rica en leucina (LRR), una región intermedia conservada y una región C-terminal específica de cada internalina (Cossart y cols., 2003; Dussurget, 2008). Las LRRs y la región intermedia de la InIA interactúan con los dominios extracelulares del receptor celular transmembrana E-cadherina, por el que *L. monocytogenes* tiene una gran especificidad (Torres y cols., 2005; Cossart, 2011). Este receptor está presente en las células epiteliales polarizadas del intestino, en hepatocitos, en las células dendríticas, en la membrana plasmática basal y apical de sincitiotrofoblastos y citotrofoblasto veloso, en las células endoteliales microvasculares de la barrera hematoencefálica (BHE) y en las células epiteliales del plexo coroideo que están en contacto con el LCR (Lecuit, 2007; Seveau y cols., 2007).

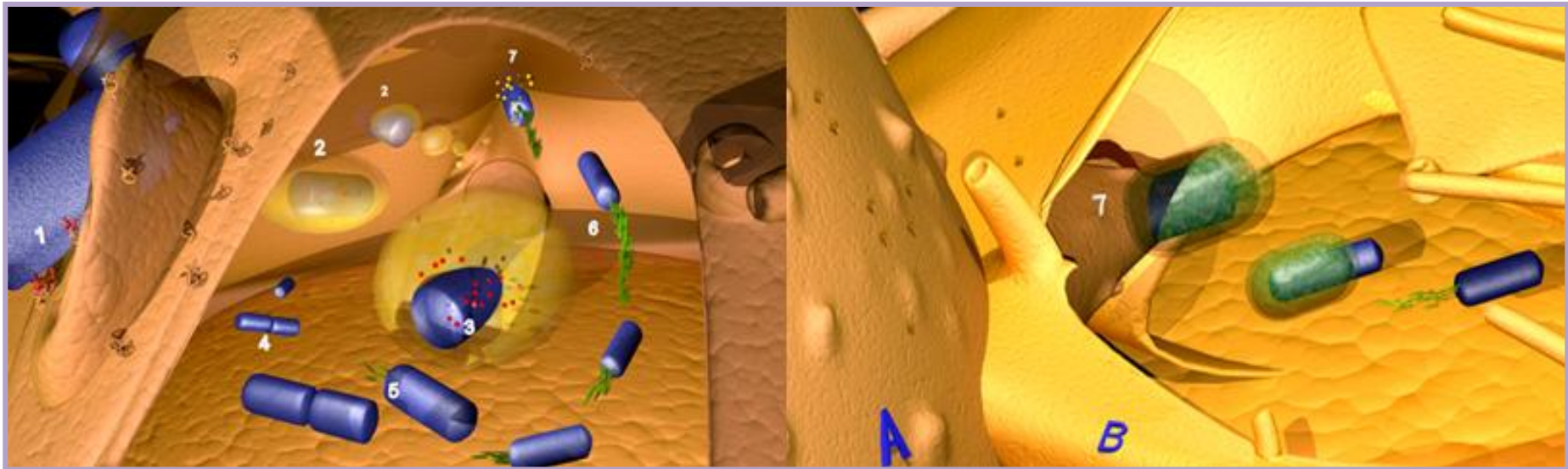


Figura 3. Etapas del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. 1) Internalización mediada por receptores. 2) Dentro de la célula, la bacteria es rodeada por una vacuola o membrana fagosomal. 3) Escape de la vacuola por la secreción de LLO y fosfolipasas. 4) Replicación en el citosol. 5) Polimerización de una red de filamentos de actina celular en uno de los polos de la bacteria. 6) Movimiento intracelular. 7) Invaginación de la membrana de la célula infectada (A) que permite la invasión bacteriana de la célula adyacente (B).

Por el contrario, la InIB puede unirse a tres receptores. El primero identificado fue gC1qR, glicoproteína receptora de C1q, primer componente de la cascada del complemento y de varias proteínas virales. Se localiza mayoritariamente en la superficie celular, en las mitocondrias y en el núcleo; donde interacciona con módulos formados por un dipéptido glicina – triptófano (GW) de la región C-terminal de la InIB. Por otro lado, la región LRR de la InIB se une al dominio extracelular del receptor Met, ligando normal del factor de crecimiento de hepatocitos. Los módulos GW estabilizan la interacción entre InIB y Met, que es específica en cada especie animal (Pizarro-Cerdá y cols., 2012). Además, la unión de InIB con un tercer receptor, los glicosaminoglicanos de las superficies celulares, incrementa la eficiencia de la internalización de la bacteria. Tanto la InIA como la InIB de *Listeria*, tratan de mimetizar los ligandos normales de la célula para beneficiarse de las propiedades de sus receptores correspondientes, desencadenando dos vías de señalización diferentes que pueden ser sinérgicas (Cossart y cols., 2003).

2) Tras las interacciones ligando-receptor, la bacteria es fagocitada por células fagocíticas o endocitada a través de un mecanismo mediado por componentes de la maquinaria endocítica como clatrina y dinamina, en las células de mamífero no fagocíticas (Veiga y Cossart, 2005; Cossart y Toledo-Arana, 2008). Esta entrada inducida por *L. monocytogenes* se denomina zipper o de “cremallera” y supone una reorganización local de la actina citoesquelética acoplada a la extensión de la membrana celular, para producir la envoltura de la bacteria (Cossart y cols., 2003; Pizarro-Cerdá y cols., 2012) (Figura 4A). En ocasiones, dependiendo del tipo celular, se ha observado que *Listeria* podría inducir una fuerte reorganización de la actina celular y plegamientos de la membrana que internalizan la bacteria por macropinocitosis, recordando al mecanismo trigger descrito principalmente en Gram negativas (Cossart y Toledo-Arana, 2008; Remuzgo-Martínez y cols., 2013a).

3) Dentro de la célula, *L. monocytogenes* es rodeada por una membrana, formando un conjunto conocido como “fagosoma” en las células fagocíticas. Las condiciones que existen en el fagosoma (pH 5 y bajas concentraciones de hierro) no permiten la multiplicación de la bacteria, pero inducen la secreción de una hemolisina, la LLO. La LLO es una toxina perteneciente a la familia de citolisinas dependientes de colesterol, capaces de formar pequeños poros en la membrana fagosomal (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006). Estos poros desacoplan los gradientes de pH y calcio para bloquear la fusión del fagosoma con el lisosoma. La acción combinada de la LLO y de dos tipos de fosfolipasas C: fosfatidilinositol específica y fosfatidilcolina específica permiten la lisis de la membrana fagosomal. De esta manera, el patógeno escapa rápidamente

al citosol, en aproximadamente 30 minutos (min), donde encuentra el medio favorable para su multiplicación (Cossart y Toledo-Arana, 2008). En unas 2 horas (h), al menos, el 50% de la población bacteriana está libre en el citoplasma de las células infectadas (Figura 4B).

4) En el citosol, la bacteria empieza a replicarse gracias a los nutrientes que adquiere de la célula hospedadora, a través de sistemas de transporte de hexosas fosfato, ácido lipoico, glicerol y péptidos (Joseph y Goebel, 2007; Freitag y cols., 2009).

5) Al mismo tiempo, la bacteria citosólica empieza a expresar la proteína actina A (ActA), presente en los polos de la superficie bacteriana. ActA recluta y activa el complejo celular Arp2/3 que produce la polimerización de los filamentos de F-actina celular, formando una red de filamentos ramificados, de hasta 40 μm de longitud, en uno de los polos de la bacteria. De esta manera, ActA imita el comportamiento de la familia de proteínas eucarióticas WASP (proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich) organizadoras de la disposición de la actina en el citoesqueleto de las células.

6) Los filamentos de actina le sirven a *L. monocytogenes* de motor molecular, ya que producen una energía que la propulsa a través del citosol, a una velocidad aproximada de 10 μm por minuto (Tilney y Portnoy, 1989; Cossart y Toledo-Arana, 2008). El movimiento intracelular de *L. monocytogenes* es al azar, lo que hace que algunas de ellas migren por el citoplasma hacia la membrana de la célula, empujándola y formando protusiones (listeriopodos) hacia las células adyacentes no infectadas. A través de este mecanismo, las bacterias consiguen dispersarse célula a célula.

7) Al invadir la nueva célula, la bacteria queda rodeada por una vacuola de doble membrana, la originaria de la célula donadora y la procedente de la fusión con la nueva vacuola. En poco tiempo, las bacterias son liberadas de nuevo al citosol debido a la actividad de la LLO y las fosfolipasas, requeridas para la lisis del fagosoma secundario. De esta manera, *L. monocytogenes* puede empezar un nuevo ciclo de proliferación intracelular y dispersión intercelular (Drevets y cols., 2004a; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006; Cossart y Toledo-Arana, 2008).

Este movimiento intracelular hace que la bacteria asegure su supervivencia, ya que evita el contacto con las proteínas del complemento, anticuerpos y fagocitos, presentes en el espacio extracelular (Lorber, 1997).

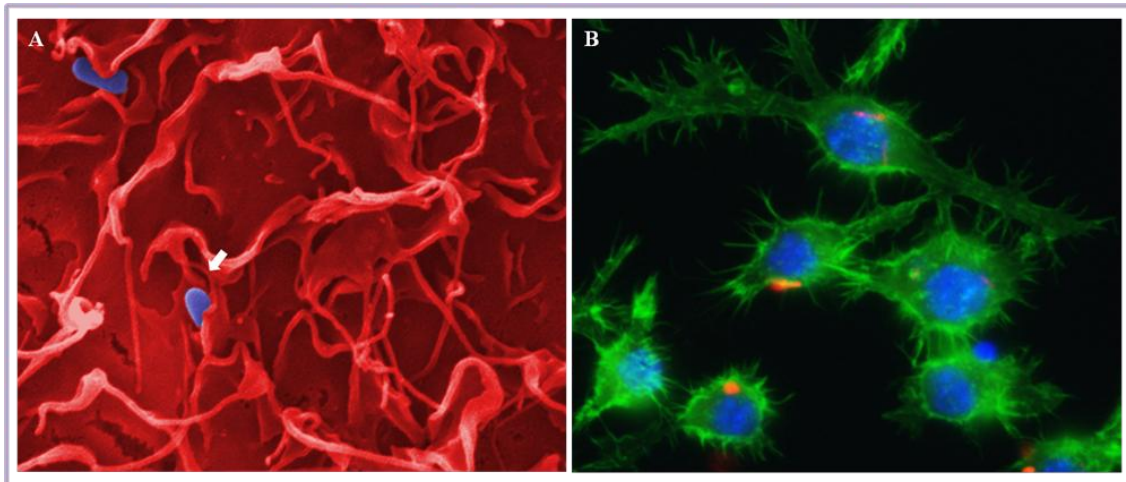


Figura 4. Macrófagos de ratón infectados con *L. monocytogenes*. A, Microfotografía pseudocoloreada tomada con el microscopio electrónico de barrido que muestra la entrada celular de *Listeria* en un macrófago mediante el mecanismo *zipper* (flecha). B, Microfotografía de fluorescencia que muestra la localización intracelular de *L. monocytogenes* (marcada en rojo) en el citosol de los macrófagos. Los filamentos de actina celular aparecen marcados con Faloidina – Atto 488 (verde) y sus núcleos con DAPI (azul).

1.3. Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria rara en humanos (0,1% de todas las infecciones alimentarias), pero potencialmente seria. A diferencia de otras infecciones de transmisión alimentaria como salmonelosis o campilobacteriosis, la listeriosis está asociada con una alta tasa de mortalidad, aproximadamente entre un 20-30%, a pesar de un tratamiento antimicrobiano adecuado. En individuos sanos, su ingestión puede producir una listeriosis gastrointestinal febril, no invasiva, en menos de 24 h. Sin embargo, en la población de riesgo de listeriosis (recién nacidos, mujeres embarazadas, personas mayores e inmunodeprimidos), ésta podría causar infecciones invasivas más severas en el sistema nervioso central (SNC); útero; infecciones locales en ojos, piel, válvulas cardiacas, pulmón (neonatos), hígado y bazo; así como casos de sepsis (Clauss y Lorber, 2008; Allerberger y Wagner, 2010). Más del 50% de los casos corresponden a septicemia, mientras que el 20-25% son debidos a infeccio-

nes del SNC y el 10-15% a infecciones fetoplacentarias. Debido a esto, *L. monocytogenes* es la segunda causa más frecuente de muertes producidas por infecciones de transmisión alimentaria en Europa (Allerberger y Wagner, 2010; Disson y Lecuit, 2012).

Según la forma de presentación de la listeriosis, se puede distinguir entre listeriosis neonatal, perinatal o en el adulto.

La listeriosis neonatal se manifiesta durante la primera semana de vida (listeriosis de inicio temprano) o bien a partir de la primera semana (de inicio tardío). En la listeriosis de inicio temprano se cree que el feto se infecta en el útero a través de la migración transplacentaria de *Listeria* desde la corriente sanguínea de la madre, mientras que la listeriosis de inicio tardío, podría deberse a la ingestión de la bacteria durante el paso por el canal del parto contaminado, o por el contacto con una fuente externa (Swaminathan y Gerner-Smith, 2007). La listeriosis perinatal, ocurrida durante el embarazo, puede producir villitis (lesión placentaria), abscesos placentarios o corioamnionitis (inflamación aguda de las membranas amnios y corion de la placenta). Estas complicaciones se asocian con un nacimiento prematuro, aborto, muerte fetal, meningitis o incluso una infección generalizada en el neonato (granulomatosis infantiséptica), caracterizada por la presencia de microabscesos y granulomas en hígado, bazo y piel (Lecuit, 2007).

La listeriosis en el adulto se presenta frecuentemente como una infección en el SNC (meningoencefalitis) asociada con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral, bacteremia o septicemia (Drevets y Bronze, 2008). Otros cuadros clínicos más inusuales son: endocarditis, miocarditis, neumonía, hepatitis, peritonitis, artritis, otitis y conjuntivitis (Vázquez-Boland y cols., 2001).

1.3.1. Vías de infección

La mayoría de las infecciones humanas causadas por *L. monocytogenes* se producen a través de la ingestión de comida contaminada (se necesitan unas 10^8 - 10^9 bacterias para producir la infección). Después de la ingestión, la bacteria puede ser capaz de cruzar la barrera intestinal, fetoplacentaria o hematoencefálica del hospedador (Lecuit, 2005).

Antes de alcanzar el intestino, *L. monocytogenes* tiene que resistir el ambiente adverso del estómago (acción de las enzimas proteolíticas, ácido gástrico y sales biliares). Las bacterias que sobreviven a estas defensas inespecíficas llegan al intestino. Aquí, *L. monocytogenes* compete

con la flora autóctona, invade el tejido intestinal y se transloca probablemente a través de las células epiteliales intestinales y de las células M de las placas de Peyer (Schuppler y Loessner, 2010). Así, consigue atravesar la primera de las barreras con las que se encuentra. Tras la translocación intestinal, la bacteria se puede diseminar a través de la linfa y la sangre desde los nódulos linfáticos mesentéricos hasta el bazo y el hígado (Dussurget, 2008). En estos órganos, las bacterias se replican intracelularmente tanto en macrófagos como en hepatocitos, originando focos necróticos (Berche, 1995). Como resultado de esto, se produce una bacteremia prolongada, de manera que si el sistema inmunitario no es capaz de controlar la infección, la bacteria es liberada a la circulación y puede llegar a alcanzar e infectar el cerebro, o la placenta en mujeres embarazadas (Berche, 1995; Lecuit, 2007).

La transmisión horizontal entre personas no ha sido descrita, excepto en algunos casos raros de contaminación cruzada ocurrida en el parto o entre niños prematuros (Lorber, 1997).

1.3.2. Tratamiento y profilaxis

Estudios *in vitro* demuestran que *L. monocytogenes* es susceptible a un amplio rango de antibióticos como penicilinas, aminoglucósidos, trimetoprima, tetraciclina, macrólidos y vancomicina, la mayoría de ellos bacteriostáticos (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). El tratamiento de elección más efectivo para los casos de bacteremia, meningitis o abscesos por *L. monocytogenes* es la administración de ampicilina o penicilina (betalactámicos que interfieren en la síntesis de la pared celular de las bacterias). Entre ellos, se recomienda la ampicilina ya que atraviesa mejor la BHE. Para que el efecto sea más rápido, al menos, durante los primeros días de tratamiento se aconseja administrar junto con un aminoglucósido (inhiben la síntesis proteica actuando sobre la subunidad 30S de los ribosomas), generalmente, gentamicina (Moragas y cols., 2010). A los pacientes alérgicos a ampicilinas se les suele dar una combinación de trimetoprima y sulfametoxazol, bactericidas contra *L. monocytogenes* (Clauss y Lorber, 2008; Allerberger y Wagner, 2010). Estos dos componentes son capaces de alcanzar el SNC de una manera muy eficiente (Moragas y cols., 2010). La duración y dosis del tratamiento es muy variable, dependiendo de la virulencia de la cepa, de los síntomas clínicos y del estado inmunológico del hospedador (Mylonakis y cols., 1998).

La incidencia de listeriosis ha ido disminuyendo en la mayoría de los países industrializados durante la última década, principalmente debido a la implementación de medidas de control y seguridad alimentaria. Para ello, los profesionales de la seguridad pública y alimentación recomiendan que la mejor solución para evitar una contaminación por *L. monocytogenes* es seguir unas buenas técnicas de manipulación de los alimentos, desde su elaboración hasta su fabricado y procesamiento (Swaminathan y Gerner-Smith, 2007).

1.3.3. Modelos experimentales para el estudio de listeriosis

Se han desarrollado diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la listeriosis. El desarrollo de estos modelos y de diferentes técnicas experimentales ha contribuido al conocimiento de la patobiología de esta bacteria, y de las enfermedades que causa.

La cepa de referencia utilizada por el Consorcio Europeo del Genoma de *Listeria* es *L. monocytogenes* EGD-e, originalmente aislada en 1924 en tejido de conejo (Vázquez-Boland y cols., 2001). Además, la utilización de mutantes en proteínas importantes para la virulencia de *Listeria*, como la LLO, fosfolipasas o ActA, han ayudado a conocer el papel de las mismas durante el proceso infeccioso. Debido a la similitud entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*, esta última ha sido utilizada como un control avirulento y como sustituta de *L. monocytogenes* en una gran variedad de estudios diseñados para el control de este patógeno en la industria alimentaria, donde el uso de *L. monocytogenes* sería peligroso (Milillo y cols., 2012).

1.3.3.1. Modelos animales

El ratón y la rata son las especies animales más utilizadas para el estudio de la infección de *Listeria*. En ellos, la vía de inoculación más habitual es la infección intragástrica o intravenosa, aunque éstas no sean la vía de entrada natural de *L. monocytogenes* (Cabanes y cols., 2008). Cuando se realiza una infección intragástrica, se utilizan ratones transgénicos que expresan E-cadherina humana en los enterocitos, ya que se ha comprobado que la cadherina constitutiva de los ratones presenta un cambio de un aminoácido en la posición 16 (prolina en humanos, ácido glutámico en ratones y ratas) que hace que *Listeria*, a través de InIA, sea incapaz de penetrar en las células epiteliales del intestino de ratones (Lecuit y cols., 1999; Cossart y

Toledo-Arana, 2008; Drevets y Bronze, 2008). Esta ruta intragástrica supone un modelo adecuado para el estudio de la listeriosis sistémica. Sin embargo, éste se ve limitado, ya que sólo se puede caracterizar el papel de la E-cadherina intestinal. Por el contrario, la ruta intravenosa no requiere el uso de ratones transgénicos, induce una letalidad dosis – dependiente y es más utilizada para estudios inmunológicos, donde resulta ser un modelo muy útil, tanto para el estudio de la respuesta inmunitaria innata como adaptativa, debido a que la infección es muy reproducible y a la fuerte respuesta inmunitaria inducida por *L. monocytogenes* en el hospedador (Zenewicz y Shen, 2007). Esta ruta ha servido para caracterizar la mayoría de los factores de virulencia de *L. monocytogenes* que pueden intervenir en la infección humana: como LLO, ActA y fosfolipasas (Lecuit, 2007).

El cerdo de Guinea también se utiliza como modelo de listeriosis, ya que es un hospedador natural de *L. monocytogenes* y la infección intragástrica con *Listeria* es capaz de inducir una gastroenteritis que se asemeja a la humana, gracias a la interacción de la E-cadherina de los enterocitos con la InIA de la bacteria, favorecida por la presencia de prolina en el dominio de interacción con la internalina, al igual que en la E-cadherina humana (Lecuit y cols., 1999). Sin embargo, este modelo también tiene la peculiaridad de que el receptor Met de sus células no reconoce la InIB de *L. monocytogenes* (específico para los receptores de humano y ratón) por lo que el papel de InIB, después de la translocación intestinal, no puede ser investigado mediante este modelo (Cossart y Toledo-Arana, 2008).

La infección del SNC y la placenta también se han estudiado en el ratón y en el cerdo de Guinea, pero en estos modelos la diseminación secundaria de la bacteria no es tan frecuente y eficiente como en humanos (Cabanés y cols., 2008). Por otra parte, el jerbo es un buen modelo para la listeriosis fetoplacentaria, ya que cuando una madre es inoculada por vía oral con *L. monocytogenes* se produce el 100% de mortalidad en los fetos. Esto significa que los receptores E-cadherina y Met del jerbo se unen específicamente a la InIA y InIB del patógeno, posibilitando su acceso a la placenta (O'Byrne y Utratna, 2010).

Los modelos animales desarrollados para el estudio de la infección de *Listeria* en el SNC han proporcionado, durante más de 50 años, información importante sobre los factores de virulencia de la bacteria que influyen en la patogénesis, aunque su complejidad no ha permitido la disección completa de los mecanismos celulares involucrados en la interacción bacteria – hospedador (Lecuit, 2007; Drevets y Bronze, 2008).

En general, la mayoría de los modelos animales que se utilizan para estudiar patógenos productores de meningitis se realizan con animales recién nacidos, debido principalmente a que los adultos no desarrollan fielmente la patología, y además, el sistema inmunitario de los ratones neonatos puede ser más sensible a cualquier infección, debido a la falta de madurez de dicho sistema (Domínguez-Punaro y cols., 2007). Dependiendo de la virulencia de la cepa bacteriana y del estado inmunológico del ratón, se puede conseguir que *Listeria* llegue a infectar el SNC después de una inoculación gástrica en ratones sin alteración genética, imitando la situación humana (Drevets y Bronze, 2008). Además, una inoculación intracisternal en modelos de ratas recién nacidas produce una meningoencefalitis similar a la humana, debida a la dispersión hematológica de la bacteria por el cerebro (Michelet y cols., 1999; Remer y cols., 2001). Un nuevo modelo animal sería necesario, en concreto, para el estudio de la neurolisteriosis, de manera que éste posea las mismas características para el tropismo bacteriano y desencadene la misma respuesta y cuadro clínico observado en humanos (Disson y Lecuit, 2012).

1.3.3.2. Cultivos celulares

Los modelos *in vitro* para el estudio de *L. monocytogenes* se basan en el cultivo de monocapas de líneas celulares (cultivos en dos dimensiones) o cultivos de células primarias. Estos sistemas se han utilizado para investigar los eventos que ocurren durante la invasión celular y proliferación intracelular (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006). Por ejemplo, para el estudio de la interacción de la InlA con la E-cadherina, se utilizaron células epiteliales de cerdo de Guinea, donde *L. monocytogenes* es capaz de inducir gastroenteritis, semejante a la de humanos (Lecuit y cols., 1999). Además, de una manera dependiente de InlB, es capaz de invadir células endoteliales procedentes de la vena umbilical humana y células microvasculares del cerebro humano, donde *Listeria* es capaz de sobrevivir, replicarse, moverse intracelularmente y dispersarse célula a célula (Greiffenberg y cols., 2000; Disson y Lecuit, 2012). Asimismo, en estas células endoteliales microvasculares del cerebro, se ha estudiado la respuesta genética inducida por la invasión directa de *L. monocytogenes*, gracias a la utilización de micromatrices de ADN (Wang y cols., 2011).

Aparte de estos tipos celulares, otras líneas muy utilizadas son: macrófagos murinos (líneas J774A.1 y Raw 264.7) (Dramsi y cols., 1998; Birmingham y cols., 2007), neuronas (GT1-7 y Neuro-2a) (Jin y cols., 2004; Parra y cols., 2008), fibroblastos (líneas L2071 y L929) (Lecuit y

cols., 1999; Holch y cols., 2010), hepatocitos humanos (HepG2) (Dramsi y Cossart, 2003; Vadia y cols., 2011) y células epiteliales humanas tipo enterocitos (Caco-2) (Bierne y cols., 2012).

Para estudiar el neurotropismo de *Listeria* por el SNC, además de las líneas celulares y los modelos *in vivo*, se han utilizado principalmente cultivos primarios tanto de células gliales (microglía, astrocitos, oligodendrocitos) como de células no gliales (neuronas). Estos cultivos han sido obtenidos mayoritariamente de cerebros fetales murinos y ovinos y de médula espinal de ratas (Peters y Hewicker-Trautwein, 1994; Peters y Hewicker-Trautwein, 1996; Dramsi y cols., 1998). El cultivo de neuronas primarias (de los ganglios dorsales e hipocampales) de ratón ha permitido la investigación de la ruta neural desencadenada por *Listeria* en el SNC (Jin y cols., 2001; Jin y cols., 2004).

2. INFECCIONES BACTERIANAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las infecciones bacterianas del SNC son un grupo de enfermedades altamente dañinas cuya incidencia ha aumentado durante las dos últimas décadas (Chauhan y Marriot, 2007). A pesar de la utilización de antibióticos nuevos y más eficaces en alcanzar el LCR, como algunas cefalosporinas de tercera y cuarta generación, la meningitis bacteriana produce todavía una alta morbilidad y mortalidad (Brouwer y cols., 2010). Además, hasta en un 50% de las personas que sobreviven quedan secuelas de la enfermedad a largo plazo (Weber y Tuomanen, 2007).

Las infecciones bacterianas del SNC pueden producir meningitis, encefalitis, abscesos o romboencefalitis, incluso de manera múltiple y no excluyente.

La **meningitis** o inflamación de las meninges (membranas protectoras del SNC en el parénquima cerebral y médula espinal) puede ocurrir en cuatro pasos: ataque y colonización de la bacteria, invasión, translocación de la bacteria a través de la BHE y replicación y persistencia en el LCR (Spach y Jackson, 1999). La meningitis bacteriana puede causar daños importantes en el SNC como muerte neuronal apoptótica en el hipocampo y necrótica en la corteza cerebral, y pérdida de neuronas en el ganglio espiral (Wittwer y cols., 2010; Blaser y cols., 2011). Estos daños se deben a las interacciones producidas entre la bacteria y la respuesta inflamatoria del hospedador (Coimbra y cols., 2006).

La **encefalitis** (inflamación del cerebro), en general, puede deberse a un daño directo producido por la bacteria, comúnmente en la materia gris; o a un daño ocurrido como consecuencia de la respuesta inmunitaria del hospedador que daña la materia blanca. Se produce más frecuentemente en recién nacidos y en niños.

La **meningoencefalitis** es una inflamación del cerebro asociada con meningitis.

Los **abscesos cerebrales** (exudados inflamatorios rodeados por una cápsula vascularizada) son la forma más dramática y complicada de infección craneal. La severidad de esta manifestación depende del tamaño y localización de los abscesos, virulencia de la bacteria y estado inmunológico del individuo. Su incidencia es baja (un caso por cada 10.000 admisiones en hospitales), pero si no se diagnostica a tiempo, su mortalidad puede ser hasta del 80% (Chauhan y Marriot, 2007).

La **romboencefalitis** está producida por una disfunción progresiva del tronco cerebral.

Aunque no es la causa más común de infección en el SNC, *L. monocytogenes* es diez veces más eficiente en invadir este sistema que otras bacterias neuroinvasivas, como *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* del grupo B (Drevets y Bronze, 2008). La meningitis es la infección

bacteriana más frecuente del SNC y las bacterias que causan la mayoría de casos de meningitis son: *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* K1 (Weber y Tuomanen, 2007; Brouwer y cols., 2010). Sin tener en cuenta la meningitis ocasionada por *Listeria*, en general, se considera que *Streptococcus* del grupo B (como *S. agalactiae*) y *E. coli* son los responsables de la meningitis neonatal (Nizet y cols., 1997); mientras que los responsables de la meningitis en niños y adultos son *N. meningitidis* y *S. pneumoniae* (responsables del 85% de los casos de meningitis bacteriana) (Brouwer y cols., 2006).

La meningitis causada por *H. influenzae* ha desaparecido casi completamente debido al desarrollo de una vacuna conjugada eficaz (Brouwer y cols., 2010).

Otras especies bacterianas que pueden ocasionar esporádicamente meningitis en humanos son: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Brouwer y cols., 2010). Además, la enterobacteria *Morganella morganii* puede causar ocasionalmente meningitis y abscesos cerebrales tanto en neonatos como adultos (Abdalla y cols., 2006).

Aparte de las bacterias, los hongos son también una causa importante de infecciones en el SNC, normalmente en individuos con un sistema inmunitario deficiente. Entre ellos, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* son los principales causantes de la meningitis fúngica (Kim, 2008).

Entre los parásitos que invaden el SNC de humanos, *Toxoplasma gondii*, puede producir encefalitis, ocasionando abortos o incluso la muerte del feto (Scheidegger y cols., 2005). El parásito *Trypanosoma brucei brucei* también es capaz de invadir el SNC, evadiendo el sistema inmunitario del hospedador de una manera similar a *L. monocytogenes* (Stoppini y cols., 2000; Kim, 2008).

Por otro lado, algunos virus tienen, también, una fuerte predilección por el SNC, como el virus de la inmunodeficiencia humana, citomegalovirus y virus del herpes simple que ocasionan, en su mayoría, una fuerte encefalitis (Rock y cols., 2004).

2.1. La barrera hematoencefálica

El SNC está protegido y separado de la circulación sanguínea periférica por la BHE, constituida a dos niveles, en el endotelio de los capilares cerebrales, entre la circulación y el cerebro; y en el epitelio del plexo coroideo, entre la circulación y el LCR. El plexo coroideo es un epitelio altamente vascularizado que se encuentra en los ventrículos cerebrales y produce el LCR (Tuomanen, 1996).

La BHE mantiene la homeostasis del SNC regulando y limitando la difusión de moléculas y la entrada de agentes extraños, debido a las estrechas uniones existentes entre las células endoteliales microvasculares que la componen. Además, esta barrera está compuesta por neuronas, astrocitos, pericitos y microglía (Wong y cols., 2013) (Figura 5). La interacción de las células endoteliales con estos tipos celulares y con la membrana basal constituye la unidad neurovascular, responsable del buen funcionamiento de esta barrera (Cardoso y cols., 2010). Los astrocitos y pericitos, cruciales para el desarrollo y mantenimiento de la BHE, rodean los capilares del cerebro (Bailey y cols., 2006). Los capilares del SNC presentan una actividad escasa de transporte de vesículas por pinocitosis, que se ve contrarrestada por sistemas de transporte altamente especializados que limitan la entrada de moléculas a través de la corriente sanguínea (Coureuil y cols., 2012). Por otro lado, se cree que las neuronas podrían estar regulando la función de estos capilares en respuesta a sus necesidades metabólicas. La microglía juega un papel fundamental en la respuesta inmunitaria del SNC y junto con los astrocitos, regulan el reclutamiento de las células hematógenas de la periferia (Cardoso y cols., 2010).

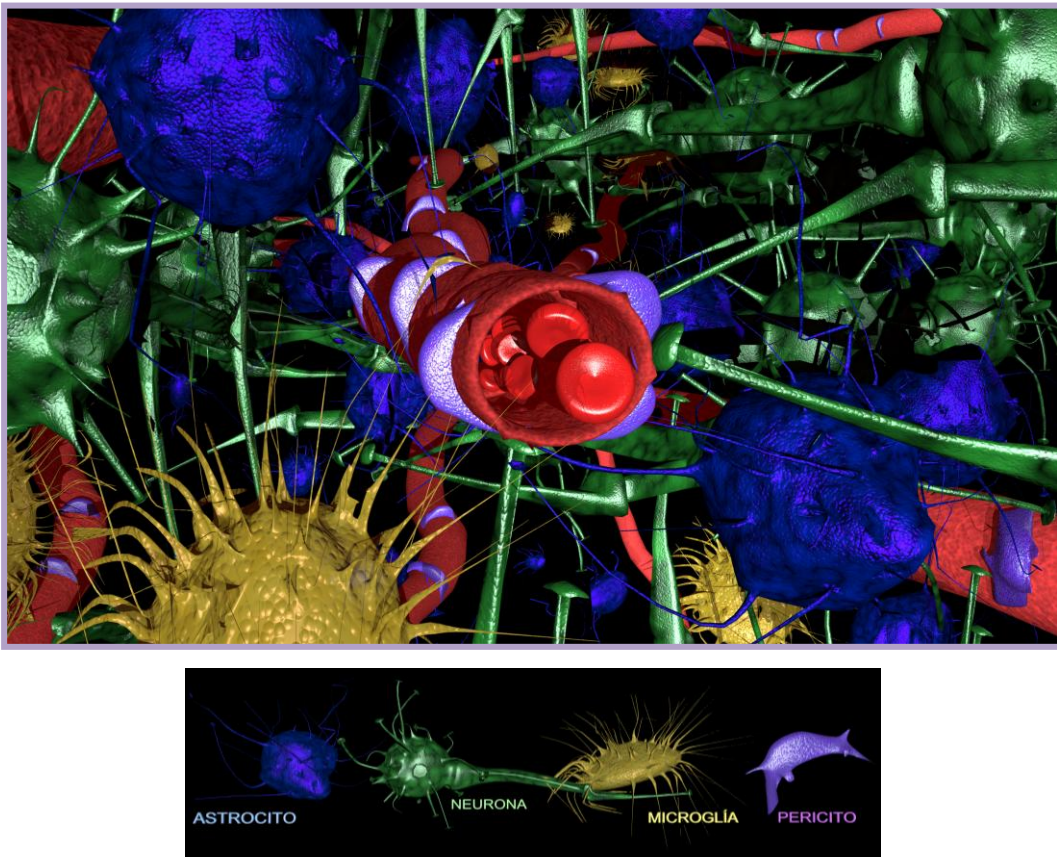


Figura 5. Representación tridimensional de la BHE con las principales células que la componen.

Para llegar al SNC, los patógenos tienen que invadir y atravesar la BHE. La ruptura de la BHE induce una rápida respuesta inmunitaria innata de las células residentes del SNC, a través de la expresión y secreción de moléculas de adhesión celular y de mediadores inflamatorios, como citocinas y quimiocinas. Esto resulta en un incremento de la permeabilidad de la BHE, que promueve el reclutamiento de leucocitos en el LCR (pleocitosis) y altera la homeostasis neural (encefalopatías) (Coimbra y cols., 2006; Kim, 2008). Además, en la respuesta inflamatoria participan especies reactivas del oxígeno y el óxido nítrico (ON) que podrían causar una citotoxicidad directa sobre la BHE (Koedel y cols., 2002; Weber y Tuomanen, 2007).

En determinadas áreas del plexo coroideo, las uniones entre las células son más débiles, por lo que la permeabilidad aumenta, y los patógenos, capaces de entrar por este epitelio, pueden alcanzar el LCR (como *S. pneumoniae*, *N. meningitis*, *H. influenzae* y *L. monocytogenes*) (Zhang y Tuomanen, 1999). Este espacio, a pesar de ser pobre en nutrientes, les resulta beneficioso porque en él evitan las defensas específicas del hospedador, como el sistema del complemento y leucocitos (Tuomanen, 1996).

2.2. Mecanismos de entrada al SNC por microorganismos

El cruce de la barrera endotelial del SNC por los patógenos, puede ocurrir, como mínimo, por tres vías (Kim, 2008) (Figura 6):

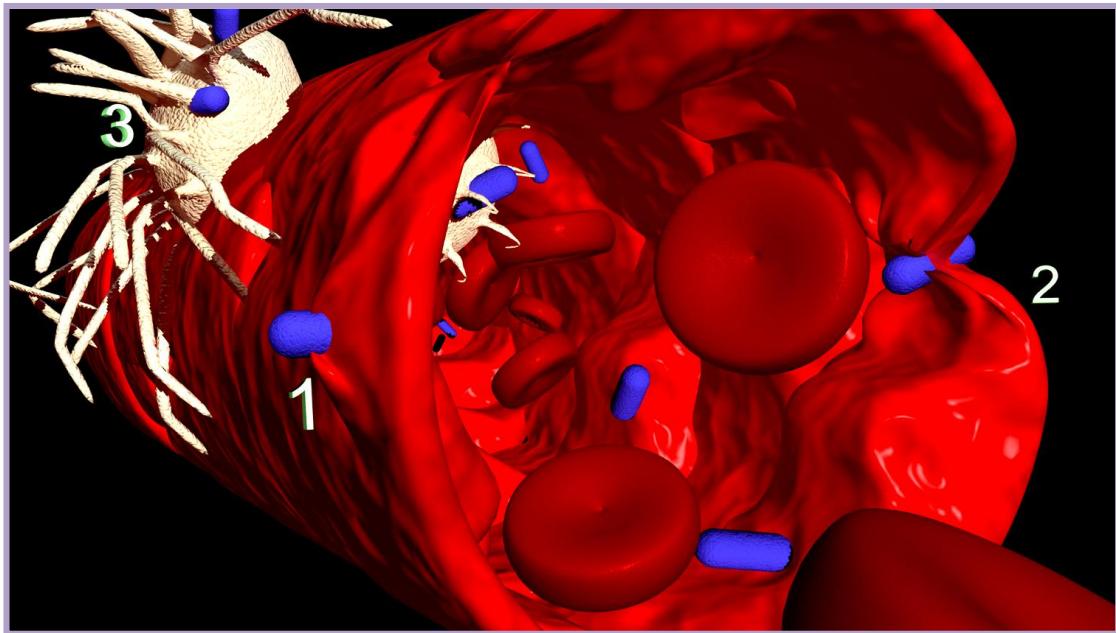


Figura 6. Principales mecanismos implicados en el cruce de la barrera endotelial de la BHE por patógenos: 1) Transcelular, 2) Paracelular, 3) Caballo de Troya.

- 1) Transcelular pasiva o inducida. Penetración microbiana a través de las células endoteliales microvasculares de la BHE sin producir ninguna alteración en las uniones existentes entre ellas.
- 2) Paracelular. La invasión microbiana ocurre entre las uniones de las células, lo que puede provocar una alteración de las mismas. Como consecuencia de este tipo de entrada, algunas citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina (IL)-1 β incrementan la permeabilidad vascular, perdiéndose la integridad de la BHE, con lo que se promueve la entrada de las bacterias (Chauhan y Marriot, 2007).
- 3) Migración facilitada por leucocitos o mecanismo del caballo de Troya. Los microorganismos alcanzan el SNC siendo transportados por fagocitos infectados en la periferia que o bien pasan entre las uniones de las células endoteliales de la BHE, o bien activan estas células con o sin infección. Esta entrada puede ser facilitada de una forma directa por los patógenos intracelulares; o bien, como consecuencia de la producción de mediadores

inflamatorios producidos por las células del SNC y por los leucocitos que entran a través de la BHE. Todos estos factores activan el endotelio e incrementan la expresión de moléculas de adhesión en los leucocitos que migran hacia el SNC (Drevets y Leenen, 2000).

A continuación, en la **Tabla 1**, se especifica la vía de entrada que utilizan algunos microorganismos para infectar el SNC.

TRANSCELULAR	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	Kim, 2008; Coureuil y cols., 2012
<i>Listeria monocytogenes</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Neisseria meningitidis</i>	Kim, 2008
<i>Rickettsia</i> spp.	Drevets y cols., 2004a
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Nizet y cols., 1997; Kim, 2008
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kim, 2008; Coureuil y cols., 2012
H: <i>Candida albicans</i>	Kim, 2008
H: <i>Cryptococcus neoformans</i>	Kim, 2008
PARACELULAR	
<i>Borrelia</i> spp.	Kim, 2008
<i>Listeria monocytogenes</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Neisseria meningitidis</i>	Coureuil y cols., 2012
<i>Treponema pallidum</i>	Kim, 2008
P: <i>Trypanosoma</i> spp.	Kim, 2008
CABALLO DE TROYA	
<i>Borrelia burgdorgeri</i>	Chauhan y Marriot, 2007
<i>Brucella</i> spp	Drevets y cols., 2004a
<i>Coxiella burnetii</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Ehrlichia chafeensis</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Listeria monocytogenes</i>	Drevets y cols., 2004a; Chauhan y Marriot, 2007; Kim, 2008
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Drevets y cols., 2004a; Kim, 2008
<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Drevets y cols., 2004a
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Chauhan y Marriot, 2007

Tabla 1 (continuación)

CABALLO DE TROYA	
<i>Salmonella</i> spp.	Drevets y cols., 2004a
<i>Streptococcus iniae</i>	Zlotkin y cols., 2003
<i>Streptococcus suis</i>	Tuomanen, 1996; Domínguez-Punaro y cols., 2007
H: <i>Cryptococcus neoformans</i>	Liu y cols., 2012
P: <i>Toxoplasma gondii</i>	Dellacasa-Lindberg y cols., 2011; Lachenmaier y cols., 2011

Abreviaturas: H, hongo; P, parásito.

Tabla 1. Mecanismo de entrada de microorganismos en el SNC.

Se ha propuesto un cuarto mecanismo de entrada a través del efecto citotóxico directo producido por componentes bacterianos, como los glicopéptidos de *S. pneumoniae* y endotoxinas de *Haemophilus* y *N. meningitidis* (Tuomanen, 1996; Coureuil y cols., 2012). Estos componentes podrían alterar la función de la BHE aumentando su permeabilidad.

2.3. Listeriosis en el SNC

La mayoría de los pacientes con listeriosis en el SNC (entre un 70 y un 90%) tienen meningitis aguda o subaguda y meningoencefalitis (Disson y Lecuit, 2012). En este sentido, *L. monocytogenes* se sitúa como la segunda o tercera causa de meningitis bacteriana (Brouwer y cols., 2006; Lecuit, 2007). Debido a su tropismo por el parénquima cerebral, entre el 5 y el 10% de las infecciones del SNC se corresponden con el desarrollo de abscesos cerebrales (Moragas y cols., 2010). La localización característica de estos abscesos es la sustancia gris subcortical, sobre todo el tálamo y los ganglios de la base, aunque también se han descrito casos localizados en la sustancia blanca del lóbulo frontal derecho (Adeva-Bartolomé y cols., 2005; Clauss y Lorber, 2008). La romboencefalitis es una manifestación inusual (aproximadamente el 10% de las neurolisteriosis) que afecta al tronco cerebral, principalmente, en adultos sanos (Bartt, 2000).

Las tasas más altas de neurolisteriosis se dan en recién nacidos de menos de 1 mes y en adultos mayores de 60 años (Clauss y Lorber, 2008). En ellos, los signos y síntomas más comu-

nes son: fiebre alta, dolor de cabeza, náuseas, rigidez del cuello, alteraciones neurológicas como confusión, letargia, estado de coma y síntomas gastrointestinales.

2.3.1. Invasión del SNC por *L. monocytogenes*

A través de estudios *in vitro* e *in vivo* en el modelo experimental de listeriosis murina, se ha comprobado que *L. monocytogenes* utiliza, como mínimo, tres mecanismos diferentes para invadir el SNC (Clauss y Lorber, 2008; Drevets y Bronze, 2008; Disson y Lecuit, 2012):

a) Invasión directa de las células endoteliales microvasculares de la BHE por diseminación hematológica de la bacteria. *L. monocytogenes* invade las células endoteliales desde la corriente sanguínea, por un mecanismo totalmente independiente de InIA (Drevets y Bronze, 2008). La diseminación hematológica de la bacteria es más frecuente en los casos de meningitis o meningoencefalitis en humanos (Dramsí y cols., 1998).

b) Invasión facilitada por fagocitos (caballo de Troya). Los fagocitos infectados con *Listeria* en la periferia migran al SNC donde se adhieren a las células endoteliales de la vasculatura del SNC y son introducidos en el parénquima cerebral por diapédesis. La transmigración lleva a que las bacterias sean fagocitadas por la microglía o infecten células residentes del SNC por la dispersión célula a célula mediada por ActA (Dramsí y cols., 1998; Chauhan y Marriot, 2007).

c) Ruta neural. La bacteria inoculada en tejidos orales se mueve en una dirección retrógrada, alcanzando el SNC por transporte intraaxonal a lo largo de nervios craneales, llegando a invadir neuronas. Esto fue identificado en los axones de los nervios periféricos de ovejas y cabras que tenían una encefalitis producida por *Listeria*, donde esta ruta ocurre con mayor frecuencia (Disson y Lecuit, 2012).

3. INMUNIDAD CONTRA LA INFECCIÓN DE *L. MONOCYTOGENES*

Tras la infección intracelular de *L. monocytogenes*, el sistema inmunitario del hospedador desencadena dos tipos de respuestas. La primera y más rápida es la respuesta inmunitaria innata, mediada por neutrófilos, macrófagos, células asesinas naturales (*natural killer*) y el sistema del complemento. La producción de mediadores solubles por parte de las células de la respuesta inmunitaria innata, como citocinas y quimiocinas, juega un papel importante en el control de la infección de *L. monocytogenes*. También, como patógeno intracelular facultativo, *L. monocytogenes* se caracteriza por producir una fuerte respuesta inmunitaria adaptativa, necesaria para la resolución completa de la infección y mediada, principalmente, por células T, detectables a los 4-5 días de la infección (Lara-Tejero y Pamer, 2004; Zenewicz y Shen, 2007). La función de las células T en la mayoría de los pacientes con listeriosis es deficiente o nula, lo que explica que sea un patógeno oportunista (Vázquez-Boland y cols., 2001).

Tanto desde el punto de vista de la respuesta inmunitaria innata como adaptativa, *L. monocytogenes* ha sido ampliamente estudiada como patógeno modelo desde 1962, cuando Mackaness demostró la capacidad de esta bacteria para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos, y que la inmunidad celular del hospedador era crítica para el control de la infección en ratones (Mackaness, 1962; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

3.1. Respuesta inmunitaria innata en el SNC

En el SNC, la microglía (macrófagos residentes del SNC) principalmente, y los astrocitos, constituyen el sistema inmunitario intrínseco del SNC, contribuyendo a través de sus receptores a la iniciación de las respuestas celulares y al reclutamiento de células del sistema periférico hacia el SNC. Las células endoteliales también contribuyen a la defensa innata del SNC, ya que como se comentó en el apartado 2.1, la estrecha unión que presentan estas células es crucial para impedir que se produzca la entrada de cualquier agente extraño en el SNC (Chauhan y Marriot, 2007). Asimismo, ante un daño o infección cerebral, los monocitos que se encuentran por la corriente sanguínea pueden alcanzar el cerebro, modificar su morfología, adquirir un fenotipo activado y diferenciarse en microglía (Djukic y cols., 2006). También las células dendríticas, neutrófilos y linfocitos T activados pueden penetrar en el endotelio vascular del cerebro y ser reclutadas al sitio de infección (Ousman y Kubes, 2012).

3.1.1. Origen y función de las células inmunitarias innatas residentes en el SNC

Las células de microglía tienen el mismo origen mesodérmico y mieloide que los macrófagos y las células dendríticas, y están distribuidas extensamente por el parénquima cerebral. Al contrario que los macrófagos, cuando están inactivas muestran una morfología altamente ramificada. Son vitales para el mantenimiento de la homeostasis en el SNC ya que durante el desarrollo normal, protegen, regulan y promueven la supervivencia, y también la regeneración y muerte neuronal en varias regiones del SNC (Ousman y Kubes, 2012). Debido a la capacidad de diferenciación y plasticidad funcional de la microglía, tras la recepción de un estímulo, ésta puede pasar en poco tiempo, de este estado vigilante de reposo a un estado activado. Si el estímulo persiste, adquieren una morfología ameboide con capacidad fagocítica (Tambuyzer y cols., 2009). De esta manera, en caso de daño o infección, la microglía se activa, prolifera, migra al sitio de infección, fagocita elementos extraños y elimina restos celulares o células muertas (Chan y cols., 2003; Mariani y Kielian, 2009; Marín-Teva y cols., 2011). Estas características confieren además a la microglía activada, la propiedad de actuar como células presentadoras de antígenos del sistema inmunitario, con una función comparable a la de las células dendríticas (Aloisi, 2001; Nakajima y Kohsaka, 2001). Por otro lado, la respuesta de la microglía debe ser controlada estrechamente mediante citocinas, factores quimiotácticos endógenos y exógenos del ambiente, para provocar el mínimo daño colateral en el SNC, producido por una hiperactivación de estas células (Tambuyzer y cols., 2009).

Los astrocitos derivados del neuroectodermo son las células no mieloides más abundantes del SNC. Están involucrados principalmente en el mantenimiento de la homeostasis y en el metabolismo energético del SNC, ya que son la principal reserva de glucógeno del cerebro. Además, constituyen un soporte estructural, metabólico y trófico para las neuronas, y en ocasiones se pueden comportan como células de defensa, jugando un papel esencial en la inmunidad innata (Jensen y cols., 2013). Asimismo, se ha comprobado que pueden inducir cambios en la morfología de la microglía (Rock y cols., 2004).

Las neuronas y los oligodendrocitos, de origen ectodérmico, también contribuyen al desarrollo de la respuesta inmunitaria durante las infecciones bacterianas del SNC. Las neuronas modulan la función de las células gliales (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) y de linfocitos T (Vergara, 2011). De esta manera, un mecanismo que podría contribuir a la supresión de las reacciones inmunológicas en el SNC sería la expresión constitutiva del ligando Fas en neu-

ronas, el cual promueve la muerte de las células inmunitarias infiltradas en el SNC (Flügel y cols., 2000).

3.1.2. Receptores celulares

Todas las células de la respuesta inmunitaria innata se activan por el reconocimiento, a través de sus receptores, de señales de peligro procedentes de patógenos, o de señales endógenas de las propias células. Éstas pueden ser detectadas por distintos tipos de receptores que se encuentran en la superficie celular, en membranas o en el interior del citoplasma, de manera que pueden coincidir en una misma célula. Estos receptores se encuentran principalmente en la microglía pero también se han descrito en astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales, células endimarias y células madre neurales (Hoarau y cols., 2011).

Los receptores tipo Toll (TLRs) son una familia de glicoproteínas transmembrana, que detectan la presencia de bacterias y/o productos microbianos. Contienen un dominio con LRR que median la unión al ligando, y una cola intracelular citosólica a través de la cual tiene lugar la transducción de señales, tras la unión de proteínas adaptadoras (Lavelle y cols., 2010). Se han identificado hasta 11 TLRs en humanos y 13 en ratones (Tambuyzer y cols., 2009). Estos receptores son considerados los iniciadores más importantes de la respuesta inflamatoria temprana del SNC frente a las infecciones bacterianas (Weber y Tuomanen, 2007). Los TLRs más importantes contra estas infecciones son: TLR2, que reconoce ácidos lipoteitoicos, lipoproteínas y el peptidoglicano de bacterias Gram positivas; TLR4, que reconoce el lípido A que presenta el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas; TLR5, que reconoce flagelina; y TLR9, responsable de la detección de ADN CpG no metilado presente en los genomas de bacterias (Kawai y Akira, 2010).

También, se ha demostrado la presencia de receptores scavenger (“basurero”), receptores de manosa y de lectinas tipo C, el receptor CD14 (correceptor del LPS, junto con el TLR4 y la proteína de unión al LPS) y receptores del complemento, entre otros, en la superficie de las células gliales (Tambuyzer y cols., 2009; Hoarau y cols., 2011).

En el citosol de las células, se encuentra la familia de receptores NLR (receptores tipo NOD) compuestos por dominios de oligomerización de nucleótidos y LRR. Se han identificado 23 miembros de esta familia en humanos y 34 en ratones (Schuppler y Loessner, 2010). Estos receptores se pueden dividir en dos subfamilias, unos caracterizados por presentar un dominio N-terminal de reclutamiento de caspasas (CARDs) asociadas a apoptosis (receptores NOD) y otros por tener un dominio de pirina (receptores NLRP). El reconocimiento intracelular del peptidoglicano bacteriano y sus componentes está mediado principalmente por los receptores NOD y NLRP3 (Hoarau y cols., 2011).

Además, varias familias de NLRs forman complejos multiproteicos de alto peso molecular conocidos como inflamasomas, junto con el adaptador ASC (proteína con dominio CARD de reclutamiento de caspasas asociadas a apoptosis) y la pro-caspasa 1. Los inflamasomas desempeñan un papel crítico en el reconocimiento de patógenos y están implicados en la regulación de la activación de la caspasa 1. La activación de esta caspasa cataliza la lisis del precursor de IL-1 β acumulado en el citosol durante la infección, produciendo la secreción de la IL-1 β , biológicamente activa, y el procesamiento de IL-18, que reclutan células inflamatorias al sitio de infección y desempeñan un papel crítico tanto en la inmunidad innata como adaptativa (Bauernfeind y Hornung, 2013). Aunque se ha demostrado la expresión de varias moléculas relacionadas con inflamasomas principalmente en la microglía, su papel en el SNC no se ha determinado por completo (Hanamsagar y cols., 2012).

3.1.3. Respuesta inmunitaria innata del SNC frente a la infección por *Listeria monocytogenes*

Diversos estudios experimentales de listeriosis cerebral muestran que una vez que *L. monocytogenes* invade el SNC, por alguno de los mecanismos citados en el apartado 2.3.1, ésta se dispersa célula a célula y se multiplica en células epiteliales del plexo coroideo, células endoteliales, macrófagos/microglía y en último caso, en neuronas. La respuesta inmunitaria innata desencadenada por los monocitos y otras células se ve potenciada, ya que a ella también contribuyen las células residentes del cerebro (Schlüter y cols., 1999).

En las células gliales, principalmente, microglía y astrocitos, *L. monocytogenes* debe ser detectada principalmente en la superficie o en los fagosomas por los TLRs, o en el citosol por los NLRs, como ocurre en los macrófagos (Corr y O'Neill, 2009). Algunos receptores del sistema

del complemento también participan en la opsonización (señalización para su eliminación) y fagocitosis de la bacteria (Chauhan y Marriot, 2007).

La señalización desencadenada tanto por los TLRs como los NLRs lleva a la activación de quinasas y de la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B, que se transloca al núcleo y produce la secreción de diferentes citocinas proinflamatorias, quimiocinas, interferones (IFN) de tipo I y moléculas coestimuladoras (Kawai y Akira, 2010). En el SNC, la microglía y astrocitos producen rápidamente estas moléculas, generando un gradiente quimiotáctico que recluta neutrófilos, monocitos y leucocitos al sitio de infección. Además, la microglía puede producir diferentes tipos de radicales libres (como ON y especies reactivas del oxígeno) que podrían agravar la toxicidad en el SNC (Tambuyzer y cols., 2009). Así mismo, la expresión de receptores de citocinas y quimiocinas que regulan inversamente a su mediador correspondiente, son importantes para el control de la respuesta del hospedador a la infección (Taüber y Moser, 1999).

La respuesta inmunitaria desencadenada por *L.monocytogenes* y otros patógenos neutrópicos debe estar bien controlada, ya que una respuesta exacerbada puede llegar a producir daño celular y tisular. Para ello, la microglía expresa y secreta factores tanto pro-inflamatorios (como IL-1, IL-6, TNF- α) que activan el reclutamiento de células inmunitarias, como anti-inflamatorios (como IL-4, IL-10, IL-1rn) que reducen la muerte neuronal (Marín-Teva y cols., 2011).

Lo expuesto en este apartado hace referencia a estudios tanto *in vivo*, en ratones *wild type* o mutantes en ciertos receptores y otras proteínas, como *in vitro*, en macrófagos, ambos infectados con *Listeria* o otros patógenos causantes, principalmente, de meningitis.

3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

Los TLRs también participan en la inmunidad adaptativa porque desencadenan señales secundarias favorables para el desarrollo de esta inmunidad, como son la activación de macrófagos y células dendríticas, la producción de linfocitos T citotóxicos y la producción de anticuerpos. Las células dendríticas son el vínculo entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, ya que se encargan de iniciar la respuesta T CD4 necesaria para el control de la infección (Zenewicz y Shen, 2007).

La inmunidad mediada por células T es la principal defensa del hospedador contra la listeriosis. Los linfocitos T citotóxicos CD8 reconocen en la superficie de las células infectadas por *L. monocytogenes* las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, donde se localizan los componentes proteicos de la bacteria degradados por la célula (Zenewicz y Shen, 2007). Estos linfocitos originan una potente respuesta inmunitaria, ya que eliminan la infección primaria de *Listeria* y generan una población de células T de memoria (Doyle, 2001). Esta inmunidad está mediada tanto por la secreción de la citocina IFN- γ (IFN de tipo II) que activa a los macrófagos, como por la lisis de células infectadas que expone las bacterias intracelulares a los macrófagos activados (Zenewicz y Shen, 2007; Schuppler y Loessner, 2010). Además, la infección con *Listeria* también induce una fuerte activación de los linfocitos T colaboradores CD4, que aunque su papel no está esclarecido por completo, se sabe que contribuyen a la supervivencia de las células CD8 de memoria (Lara-Tejero y Pamer, 2004). Al contrario que los CD8, éstos reconocen las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) (Zenewicz y Shen, 2007).

Otra subpoblación de células T CD4 que contribuye a la respuesta inmunitaria adaptativa son las células T reguladoras que limitan el efecto de otras células T a través de la secreción de las citocinas TGF- β e IL-10 (Zenewicz y Shen, 2007). Se ha estudiado, también, la presencia de células Th17, productoras mayoritariamente de la citocina IL-17, que protege al hospedador contra la listeriosis (Curtis y Way, 2009; Xu y cols., 2010).

Aunque se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales específicos para LLO protegen parcialmente frente a la infección por *Listeria* (Edelson y Unanue, 2001), la inmunidad humoral no parece jugar un papel importante (Pamer, 2004). Esto se podría explicar en parte, por la capacidad de la bacteria de diseminarse célula a célula a través de los tejidos que infecta, sin entrar en contacto con los efectores del sistema inmunitario que se encuentran en el medio extracelular. Sin embargo, se ha mostrado que los linfocitos B son importantes para el mantenimiento de las células T CD8 de memoria (Shen y cols., 2003). En el intestino, esta respuesta se caracteriza por la producción de altos niveles de IgA producida por células plasmáticas, células T reguladoras y células productoras de IL-17 (Schuppler y Loessner, 2010).

3.3. Mecanismos de evasión del sistema inmunitario

L. monocytogenes modula la transcripción de genes del hospedador a través de diversas estrategias que le permiten promover su supervivencia. Por ejemplo, para resistir a la acción de la lisozima del intestino, deacetila los residuos N-acetilglucosamina de su peptidoglicano. Además, para contrarrestar la respuesta inflamatoria generada, la LLO puede modificar las histonas de los genes inmunes activados; o bien, inducir la apoptosis de las células inmunitarias (Corr y O'Neill, 2009). Cuando *Listeria* está en el citosol, puede silenciar importantes señales de peligro para la célula hospedadora, como el factor NF-KB, impidiendo que éste alcance el núcleo para activarse (Cossart, 2011). A nivel post-transcripcional, la LLO de *Listeria* es capaz de modificar la maquinaria de SUMOilación del hospedador, ya que induce la degradación de Ubc9, un enzima esencial de este sistema. Durante la SUMOilación, SUMO (proteína modificadora de tipo ubiquitina), se une a algunas de las proteínas celulares y las modifica covalentemente, influyendo en su transcripción, proliferación, reparación del ADN, estabilidad de proteínas y respuesta a estrés. *L. monocytogenes* interfiere con este proceso celular para promover su capacidad de infección, crecimiento y persistencia (O'Byrne y Utratna, 2010; Ribet y cols., 2010).

3.3.1. Autofagia

La autofagia (también conocida como macroautofagia) es un proceso catabólico citosólico por el cual algunos componentes celulares citoplasmáticos (orgánulos, agregados de proteínas o del citosol) son secuestrados en vacuolas de doble membrana (autofagosomas) que, eventualmente, se fusionan con los lisosomas (autofagolisosomas) donde el contenido es degradado por proteasas (Kundu y Thompson, 2008). La autofagia desempeña una función esencial para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés, escasez de nutrientes y durante el desarrollo neonatal de las células eucariotas. También se sabe que protege parcialmente frente a la neurodegeneración (Hara y cols., 2006).

Además de este papel fisiológico, muchos estudios recientes reflejan la importancia y complejidad de este proceso tanto en la inmunidad innata como la adaptativa (Deretic, 2009; Deretic, 2012; Martínez-Borra y López-Larrea, 2012; Randow y Münz, 2012). En concreto, se ha demostrado que es un componente importante para la inmunidad innata frente a una variedad de agentes infecciosos, como parásitos, virus y bacterias intracelulares (Levine y cols., 2011). En

algunas bacterias intracelulares, como *M. tuberculosis* y *Salmonella enterica*, la autofagia controla a las bacterias en fagosomas intactos, en fagosomas dañados o en el citosol, eliminándolos (Gutiérrez y cols., 2004; Birmingham y cols., 2006). Por lo tanto, está ampliamente aceptado que la autofagia juega un papel clave en la detección y eliminación de bacterias intracelulares (Colombo, 2007; Mostowy, 2013). Para contrarrestar esta defensa del hospedador, *L. monocytogenes* y otras bacterias intracelulares como *Shigella*, han desarrollado mecanismos para evitarla (Ogawa y Sasakawa, 2006; Birmingham y cols., 2008).

Durante la infección de macrófagos, algunas poblaciones de *Listeria* no consiguen escapar del fagosoma y son degradadas satisfactoriamente en los fagolisosomas, en fases tempranas de la infección, por lo que se consigue limitar su crecimiento intracelular (Birmingham y cols., 2007) (Figura 7). Durante el escape de la bacteria del fagosoma y una vez que la bacteria está en el citosol, el sistema de la autofagia trata de degradar a *Listeria* (Rich y cols., 2003). Una pequeña población de *L. monocytogenes*, con una LLO ineficiente para inducir el escape del fagosoma, es capaz de replicarse dentro de vacuolas presentes en los macrófagos, denominadas SLAPs. Sin embargo, esta LLO es eficiente en bloquear la autofagia, lo que permite la replicación y supervivencia de la bacteria dentro de estos fagosomas, aunque su crecimiento se reduce. De esta manera, se establece una infección persistente, evitando nuevamente la respuesta inmunitaria (Birmingham y cols., 2008). Además, en el citosol, las bacterias evitan la autofagia a través de la movilidad basada en actina, de una manera dependiente de ActA (Figura 7). En los fibroblastos *in vitro*, la autofagia puede limitar el crecimiento intracelular de *Listeria* en fases tempranas de la infección, pero no en fases posteriores a las 6 h (Py y cols., 2007).

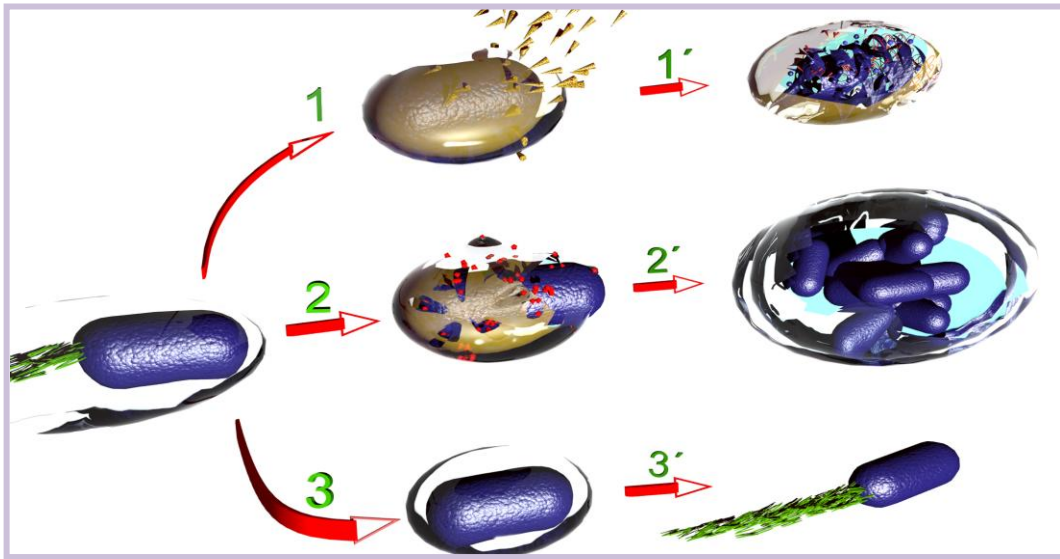


Figura 7. Interacción de *L. monocytogenes* con el sistema de la autofagia en el citosol de los macrófagos. Una vez que *L. monocytogenes* queda envuelta por un fagosoma, pueden ocurrir al menos tres situaciones: 1) Una parte de la población total de bacterias es incapaz de escapar del fagosoma, y éste se fusiona con los lisosomas (conos), lo que produce la degradación y muerte de la bacteria (1'). 2) La expresión de la LLO bacteriana (círculos rojos) produce poros en la membrana fagosomal y se bloquea la fusión con el lisosoma. Durante el escape de la bacteria del fagosoma, la autofagia se activa. Sin embargo, una población de *L. monocytogenes* con una actividad LLO baja o ineficiente no se escapa del fagosoma pero bloquea la autofagia y consigue replicarse y sobrevivir en SLAPs (2'). 3) Por último, una población de *Listeria* escapa del fagosoma y expresa ActA que evita la autofagia y favorece el crecimiento y dispersión de la bacteria a través de la movilidad basada en actina (3').

4. MODELO ORGANOTÍPICO DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Desde hace más de un siglo, existen diferentes técnicas para obtener modelos tisulares de sistema nervioso *ex vivo* (también llamados cultivos organotípicos tridimensionales (3D-OC)) (De Simoni y Yu, 2006). Este método se introduce como un modelo intermediario entre los modelos *in vivo* y las líneas celulares, ya que en ellos se mantiene la integridad bioquímica, fisiológica y estructural de las distintas regiones del SNC (Ding y Li, 2008).

El tubo rotatorio, el método de interfase de membrana y los cultivos estacionarios en placas Petri, son varias de las alternativas para obtener 3D-OC (Gähwiler y cols., 1997) (Figura 8). El primer paso para realizar cualquiera de ellos es la obtención de secciones del tejido, mediante un vibratomo. Después, éstas deben adherirse a un sustrato para su cultivo a largo plazo.

La técnica del tubo rotatorio fue introducida inicialmente por Hogue en 1947 y detallada posteriormente por Gähwiler en 1981 (Hogue, 1947; Gähwiler, 1981). Consiste en fijar el tejido a un portaobjetos de vidrio por medio de un coágulo, preparado a partir de plasma de pollo, o mediante una matriz de colágeno. El portaobjetos se pone en un tubo de ensayo de plástico que contiene 1 mililitro (ml) de medio de cultivo y se somete a rotación en un rodillo que gira a una velocidad lenta y constante (aproximadamente 10 revoluciones por minuto (rpm)), con una inclinación específica de 5°. Pasado el tiempo, el coágulo de plasma que rodea el tejido se autolisa progresivamente. La oxigenación y nutrición de los cultivos está asegurada porque la lenta rotación permite un intercambio continuo de la interfase líquido – gas entre los dos sustratos (Gähwiler y cols., 1997).

El método de interfase de membrana fue presentado por Stoppini y colaboradores en 1991 (Stoppini y cols., 1991). La característica principal de este método es que los cortes se colocan sobre filtros de membrana. Estas membranas son estériles, semipermeables, transparentes y de baja afinidad por proteínas. Debido a que la membrana es transparente, es posible comprobar el estado de los cultivos en un microscopio de luz invertida. Además, no genera autofluorescencia, lo que permite su utilización para estudios de inmunofluorescencia. La membrana se coloca en una placa de Petri o en un pocillo de una placa de 6 pocillos que contienen 1 ml de medio. Los explantes se mantienen en la interfase entre el aire y el medio de cultivo, ya que el oxígeno lo obtienen desde arriba y los nutrientes difunden desde la parte inferior a través de la membrana. Con el tiempo, los cortes se aplanan y se unen fuertemente a la membrana, a través de proyecciones celulares que se enraízan firmemente en ella.

La preparación y el equipo de esta técnica son sencillos, por lo que se utiliza como una alternativa a los cultivos del tubo rotatorio (De Simoni y Yu, 2006; Gogolla y cols., 2006). Además, debido a la ausencia de coágulo, los experimentos morfológicos y electrofisiológicos son más fáciles de realizar (Stoppini y cols., 1991).

Para el mantenimiento de cultivos organotípicos en placas, el tejido se coloca directamente en placas de plástico recubiertas por colágeno o en placas de Petri que contienen una parte inferior permeable a los gases, embebidas en geles tridimensionales de colágeno. La oxigenación de los cortes cultivados por este método es limitada, por lo que existe cierto riesgo de necrosis en el centro del tejido (Gähwiler y cols., 1997).

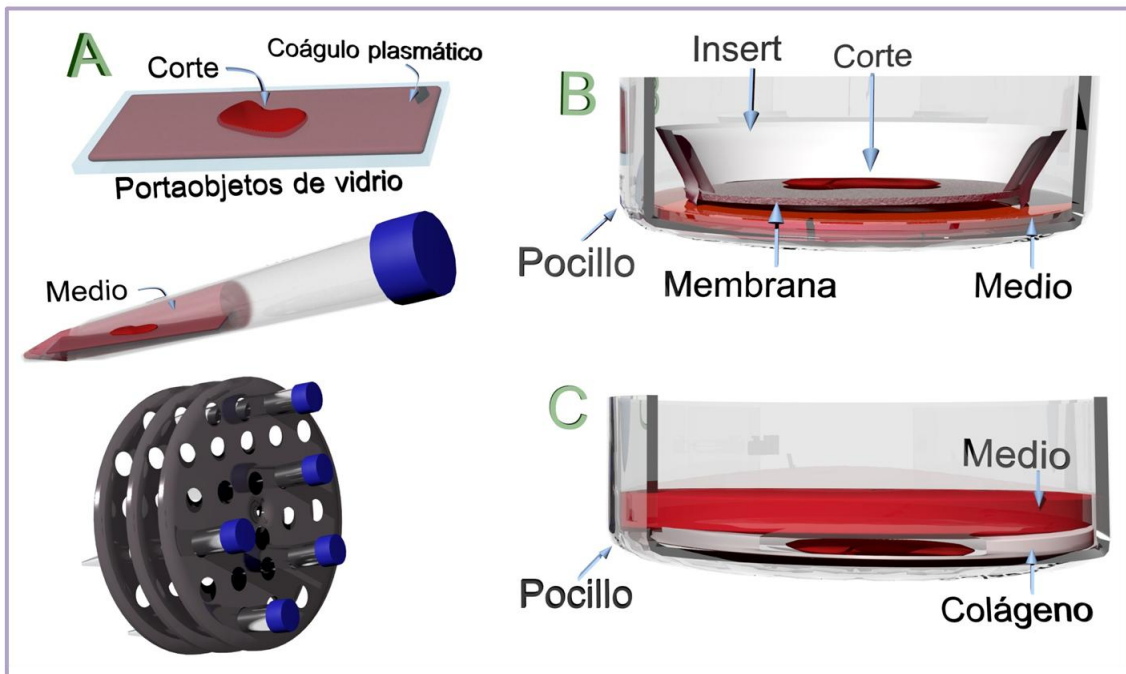


Figura 8. Procedimientos para la obtención de cultivos organotípicos. A, Cultivo del tubo rotatorio. Vista de un corte embebido en un coágulo plasmático sobre un portaobjetos de vidrio. Éste se coloca en un tubo de plástico para su cultivo en rotación. B, Método de interfase de membrana. Vista de un explante sobre un filtro de membrana colocado en un pocillo con medio de cultivo. C, Cultivo en placas. El corte queda embebido en colágeno, que recubre directamente el fondo del pocillo.

En todas las técnicas, la organización tridimensional organotípica del tejido *in vivo* (superficie celular apical, basal y lateral), las proyecciones axonales y la diferenciación de las células nerviosas están muy bien preservadas. Estas condiciones se consiguen al cultivarlos en un sustrato y una temperatura estables, con el medio de cultivo adecuado y una oxigenación suficiente (Stoppini y cols., 1991; Gähwiler y cols., 1997). La estructura organotípica de los tejidos

preserva el microambiente cerebral, lo que facilita la visualización e identificación de todos los tipos celulares representativos del cerebro. Sin embargo, este grado de organización depende de la edad de los animales utilizados para el cultivo. Generalmente, se utilizan roedores de 8 a 15 días, en los que la citoarquitectura del tejido ya se ha establecido en la mayoría de las áreas del cerebro (Gähwiler, 1981; Stoppini y cols., 1991).

A continuación, en la **Tabla 2** se presentan algunas de las diferencias que existen entre las técnicas a tener en cuenta a la hora de elegir una de ellas para la obtención de explantes organotípicos.

	<u>Tubo rotatorio</u>	<u>Interfase de Membrana</u>	<u>Cultivo en placas</u>
Espesor	De 400 a 50 μm , aspecto de monocapa	Adelgazamiento intermedio (de 400 a 150 μm)	Similar al original
Supervivencia	Varias semanas a meses	Varias semanas a meses	Pocos días
Utilidad	Experimentos que requieren grandes cantidades de tejido, condiciones ópticas optimas y acceso a células individuales	Observación de la estructura tridimensional, estudios morfológicos y bioquímicos a largo plazo	Ensayos de tiempos cortos y de estimulación de la actividad eléctrica

Tabla 2. Principales diferencias entre los distintos métodos de obtención de cultivos organotípicos.

Tras su obtención, se ha demostrado que los cultivos 3D-OC son viables durante varios meses, por lo que con ellos se puede realizar el estudio de procesos que requieren una supervivencia a largo plazo, como la neurogénesis y el daño cerebral (Noraberg y cols., 2005; Lossi y cols., 2009), la neurodegeneración producida durante la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson (Huuskonen y cols., 2005; Cho y cols., 2007; Ding y Li, 2008), estudios de regeneración del SNC a partir de células madre transplantadas (Kim y cols., 2011), infecciones con patógenos a largo plazo (Stoppini y cols., 2000) o expresión de proteínas a partir del uso de vectores virales (De Simoni y Yu, 2006).

Para el estudio de infecciones con distintos microorganismos, las monocapas celulares carecen de la complejidad y fisiología de los tejidos que un patógeno se encuentra en la situación *in vivo*, mientras que la utilización de animales vivos requiere sacrificar un gran número para

obtener datos suficientes y fiables y es una técnica más complicada, laboriosa y costosa. Por el contrario, los modelos tisulares se han introducido como una herramienta intermedia muy útil para el completo entendimiento de las interacciones entre los patógenos y el tejido, durante el desarrollo de una infección en la que además, se pueden definir los parámetros de estudio (Richter-Dahlfors y cols., 2012). Por este motivo, los cortes de cerebro *ex vivo* están utilizándose para estudiar infecciones experimentales del SNC. Algunos patógenos que se han utilizado son: los parásitos *Trypanosoma brucei brucei* (Stoppini y cols., 2000), *Neospora caninum* (Müller y cols., 2002; Vonlaufen y cols., 2002), *Toxoplasma gondii* (Scheidegger y cols., 2005) y *Naegleria fowleri* (Gianinazzi y cols., 2005); la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (Schmidt y cols., 2001; Gianinazzi y cols., 2004) y algunos virus neurotrópicos como el virus del herpes simple tipo 1 (Braun y cols., 2006; Cohen y cols., 2011) y el virus del sarampión (Stubblefield Park y cols., 2011). También, se ha analizado la infección cerebral producida por priones en cultivos organotípicos de cerebelo (Falsig y cols., 2008). Estos estudios se han basado en los métodos del tubo rotatorio e interfase de membrana, descritos previamente. En ellos se realizan dos tipos de infecciones diferentes: infección con el patógeno en la parte superior del tejido, o inoculación del patógeno en el medio de cultivo. La primera de ellas, se suele realizar para el estudio de patógenos que atraviesan fácilmente la BHE; mientras que para los patógenos que no atraviesan la BHE, pero sus productos extracelulares inducen daño cerebral, se infecta de manera indirecta, de modo que el patógeno no entre en contacto directo con el tejido pero sus productos extracelulares sí. Además, los explantes permiten realizar de manera satisfactoria técnicas de biología molecular, inmunofluorescencia, microscopía de dos fotones, microscopía electrónica, microscopía láser confocal, electrofisiología, farmacología, estudios inmunohistoquímicos, RNA de interferencia y proteómica (Stoppini y cols., 2000; De Simoni y Yu, 2006; Peña, 2010). La forma de infección y las técnicas utilizadas en estos estudios se recogen en la **Tabla 3**.

Parásito	Origen del tejido	Forma de infección	Técnicas utilizadas
<i>Naegleria fowleri</i>	Rata	Superficie del tejido	Inmunohistoquímica, tinción de Nissl, PCR, PCR cuantitativa (qPCR)
<i>Neospora caninum</i>	Rata	Superficie del tejido	Inmunohistoquímica, qPCR en tiempo real (qRT-PCR), microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (TEM)

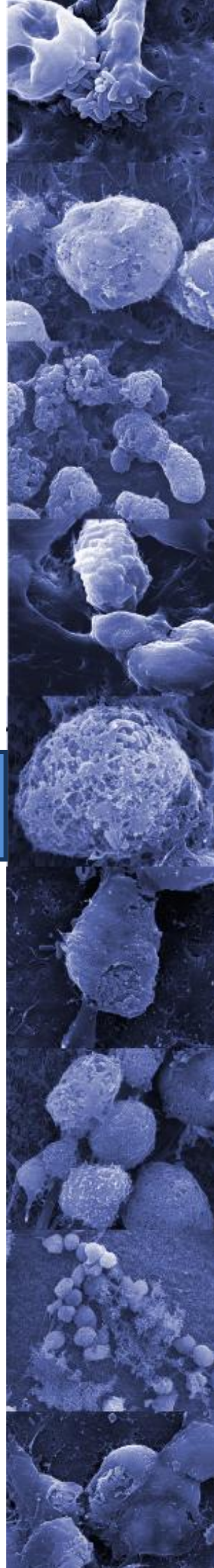
Tabla 3 (continuación)

Parásito	Origen del tejido	Forma de infección	Técnicas utilizadas
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ratón	En el medio de cultivo	Inmunohistoquímica, tinción de Nissl, TEM, qPCR
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Rata	Superficie del tejido	Inmunofluorescencia, microscopía óptica, TEM, electrofisiología
Virus	Origen del tejido	Forma de infección	Técnicas utilizadas
Virus del herpes simple tipo 1	Ratón	En el medio de cultivo	Ensayos de viabilidad, muerte celular, histología, inmunofluorescencia, luciferasa, transfección, PCR inversa
Virus del sarampión	Ratón	Superficie del tejido	Inmunohistoquímica, microscopía confocal, qRT-PCR
Bacteria	Origen del tejido	Forma de infección	Técnicas utilizadas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rata	En el medio de cultivo	Ensayos de daño y muerte celular, inmunohistoquímica
Priones	Origen del tejido	Forma de infección	Técnicas utilizadas
Proteína de priones, PrP ^{Sc}	Ratón	En el medio de cultivo	Ensayos de viabilidad y muerte celular, toxicidad, inmunohistoquímica, qPCR, Western blot, transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), TEM

Tabla 3. Cuadro resumen de las técnicas y forma de infección de algunos estudios de cortes de cerebro *ex vivo* infectados con distintos patógenos.

Además de los cultivos organotípicos tisulares, se utilizan modelos tridimensionales de agregados celulares para el estudio de enfermedades infecciosas y el desarrollo de fármacos, aunque estos modelos no reproducen por completo la heterogeneidad tisular (Nickerson y cols., 2007; Barrila y cols., 2010).

Justificación y objetivos



Se han identificado una amplia variedad de microorganismos capaces de producir daños cerebrales en humanos. Entre ellos, la bacteria *Listeria monocytogenes* presenta un especial tropismo por el SNC, donde causa meningitis, encefalitis, meningoencefalitis, romboencefalitis y abscesos cerebrales (Disson y Lecuit, 2012). A diferencia de otras infecciones, el tratamiento antibiótico de los abscesos cerebrales asociados o no a meningitis, no está bien definido, lo que explica en parte su mal pronóstico y elevada mortalidad en los pacientes con abscesos por *Listeria* (Moragas y cols., 2010).

Hasta hace poco tiempo, el estudio de las enfermedades infecciosas en el cerebro se basaba casi exclusivamente en la utilización de modelos animales o de cultivos celulares. Actualmente, la utilización de modelos organotípicos tridimensionales de SNC ha permitido caracterizar mejor algunos de estos procesos infecciosos. Dichos modelos imitan las características morfológicas y funcionales del tejido *in vivo*, manteniendo una organizada arquitectura celular tridimensional y todas las proyecciones axonales (Stoppini y cols., 1991).

El estudio de la interacción de *L. monocytogenes* con un sistema tisular que posea un nivel de complejidad elevado, podría aportar más ventajas que el modelo celular y menos inconvenientes que el modelo animal, y por lo tanto ser muy útil para estudiar una gran variedad de vías biológicas relevantes durante la neurolisteriosis. De esta manera, la respuesta inmunitaria innata provocada por las células residentes del SNC frente a una infección, podrá ser estudiada en detalle. Este conocimiento es de un gran interés clínico, ya que potenciales mediadores pro y antiinflamatorios podrían ser utilizados como diana terapéutica.

En este contexto tisular, la principal línea de defensa es proporcionada por la microglía (fagocitos residentes en el parénquima del SNC) y por lo tanto, la observación mediante microscopía de la actividad fagocítica de la microglía puede ayudar a caracterizar el ciclo de infección de *Listeria* en el cerebro.

Además, durante su localización en el citosol, *L. monocytogenes* ha desarrollado estrategias para evadir distintos mecanismos de defensa del hospedador, como la autofagia (Birmingham y cols., 2007). Sin embargo, la mayoría de los estudios *in vitro* de las interacciones entre los patógenos y la ruta de autofagia utilizan líneas celulares, por lo que el papel que puede jugar esta ruta en el tejido cerebral no está esclarecido. En el SNC, los trabajos publicados sobre autofagia se han centrado más en su participación en procesos de degeneración de neuronas y astrocitos, en los que se acumulan autofagosomas debido al bloqueo de su fusión con los lisosomas, por lo que la vía de la autofagia también se bloquea (Di Malta y cols., 2012). Por otro lado, esta ruta también desempeña un papel neuroprotector ya que se ha demostrado que regula la apoptosis en cultivos organotípicos de cerebelo de ratón, contribuyendo a la supervi-

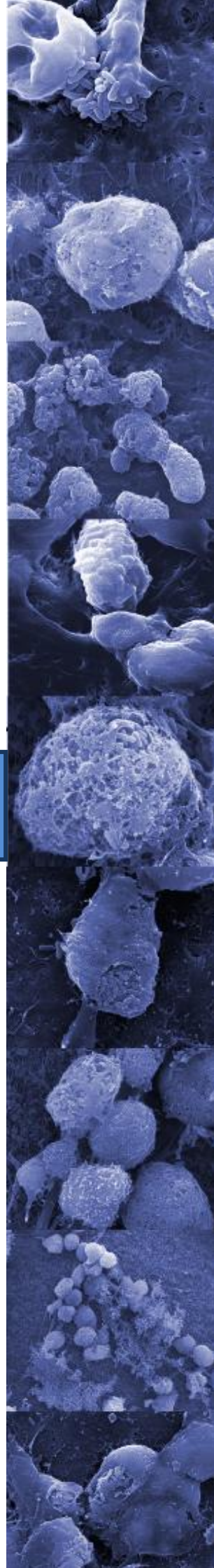
vencia neuronal (Lossi y cols., 2010). En el contexto de la inmunidad, la autofagia elimina patógenos intracelulares de una forma análoga a como lo hace con orgánulos celulares dañados o defectuosos. En modelos murinos de encefalitis, se ha demostrado que algunos virus neurotróficos interfieren con la maquinaria autofágica en el SNC contribuyendo directa e indirectamente a la neurodegeneración (Hara y cols., 2006; Rosello y cols., 2012). Además, se sabe que *L. monocytogenes* también interactúa con la maquinaria autofágica, por lo que resulta importante conocer la función de esta ruta en la eliminación bacteriana por la microglía, durante la neurolisteriosis.

En base a lo anterior, los objetivos específicos que nos planteamos en esta Tesis fueron los siguientes:

- 1) Poner a punto en nuestro laboratorio un modelo organotípico de SNC para realizar infecciones experimentales con *L. monocytogenes*.
- 2) Estudiar los eventos celulares que tienen lugar en dicho modelo tras las infecciones experimentales con *L. monocytogenes*, mediante distintas técnicas de microscopía.
- 3) Evaluar la expresión transcripcional de genes de respuesta inmunitaria innata y autofagia que pueden estar implicados en las distintas fases de la infección por *L. monocytogenes* en este modelo.
- 4) Aislar y cultivar células primarias de microglía a partir de los cultivos organotípicos, para analizar el tropismo celular de *Listeria* y la respuesta inmunitaria desencadenada tras infecciones *in vitro*.

A modo de resumen, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es utilizar un sistema de cultivo organotípico como modelo para obtener información sobre la compleja respuesta del SNC a las infecciones bacterianas. La información morfológica y genética obtenida tras el estudio de las interacciones entre el tejido y la bacteria, podría servir para el desarrollo de estrategias innovadoras para la neuroprotección contra el daño cerebral causado por patógenos u otros agentes.

Material y métodos



1. CEPAS BACTERIANAS

A continuación, se muestran las cepas bacterianas utilizadas durante el desarrollo de este trabajo (Tablas 4 y 5):

Número	Cepa (HUMV)•	Origen
1	240	Sangre
2	2580	Sangre
3	6993	Sangre
4	2986	Exudado oído medio
5	3029	Exudado endometrial
6	6044	Sangre
7	3292	Placenta
8	2016	Sangre
9	460	Líquido ascítico/ peritoneal
10	476	Sangre
11	4771	Líquido cefalorraquídeo
12	3115	Frotis faríngeo
13	930	Sangre
14	2362	Pared aorta
15	4251	Líquido cefalorraquídeo
16	5426	Frotis faríngeo
17	832	Sangre
18	4492	Sangre
19	3243	Sangre

•Todas las cepas clínicas fueron aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV).

Tabla 4. Lista de las cepas clínicas de *L. monocytogenes* utilizadas.

	Origen
<i>Listeria monocytogenes</i> 10430S	Cedidas por el Dr. Javier Pizarro-Cerdá (Instituto Pasteur, Paris)
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD serovar 1/2a, expresando la GFP en el pNF8	
<i>Listeria monocytogenes</i> BUG 2132: Δ Hly	
<i>Listeria monocytogenes</i> BUG 2140: Δ ActA	
<i>Listeria innocua</i>	
<i>Rhodococcus equi</i> (ReB3 y ReB9)	Cedidas por el Dr. Marcio G. Ribeiro (Brasil)

Tabla 5. Otras cepas bacterianas utilizadas.

1.1. Condiciones de cultivo y conservación

Tanto las cepas de *L. monocytogenes* como de *R. equi* se cultivaron en el medio de cultivo BHI que está compuesto de los siguientes elementos (Tabla 6):

Laboratorios Conda S.A.	
Fórmula en gramos (g) por litro de agua destilada	
Peptona de gelatina	10 g
Infusión de corazón de res	10 g
Infusión de cerebro de ternera	7,5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Dextrosa	2 g

Tabla 6. Composición del medio de cultivo BHI.

Por otro lado, en medio sólido, las cepas se cultivaron indistintamente, tanto en placas de AS [Agar Columbia + 5% de sangre de cordero; bioMérieux] como de BHI Agar (BHIA) [Agar Bacteriológico Europeo de Laboratorios Conda S.A.; 15 g por litro de agua destilada].

Para el cultivo de *L. monocytogenes* EGD que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en un plásmido con resistencia a eritromicina, se utilizó BHI líquido (BHIB) o sólido (BHIA) suplementados con este antibiótico [BioChemika], en una concentración final de 5 microgramos/mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

La temperatura a la que se llevaron a cabo los experimentos fue de 37°C; tanto para la incubación de las bacterias en placa como en el shaker (agitación).

Para la conservación de las bacterias, una vez cultivadas en medio de cultivo líquido, se congelaron a -80°C en viales, añadiendo un 20% de glicerol (v/v) [Merck].

1.2. Caracterización de las cepas de *Listeria*

- Extracción de ADN

Para extraer el ADN genómico (ADNg) de las bacterias se realizó una disrupción mecánica mediante la utilización de esferas de vidrio [Sigma], para liberar los ácidos nucleicos contenidos en el citoplasma bacteriano, de acuerdo al protocolo descrito por Fujimoto y colaboradores (Fujimoto y cols., 2004). Las cepas clínicas de *L. monocytogenes*, las cepas de colección *L. innocua*, *L. monocytogenes* EGD-GFP y la cepa *R. equi* ReB3 se cultivaron en placas de AS. Varias colonias de cada cepa se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS)¹ 1×, en tubos Eppendorf de 2 ml. Se añadieron en cada tubo Eppendorf unas esferas de vidrio y se agitaron fuertemente en vórtex para romper las bacterias. Tras esto, los tubos se centrifugaron y después, se recogió el sobrenadante que contenía el ADN bacteriano, pasándolo a un nuevo tubo Eppendorf. El ADN aislado de esta forma se congeló a -20°C para su mejor conservación.

- Electroforesis en geles de agarosa

Para verificar la presencia de ADN tras su extracción, se prepararon geles de agarosa [Sigma] al 1% en Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE)² 0,5×. Para la tinción del ADN se añadió el colorante SYBR® Safe (concentrado 10.000× en Dimetilsulfóxido) [Invitrogen]. A cada muestra se le añadió Buffer de carga³ 10× y se cargó en cada pocillo del gel. Las bandas de ADN se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un lector de geles Gel Doc™ XR+ Molecular Imager [Bio-Rad] a través del programa informático de análisis de imágenes Quantity One [Bio-Rad].

¹Fórmula para 1 litro de PBS → 8,5 g de Cloruro sódico [Merck], 1,2 g de Fosfato disódico [Merck], 0,23 g de Fosfato disódico hidratado [Merck]. pH 7,5.

²TBE 0,5× → preparado a partir del Buffer TBE 10× [AppliChem].

³Fórmula para Buffer de carga 10× → 30% de glicerol, 0,1 M EDTA [Sigma], 1% de SDS al 20% [Merck], 0,25% de azul de bromofenol [Merck].

- PCR de los genes LLO y ARNr 16S

Para amplificar el gen de la LLO se usaron los primers específicos a una porción del gen de la hemolisina (hly), descritos en Kushwaha y Muriana, 2009, con las siguientes secuencias:

Forward LL5 : 5'-AACCTATCCAGGTGCTC-3'

Reverse LL6 : 5'-CTGTAAGCCATTTTCGTC-3'

Estos primers amplifican un fragmento de 267 pb.

Por otro lado, para amplificar el gen del 16S, se utilizaron primers universales con las siguientes secuencias:

Forward PA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Reverse PL06: 5'-GCGCTCGTTGCGGGACTTAACC-3'

Con estos primers se amplifica el ARN ribosómico (ARNr) 16S parcialmente, generándose un amplicón de 1000 pb.

Los primers y el resto de componentes necesarios para la mezcla se prepararon en tubos de PCR, tal y como se indica en la **Tabla 7**. Para ello, se utilizó el kit GoTaq® Flexi [Promega] que contiene el tampón incoloro GoTaq® Flexi 5×, una solución 25 milimolar (mM) de cloruro de magnesio (MgCl₂) y la enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U/μl. Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) [GE Healthcare], disponibles a una concentración de 20 mM, se diluyeron ½ para usarlos a una concentración final de 10 mM.

	Cantidad (LLO)	Cantidad (16S)
Buffer Taq Polimerasa 5×	10 μl	10 μl
dNTPs 10 mM	1 μl	1 μl
Primer 5 μM	1,5 μl	2 μl
Primer 5 μM	1,5 μl	2 μl
MgCl ₂ 25 mM	3 μl	3 μl
H ₂ O	28 μl	28 μl
ADN molde	5 μl	4 μl
Taq (5U)	1 μl	1 μl

Tabla 7. Composición de la reacción de PCR para la amplificación de los genes LLO y 16S.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler pro S [Eppendorf]. En él se diseñó un programa con los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial para provocar la separación de la doble cadena de ADN en ADN de cadena sencilla.
2. Desnaturalización cíclica, sirve de mantenimiento de la desnaturalización inicial.
3. Anillamiento. Etapa en la que los primers se unen a las cadenas de ADN separadas en los pasos anteriores.

4. Extensión de las cadenas a las que se han unido los primers gracias a la actividad de la polimerasa.
5. Repetición de los pasos 2,3 y 4 (n veces) para conseguir muchas copias del fragmento de interés.
6. Extensión final para finalizar la elongación de los productos de PCR generados durante el último ciclo de extensión.
7. Enfriamiento de los tubos de PCR a 4°C para su conservación.

A cada paso se le asignó una temperatura y tiempo que se recogen en las **Tablas 8 y 9**:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 minutos
2	94°C	1 minuto
3	55°C	1 minuto
4	72°C	2 minutos
5	Pasos del 2 al 4	30 ciclos
6	72°C	5 minutos
7	4°C	Ilimitado

Tabla 8. Programa de PCR para la amplificación del gen LLO.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 minutos
2	94°C	1 minuto
3	50°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	Pasos del 2 al 4	30 ciclos
6	72°C	10 minutos
7	4°C	Ilimitado

Tabla 9. Programa de PCR para la amplificación del gen ARNr 16S.

La amplificación se confirmó por la visualización de los productos de PCR (267 pb y 1000 pb) en un gel de agarosa al 1,5 y 1%, respectivamente, realizado de la misma manera que se describió en el apartado anterior, para la comprobación de la extracción del ADN bacteriano.

- Secuenciación parcial de ADN y análisis

Los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación parcial del gen 16S se cuantificaron en un nanodrop [NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Thermo Scientific] para conocer la concentración del ADN. Tras ajustar cada uno a la concentración de 15 ng/μl, se prepararon para su secuenciación. Para ello, se utilizó el kit de secuenciación “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle” [GE Healthcare] diseñado para una secuenciación del ADN de alto rendimiento, sensible y robusta, obtenida a través del sistema de análisis MegaBACE (Dolník, 1999). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó la reacción de secuenciación en el termociclador, incluyendo en ella uno de los primers usados para la reacción de PCR y los productos de PCR a secuenciar. Durante esta reacción, las terminaciones de desoxinucleótidos (ddG, ddA, ddT y ddC) quedan marcadas con dos colorantes (fluoresceína y uno de 4 derivados posibles de la rodamina) para la detección automática del ADN a través de la transferencia de energía entre los colorantes (la fluoresceína actuaría como colorante donador y la rodamina como aceptor). Tras la reacción, los productos se precipitaron para eliminar los terminadores marcados con colorante no incorporados al ADN. Finalmente, las muestras se disolvieron en una solución de carga para la separación y detección en el secuenciador.

Para la secuenciación del ADN por electroforesis capilar, se utilizó el secuenciador automático MegaBACE 1000 [Molecular Dynamics]. Durante la secuenciación, cada colorante aceptor emite luz y una característica longitud de onda para la detección e identificación de las secuencias de nucleótidos del fragmento de ADN.

El programa informático que se utilizó para el análisis de las secuencias fue el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), capaz de encontrar las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema y calcular la significancia estadística de los resultados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- Prueba de hemólisis Christie, Atkins y Muench-Petersen (CAMP)

El test de CAMP es considerado un criterio taxonómico útil para diferenciar entre cepas hemolíticas de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* no patógenas para humanos como *L. ivanovii*, y cepas no hemolíticas como *L. innocua* (Fernández-Garayzábal y cols., 1996). La

reacción hemolítica se produce como consecuencia de la lisis sinérgica de eritrocitos provocada por las cepas que crecen de manera adyacente en la superficie del medio agar sangre (McKellar, 1994).

Para realizar esta prueba, se cultivaron todas las cepas clínicas de *L. monocytogenes*, además de *L. monocytogenes* EGD-GFP, *L. innocua*, y las cepas ReB3 y ReB9 de *R. equi* en placas de AS. El día del ensayo, se realizó una estría vertical en placas de AS con las cepas de *R. equi*, y a los lados, en estrías rectas, 4 ó 5 cepas de *Listeria*, sin contacto directo entre ellas. Tras 48 h de incubación a 37°C, se observó la hemólisis producida en las placas de AS. La prueba se hizo por triplicado.

- Curva de crecimiento bacteriano

Se partió de cultivos frescos en AS y se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo de cultivo BHI. En los matraces, se inocularon varias colonias de la bacteria problema, y se incubaron en agitación (175 rpm) a 37°C hasta las 72 h (3 días). A diferentes tiempos, se cuantificó su densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) con un espectrofotómetro Biophotomer [Eppendorf] y, también, el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFCs/ml), para lo cual se realizaron diluciones seriadas en PBS que se sembraron mediante perlas de vidrio [Afora] en placas de BHIA. Los recuentos se realizaron por duplicado y se presentaron como la media \pm la desviación estándar.

- Producción de anticuerpos policlonales contra *L. monocytogenes*

Los Ac anti-*L. monocytogenes* se obtuvieron en las dependencias de la Unidad de Reproducción, de la Facultad de Veterinaria, en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Los experimentos que se describen a continuación, cumplieron con la norma 86/609/EU de la Unión Europea y las normas de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (Gobierno de España), para el manejo de animales de experimentación.

Las cepas de *L. monocytogenes* 10430S, HUMV-3292 y HUMV-4771 se cultivaron durante 24 h a 37°C en BHIB. Cien ml de los cultivos se centrifugaron a 2000 g durante 30 min a 4°C en una centrífuga 5810R [Eppendorf]. El pellet resultante de cada cultivo se resuspendió en un matraz con PBS y formaldehído comercial [Fluka] al 1% (v/v). Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 16 h a 4°C. La suspensión de bacterias muertas se centrifugó y el pellet se lavó 3 veces con PBS. En el lavado final, el pellet se resuspendió en 4 ml de PBS y 1 ml de esta suspensión se mezcló con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund [Sigma]. Con esta mezcla, se inoculó subcutáneamente a 2 conejos de la raza New Zealand. A las dos semanas, se realizó una segunda

inyección de la misma manera. Pasadas 8 semanas de la primera inyección, los conejos se anestesiaron mediante ketamina y xilacina y se procedió a la extracción de la sangre mediante punción cardíaca. Después de la extracción, los conejos se sacrificaron mediante sobredosis de barbitúricos. El suero se separó del coágulo sanguíneo por centrifugación a 2000 g durante 30 min a 4°C y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20°C.

- Tinción de las bacterias para inmunofluorescencia

Se siguió un protocolo de tinción rápida para inmunofluorescencia descrito por Padilla y colaboradores para probar los anticuerpos primarios policlonales producidos en conejos (Padilla y cols., 2009).

Se partió de cultivos bacterianos en placas de AS. Se colocaron cubreobjetos de 15 mm de diámetro [Microscopic Glass Factory] en pocillos de placas de 24 pocillos [Nunc]. Sobre cada cubreobjetos, se añadió una gota de PBS y se resuspendieron en ella de dos a tres colonias bacterianas. Se dejaron secar en campana, y posteriormente se fijaron a temperatura (T^a) ambiente con paraformaldehído comercial (PAF) [Electron Microscopy Sciences] frío al 3,4% en PBS. A continuación, se procedió a realizar la inmunofluorescencia. Para ello, las preparaciones se incubaron durante 20 min con cada Ac policlonal α -*Listeria* (diluidos 1:1000 en albúmina de suero bovino (BSA) [Sigma] al 1% en PBS), y otros 20 min, con los Ac secundarios Alexa Fluor 488 (verde) o Alexa Fluor 594 (rojo) obtenidos de cabra (policlonales anti-IgG de conejo [Invitrogen]), ambos a una concentración de 1:1000 en BSA al 1%. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos [Knittel glass] con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield™ [Sigma Aldrich] que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Todas las preparaciones se examinaron por microscopía de epifluorescencia usando un microscopio Zeiss Axiovert 200.

Las imágenes se adquirieron usando una cámara digital Zeiss AxioCamHRc incorporada en el microscopio. Para la fusión y tratamiento de las imágenes se utilizó el programa Photoshop CS3 (Adobe).

2. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.1. Realización de cultivos organotípicos tridimensionales (3D – OC)

La obtención de los cultivos 3D-OC se realizó en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Cantabria. El cuidado animal y todos los procedimientos experimentales cumplieron con la Legislación española y la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas basada en la norma 86/609/EU sobre la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”.

Para obtener cultivos organotípicos de SNC con alta viabilidad sobre filtros de membrana, se utilizó el método de “interfase”, introducido por Stoppini y colaboradores (Stoppini y cols., 1991) y los protocolos de De Simoni y Yu (De Simoni y Yu, 2006) y Gogolla y colaboradores (Gogolla y cols., 2006), basados en este mismo método.

Para empezar, se preparó en la campana todo el material necesario para llevar a cabo la técnica: cuchillas, tijeras, pinzas, placas de Petri de distintos tamaños, pinceles, pipeta y puntas de 1000, placas de 6 pocillos [SPL Life Sciences] y filtros Millipore de 0,4 μm y 30 mm de diámetro [CM Organotypic tissue inserts Millicell] (Figura 9). Se esterilizó el material con etanol al 70% y posteriormente también, en un esterilizador de microesferas de vidrio.



Figura 9. Material para la realización de cultivos organotípicos. A, Esterilizador y vasos de precipitados con etanol al 70% (para la descontaminación de las tijeras) y agua destilada. B, Bisturí, tijeras, pinzas y placas de Petri de distintos tamaños. C, Pinceles, micropipeta y puntas.

Para la obtención de cultivos organotípicos se utilizaron como animales de experimentación ratas hembras de raza Sprague Dawley, de 7 a 10 días de edad. Se procedió en dichos animales a una ablación craneal completa por detrás del pabellón auditivo. Los cerebros se extrajeron

tras una retirada cautelosa de las meninges que los protegen, y se colocaron rápidamente en una placa de Petri con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) [PAA] dispuesta sobre una placa fría para reducir la actividad metabólica del tejido, conservar mejor las estructuras y dar solidez al cerebro, lo que facilita su posterior corte en rodajas (**Figura 10**).

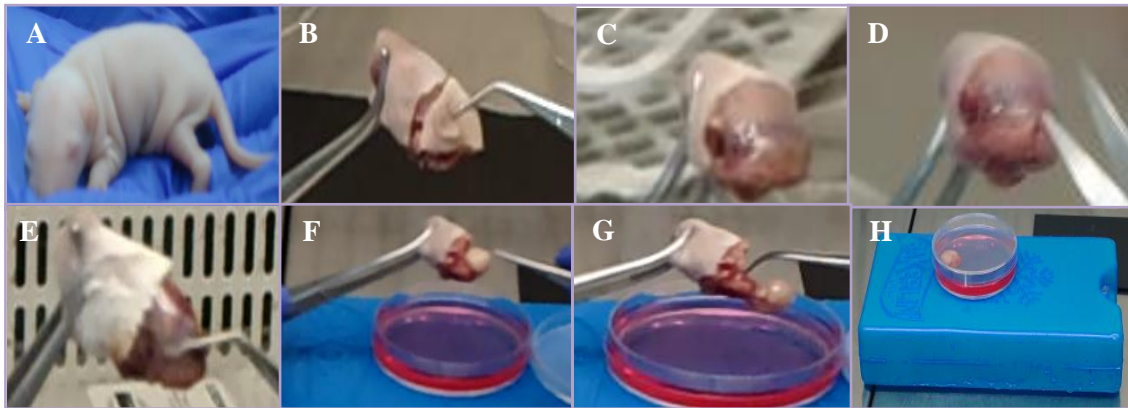


Figura 10. Proceso de extracción del cerebro de rata. A, Rata hembra Sprague Dawley. B, Retirada de la piel de la cabeza. C, Vista del cráneo. D, Corte del cráneo a lo largo de la línea media. E, Retirada de las meninges. F y G, Desgarro de las uniones del cerebro con el cráneo. H, Cerebro extraído en medio DMEM sobre una placa fría.

A continuación, se talla con la cuchilla la parte más posterior del cerebro, el cerebelo; y el resto del cerebro se pega con Superglue [Loctite®], sobre la platina del vibratomo. Para asegurar que el cerebro no se despegue o mueva durante el proceso de corte, sobre esta platina se coloca un trozo de agar (al 2%, previamente preparado), que quedará detrás del cerebro y sirve de apoyo y de parada del corte. Este conjunto (platina con cerebro y agar) se coloca en un microtomo vibratorio [Microm HM 650V; Thermo Scientific], mediante el cual se realizan cortes coronales (**Figura 11**). Este proceso se realiza también en frío, ya que en el microtomo se añade medio DMEM a 4°C. Además, se fija esta temperatura en un enfriador [Microm; Thermo Scientific] conectado al vibratomo, para que se ésta se mantenga a lo largo de toda la etapa de corte.



Figura 11. Preparación del cerebro para el corte en el microtomo. A, Colocación de agar en la platina. B, Fijación del cerebro a la platina apoyado sobre el agar. C, Microtomo vibratorio con medio DMEM frío. D, Platina colocada en el microtomo para realizar el proceso de corte.

El microtomo se ajustó para que los cortes tuvieran un espesor de 300 μm , definiéndose una ventana de corte para fijar el sitio de inicio y de término de cada corte. Éstos se recogieron con pinceles y se colocaron en una placa de Petri con medio DMEM frío. Después del proceso de corte, se añadió 1 ml de medio de cultivo y un filtro de membrana en cada uno de los pocillos de una placa de 6 pocillos. Para el montaje, se añadió medio de cultivo sobre la membrana, con el fin de colocar mejor los explantes sobre ésta. Se colocaron de uno a tres cortes en una misma membrana. Finalmente, se retiró el medio de la parte superior y las placas se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera humidificada y enriquecida con un 5% de CO_2 (Figura 12). Los cultivos se disponen sobre la superficie del filtro, con lo que los nutrientes son adquiridos por capilaridad. Para su correcta conservación, se cambió el medio de cultivo a diario durante los 3-4 días siguientes al proceso de corte y, posteriormente, cada dos o tres días hasta la realización de los experimentos. El medio de cultivo para los explantes de cerebro consistió en una mezcla de Medio Basal Eagle (BME) 1× al 50% [Gibco-Invitrogen], suero de caballo (inactivado a 56°C durante 30 min) al 25% [Gibco-Invitrogen] y solución de Hank al 25% [Gibco] (v/v/v). También, se añadió glutamina (200 mM) [Gibco], D-glucosa (3,74 mM) [Sigma] y los antibióticos penicilina, estreptomicina (10000 U/10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) [Gibco] y anfotericina B (25 μg) [Invitrogen]. El medio se filtró utilizando unidades de filtración con filtros de 0,22 μm [Millipore].

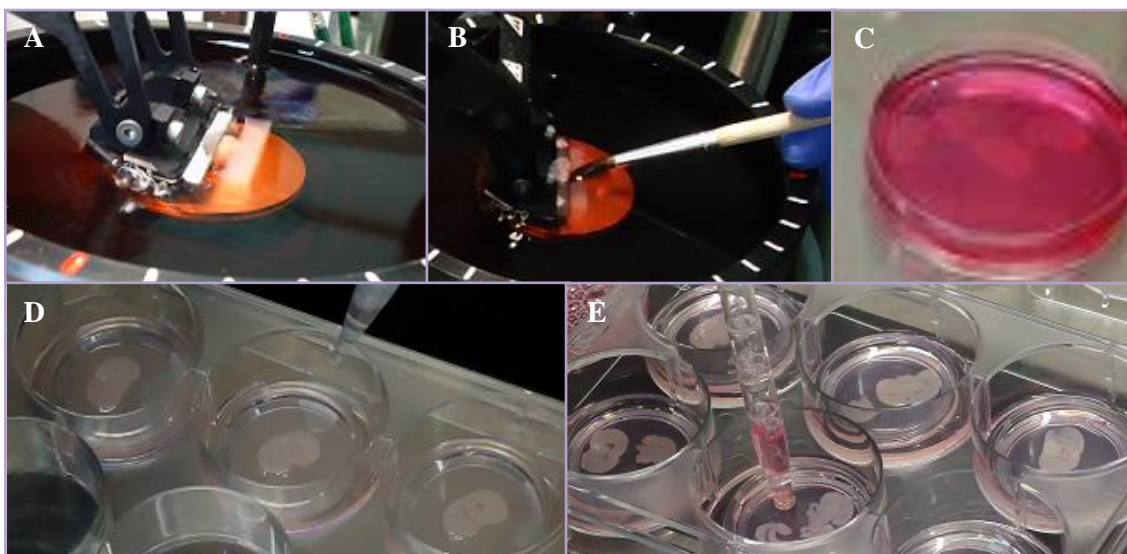


Figura 12. Obtención de cortes de cerebro y montaje en placas de 6 pocillos. A, Proceso de corte. B, Retirada con el pincel de los cortes incompletos que quedan sobre la cuchilla. C, Recogida de los cortes en placa Petri con medio DMEM. D y E, Retirada de la gota de medio añadida para el montaje con pipeta o gotero, respectivamente.

La mayoría de los ensayos se llevaron a cabo tras el cultivo de los cortes durante 1-4 semanas *in vitro*. Además, se comprobó que los explantes se mantenían viables durante períodos de hasta 12 semanas, con un aspecto similar a los primeros días de cultivo.

2.2. Aislamiento de células primarias de microglía

A partir de los cultivos organotípicos de tejido cerebral se obtuvieron cultivos celulares primarios. Para ello, unos días después de la obtención de cultivos organotípicos bien establecidos, éstos se disgregaron pasándolos repetidas veces a través de una jeringa de 2 ml [Monoject], utilizada a modo de pistón, sobre una placa de Petri, hasta que la disgregación del tejido pareció evidente. Para facilitar el paso de los cortes de cerebro por la jeringa, éstos se bañaron en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal [Invitrogen] y 2 mM de L-glutamina [Gibco]. Para terminar, se añadió más volumen de medio de cultivo a la suspensión y se repartió el tejido disgregado tanto en frascos de cultivo Roux de 25 cm² [Corning] como en placas de 6 y 24 pocillos (Figura 13). Previamente, en algunos pocillos de las placas de 24 pocillos, se colocaron portaobjetos para los ensayos de inmunofluorescencia. Con el fin de evitar posibles contaminaciones de las células primarias aisladas, se añadió una

mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C con una atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂ hasta la realización de ensayos posteriores.

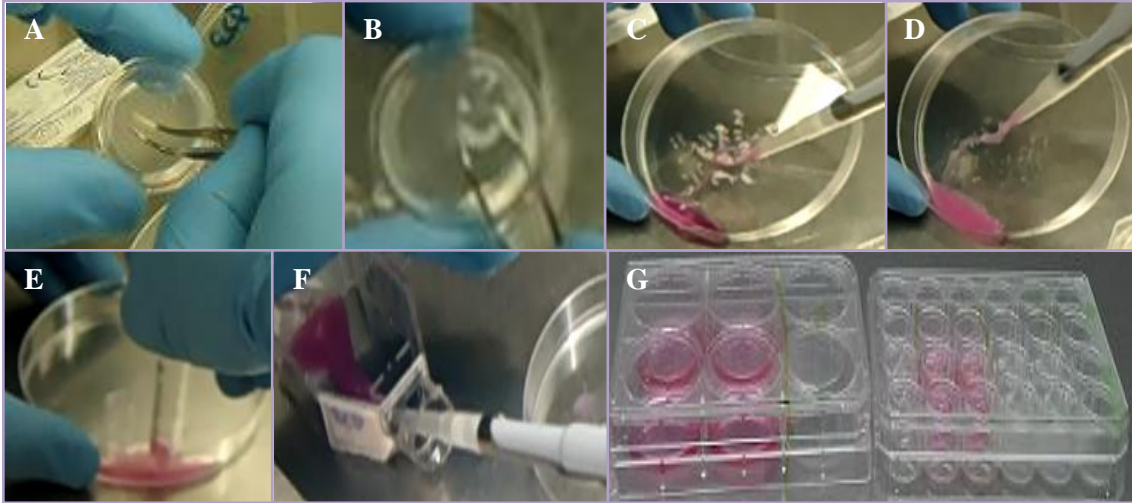


Figura 13. Disgregación del tejido cerebral para el cultivo de células primarias. A y B, Recogida de los cortes con pinza desde los filtros de membrana. C y D, Baño de los cortes con medio de cultivo sobre una placa de Petri. E, Disgregación de los cortes a través de una jeringa. F y G, Reparto del cultivo celular obtenido en un frasco Roux de 25 cm² (F), placas de 6 y 24 pocillos (G).

3. ENSAYOS REALIZADOS CON CULTIVOS ORGANOTÍPICOS Y CÉLULAS PRIMARIAS

3.1. Cultivo bacteriano para las infecciones

La cepa *L. monocytogenes* HUMV-4251 se cultivó en placas de AS. Tras 12-14 h de incubación se realizó un cultivo en medio líquido a 37°C y agitación (175 rpm), en 10 ml de BHIB. El cultivo se ajustó en un espectrofotómetro Biophotomer [Eppendorf] a una densidad óptica de $1,6 \pm 0,05$. Se siguió la misma pauta para los estudios con las cepas mutantes de *Listeria*.

3.2. Infecciones en el modelo *ex vivo* de SNC

Los cultivos organotípicos se mantuvieron con antibiótico durante una semana, como mínimo, para asegurar su recuperación del proceso de corte y comprobar la ausencia de contaminación. El medio de cultivo de los explantes organotípicos se cambió por medio fresco, libre de antibióticos, al menos una hora antes de la realización de las infecciones bacterianas.

El cultivo de la cepa *L. monocytogenes* HUMV-4251 se centrifugó durante 4 min a 5000 rpm en una microcentrífuga de mesa, y el pellet resultante se resuspendió en medio DMEM a una concentración final de 10^{10} UFCs/ml. El número de UFCs fue determinado por diluciones seriadas en PBS sembradas en placas de BHIA y se correlacionó con la DO_{600} de los cultivos.

Los cultivos de tejido se infectaron por la superficie, con 2 μ l de medio que contenían 10^7 bacterias. Las infecciones se prolongaron durante diferentes tiempos en un incubador a 37°C con una atmósfera enriquecida en 5% de CO_2 . Se utilizaron, como controles, tejidos inoculados con 2 μ l de medio DMEM sin bacterias.

Para evaluar la viabilidad bacteriana en cada tiempo de estudio, los tejidos se disgregaron mecánicamente con tritón X-100 [Sharlau] al 1% en PBS, con la ayuda de un homogeneizador o minipotter [Kontes] diseñado para tubos Eppendorf de 1,5 ml. El número de UFCs se determinó mediante diluciones seriadas de la muestra en PBS, tras siembra en placas de BHIA. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar del porcentaje del número de

bacterias recuperadas a los distintos tiempos respecto al inóculo inicial, a partir de la realización de tres experimentos independientes.

Además de la cepa *L. monocytogenes* HUMV-4251, se realizaron infecciones de la misma manera con los mutantes BUG 2132: Δ Hly y BUG 2140: Δ ActA para comprobar su viabilidad a lo largo del tiempo y para estudios post-transcripcionales.

3.3. Infecciones *in vitro* de células primarias

Para los estudios de supervivencia de *L. monocytogenes* HUMV-4251 en las células primarias procedentes de cultivos organotípicos, éstas se cultivaron directamente en placas de 24 pocillos o bien en un frasco Roux de 25 cm². Cuando el cultivo celular en el frasco alcanzó una confluencia aproximada del 100%, las células adheridas al plástico se despegaron del mismo mediante un raspador [Fisher Scientific] y se colocaron en placas de 24 pocillos. En dichas placas, alcanzada una confluencia aproximada del 70% (aproximadamente $1,4 \times 10^5$ células) en cada pocillo, se sustituyó el medio por uno libre de antibióticos, al menos 1 h antes de las infecciones. Después, las células se infectaron con 5 μ l del cultivo bacteriano ajustado a una concentración de 10^9 UFCs/ml. Tras la agitación en cruz de las placas, la mezcla se centrifugó en una centrífuga 5410R [Eppendorf] durante 4 min a 50 g para promover el contacto bacteriano con las células y sincronizar las infecciones. Posteriormente, las células infectadas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 h. Pasado este tiempo, la infección se interrumpió, lavando los cultivos tres veces con PBS y añadiendo 100 μ l de tritón X-100 al 1% en PBS para lisar las células. Se incubaron a 37°C durante 5 min. Después de añadir 400 μ l de PBS a cada pocillo, el fondo de los pocillos se raspó con una punta de pipeta para disgregar y despegar totalmente la monocapa y se procedió a realizar diluciones seriadas en PBS para el recuento de bacterias. El número de bacterias totales se determinó por recuento en placas de BHIA por duplicado.

3.4. Extracción de ARN

- Extracción de ARN de los tejidos organotípicos

Los tejidos infectados durante 1, 3, 5, 12 y 24 h y sus respectivos controles se congelaron a -80°C inmediatamente tras el tiempo de infección. El ARN total se extrajo de los tejidos utilizando TRIzol® [Invitrogen], siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, los cortes de tejido congelados se retiraron de la membrana, se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 ml, libre de nucleasas, y se homogeneizaron con el TRIzol con ayuda de un minipoter. Las muestras se incubaron durante 5 min a T^{a} ambiente. Después, se añadieron 300 μl de cloroformo [Probus] por muestra y esta mezcla se agitó vigorosamente mediante repetidas inversiones del tubo. Las muestras se dejaron reposar durante 2-3 min a T^{a} ambiente. Después, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 15 min a 4°C en una microcentrífuga de mesa, y se obtuvieron tres fases: fase inferior, orgánica, contiene en su mayor parte proteínas y ADN; interfase, contiene ADN; y la fase superior, incolora y acuosa, contiene el ARN. Esta fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 750 μl de isopropanol [Merck], para separar las proteínas remanentes y precipitar el ARN. La mezcla se homogeneizó vigorosamente en un vórtex y de nuevo se incubó durante 10 min a T^{a} ambiente. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C en microcentrífuga de mesa para precipitar el ARN. El pellet conteniendo el ARN se lavó con 1,5 ml de etanol [Merck] preparado al 75% en agua libre de nucleasas [Ambion]. A la mezcla se le dio un vórtex y se centrifugó a 7500 rpm en una microcentrífuga de mesa durante 5 min a 4°C . Finalmente, los pellets de ARN se dejaron secar durante 5 min a T^{a} ambiente, y se resuspendieron en 20 μl de agua libre de nucleasas.

- Extracción de ARN de las células primarias

Las células primarias obtenidas de cultivos organotípicos se mantuvieron en placas de 6 pocillos ($9,5 \times 10^5$ células por pocillo). Al menos 1 h antes de las infecciones, se sustituyó el medio por uno libre de antibióticos, y las células se infectaron con 20 μl de *L.monocytogenes* HUMV-4251, con una concentración final de 10^9 UFCs/ml. Las placas se centrifugaron durante 4 min a 700 rpm para promover la adherencia de las células a las bacterias y sincronizar las infecciones, y posteriormente se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 3 h. Tras este tiempo, las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron rápidamente a -80°C hasta su procesamiento para la extracción de ARN.

Para la extracción del ARN de estas células primarias se siguió el mismo protocolo que para la extracción de ARN tisular, con unas ligeras modificaciones. Básicamente, las células se homogeneizaron directamente con TRIzol, sin necesidad de utilizar un minipoter. Tras la incubación a Tª ambiente, se añadieron 200 µl de cloroformo. Después de retirar la fase superior, el ARN se precipitó con 500 µl de isopropanol y el lavado final del ARN se realizó con 1 ml de etanol al 75% (v/v) en agua libre de nucleasas.

Tras la extracción del ARN, todas las muestras se congelaron a -80°C para su posterior uso.

- Cuantificación y calidad del ARN

La concentración de todas las muestras de ARN, procedentes de tejidos o de células, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop, realizando mediciones por duplicado. La calidad del ARN se evaluó mediante la medición de unos ratios correctos de la absorbancia a 260 nanómetros (nm) – 280 nm para evaluar la pureza del ARN, y a 260 nm – 230 nm usado como medida secundaria de su pureza. Además, la integridad de las bandas del ARN ribosomal (18S y 28S) se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

3.5. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis del ADNc se partió de 400 ng del ARN total tisular y de 200 ng del ARN total extraído de las células primarias. En ambos casos se utilizó el Kit SABiosciences's RT² First Strand, siguiendo las instrucciones del fabricante [Qiagen]. El proceso se detalla en la **Figura 14**.

Primeramente, cada ARN se trató con un tampón de eliminación de ADNg. Esta mezcla se realizó en un tubo de PCR estéril, libre de nucleasas, mediante incubación a 42°C durante 5 min. Después, se preparó el cocktail de transcripción inversa (RT; Buffer RT 5×, primer, enzima de la RT y H₂O) y junto con el ARN libre de ADNg se realizó la reacción de síntesis de ADNc mediante incubación a 42°C durante 15 min. La reacción se detuvo por calentamiento inmediato a 95°C durante 5 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo hasta la realización de la qRT-PCR.

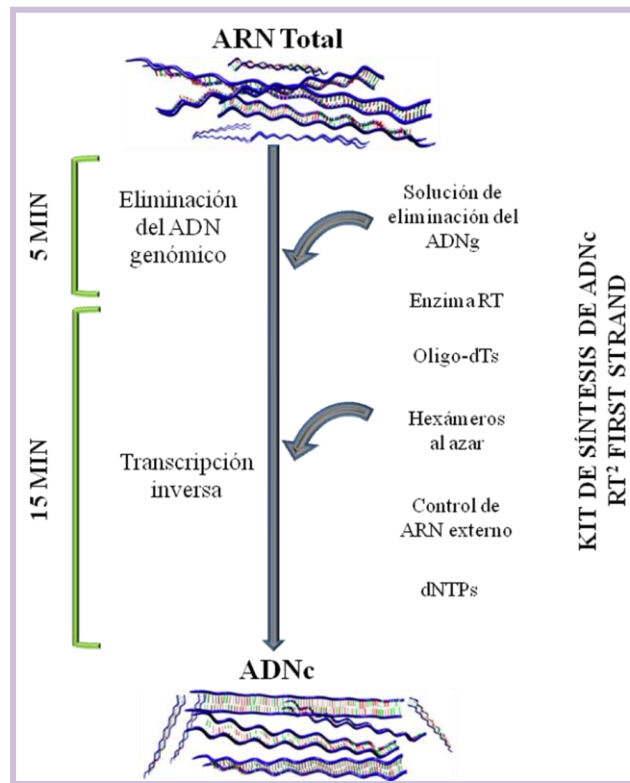


Figura 14. Diagrama representativo de la obtención del ADN complementario.

3.6. Expresión de genes utilizando matrices de PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación de la expresión génica se realizó utilizando matrices de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” (PARN-052A) y de “Autofagia de rata” (PARN-084A) en formato de 96 pocillos [SABiosciences-Qiagen].

El ADNc, obtenido en el paso anterior, se mezcló con el Master Mix RT² para qPCR de SABiosciences y agua libre de RNAsas (volumen total de 2700 μ l), de acuerdo a las instrucciones del fabricante [Qiagen]. Veinticinco μ l de esta mezcla se añadieron a cada pocillo de la matriz de qPCR hasta completar los 96 pocillos de cada placa. Finalmente, las placas se centrifugaron en una centrífuga 5810R [Eppendorf] a 450 g durante 1 min a T^a ambiente para eliminar posibles burbujas de aire. Tras esta centrifugación, las placas se colocaron en un termociclador de tiempo real CFX96 [Bio-Rad]. En el termociclador se diseñó un programa de dos pasos para amplificar el ADNc, según el protocolo del fabricante de las matrices (Tabla 10):

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	10 minutos	1
2	95°C	15 segundos	40
	60°C	1 minuto	

Tabla 10. Programa para la amplificación del ADNc.

Después de cada ciclo, los niveles de fluorescencia se midieron automáticamente mediante un detector que sólo recoge fluorescencia cuando el colorante (SYBR Green) se une al ADN de cadena doble (Figura 15). Inmediatamente después del programa anterior, se insertó un programa para calcular las curvas de disociación a partir de cada pocillo de la placa, con el objetivo de comprobar la fiabilidad de las reacciones individuales de la qRT-PCR. Tras la finalización de la reacción de qRT-PCR, se verificó que la curva derivada de cada pocillo no contenía más de un pico de temperatura mayor de 80°C. Además, para comprobar que sólo se amplificó un producto de PCR en cada pocillo, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%, a partir del material presente en los distintos pocillos.

El ciclo crítico o threshold (C_t) de cada gen, la curva de disociación y la adquisición de datos se generaron y grabaron automáticamente mediante el programa informático CFX Manager de Bio-Rad.

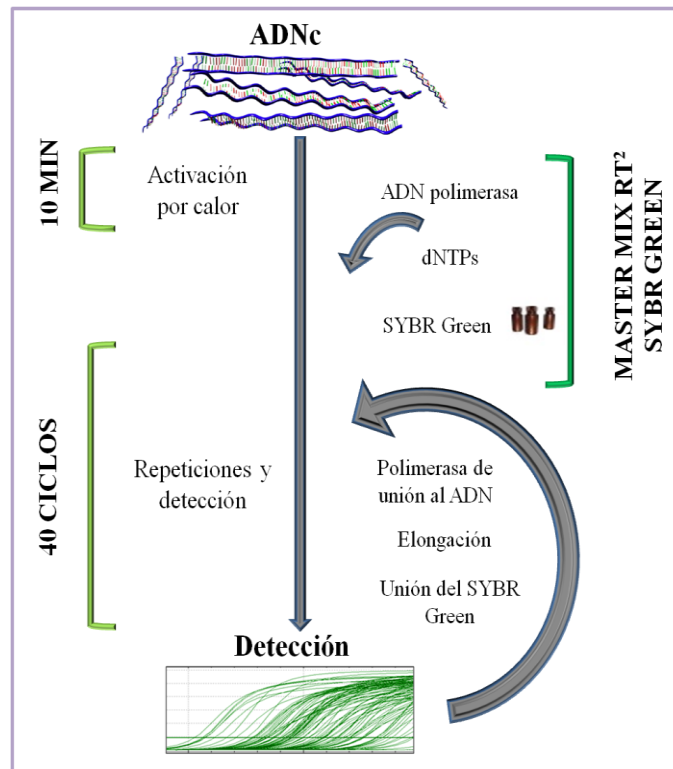


Figura 15. Diagrama representativo de las etapas de cuantificación de la expresión génica.

- Matriz de Respuesta Inmunitaria Innata y Adaptativa de rata

Esta matriz se utilizó para el análisis de la expresión de genes tanto en el modelo *ex vivo* de cultivos organotípicos (tres tejidos control y tres tejidos infectados independientes para cada tiempo de estudio) como en las infecciones *in vitro* de las células primarias obtenidas del tejido (tres cultivos control y tres cultivos infectados independientes durante 3 h).

Las matrices están diseñadas para cuantificar la expresión de 84 genes involucrados en la respuesta a infecciones bacterianas y sepsis: genes relacionados con las vías de señalización de los receptores interleucina-1 (Il-1R) y tipo Toll (TLR); genes involucrados en la respuesta de fase aguda, activación del complemento, respuesta inflamatoria (citocinas, quimiocinas), respuesta humoral antibacteriana; así como otros genes de respuesta inmunitaria innata, apoptosis y genes de choque séptico. Además, se incluyen 5 genes de referencia: proteína ribosomal P1 (Rplp1), hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (Hprt1), proteína ribosomal L13A (Rpl13a), lactato deshidrogenasa A (Ldha) y beta actina (Actb). A continuación, se muestra la disposición completa de los genes presentes en la matriz (Figura 16) y una tabla con información de cada gen: posición en la matriz, número de acceso en el GenBank, símbolo, descripción y nombre/nombres que reciben (Tabla 11).

84 genes relacionados con la vía											
A01 Adora2a	A02 C5	A03 C8a	A04 Camp	A05 Casp1	A06 Casp4	A07 Ccl2	A08 Ccr3	A09 Cd14	A10 Cd1d1	A11 Cd55	A12 Cfp
B01 Chuk	B02 Clec7a	B03 Colec12	B04 Crp	B05 Cxcr4	B06 Cybb	B07 Defb4	B08 Dmbt1	B09 Fn1	B10 Hmox1	B11 Ifna1	B12 Ifnb1
C01 Ifngr1	C02 Ifngr2	C03 Ikbkb	C04 Il10	C05 Il12rb2	C06 Il1a	C07 Il1b	C08 Il1f10	C09 Il1f5	C10 Il1f6	C11 Il1f8	C12 Il1f9
D01 Il1r1	D02 Il1r2	D03 Il1rap	D04 Il1rap2	D05 Il1rl2	D06 Il1rn	D07 Il6	D08 Irak1	D09 Irak2	D10 Irf1	D11 Lalba	D12 Lbp
E01 Lck	E02 Ly96	E03 Lyz2	E04 Mapk14	E05 Mapk8	E06 Mif	E07 Myd88	E08 Ncf4	E09 Nfkb1	E10 Nfkb2	E11 Nfkbia	E12 Nlr4
F01 Nos2	F02 Pglyrp1	F03 Pglyrp3	F04 Ppbp	F05 Prg2	F06 Proc	F07 Ptafr	F08 Serpina1	F09 Serpine1	F10 Sftpd	F11 Stab1	F12 Tgfb1
G01 Tlr1	G02 Tlr10	G03 Tlr2	G04 Tlr3	G05 Tlr4	G06 Tlr6	G07 Tlr9	G08 Tnf	G09 Tnfrsf1a	G10 Tollip	G11 Traf6	G12 Trem1
H01 Rplp1	H02 Hprt1	H03 Rpl13a	H04 Ldha	H05 Actb	H06 CAG	H07 CRT	H08 CRT	H09 CRT	H10 CPP	H11 CPP	H12 CPP
Genes de referencia					Control ADNg	Controles de la transcripción inversa			Controles positivos PCR		

Figura 16. Disposición de los genes en la matriz de Respuesta Inmunitaria innata y adaptativa en formato de 96 pocillos. 84 genes funcionales de respuesta inmunitaria; 5 genes de referencia para normalizar los datos de las matrices; 1 control de ADN genómico; 3 controles de la transcripción inversa; y 3 controles positivos de la PCR.

TABLA 11. INFORMACIÓN DE CADA GEN EN LA MATRIZ DE RESPUESTA INMUNITARIA

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
A01	Rn.11180	NM_053294	Adora2a	Receptor Adenosina A2a	A2ar, ADENO, Adora211, MGC93190
A02	Rn.21259	XM_342421	C5	Componente 5 del complemento	C5a, Hc, RGD1561905
A03	Rn.105718	XM_233251	C8a	Componente 8 del complemento, polipéptido alfa	-
A04	Rn.33146	XM_236642	Camp	Péptido antimicrobiano catelicidina	CRAMP
A05	Rn.37508	NM_012762	Casp1	Caspasa 1	Ice, I11bc
A06	Rn.16195	NM_053736	Casp4	Caspasa 4, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis	Casp11, MGC124949
A07	Rn.4772	NM_031530	Ccl2	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	MCP-1, Scya2, Sigie
A08	Rn.9890	NM_053958	Ccr3	Receptor de quimiocinas 3 (motivo C-C)	Cmkbr3
A09	Rn.42942	NM_021744	Cd14	Molécula CD14	-
A10	Rn.11120	NM_017079	Cd1d1	Molécula CD1d1	Cd1, Cd1d
A11	Rn.18841	NM_022269	Cd55	Molécula Cd55	Daf, Daf1
A12	Rn.204119	XM_216784	Cfp	Factor del complemento properdina	Pfc
B01	Rn.23019	XM_219857	Chuk	Quinasa ubicua conservada hélice-bucle-hélice	-
B02	Rn.15743	XM_001067977	Clec7a	Familia 7 del dominio de lectinas tipo C, miembro a	Clec7b, RGD1565140
B03	Rn.31273	NM_001025721	Colec12	Miembro 12 de la subfamilia de colectinas	MGC114569
B04	Rn.16463	NM_017096	Crp	Proteína C reactiva, relacionada con pentraxina	Aa1249, Ab1-341, Ab2-196, Ac1-114, Ac1262, Ac2-069, Ba2-693
B05	Rn.44431	NM_022205	Cxcr4	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)	MGC108696
B06	Rn.98491	NM_023965	Cybb	Citocromo b-245, polipéptido beta	Gp91-phox
B07	Rn.2267	NM_022544	Defb4	Beta defensina 4	Defb2, Defb3
B08	Rn.10107	XM_001080554	Dmbt1	Delección en los tumores cerebrales malignos 1	Crpd
B09	Rn.1604	NM_019143	Fn1	Fibronectina 1	FIBNEC, fn-1
B10	Rn.3160	NM_012580	Hmox1	Hemo oxigenasa (decicladora) 1	HEOXG, Heox, Hmox, Ho-1, Ho1, hsp32
B11	Rn.196548	NM_001014786	Ifna1	Interferón alfa 1	IFN-alfa 1
B12	Rn.138105	NM_019127	Ifnb1	Interferón beta 1, fibroblasto	Ifnb
C01	Rn.19927	NM_053783	Ifngr1	Receptor de interferón gamma 1	Ifngr
C02	Rn.23305	XM_340967	Ifngr2	Receptor de interferón gamma 2	-
C03	Rn.19222	NM_053355	Ikbkb	Inhibidor del polipéptido ligero kappa potenciador de genes en las células B, quinasa beta	AIM-1, IKK2
C04	Rn.9868	NM_012854	Il10	Interleucina 10	IL10X
C05	Rn.207395	XM_231873	Il12rb2	Receptor de interleucina 12, beta 2	-
C06	Rn.12300	NM_017019	Il1a	Interleucina 1 alfa	IL-1 alfa

Tabla 11 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
C07	Rn.9869	NM_031512	Il1b	Interleucina 1 beta	-
C08	Rn.84164	XM_342378	Il1f10	Familia de las interleucinas 1, miembro 10	-
C09	Rn.63170	XM_231101	Il1f5	Familia de las interleucinas 1, miembro 5 (delta)	-
C10	Rn.218666	XM_231099	Il1f6	Familia de las interleucinas 1, miembro 6	-
C11	Rn.137499	XM_342377	Il1f8	Familia de las interleucinas 1, miembro 8	-
C12	Rn.152030	XM_575079	Il1f9	Familia de las interleucinas 1, miembro 9	RGD1563019
D01	Rn.9758	NM_013123	Il1r1	Receptor de interleucinas 1, tipo I	-
D02	Rn.10758	NM_053953	Il1r2	Receptor de interleucinas 1, tipo II	-
D03	Rn.10511	NM_012968	Il1rap	Proteína accesoria de receptores de interleucinas 1	IL-1RAcP, MGC114349
D04	Rn.208232	XM_236512	Il1rap12	Proteína accesoria de tipo 2 de receptores de interleucinas 1	RGD1561761
D05	Rn.10235	NM_133575	Il1r12	Receptor tipo 2 de interleucinas 1	-
D06	Rn.162640	NM_022194	Il1rn	Antagonista del receptor de interleucinas 1	IL-1ra
D07	Rn.9873	NM_012589	Il6	Interleucina 6	ILg6, Ifnb2
D08	Rn.22238	XM_343844	Irak1	Quinasa 1 asociada al receptor de interleucinas 1	RGD1563841
D09	Rn.17123	NM_001025422	Irak2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	-
D10	Rn.6396	NM_012591	Irf1	Factor regulador de interferón 1	-
D11	Rn.10479	NM_012594	Lalba	Alfa-lactoalbúmina	-
D12	Rn.48863	NM_0172208	Lbp	Proteína de unión al lipopolisacárido	MGC124626
E01	Rn.22791	XM_232763	Lck	Proteína tirosina quinasa específica de linfocitos	Lck1, Lcktkr
E02	Rn.141496	NM_001024279	Ly96	Antígeno 96 de linfocitos	MD-2
E03	Rn.2283	NM_012771	Lyz2	Lisozima 2	Lysz, Lyz
E04	Rn.88085	NM_031020	Mapk14	Proteína quinasa 14 activadora de mitógenos	CSBP, CSPB1, Csbp1, Csbp2, Exip, Hog, MGC105413, Mxi2, Prkm14, Prkm15, RK, Sapk2A, p38, p38Hog, p38 alfa
E05	Rn.4090	XM_341399	Mapk8	Proteína quinasa 8 activadora de mitógenos	JNK
E06	Rn.2661	NM_031051	Mif	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	MGC72801
E07	Rn.37341	NM_198130	Myd88	Gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide	-
E08	Rn.46120	XM_576306	Ncf4	Factor citosólico 4 de neutrófilos	-
E09	Rn.2411	XM_342346	Nfkb1	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	NF-kB

Tabla 11 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
E10	Rn.204814	NM_001008349	Nfkb2	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	MGC93816, RGD1307189
E11	Rn.12550	XM_343065	Nfkb1a	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	RL, IF-1
E12	Rn.144882	XM_216640	Nlrc4	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	Card12
F01	Rn.10400	NM_012611	Nos2	Oxido nítrico sintasa inducible 2	Nos2a, iNos
F02	Rn.2834	NM_053373	Pglyrp1	Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 1	Pglyrp, Pgrp
F03	Rn.109236	XM_574982	Pglyrp3	Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 3	-
F04	Rn.67082	NM_153721	Ppbp	Proteína básica de pro-plaquetas (quimiocina motivo CXC) ligando 7	Cxcl7, Nap-2
F05	Rn.10674	NM_031619	Prg2	Proteoglicano 2, médula ósea	-
F06	Rn.91064	NM_012803	Proc	Proteína C	-
F07	Rn.10137	NM_053321	Ptafr	Receptor del factor pro-plaquetas	-
F08	Rn.1419	NM_022519	Serpina1	Inhibidor de la peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	AAT, Pi, Spi1
F09	Rn.29368	NM_012620	Serpine1	Inhibidor de la peptidasa de serpinas, clado E (nexina, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), miembro 1	PAIIA, Pai1, Pai1aa, Planh, RATPAIIA
F10	Rn.11348	NM_012878	Sftpd	Proteína surfactante D	SP-D, SPD
F11	Rn.144136	XM_214279	Stab1	Estabilina 1	-
F12	Rn.40136	NM_021578	Tgfb1	Factor de crecimiento transformante, beta 1	-
G01	Rn.107212	XM_223421	Tlr1	Receptor tipo Toll 1	-
G02	N/A	XM_223422	Tlr10	Receptor tipo Toll 10	-
G03	Rn.46387	NM_198769	Tlr2	Receptor tipo Toll 2	-
G04	Rn.15273	NM_198791	Tlr3	Receptor tipo Toll 3	-
G05	Rn.14534	NM_019178	Tlr4	Receptor tipo Toll 4	-
G06	Rn.163249	NM_207604	Tlr6	Receptor tipo Toll 6	-
G07	Rn.92495	NM_198131	Tlr9	Receptor tipo Toll 9	-
G08	Rn.2275	NM_012675	Tnf	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	MGC124630, RATTNF, TNF-alfa, Tnfa
G09	Rn.11119	NM_013091	Tnfrsf1a	Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 1a	MGC105478, Tnfr1
G10	Rn.137040	XM_341961	Tollip	Proteína Toll de interacción	-
G11	Rn.220435	XM_230377	Traf6	Receptor TNF asociado al factor 6	-
G12	Rn.86337	XM_217336	Trem1	Receptor expresado en células mieloides 1	-
H01	Rn.973	NM_001007604	Rplp1	Proteína ribosomal, grande, P1	MGC72935
H02	Rn.47	NM_012583	Hprt1	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1	Hgpptase, Hprt, MGC112554

Tabla 11 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
H03	Rn.92211	NM_173340	Rpl13a	Proteína ribosomal L13A	-
H04	Rn.107896	NM_017025	Ldha	Lactato deshidrogenasa A	Ldh1
H05	Rn.94978	NM_031144	Actb	Beta actina	Actx
H06	N/A	U26919	CAG	Control de ADN genómico	CAG
H07	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H08	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H09	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H10	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP
H11	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP
H12	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP

Tabla 11. Posición, número de acceso en GenBank, símbolo, descripción y nombre/s de cada gen de la matriz de Respuesta Inmunitaria Innata y Adaptativa de rata.

Los genes analizados en la matriz se pueden agrupar en las siguientes rutas:

a. Miembros IL-1R/TLR y genes relacionados:

- Detección de patógenos: Clec7a, Tlr1, Tlr3, Tlr4, Tlr6
- Receptores de Interleucina-1: Il1r1, Il1r2, Il1rap, Il1rapl2, Il1rl2
- Otros genes involucrados en la vía Il-1R: Ikbkb, Mapk14, Mapk8, Nlrc4
- Respuesta inflamatoria: Il1a, Il1b, Il1f10, Il1f5, Il1f6, Il1f8, Il1r1, Il1rn, Irak2, Myd88, Nfkb1, Tlr1, Tlr10, Tlr2, Tlr3, Tlr4, Tlr6, Tlr9, Tnf, Tollip
- Apoptosis: Il1a, Il1b, Nfkb1, Nfkbia, Tgfb1, Tnf
- Citocinas: Ifna1, Ifnb1, Il1a, Il1b, Il1f10, Il1f5, Il1f6, Il1f8, Il1f9, Il6, Tnf
- Genes involucrados en la señalización NF-κB: Chuk, Irak2, Myd88, Tlr1, Tlr3, Tlr4, Tlr6, Traf6

b. Respuesta del hospedador frente a bacterias:

- Detección de bacterias: Cd1d1, Nlrc4, Pglyrp1, Pglyrp3, Tlr1, Tlr3, Tlr6
- Receptor de lipopolisacárido (LPS): Cd14, Cxcr4
- Respuesta de fase aguda: Crp, Fn1, Lbp
- Activación del complemento: C5, C8a, Cd55, Cfp
- Respuesta inflamatoria: C5, Ccl2, Cd14, Clec7a, Crp, Cybb, Ly96, Nfkb1, Nlrc4, Nos2, Stab1, Tlr1, Tlr3, Tlr6, Tlr9
- Citocinas, quimiocinas y sus receptores: C5, Ccl2, Cxcr4, Ifngr1, Ifngr2, Il12rb2, Ppbp
- Respuesta humoral antibacteriana: Colec12, Cybb, Ly96, Nfkb1

– Respuesta frente a bacterias: Camp, Cfp, Defb4, Lalba, Lbp, Lyz2, Nlrc4, Nos2, Pglyrp1, Pglyrp3, Pbbp, Prg2, Stab1, Tlr3, Tlr6, Tlr9

– Otros genes involucrados en la defensa contra bacterias: Dmbt1, Irf1, Ncf4, Nfkb1a

c. Respuesta inmunitaria innata:

– Respuesta inmunitaria innata: Cd55, Clec7a, Colec12, Dmbt1, Pglyrp1, Pglyrp3, Sftpd

– Otros genes involucrados en la respuesta inmunitaria innata: Cd1d1, Ifnb1, Tlr10

d. Choque séptico:

– Apoptosis: Adora2a, Casp1, Casp4, Lck, Il10, Il1b, Nfkb1, Nlrc4, Proc, Tnf, Tnfrsf1a

– Citocinas y factores de crecimiento: Il10, Il1b, Il6, Mif, Tnf

– Respuesta inflamatoria: Adora2a, Ccr3, Il10, Il1b, Il1rn, Mif, Nfkb1, Ptafr, Tlr2, Tlr4, Tnf

– Otros genes involucrados en choque séptico: Hmox1, Irak1, Nfkb2, Serpina1, Serpine1, Trem1

• Array de autofagia de rata

Esta matriz se utilizó para el análisis de la expresión de genes en los cultivos organotípicos infectados con la cepa HUMV-4251 de *L. monocytogenes* durante 5 h y 12 h (tres tejidos control y cuatro tejidos infectados de manera independiente para cada tiempo).

La matriz de autofagia está diseñada para cuantificar la expresión de 84 genes involucrados en esta ruta: genes que codifican componentes de la maquinaria molecular y reguladores clave de la modulación de la autofagia en respuesta a señales extracelulares e intracelulares; genes involucrados en la formación de vacuolas fagocíticas; genes responsables de transportar y dirigir proteínas a las membranas, ubiquitinación de proteínas; genes de unión de los autofagosomas con los lisosomas, correguladores de autofagia y apoptosis; y genes de autofagia inducidos por patógenos intracelulares. Además, se incluyen los mismos genes de referencia que en la matriz de respuesta inmunitaria. La disposición completa de los genes presentes en la matriz se muestra en la **Figura 17**.

84 genes relacionados con la vía											
A01 Akt1	A02 App	A03 Arsa	A04 Arzb	A05 Atg12	A06 Atg16l1	A07 Atg16l2	A08 Atg3	A09 Atg4b	A10 Atg4c	A11 Atg5	A12 Atg7
B01 Atg9a	B02 Bad	B03 Bak1	B04 Bax	B05 Bcl2	B06 Bcl2l1	B07 Becn1	B08 Bid	B09 Bnip3	B10 Casp3	B11 Casp8	B12 Cdkn1b
C01 Cdkn2a	C02 Cln3	C03 Ctsb	C04 Ctsd	C05 Ctss	C06 Cxcr4	C07 Dapk1	C08 Eif2ak3	C09 Eif4g1	C10 Esr1	C11 Fadd	C12 Fas
D01 Gaa	D02 Gabarap	D03 Gabarapl2	D04 Hdac1	D05 Hdac6	D06 Hgs	D07 Hsp90aa1	D08 Hspa8	D09 Htt	D10 Ifna2	D11 Ifna4	D12 Ifng
E01 Igf1	E02 Ins2	E03 Irgm	E04 Lamp1	E05 Map11c3a	E06 Map11c3b	E07 Mapk14	E08 Mapk8	E09 Nfkb1	E10 Ambra1	E11 Pik3c3	E12 Pik3cg
F01 Pik3r4	F02 Prkaa1	F03 Prkaa2	F04 Psen1	F05 Pten	F06 Rab24	F07 Rb1	F08 Rb1cc1	F09 RGD1359310	F10 Rgs19	F11 Rps6kb1	F12 Snca
G01 Sqstm1	G02 Tgfb1	G03 Tgm2	G04 Tm9sf1	G05 Dram2	G06 Tnf	G07 Tnfsf10	G08 Tp53	G09 Tp73	G10 Ulk1	G11 Uvrag	G12 Wipi1
H01 Rplp1	H02 Hprt1	H03 Rpl13a	H04 Ldha	H05 Actb	H06 CAG	H07 CTR	H08 CTR	H09 CTR	H10 CPP	H11 CPP	H12 CPP
Genes de referencia					Control ADNg	Controles de la transcripción inversa			Controles positivos PCR		

Figura 17. Disposición de los genes en la matriz de Autofagia. 84 genes funcionales de autofagia; 5 genes de referencia para normalizar los datos de las matrices; 1 gen control de ADN genómico; 3 controles de la transcripción inversa; y 3 controles positivos de la PCR.

Además, se recoge en una tabla información de cada gen: su posición en la matriz, número de acceso en el GenBank, símbolo, descripción y nombre/nombres que reciben (Tabla 12).

TABLA 12. INFORMACIÓN DE CADA GEN EN LA MATRIZ DE AUTOFAGIA

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
A01	Rn.11422	NM_033230	Akt1	Homólogo 1 del oncogén viral de timoma murino v-akt	Akt
A02	Rn.2104	NM_019288	App	Proteína precursora beta amiloide (A4)	-
A03	Rn.23323	NM_001034933	Arsa	Arilsulfatasa A	MGC125207
A04	Rn.94004	NM_033443	Arsb	Arilsulfatasa B	-
A05	Rn.6224	NM_001038495	Atg12	Homólogo de ATG12 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	Apg12l, MGC125080
A06	Rn.101734	NM_001108809	Atg16l1	ATG16 relacionado con la autofagia tipo 1 (<i>S.cerevisae</i>)	Apg16l, Wdr30
A07	Rn.104199	NM_0011915560	Atg16l2	ATG16 relacionado con la autofagia tipo 2 (<i>S.cerevisae</i>)	RGD1311400
A08	Rn.3084	NM_134394	Atg3	Homólogo de ATG3 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	Apg3l, PIG-1, Pig1
A09	Rn.163086	NM_001025711	Atg4b	Homólogo B de ATG4 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	Apg4b, MGC112887
A10	Rn.23378	NM_001107948	Atg4c	Homólogo C de ATG4 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	-
A11	Rn.98385	NM_001014250	Atg5	Homólogo de ATG5 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	-
A12	Rn.162765	NM_001012097	Agt7	Homólogo de ATG7 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	Apg7l
B01	Rn.35248	NM_001014218	Atg9a	Homólogo A de ATG9 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisae</i>)	MGC105908, RGD1310450
B02	Rn.36696	NM_022698	Bad	Agonista de BCL2, asociada a muerte celular	MGC72439
B03	Rn.14598	NM_053812	Bak1	Antagonista de BCL2/muerte 1	MGC108627
B04	Rn.10668	NM_017059	Bax	Proteína X asociada a Bcl2	-
B05	Rn.9996	NM_016993	Bcl2	CLL/ linfoma de células B2	Bcl-2
B06	Rn.10323	NM_031535	Bcl2l1	Bcl2 tipo 1	Bcl-xl, Bcl2l, Bclx, bcl-X
B07	Rn.2776	NM_053739	Becn1	Beclina 1, relacionada com autofagia	-
B08	Rn.31142	NM_022684	Bid	Agonista de muerte con dominio de interacción BH3	-
B09	Rn.2060	NM_053420	Bnip3	Proteína de interacción 3 BCL2/adenovirus E1B	MGC93043
B10	Rn.10562	NM_012922	Casp3	Caspasa 3	Lice, MGC93645
B11	Rn.54474	NM_022277	Casp8	Caspasa 8	-
B12	Rn.29897	NM_031762	Cdkn1b	Inhibidor 1B de la quinasa dependiente de ciclina	CDKN4, Cdk1b, Kip1, P27KIP1, p27
C01	Rn.48717	NM_031550	Cdkn2a	Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina	Arf, INK4A, MTS1, p16, p16Cdkn2a, p19ARF

Tabla 12 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
C02	Rn.102386	NM_001006971	Cln3	Ceroidlipofuscinosis neuronal 3	MGC94583
C03	Rn.100909	NM_022597	Ctsb	Catepsina B	-
C04	Rn.11085	NM_134334	Ctsd	Catepsina D	-
C05	Rn.11347	NM_017320	Ctss	Catepsina S	-
C06	Rn.44431	NM_022205	Cxcr4	Receptor de quimiocina 4 (motivo CXC)	MGC108696
C07	Rn.23108	NM_001107335	Dapk1	Proteína quinasa 1 asociada a muerte	-
C08	Rn.24897	NM_031599	Eif2ak3	Quinasa 3 del factor eucariótico iniciador de la traducción 2 alfa	PEK
C09	Rn.101803	XM_213569	Eif4g1	Factor eucariótico 4 iniciador de la traducción 1 gamma	-
C10	Rn.10595	NM_012689	Esr1	Receptor de estrógenos 1	ER-alfa, Esr, RNESTROR
C11	Rn.16183	NM_152937	Fadd	Dominio de muerte asociado a Fas (TNFRSF6)	Mort1
C12	Rn.162521	NM_139194	Fas	Fas (Miembro de la superfamilia del receptor de TNF 6)	Tnfrsf6
D01	Rn.162368	NM_199118	Gaa	Alfa glucosidasa ácida	MGC72625
D02	Rn.8411	NM_172036	Gabarap	Proteína asociada al receptor GABA (A)	-
D03	Rn.64537	NM_022706	Gabarap12	Proteína tipo 2 asociada al receptor GABA (A)	Gef2, MGC108686
D04	Rn.1863	NM_001025409	Hdac1	Histona deacetilasa 1	-
D05	Rn.13453	XM_228753	Hdac6	Histona deacetilasa 6	-
D06	Rn.21	NM_019387	Hgs	Sustrato tirosina quinasa regulador del factor de crecimiento de hepatocitos	Hrs
D07	Rn.119867	NM_175761	Hsp90aa1	Proteína de choque térmico 90, alfa (citósólica), miembro 1 de la clase A	Hsp86, Hsp90, Hspca, MGC105293
D08	Rn.120392	NM_024351	Hspa8	Proteína de choque térmico 8	Hsc70, MGC114311
D09	Rn.11193	NM_024357	Htt	Huntingtina	Hd, Hdh
D10	N/A	XM_233152	Ifna2	Gen 2 de la familia de interferones alfa	-
D11	Rn.218577	NM_001106667	Ifna4	Interferón alfa 4	-
D12	Rn.10795	NM_138880	Ifng	Interferón gamma	IFNG2
E01	Rn.6282	NM_178866	Igf1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1	-
E02	Rn.989	NM_019130	Ins2	Insulina 2	-
E03	Rn.20356	NM_001012007	Irgm	Familia GTPasa M relacionada con la inmunidad	Ifi1
E04	Rn.40177	NM_012857	Lamp1	Proteína de membrana 1 asociada al lisosoma	LGP120
E05	Rn.3135	NM_199500	Map11c3a	Proteína 1 de cadena ligera 3 alfa asociada a microtúbulos	MGC105263

Tabla 12 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
E06	Rn.41412	NM_022867	Map1lc3b	Proteína 1 de cadena ligera 3 beta asociada a microtúbulos	MGC93422, Map1lc3, Mpl3, zbs559
E07	Rn.88085	NM_031020	Mapk14	Proteína quinasa 14 activadora de mitógenos	CRK1, CSBP, CSBP1, Csbp1, Csbp2, Exip, Hog, MGC105413, Mxi2, Prkm14, Prkm15, RK, Sapk2A, p38, p38Hog, p38alfa
E08	Rn.4090	XM_341399	Mapk8	Proteína quinasa 8 activadora de mitógenos	JNK
E09	Rn.2411	XM_342346	Nfkb1	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	NF-kB
E10	Rn.133954	NM_001134341	Ambra1	Regulador 1 de autofagia/beclina 1	Nyw1
E11	Rn.30010	NM_022958	Pik3c3	Fosfoinositida -3- quinasa, clase 3	-
E12	Rn.152697	NM_001106723	Pik3cg	Fosfoinositida -3- quinasa, catalítica, polipéptido gamma	Pi3k
F01	Rn.8917	NM_001108777	Pik3r4	Fosfoinositida -3- quinasa, subunidad reguladora 4	-
F02	Rn.87789	NM_019142	Prkaa1	Proteína quinasa, activada por AMP, subunidad catalítica alfa 1	5'-AMP ó 5-AMP- proteína quinasa activada subunidad catalítica alfa 1
F03	Rn.64583	NM_023991	Prkaa2	Proteína quinasa, activada por AMP, subunidad catalítica alfa 2	AMPK
F04	Rn.44440	NM_019163	Psen1	Presenilina 1	-
F05	Rn.22158	NM_031606	Pten	Homólogo de fosfatasa y tensina	MMAC1, Mmac, TEP1
F06	Rn.6295	NM_001015023	Rab24	RAB24, miembro de la familia de oncogenes RAS	MGC108835
F07	Rn.55115	NM_017045	Rb1	Retinoblastoma 1	-
F08	Rn.33137	NM_001107901	Rb1cc1	RB1- bobina en espiral inducible 1	-
F09	Rn.4038	NM_001007659	RGD13593 10	Similar a RIKEN ADNc 9430023L20	Atg101, MGC94201
F10	Rn.88166	NM_021661	Rgs19	Regulador 19 de señalización de proteínas G	Camki, Gaip, MGC108699
F11	Rn.4042	NM_031985	Rps6kb1	Proteína ribosomal 6 quinasa, polipéptido 1	-
F12	Rn.1827	NM_019169	SncA	Sinucleína, (componente alfa A4 no de precursor amiloide)	MGC105443
G01	Rn.107103	NM_181550	Sqstm1	Secuestrosoma 1	Osi, ZIP, ZIP3
G02	Rn.40136	NM_021578	Tgfb1	Factor transformador de crecimiento, beta 1	-

Tabla 12 (continuación)

Posición	Unigen	GenBank	Símbolo	Descripción	Nombre/s del gen
G03	Rn.10	NM_019386	Tgm2	Transglutaminasa 2, polipéptido C	Tgasell
G04	Rn.12071	NM_001012155	Tm9sf1	Miembro 1 de la superfamilia transmembrana 9	-
G05	Rn.1279	NM_001025018	Dram2	Modulador de autofagia 2 regulador del daño en el ADN	MGC109061, Tmem77
G06	Rn.2275	NM_012675	Tnf	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	MGC124630, RATTNF, TNF-alfa, Tnfa
G07	Rn.83627	NM_145681	Tnfsf10	Miembro 10 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	Trail
G08	Rn.54443	NM_030989	Tp53	Proteína tumoral p53	MGC112612, Trp53, p53
G09	Rn.103860	NM_001108696	Tp73	Proteína tumoral p73	P73, Trp73
G10	Rn.24509	NM_001108341	Ulk1	Quinasa 1 tipo Unc-51 (<i>C.elegans</i>)	-
G11	Rn.99218	NM_001107536	Uvrag	Gen de resistencia asociado a la radiación UV	-
G12	Rn.203725	NM_001127297	Wipi1	Dominio de repetición WD interactuando con fosfoinositida 1	RGD1307754
H01	Rn.973	NM_001007604	Rplp1	Proteína ribosomal, grande, P1	MGC72935
H02	Rn.47	NM_012583	Hprt1	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1	Hgprtase, Hprt, MGC112554
H03	Rn.92211	NM_173340	Rpl13a	Proteína ribosomal L13A	-
H04	Rn.107896	NM_017025	Ldha	Lactato deshidrogenasa A	Ldh1
H05	Rn.94978	NM_031144	Actb	Beta actina	Actx
H06	N/A	U26919	CAG	Control de ADN genómico	CAG
H07	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H08	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H09	N/A	SA_00104	CRT	Control de la transcripción inversa	CRT
H10	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP
H11	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP
H12	N/A	SA_00103	CPP	Control positivo de la PCR	CPP

Tabla 12. Posición, número de acceso en GenBank, símbolo, descripción y nombre de cada gen de la matriz de Autofagia de rata.

Los **componentes de la maquinaria de la autofagia** presentes en la matriz pueden agruparse en:

- Formación de la vacuola autofágica: Atg12, Atg16l1, Atg4b, Atg4c, Atg5, Atg9a, Becn1, Ctsd, Gabarap, Gabarapl2, Irgm, Map1lc3a, Map1lc3b, Ambra1, Psen1, Rb1cc1, RGD1359310, Rgs19, Tm9sf1, Ulk1, Wipi1
- Responsables de dirigir proteínas a las membranas/vacuolas: Atg4b, Atg4c, Gabarap

- Transporte de proteínas: Atg16l1, Atg16l2, Atg3, Atg4b, Atg4c, Atg7, Atg9a, Gabarap, Gabarapl2, Rab24
- Genes de unión del autofagosoma al lisosoma: Arsb, Gabarap
- Genes involucrados en la ubiquitinación de proteínas: Atg3, Atg7
- Genes con actividad proteasa: Atg4b, Atg4c, Ctsd

En cuanto a los **genes encargados de la regulación de la autofagia**, se pueden clasificar en:

- Correguladores de autofagia y apoptosis: Akt1, App, Atg12, Atg5, Bad, Bak1, Bax, Bcl2, Bcl2l1, Becn1, Bid, Bnip3, Casp3, Casp8, Cdkn1b, Cdkn2a, Cln3, Ctsb, Cxcr4, Dapk1, Eif2ak3, Fadd, Fas, Hdac1, Htt, Ifna2, Ifng, Igf1, Ins2, Mapk8, Nfkb1, Pik3cg, Prkaa1, Pten, Snca, Sqstm1, Tgfb1, Tgm2, Tnf, Tnfsf10, Tp53, Tp73
- Correguladores de autofagia y ciclo celular: Bax, Cdkn1b, Cdkn2a, Ifng, Pten, Rb1, Tgfb1, Tp53, Tp73
- Inducción de autofagia por patógenos intracelulares: Eif2ak3, Ifna2, Ifna4, Ifng, Lamp1
- Autofagia en respuesta a otras señales intracelulares: Arsa, Ctss, Eif4g1, Esr1, Gaa, Hdac6, Hgs, Mapk14, Pik3c3, Pik3r4, Prkaa2, Rps6kb1, Dram2, Uvrag
- Autofagia mediada por chaperonas: Hsp90aa1, Hspa8

A continuación, se muestra un diagrama del trabajo seguido para analizar la expresión de genes a partir de los cultivos organotípicos y células primarias (Figura 18):

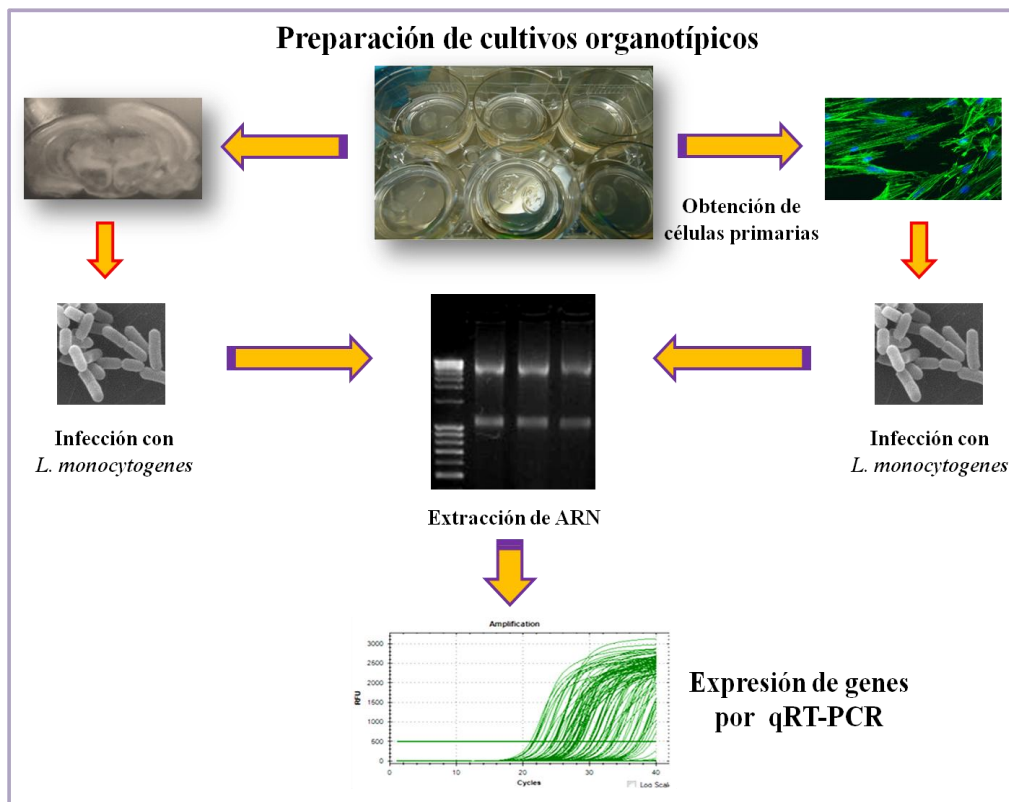


Figura 18. Esquema de trabajo seguido para el estudio de la expresión de genes.

3.7. Análisis de datos y estadística

Los datos de C_t obtenidos tras la realización de la qRT-PCR se clasificaron para su posterior análisis en una plantilla del programa Excel, versión 2007. Los resultados se analizaron a través del portal web de análisis de datos de las matrices de qPCR [SABiosciences] (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). El valor máximo de C_t para examinar los resultados se estableció en 35.

Este software analiza los datos de C_t a través del método delta C_t (ΔC_t). El ΔC_t normalizado para cada gen de interés (GDI) se calculó restando la media C_t de los cinco genes de referencia de la C_t de cada GDI. A partir de este dato, se calcula el doble delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) para cada GDI por deducción de la media C_t de los GDI en el grupo control de la ΔC_t de cada GDI. El cambio o fold-change de cada GDI comparado con su correspondiente en el grupo control, se calcula como el

$2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor obtenido representa los resultados del fold-change de una manera biológicamente significativa. Un valor de fold-change mayor de 1 indica una regulación positiva o sobreexpresión del gen, y el fold-regulation (en adelante, nivel de expresión relativa) es igual que el fold-change. Por el contrario, un fold-change menor de 1 indica una regulación negativa o represión de la expresión del gen, y el nivel de expresión relativa es la inversa negativa del fold-change.

El valor de p de cada gen se calculó en base al test estadístico t de Student de los valores del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada gen, en los grupos control e infectados. Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Además, este portal web examina los valores C_t de los pocillos control:

- a. Control de ADN genómico. Siempre se tiene que comprobar que este valor sea mayor de 35, lo que indica que el nivel de contaminación es demasiado bajo como para afectar a los resultados de expresión génica.
- b. Controles de la transcripción inversa. Valora el ΔC_t resultante de la resta de la media de los C_t de los controles de RT y la media de los C_t de los controles de PCR positivos. Si éste es menor de 5, no es evidente la presencia de impurezas que podrían inhibir la transcripción inversa durante la amplificación.
- c. Controles positivos de la PCR. El valor medio de los C_t de estos controles debería ser 20 ± 2 ciclos en cada matriz de qPCR y no variar más de dos ciclos entre matrices o grupos de matrices que se comparan.

3.8. Análisis de citocinas mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Tras la infección de los 3D-OC de cerebro con *L. monocytogenes*, tal y como se describió en el apartado 3.2, se recogió el medio de cultivo en los diferentes tiempos de estudio (cortes control e infectados durante 1, 3, 5, 12 y 24 h para la cepa HUMV-4251 y durante 1, 5 y 24 h para el mutante en LLO) y se esterilizó por filtración (0,22 μm) [Millipore]. Al menos, tres sobrenadantes obtenidos de cortes control y tres de infectados se congelaron a -20°C para su posterior utilización.

Se cuantificaron mediante ELISA los niveles de las citocinas IL-6 (en la cepa clínica) e IL-1 β (en la cepa clínica y el mutante en LLO) secretados en el medio de los cultivos organotípicos, utilizando los kits de Invitrogen (Camarillo, CA) y Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), respectivamente. Cincuenta μ l de los sobrenadantes se diluyeron a la mitad con el Buffer de dilución estándar presente en el kit, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En los pocillos se incluyeron blancos, controles positivos para las interleucinas y pocillos para realizar la curva estándar en cada una de ellas. Tras la primera incubación, se lavaron las placas, y posteriormente se añadió el Ac secundario unido a biotina. Después de lavar de nuevo, se añadió la enzima estreptavidina-peroxidasa que se une al Ac secundario. Nuevamente, se realizó otro lavado para retirar la enzima que no se ha unido, y se añadió una solución sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) que reacciona con la enzima para producir color. La intensidad de este color es directamente proporcional a la concentración de citocinas presentes en los sobrenadantes. El valor de densidad óptica se obtuvo en un lector de microplacas de ELISA [Multiskan FC; Thermo Scientific] utilizando un filtro para la absorbancia de 450 nm. Las concentraciones de citocinas se cuantificaron a partir de la realización de la curva estándar. Como mínimo, se utilizaron dos cultivos organotípicos independientes para cada tiempo, por duplicado, y su concentración en pg/ml se calculó como la media \pm error típico de las muestras.

3.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Tanto los cultivos organotípicos control como los infectados con *L. monocytogenes* a los tiempos de 30 min, 45 min, 1 h, 3 h, 5 h, 12 h, 18 h y 24 h, y también las células primarias control e infectadas durante 1 h, se analizaron mediante SEM. Para ello, tras las infecciones, los cultivos organotípicos y las células dispuestas sobre cubreobjetos, se fijaron con glutaraldehído frío al 3% durante 20 min a 4°C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron a través de una serie ascendente de concentraciones de acetona [Fisher Scientific] (30%, 50%, 70%, 90% y 100%, v/v en agua destilada) incubándolas durante 10 min en cada una (en acetona 100% se realizaron 3 lavados de 10 min). Tras estos pasos, se procedió al secado de las muestras para evaporar la acetona, a través del método del punto crítico y se recubrieron las muestras con partículas de oro mediante un pulverizador de iones de capa fina JFC-1100 [JEOL] (proceso de pulverización catódica con partículas de oro). Finalmente, los cortes de tejidos organotípicos y las células primarias se observaron en un microscopio electrónico Inspect S [FEI

Company], trabajando a 15 o 20 kV con distintos aumentos. El secado por punto crítico, la pulverización con partículas de oro y las observaciones mediante SEM, se realizaron en el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Cantabria.

3.10. Microscopía óptica de cortes semifinos

Al igual que para la microscopía SEM, los tejidos organotípicos se fijaron con glutaraldehído frío al 3%. Para realizar cortes semifinos, los tejidos se volvieron a fijar con tetraóxido de osmio al 1%. Posteriormente, se deshidrataron a través de un gradiente de acetonas, se trataron con óxido de propileno y se embebieron en Araldita [Fluka, Buchs, Switzerland]. Se prepararon secciones semifinas con un microtomo (Ultratome LKB III) y se contrastaron con una solución de azul de toluidina al 1%. Las muestras se observaron con un microscopio *plus* Zeiss Axioskop 2 equipado con una cámara digital AxioCam HRc.

3.11. Microscopía de fluorescencia en células primarias

Las células aisladas de los cultivos organotípicos se cultivaron sobre cubreobjetos redondos de cristal, en placas de 24 pocillos. Alcanzada la confluencia aproximada del 70% ($1,4 \times 10^5$ células) en cada pocillo, se infectaron de la misma manera que lo descrito en el apartado 3.3. Así mismo, algunos pocillos se inocularon con 5 μ l de medio BHI como control. Tras la infección de 3 h, se lavaron los pocillos con PBS y las células se fijaron con PAF frío durante 20 min a T^a ambiente. Pasado este tiempo, se retiró el PAF y tras varios lavados con PBS la placa se guardó a 4°C hasta la realización de los ensayos de inmunofluorescencia.

Para proceder con la inmunofluorescencia, se realizaron dos tipos de marcajes. Por un lado, una tinción diferencial entre bacterias extracelulares e intracelulares; y por el otro, un marcaje de las bacterias totales.

En el primer caso, las muestras se incubaron 20 min con una mezcla de los anticuerpos policlonales α -*Listeria* L7 y α -*Listeria* L11 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron otros 20 min con el anticuerpo secundario verde

Alexa 488 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS). Tras los lavados del anticuerpo no fijado, las muestras se incubaron durante 5 min con tritón al 1% en PBS para permeabilizar las células y permitir el marcaje de las bacterias intracelulares. Para ello, las muestras se incubaron, de nuevo, durante 20 min con la mezcla de los anticuerpos α -*Listeria* L7 y α -*Listeria* L11. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron otros 20 min con el anticuerpo secundario rojo Alexa 594 (a una concentración 1:750 en BSA-PBS). Tras el lavado con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield™ [Sigma Aldrich] que contiene DAPI.

Para el marcaje de las bacterias totales, las muestras se incubaron durante 5 min con tritón al 1% en PBS. A continuación, se incubaron durante 20 min con una mezcla de los anticuerpos policlonales α -*Listeria* (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS). Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron otros 20 min con el anticuerpo secundario rojo Alexa 594 (a una concentración 1:750 en BSA-PBS). Tras el lavado de este anticuerpo, se incubaron con el anticuerpo secundario Faloidina-Atto 488 (verde) [Sigma] durante 35 min a una concentración 1:200, que se une fuertemente a las fibras y filamentos de actina del citoesqueleto celular. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield™ [Sigma Aldrich] que contiene DAPI.

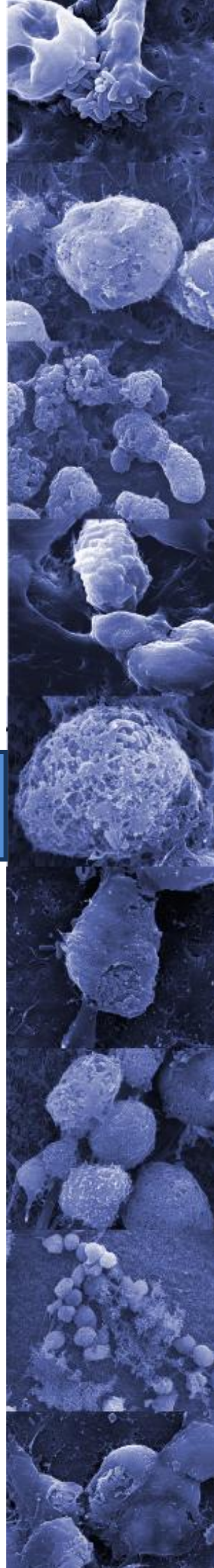
Finalmente, los cubreobjetos, con ambos tipos de marcaje, se sellaron a los portaobjetos con laca de uñas y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta que se observaron en el microscopio.

Todas las preparaciones se examinaron utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 200. A partir de estas preparaciones, se procedió al recuento del número de bacterias presentes en los distintos tipos celulares, en diferentes campos de las preparaciones, clasificándolas según tuvieran: más de 10 bacterias, menos de 10, o ninguna. Las tasas de infección de los distintos tipos celulares se basaron en los valores medios de los recuentos y se definieron como el porcentaje de células de un tipo celular infectadas por *L. monocytogenes*. Las imágenes se adquirieron usando una cámara digital Zeiss AxioCamHRc incorporada en el microscopio. Para la fusión y tratamiento de las imágenes se utilizó el programa Photoshop CS3 (Adobe).

3.12. Microscopía confocal en células primarias

Las muestras para microscopía laser confocal se prepararon siguiendo el mismo protocolo que para los estudios de inmunofluorescencia. En este caso, las preparaciones se visualizaron usando un microscopio confocal Nikon A1R con lasers de 405 nm, 488 nm, y 561 nm. Las reconstrucciones tridimensionales de las series de secciones ópticas (a una distancia de 0,2 – 0,5 μm en el eje vertical) se fusionaron a través del uso de los programas NisElements Ar 3.2 (<http://www.nis-elements.com>) e ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Resultados



1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *LISTERIA*

Tras la recepción de las cepas de *L. monocytogenes* en nuestro laboratorio, tratamos de caracterizar un poco más en profundidad cada una de ellas. Para esto, se detectó por PCR el gen de la hemolisina que codifica la LLO (específica de *L. monocytogenes*); se realizaron pruebas CAMP para observar los distintos grados de hemólisis de las cepas; y se secuenció parcialmente el ARN ribosómico 16S. Además, para los estudios de inmunofluorescencia que se realizarían *a posteriori*, se comprobó el marcaje de las cepas con los anticuerpos policlonales obtenidos en conejos a partir de la cepa de referencia *L. monocytogenes* 10430S y de dos cepas de origen clínico (*L. monocytogenes* HUMV-3292 y HUMV-4771).

1.1. Amplificación por PCR de la listeriolisina O

Para la realización de la PCR, se extrajo primero el ADN de las cepas clínicas de *L. monocytogenes*, de *L. monocytogenes* EGD-GFP como control positivo del gen LLO, y de la cepa *L. innocua* como control negativo (especie no patógena) (Figura 19).

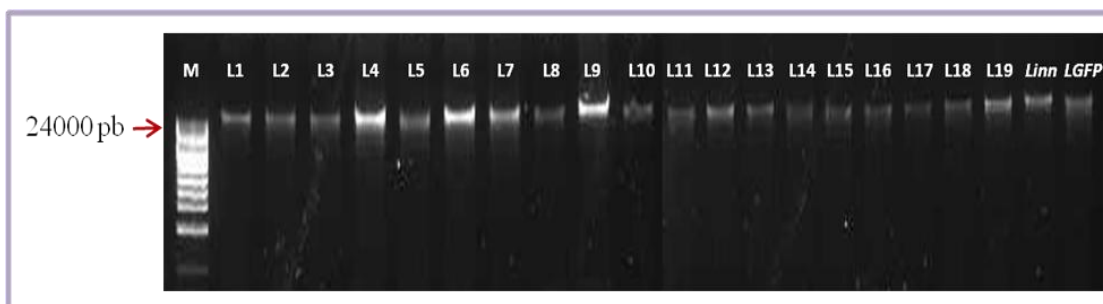


Figura 19. Comprobación de la extracción del ADN genómico bacteriano. M, Marcador de ADN 24 Kb exACTGene [Fisher Scientific]; ADN de las cepas clínicas de *L. monocytogenes* (L1-L19), *L. innocua* (Linn) y *L. monocytogenes* EGD-GFP (LGFP).

Una vez extraído el ADN, se realizó una PCR para amplificar la LLO. La amplificación se confirmó por la visualización del producto de PCR (267 pb) en todas las cepas. Además, se observó la ausencia de amplificación del gen en la cepa *L. innocua* (Figura 20).

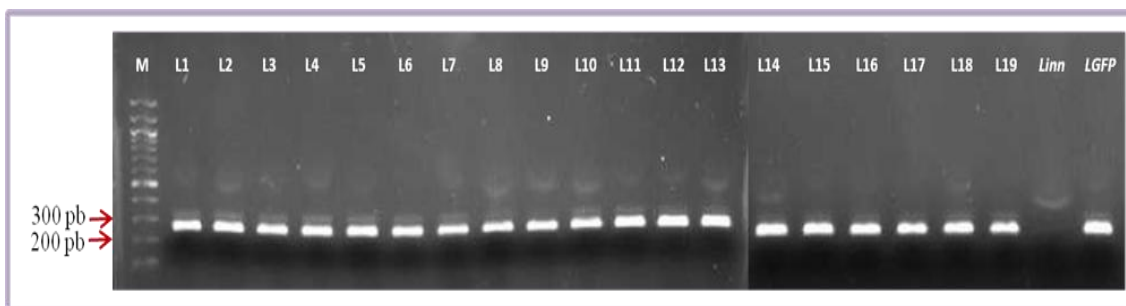


Figura 20. Amplificación del fragmento específico de LLO. M, Marcador de ADN 100 pb [BioLabs]; Presencia de LLO en las cepas clínicas de *L. monocytogenes* (L1-L19) y en *L. monocytogenes* EGD-GFP (LGFP); Ausencia de LLO en *L. innocua* (Linn).

1.2. Prueba CAMP

Para realizar el test de CAMP en las cepas de *Listeria*, se utilizaron dos cepas hemolíticas de *R. equi* de origen humano, disponibles en el laboratorio.

Tras 48 h de incubación, ambas cepas de *R. equi* produjeron el mismo grado de hemólisis frente a las cepas de estudio. En las placas de AS, se observó una lisis alrededor de las cepas testadas, incrementándose en las zonas donde la hemólisis de los dos microorganismos se entrecruza. En el extremo de algunas de las estrías, la hemólisis presentó una forma circular o de raqueta, descrita como específica de *L. monocytogenes* (en *L. ivanovii* es semicircular o en forma de pala). Dos cepas clínicas de *L. monocytogenes* (L14 y L18) se mostraron negativas junto con *L. innocua*, ejemplo de cepa no hemolítica, CAMP negativa.

Con esta prueba se detectó de nuevo la presencia de la LLO en las cepas de *Listeria*, ya que se sabe que éste es el factor citolítico involucrado en la reacción de CAMP con *R. equi*. Los resultados demostraban que la mayoría de las cepas estudiadas de *L. monocytogenes* fueron positivas para la reacción de CAMP, y por lo tanto, son hemolíticas, aunque cabe destacar la ausencia de actividad evidente en dos de los aislados clínicos. A continuación, se recogen en una tabla las reacciones de *R. equi* con *L. monocytogenes* clasificadas por las observaciones de hemólisis débil (+), moderada (++) , fuerte (+++); o ausencia de la misma (-) (Tabla 13). Además,

se muestran como ejemplos algunas imágenes de la hemólisis producida en las placas de AS (Figura 21). Las variaciones en la zona de hemólisis sinérgica se pueden asociar con la distinta capacidad de las cepas para secretar LLO.

<i>R. equi</i> vs <i>Listeria</i>	Hemólisis	<i>R. equi</i> vs <i>Listeria</i>	Hemólisis
L1	++	L12	++
L2	++	L13	++
L3	++	L14	-
L4	++	L15	++
L5	++	L16	++
L6	++	L17	++
L7	++	L18	-
L8	++	L19	++
L9	++	L.EGD-GFP	+++
L10	++	<i>L. innocua</i>	-
L11	+		

Tabla 13. Test de CAMP entre *L. monocytogenes* y *R. equi*.

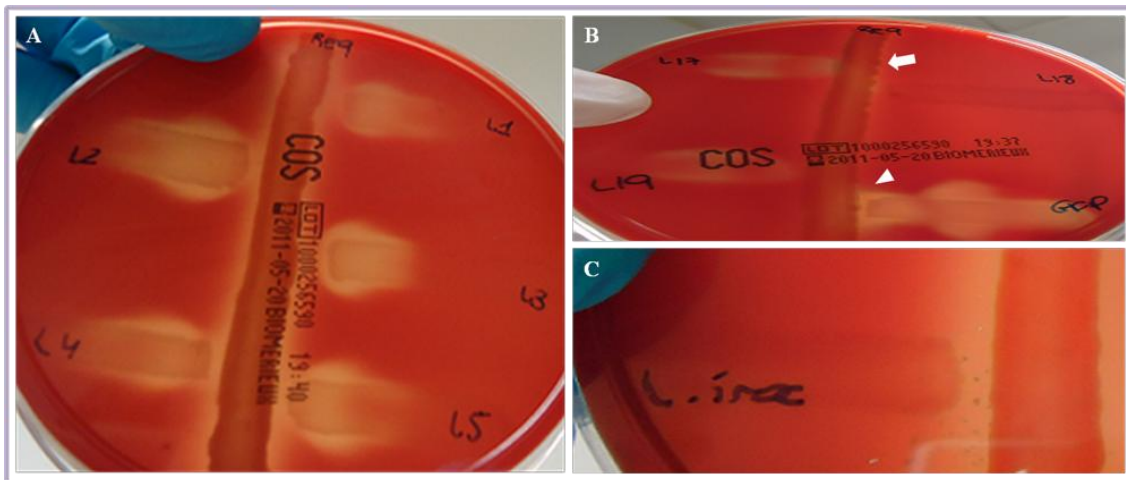


Figura 21. Ejemplos de la hemólisis producida en las placas de agar sangre por distintas cepas de *Listeria*. A, Ejemplos de hemólisis moderada en las cepas L1, L2, L3, L4 y L5 de *L. monocytogenes*. B, Ausencia de hemólisis en la cepa L18 (flecha) y fuerte hemólisis producida entre *R. equi* ReB9 y la cepa *L. monocytogenes* EGD-GFP (cabeza de flecha). C, Control negativo de hemólisis en la cepa *L. innocua*.

1.3. Identificación bacteriana mediante secuenciación parcial del ARNr 16S

El análisis de la secuencia génica del ARNr 16S permitió la identificación rápida y precisa de las bacterias mediante la comparación con bases de datos que contienen un amplio número de secuencias bacterianas.

Para la identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S se realizaron tres etapas: amplificación por PCR del gen en las cepas a secuenciar; determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón; y análisis de la secuencia.

PCR del gen 16S

Se realizó la PCR del gen ARNr 16S en cada cepa de *Listeria*, comprobando la presencia de un único fragmento de 1000 pb mediante electroforesis (Figura 22). *R. equi* (ReB3) fue utilizado como control positivo de la amplificación del gen ya que los primers utilizados se habían validado anteriormente en el laboratorio con esta cepa.

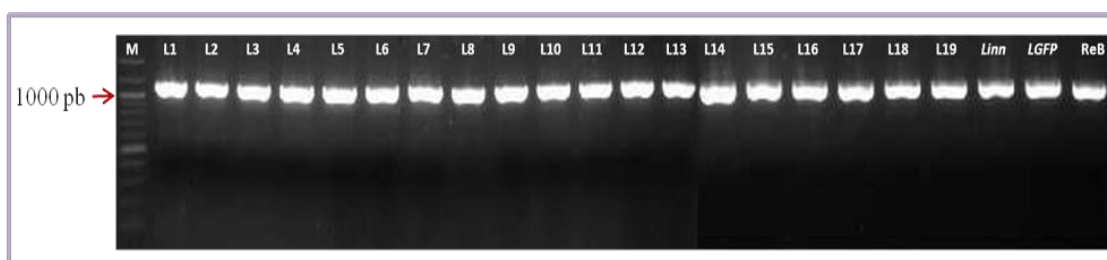


Figura 22. Amplificación parcial del gen ARNr 16S. M: Marcador de ADN 100 pb [BioLabs]; Fragmento del gen ARNr 16S de las cepas de *Listeria* utilizadas y de *R. equi* (ReB).

Secuenciación

Comprobado el tamaño adecuado del amplicón para cada cepa, el resto del producto de PCR se cuantificó mediante un nanodrop. El rango de concentraciones fue de 742,25 ng/ μ l hasta 1174,6 ng/ μ l, ajustándolos para su secuenciación a 15 ng/ μ l.

Tras la secuenciación, se obtuvo la secuencia de bases nitrogenadas de las 21 cepas analizadas (19 cepas clínicas de *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes* EGD-GFP y *L. innocua*). Un ejemplo se muestra en la Figura 23.

```
5'CGTGCTATACATGCAGTCGAACGAACGGAGGAAGAGCTTGCTCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
CGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGTTACAGATGGG
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTCGGAT
CGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGTAACTGTTGCCCTTGACGGTATCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCC-3'
```

Figura 23. Secuencia de 574 bases obtenida para la cepa HUMV-4251 (L15).

Análisis de la secuencia

Una vez que se tuvieron las secuencias de todas las cepas de *Listeria* se compararon con las que existen en las bases de datos para tratar de identificar cada una de ellas. Al realizar esto, todas nuestras cepas se identificaron como *L. monocytogenes* con un 99% de identidad máxima con respecto a las secuencias recogidas en la base de datos.

A continuación, se muestra una parte del resultado del análisis obtenido para la cepa HUMV-4251, a partir de la secuencia indicada anteriormente (**Tabla 14**):

Descripción	Punt. máx	Punt. total	Simil. máx	Valor E	Ident	Acceso
<i>Listeria monocytogenes</i> cepa Shia-L2.1 Gen ARNr 16S, secuencia parcial	1012	1012	98%	0,0	99%	FJ160767.1
<i>Listeria monocytogenes</i> cepa Shia-L1.1 Gen ARNr 16S, secuencia parcial	1009	1009	99%	0,0	99%	FJ160766.1
<i>Listeria monocytogenes</i> R479a cromosoma, secuencia completa	1005	5025	98%	0,0	99%	HG813247.1
<i>Listeria monocytogenes</i> cepa L11 Gen ARNr 16S, secuencia parcial	1005	1005	98%	0,0	99%	KF956739.1
<i>Listeria monocytogenes</i> cepa AMDK2 Gen ARNr 16S, secuencia parcial	1005	1005	98%	0,0	99%	KF894986.1
<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC1042, secuencia completa	1005	6020	98%	0,0	99%	CP007210.1

Punt. máx: puntuación máxima / Punt. total: puntuación total / Simil. máx: Similitud máxima / Ident: Identidad

Tabla 14. Análisis de las seis primeras secuencias que producen alineamientos significativos con la secuencia parcial de *L. monocytogenes*-4251. Resultados actualizados en abril 2014.

1.4. Marcaje de las cepas de *Listeria*

Para comprobar el marcaje de las cepas de *Listeria* con el anticuerpo policlonal anti-*L. monocytogenes* 10430S, se realizó una tinción rápida de las bacterias para inmunofluorescencia. Con este anticuerpo, no se obtuvo un marcaje óptimo en la mayoría de las cepas clínicas. Por el contrario, las cepas *L. monocytogenes* EGD-GFP, los mutantes, y *L. innocua* se tiñeron satisfactoriamente (Figura 24).

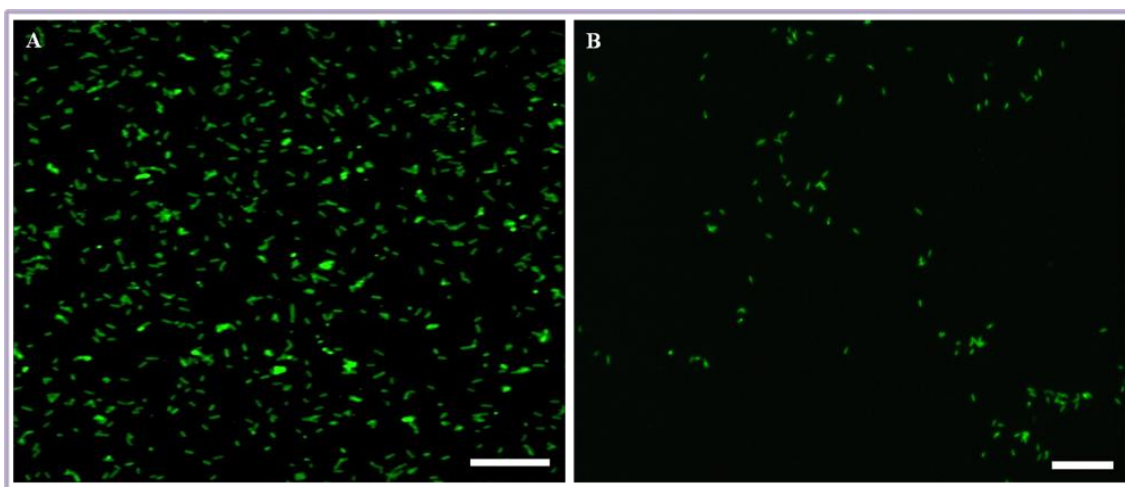


Figura 24. Marcaje de las cepas *L. monocytogenes* BUG 2140: Δ ActA (A) y *L. monocytogenes* BUG 2132: Δ Hly (B) con los anticuerpos α -*Listeria* 10430S y Alexa Fluor 488. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: A, 20 μ m; B, 10 μ m.

Con el fin de mejorar el marcaje, se seleccionaron las cepas HUMV-3292 y HUMV-4771 para ser utilizadas como antígenos en la obtención de dos nuevos antisueros de conejo.

Obtenidos los anticuerpos, se volvió a comprobar el marcaje de todas las cepas clínicas. Con los anticuerpos primarios generados, se consiguió una buena visualización de las mismas mediante microscopía de epifluorescencia, tanto con el anticuerpo secundario verde como con el rojo. Además, se probó a mezclar los dos anticuerpos α -3292 y α -4771 en una concentración 1:1000 en BSA, y el marcaje fue incluso superior (Figura 25).

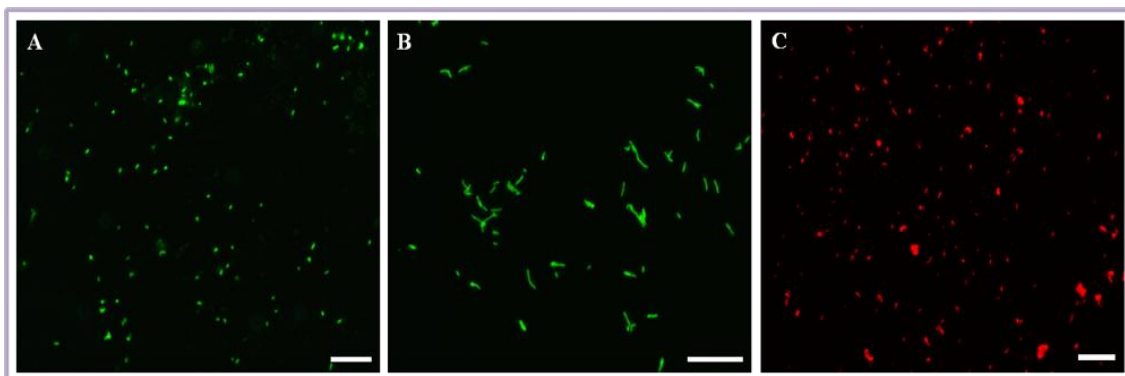


Figura 25. Marcaje de las cepas *L. monocytogenes* HUMV-4771 (A), *L. monocytogenes* HUMV-930 (B) y *L. monocytogenes* HUMV-4251 (C) con los anticuerpos α -3292/ α -4771 y Alexa Fluor 488 (en A y B) y α -3292/ α -4771 y Alexa Fluor 590 (en C). Aumentos originales: A y C, $\times 400$. B, $\times 1000$. Barras de escala: A y C, 10 μm ; B, 5 μm .

1.5. Elección de la cepa para las infecciones *in vitro*

Tras observar los resultados de los ensayos anteriores, todas las cepas clínicas de *L. monocytogenes* presentaron características similares y se identificaron correctamente. El hecho de que entre las cepas del Servicio de Microbiología hubiese dos aisladas en líquido cefalorraquídeo (HUMV-4771 y HUMV-4251, nº11 y nº15, respectivamente), nos hizo pensar en ellas como candidatas para los estudios de interacción bacteria-tejido y bacteria-célula en el contexto del SNC.

Entre estas dos, se decidió utilizar la cepa HUMV-4251, fundamentalmente, por dos motivos:

- Según la prueba CAMP, la hemólisis producida por esta cepa fue superior a la de la cepa 4771, y además, este tipo de hemólisis se daba en la mayoría del resto de cepas por lo que podría ser una cepa más representativa.
- La combinación de los anticuerpos policlonales generados a partir de las cepas clínicas HUMV-3292 y HUMV-4771 producía mejores resultados en los estudios de inmunofluorescencia para la cepa HUMV-4251 (L15).

1.6. Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* HUMV-4251

Se realizó una curva de crecimiento específica para la cepa HUMV-4251. Para cada tiempo de estudio, se obtuvieron, también, los datos de densidad óptica cuyos valores nos serían útiles para los experimentos de infección (Figura 26).

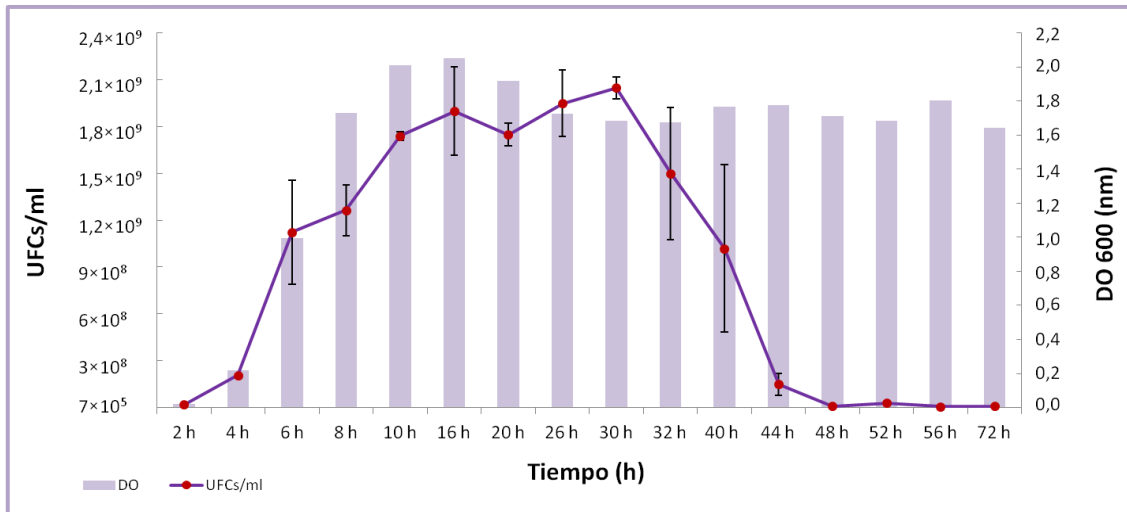


Figura 26. Gráfica lineal que muestra la curva de crecimiento de la cepa *L. monocytogenes* HUMV-4251 a lo largo del tiempo. Cada punto representa la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar. La gráfica de barras muestra los valores de densidad óptica obtenidos para cada tiempo de estudio.

Este análisis del crecimiento de la cepa a lo largo del tiempo, permitiría calcular el número aproximado de bacterias que se iban a inocular durante las infecciones, dependiendo del tiempo de crecimiento del cultivo.

2. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA INTERACCIÓN DE *L. MONOCYTOGENES* CON EL TEJIDO CEREBRAL

La primera parte importante de la tesis fue la realización y puesta a punto de la técnica para obtener cultivos organotípicos procedentes de cerebros de rata y mantenerlos *in vitro*, en condiciones óptimas, durante varias semanas. Una vez desarrollado el modelo y seleccionada la cepa de interés de *L. monocytogenes*, el primer objetivo que nos planteamos fue analizar microscópicamente las interacciones entre la bacteria y el tejido cerebral. Para ello, se utilizaron dos tipos de microscopía: electrónica de barrido y óptica de cortes semifinos.

2.1. SEM de tejidos no infectados (control)

En todas las infecciones experimentales, se mantuvieron tejidos sin infectar, para asegurar que nuestras observaciones mostrarían diferencias entre el tejido control y el infectado por la cepa clínica de *L. monocytogenes*. A bajos aumentos, los cortes control inspeccionados por SEM mostraban, en general, una superficie aplanada, sin aparente activación celular (Figura 27A y 28A). En todos ellos, se diferenciaba muy bien la corteza, bordeando el cultivo organotípico, con una apariencia completamente lisa a lo largo de toda su extensión (Figura 27B). Más en detalle, la superficie del tejido parece estar formada por una monocapa continua de células, de tipo epitelial. Las células de esta monocapa más superficial son extremadamente planas, mostrando tanto áreas de solapamiento como de uniones intercelulares clásicas (Figura 27C-D).

En la mayoría de los casos, la continuidad de la superficie de los explantes se alteraba por la presencia de una cavidad central de tamaño variable. A través de esta cavidad central, se podían identificar: células más alargadas con prolongaciones tipo neurona, más aplanadas de tipo epitelial, y células más redondeadas o hinchadas, con fenotipo de células microgliales (Figura 28).

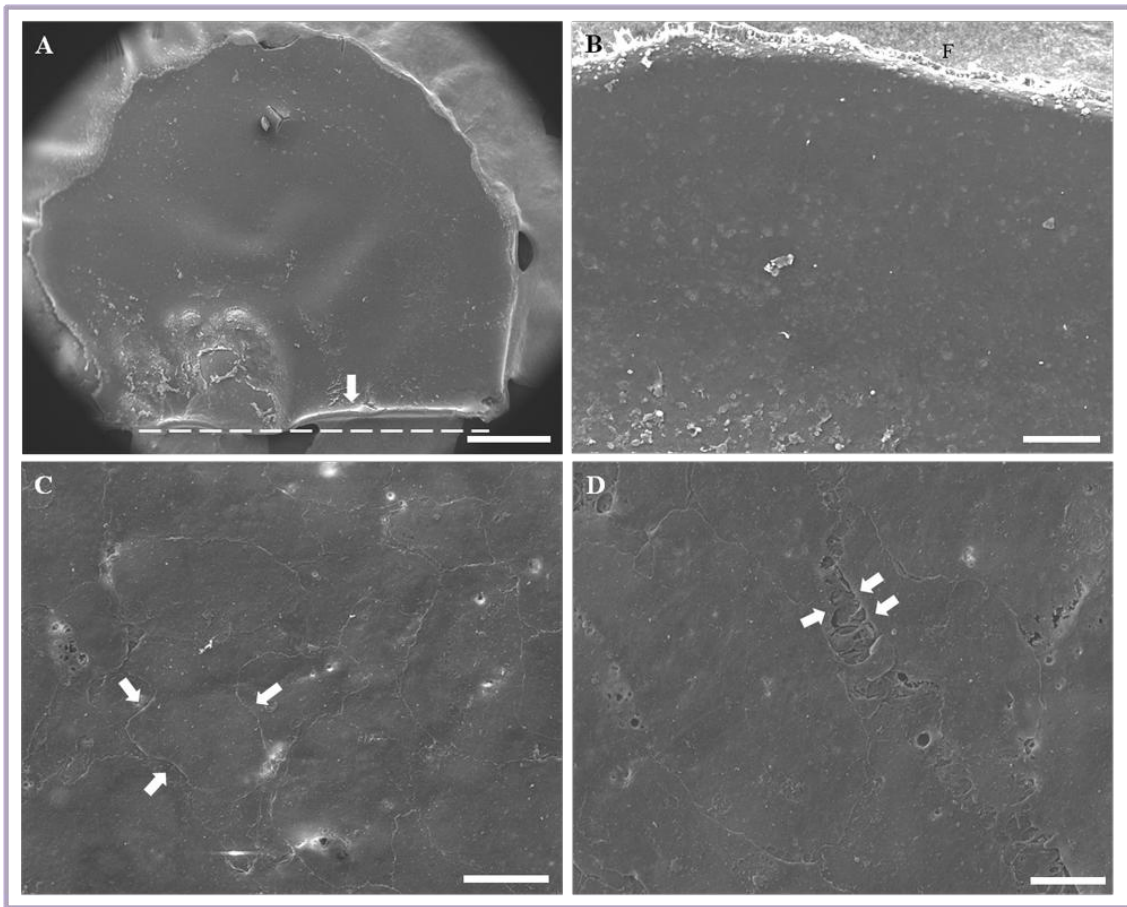


Figura 27. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos control. Tiempo, 24 h (A), 30 min (B), 3 h (C-D). A, Este panel muestra una de las mitades de un corte completo de cerebro, donde se observa el aspecto liso de la superficie. La línea de corte se localiza en la parte inferior (flecha y línea punteada). B, Ampliación de una zona de corteza que muestra ausencia de actividad celular. En la parte superior, se distingue el filtro de membrana (F) sobre el que se asienta el tejido. C, Capa de células planas en la superficie del tejido. Se puede observar el contorno de las células y las áreas de unión entre ellas (flechas). D, Detalle de las estrechas uniones intercelulares (flechas). Aumentos originales: A, $\times 50$; B, $\times 300$; C-D, $\times 5000$. Barras de escala: A, 1 mm; B, 150 μm ; C-D, 10 μm .

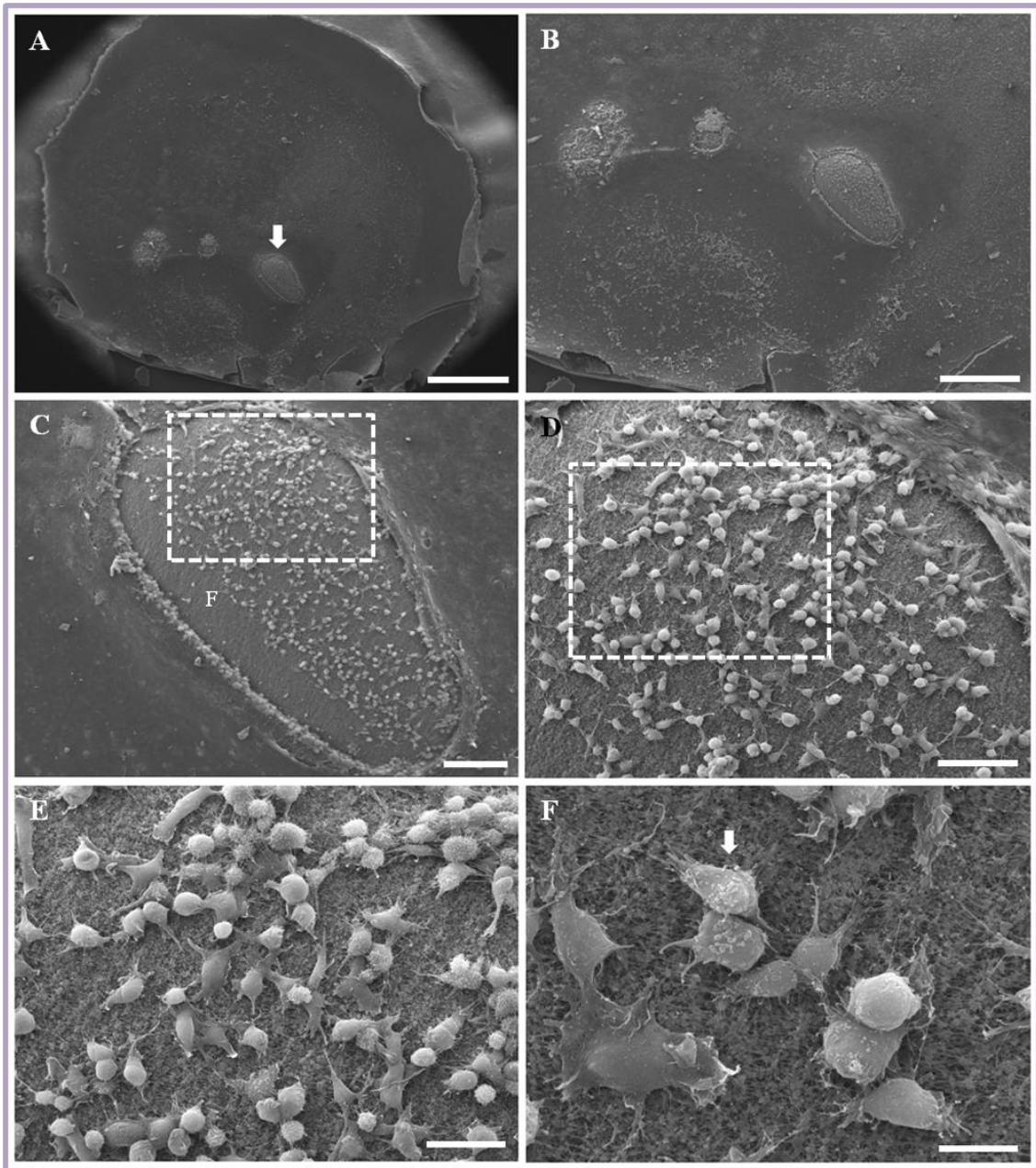


Figura 28. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos control. Tiempo, 30 min. A, Presencia de una cavidad central (flecha) y otras pequeñas fracturas en la superficie del tejido control. B, Ampliación de la vista inferior del corte mostrado en A. C, Vista general, a través de la cavidad central, de las células que componen el tejido, ancladas al filtro de la membrana (F). D, Detalle del área marcada en C. E, Detalle del área marcada en D. D y E, Panorámica de la diversidad celular del tejido. F, Identificación de células de microglía (flecha) en el tejido cerebral. Aumentos originales: A, $\times 50$; B, $\times 100$; C, $\times 400$; D, $\times 1000$; E, $\times 2000$; F, $\times 5000$. Barras de escala: A, 1 mm; B, 500 μm ; C, 100 μm ; D, 50 μm ; E, 25 μm ; F, 10 μm .

La cavidad central permitía observar también la superficie rugosa del filtro de membrana que se utiliza como soporte para los cultivos. Curiosamente, el área que lo rodea se caracterizaba por la presencia de células multipolares interconectadas por finas prolongaciones celulares, células ciliadas o endimarias y células sin cilios (Figura 29A-B). Además, un número reducido de células dispersas por la superficie del tejido parecían estar ligeramente activadas, ya que mostraban prolongaciones celulares (Figura 29C). De manera ocasional, se podían observar también algunas células muertas distribuidas por la superficie del tejido (Figura 29D).

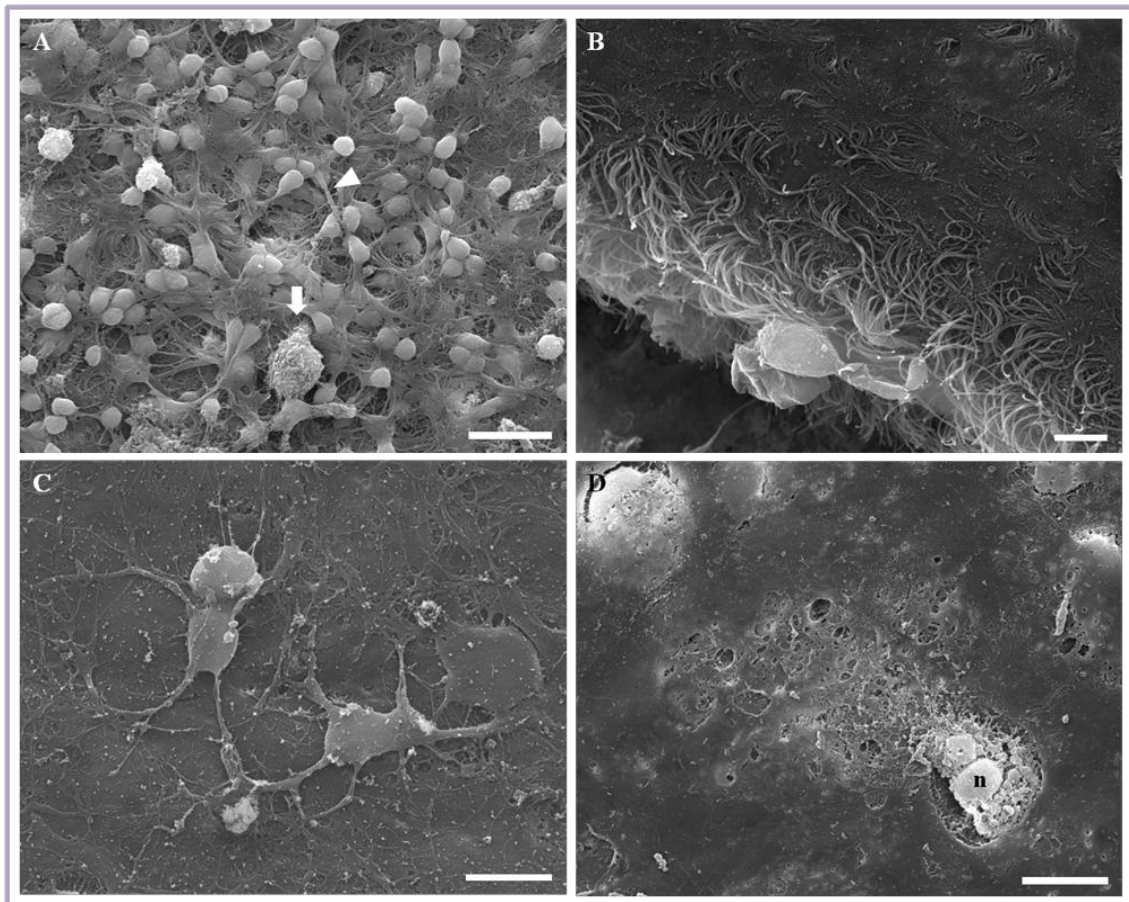


Figura 29. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos control. Tiempo, 30 min (A), 3 h (B), 24 h (C), 5 h (D). A, Vista de células de microglía (flecha) con rugosidades en su membrana (“ruffling”) y otros tipos celulares, como células multipolares interconectadas (cabeza de flecha) y células no ciliadas. B, Presencia de pequeñas áreas desprovistas de células planas, dominadas por la presencia de células ciliadas con largos cilios en su superficie, en la zona del epéndimo. C, Detalle de una célula activada con ramificaciones. D, Célula muerta en la superficie del tejido, en la que se puede apreciar el núcleo relativamente intacto (n). Aumentos originales: A, $\times 3000$; B, $\times 6000$; C-D, $\times 5000$. Barras de escala: A, 15 μm ; B, 5 μm ; C-D, 10 μm .

El espesor del tejido se puede analizar claramente a través del borde de los cortes o de fisuras posiblemente ocasionadas durante la preparación de la muestra. En él, se podían identificar desde la capa de células planas, hasta la superficie rugosa de la membrana sobre la que se asienta el corte. Entre estas dos zonas, se encontraban las células ya caracterizadas a través de la cavidad central (Figura 30). Con esto, se comprobó que todos los cortes del tejido representan un complejo entramado de las distintas interacciones celulares que dan consistencia al sistema.

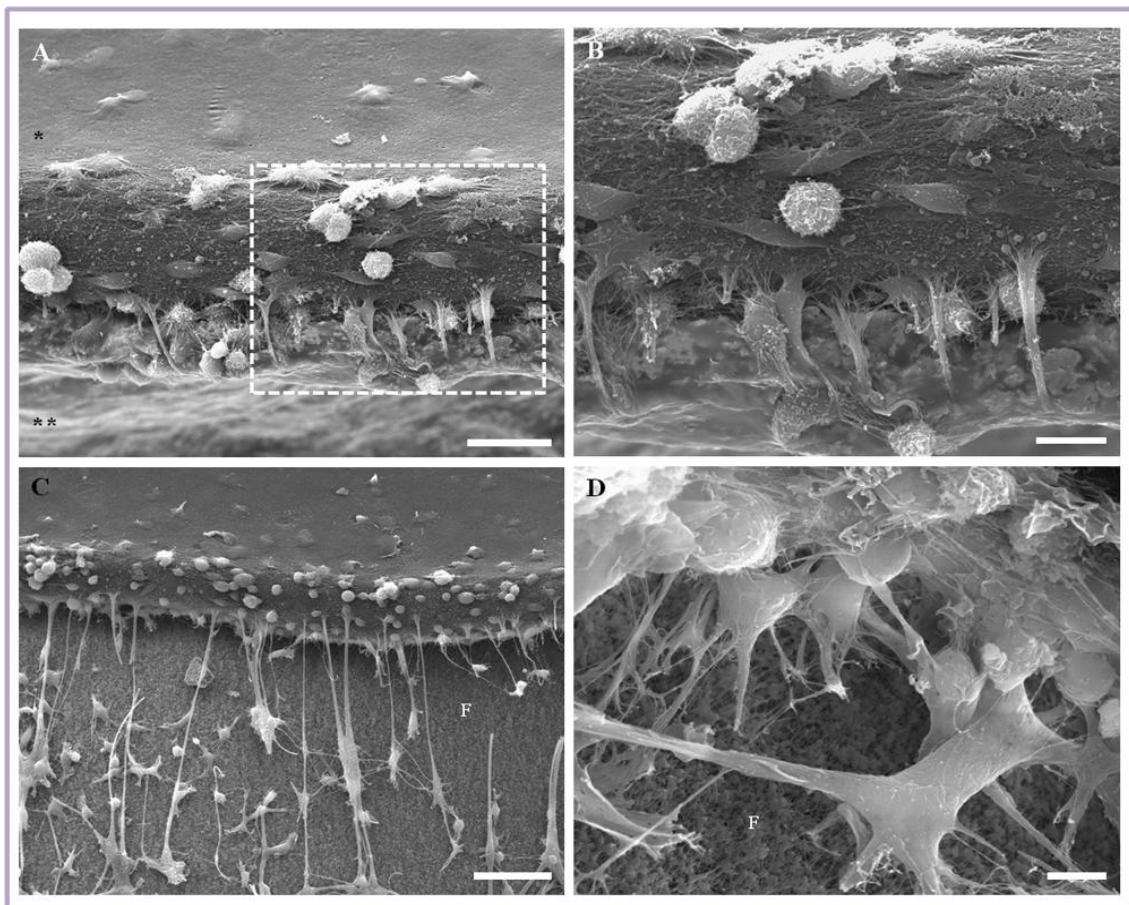


Figura 30. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos control. Tiempo, 30 min (A-C), 3 h (D). A, Espesor de un corte de cultivo organotípico, distinguiéndose desde la superficie (*) hasta la parte basal del tejido (**). B, Detalle del área marcada en A. Células del interior del tejido, dispuestas bajo la monocapa superficial de células planas. C, Células con largas prolongaciones que las mantienen estiradas desde el tejido hasta el filtro (F). D, Detalle de las células presentes en el tejido. Destaca la gran proyección celular emitida por una de las células para adherirse al filtro (F). Aumentos originales: A, $\times 2000$; B, $\times 4000$; C, $\times 900$; D, $\times 7000$. Barras de escala: A, 25 μm ; B, 10 μm ; C, 50 μm ; D, 5 μm .

2.2. Análisis de la infección a lo largo del tiempo mediante SEM

La microscopía de barrido nos ha permitido investigar la respuesta innata del SNC desencadenada por *L. monocytogenes*. La infección de los cortes con *L. monocytogenes* producía la activación de numerosas células, lo que alteraba la superficie del tejido. Ésta pasaba de una superficie lisa, a otra de apariencia claramente rugosa (Figura 31A), en comparación a la superficie analizada en los tejidos control. Tanto la activación como la rugosidad en la superficie se observaron repetidamente a lo largo de todo el estudio, desde el tiempo más temprano de infección (30 min). También, se encontraron frecuentemente en los cultivos infectados células muertas, caracterizadas por la ruptura o desaparición de la membrana celular y la exposición de los componentes nucleares y citoplasmáticos. Sin embargo, cabe señalar que, el área periférica de los cortes infectados se mostraba mayoritariamente libre de actividad celular, lo que permitía distinguir dos áreas diferentes en los explantes (Figura 31B).

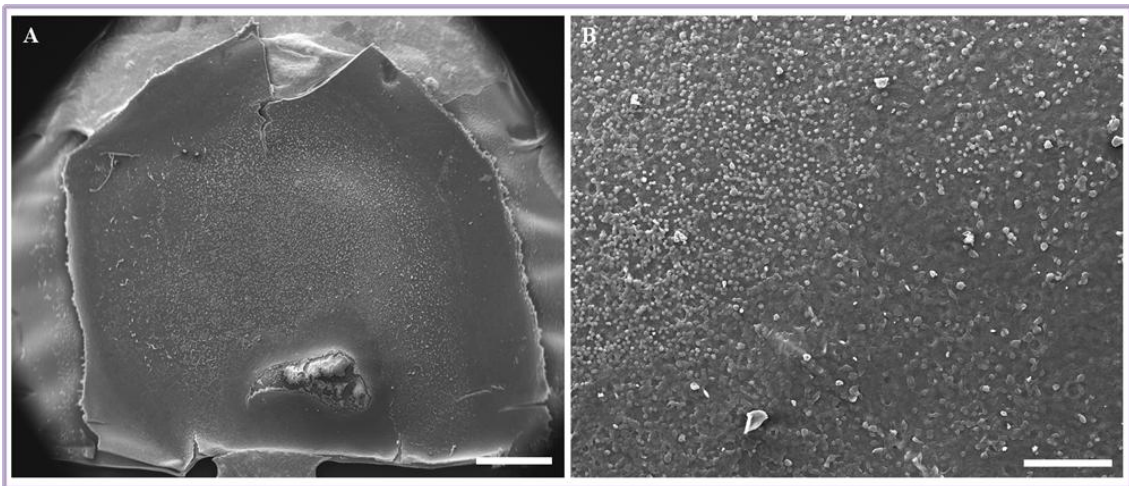


Figura 31. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 30 min. A, Superficie rugosa. B, Activación masiva del tejido en la parte superior de la imagen que muestra numerosas células redondeadas que emergen del tejido. En la parte inferior derecha se puede apreciar una menor actividad celular, correspondiente a una zona de corteza. Aumentos originales: A, $\times 50$; B, $\times 500$. Barras de escala: A, 1 mm; B, 100 μm .

A los 30 min de la infección con *L. monocytogenes*, se pudo observar la activación temprana de las células microgliales en la superficie de los cultivos. En algunas áreas, muchas células procedentes del interior del tejido cerebral eran reclutadas masivamente a la superficie como consecuencia de la infección bacteriana. Estas células mostraban fenotipos activados, caracterizados por tener núcleos protrusivos con proyecciones celulares y formas ameboides (Figura 32A). En este sentido, muchas bacterias de la superficie estaban en proceso de ser fagocitadas por estas células, o bien ya lo habían sido por completo, de manera que se localizaban en su interior, bajo la membrana celular (Figura 32B).

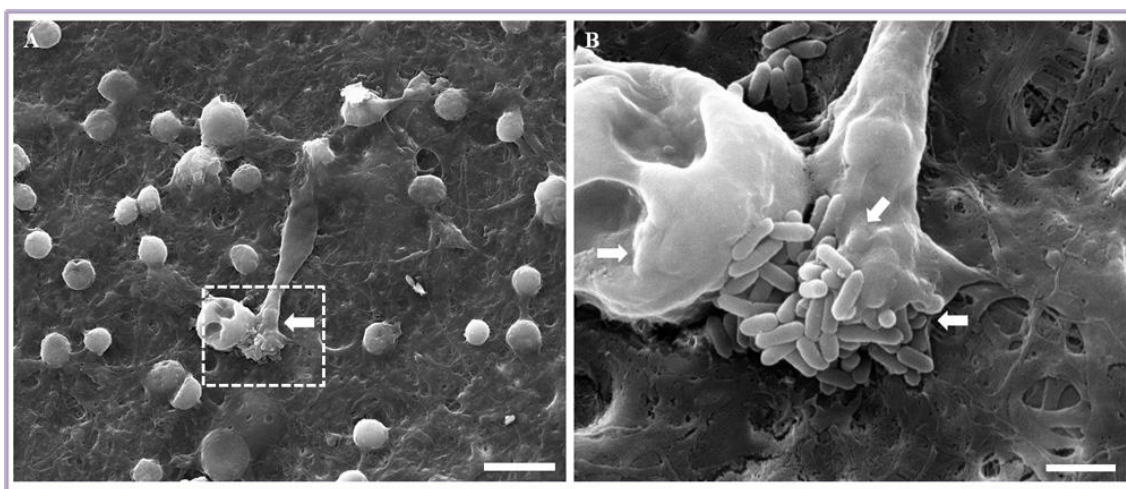


Figura 32. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 30 min. A, Numerosas células parecen emerger del tejido infectado. Muchas de ellas son redondeadas y otras alargadas (flecha), las cuales estaban en contacto con bacterias. B, Detalle del área marcada en A. Numerosas bacterias están siendo fagocitadas o se encuentran ya bajo la membrana celular (flechas). Aumentos originales: A, $\times 4000$; B, $\times 20000$. Barras de escala: A, $10\ \mu\text{m}$; B, $2\ \mu\text{m}$.

También a este tiempo, se podían identificar algunas de las etapas tempranas del ciclo de infección de *Listeria*, como las interacciones bacteria-célula que dan lugar a la entrada de la bacteria mediante el mecanismo *zipper*, como se puede comprobar en la [Figura 33](#).

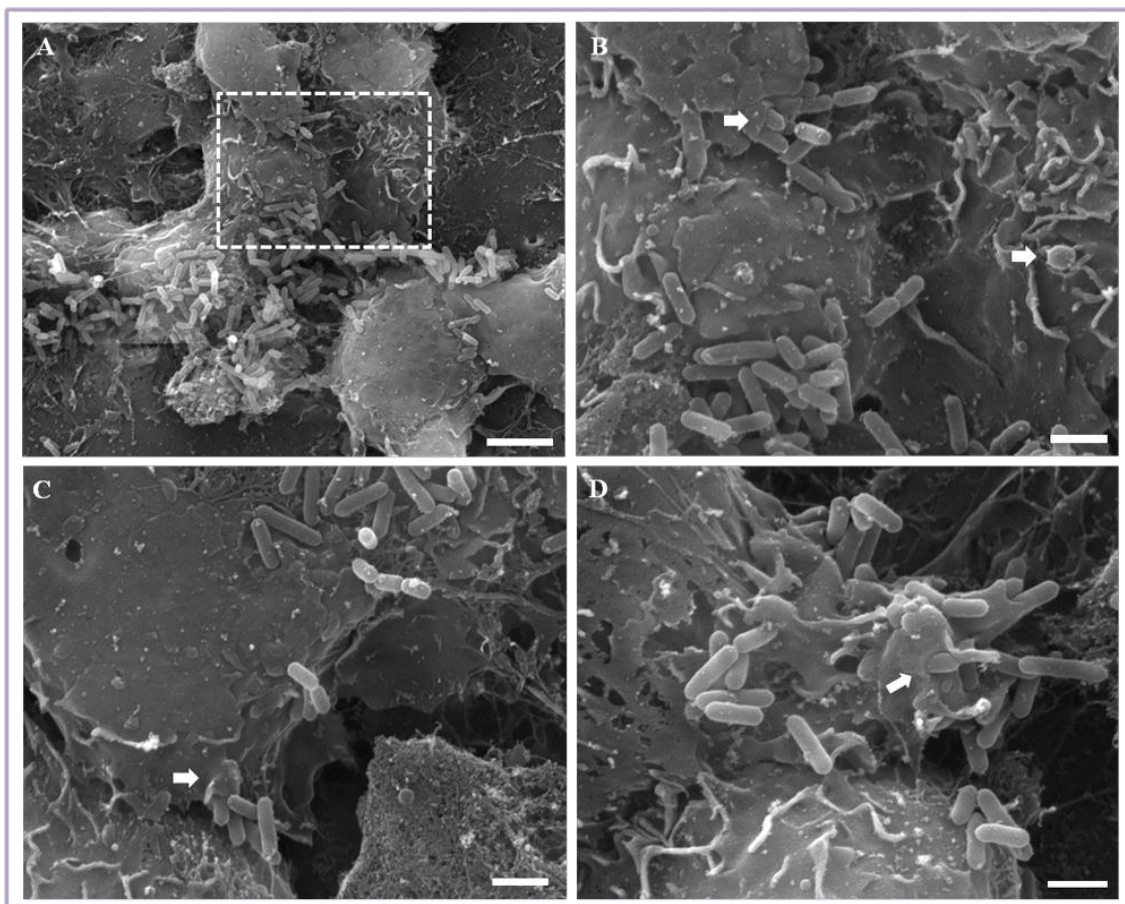


Figura 33. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 30 min. Entrada *zipper* de *L. monocytogenes* en las células de los cultivos. A, Numerosas bacterias extracelulares se encuentran adheridas en la superficie de las células y algunas de ellas ya están siendo internalizadas. B, Detalle del área marcada en A. En B y en C, se pueden observar dos bacterias entrando en las células por el mecanismo *zipper* (flechas). D, Se destaca una bacteria en pleno proceso de entrada (flecha), donde se observa que una parte de la bacteria queda bajo la membrana celular y otra en el exterior. Aumentos originales: A, $\times 7800$; B-D, $\times 15000$. Barras de escala: A, $5\ \mu\text{m}$; B-D, $2,5\ \mu\text{m}$.

Una vez producida la entrada, *L. monocytogenes* se localizaba intracelularmente en el citoplasma de las células microgliales presentes en el cerebro de rata (Figura 34A-B). Éstas, además de emerger hacia la superficie del tejido donde se ha producido la infección para fagocitar a las bacterias, pueden facilitar el transporte de las bacterias al interior del SNC (Figura 34C-D).

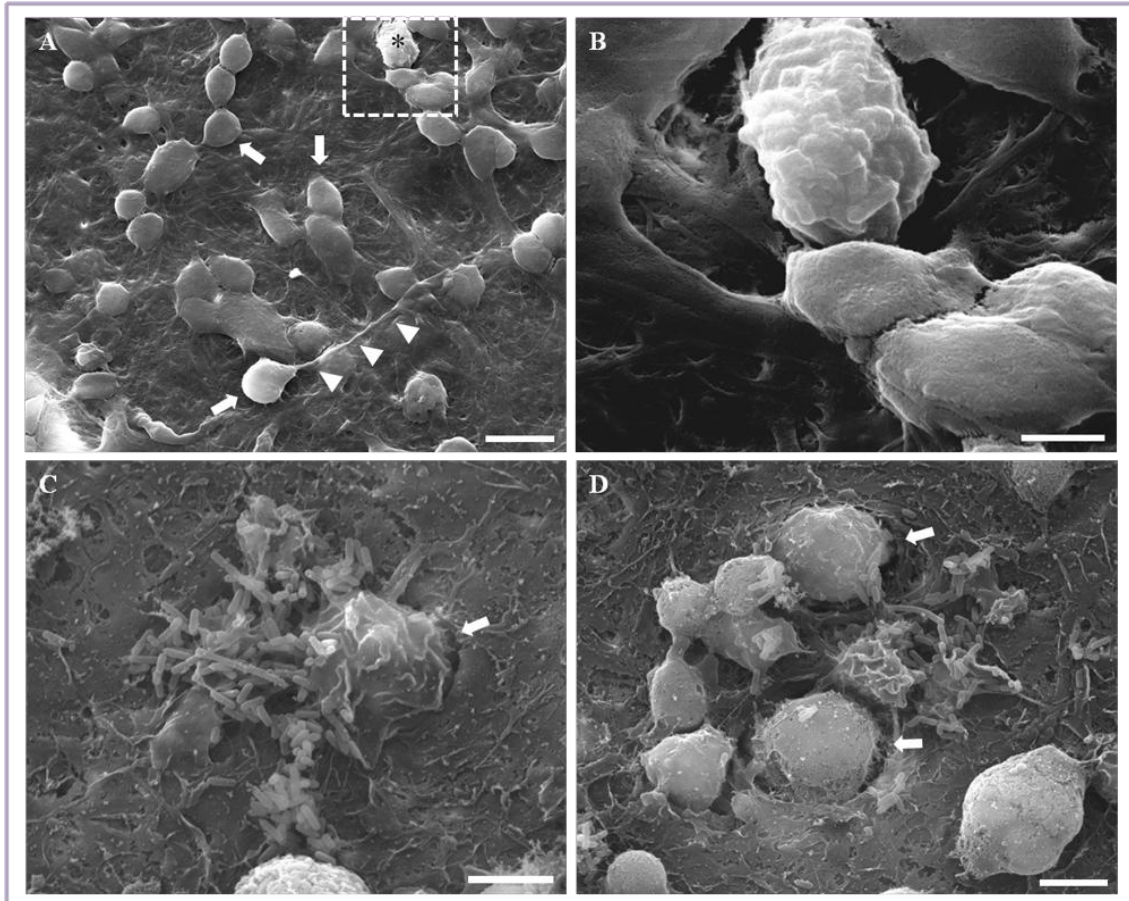


Figura 34. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 30 min. A, Numerosas células se muestran activadas en la superficie del corte. Entre ellas, se observan cuerpos neuronales (flechas) y un axón de gran tamaño (cabezas de flecha), sobre un entramado de extensas conexiones nerviosas. Se destaca una célula fagocítica que ha capturado bacterias (asterisco) y se dispone a penetrar en el interior del tejido. B, Ampliación del recuadro punteado en A donde se puede observar la localización intracelular de *L. monocytogenes*. C-D, Las células podrían estar saliendo del interior del tejido infectado hacia la superficie, o entrando en él (flechas). Aumentos originales: A, $\times 4000$; B, $\times 19627$; C, $\times 10000$; D, $\times 8000$. Barras de escala: A, $10\ \mu\text{m}$; B, $2,5\ \mu\text{m}$; C-D, $5\ \mu\text{m}$.

Mientras que la membrana de algunas células se mantenía en buen estado, otras células parecían no ser capaces de soportar la carga bacteriana y mostraban distintos daños en su membrana (Figura 35A-B). Incluso, se observaron algunas células neurales con un típico fenotipo necrótico mediante SEM, presentando restos de orgánulos dispersos (Figura 35C). En algunos casos, junto con los restos del citoplasma, quedaban visibles bacterias intracelulares liberadas por células infectadas (Figura 35D).

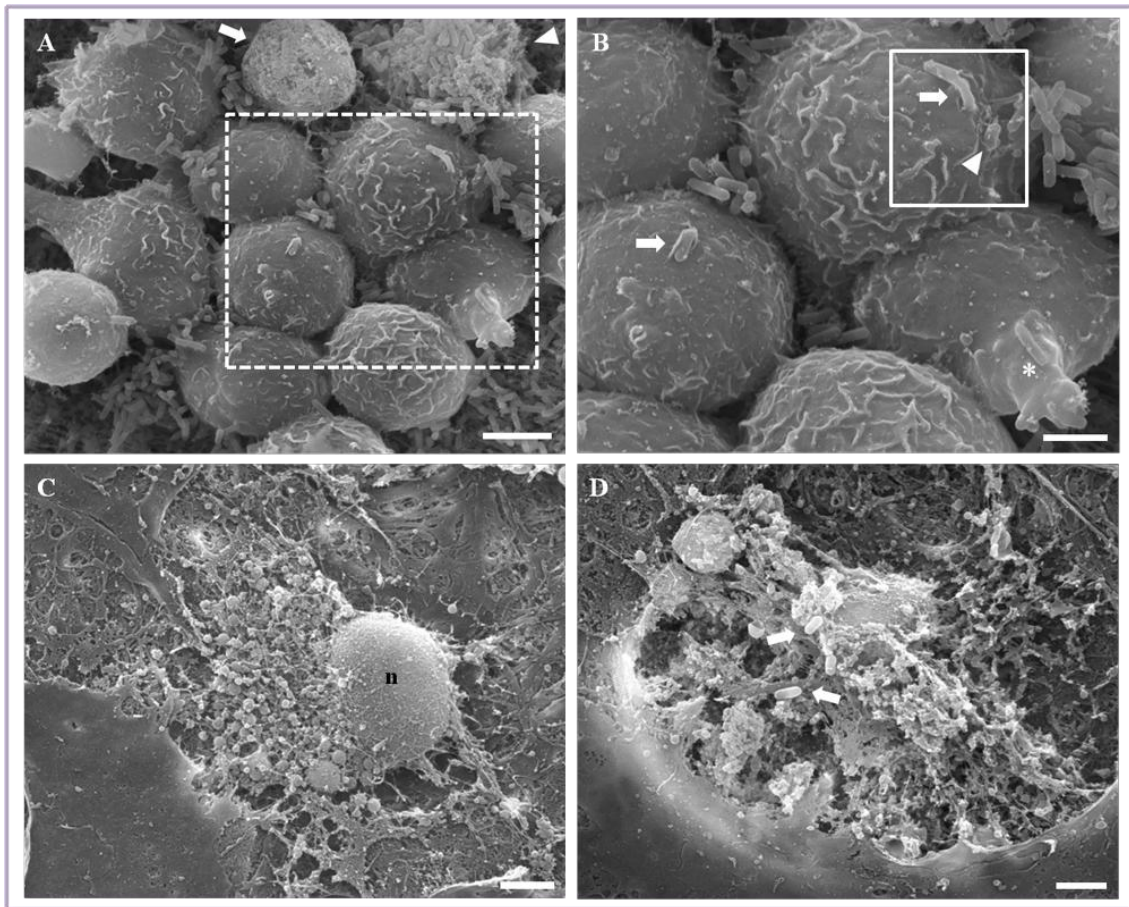


Figura 35. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 30 min. A, Panorámica de células con la membrana más intacta y otras con ella dañada (flecha) o rota (cabeza de flecha). B, Detalle del área marcada en A. Células sin aparentes daños en sus membranas. Algunas bacterias podrían estar tanto penetrando en las células (flechas) como saliendo de ellas (cabeza de flecha). Además, un grupo de bacterias intracelulares (asterisco) parecen estar empujando la membrana para salir de la célula. C y D, Células neurales muertas sin bacterias (C) o con algunas bacterias intracelulares (flechas en D). En C, se distingue el núcleo (n) celular. Aumentos originales: A, $\times 8000$; B, $\times 15000$; C, $\times 12688$; D, $\times 11862$. Barras de escala: A, 5 μm ; B-D, 2,5 μm .

Tras la infección durante 45 min, la superficie activada del tejido presentaba células con morfologías celulares redondeadas y alargadas, ambas con bacterias adheridas o ya internalizadas. Incluso en las áreas con largos cilios, las células estaban activadas y en contacto con las bacterias localizadas en la superficie celular (Figura 36).

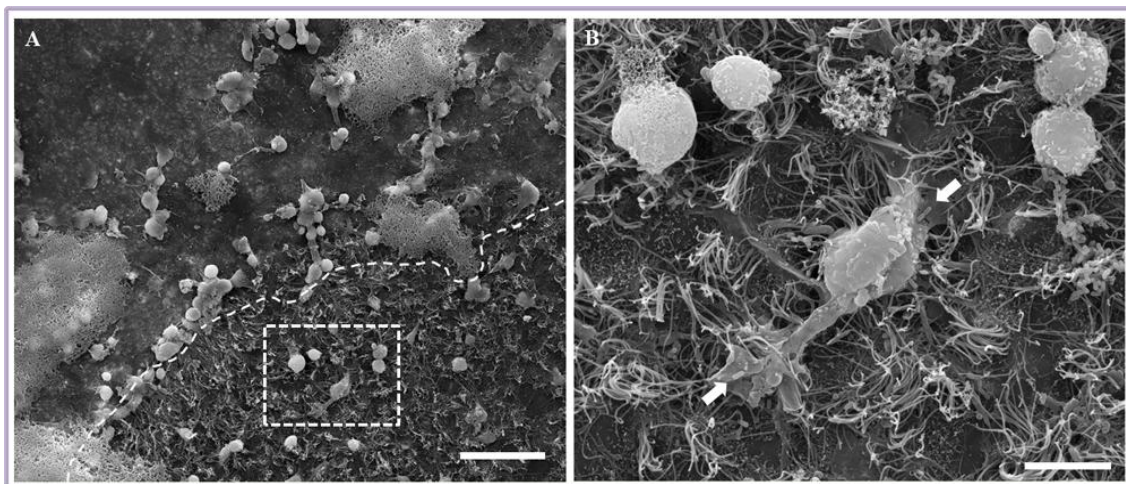


Figura 36. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 45 min. A, Zona de transición entre las células planas con menor actividad y el área ciliada (línea punteada). B, Detalle del área marcada en A. El área ciliada también presenta células activadas y en contacto con bacterias (flechas). Otras células de la superficie muestran una morfología redondeada. Aumentos originales: A, $\times 1000$; B, $\times 5000$. Barras de escala: A, $50\ \mu\text{m}$; B, $10\ \mu\text{m}$.

A este tiempo, la mayoría de las células fagocíticas aparecían llenas de bacterias, el daño celular era más evidente y muchas de estas células mostraban poros de distintos tamaños en su membrana, a través de los cuales se observaban grupos de bacterias internalizadas (Figura 37A-B). Estas bacterias parecían estar en el proceso de extrusión celular ya que estaban rodeadas y unidas por una fina membrana (Figura 37C-D).

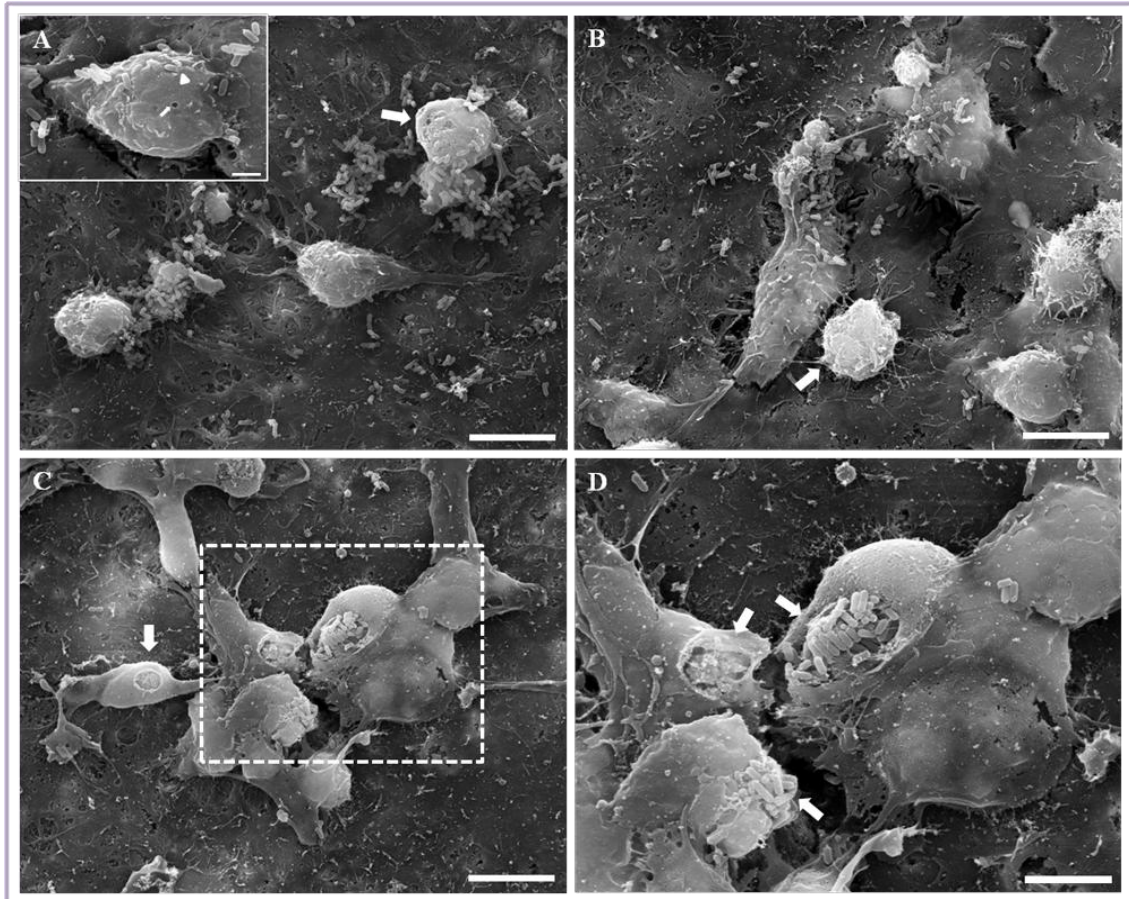


Figura 37. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 45 min. A, Células redondeadas en contacto con bacterias. Una de las células presenta pequeñas roturas en la membrana (flecha). Recuadro: Célula con un poro en la membrana (flecha), en la que está entrando una bacteria (mecanismo zipper) (cabeza de flecha). B, Presencia de células con membranas rugosas (flecha). C-D, Varias células en la superficie del explante muestran grandes poros en las membranas dejando al descubierto bacterias intracelulares (flechas). D, Detalle del área marcada en C. Destaca un grupo de bacterias intracelulares rodeadas por una envoltura membranosa. Aumentos originales: A,B y C, $\times 5000$; Recuadro en A, $\times 15000$; D, $\times 10000$. Barras de escala: A, B y C, $10\ \mu\text{m}$; Recuadro en A, $2,5\ \mu\text{m}$; D, $5\ \mu\text{m}$.

Además, se observaron, de nuevo, algunas células necróticas caracterizadas por presentar una pérdida de la integridad de la membrana plasmática y un núcleo sin fragmentar (**Figura 38A-B**).

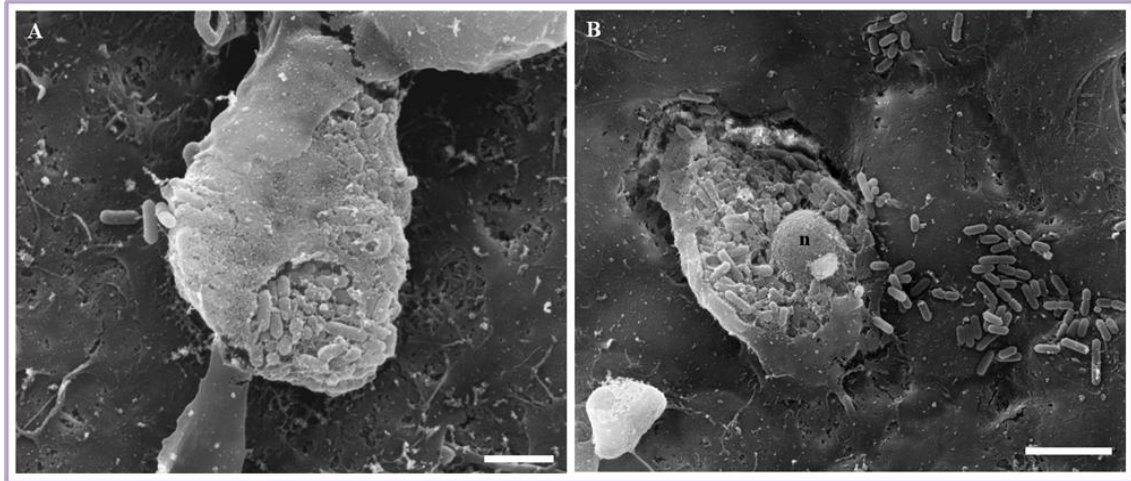


Figura 38. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 45 min. Células necróticas que han perdido gran parte de su membrana, lo que permite observar las bacterias que poseen en su interior. En la imagen B se puede identificar el núcleo (n) de la célula. Aumentos originales: A, $\times 16000$; B, $\times 10000$. Barras de escala: A, $2,5 \mu\text{m}$; B, $5 \mu\text{m}$.

A partir de este tiempo, la actividad celular en la superficie del tejido fue menos evidente, ya que una hora después de la infección había escasas células ramificadas, aunque sí se observaban restos celulares y algunos grupos de bacterias dispersos (Figura 39A). Esta situación se encontró en la mayoría de los campos examinados. Durante el análisis, se volvieron a evidenciar procesos de fagocitosis y células llenas de bacterias, las cuales parecían dirigirse hacia el interior del tejido (Figura 39B). Las zonas que presentaban cilios mostraban diversas bacterias adheridas a la monocapa de células superficiales, o bien a las células más redondeadas del interior del tejido, donde se podía observar un gran número de bacterias (Figura 39C-D).

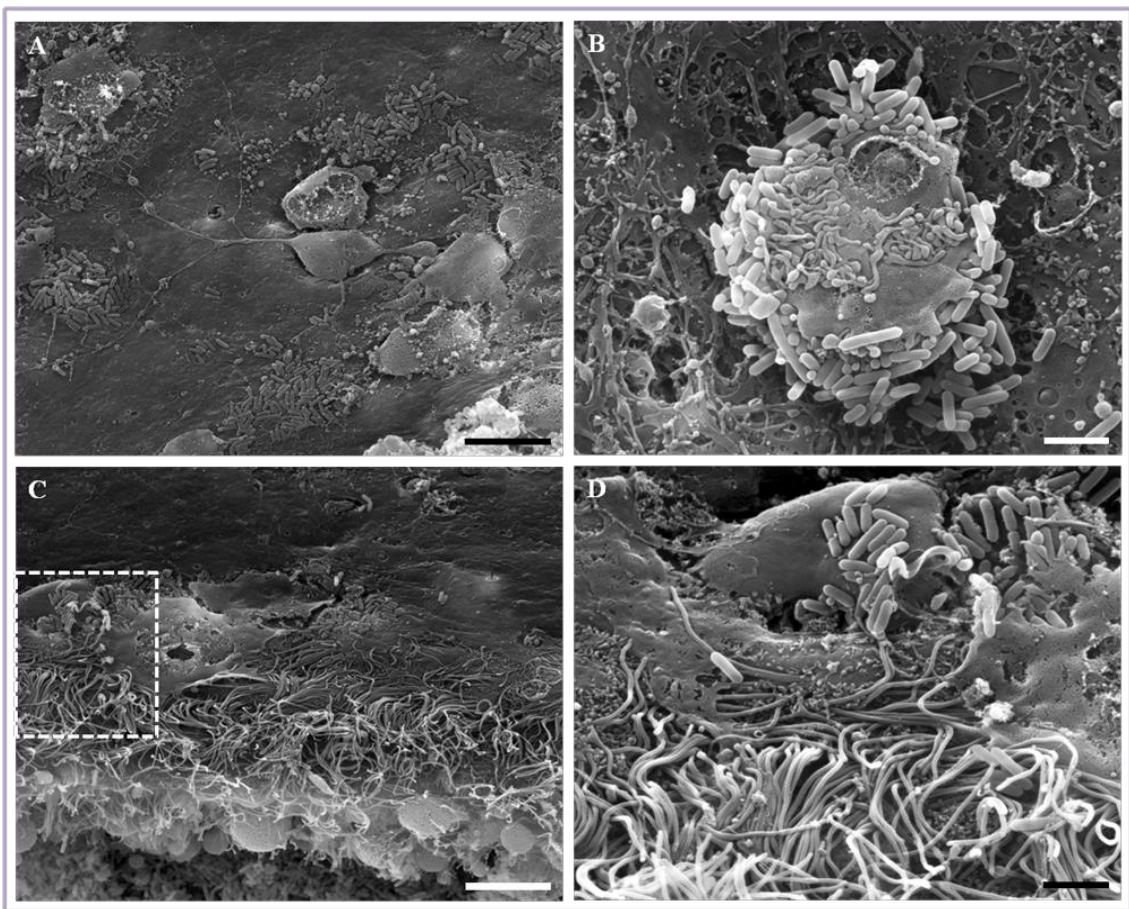


Figura 39. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 1 h. A, La superficie del cultivo muestra una célula superficial con numerosas prolongaciones celulares, grupos de bacterias y varias células muertas. B, Una célula llena de bacterias parece estar entrando o saliendo del tejido. C, Espesor del corte mostrando células planas, cilios, células redondeadas y numerosas bacterias. D, Detalle del área marcada en A. Destacan los largos cilios presentes en esta zona, asociados o no con bacterias. Aumentos originales: A y C, $\times 5000$; B y D, $\times 15000$. Barras de escala: A y C, $10\ \mu\text{m}$; B y D, $2,5\ \mu\text{m}$.

Tres horas después de la infección, las fotografías tomadas del espesor del explante y otras realizadas a través de fracturas en el corte, revelaban la presencia de células redondeadas, células llenas de bacterias y grupos de bacterias libres, que se acumulaban en la superficie del tejido y contactaban con el filtro de membrana que lo soporta (Figura 40).

Lo más característico de este tiempo fue la frecuente localización de las bacterias en células en forma de saco, que se mostraban muy hinchadas. Éstas se detectaron por primera vez a los 30-45 min después de la infección (Figura 38A-B), no siendo significativo de todos los cortes analizados. Sin embargo, a partir de las 3 h se encontraron frecuentemente, tal y como se puede comprobar en las microfotografías mostradas de aquí en adelante. También se puede comprobar que en comparación con las primeras veces que las observamos, 3 h después de la infección, estas células llenas de bacterias presentaban completamente rota su membrana celular (Figura 40E-F).

Por el contrario, a las 3 h identificamos por primera vez sacos de bacterias de distintos tamaños (flecha en la Figura 40D), pero siempre más pequeños que las células. En estos agregados, las bacterias parecían estar unidas por una membrana, a veces prácticamente inexistente. Como se podrá comprobar más adelante, estos sacos fueron más abundantes 12 h después de la infección, y los hemos denominado “cuerpos fagosomales” ya que recuerdan a los fagosomas en los que queda envuelta *L. monocytogenes* cuando entra dentro de las células fagocíticas, o a las vacuolas intracelulares formadas cuando invade células no fagocíticas.

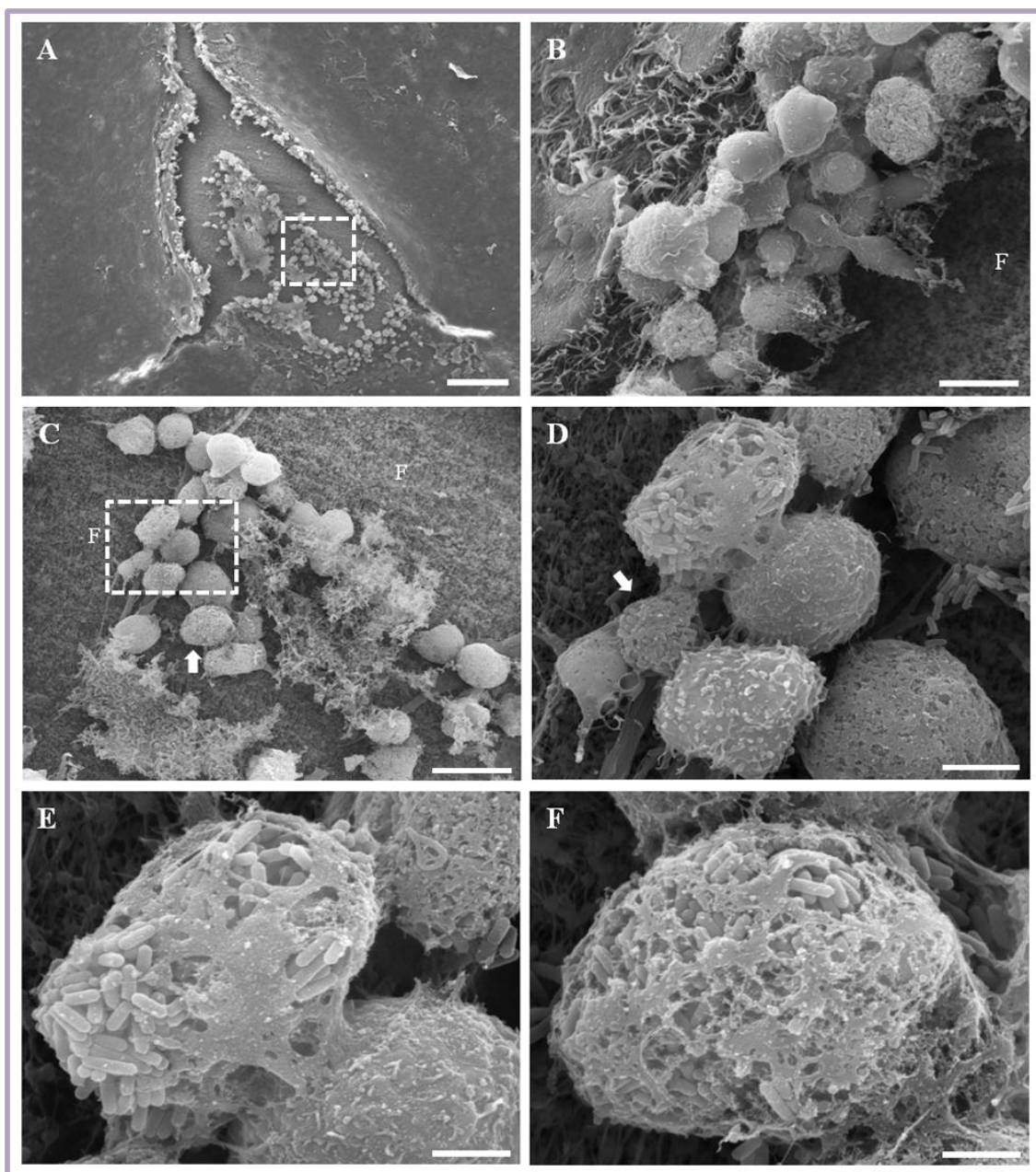


Figura 40. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 3 h. A, Presencia de una fractura en el corte. B, Borde de la cavidad central en la que pueden observarse células redondeadas, células llenas de bacterias y grupos de bacterias libres. En la esquina superior izquierda, la superficie del explante muestra células ciliadas ependimales. En la esquina inferior derecha, se observa el filtro de membrana (F). C, Detalle del área marcada en A. Las células y bacterias aparecen dispuestas a ambos lados del filtro (F). D, Detalle del área marcada en C en la que se pueden identificar células redondas, células llenas de bacterias, un cuerpo fagosomal (flecha) y bacterias libres. E-F, Detalle de las células de microglía llenas de bacterias vistas en D e indicada por una flecha en C. Éstas aparecen con la membrana rota y muy hinchadas al fagocitar un gran número de bacterias que pueden observarse en su interior. En E, la célula inferior derecha mantiene la

membrana más intacta. Aumentos originales: A, $\times 400$; B, $\times 5000$; C, $\times 2500$; D, $\times 10000$; E-F, $\times 20000$. Barras de escala: A, $100\ \mu\text{m}$; B, $10\ \mu\text{m}$; C, $20\ \mu\text{m}$; D, $5\ \mu\text{m}$; E-F, $2,5\ \mu\text{m}$.

Después de 5 h de infección, las células fagocíticas de la superficie de los cortes seguían sin mostrar una actividad comparable con la actividad inicial. A este tiempo se observaron, en general, pocas células activadas y restos celulares llenos de bacterias. De manera discreta, se identificaron nuevas células fagocíticas que intentaban digerir bacterias libres y también a otras células llenas de bacterias (Figura 41A-B). Por el contrario, se detectaron con frecuencia células aplanadas infectadas, dañadas o muertas, que habían perdido grandes extensiones de la membrana celular. La ruptura de la membrana celular permitía observar la presencia de bacterias intracelulares y componentes celulares. Sin embargo, no se encontraron células con núcleos fragmentados apoptóticos, manteniendo la mayoría su integridad nuclear, por lo que el tipo de muerte celular parecía principalmente de tipo necrótico (Figura 41C-D).

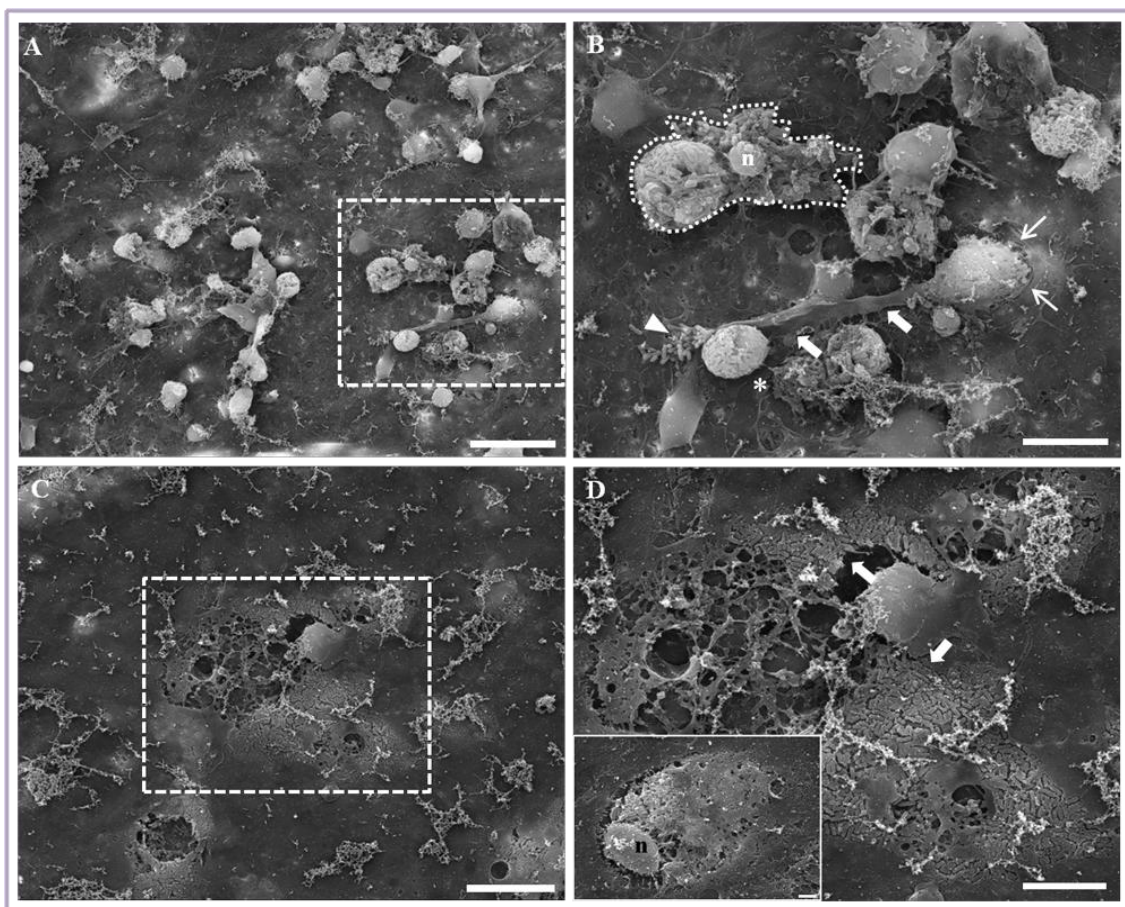


Figura 41. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 5 h. A, Unas pocas células microgliales activadas y restos celulares permanecen en la superficie del tejido. B, Detalle del área marcada en A. Una célula de microglía emerge del interior del tejido a través de una protrusión (flechas finas) e intenta fagocitar bacterias libres (cabeza de flecha) y a una célula llena de bacterias (asterisco), a través de la emisión de un gran pseudópodo celular (flechas). La línea punteada indica una célula necrótica con el núcleo intacto (n). C, Células muertas, aplanadas en la superficie del tejido. D, Detalle del área marcada en C. Pueden observarse bacterias intracelulares (flechas) incrustadas entre las células muertas y sus componentes citoplasmáticos. Recuadro en D, Célula necrótica aplanada con bacterias en su interior y con el núcleo intacto (n). Aumentos originales: A, $\times 2000$; B y D, $\times 5000$; C, $\times 2500$; Recuadro en D, $\times 10000$. Barras de escala: A, $25\ \mu\text{m}$; B y D, $10\ \mu\text{m}$; C, $20\ \mu\text{m}$; Recuadro en D, $2,5\ \mu\text{m}$.

Curiosamente, tras 12 h de infección, se volvía a incrementar la actividad celular en la superficie del explante (Figura 42). En toda ella, se podían encontrar numerosas células fagocíticas activadas, células infectadas llenas de bacterias, fagosomas de distintos tamaños, restos celulares y bacterias dispersas (Figura 43).

Como se puede comprobar en las microfotografías, al contrario que al inicio de la infección, donde las células microgliales emitían pseudópodos a través de los cuales capturaban en su mayoría bacterias o grupos de bacterias, ahora se producía la fagocitosis principalmente de células llenas de bacterias (Figura 43B) y cuerpos fagosomales de distintos tamaños, que mostraban en su interior grupos de bacterias (Figura 44A-D). Además, otra población de células de microglía podría estar liberando a su vez esos fagosomas llenos de bacterias a la superficie del tejido (Figura 44E-F).

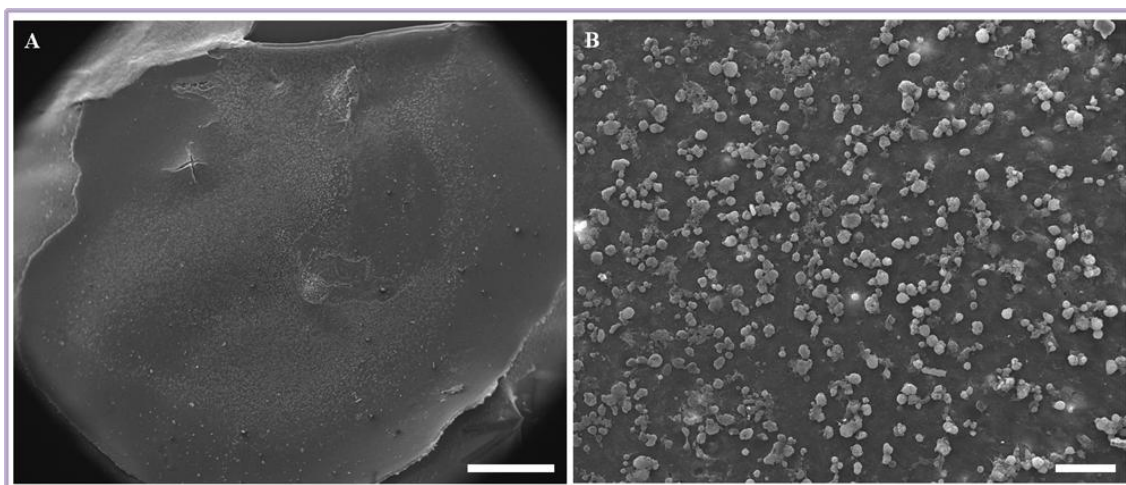


Figura 42. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 12 h. A, Vista general, a pocos aumentos, de la superficie del tejido. B, Área del tejido que muestra una gran actividad celular con células principalmente redondeadas. Aumentos originales: A, $\times 50$; B, $\times 700$. Barras de escala: A, 1 mm; B, 50 μm .

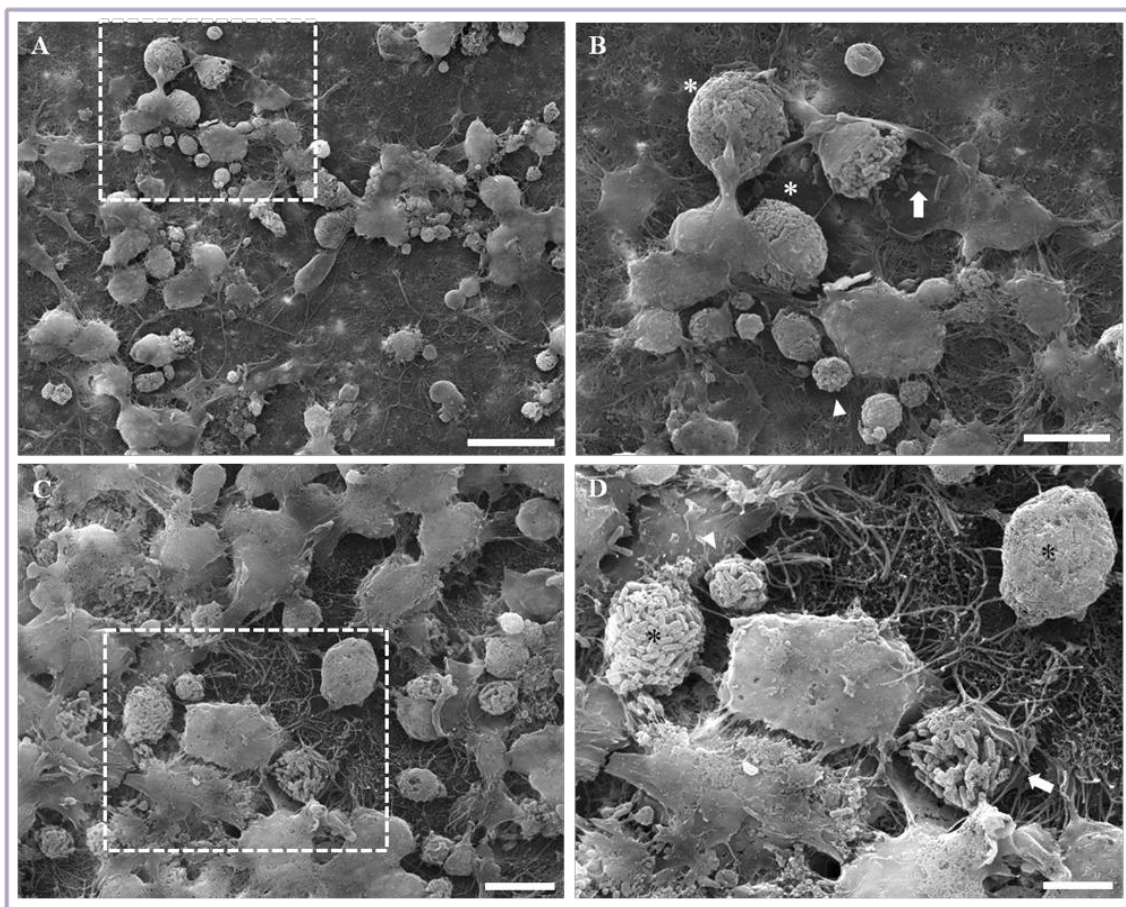


Figura 43. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 12 h. A, En la imagen se observan células alargadas muy ramificadas, células con capacidad fagocítica, cuerpos fagosomales y restos celulares. B, Detalle del área marcada en A donde se puede observar la fagocitosis de células en forma de saco (asteriscos) llenas de bacterias. Algunas células estaban rotas y las bacterias eran liberadas al exterior quedando adheridas a la membrana celular (flecha). Se localizan algunos cuerpos fagosomales llenos de bacterias (cabeza de flecha). C, Presencia de cilios en un área de gran actividad celular. D, Detalle del área marcada en C. Se observan largos cilios, células grandes, células llenas de bacterias (asteriscos) y un grupo de bacterias sobre una membrana (flecha). Aumentos originales: A, $\times 2000$; B, $\times 5000$; C, $\times 4000$; D, $\times 8000$. Barras de escala: A, 25 μm ; B-C, 10 μm ; D, 5 μm .

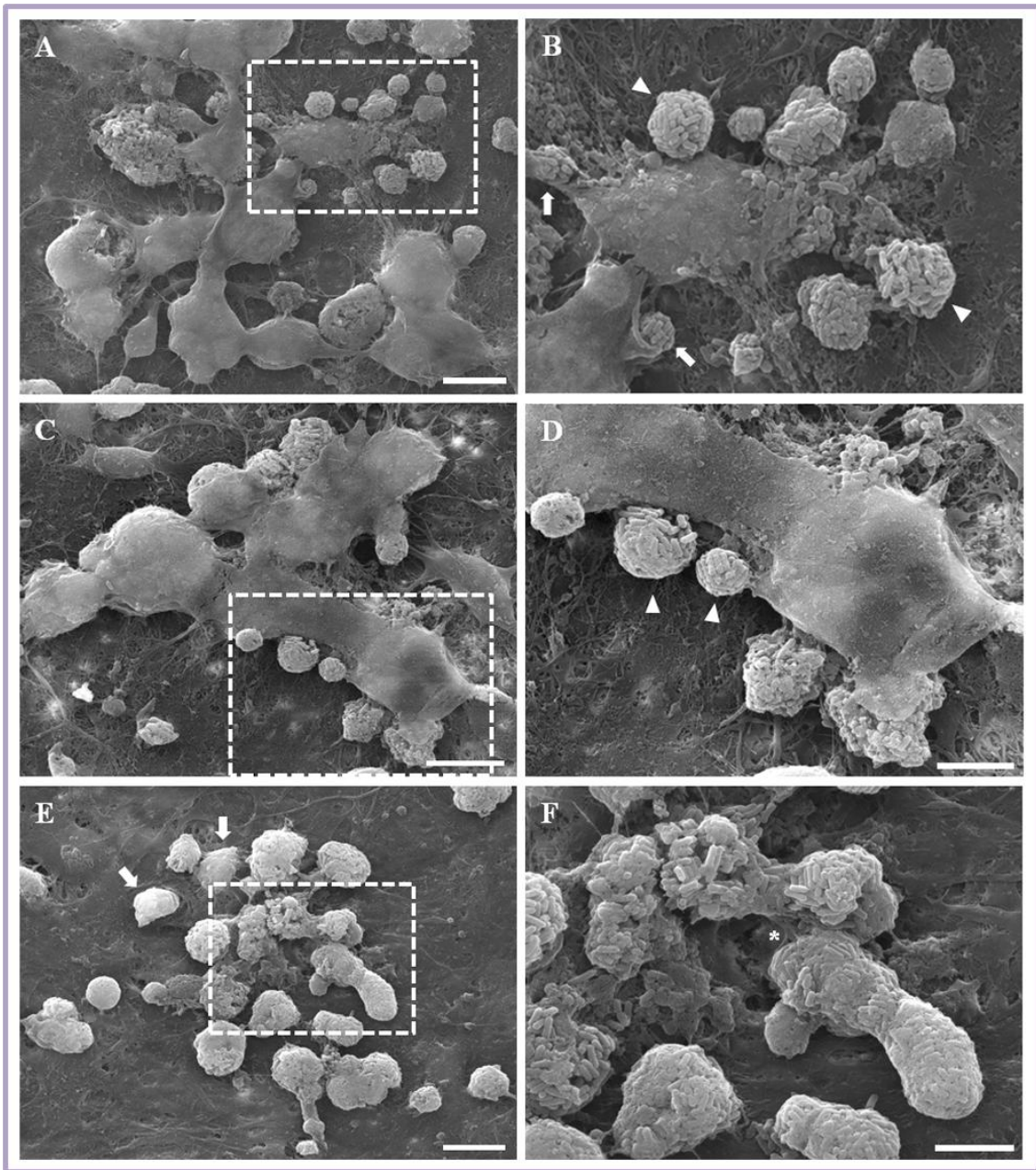


Figura 44. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 12 h. A y C, Vista general de células microgliales activadas y cuerpos fagosomales. B, Ampliación del área marcada en A. Partículas llenas de bacterias tipo fagosoma de diferentes tamaños (cabezas de flecha) y restos celulares, que están siendo fagocitados por la microglía. Las flechas indican la fagocitosis de grupos de bacterias. D, Detalle del área marcada en C donde se observa una célula de microglía fagocitando varios cuerpos fagosomales (cabeza de flecha) y restos celulares y bacterianos al mismo tiempo. E, Células fagocíticas activadas (flechas), bacterias y restos celulares presentes en la superficie del cultivo. F, Detalle del área marcada en E. Localización intracelular de un gran número de bacterias en restos celulares dispuestos sobre el tejido (asterisco). Aumentos originales: A y E, $\times 4000$; C, $\times 5000$; D y F, $\times 10000$. Barras de escala: A, C y E, $10\ \mu\text{m}$; D y F, $5\ \mu\text{m}$.

Posteriormente, se analizó la infección de *Listeria* durante 18 y 24 h en el tejido cerebral. En ambos tiempos, la actividad celular fue alta y la activación y eventos celulares observados fueron similares, sin apenas diferencias significativas entre los dos períodos de infección (Figura 45).

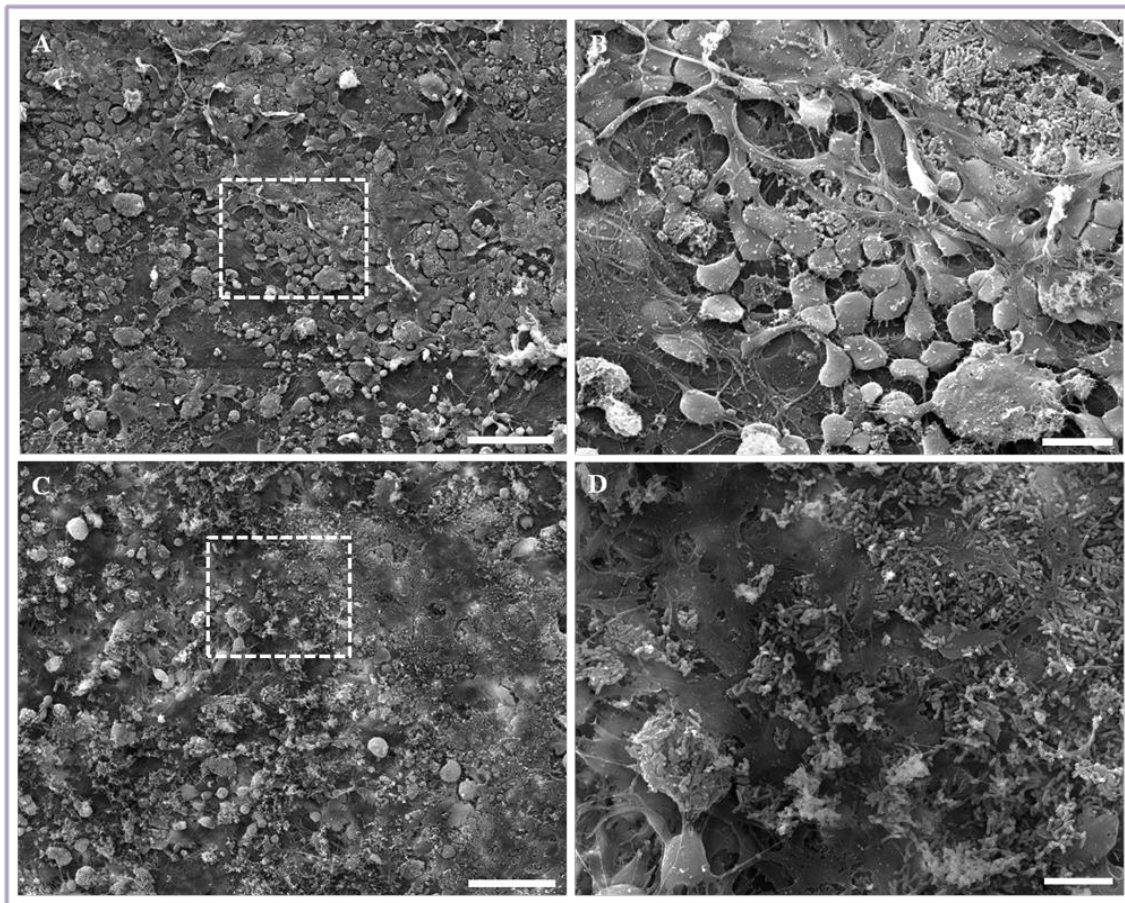


Figura 45. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 18 h (A-B), 24 h (C-D). Analogía en la superficie del tejido en ambos tiempos de infección. A y C, Células aplanadas, células redondeadas y grupos de bacterias en la superficie del tejido. B, Detalle del área marcada en A. Las células de la monocapa han perdido las uniones intercelulares que las mantenían unidas. D, Detalle del área marcada en C. Numerosas bacterias libres localizadas bajo las células y entre las conexiones nerviosas del tejido. Aumentos originales: A y C, $\times 1000$; B y D, $\times 4000$. Barras de escala: A y C, $50 \mu\text{m}$; B y D, $10 \mu\text{m}$.

La rugosidad observada en la superficie de los cortes a bajos aumentos, de nuevo anticipaba la gran actividad celular que estaba teniendo lugar en el tejido cerebral (**Figura 46A**). En todas las preparaciones analizadas a las 24 h de la infección, se encontraron frecuentemente células redondeadas, numerosas células necróticas, cuerpos fagosomales de diferentes tamaños, restos celulares y bacterias libres, todo ello dispuesto entre una red neuronal (**Figura 46B-D**). Además, las células dañadas continuaban liberando partículas tipo fagosoma de gran tamaño, que mostraban grupos de bacterias (**Figura 46E**).

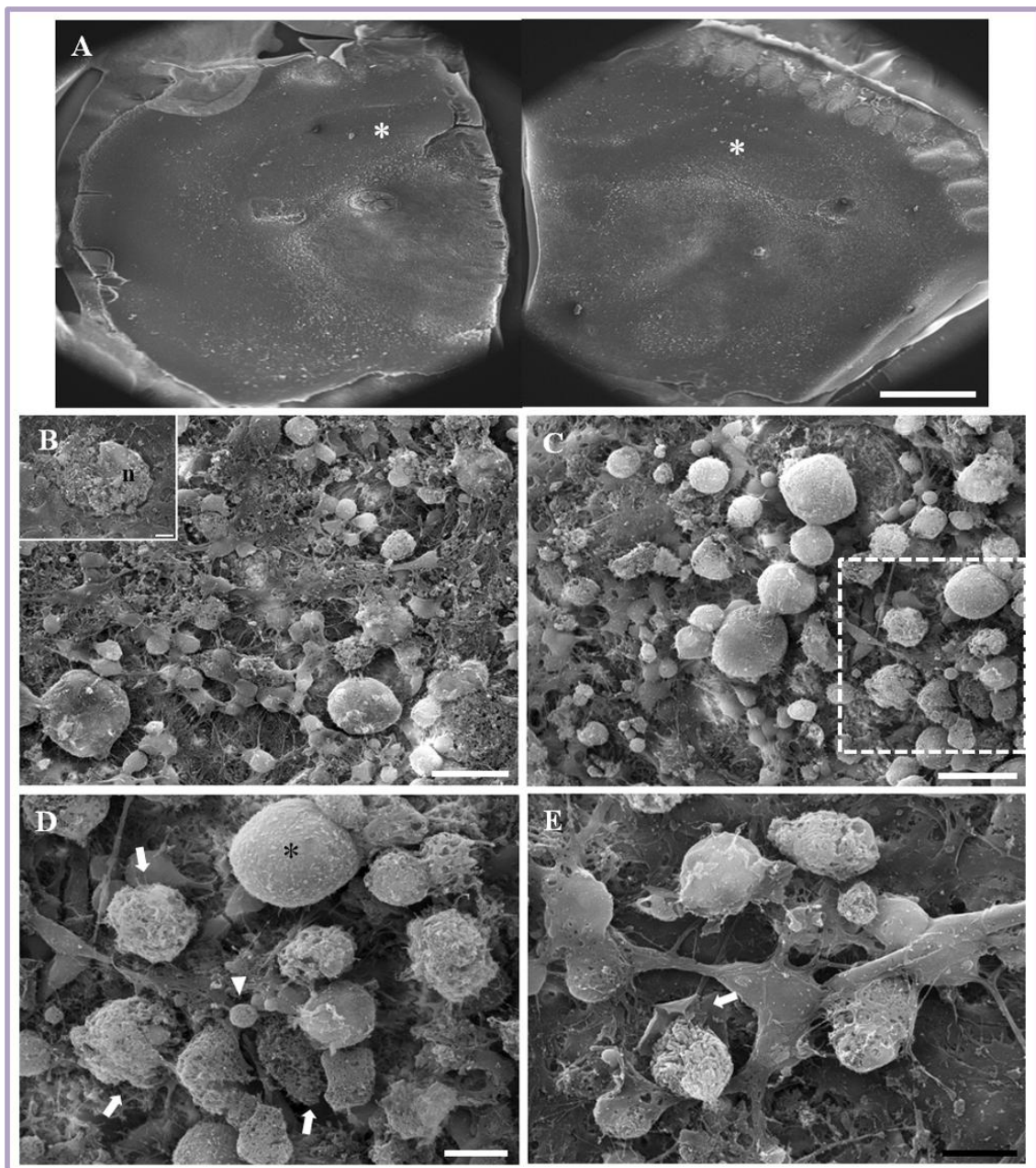


Figura 46. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 24 h. A, Este panel muestra un corte completo de un mismo cultivo infectado, distinguiéndose el hemisferio izquierdo y derecho. Se observa una superficie principalmente rugosa debida a la activación celular, mientras que la periferia se mantiene lisa. En el centro del corte se identifica la estructura del hipocampo (asteriscos). B, Cuerpos celulares redondeados, restos celulares y bacterias libres acumuladas en la superficie del explante. Recuadro: Una célula muerta muestra una mezcla de restos citoplasmáticos y bacterias. El núcleo (n) aparece conservado. C, Se pueden observar células en distintos estados, con la membrana intacta o con aspecto necrótico. Además, se observan numerosos cuerpos fagosomales muy degradados. D, Detalle del área marcada en C. Célula redonda sin alteraciones en la membrana (asterisco), células necróticas llenas de bacterias (flechas), restos celulares y cuerpos fagosomales en descomposición (cabeza de flecha). E, Otra área del corte con presencia de células activadas, partículas fagosomales, células dañadas, restos celulares y bacterias libres en la superficie. Uno de los cuerpos fagosomales está parcialmente rodeado por una gran prolongación de la membrana de una célula fagocítica (flecha). Aumentos originales: A, $\times 50$; B-C, $\times 2000$; Recuadro en B, $\times 7000$; D, $\times 4000$; E, $\times 5000$. Barras de escala: A, 1 mm; B-C, 25 μm ; Recuadro en B, 5 μm ; D-E, 10 μm .

Por lo tanto, la actividad de la microglía seguía siendo intensa, similar a lo observado 12 h después de la infección. De hecho, en varios de los campos analizados se podía observar cómo la microglía activada nuevamente extendía largos pseudópodos para capturar tanto bacterias libres como células necróticas con la membrana rota y llenas de bacterias (Figura 47).

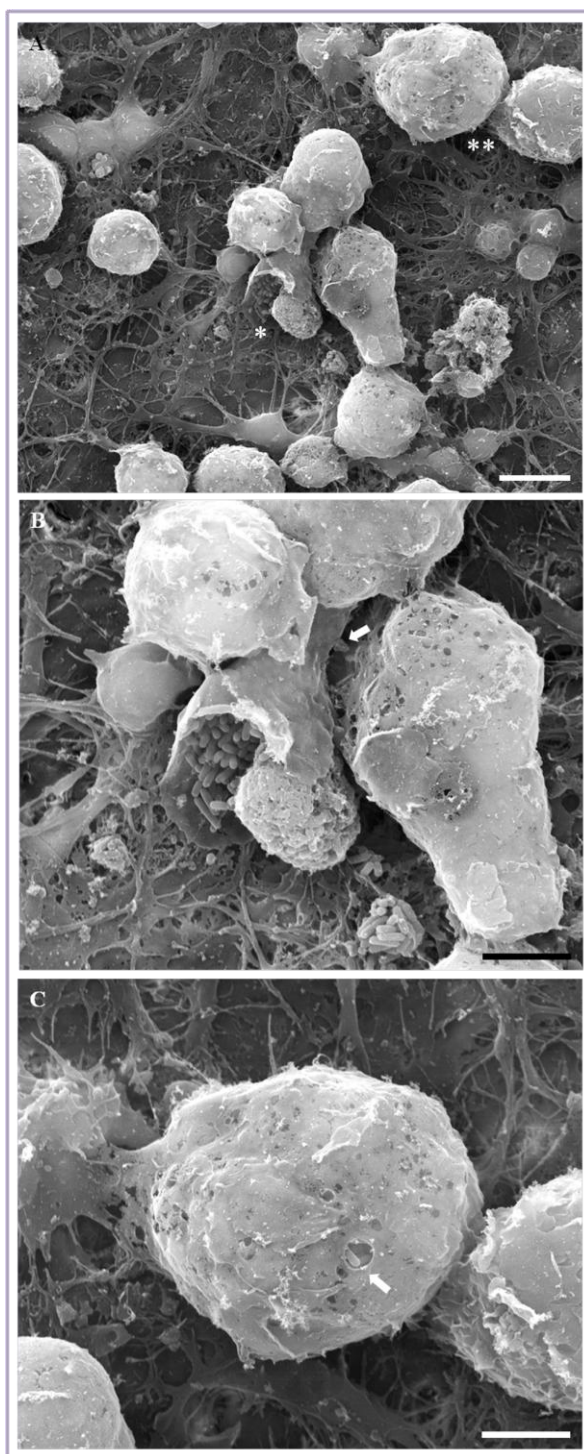


Figura 47. Microfotografías de SEM de cultivos organotípicos infectados. Tiempo, 24 h. A, Vista general de la red neuronal sobre la que se disponen células fagocíticas (*), células dañadas (**) y bacterias que están siendo fagocitadas. B, Detalle de la célula fagocítica marcada con un asterisco en A que con un gran pseudópodo celular (flecha) está fagocitando bacterias libres y una célula llena de bacterias. C, Detalle de la célula marcada con doble asterisco en A, mostrando numerosos poros en la membrana. A través de uno de ellos pueden verse las bacterias intracelulares (flecha). Aumentos originales: A, $\times 4000$; B-C, $\times 10000$. Barras de escala: A, 10 μm ; B-C, 5 μm .

2.3. Microscopía óptica

Gracias a la microscopía óptica podemos observar también cómo se preserva el espesor de los cortes tras los días de cultivo *in vitro* y cómo es la organización del tejido, desde la superficie hasta el anclaje del tejido en el filtro de membrana (Figura 48). Esto complementa la localización de la actividad celular en el tejido, observada mediante el microscopio electrónico.

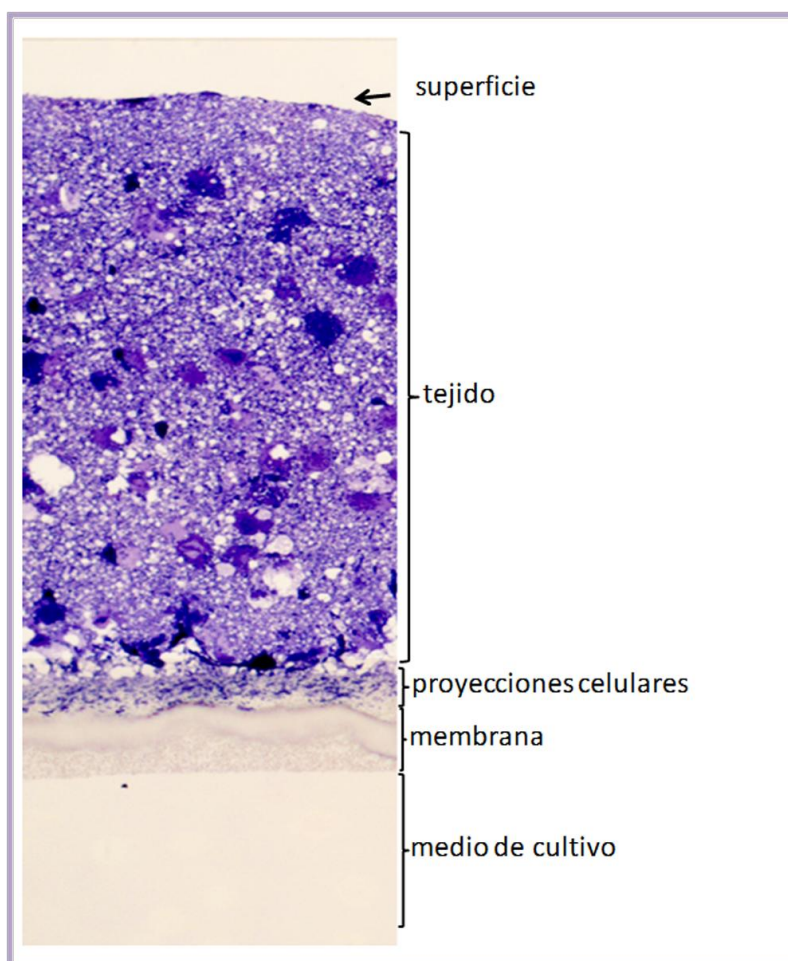


Figura 48. Representación esquemática de uno de los 3D-OC obtenidos mediante el método de interfase de membrana, preparado para microscopía óptica. Se puede observar que el contacto del tejido con el medio de cultivo presente bajo la membrana se realiza a través de conexiones mediante las cuales el tejido nervioso capta los nutrientes del medio.

El análisis de secciones de los cortes infectados bajo microscopía óptica permitió confirmar la fuerte actividad celular observada en la superficie del tejido. Por el contrario, los cultivos utilizados como control presentaban una superficie lisa y regular, a lo largo de toda la sección (Figura 49).

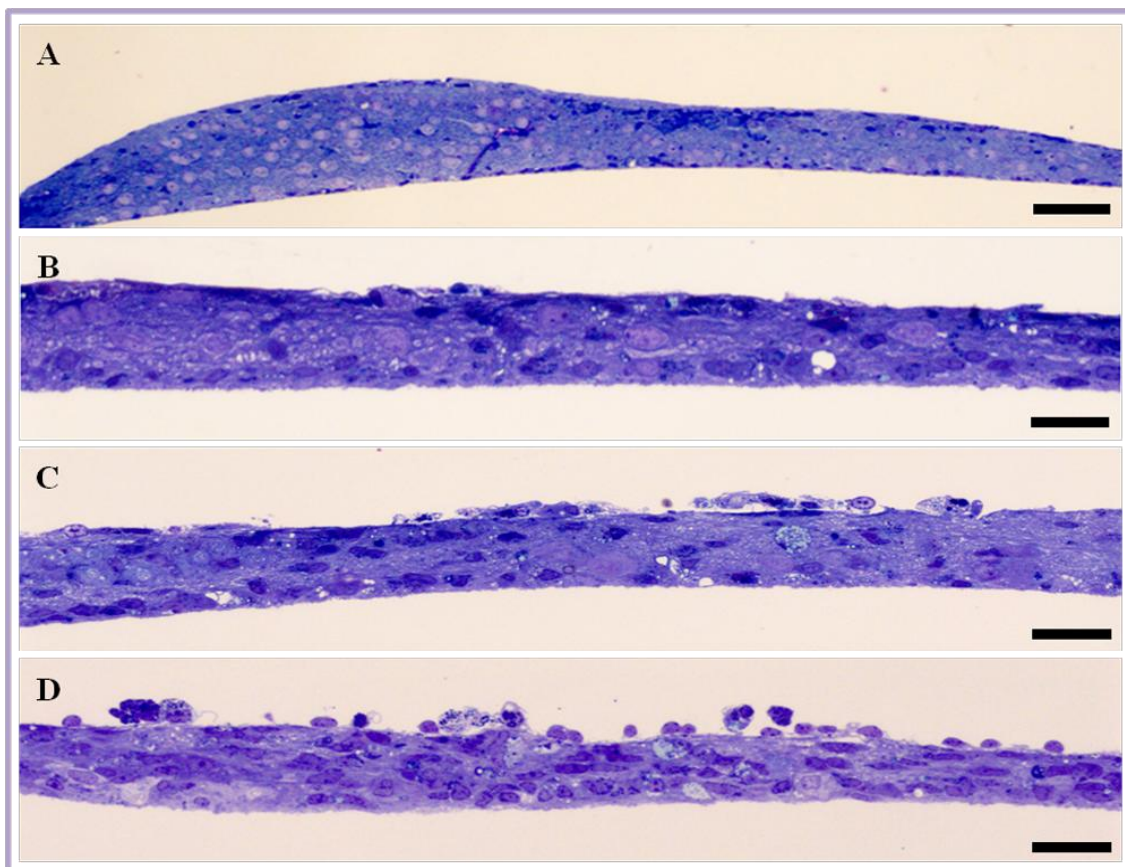


Figura 49. Microfotografías de microscopía óptica de semifinos de cultivos organotípicos control (A-B) e infectados (C-D). Tiempo, 30 min. A-B, La superficie de los explantes se mantiene lisa en los controles. C-D, La superficie del tejido muestra numerosas células que han migrado desde el interior a la superficie del explante. Aumentos originales: A, $\times 100$; B-D, $\times 400$. Barras de escala: A, $100\ \mu\text{m}$; B-D, $25\ \mu\text{m}$.

3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE SNC

Tras el análisis microscópico de la infección en los cultivos organotípicos, se realizó el estudio de la expresión génica de dos rutas del hospedador relevantes frente a la infección de *L. monocytogenes*: respuesta inmunitaria y autofagia. Para ello, se usaron matrices de qRT-PCR que permiten la cuantificación de la expresión de un gran número de genes.

3.1. Regulación temporal de la expresión de genes de respuesta inmunitaria

Para determinar la expresión de genes de la respuesta inmunitaria en el tejido cerebral, tras la infección con la cepa clínica de *L. monocytogenes* durante distintos tiempos, se analizaron los niveles de ARN mensajero (ARNm) de 84 genes de interés en cada matriz individual. El primer tiempo de estudio fue 1 h lo que se corresponde con la fase temprana de la infección. Posteriormente, se analizaron tiempos hasta las 24 h, para comprobar fases posteriores de la respuesta inmunitaria.

Se realizaron las infecciones en tres ensayos independientes y se extrajo el ARN total de los cultivos (controles e infectados). La concentración de los ARNs extraídos y utilizados para la realización de la qRT-PCR osciló entre un valor mínimo de 76,95 ng/ μ l y un máximo de 488,10 ng/ μ l. En todos ellos, se comprobó la presencia e integridad de las dos bandas del ARNr mediante geles de agarosa (Figura 50).

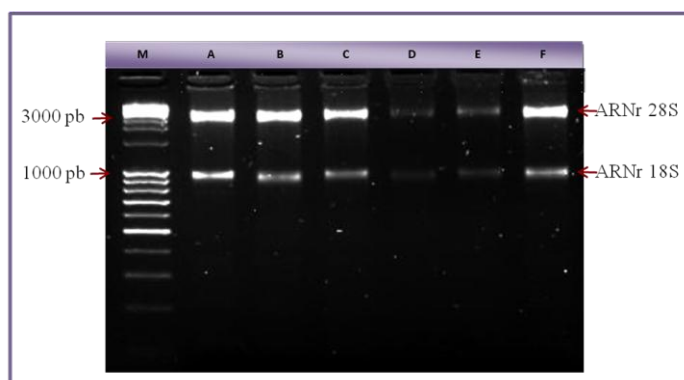


Figura 50. Ejemplo de la detección del ARN ribosomal extraído de cultivos organotípicos. M: Marcador de ADN 1 Kb [Fisher Scientific]; A, Tejido control 24 h; B-C, Tejidos infectados 24 h; D, Control 12 h; E-F, Tejidos infectados 12 h.

Una vez verificada la calidad del ARN se obtuvo el ADNc, a partir del cual se realizó la qRT-PCR de todas las muestras de estudio. Tras la qRT-PCR, se controló la correcta amplificación de las muestras y la especificidad de los productos de amplificación por el análisis de las curvas de disociación, proporcionado por el programa informático del termociclador. Además, se comprobó que la curva de disociación derivada de cada pocillo no tenía más de un pico de T^a mayor a 80°C (Figura 51).

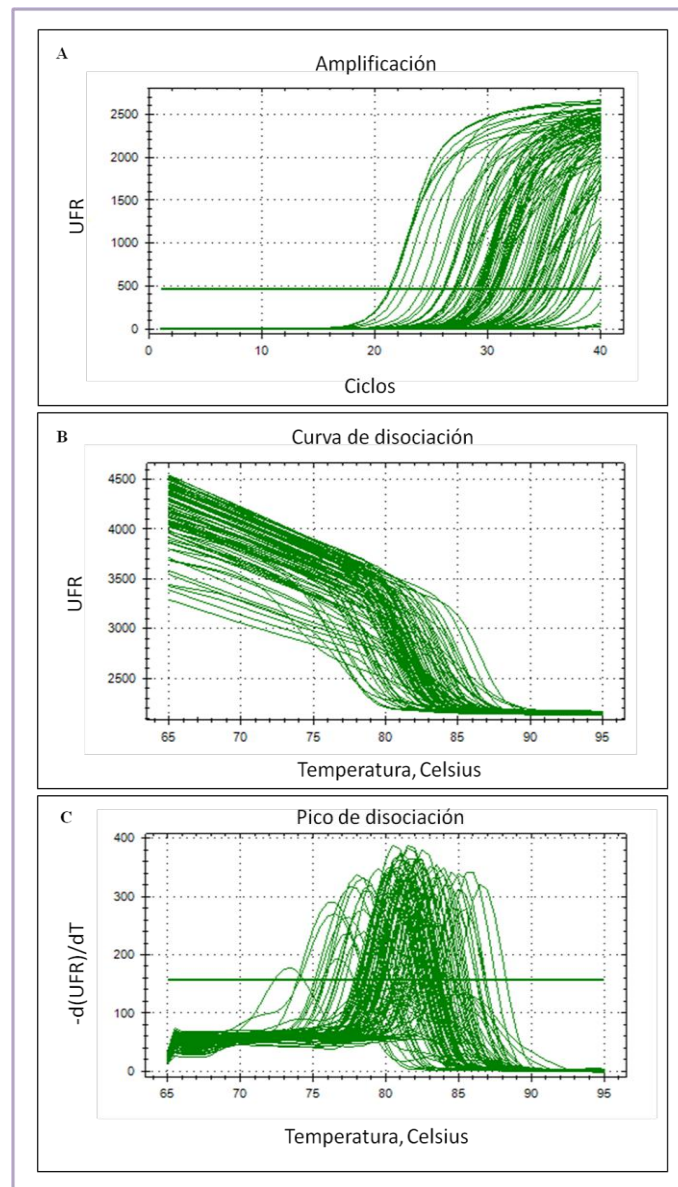


Figura 51. Ejemplos de la validación de la qRT-PCR. A, Análisis gráfico de los ciclos de amplificación de cada gen respecto a las unidades de fluorescencia relativa (UFR). B, Curvas de disociación y C, picos de disociación según la temperatura producidos por cada producto de amplificación presente en las matrices de qRT-PCR.

Finalmente, se analizaron estadísticamente todos los valores C_t obtenidos en cada matriz. El conjunto de los resultados (lista de genes, sus números de acceso en GenBank, media de sus C_t , desviación estándar, media del $\Delta\Delta C_t$, valor de p, y el nivel de expresión relativa) se muestran en las [tablas suplementarias S1-S5](#). El estudio de los datos revelaba que los niveles de expresión de 36 de los 84 genes que se incluían en las matrices estaban claramente modificados por la infección ([Tabla 15](#)). De ellos, 30 genes estaban sobreexpresados o reprimidos más de dos veces durante todo el experimento, de manera estadísticamente significativa. La alta expresión de citocinas proinflamatorias como TNF, miembros de la IL-1, IL-6 y la familia NF-KB fueron características de la respuesta inmunitaria en nuestro modelo. Los genes más sobreexpresados a lo largo de todo el experimento fueron, por orden de posición en la placa: Ccl2, Cd14, Il1a, Il1b, Il1rn, Il6, Irf1, Nos2, Serpine1 y Tnf.

TABLA 15. Expresión de genes de respuesta inmunitaria tras la infección de 3D-OC con *L. monocytogenes*

Símbolo	Descripción	Nivel de expresión relativa				
		Tiempo después de la infección				
		1 h	3 h	5 h	12 h	24 h
Adora2a	Receptor Adenosina A2a				4,5148***	
Camp	Péptido antimicrobiano catelicidina				3,0624***	
Casp1	Caspasa 1				2,8115***	
Casp4	Caspasa 4, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis			5,167***	4,7393**	
Ccl2	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2		12,1426***	225,3463**	173,8059***	84,8789***
Ccr3	Receptor de quimiocina 3 (motivo C-C)			(-) 3,2281 ***		
Cd14	Molécula CD14	4,9565**		58,8648**	21,2786***	15,5337***
Cxcr4	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)		(-)2,1705***	(-) 3,0539***		
Cybb	Citocromo b-245, polipéptido beta				5,3443***	5,6857***
Hmx1	Hemo oxigenasa (decicladora) 1				4,4219***	
Ifngr2	Receptor de interferón gamma 2			3,8709***		
Il10	Interleucina 10	2,5303**				
Il1a	Interleucina 1 alfa	54,0417**		423,436***	165,192***	17,3556***
Il1b	Interleucina 1 beta	53,6684**	29,2832**	669,0638***	198,7301***	44,2417***
Il1r1	Receptor de interleucinas 1, tipo I	2,5775***		3,2625***	2,2942***	2,8959***
Il1rap	Proteína accesoria de receptores de interleucinas 1				2,4817**	

Resultados

Tabla 15 (continuación)

Símbolo	Descripción	1 h	3 h	5 h	12 h	24 h
Il1rn	Antagonista del receptor de interleucinas 1	4,1106**		32,1334**	26,0161***	11,7996***
Il6	Interleucina 6	16,6717**		413,7647**	143,808**	12,1594**
Irak2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	2,0744***		8,893***	4,599**	
Irf1	Factor regulador de interferón 1	4,8658**		25,3281***	6,7179**	2,8626**
Lpb	Proteína de unión al lipopolisacárido				2,5931**	4,2398***
Myd88	Gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide			2,2963***	2,1856***	
Ncf4	Factor citosólico 4 de neutrófilos		3,0568***		2,8115**	2,9773***
Nfkb1	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas			12,7521***		2,0477***
Nfkb2	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	3,9614**		18,6702***	5,8889**	3,5162**
Nfkbia	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	4,9565**	7,6493***	20,3365***	10,019**	
Nlrc4	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	2,0364***			3,0342***	2,2985***
Nos2	Oxido nítrico sintasa inducible 2		51,4584***	430,3401**	465,0794***	331,7609***
Proc	Proteína C	2,2647**				
Serpina1	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	2,7308**				
Serpine1	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	3,0511**		42,8929***	99,3651***	64,1777***
Sftpd	Proteína surfactante D	2,3016**				
Tlr1	Receptor tipo Toll 1				4,8613***	5,6464***
Tlr2	Receptor tipo Toll 2	2,6561***		10,098***	4,5253***	
Tlr10	Receptor tipo Toll 10		5,2367***			
Tnf	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	27,8447**		118,8227***	11,7778**	4,9383**

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de $p < 0,05$.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

Tabla 15. Genes regulados por la infección a distintos tiempos. Los resultados corresponden a la media de los niveles de expresión relativa de tres experimentos independientes (tejidos controles e infectados) y se expresan como los cambios de los tejidos infectados en comparación con los controles no infectados.

Después de 1 h de infección, se observó una alta expresión en los genes de las citocinas proinflamatorias Il1a, Il1b, Il6 y Tnf. Destacó la expresión del TLR2, que aparece sobreexpresado significativamente. La expresión de este TLR junto con el TLR1, permanece constante en todo el estudio. También la molécula adaptadora CD14, que interactúa con los TLRs, estaba sobreexpresada. Igualmente, el gen Nlrc4, receptor citosólico en células de la respuesta inmunitaria, aparece regulado positivamente.

A las 5 h, la mayoría de los genes modulados por la infección, a excepción de Nos2 y Serpine1, muestran su pico más alto de expresión. En este tiempo, 19 genes tenían unas diferencias de expresión mayores de 2 con respecto a los controles; mientras que 2 genes, correspondientes a los receptores de quimiocinas 3 (motivo C-C) y 4 (motivo C-X-C) estaban reprimidos. El gen de la Il1b presentaba la mayor expresión de todos los genes regulados este tiempo (669 veces). Entre las quimiocinas, la Ccl2 (también llamada MCP-1) fue la principal señal inmunomoduladora detectada con una expresión de 225 veces con respecto a los tejidos control.

A las 12 y 24 h se mantiene una alta regulación génica en el tejido, ya que 27 y 18 genes aparecen sobreexpresados, respectivamente (Figura 52).

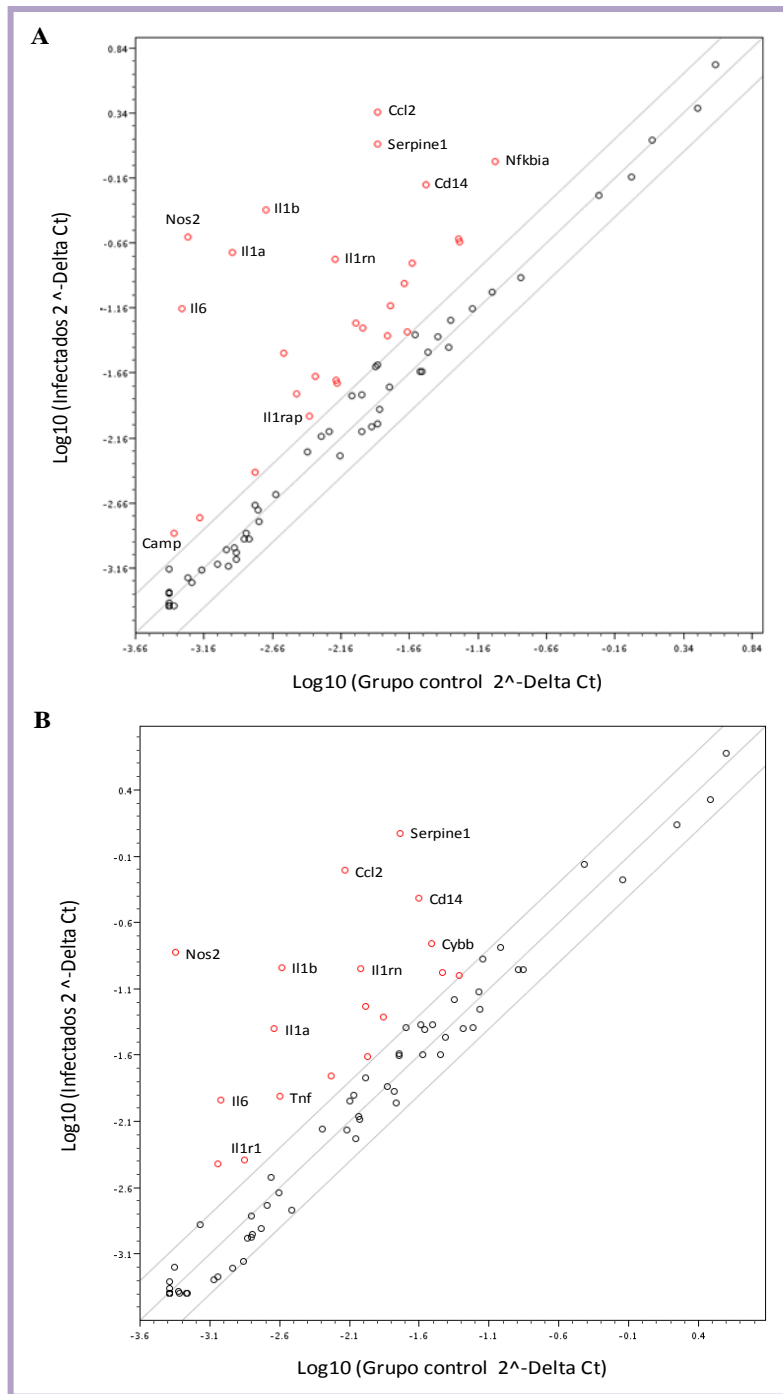


Figura 52. Ejemplos de gráficas de dispersión comparando la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en cultivos 3D-OC infectados con *L. monocytogenes* y la expresión de estos genes en tejidos control, a las 12 (A) y 24 h (B). Cada círculo representa un gen individual. La línea central indica la expresión de genes sin cambios. Las líneas que la limitan indican una diferencia de expresión de 2. Los genes representados fuera de las líneas (círculos rojos) tienen una expresión > de 2 veces respecto a los controles y un valor de $p < 0,05$; y están consistentemente regulados. Se han localizado en la gráfica algunos de los genes sobreexpresados.

A las 12 h, destaca la regulación de Irak2 y Myd88, involucrados en la vía de señalización NF- κ B, que mantienen la respuesta innata activada. Por el contrario, a las 24 h, estos dos genes están modulados por la infección, pero no muestran diferencias mayores de 2 en su expresión respecto a los controles. Además, a las 12 h, se detecta un incremento en la expresión de genes tanto pro-apoptóticos (Caspasa 1 y Caspasa 4) como reguladores negativos de la apoptosis (Serpine 1).

Por lo general, a las 24 h se observa un descenso en la expresión de quimiocinas, citocinas y sus receptores, con respecto a la producida a las 5 y 12 h desde el inicio de la infección (Figura 53). Ante esta situación, el gen Nos2, el más expresado a las 24 h, sigue indicando la producción de altos niveles de óxido nítrico (Figura 54).

Varios genes relevantes de la respuesta inmunitaria innata que pueden alertar al sistema inmunitario no estaban modulados por la infección. Entre éstos estaban algunos genes responsables de la detección de patógenos, como miembros de la familia de los TLRs (Tlr3, Tlr4, Tlr6 y Tlr9) y el receptor Cd1d1, factores de regulación de la función de los macrófagos como Mif, y enzimas antibacterianas como la lisozima. Sin embargo, otros genes (Il10, Proc, Serpina1 y Sftpd) estaban consistentemente modulados por la infección en diferentes tiempos de estudio, a pesar de tener un valor de $p > 0,05$. Una lista de los genes modulados por la infección con diferencias de expresión mayores de 2 con respecto a los controles, la media de sus C_t , la media del $\Delta\Delta C_t$, el valor de p , y el nivel de expresión relativa, se muestran en las tablas suplementarias S6 – S10.

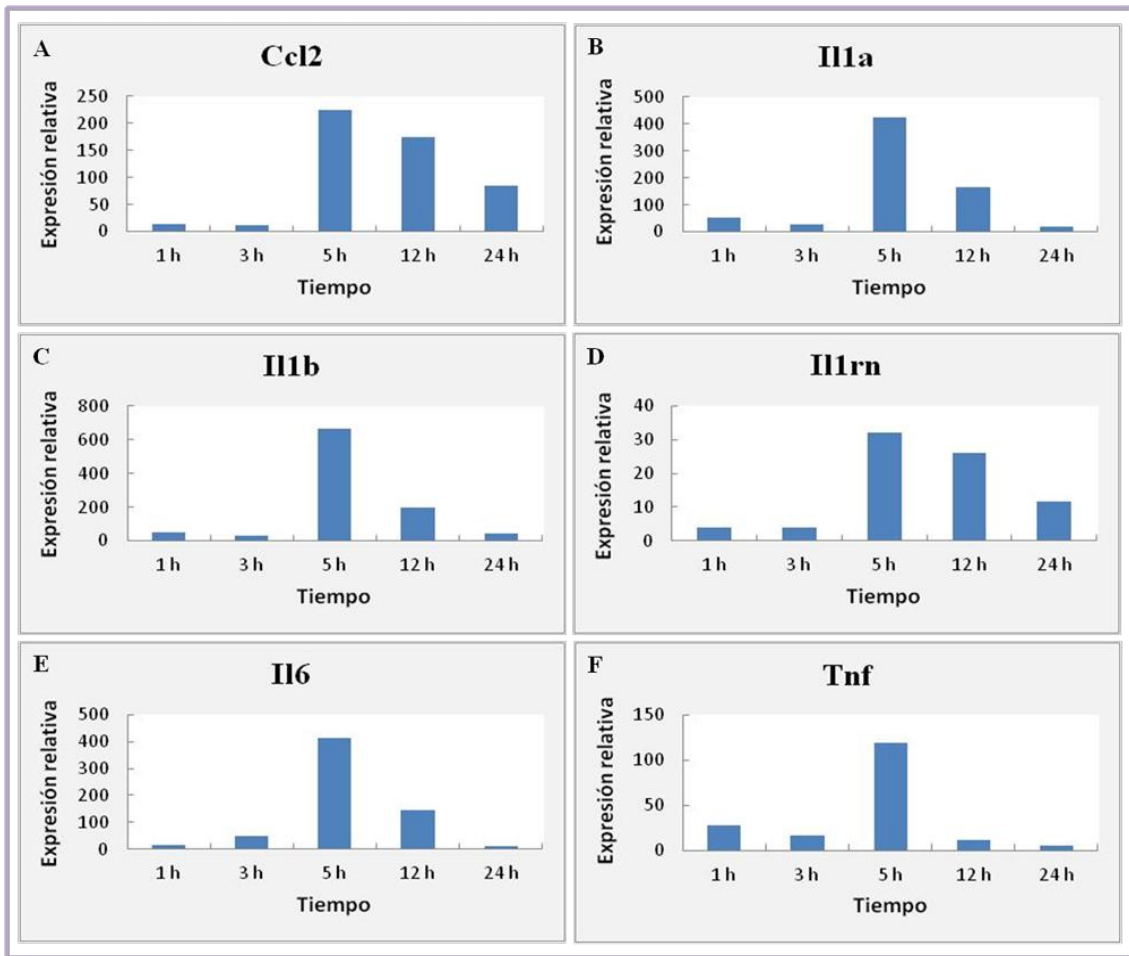


Figura 53. La infección de los 3D-OC con *L. monocytogenes* induce la sobreexpresión de mediadores inflamatorios: A) Ccl2, B) Il1a, C) Il1b, D) Il1rn, E) Il6, F) Tnf, produciendo un nivel de expresión relativa máximo a las 5 h después de la infección. Cada tiempo representa la media de los valores de los niveles de expresión para tres cultivos infectados de manera independiente con respecto a tres cortes sin infectar.

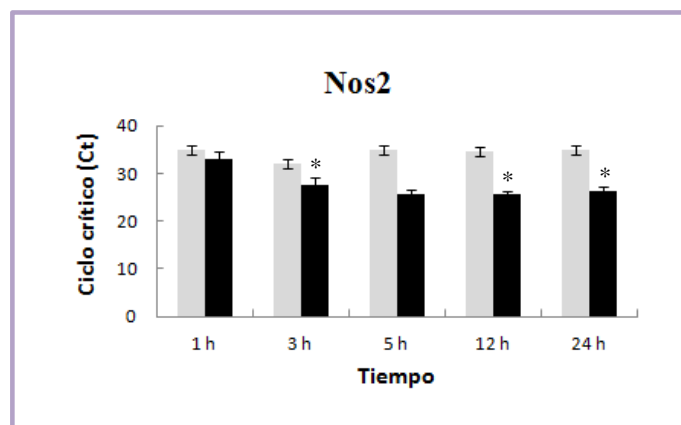


Figura 54. Gráfica comparativa del ciclo crítico de expresión del gen Nos2 entre los cultivos organotípicos control (barras grises) y los infectados (barras negras). Los datos son expresados como la media \pm la

desviación estándar de los C_t y cada barra representa tres experimentos independientes. La expresión de Nos2 en los tejidos control se mantiene prácticamente constante, mientras que en los tejidos infectados aparece sobreexpresado (C_t menor que los controles). El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre los controles y los infectados, con un valor de $p < 0,05$.

3.1.1. Verificación de los productos de qRT-PCR

Tras la qRT-PCR, las matrices se almacenaron a -20°C , y posteriormente se comprobó la presencia de un único amplicón correspondiente al gen de cada pocillo. En la **Figura 55** se comparan los productos de PCR producidos en matrices control e infectadas para el mismo tiempo de estudio, siguiendo la disposición por filas que presentan en las placas de 96 pocillos.

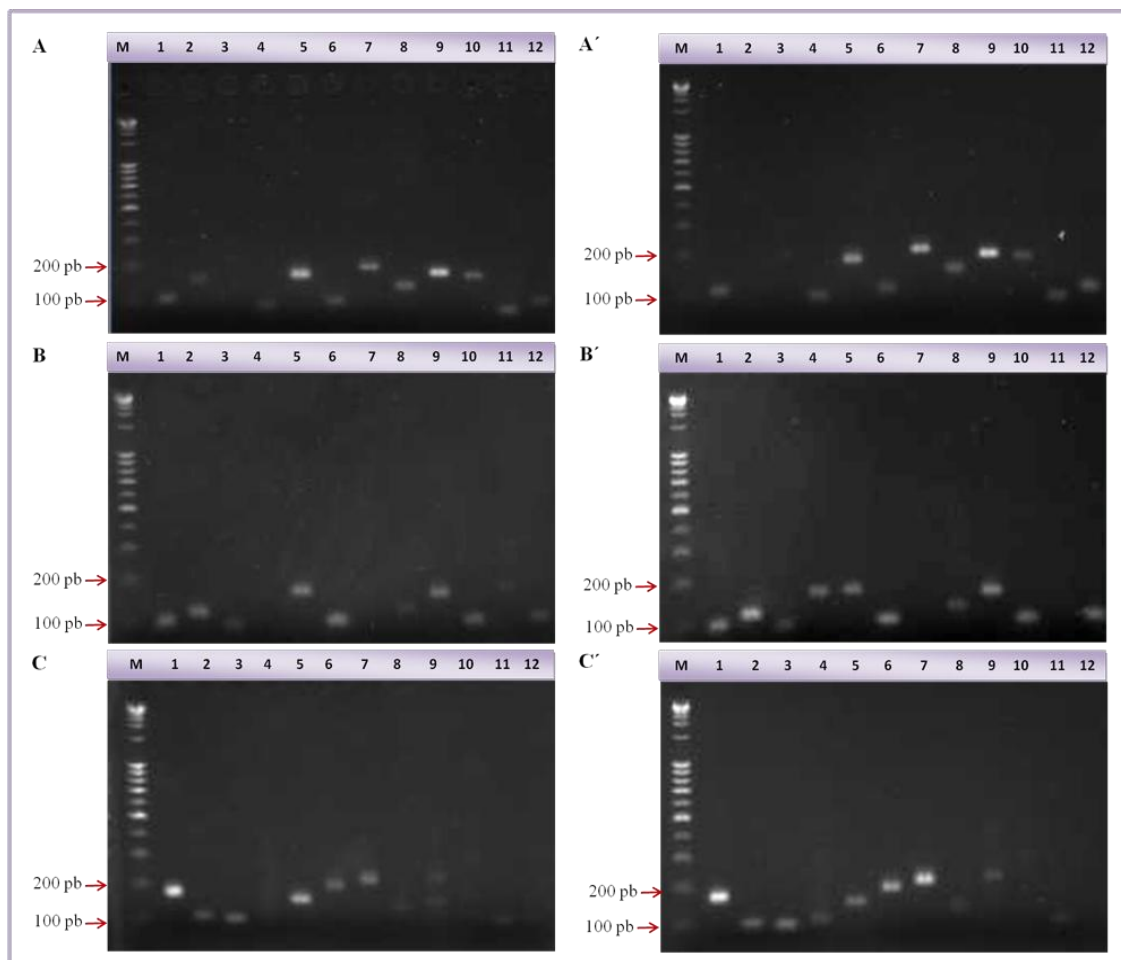


Figura 55

Figura 55 (continuación)

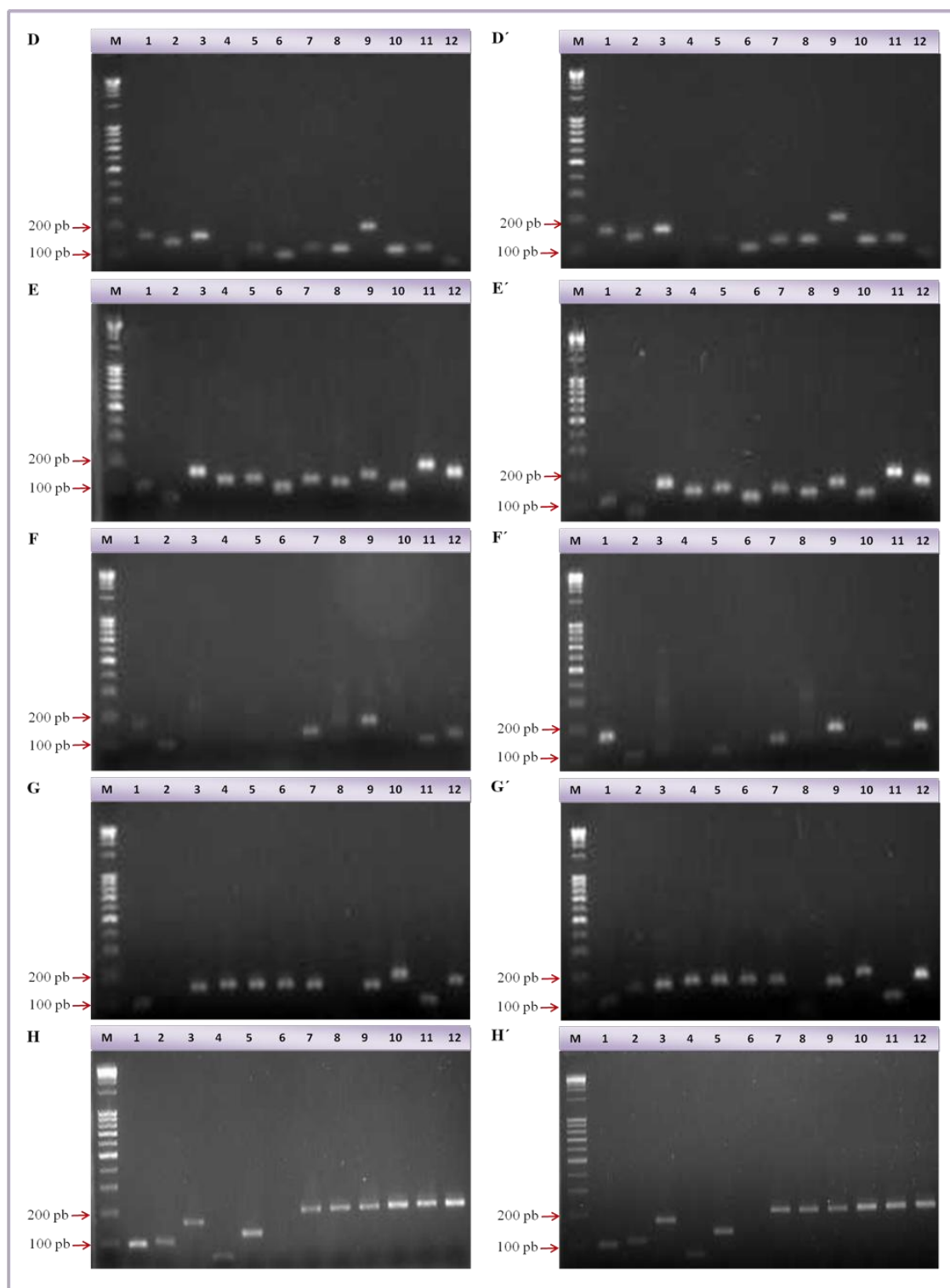


Figura 55. Comprobación de los productos de qRT-PCR generados en cada matriz de genes. Todos los paneles de la izquierda (A – H) corresponden a los genes analizados en tejidos control durante 5 h. Todos los paneles de la derecha (A' – H') corresponden a los genes analizados en tejidos infectados durante 5 h.

A-A': M, Marcador de ADN 1 Kb exACTGene [Fisher Scientific]; 1, Adora2a; 2, C5; 3, C8a; 4, Camp; 5, Casp1; 6, Casp4; 7, Ccl2; 8, Ccr3; 9, Cd14; 10, Cd1d1; 11, Cd55; 12, Cfp. **B-B'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Chuk; 2, Clec7a; 3, Colec12; 4, Crp; 5, Cxcr4; 6, Cybb; 7, Defb4; 8, Dmbt1; 9, Fn1; 10, Hmox1; 11, Ifna1; 12, Ifnb1. **C-C'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Ifngr1; 2, Ifngr2; 3, Ikbkb; 4, Il10; 5, Il12rb2; 6, Il1a; 7, Il1b; 8, Il1f10; 9, Il1f5; 10, Il1f6; 11, Il1f8; 12, Il1f9. **D-D'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Il1r1; 2, Il1r2; 3, Il1rap; 4, Il1rapl2; 5, Il1r2; 6, Il1rn; 7, Il6; 8, Irak1; 9, Irak2; 10, Irf1; 11, Lalba; 12, Lbp. **E-E'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Lck; 2, Ly96; 3, Lyz2; 4, Mapk14; 5, Mapk8; 6, Mif; 7, Myd88; 8, Ncf4; 9, Nfkb1; 10, Nfkb2; 11, Nfkbia; 12, Nlr4. **F-F'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Nos2; 2, Pglyrp1; 3, Pglyrp3; 4, Pppb; 5, Prg2; 6, Proc; 7, Ptafr; 8, Serpina1; 9, Serpine1; 10, Sftpd; 11, Stab1; 12, Tgfb1. **G-G'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Tlr1; 2, Tlr10; 3, Tlr2; 4, Tlr3; 5, Tlr4; 6, Tlr6; 7, Tlr9; 8, Tnf; 9, Tnfrsf1a; 10, Tollip; 11, Traf6; 12, Trem1. **H-H'**: M, Marcador de ADN 1 Kb; 1, Proteína ribosomal, grande, P1; 2, Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1; 3, Proteína ribosomal L13A; 4, Lactato deshidrogenasa A; 5, Beta actina; 6, Control de ADN genómico de rata; 7-9; Control de la transcripción inversa; 10-12, Control positivo de la PCR.

Como se puede comprobar, todos los productos analizados presentaban una única banda. Entre los controles y los infectados se observaban dos posibles diferencias: 1) genes visualizados en la placa control no lo estaban en la placa infectada ó viceversa (por ejemplo, el gen C5 (A2) identificado sólo en el control ó el gen Crp (B4) identificado sólo en el infectado), 2) diferencias entre la intensidad de las bandas (por ejemplo, los genes Ccl2 (A7), Il1a (C6), Il1b (C7) más intensos en los infectados). Estos resultados corroboraban el análisis cuantitativo realizado anteriormente, ya que las bandas más intensas observadas en los pocillos de las matrices infectadas representaban genes en los que existía mayor cantidad de producto y por ello presentaban valores de C_t menores que en los controles. Además, la fila de genes de referencia y control (H) que se incluye en todas las matrices no mostraba diferencias entre las dos situaciones lo que validaba de nuevo los resultados. El control de ADN genómico (H6) no se detectó en la electroforesis por no presentar señal o por presentar una señal tardía de fluorescencia en la qRT-PCR con valores de C_t mayores de 35, al igual que ocurría con otros genes de la matriz que no se observaban en los geles de agarosa mostrados.

3.1.2. Expresión post-transcripcional de citocinas proinflamatorias

Para confirmar la existencia de mecanismos de control post-transcripcional, se realizó un ensayo ELISA de las citocinas IL-6 e IL-1 β (Figura 56).

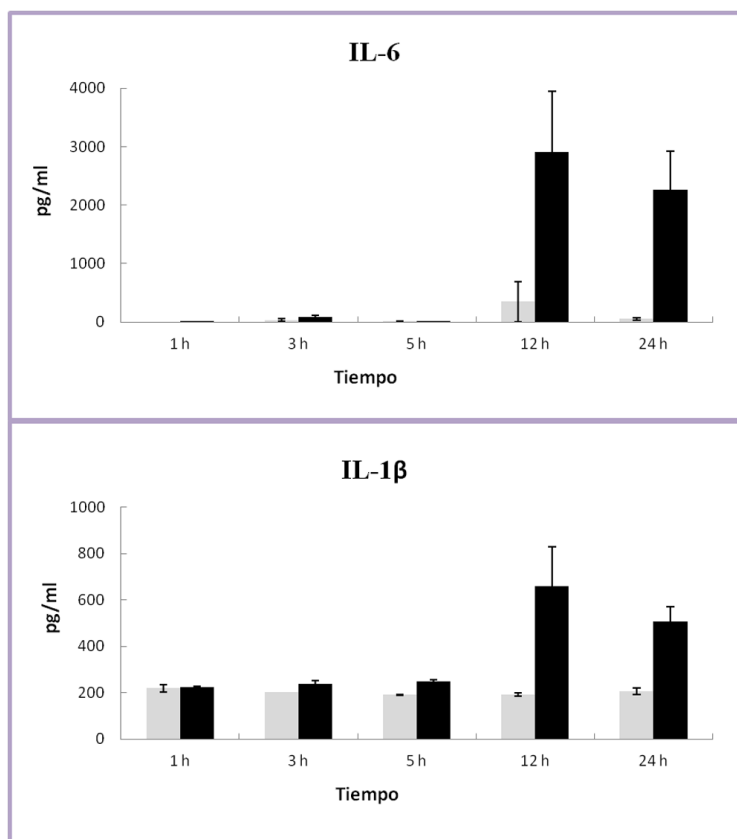


Figura 56. ELISA de IL-6 e IL-1β. Gráficas de barras mostrando los niveles de IL-6 e IL-1β analizados en el medio de cultivo filtrado de tejidos organotípicos control (barras grises) e infectados (barras negras). Los resultados representan dos cultivos independientes medidos por duplicado y expresados como la media ± el error típico de las muestras.

L. monocytogenes inducía un incremento significativo en la inducción y liberación de estas dos citocinas 5 h después de la infección. El pico más alto de ambas citocinas ocurría a las 12 h (2912,97 pg/ml de IL-6 y 657,05 de IL-1β), descendiendo su nivel de expresión a las 24 h. La máxima expresión de estos dos genes se producía a las 5 h, lo que nos indica que existe un retraso entre la transcripción y la secreción de las proteínas al medio.

Estudios de ELISA complementarios para la citocina IL-1β realizados tras la infección de los cultivos organotípicos con el mutante en LLO mostraban, hasta las 5 h, un comportamiento similar al de la cepa clínica. Sin embargo, 24 h después de la infección, los niveles de expresión de esta citocina debidos a la infección con el mutante descendieron significativamente con respecto a la cepa clínica (304,42 pg/ml frente a 505,92 pg/ml) (Figura 57).

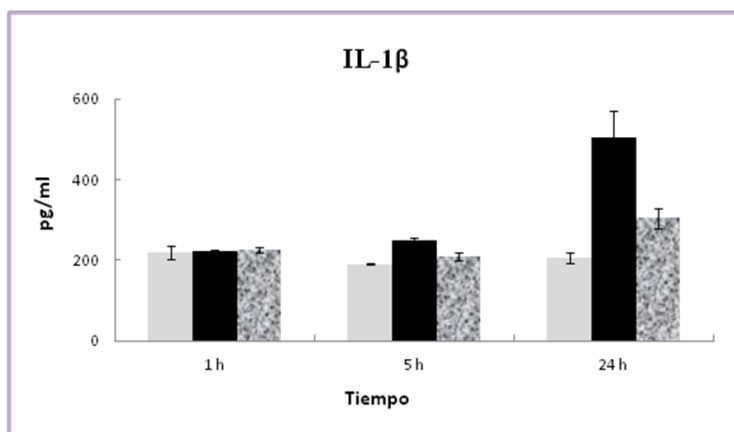


Figura 57. ELISA de los niveles de IL-1 β analizados en tejidos organotípicos control (barras grises), tejidos infectados con *L. monocytogenes* HUMV-4251 (barras negras) y tejidos infectados con el mutante en LLO (barras con textura). Los resultados representan dos cultivos independientes medidos por duplicado y expresados como la media \pm el error típico de las muestras.

3.2. Expresión de genes relacionados con la autofagia

A raíz de la descripción de la respuesta inmunitaria en nuestro modelo, decidimos evaluar también la expresión de genes relacionados con la ruta de la autofagia utilizando matrices de PCR en tiempo real. Este estudio lo realizamos a las 5 h y 12 h después de la infección, por ser dos tiempos que presentaban más de 20 genes de respuesta inmunitaria modulados por las infecciones.

Tras la realización de la qRT-PCR de la misma manera que para el estudio de respuesta inmunitaria, los resultados obtenidos mostraban que todos los componentes de la maquinaria de la autofagia y otros reguladores claves de la misma estaban presentes en los cerebros de rata recién nacidas. Una lista de todos los genes estudiados, sus números de acceso en GenBank, la media de sus C_t , la desviación estándar, la media del $\Delta\Delta C_t$, el valor de p, y el nivel de expresión relativa, se muestra en las [tablas suplementarias S11 y S12](#). Durante el estudio, la expresión de 7 de los 84 genes incluidos en las matrices de qRT-PCR estaba claramente modulada por la infección ([Tabla 16](#)). Entre ellos, el TNF fue la citocina más sobreexpresada con un pico de expresión a las 5 h. Exceptuando este factor, en el resto de genes no se producían grandes diferencias de expresión entre las 5 y 12 h ([Figura 58](#)). Al igual que en el estudio de la respuesta inmunitaria, el gen del receptor de quimiocinas 4 (Cxcr4) estaba

reprimido significativamente durante los dos tiempos de estudio. También, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (Igf1) aparecía reprimido. Respecto a los genes que conforman el núcleo central de la autofagia, sólo el gen Atg12 aparecía regulado negativamente por la infección, mientras que otros como el Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg9 y Atg16 no estaban regulados.

TABLA 16. Expresión de genes de autofagia tras la infección de 3D-OC con *L. monocytogenes*

Símbolo	Descripción	Nivel de expresión relativa	
		Tiempo después de la infección	
		5 h	12 h
Atg12	Homólogo de ATG12 relacionado con la autofagia (<i>S.cerevisiae</i>)	(-) 2,0951***	
Cxcr4	Receptor de quimiocina 4 (motivo CXC)	(-) 3,17***	(-) 2,2395***
Fas	Fas (Miembro de la superfamilia del receptor de TNF 6)	3,7877***	
Igf1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1		(-) 4,2742***
Tgm2	Transglutaminasa 2, polipéptido C		7,8589**
Tnf	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	113,8113***	19,4968***
Tnfsf10	Miembro 10 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral		4,8154**

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de $p < 0,05$.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

Tabla 16. Expresión de genes modulados por la infección a las 5 y 12 h. Los resultados corresponden a las medias de tres y cuatro experimentos independientes (tejidos control e infectados respectivamente) y se expresan como los cambios de los tejidos infectados en comparación con los controles no infectados.

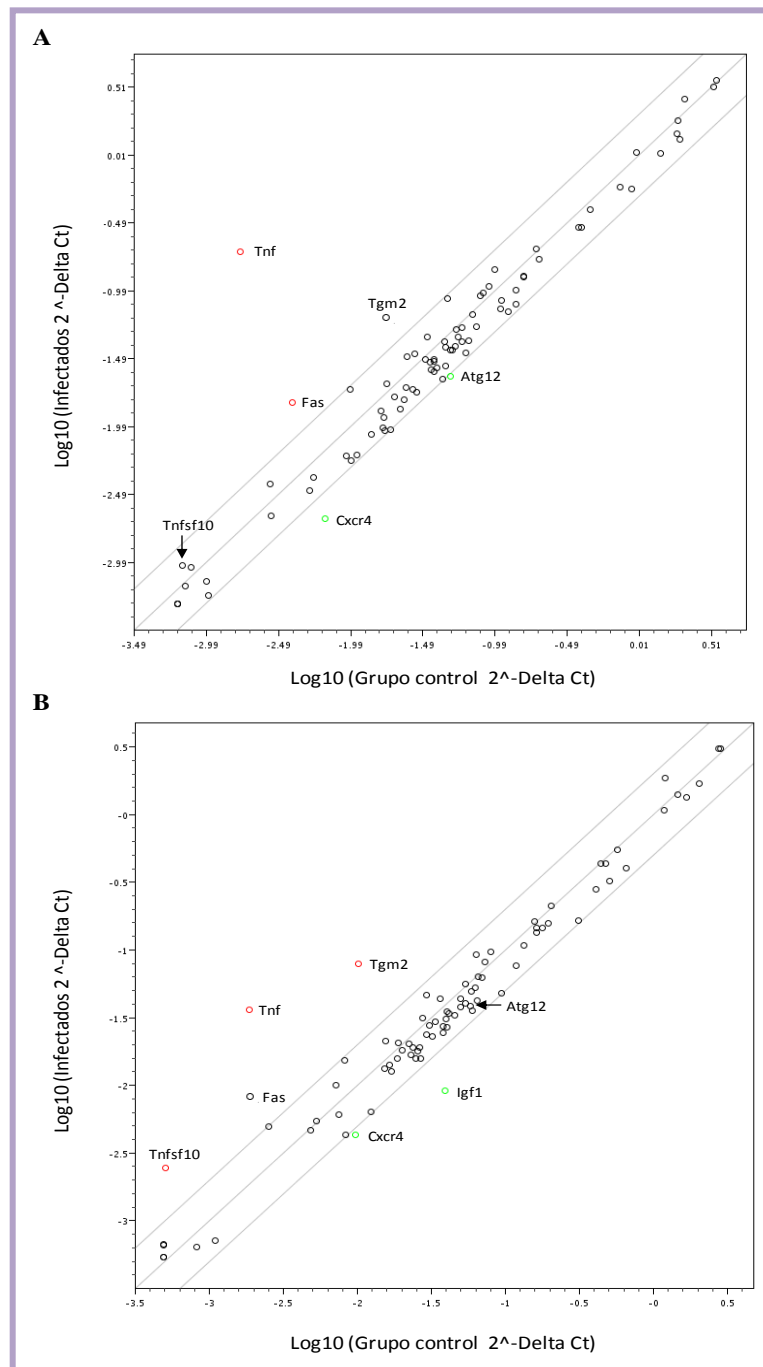


Figura 58. Ejemplos de gráficas de dispersión comparando la expresión de genes involucrados en la respuesta autofágica en cultivos 3D-OC infectados con *L. monocytogenes* y la expresión de estos genes en tejidos no infectados, a las 5 (A) y 12 h (B). Cada círculo representa un gen individual. La línea central indica la expresión de genes sin cambios. Las líneas que la limitan indican una diferencia de expresión de 2. Los genes representados fuera de las líneas tienen una expresión >2 (círculos rojos) ó <2 (círculos verdes), un valor de $p < 0,05$, y están consistentemente regulados en cerebros infectados con *L. monocytogenes* en comparación con la expresión en los tejidos control. El gen Tgm2 a las 5 h y el gen Fas a las 12 h se han identificado en la gráfica por presentar una expresión >2 , a pesar de tener un valor de $p > 0,05$ (círculos negros fuera de la primera línea límite). Se han localizado en la gráfica los genes mostrados en la Tabla 16.

Además, algunos genes correguladores de la autofagia y apoptosis (como Bid y Nfkb1) y componentes de la maquinaria de la autofagia involucrados en la formación de vacuolas (Irgm y Wipi1) presentaban diferencias mayores de 2 con respecto a sus controles, si bien los datos obtenidos para ellos no eran estadísticamente significativos (valor de $p > 0,05$). Por otro lado, otros genes importantes de estos dos grupos, aunque presentes en el tejido, no aparecían modulados por la infección, como los correguladores Bad, Bak1, Bax, Bcl2, Caspasas 3 y 8, Tp53; y el componente Ulk1. Todos los genes con diferencias mayores de 2, la media de sus C_t , desviación estándar, media del $\Delta\Delta C_t$, valor de p , y el nivel de expresión relativa se recogen en las tablas suplementarias S13 y S14.

4. SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN EL TEJIDO CEREBRAL

Para determinar la supervivencia de *L. monocytogenes* en los cultivos 3D-OC, se contabilizaron el número de bacterias viables recuperadas después de la infección a distintos tiempos (1 h, 5 h, 12 h, 24 h y 48 h).

Los resultados obtenidos indicaron que la cepa clínica de *L. monocytogenes* utilizada en este estudio era capaz de sobrevivir a lo largo de todo el experimento (Figura 59). Sin embargo, con el tiempo, se observaba una disminución en el número de bacterias, respecto al inóculo inicial, ya que tras la primera hora de infección en la que se recuperaron el 30,27% de las bacterias, a las 48 h sólo se recuperaron un 3,69%.

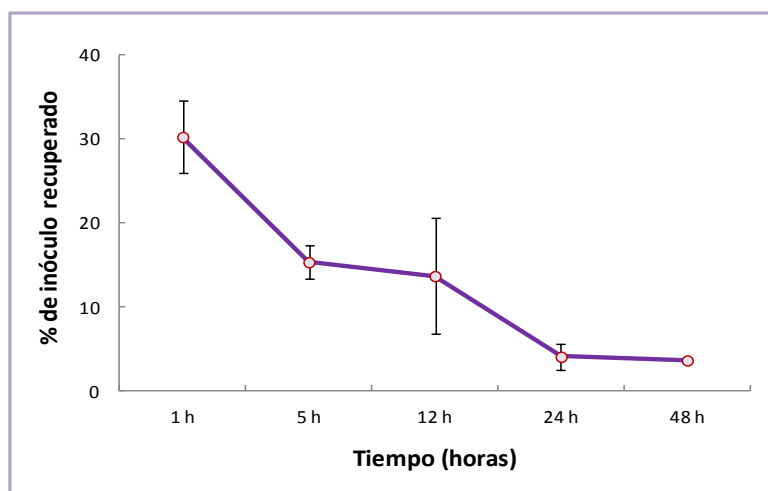


Figura 59. Cinética de la carga bacteriana (*L. monocytogenes* HUMV-4251) en el tejido cerebral. Cada punto aparece como la media de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar del número de bacterias recuperadas del tejido en cada tiempo, expresadas como un porcentaje del inóculo inicial.

Estudiamos además, la supervivencia en el tejido cerebral de las cepas de *L. monocytogenes* mutantes en los factores de virulencia LLO y ActA hasta las 24 h (Figura 60).

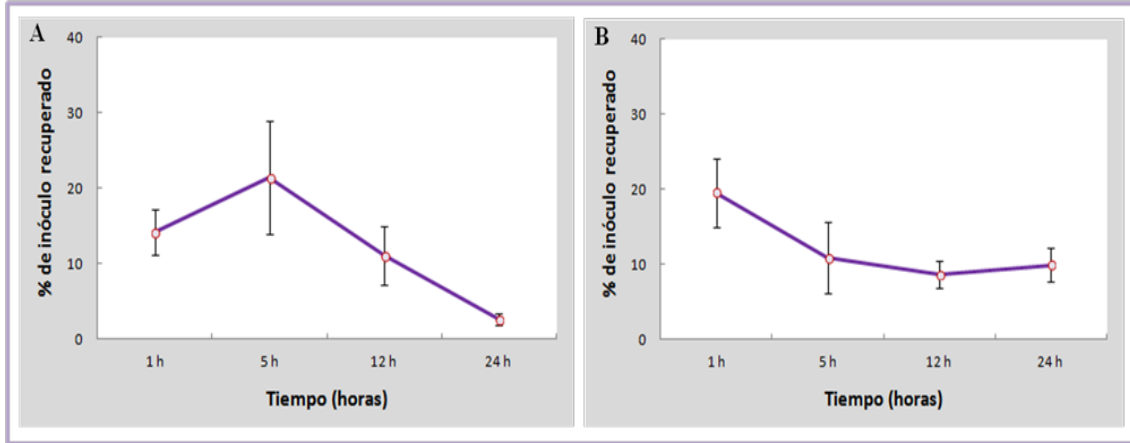


Figura 60. Cinética de la supervivencia de las cepas *L. monocytogenes* BUG 2132: Δ Hly (A) y *L. monocytogenes* BUG 2140: Δ ActA (B) en el tejido cerebral. Cada punto aparece como la media de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar del número de bacterias recuperadas del tejido en cada tiempo, expresadas como un porcentaje del inóculo inicial.

Como se puede comprobar, en el primer tiempo de infección se recuperaron menos bacterias del tejido cerebral (14,14% Hly, 19,53% ActA) en comparación con la cepa clínica (30,27%). A partir de aquí, el número de bacterias va disminuyendo con el tiempo, a excepción del mutante en LLO que a las 5 h parece multiplicarse en el tejido duplicando su porcentaje (21,35%). Por otro lado, el mutante en ActA parece soportar mejor que el mutante en LLO la respuesta del tejido cerebral a las 24 h (9,87% frente a 2,56%).

5. ESTUDIOS DE INFECCIÓN CON CÉLULAS PRIMARIAS

El análisis de la infección del sistema nervioso por *L. monocytogenes* se completó tras el aislamiento de células primarias procedentes del tejido nervioso cultivado *ex vivo*. Para ello, se llevaron a cabo ensayos tanto de microscopía (SEM, inmunofluorescencia y confocal) como de expresión de genes de respuesta inmunitaria. A través de la microscopía comprobamos que además de aislar células primarias de microglía, tal y como nos planteamos en un principio, obteníamos otros tipos celulares. Por este motivo, consideramos analizar la infección en el conjunto de las células primarias aisladas y caracterizar lo que ocurría en cada tipo celular identificado morfológicamente.

5.1. Análisis microscópico de la interacción *L. monocytogenes* - células primarias

Una vez que logramos obtener una gran densidad celular a partir de la disgregación del tejido, tratamos de caracterizar mediante SEM los distintos tipos de células aisladas de los cultivos de cerebro de rata. Asimismo, estas células se infectaron *in vitro* para examinar qué tipos celulares se veían más afectados por la bacteria.

La microscopía SEM nos permitió identificar principalmente dos tipos celulares distintos según su morfología, ambos de relativamente gran tamaño. Por un lado, se observaban células con una forma variada, desde irregular hasta más redondeada, que mostraban numerosos plegamientos y rugosidades en la membrana, sin una organización definida de su citoesqueleto, que recordaban a las células de microglía (Figura 61A-B). Por otro lado, se distinguían células planas de tipo epitelial, en las que los filamentos de actina se veían muy bien definidos y distribuidos de forma paralela (Figura 62A-B). De manera más ocasional, en la mayoría de los campos examinados se observaron pequeños grupos de células que recordaban a neuronas, ya que en ellas se podían distinguir tanto el cuerpo neuronal como un axón (Figura 63). Tras la infección de este cultivo celular mixto durante 1 h, *L. monocytogenes* se detectó principalmente en la población identificada como “microglía”, que se mostraba activada. Numerosas bacterias se encontraban adheridas a su superficie o incluso bajo la membrana celular (Figura 61C-D). Sin embargo, en las células de morfología epitelioide sólo se detectaron algunas bacterias en contacto con la superficie, que no parecían estar en el proceso de

infección de las células (Figura 62C-D). De igual manera, las pocas células de morfología neuronal identificadas en los cultivos estaban mínimamente infectadas (Figura 63E).

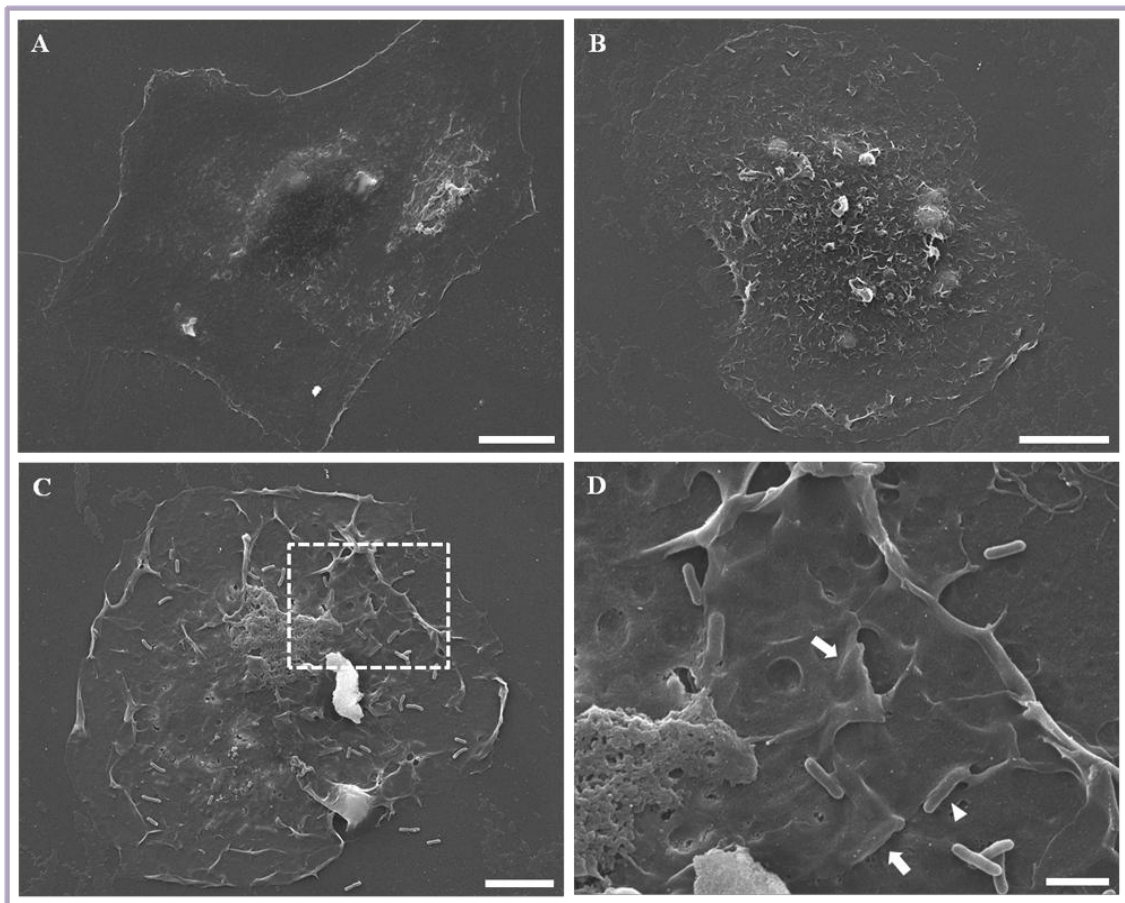


Figura 61. Microfotografías de SEM de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Célula de microglía procedente de un cultivo control sin infectar. B-C, Microglía primaria de rata con bacterias en su superficie. D, Detalle del área marcada en C. Se muestran bacterias tanto en contacto con la superficie de la célula estableciendo uniones con la membrana celular (cabeza de flecha), como bajo la membrana celular (flechas). Aumentos originales: A, $\times 2000$; B, $\times 2500$; C, $\times 4000$; D, $\times 15000$; Barras de escala: A, 25 μm ; B, 20 μm ; C, 10 μm ; D, 2,5 μm .

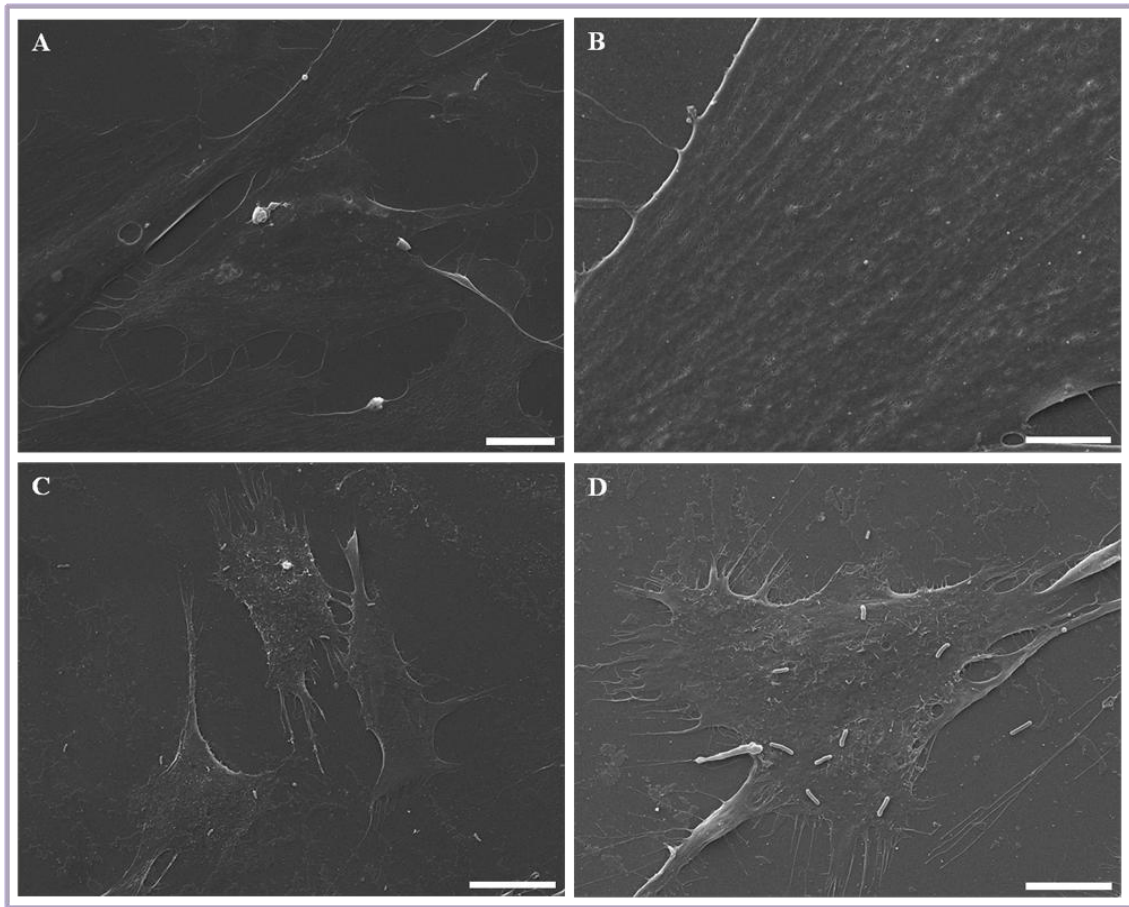


Figura 62. Microfotografías de SEM de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Monocapa de células planas control. B, Distribución paralela y organizada de los filamentos de actina. C-D, Células planas de cultivos infectados con algunas bacterias adheridas. Aumentos originales: A, $\times 2000$; B, $\times 10000$; C, $\times 2500$; D, $\times 5000$; Barras de escala: A, $25 \mu\text{m}$; B, $5 \mu\text{m}$; C, $20 \mu\text{m}$; D, $10 \mu\text{m}$.

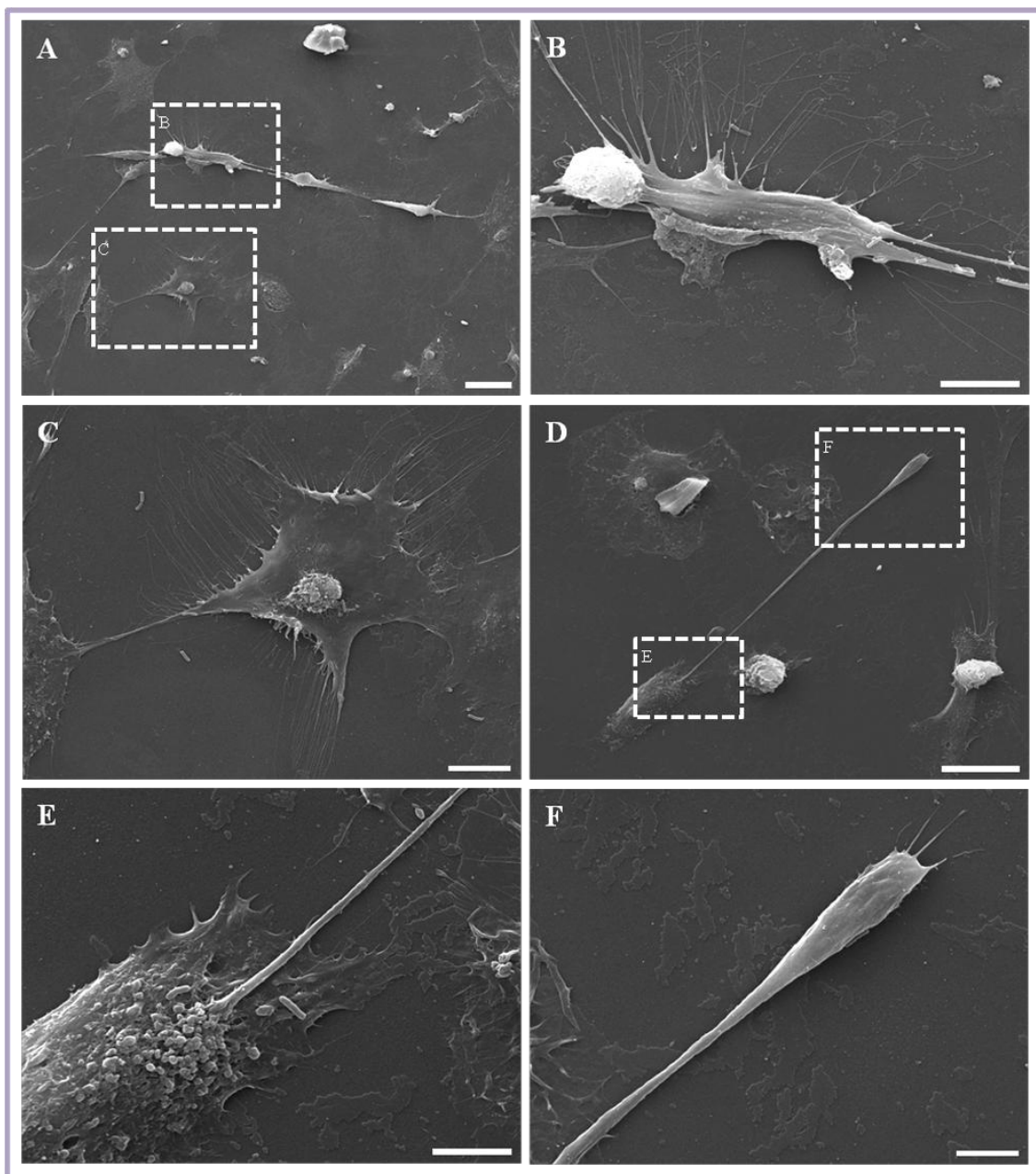


Figura 63. Microfotografías de SEM de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Neuronas dispuestas en fila. B-C, Detalles de las áreas marcadas en A. Destacan las numerosas y largas prolongaciones que está emitiendo la célula para anclarse sobre la superficie del cristal. D, Neurona con un axón de gran longitud. E, Detalle del área marcada en D mostrando un cuerpo neuronal del que parte el axón. F, Detalle del axón marcado en D, con pequeñas prolongaciones en su extremo. Aumentos originales: A, $\times 1200$; B, $\times 5000$; C, $\times 4000$; D, $\times 2000$; E, $\times 10000$; F, $\times 8000$. Barras de escala: A, $25 \mu\text{m}$; B-C, $10 \mu\text{m}$; D, $25 \mu\text{m}$; E, $5 \mu\text{m}$; F, $10 \mu\text{m}$.

La utilización de SEM permitió además caracterizar la entrada de las bacterias en las células. A través del análisis detallado y a grandes aumentos, se observó cómo las bacterias penetraban en las células mediante un mecanismo tipo *zipper* (Figura 64).

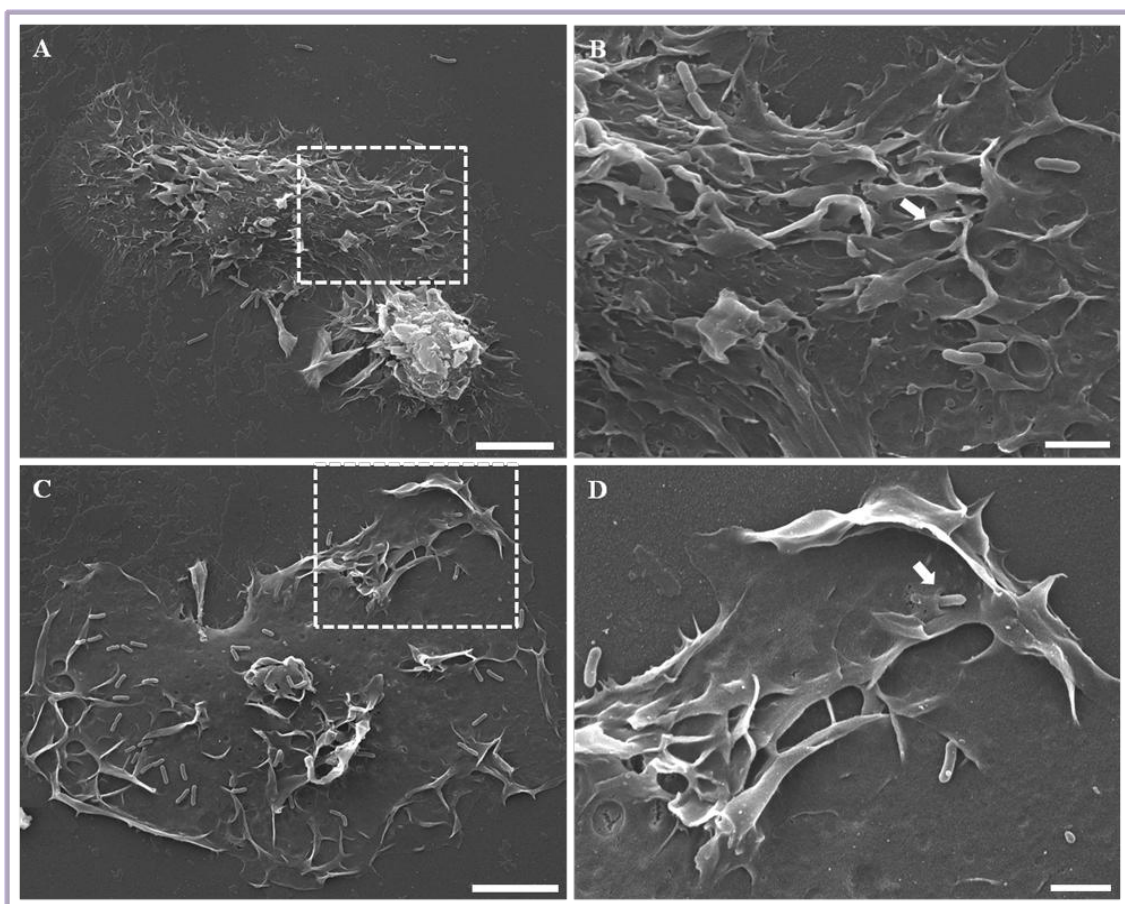


Figura 64. Microfotografías de SEM de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A y C, Células primarias microgliales activadas. B y D, Detalles del área marcada en A y C. Destaca la presencia de bacterias entrando en las células por un mecanismo *zipper* (flechas). Aumentos originales: A, $\times 4500$; B, $\times 15000$; C, $\times 5000$; D, $\times 14000$. Barras de escala: A y C, $10\ \mu\text{m}$; B y D, $2,5\ \mu\text{m}$.

Además, en las preparaciones analizadas se observaron algunos eventos de rotura de membranas y muerte celular (Figura 65), al igual que ocurrió en el análisis SEM a nivel tisular.

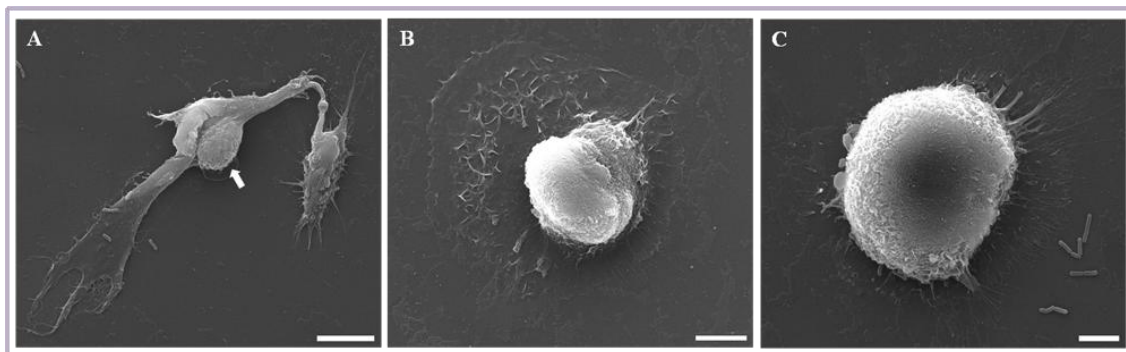


Figura 65. Microfotografías de SEM de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Saco celular de bacterias, envueltas por una membrana que presenta roturas (flecha). B, Célula de microglía en la que el núcleo parece despegarse del resto de componentes celulares. C, Célula muerta despegándose de la superficie del cristal con las prolongaciones celulares muy retraídas. Bajo la célula se pueden observar algunas bacterias. Aumentos originales: A, $\times 5000$; B, $\times 4500$; C, $\times 7000$. Barras de escala: A-B, $10\ \mu\text{m}$; C, $5\ \mu\text{m}$.

El estudio de la interacción entre *Listeria* y las células primarias también se evaluó mediante la realización de ensayos de inmunofluorescencia. En este sentido, la microscopía de inmunofluorescencia nos permitió detallar los eventos ocurridos tras la entrada de *Listeria* en las células. Después de 3 h de infección, la mayoría de las bacterias parecían localizarse en el citoplasma celular cuyo esqueleto de actina había sido marcado con faloidina (Figuras 66-67). De esta manera pudimos comprobar nuevamente que las células con fenotipo microglial estaban llenas de bacterias (Figuras 68-69).

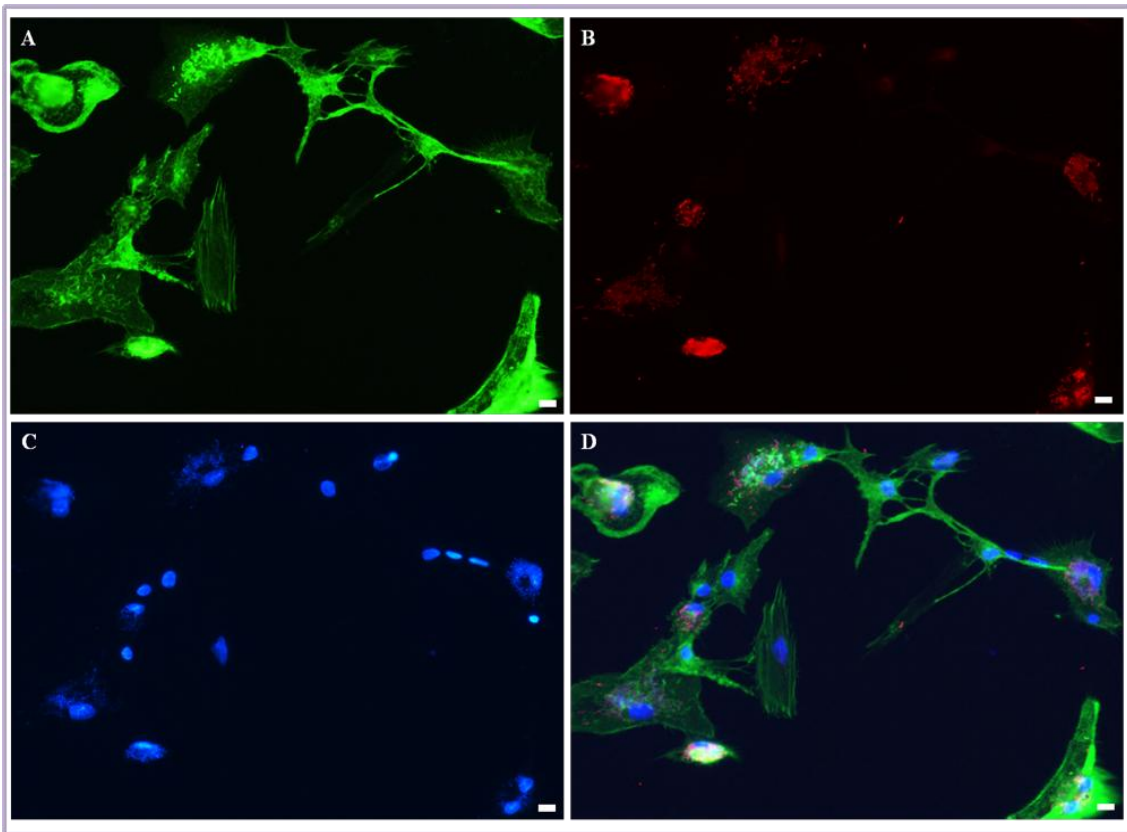


Figura 66. Microfotografías de inmunofluorescencia de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Células primarias marcadas con faloidina. B, Bacterias totales (extracelulares + intracelulares) detectadas con el anticuerpo anti-*Listeria* (mostradas en rojo) en células permeabilizadas. C, Núcleos marcados con DAPI. D, La fusión de las imágenes muestra a las bacterias presumiblemente en el citoplasma celular. Aumentos originales: $\times 200$. Barras de escala: $10 \mu\text{m}$.

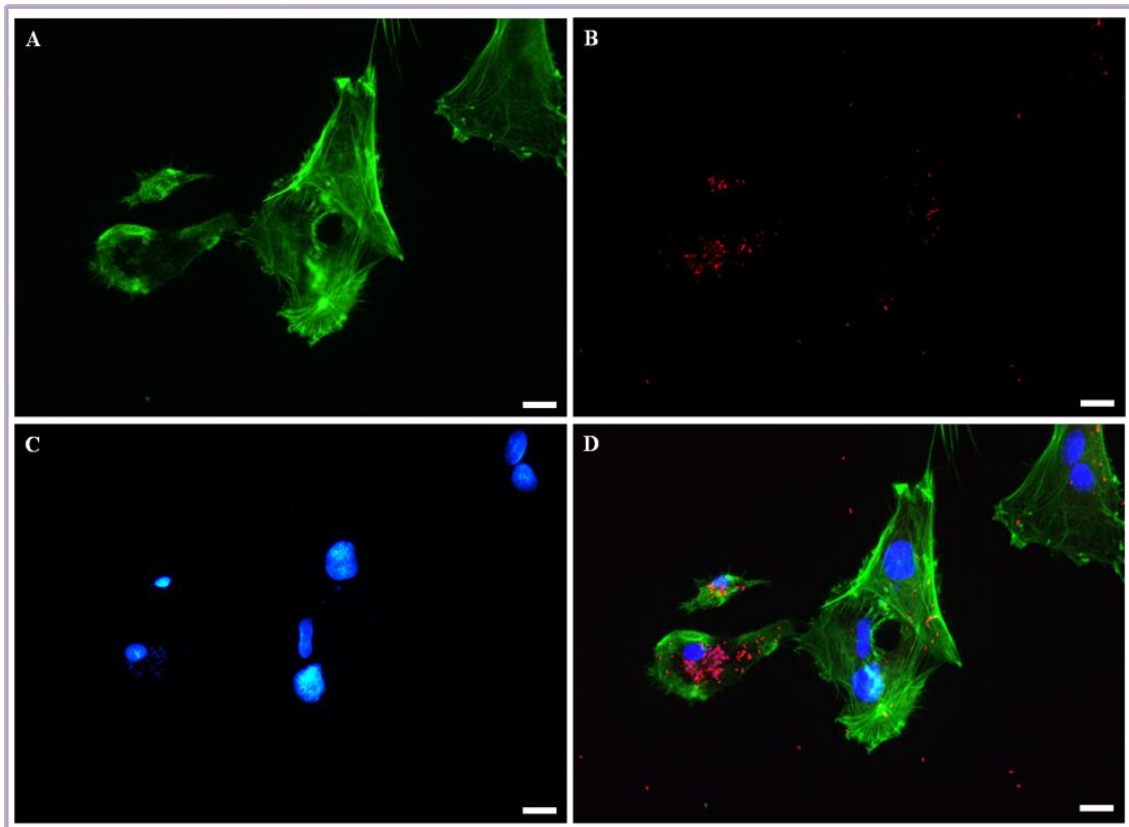


Figura 67. Microfotografías de inmunofluorescencia de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Células primarias marcadas con faloidina. B, Bacterias totales (extracelulares + intracelulares) detectadas con el anticuerpo anti-*Listeria* (marcadas en rojo) en células permeabilizadas. C, Núcleos marcados con DAPI. D, La fusión de las imágenes muestra a las bacterias presumiblemente localizadas en el citoplasma celular. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: 10 μm .

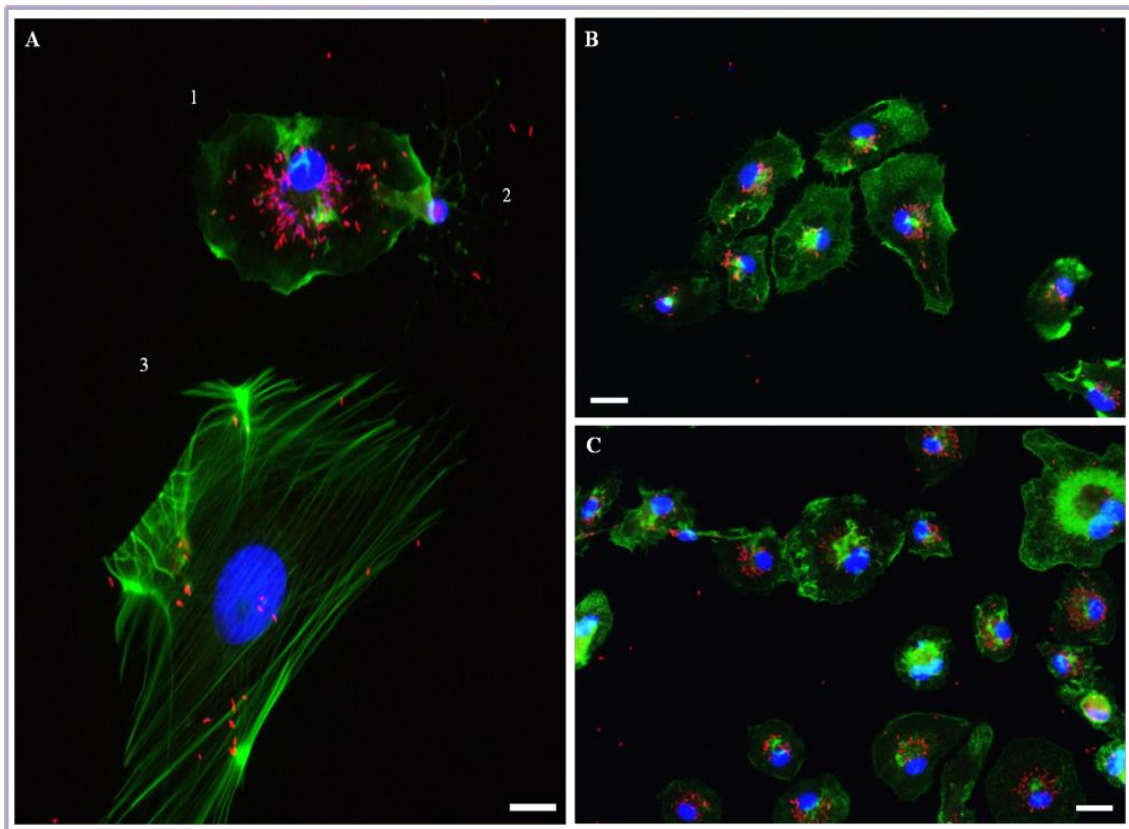


Figura 68. Microfotografías de inmunofluorescencia de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. Células primarias marcadas con faloidina (verde), bacterias (en rojo) detectadas con el anticuerpo anti-*Listeria* y núcleos teñidos con DAPI (azul). A, Diferente morfología entre las células primarias: 1, Célula de microglía llena de bacterias; 2, Células estrelladas tipo astrocito; 3, Célula tipo epitelial con pocas bacterias adheridas. B-C, Células de microglía infectadas por *L. monocytogenes*. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: 10 μm .

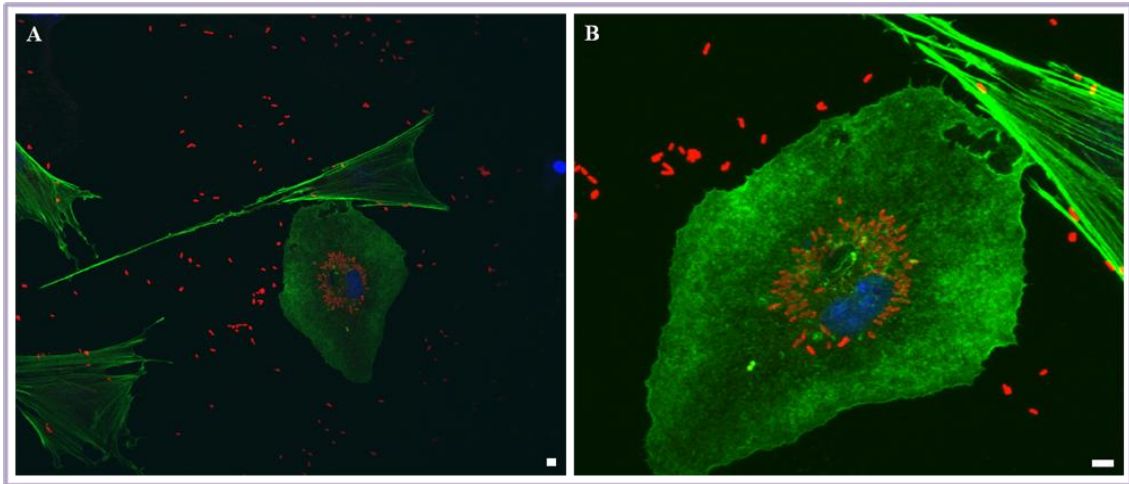


Figura 69. Microfotografías de microscopía confocal de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Localización de las bacterias (en rojo) en las células adheridas a la superficie del cristal. B, Numerosas bacterias parecen localizarse principalmente en el citoplasma de las células con fenotipo microglial. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: $5 \mu\text{m}$.

El marcaje diferencial entre las bacterias extracelulares y totales demostraba que la mayoría de las bacterias se detectaban intracelularmente (Figura 70). Esta localización la pudimos comprobar también mediante microscopía confocal ya que las secciones transversales analizadas mostraban las bacterias intracelulares completamente rodeadas por la actina, mientras que las extracelulares no estaban en contacto con la actina celular (Figura 71).

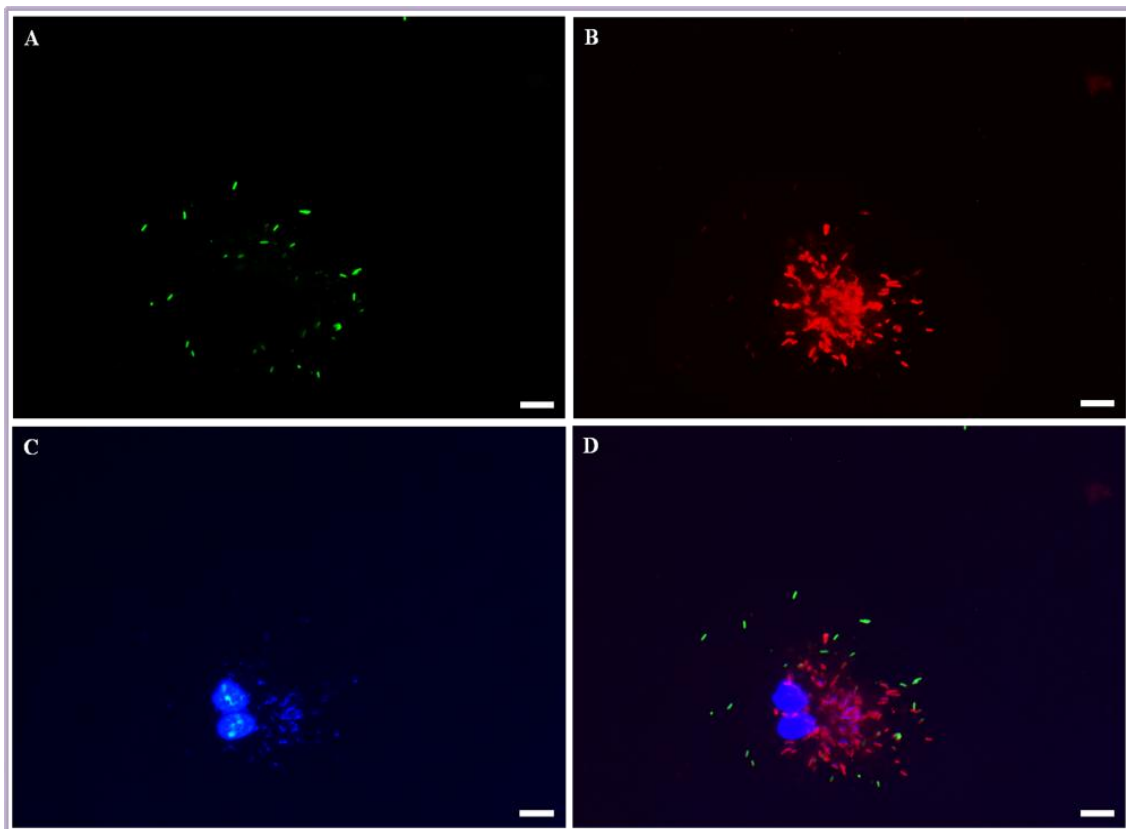


Figura 70. Microfotografías de inmunofluorescencia de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. A, Bacterias extracelulares fueron detectadas con el anticuerpo anti-*Listeria* en células no permeabilizadas. B, Bacterias totales (extracelulares + intracelulares) detectadas con el mismo anticuerpo en células permeabilizadas. C, Núcleos marcados con DAPI. D, La fusión de las imágenes muestra a las bacterias extracelulares en verde y a las intracelulares en rojo. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: 10 μm .

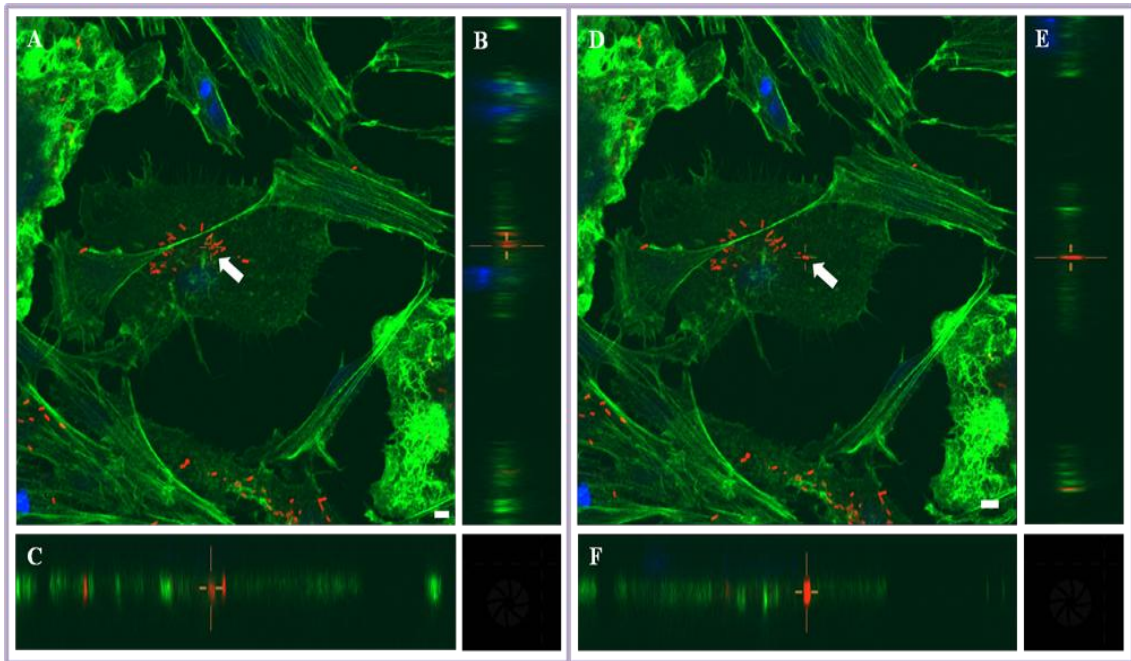


Figura 71. Microfotografías de microscopía confocal de células primarias aisladas de cultivos organotípicos.

A, Bacterias detectadas con el anticuerpo anti-*Listeria* en células de microglía. Muchas de ellas estaban localizadas intracelularmente (flecha). B-C, Sección transversal de los ejes X (B) e Y (C) que muestran la bacteria (rojo) rodeada de actina (verde), localizada dentro de la célula. D, Se muestra una bacteria extracelular (flecha). E-F, Sección transversal de los ejes X (E) e Y (F) que muestran la bacteria sin contacto con la actina. Aumentos originales: $\times 400$. Barras de escala: $5 \mu\text{m}$.

Además, en algunas células infectadas se evidenció el movimiento intracelular adquirido por *L.monocytogenes* al reclutar e inducir la polimerización de la actina celular, lo que le permite moverse por el citoplasma. Este fenómeno se visualiza como una estela en forma de “cola de cometa de actina” (Figura 72).

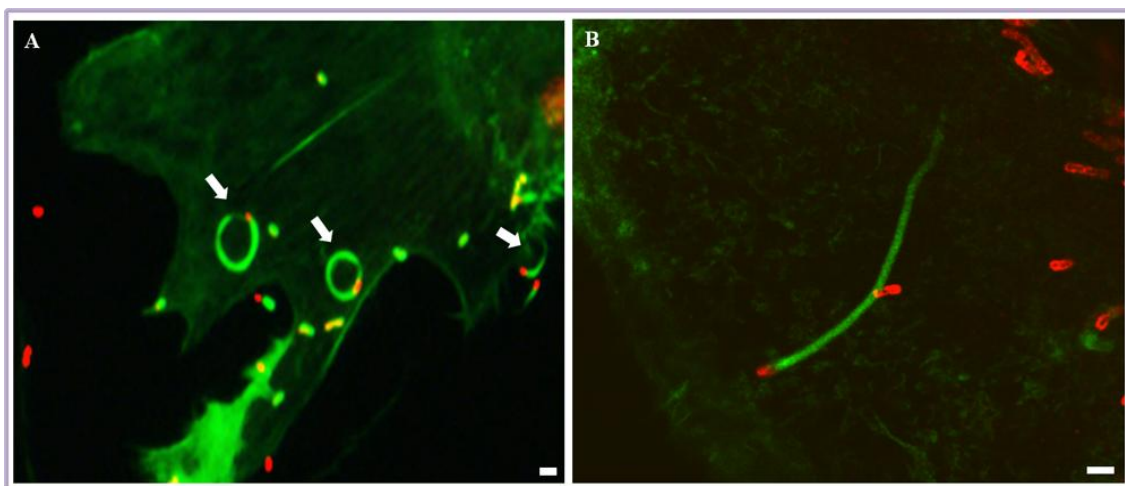


Figura 72. Microfotografías de inmunofluorescencia (A) y microscopía confocal (B) de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. En ambas microfotografías se muestra el movimiento intracelular de *L. monocytogenes* (rojo) en una célula de microglía, a través de la cola de actina celular (marcada en verde) (flechas en A). Aumentos originales, $\times 600$. Barras de escala: 2 μm .

5.1.1. Estudio del tropismo celular de *L. monocytogenes*

Para cuantificar la interacción de *Listeria* con los tipos celulares primarios obtenidos a partir de la disociación del tejido cerebral, se hicieron recuentos del número de bacterias que había en cada tipo celular, bajo el microscopio de fluorescencia. De esta manera, se podía estudiar qué células se encontraban más frecuentemente infectadas por la bacteria y el número de bacterias por célula.

Antes de realizar el recuento, se clasificó a las células según la morfología que presentaban en: microglía, aquellas células claramente fagocíticas y más o menos redondeadas, sin un citoesqueleto distribuido de manera uniforme, y/o que presentaban ruffling en su superficie; células epiteliales, de aspecto plano, en las que se distinguían los filamentos de actina distribuidos paralelamente; neuronas, células en las que se identificaba un axón más largo; y otros tipos, entre los que podrían encontrarse células tipo astrocito por su morfología

estrellada, o bien algún tipo celular que no correspondía con la morfología de las categorías anteriores (Figura 73). Los campos para el recuento del número de bacterias por célula se eligieron en función de que las células estuvieran bien marcadas con la faloidina de manera que se diferenciaron morfológicamente entre ellas.

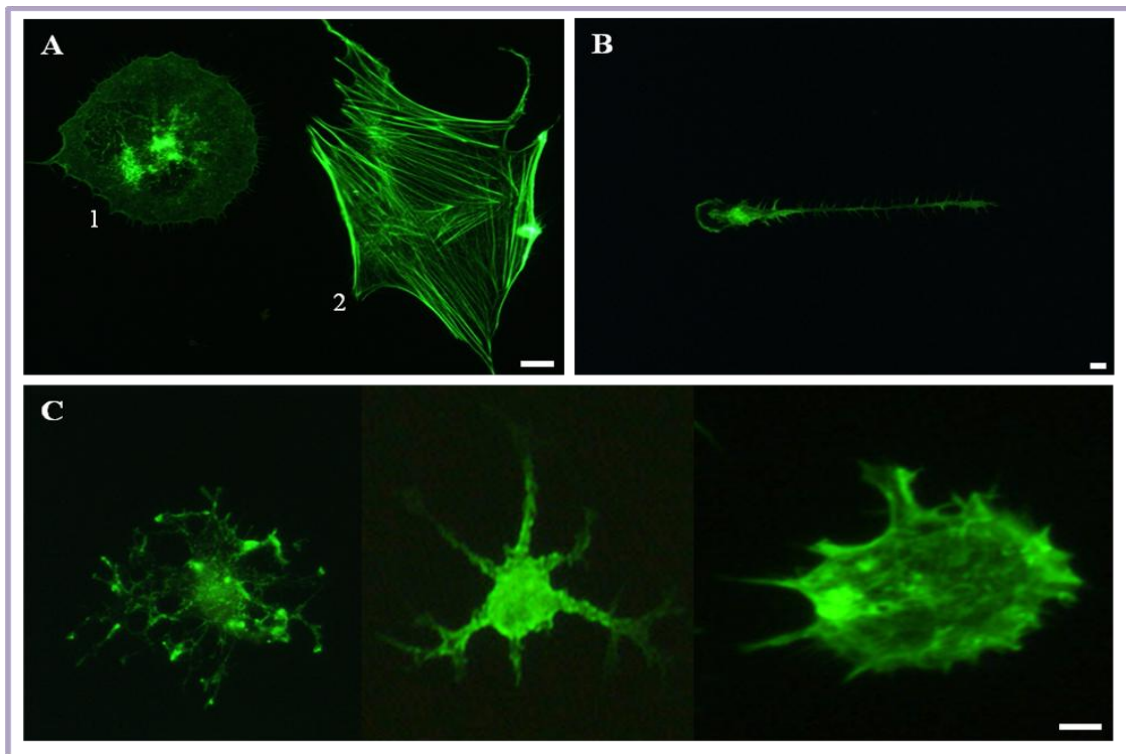


Figura 73. Microfotografías de inmunofluorescencia de células primarias aisladas de cultivos organotípicos. Clasificación de las células según su morfología, analizada mediante el marcaje con faloidina (verde). A, Célula de microglía (1) y célula epitelial (2). B, Neurona. C, Otros tipos celulares observados en las preparaciones. Aumentos originales: A y C, $\times 200$; B, $\times 400$. Barras de escala: 10 μm .

Tras 3 h de infección, se recuperaron de los cultivos celulares el $24,45\% \pm 2,33$ de bacterias respecto al inóculo inicial. Como hemos visto en las microfotografías de SEM e inmunofluorescencia, la mayor parte de estas bacterias se localizaban en la microglía, tipo celular donde se producía la tasa de infección más alta (91,6%) (Figura 74). Además, la mayor parte de estas células tenían más de 10 bacterias en su citoplasma (Figura 75). Las neuronas mostraron la segunda mayor tasa de infección. Si bien, este tipo celular apareció en un número menor ($n=35$) y la mayoría tenían menos de 10 bacterias por célula. Las células epiteliales, también muy abundantes en todos los campos observados ($n=47$), fueron el tercer tipo celular más frecuentemente infectado. Catorce células se clasificaron como otros tipos celulares con

morfologías distintas a las anteriormente mencionadas. De ellas, aproximadamente la mitad estaba infectada por bacterias, pero el 35,71% presentaba menos de 10 bacterias por célula.

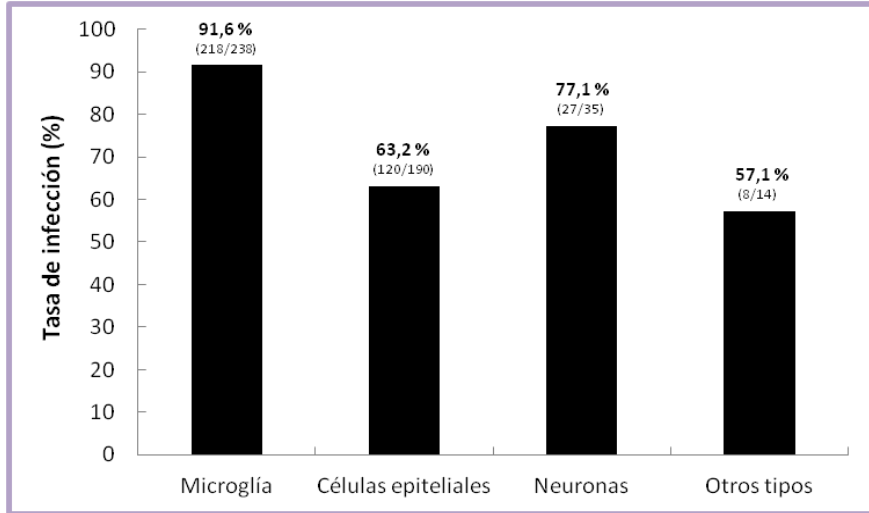


Figura 74. Tasas de infección de *L. monocytogenes* en los diferentes tipos celulares de cerebro de rata. En paréntesis: número de células infectadas / número total de células contabilizadas.

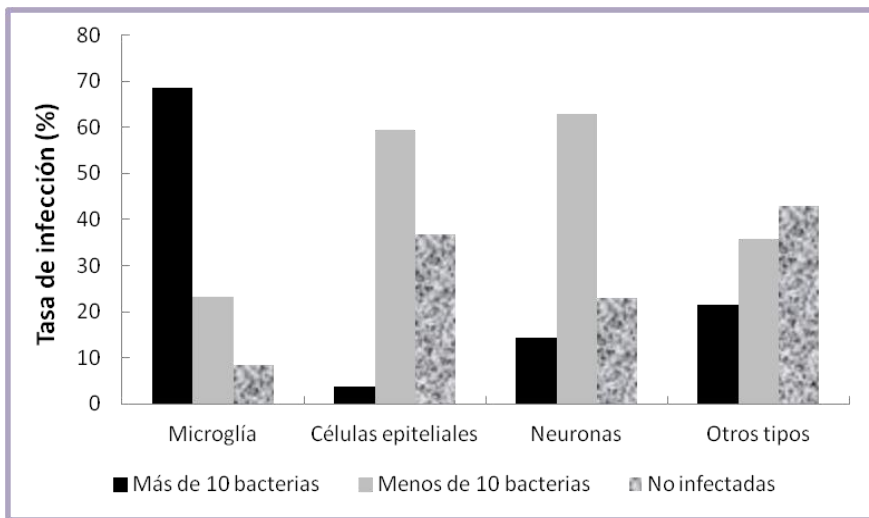


Figura 75. Tasas de infección de *L. monocytogenes* en los diferentes tipos celulares de cerebro de rata, según el número de bacterias presentes en cada célula.

5.2. Expresión de genes de la respuesta inmunitaria

Como se ha comprobado en el apartado anterior, en los cultivos celulares primarios obtenidos del tejido cerebral predominaban células de microglía, las cuales constituyen el principal tipo celular responsable de la respuesta inmunitaria ante una infección o daño cerebral. Debido a esto, y para complementar el estudio de la expresión de genes de la respuesta inmunitaria realizado en el modelo organotípico de SNC, se analizó esta respuesta en las células aisladas, mediante qRT-PCR.

Tras la infección de 3 h, tiempo en el que habíamos observado mayoritariamente una localización intracelular de *Listeria*, se extrajo el ARN de 3 cultivos celulares independientes (control e infectados). La concentración de los ARNs extraídos y utilizados para la realización de la qRT-PCR osciló entre un valor mínimo de 162,75 ng/μl y un máximo de 639,3 ng/μl. A partir del ADNc, se realizó el estudio de expresión mediante el análisis de los niveles de ARN mensajero de los 84 genes incluidos en la matriz. El conjunto de los resultados (lista de genes, sus números de acceso al GenBank, media de sus C_t , desviación estándar, media del $\Delta\Delta C_t$, valor de p , y el nivel de expresión relativa), se muestra en la [tabla suplementaria S15](#). De los 84 genes, 16 estaban regulados positiva o negativamente por la infección con un valor de p estadísticamente significativo ($<0,05$) o regulados consistentemente mediante la comparación de los C_t entre los controles e infectados ([Tabla 17](#)).

TABLA 17. Expresión de genes de respuesta inmunitaria tras la infección de células primarias con *L. monocytogenes*

Símbolo	Descripción	Nivel de expresión relativa
		3 h después de la infección
Adora2a	Receptor Adenosina A2a	16**
Ccl2	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	6,3496**
Ikkkb	Inhibidor del polipéptido ligero kappa potenciador de genes en las células B, quinasa beta	2***
Il10	Interleucina 10	12,6992**
Il1a	Interleucina 1 alfa	64**
Il1b	Interleucina 1 beta	12,6992**
Il1r1	Receptor de interleucinas 1, tipo I	2,5198**
Il6	Interleucina 6	40,3175***

Tabla 17 (continuación)

Irak2	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	3,1748***
Nfkb1	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	4***
Nfkb2	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	3,1748***
Nfkbia	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	5,0397**
Nos2	Oxido nítrico sintasa inducible 2	25,3984***
Serpina1	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	2**
Tlr4	Receptor tipo Toll 4	-2**
Tnf	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	25,3984***

*** Genes sobreexpresados en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de $p < 0,05$.

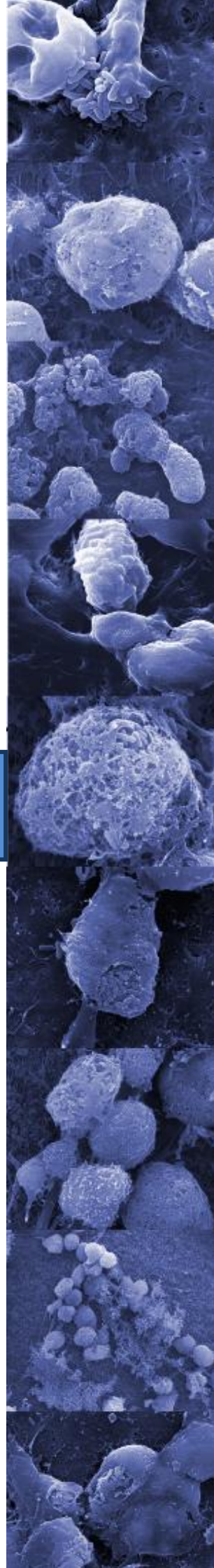
** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados con diferencias > ó < de 2 en sus C_t con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

Tabla 17. Genes regulados 3 h después de la infección. Los resultados corresponden a las medias de tres experimentos independientes (tejidos controles e infectados) y se expresan como los cambios de los cultivos infectados en comparación con los controles no infectados.

Los genes para las citocinas proinflamatorias Il1a y Il6 fueron los que presentaron una mayor sobreexpresión. Otros genes de citocinas proinflamatorias como Il1b o Tnf, la citocina antiinflamatoria Il10 y la quimiocina Ccl2 también aparecían sobreexpresados por la infección. Por otra parte, el gen Nos2 presentaba una diferencia de expresión de 25 veces con respecto a los controles. Otros genes de la respuesta inflamatoria como el receptor Adora2a e Irak2 también están sobreexpresados.

Una lista de los genes modulados por la infección con diferencias de expresión mayores ó menores de 2 con respecto a los controles, la media de sus C_t , la media del $\Delta\Delta C_t$, el valor de p y el nivel de expresión relativa, se muestran en la [tabla suplementaria S16](#). Al igual que en el modelo tisular, genes como la molécula adaptadora Cd14 y el receptor de quimiocinas Cxcr4 presentaban diferencias mayores o menores de 2 con respecto a los controles, a pesar de tener un valor de $p > 0,05$ y no estar consistentemente regulados.

Discusión



1. EL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE SNC COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA LISTERIOSIS CEREBRAL

Los modelos organotípicos tridimensionales permiten predecir la respuesta del tejido a una infección con mayor exactitud que los cultivos celulares convencionales. En comparación con los modelos animales, la utilización de modelos tisulares reduce significativamente el número de animales sacrificados, ya que del mismo individuo se obtienen un gran número de explantes, indicando que este modelo es flexible, reproducible y menos costoso. Además, los 3D-OC de SNC se presentan como interesantes y útiles para el estudio de patógenos capaces de infectar el SNC, facilitando la transferencia de conocimiento de la investigación básica a la clínica.

En la presente Tesis Doctoral, se estudió la interacción del patógeno neurotrópico *Listeria monocytogenes* con explantes de tejido cerebral mediante microscopía óptica y de barrido. Las observaciones microscópicas realizadas en los cultivos 3D-OC permitieron caracterizar el ciclo de infección que sigue *L. monocytogenes* cuando alcanza e infecta el SNC y aspectos de la respuesta celular y tisular al patógeno.

Ante un daño o infección cerebral, la microglía activada es atraída al sitio de infección de forma rápida, presentando formas ameboides (Rock y cols., 2004; Djukic y cols., 2006; Wittwer y cols., 2010). Además de la microglía, otros tipos de monocitos pueden ser atraídos al sitio de infección (Drevets y cols., 2004b). Sin embargo, en nuestro modelo, las células inflamatorias extracerebrales o células que cruzan la BHE para llegar al sitio de infección no están presentes, por lo que los fagocitos ameboides observados por SEM capturando grandes cantidades de bacterias corresponden a células microgliales activadas por la presencia de *Listeria*. La mayoría del conocimiento sobre la activación de la microglía se debe a estudios *in vitro* basados en cultivos celulares, o a estudios *in vivo* que no permiten discernir entre las células microgliales residentes y los monocitos que entran al cerebro. Por este motivo, el papel exacto de la microglía durante procesos neuropatológicos no se ha descifrado por completo. Por el contrario, nuestro modelo *ex vivo* tiene la ventaja de que permite conocer la respuesta generada sólo por las células residentes del SNC.

Una de las características que permite a *L. monocytogenes* establecer una infección es su capacidad para superar la respuesta inmunitaria innata de los macrófagos (Dussurget, 2008). En el presente trabajo hemos mostrado que *L. monocytogenes* es rápidamente capturada por la microglía activada. Sin embargo, la supervivencia intracelular de *L. monocytogenes* parece representar un importante mecanismo patogénico en infecciones invasivas. En muchas de las microfotografías realizadas durante los primeros momentos de la infección, se puede observar un gran número de bacterias distribuidas por la zona central del tejido, en la cual se produjo la inoculación.

La microglía infectada parece moverse activamente, transportando incluso a las bacterias al interior del tejido tras la fagocitosis. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de dispersión tipo caballo de Troya, donde los fagocitos infectados liberan su carga dentro del tejido cerebral (Drevets y cols., 2004a).

Además, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de dispersarse célula a célula (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006) lo que podría incrementar la infección. La microscopía de inmunofluorescencia nos permitió observar esta propiedad de la bacteria debido al movimiento adquirido por la cola de actina en algunas células microgliales primarias. Otros estudios han demostrado este movimiento intracelular de *L. monocytogenes* tanto en microglía como en astrocitos (Dramsi y cols., 1998). Esta posibilidad de dispersión podría explicar que la cepa clínica presentase una supervivencia mayor que el mutante en ActA durante los primeros tiempos de infección.

Nuestras observaciones mediante SEM también indican que las células microgliales podrían morir *in situ* (en la superficie del tejido) o entrar en el tejido llenas de bacterias, y regresar a la superficie para morir. Después de esto, otras células microgliales llegan a ser activadas y parecen ser las responsables de la fagocitosis bacteriana y de la eliminación de los restos celulares. Estos ciclos pueden perpetuar claramente la infección de *L. monocytogenes*. Alternativamente, estos ciclos continuos de lisis celular microglial y fagocitosis, podrían inducir además la muerte bacteriana a través de la liberación de mediadores proinflamatorios, péptidos antimicrobianos, radicales libres y productos de la lisis celular. De acuerdo con esta hipótesis, la carga bacteriana total en los explantes infectados disminuye con el tiempo.

En este sentido, nuestro modelo proporciona evidencia del doble papel de la microglía en el SNC, considerándola un arma de doble filo, término empleado en numerosos trabajos para discernir entre el efecto beneficioso que produce al responder rápidamente al daño cerebral eliminando bacterias y células dañadas, y el papel perjudicial mostrado por su respuesta altamente reactiva contribuyendo al daño cerebral (Dibaj y cols., 2011).

La morfología celular analizada microscópicamente insinúa una muerte celular necrótica debido a la presencia de poros y grandes áreas de disrupción de la membrana, células muertas que exponen componentes citoplasmáticos junto con bacterias, restos de células irregulares pero con núcleos relativamente bien conservados y no fragmentados, y la ausencia notable de formación de vesículas (blebs) en las células. En cultivos organotípicos de cerebros de rata infectados con el protozoo neurotrópico *Naegleria fowleri*, la mayoría de las células del tejido mostraban también signos típicos de necrosis, como núcleos picnóticos y citoplasmas hinchados (Gianinazzi y cols., 2005). Por el contrario, algunas características morfológicas típicas de apoptosis (como la reducción del volumen celular, la fragmentación nuclear y liberación de fragmentos o cuerpos apoptóticos), nunca fueron observadas. En neuronas infectadas con *Listeria*, se ha comprobado que la muerte celular depende del grado de expresión de LLO, de tal manera que altos niveles de la hemolisina producían una rápida apoptosis (Parra y cols., 2008). En este sentido, se ha demostrado que las cepas clínicas no son grandes productoras de LLO, lo que podría tener correlación con nuestras observaciones (Vázquez-Boland y cols., 2001).

La utilización de la microscopía de barrido nos ha permitido examinar directamente las interacciones entre *L. monocytogenes* y el tejido nervioso. Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se fotografía *ex vivo* el fenotipo de la microglía activada por un patógeno mediante SEM. En respuesta a la presencia del patógeno, hemos observado también por primera vez, ciclos de fagocitosis de las células microgliales, muerte celular necrótica y la posterior eliminación de los desechos celulares. Esta actividad fagocítica podría ser responsable de la formación de los abscesos cerebrales producidos por *Listeria* y otros patógenos durante la infección en humanos, acumulando material necrótico: células inflamatorias, bacterias, productos y restos celulares. Además, nuestras observaciones son compatibles con el mecanismo del caballo de Troya, de manera que la microglía “transportaría” a las bacterias por el parénquima cerebral. Se postula que las células dendríticas, las polimorfonucleares y macrófagos también podrían ser utilizadas por *L. monocytogenes* y otras bacterias como *M. tuberculosis* y *Salmonella* sp para evitar las defensas del hospedador y diseminarse desde el sitio de infección (Drevets y cols., 2004a). También se ha propuesto que las células gliales y las células T podrían actuar como “caballos de Troya” facilitando la diseminación del parásito *T. gondii* en el SNC (Dellacasa-Lindberg y cols., 2011).

Por todo esto, los cultivos organotípicos *ex vivo* de rata constituyen una herramienta versátil para estudiar, en condiciones controladas, una gran variedad de rutas biológicas relevantes a la fase cerebral de la listeriosis. De forma paralela a nuestro trabajo, Guldemann y colaboradores propusieron recientemente esta misma hipótesis, aunque ellos utilizaban cultivos organotípicos de hipocampo y cerebelo procedentes de terneros, como modelo para la investigación de la neurolisteriosis (Guldemann y cols., 2012). De acuerdo con nuestro análisis microscópico, dentro de la microglía es donde se encontraban la mayoría de las bacterias. Por el contrario, en el estudio de este grupo suizo, *L. monocytogenes* se multiplicaba exponencialmente durante 48 h. La cepa clínica y los mutantes utilizados para nuestras infecciones temporales eran capaces de sobrevivir en el tejido pero su número disminuía a lo largo del tiempo. Entre ellos, el mutante en LLO presentaba una supervivencia menor, posiblemente debido a que no puede multiplicarse al no escapar del “fagosoma” formado tras su entrada en las células. Cinco horas después de la infección, este mutante aumentaba ligeramente en número, pero hay que tener en cuenta que a este tiempo, la desviación estándar mostró grandes variaciones en el porcentaje del inóculo recuperado. Las variaciones con respecto al trabajo de Guldemann y colaboradores quizá puedan ser debidas a las diferencias en el tamaño de los cortes, ya que aunque ambos son de grosor similar, los explantes obtenidos del cerebro de terneros son mucho mayores que los de ratas, por lo que existen más posibilidades de que *Listeria* migre por una mayor superficie cerebral y se multiplique en distintas zonas. Por el contrario, en nuestro modelo, su dispersión podría quedar más restringida a la parte central del explante, que representaría un foco de tamaño menor para el control de la infección.

2. UTILIZACIÓN DE LA qRT-PCR PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

La infección por microorganismos produce una serie de cambios en la fisiología de las células hospedadoras relacionados con alteraciones en los niveles de transcripción de los genes. Por este motivo, para estudiar la meningitis en ratas infectadas intracisternalmente con *S. pneumoniae*, diferentes trabajos han utilizado micromatrices que han permitido analizar la expresión de genes relacionados con los mecanismos patofisiológicos observados en la meningitis bacteriana: inflamación, inmunidad, supervivencia, muerte celular, y neurogénesis, entre otros (Coimbra y cols., 2006; Wittwer y cols., 2010; Blaser y cols., 2011). También, con el objetivo de predecir resultados clínicos, se ha evaluado de esta manera el perfil de expresión de genes en respuesta a la infección con *L. monocytogenes*, tanto *in vivo*, en el hígado y sangre de ratones (Ng y cols., 2005) como *in vitro*, mediante el cultivo de monocitos, células epiteliales intestinales y células endoteliales microvasculares del cerebro (Cohen y cols., 2000; Baldwin y cols., 2003; Wang y cols., 2011). Actualmente, la utilización de matrices de qRT-PCR está experimentando un auge debido a que permiten la cuantificación simultánea y en tiempo real de la expresión de un conjunto de genes relacionados con una vía biológica y procedentes de una misma muestra. En este sentido, nuestro estudio analiza la expresión de 84 genes por qRT-PCR, describiendo y cuantificando parcialmente la respuesta inmunitaria del tejido cerebral frente a la infección con una cepa clínica de *L. monocytogenes*, aislada de LCR.

3. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA DESENCADENADA EN EL SNC FRENTE A LA INFECCIÓN POR *L. MONOCYTOGENES*

Según nuestro conocimiento, la respuesta inmunitaria producida específicamente por las células gliales residentes del SNC ante la infección por *L. monocytogenes* en el tejido cerebral *in vivo* no ha sido estudiada. La mayoría de los trabajos hasta la fecha se basan en infecciones crónicas y sistémicas realizadas en roedores (Pamer, 2004; Lecuit, 2007). Para descifrar la interacción de *L. monocytogenes* con el tejido cerebral, hemos analizado la respuesta inmunitaria utilizando matrices de PCR en tiempo real.

Nuestros datos revelan que 30 genes estaban regulados positiva o negativamente durante el transcurso de las infecciones (de manera estadísticamente significativa, $p < 0,05$). En los cultivos celulares primarios infectados durante 3 h, se sobreexpresaron 16 genes, 14 de los cuales coincidían con los detectados en el tejido a lo largo del tiempo. Aunque algunos de ellos ya se habían identificado durante la caracterización de la meningitis bacteriana, éstos podrían representar objetivos potenciales para el tratamiento de infecciones que desencadenan procesos neuroinflamatorios. Esta información será discutida a continuación, tratando de esclarecer la respuesta inmunitaria desencadenada tras la infección con *Listeria* en el modelo *ex vivo* de SNC, desde que la bacteria, su peptidoglicano, el posible ADN liberado, la LLO y otros factores de virulencia pueden ser detectados por el hospedador.

Receptores implicados y defensa contra la infección

En primer lugar, *Listeria* tiene que ser reconocida por los TLRs que se encargan de modular la respuesta inmunitaria innata (Kawai y Akira, 2011). Entre ellos, varios TLRs (Tlr1, 2 y 10) aparecen sobreexpresados en diferentes puntos del tiempo en nuestro modelo. Los genes para Tlr1 y Tlr2 aparecían sobreexpresados 1 h después de la infección y después su expresión permanecía relativamente constante a lo largo de todo el estudio. Sin embargo, la expresión del Tlr10 no ocurría hasta las 3 h de infección (5 veces sobreexpresado). El TLR1, TLR2 y TLR10 pueden expresarse en la superficie de las células como homodímeros o formando heterodímeros entre ellos, a través de su dominio citoplasmático (Ozinsky y cols., 2000; Hasan y cols., 2005). De esta manera, reconocen una gran variedad de ligandos microbianos desencadenando posteriormente diferentes respuestas (Li y cols., 2013). Concretamente, el TLR1 junto con el TLR2 reconoce una amplia variedad de componentes de las bacterias Gram positivas y Gram

negativas, como el peptidoglicano, ácidos lipoteitoicos, lipoproteínas y lipopéptidos. En cuanto al TLR10, se ha sugerido que detecta lipopéptidos y otros ligandos que comparte con el TLR1 (Guan y cols., 2010). El papel principal del TLR2 en el control, protección y defensa contra la infección de *Listeria*, se demostró a través de experimentos realizados en ratones deficientes en este receptor, los cuales eran más susceptibles a padecer la infección (Torres y cols., 2004). El gen que codifica para el Tlr4 aparece reprimido en los cultivos primarios, por lo que la respuesta inmunitaria desencadenada sería independiente de este TLR. Generalmente, el Tlr4 está incrementado en infecciones experimentales del SNC debido a su estimulación por el LPS de bacterias Gram negativas, aunque Malley y colaboradores demostraron también una respuesta dependiente de este TLR tras la infección intracerebral de *S. pneumoniae* (Malley y cols., 2003). Además, la infección de cultivos organotípicos con este patógeno llevaba al incremento en la expresión del ARNm de los Tlrs 2 y 3 (Böttcher y cols., 2003).

In vivo, las células microgliales murinas expresan la mayoría de los Tlrs (1-9), por lo que éstas podrían ser en gran parte responsables del reconocimiento temprano de la bacteria y de la iniciación de la respuesta inmunitaria del SNC (Olson y Miller, 2004). Además, una secuencia completa del TLR10 está presente en el genoma de la rata, mientras que sólo secuencias parciales y no funcionales han sido detectadas en ratones, lo que dificulta los estudios sobre este receptor (Hasan y cols., 2005). Por otro lado, los astrocitos podrían contribuir al reconocimiento de la bacteria, ya que expresan varios Tlrs (1-6 y 9), aunque éstos, junto con los oligodendrocitos, expresan principalmente el Tlr2 y el Tlr3 (Bsibsi y cols., 2002; Bowman y cols., 2003).

Otro gen importante sobreexpresado durante la infección experimental fue el antígeno de diferenciación mielóide Cd14. CD14 es un receptor glicoproteico expresado en la superficie de fagocitos que se une a ligandos bacterianos (como el LPS o el peptidoglicano) y se encarga de mediar la fagocitosis de las bacterias y la eliminación de restos celulares (Devitt y cols., 2003). En un modelo murino de meningitis debidas a *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* y *E. coli* se mostró una expresión incrementada de Cd14 soluble (isoforma del Cd14 presente en la circulación) en el LCR, principalmente en los leucocitos intratecales. Esto sugería una producción local de CD14 durante la progresión de la meningitis, con una función principalmente proinflamatoria (Cauwels y cols., 1999). En nuestro modelo, el incremento en la expresión de Cd14 sugiere que este receptor podría actuar como un coligando, contribuyendo a la activación de la respuesta inmunitaria. Además, se sabe que colabora con el TLR2 en el reconocimiento y con-

trol de la listeriosis. De hecho, al igual que los ratones deficientes en el TLR2, los mutantes en CD14 son menos resistentes a la infección intravenosa de *Listeria* (Janot y cols., 2008).

En nuestro caso, la estimulación temprana de los TLRs parece activar procesos dependientes de la molécula MyD88, proteína adaptadora intracelular que aparece sobreexpresada 5 h después de la infección. Esta molécula es esencial para la activación completa de la respuesta inmunitaria innata contra *L. monocytogenes* (Seki y cols., 2002). En este sentido, ratones que carecen de este receptor fueron más susceptibles a la infección que los deficientes en TLR2 y CD14 (Janot y cols., 2008). Todos los TLRs (excepto el TLR3) pueden reclutar MyD88 e iniciar una cascada de señalización que culmina en la activación de quinasas y del factor de transcripción NF-KB (Kawai y Akira, 2011). De esta manera, los genes *Irak2* (quinasa 2 asociada al receptor de Il1) y *Nfkb*, estaban significativamente sobreexpresados hasta 12 h después de la infección.

El papel de *Irak2* en la patogénesis bacteriana aún no está establecido por completo. Tras la activación de los TLRs, esta quinasa se considera esencial para la producción de citocinas y quimiocinas (Wan y cols., 2011). Su sobreexpresión en nuestro modelo indica un discreto pero interesante papel en la respuesta inmunitaria del cerebro frente a la infección bacteriana.

NF-KB es requerido para la secreción de citocinas, para lo cual se debe translocar al núcleo y poder ejercer así su papel frente a la infección bacteriana (Hoarau y cols., 2011). En nuestro estudio, factores nucleares (subunidades 1 y 2) que activan NF-KB, aparecen regulados a lo largo de los distintos tiempos de infección. Un trabajo realizado por investigadores de la Universidad de Washington, evidenció que la cooperación entre los TLRs 1 y 2 activaba la vía NF-KB, lo cual se correlaciona con nuestros resultados (Ozinsky y cols., 2000). En otros modelos celulares, se ha descrito también la activación de NF-KB en respuesta a la infección con patógenos invasivos e intracelulares, que incluyen a *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes*, y *S. pneumoniae*, entre otros (Dyer y cols., 1993; Hauf y cols., 1994; Spellerberg y cols., 1996). Sin embargo, la respuesta inflamatoria desencadenada por NF-KB podría ser regulada por un inhibidor de *Nfkb* (*Nfkbia*) que también aparece sobreexpresado en nuestro modelo *ex vivo*.

La población de *L. monocytogenes* que escapa al citosol es detectada por los receptores NLRs. Entre éstos, sólo el gen *Nlr4* estaba presente en nuestras matrices de genes, pero su sobreexpresión permanecía relativamente constante a lo largo de todos los tiempos de infección. Parece esperable que *Listeria*, siendo un patógeno intracelular, desencadene esta ruta de

señalización después de su interacción inicial con los TLRs. El NLRC4 (también conocido como Ipaf, factor activador de proteasas del enzima conversor de IL-1 β) forma parte de los complejos proteicos conocidos como inflamasomas, importantes elementos de la respuesta inmunitaria innata que median la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y IL-18. En general, este inflamasoma se forma tras la infección de macrófagos por varias bacterias Gram negativas y es dependiente de la liberación de flagelina en el citosol. Debido a que la expresión de flagelina en *L. monocytogenes* está regulada por la temperatura, el papel del NLRC4 en la listeriosis no está perfectamente definido, pero se especula con que puede ser requerido para la maduración de los fagosomas (Wu y cols., 2010). Además, otros miembros de la superfamilia de los NLR se activan en respuesta a la infección por *Listeria*: NOD1, NOD2 y el inflamasoma formado por NLRP3 (Corr y O'Neill, 2009; Kim y cols., 2010). Los componentes del peptidoglicano de *Listeria* son reconocidos principalmente por NOD1 y NOD2, necesarios para la protección contra ésta y otras bacterias intracelulares (Lavelle y cols., 2010). Ambos receptores inducen respuestas inflamatorias dependientes de quinasas y NF-KB, por lo que estos genes podrían mantenerse también sobreexpresados mediante la activación de esta vía en nuestro modelo, a pesar de que los receptores NOD no estén incluidos en nuestras matrices (Kawai y Akira, 2011). Por su parte, el NLRP3 se activa por la presencia de LLO (Kim y cols., 2010). Éste es el inflamasoma mejor caracterizado de la familia, debido a que responde a una amplia variedad de estímulos (Bauernfeind y Hornung, 2013). *In vivo*, la meningitis por *S. pneumoniae* puede producir una respuesta inflamatoria mediada por este inflamasoma, que induce daño tisular (Hoegen y cols., 2011; Hanamsagar y cols., 2012). Otro inflamasoma que reconoce el ADN de *Listeria* (durante su replicación en el citosol) que es liberado tras la pérdida de integridad de su pared celular es Aim2 (Kim y cols., 2010; Sauer y cols., 2010). Aim2 es el único componente del inflamasoma que no pertenece a los NLRs, sino que es miembro de la familia de proteínas PYHIN, mediadoras de la defensa del hospedador (Schattgen y Fitzgerald, 2011).

Expresión de citocinas

La activación de NF-KB desencadenada después del reconocimiento de ligandos bacterianos-TLRs/NLRs, llevaría a la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas por parte de las células residentes del SNC. Entre ellas, los genes de las citocinas Il1, Il6 y Tnf y la quimiocina Ccl2 destacan por presentar una rápida sobreexpresión en el tejido cerebral tan sólo 1 h después de la infección con *L. monocytogenes*, incrementándose hasta las 5 h.

La familia de citocinas proinflamatorias IL-1, junto con el TNF, constituyen el principal tipo de citocinas en la inmunidad innata. Ambos tipos pueden inducir la síntesis de quimiocinas y moléculas de adhesión, estimular funciones fagocitarias y favorecer la reparación del tejido dañado (Täuber y Moser, 1999). Además, se ha observado que desempeñan un papel fundamental para la regulación de la respuesta antibacteriana durante la formación de abscesos cerebrales (Kielian y cols., 2004).

Las dos formas de IL1, IL1a e IL1b, aparecen altamente reguladas a lo largo de la infección de los 3D-OC con *L. monocytogenes*. La actividad biológica de IL-1 α y IL1 β es ejercida principalmente a través de la expresión del receptor IL1 de tipo 1 (IL1r1), regulado significativamente ($p < 0,05$) a lo largo de la infección en nuestro modelo (Täuber y Moser, 1999). Además, IL1rap, el gen que codifica una proteína accesoria de este receptor también aparecía sobreexpresado a las 12 h. La infección intracerebral de *Listeria* en ratones deficientes en este receptor demostró su importante papel para el control y supervivencia de la bacteria en el cerebro, ya que la activación de este receptor inhibía la replicación y diseminación de *L. monocytogenes* (Deckert y cols., 2007). La misma observación se realizó cuando se inducía meningitis por *S. pneumoniae* en ratones mutantes en IL-1r1 (Zwijnenburg y cols., 2003). Por otro lado, en nuestro modelo, también un antagonista de este receptor (IL1rn) presentaba grandes diferencias con respecto a los tejidos control, lo que nos lleva a pensar que estaría regulando la fuerte respuesta proinflamatoria generada, debida sobre todo a la alta expresión de las citocinas IL1. Se ha descrito que IL-1rn se une al receptor IL-1r1 compitiendo con IL-1 α y IL-1 β , para mediar la producción de IL-1 en ratones infectados intravenosamente con *L. monocytogenes* (Hirsch y cols., 1996).

IL-6 es otra citocina proinflamatoria que desempeña numerosas funciones en el SNC, tanto en condiciones normales como en casos de neuroinflamación. Con frecuencia, se produce tras la estimulación de IL-1, lo que se correlaciona bien con nuestros resultados, ya que su nivel de expresión fue algo menor, pero paralelo al de IL1a e IL1b (Täuber y Moser, 1999). Se ha sugerido que principalmente los astrocitos, pero también la microglía, monocitos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T, podrían producir IL-6 (Zhang y cols., 2009).

El TNF, ó TNF- α , es una citocina ampliamente descrita para el control de *Listeria* durante la infección cerebral. Después de la infección sistémica, es rápidamente producida por células del sistema inmunitario innato, incluyendo granulocitos, macrófagos y células dendríticas (Virna y cols., 2006). Sin embargo, el papel del TNF en la listeriosis cerebral podría no restringirse sólo a

la eliminación del patógeno. Un estudio en cultivos 3D-OC de cerebro de rata que evaluó el efecto del TNF en la toxoplasmosis cerebral revelaba un aumento dramático en la proliferación del parásito en presencia de este factor (Scheidegger y cols., 2005). En nuestro sistema, la secreción de esta citocina podría estar inducida, a su vez, por la fuerte expresión de Il1, lo que explicaría que Il1a y Il1b tengan una expresión más alta.

Ccl2 es una citocina que pertenece a la familia de quimiocinas proinflamatorias CC, también conocida como proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1). Durante la meningitis bacteriana, esta quimiocina se ha encontrado en el LCR y constituye un potente neuromodulador del SNC ya que desempeña una función clave en la respuesta del hospedador al daño cerebral (Täuber y Moser, 1999). En concreto, en la listeriosis murina parece jugar un papel importante en el reclutamiento de monocitos al sitio de infección, modulando la respuesta a la infección (Bubonja y cols., 2006). Según este trabajo, en los cerebros de estos ratones los niveles de ARNm de Ccl2 estaban fuertemente sobreexpresados, incrementándose durante la infección sistémica (de 1 a 4 días) (Drevet y cols., 2004b). En general, la microglía y los astrocitos son las principales fuentes de producción de quimiocinas en el SNC (Bailey y cols., 2006).

Además de la quimiocina Ccl2, dos receptores de quimiocinas, el Ccr3 y el Cxcr4, fueron los dos únicos genes reprimidos a lo largo de todo nuestro estudio. El CCR3 se ha descrito como un correceptor, expresado particularmente en las células microgliales. Su sobreexpresión se asocia con un control de la inflamación en el cerebro durante la infección por *Plasmodium yoelii* (Sarfo y cols., 2005). Por otro lado, el CXCR4 está ampliamente distribuido, expresándose constitutivamente en células endoteliales, neuronas, microglía y astrocitos (Berger y cols., 1999). Se ha demostrado que podría estar involucrado en el desarrollo del cerebro y mediar la supervivencia de neuronas hipocámpales en ratones (Bagri y cols., 2002). La represión de estos genes en nuestro modelo modularía la expresión de las quimiocinas de las que son receptores, RANTES y SDF1 respectivamente, evitando así una producción excesiva de las mismas, lo que puede producir daño cerebral.

El rápido incremento en la expresión de las citocinas Il1, Il6, Tnf y Ccl2 podría ser muy similar al que ocurre durante las primeras etapas de la infección por *Listeria in vivo*, ya que estas citocinas contribuirían de forma sinérgica al comienzo de la respuesta mediada por células T para el control de la bacteria. Al igual que ocurre en el tejido, esta etapa se regula por la secre-

ción de TNF, CCL2, IL-1 β , IL-6, además de IFN- γ , IL-12 e IL-18 (Pamer, 2004). Estas citocinas son características de una respuesta inmunitaria citotóxica de tipo Th1 (Bubonja y cols., 2006). De la misma manera, el estudio de la respuesta inmunitaria innata en el cerebro después de la infección experimental de ratones con *Streptococcus suis* mostró una regulación positiva en la expresión del Tlr2, Cd14, Ikba (marcador indirecto de Nfkb), Il1b, Il6 y Ccl2, a partir de las 24 h de infección, incrementando su expresión 5 días después de la misma (Domínguez-Punaro y cols., 2007).

Además, en un modelo de meningitis por *S. agalactiae* en ratas neonatales, estas citocinas predominantes pueden activar una cascada de mediadores inflamatorios, incluyendo otras citocinas y quimiocinas (Barichello y cols., 2011). Según esto, podemos considerar que la alta expresión génica de Il1, Il6, Tnf y Ccl2 en nuestro modelo podría inducir la sobreexpresión de otras citocinas involucradas en la respuesta inmunitaria, los interferones. De hecho, *Listeria* puede activar una potente producción de IFN tipo I (α y β), que al contrario que en una infección vírica podrían resultarle beneficiosos para su supervivencia, inhibiendo la respuesta del hospedador frente a la infección (O'Connell y cols., 2004). En nuestro modelo, esta señalización podría estar modulada por el factor regulador Irf1, sobreexpresado a lo largo de las infecciones experimentales. Estos factores requeridos para la activación de los IFN de tipo I son activados a su vez por el ADN citosólico de *Listeria* (Stetson y Medzhitov, 2006). Respecto al IFN- γ , sólo uno de sus receptores aparece sobreexpresado significativamente en el tejido cerebral, 5 h después de la infección. Este receptor se expresa mayoritariamente en neuronas, donde se ha comprobado que el tratamiento con IFN- γ puede inhibir la dispersión de *Listeria*, sin causar toxicidad (Jin y cols., 2004). Además, este IFN parece jugar un papel relevante en el control primario de la listeriosis sistémica (Hiromatsu y cols., 1992).

También destaca en nuestro estudio la sobreexpresión temprana del gen Il10, que codifica para una citocina con un potente efecto inhibitor en la producción de citocinas proinflamatorias y por lo tanto, en la respuesta inmunitaria producida por las células gliales activadas (Ledebøer y cols., 2002). Además, Fleming y Campbell describieron que algunos macrófagos que expresaban esta interleucina en la superficie celular no mostraban actividad bactericida contra *L. monocytogenes*, permitiendo la supervivencia de la bacteria, debido a la represión de una parte de la respuesta inmunitaria (Fleming y Campbell, 1997).

Secreción de citocinas

Hemos confirmado también la existencia de mecanismos de control post-transcripcional en la regulación de la expresión de los genes de dos citocinas proinflamatorias relevantes, IL1b e IL6. *L. monocytogenes* induce un incremento significativo en los niveles de ARNm de ambas citocinas 5 h después de la infección, mientras que el método ELISA indicaba que el pico de producción tenía lugar a las 12 h y descendía 24 h después de la infección. Estos datos indican la existencia de un retraso importante entre los niveles más altos de expresión de genes y el pico de niveles de proteínas.

Algunos estudios realizados *in vitro* en líneas de macrófagos demuestran que las cepas no hemolíticas de *L.monocytogenes* no son capaces de inducir IL-1 α , IL-6 y TNF, pero sí IL-1 β (Kuhn y Goebel, 1994). Por otro lado, otros trabajos afirman que el mutante en LLO tampoco era capaz de inducir la secreción de IL-1 β en macrófagos (Özören y cols., 2006). Ambos resultados podrían indicar que la secreción de estas citocinas requiere la presencia de la bacteria en el citoplasma. En nuestro modelo organotípico, el mutante en LLO fue capaz de inducir la secreción de IL-1 β lo que hace suponer que el crecimiento intracelular no es necesario para la inducción post-transcripcional de esta citocina.

Sobreexpresión de otras moléculas relevantes

La infección de *Listeria* también induce la sobreexpresión de otros genes, como el inhibidor de la peptidasa de serpinas (Serpine1), y el receptor adenosina A2a (Adora2a).

Por un lado, el gen Serpine1 (también conocido como PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1) es un miembro de las serpinas, superfamilia de proteínas inhibidoras de las peptidasas de serinas y encargadas en el SNC de regular diversos procesos celulares. En concreto, la proteína Serpine1 está involucrada en el desarrollo y mantenimiento neuronal, plasticidad sináptica y supervivencia celular, desempeñando, por tanto, una función anti-apoptótica (Soeda y cols., 2008; Cho y cols., 2013). En nuestro estudio, el gen Serpine1, aparece altamente sobreexpresado a partir de las 5 h de la infección, lo que indica que podría jugar un papel relevante durante etapas tardías de la misma. Sin embargo, su papel exacto es desconocido. Se ha detectado la expresión de un miembro de esta superfamilia (Serpine2a) durante la infección *in vivo* de macrófagos con *Mycobacterium*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* (Hamerman y cols., 2002). Los datos procedentes de este trabajo sugieren que la inducción de este gen es una respuesta general de los macrófagos a la infección con patógenos. Según esto, en las células de microglía, Serpine1 podría funcionar como un inhibidor que regula la actividad de las proteasas

intracelulares, encargadas de degradar las bacterias muertas. Los astrocitos también podrían promover la sobreexpresión de *Serpine1*, ya que algunos estudios demuestran que este gen se expresa principalmente en este tipo celular (Cho y cols., 2013).

Por otro lado, el receptor adenosina A2a (*Adora2a*) aparece sobreexpresado más de cuatro veces a partir de las 12 h de infección. Evidencias genéticas y farmacológicas indican que los receptores endógenos de adenosina juegan un papel protector en procesos inflamatorios, regulando la producción de citocinas proinflamatorias por las células inmunitarias (Ohta y Sitkovsky, 2001). Además, se expresa en regiones concretas del cerebro y se ha sugerido que su sobreexpresión mantiene el fenotipo ameboide de la microglía activada durante la neuroinflamación *in vivo* (Orr y cols., 2009). Es probable que este receptor ayude a controlar la respuesta inflamatoria producida por la microglía tras la infección de *Listeria*.

Curiosamente, el gen *Camp* (que codifica para el péptido antimicrobiano catelicidina) está también sobreexpresado en nuestro modelo. Los péptidos antimicrobianos son un componente evolutivamente conservado del sistema inmunitario innato frente a bacterias patógenas. De las dos principales clases de péptidos antimicrobianos presentes en los mamíferos (defensinas y catelicidinas), el gen *Camp* es una catelicidina homóloga a la catelicidina humana LL-37. La catelicidina de rata se llama rCRAMP, un nombre análogo al péptido CRAMP en el ratón (Termén y cols., 2003). Estas moléculas en general están ampliamente distribuidas, pero a nivel de la BHE pueden ser producidas por las células gliales, neuronas y células endoteliales del SNC (Hoarau y cols., 2011). rCRAMP se ha detectado en extractos de cerebro de rata y posee actividad bactericida *in vitro* contra el patógeno neurotrópico *N. meningitidis* (Bergman y cols., 2005; Bergman y cols., 2006). La sobreexpresión del ARNm de rCRAMP en nuestro modelo sugiere que este péptido podría también jugar un papel en la inmunidad innata del SNC contra *L. monocytogenes*.

Efectos de la respuesta inflamatoria

La expresión de Tlrs, Cd14 y genes de la vía NF-KB durante los estadios tempranos de la infección por *Listeria* se correlaciona bien con la activación de las células microgliales, originando una situación principalmente proinflamatoria, que puede provocar respuestas que contribuyen al daño tisular en el cerebro. La microglía activada libera varias citocinas, compuestos bactericidas y otros productos de secreción, como metaloproteasas y aminoácidos excitatorios, que potencialmente contribuyen a la inflamación y neuropatogénesis (Czeh y cols., 2011). Nosotros

hemos observado que la expresión génica de los mediadores inflamatorios Ccl2, Il1a, Il1b, Il6 y Tnf se incrementaba más de 100 veces después de la infección con *Listeria*. Las citocinas inflamatorias codificadas por estos genes pueden exacerbar un daño cerebral secundario tras la infección (Denes y cols., 2010; Wirenfeltd y cols., 2011). Por ejemplo, el TNF puede dañar el cerebro debido a que provoca la alteración de la BHE, contribuye a la formación de edemas, recluta un número creciente de células inflamatorias, y puede incluso inducir muerte celular neuronal (McCoy y Tansey, 2008; McCoy y cols., 2011). La IL-1 principalmente protectora en la meningitis bacteriana, también podría contribuir al trauma y neurodegeneración neuronal (Allan y cols., 2005). Por otro lado, niveles elevados de IL-6 podrían influir en la reactividad de la microglía y astrocitos, y en la integridad de la BHE (Spooren y cols., 2011).

El daño a las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos también puede ser debido a la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno (Rock y cols., 2004; Bailey y cols., 2006; Gerber y Nau, 2010; Czeh y cols., 2011). Estudios *in vivo* han demostrado que el ácido lipoteicoico (un componente de la pared de bacterias Gram positivas) puede inducir a la microglía a liberar ON (Chien y cols., 2005). En modelos de meningitis se ha comprobado que el ON contribuye a la pleocitosis del LCR, alteración de la permeabilidad de la BHE, hipertensión intracraneal y edema cerebral (Koedel y cols., 1995). Una parte importante de la producción de ON se debe a la óxido nítrico sintasa inducible, Nos2 (también conocida como iNos). En el SNC, ésta se ha detectado en la microglía, astrocitos y células endoteliales (Bailey y cols., 2006). Nosotros hemos detectado una sobreexpresión de este gen a partir de las 3 h de infección. Una vez que se expresa, produce continuamente altos niveles de ON, lo que también podría tener un efecto tóxico para la bacteria (Bogdan y cols., 2000; Bailey y cols., 2006). En esta misma línea, otros estudios también indican que el papel del ON en las infecciones podría ser protector, controlando la multiplicación de bacterias en el cerebro (Remer y cols., 2001). La actividad de Nos2 y la expresión de ON se incrementan también en el cerebro de rata durante la meningitis por *S. agalactiae*, atenuando el daño neuronal necrótico y apoptótico producido, en parte, por la producción de compuestos reactivos del oxígeno (Leib y cols., 1996; Leib y cols., 1998). Por otro lado, se ha mostrado que el ON podría promover la dispersión de *L. monocytogenes* entre los macrófagos *in vitro*, al alterar la fusión del fagosoma con el lisosoma (Cole y cols., 2012).

Análisis de genes implicados en la muerte celular

Un efecto directo del desequilibrio entre las moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias producidas durante la infección es la inducción de distintos mecanismos de muerte celular. En este sentido, los patógenos bacterianos son con frecuencia capaces de inducir la muerte celular para eliminar células hospedadoras y suprimir las funciones inmunitarias. Los principales tipos de muerte celular son apoptosis (antiinflamatoria) y necrosis (proinflamatoria). Ambas vías están controladas por la actividad de caspasas específicas que juegan papeles centrales en la muerte celular (Siegel, 2006). Por ejemplo, se ha considerado que, en la meningitis experimental debida a *S. pneumoniae*, la apoptosis dependiente de caspasa 3 es el principal mecanismo de muerte neuronal tanto en modelos de ratas *in vivo* como en modelos organotípicos de hipocampo de rata. Este tipo de muerte celular se induce tanto por la presencia de productos procedentes de la bacteria como por la existencia de un microambiente con limitación de nutrientes (Gianinazzi y cols., 2003; Gianinazzi y cols., 2004). La caspasa 3 no está presente en nuestras matrices de genes de respuesta inmunitaria, pero no parece tener un papel relevante en nuestro modelo, ya que en las matrices autofagia, donde sí está presente, no aparece modulada por la infección. Por el contrario, las caspasas 4 y 1 están presentes y reguladas positivamente en las matrices de respuesta inmunitaria.

La caspasa 4 aparece sobreexpresada en los tejidos infectados a las 5 y 12 h de la infección. La función de esta caspasa no se conoce totalmente, pero se ha sugerido que es una caspasa inflamatoria, junto con la caspasa 1 y la 5, y que podría jugar un papel relevante dentro del sistema inmunitario (Martinon y Tschopp, 2007).

La caspasa 1 está implicada en una forma proinflamatoria de muerte celular, conocida como piroptosis, que comparte características de la apoptosis y la necrosis (Miao y cols., 2011). Esta caspasa induce la muerte por piroptosis a través de la activación de la citocina IL-1 β . En nuestro estudio, la expresión génica de esta caspasa queda sin cambios en comparación con los controles, excepto a las 12 h después de la infección (2,8 veces sobreexpresada). Sin embargo, el gen *Il1b* estaba altamente regulado a lo largo del estudio lo que podría sugerir la existencia de muerte celular piroptótica en nuestro modelo tisular. Aunque los mecanismos de muerte celular producidos en respuesta a la infección de *L. monocytogenes* no son totalmente conocidos, se demostró una piroptosis dependiente de la activación de la caspasa 1 en el citoplasma de macrófagos murinos infectados con *L. monocytogenes* (Hara y cols., 2008). Además, recientemente, se ha considerado a la piroptosis como un mecanismo inmunitario eficaz en la eliminación de otras bacterias intracelulares, como *Salmonella typhimurium* (Miao y cols., 2010a).

Por otro lado, se ha descrito otra forma de muerte celular necrótica diferente a la piroptosis, conocida como pironecrosis, la cual es independiente de caspasa 1 pero dependiente de IL-1 β (Bergsbaken y cols., 2009; Remuzgo-Martínez y cols., 2013b). Estudios previos han mostrado que varios patógenos bacterianos, como *Shigella flexneri*, *S. aureus*, o *K. pneumoniae*, inducen pironecrosis (Willingham y cols., 2007; Craven y cols., 2009; Willingham y cols., 2009). De acuerdo a nuestros resultados de expresión génica, sugerimos que *L. monocytogenes* en el modelo *ex vivo* induce directa o indirectamente una forma similar de pironecrosis, dependiente de IL-1 β (por su expresión y producción tan elevadas) pero posiblemente independiente de caspasa 1 (donde no hemos detectado sobreexpresión respecto a los controles). En estudios *in vitro* con macrófagos, ya se había comprobado que la señalización desencadenada por el TLR2 promovía la secreción de IL-1 β a través de la vía NF-KB en respuesta a *L. monocytogenes*, pero no la activación de la caspasa 1 (Özören y cols., 2006). Poco después se concluyó que la muerte celular mediada por *Listeria* es, en su mayoría, independiente de caspasa 1 (Kim y cols., 2010).

Finalmente, cabe añadir que la activación de la caspasa 1 y la piroptosis dependen de la presencia de los ya comentados inflammasomas, que además de procesar las formas activas de las citocinas IL-1 β e IL-18, regulan la inducción de la piroptosis (Williams y cols., 2012). Por ejemplo, se conoce que el inflammasoma NLRC4 induce la activación de caspasa 1, la secreción de IL-1 β y la piroptosis durante la infección de *L. monocytogenes* en macrófagos murinos derivados de la médula ósea (Wu y cols., 2010). En los 3D-OC de cerebro hemos encontrado que el gen *Nlrc4* está sobreexpresado en varios tiempos durante la infección con *L. monocytogenes*, mientras que la caspasa 1 no lo está. Claramente, se necesitan más estudios para determinar con precisión el papel de los inflammasomas durante la infección bacteriana del SNC.

Tras el análisis de los resultados de expresión génica, y en base a los datos ya existentes en la literatura (principalmente descritos en macrófagos), en la **Figura 76** simplificamos la posible respuesta inmunitaria desencadenada en una célula de microglía ante la infección por *Listeria*.

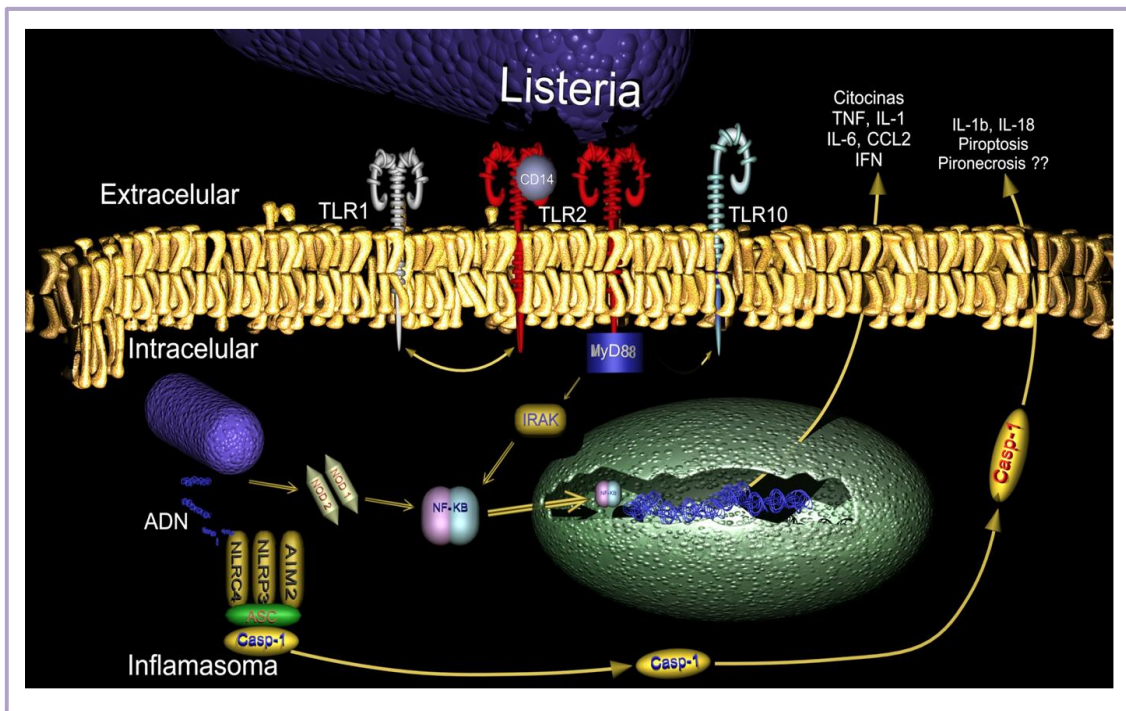


Figura 76. Posible ruta de señalización de la respuesta inmunitaria desencadenada en el modelo *ex vivo* de SNC tras la infección temporal con *L. monocytogenes*.

4. AUSENCIA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL NÚCLEO DE LA AUTOFAGIA EN EL MODELO ORGANOTÍPICO DE SNC INFECTADO CON *L. MONOCYTOGENES*

Listeria monocytogenes ha sido utilizada como un modelo de patógeno intracelular para estudiar aspectos básicos de la inmunidad innata y adaptativa. La macroautofagia (aquí referida como autofagia) ha sido propuesta como un componente de la respuesta inmunitaria innata contra los patógenos intracelulares (Amano y cols., 2006). De hecho, existe la hipótesis de que niveles basales de la maquinaria de la autofagia ocurren continuamente dentro de las células, y que un incremento en la autofagia puede ser debido a las infecciones microbianas (Campoy y Colombo, 2009). Sin embargo, la interacción entre los patógenos y la vía de la autofagia ha sido principalmente estudiada utilizando macrófagos y líneas celulares epiteliales, y por lo tanto, la información sobre los eventos autofágicos que tienen lugar en el parénquima cerebral es escasa (Gong y cols., 2012).

En este trabajo de Tesis, utilizando matrices de qRT-PCR, hemos analizado los perfiles de expresión de genes de autofagia, en respuesta a la infección de *L. monocytogenes* en el cerebro de rata. Este estudio lo realizamos a las 5 h y 12 h después de la infección, por ser dos tiempos que presentaban más de 20 genes de respuesta inmunitaria modulados por las infecciones. Además, se sabe que la dispersión intercelular de *L. monocytogenes* tiene lugar entre las 3 y 5 h de la infección *in vitro* (Tilney y Portnoy, 1989; Dabiri y cols., 1990).

Nuestros resultados revelan que sólo unos pocos genes claves de la ruta de autofagia están modulados durante el curso de las infecciones. En concreto, sólo el gen Atg12, requerido para completar el autofagosoma, estaba modulado negativamente por la infección. Por el contrario, la expresión de otros genes de la ruta central de la autofagia, como Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg9 y Atg16, se mantuvo sin cambios con respecto a los tejidos no infectados. Entre ellos, se ha demostrado en macrófagos primarios que el gen Atg5 protegía contra la infección de *T. gondii* y *L. monocytogenes* (Zhao y cols., 2008). Sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con algunos estudios en los que se describe la interacción de otras bacterias patógenas con la ruta de autofagia a nivel de la transcripción de genes. Por ejemplo, *Francisella tularensis* y *Burkholderia cenocepacia* pueden reprimir la transcripción de distintos genes Atg (entre los que está el Atg12) para evitar el efecto bactericida de la autofagia (Cremer y cols., 2009; Abdulrahman y cols., 2011). De esta manera, las bacterias permanecen en los autofagosomas, bloqueando su fusión con los lisosomas (Gong y cols., 2012). Estas bacterias podrían

conseguir, al menos, un retraso en su degradación autofágica por lo que tendrían más tiempo de replicación en el citosol. Por el contrario, otros microorganismos (como *S. aureus*, *Shigella flexneri*, herpesvirus) han desarrollado también estrategias para escapar de los autofagosomas lo que les permite evadir o superar la autofagia del hospedador, sobrevivir y establecer una infección persistente (Campoy y Colombo, 2009; Orvedahl y Levine, 2009).

La sobreexpresión de Tnf y represión de Cxcr4 cuantificada en las matrices de autofagia se correlaciona bien con los resultados obtenidos tras la utilización de matrices de respuesta inmunitaria. Esto refuerza la robustez de nuestro modelo de infección y demuestra de nuevo que estas citocinas juegan un papel activo durante la respuesta de la infección experimental de *L. monocytogenes* en el cerebro. Además de la regulación negativa del mediador inflamatorio Cxcr4, otro gen estaba reprimido sólo a las 12 h de la infección, el factor de crecimiento de insulina tipo 1 (Igf1). Estos dos genes actúan como correguladores de la vía de la autofagia (Hashimoto y cols., 2008; Sobolewska y cols., 2011).

Por otra parte, el gen Fas (sobreexpresado 5 h después de la infección) es un receptor de superficie celular de la superfamilia del TNF. Se ha demostrado que juega un papel central en la regulación fisiológica de la muerte celular programada, de manera que la interacción de este receptor con su ligando desencadena una ruta de caspasas que llevan a la apoptosis (Jeon y Boo, 2013). En el SNC, la estimulación excesiva de la microglía durante una infección o estado inflamatorio puede producir su apoptosis debido a la sobreexpresión en su superficie del receptor Fas y su ligando (Bailey y cols., 2006). Esto sugiere que algunos de los fenómenos de muerte celular observados en nuestro estudio podrían ser debidos a la apoptosis. Sin embargo, el balance entre la expresión de los genes relacionados con la apoptosis y con la necrosis, junto con el análisis de las microfotografías de SEM, nos inducen a pensar que los eventos que ocurren en nuestro modelo reflejan principalmente muerte celular de tipo necrótico.

Interesantemente, el gen para la transglutaminasa 2 (Tgm2) estaba consistentemente sobreexpresado en todos los tejidos infectados con respecto a los controles a las 12 h (a pesar de no ser estadísticamente significativo). La transglutaminasa tisular 2 pertenece a una familia de proteínas de transglutaminasa que confieren resistencia mecánica a la proteólisis y estabiliza las proteínas. Se ha demostrado *in vitro* en astrocitos de cerebro de rata, la expresión de transglutaminasas inducidas por las citocinas IL-1 β y TNF, esta última con un efecto moderado

(Monsonogo y cols., 1997). De manera importante en relación con nuestro trabajo, Akar y colaboradores mostraron que la transglutaminasa tisular inhibe la autofagia en células tumorales de origen pancreático (Akar y cols., 2007).

El papel de la autofagia durante la infección de *L. monocytogenes* en el cerebro apenas comienza a ser apreciado. A juzgar por el modesto incremento en la expresión de genes del núcleo de la autofagia en los tiempos 5 y 12 h, creemos que solamente un programa débil de autofagia se activa en el cerebro de rata tras la infección de *L. monocytogenes*.

En los macrófagos, *L. monocytogenes* es capaz de evitar por diversos mecanismos la muerte por autofagia perpetuando su infección (Birmingham y cols., 2008). Según esto, en nuestro modelo, *Listeria* podría comportarse de igual manera inactivando la posible respuesta autofágica desencadenada por la microglía durante su colonización.

Además, en el cerebro, la autofagia principalmente podría estar jugando un papel clave en la homeostasis de las células inmunitarias, en lugar de encargarse de otras funciones efectoras en las que suele estar involucrada (como la degradación de patógenos, activación o supervivencia celular) (Orvedahl y Levine, 2009).

5. TROPISMO CELULAR DE *L. MONOCYTOGENES* EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que utiliza 3D-OC procedentes de cerebro de rata para la obtención de cultivos celulares primarios destinados a la infección *in vitro* con *L. monocytogenes*.

En el presente trabajo, hemos obtenido principalmente dos tipos celulares tras la disgregación del tejido cerebral: uno de tipo fagocítico y otro de tipo epitelial. A las 3 h de incubación, *L. monocytogenes* se detectó principalmente en las células fagocíticas. Por el contrario, las células epitelioideas presentaban, en general, menos de 10 bacterias por célula. Este hallazgo refuerza la idea de que la microglía es altamente eficiente en su actividad fagocítica y que puede ser la principal diana de *Listeria* en el SNC. Un patrón similar fue observado tras la infección de cultivos celulares primarios obtenidos de cerebros fetales murinos y ovinos donde la microglía era fácilmente invadida por *L. monocytogenes* mientras que en otras células gliales o neuronas se producían las tasas más bajas de invasión (Peters y Hewicker-Trautwein, 1994; Peters y Hewicker-Trautwein, 1996). Los mismos resultados se observaron tras el cultivo primario de células gliales y neuronas obtenidas a partir de la disección de médulas espinales de ratas (Dramsi y cols., 1998).

Otro estudios *in vitro* realizados a partir del cultivo de neuronas sensoriales primarias de los ganglios de las raíces dorsales de rata, demostró que los axones y cuerpos celulares nerviosos (soma neuronal) pueden ser infectados por *L. monocytogenes*. De esta manera, la bacteria podría dispersarse a lo largo de los axones tanto en una dirección retrógrada (desde el axón al soma) como anterógrada (desde el soma al axón) (Dons y cols., 1999). En este sentido, Dramsi y colaboradores en 1998, comprobaron también que *L. monocytogenes* podía infectar las neuronas por dispersión célula-célula, cuando éstas se cocultivaban con macrófagos de ratón previamente infectados con *Listeria* (Dramsi y cols., 1998). De acuerdo con estos trabajos, también en las neuronas de los cultivos celulares de cerebro de rata pudimos localizar a *Listeria*, aunque este tipo celular era relativamente escaso en nuestras preparaciones. Esto puede ser debido a que el medio de cultivo utilizado para nuestros experimentos, pretendía aislar principalmente células fagocíticas.

En el trabajo de Dramsi y colaboradores, la inmunohistoquímica permitió caracterizar de manera exacta cada tipo celular. En nuestro caso, las microfotografías que muestran estos autores nos ayudaron a clasificar los tipos celulares que observamos en el microscopio según su morfología, siendo nuestros fenotipos algo diferentes a los publicados por ellos.

En un primer momento, las células que catalogamos como de tipo epitelial, al ser tan abundantes como la microglía, las clasificamos como astrocitos de tipo 1 (o protoplásmico), definidos como células planas con forma poligonal, en comparación con los astrocitos de tipo 2 (**Figura 77A-B**). Sin embargo, se ha descrito que éstos presentan de 5 a 8 prolongaciones citoplasmáticas muy ramificadas extendiéndose desde el núcleo celular, que nosotros no visualizamos (**Jensen y cols., 2013**). Por otro lado, estas células epiteliales podrían corresponder al epitelio del plexo coroideo, cuya morfología mostrada gracias al marcaje con faloidina se correspondía relativamente bien con fotografías encontradas en otros artículos (**Baehr y cols., 2006**). En ellas, los filamentos de actina se distribuían en forma de redes paralelas, extendiéndose por toda la célula (**Figura 77C**), como ocurría en nuestras células primarias (**Figura 77D**), en comparación con los astrocitos con la actina desorganizada y más ramificados.

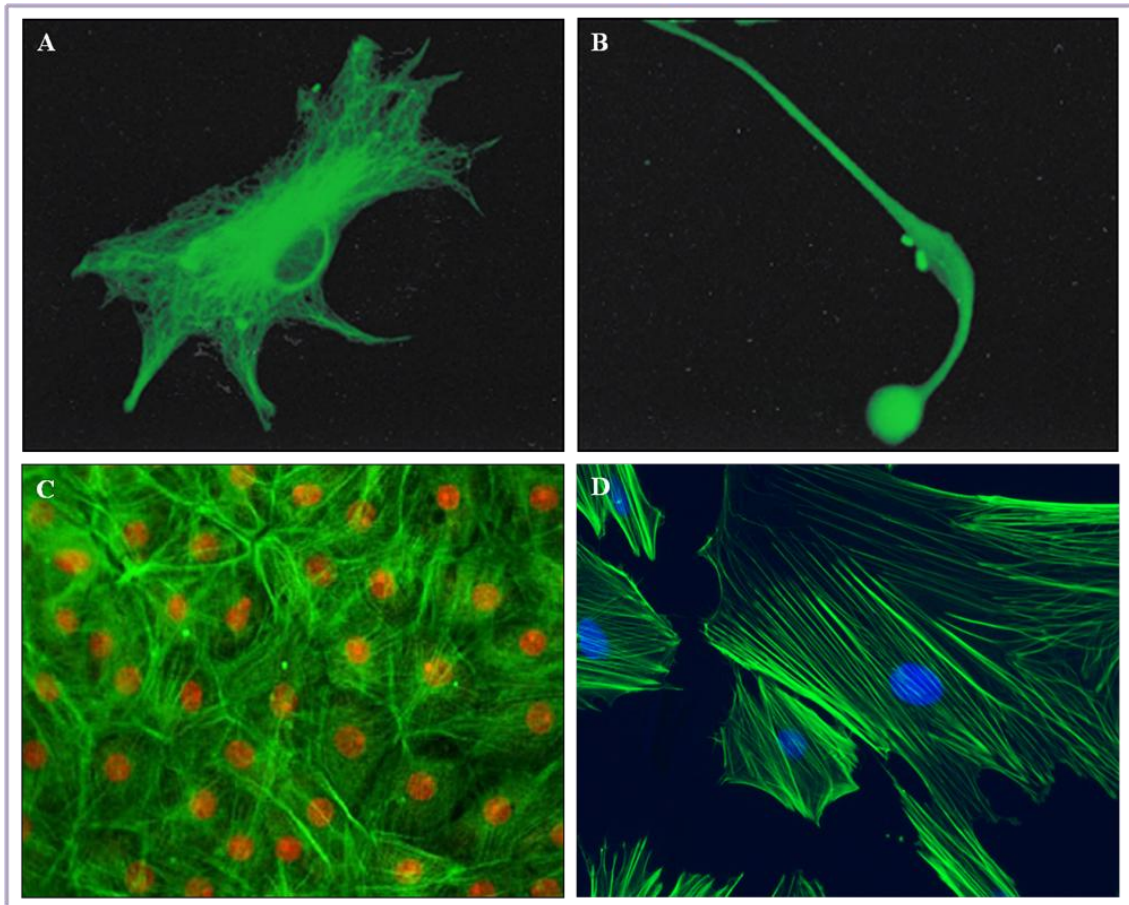


Figura 77. Astrocitos primarios tipo 1 (A) y tipo 2 (B) de médula espinal de ratas. Fotografías tomadas de Dramsi y colaboradores (Dramsi y cols., 1998). C, Monocapa de células epiteliales de plexo coroideo de cerdo teñidas con faloidina y yoduro de propidio (núcleos). Fotografía tomada de Baehr y colaboradores (Baehr y cols., 2006). D, Células primarias de tipo epitelial aisladas de cerebro de rata marcadas con faloidina y DAPI (núcleos) en el presente trabajo.

6. LIMITACIONES, CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

El problema más serio (aunque poco habitual) al que nos hemos enfrentado ha sido la contaminación de algunos cultivos organotípicos. Las contaminaciones bacterianas o fúngicas se detectaron fácilmente, pero fue necesaria la eliminación de la práctica totalidad de los tejidos procesados en esos períodos de tiempo. A esto se unieron problemas con el retraso en la ronda de apareamiento de los animales para obtener descendencia, o incluso problemas de viabilidad de los embarazos.

A pesar de lo anteriormente citado, hemos llevado a cabo los objetivos planteados, destacando a continuación algunas de las contribuciones aportadas por nuestro modelo.

Principalmente, hemos utilizado los cultivos organotípicos para el análisis de la expresión de genes y para microscopía electrónica de barrido.

La cuantificación de los genes de citocinas, quimiocinas, receptores, y otros mediadores de la inflamación detectados a través de las matrices de qRT-PCR podrían constituir un elemento importante en estudios de inflamación y respuesta inmunitaria, dos eventos claves y comunes de la meningitis bacteriana, y por lo tanto, también de la meningitis producida por *Listeria*. Esta caracterización proporciona información del proceso infeccioso y permite identificar posibles biomarcadores para el diagnóstico de la listeriosis y otras patologías bacterianas.

Además, la caracterización de todas estas moléculas podría ayudar a definir el fenotipo de la microglía activada por la infección de *L. monocytogenes*. Los macrófagos/microglía pueden ser clasificados de forma general en dos fenotipos (M1 y M2) según su vía de activación, lo que justifica el doble papel, neuroprotector y neurotóxico, de las moléculas que producen (Czeh y cols., 2011). Mientras que la microglía M1 produce moléculas proinflamatorias como TNF, IL-1 β y IL-6; la microglía M2 expresa moléculas antiinflamatorias como IL-10, IL-1rn (Gordon, 2003). Ambos patrones de respuesta son los que obtenemos en nuestro modelo, ya que los 3D-OC responden de esta manera a la infección con *L. monocytogenes*, provocando la activación de una mezcla de señales proinflamatorias y antiinflamatorias, con el objetivo de evitar una respuesta inmunitaria exacerbada. Esta característica fue descrita también tras el tratamiento con estímulos proinflamatorios (LPS y tricostatina A) y antiinflamatorios (helenalina, un inhibidor de NF-KB) de cultivos organotípicos hipocampales de rata (Huuskonen y cols., 2005).

En cuanto a la autofagia, nuestros resultados ofrecen un enfoque general para ir describiendo la imagen completa de la expresión de los genes centrales de la autofagia en el cerebro. Hasta la fecha, existen pocos trabajos publicados sobre el papel de la vía de la autofagia en el SNC.

Además, la utilización de una cepa clínica obtenida en el LCR de un paciente con listeriosis ofrece una aproximación más realista de la infección respecto a otros estudios en los que mayoritariamente se utilizan cepas de colección sin la misma virulencia que una cepa salvaje. Este modelo ofrece la posibilidad clara de poder realizar otros estudios complementarios con distintos mutantes de *Listeria* u otros patógenos capaces de alcanzar e invadir el SNC, para comparar su comportamiento en la interacción con el tejido cerebral.

Dada la gran variedad de técnicas existentes que se pueden aplicar a estos cultivos, se podrían plantear nuevos estudios, tanto con el tejido completo como con células aisladas del mismo.

Por ejemplo, con técnicas como la inmunofluorescencia o la inmunohistoquímica podemos precisar la localización celular de *L. monocytogenes* observada mediante SEM. Para ello, además del marcaje de la cepa bacteriana con los anticuerpos primarios (α -3292/ α -4771) que hemos generado, tendríamos que tener las poblaciones celulares de los cultivos organotípicos identificadas a través del marcaje con anticuerpos específicos: por ejemplo, anti-Mac-1 ó anti-F4/80 para microglía, anti-GFAP para astrocitos, anti-CNP para oligodendrocitos y anti-MAP2 ó anti-NeuN para neuronas.

La caracterización de estas poblaciones podría permitir además, distinguir definitivamente las células primarias aisladas de los tejidos organotípicos. Aunque la morfología analizada nos ha servido para caracterizar el tropismo de *Listeria* por la microglía (fácilmente distinguible), se sabe que esta característica resulta muy variable para poder clasificar los demás tipos celulares, debido a las condiciones fisiológicas que se dan en los cultivos primarios. Además, si esta microglia primaria infectada *in vitro* se aísla y se pone en contacto con la superficie de un nuevo cultivo organotípico, se podría imitar fielmente el mecanismo del caballo de Troya. De esta manera se conseguiría analizar con más detalle cómo el patógeno escapa de las células infectadas para colonizar el tejido cerebral. Este modelo puede ser, por lo tanto, muy polivalente para estudiar fenómenos aislados de interacciones bacteria-célula dentro de un contexto tisular, lo que permitiría conocer con más detalle cómo es la biología de la infección en el cerebro.

También, sería importante correlacionar la expresión génica obtenida con la producción de algunas proteínas que jueguen un papel clave durante la infección como, por ejemplo, validar

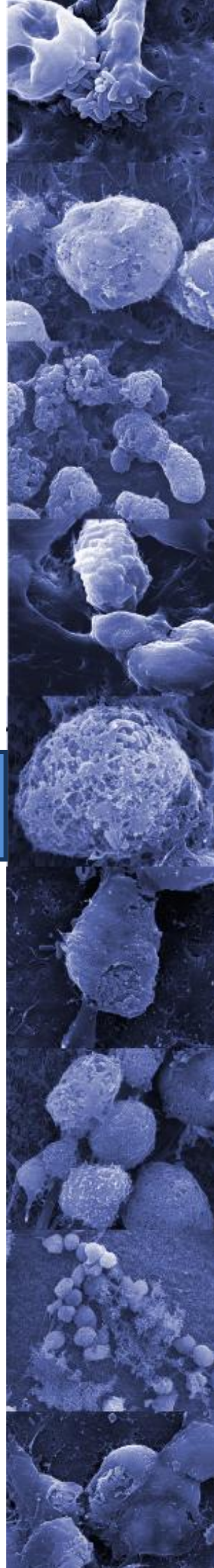
algunos de estos genes individualmente mediante Western blot para entender su función biológica en el parénquima cerebral. Alguna de las moléculas expresadas de manera significativa y no muy estudiadas hasta el momento, como el comentado péptido antimicrobiano rCRAMP, podrían representar nuevas estrategias terapéuticas.

Por último, sería interesante además, profundizar en la regulación de la ruta de la autofagia. Se han descrito muchas herramientas para estudiar la autofagia, desde la microscopía electrónica de transmisión hasta la inmunofluorescencia, la regulación transcripcional y traduccional, análisis *in vivo*, y ensayos de muerte celular, entre otros. Para poder evidenciar e interpretar la inducción de la autofagia de una manera más precisa, muchos autores recomiendan la utilización, en paralelo, de varios de los métodos citados anteriormente (Klionsky y cols., 2012). Sin embargo, nosotros sólo hemos utilizado PCR en tiempo real, técnica que por otro lado, pocos autores han utilizado.

Además, podría ser que en los tiempos de infección seleccionados en relación al nivel máximo de expresión de genes inmunitarios, la mayor parte de la población de *L. monocytogenes* haya sido capaz de evadir la autofagia y por este motivo los marcadores principales de esta vía no aparezcan activados en nuestro modelo. En relación con esto, un estudio sugiere que la autofagia se induce en los fibroblastos durante la fase temprana de la infección de *Listeria* (entre 1 y 2 h después de la infección) (Py y cols., 2007).

Es necesario un mayor conocimiento sobre la vía de la autofagia por sí misma en el cerebro, en un contexto organotípico, o incluso en líneas celulares de microglía inmortalizadas, para entender la biología de los patógenos neurotrópicos, su interacción con esta vía relevante degradativa e inmunológica y la respuesta inmunitaria desencadenada. Además, la participación de las células microgliales en la formación de abscesos cerebrales y en la muerte neuronal abre la posibilidad de manipular las rutas proinflamatorias para reducir la neuroinflamación. La identificación de los mecanismos o factores de virulencia que activan la autofagia podrían proporcionar una nueva estrategia para la intervención terapéutica en las enfermedades infecciosas.

Conclusiones



A partir del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral, hemos extraído las siguientes conclusiones:

Primera. El desarrollo de un modelo de cultivo organotípico tridimensional de Sistema Nervioso Central en ratas ofrece una nueva y valiosa información sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en el tejido cerebral, y mejora nuestro conocimiento sobre la patogénesis de esta bacteria.

Segunda. La expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria frente a *Listeria* origina una fuerte estimulación del sistema inmunitario innato intrínseco del SNC, que activa rápidamente a los fagocitos presentes en el parénquima cerebral. Las actividades fagocíticas y proinflamatorias, principalmente debidas a la microglía, podrían ser causantes de la formación de abscesos cerebrales que acumulan material necrótico, células inflamatorias, proteínas, bacterias y restos celulares.

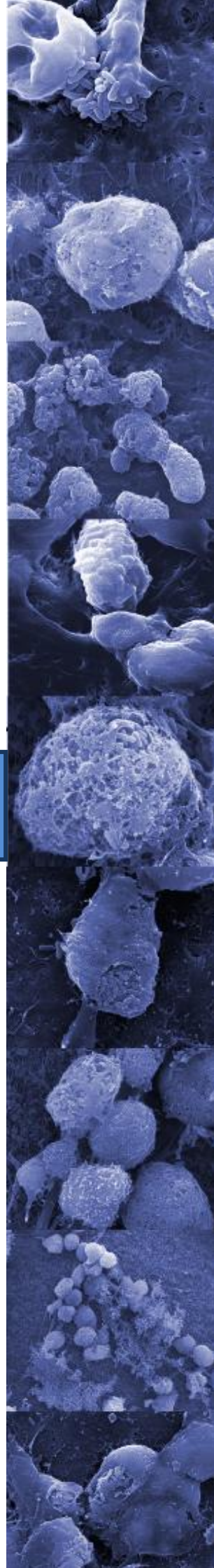
Tercera. La microscopía electrónica de barrido ha permitido conocer el fenotipo y la respuesta de la microglía residente del SNC, activada tras la presencia de bacterias. *L. monocytogenes* es rápidamente fagocitada por la microglía en la superficie, desde donde estas células se mueven hacia el interior del tejido transportando a las bacterias. De esta manera, las células microgliales actuarían como caballo de Troya facilitando la dispersión tisular del patógeno y perpetuando la infección.

Cuarta. Nuestros resultados muestran que el Tlr1, Tlr2 y Tlr10, la señalización de genes dependientes de MyD88, y varias citocinas y quimiocinas características de una respuesta inmunitaria de tipo Th1, están implicados en la respuesta inmunitaria innata contra *L. monocytogenes*. En general, la infección del tejido cerebral provoca la activación de una mezcla de señales pro y antiinflamatorias que el tejido trata de equilibrar para evitar una respuesta inmunitaria exacerbada.

Quinta. En nuestro modelo, se activa una discreta regulación transcripcional de los genes de la maquinaria de la autofagia, pudiendo desempeñar ésta un papel principalmente dedicado a la homeostasis del tejido cerebral dañado, en lugar de ser un mecanismo inmunitario relevante contra la infección de *L. monocytogenes*.

Sexta. La obtención de células primarias de microglía procedentes de los cultivos organotípicos permite estudiar el tropismo de *Listeria* por este tipo celular, así como evidenciar que son las células responsables de la mayor parte de la respuesta inmunitaria transcripcional producida a tiempos cortos de la infección.

Bibliografía



- ▣ Abdalla J, Saad M, Samnani I, Lee P, Moorman J. 2006. Central nervous system infection caused by *Morganella morganii*. Am J Med Sci 331:44-47.
- ▣ Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, Caution K, Kotrange S, Abdelaziz DH, Newland C, Rosales-Reyes R, Kopp B, McCoy K, Montione R, Schlesinger LS, Gavrilin MA, Wewers MD, Valvano MA, Amer AO. 2011. Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. Autophagy 7:1359-1370.
- ▣ Adeva-Bartolomé MT, de Castro-García FJ, Castellanos-Pinedo F, Zurdo-Hernandez JM. 2005. [Brain abscesses due to *Listeria monocytogenes*]. Rev Neurol 40:219-221.
- ▣ Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, López-Berestein G. 2007. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. Mol Cancer Res 5:241-249.
- ▣ Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. Nat Rev Immunol 5:629-640.
- ▣ Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin Microbiol Infect 16:16-23.
- ▣ Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. Glia 36:165-179.
- ▣ Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T. 2006. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. J Biochem 140:161-166.
- ▣ Baehr C, Reichel V, Fricker G. 2006. Choroid plexus epithelial monolayers--a cell culture model from porcine brain. Cerebrospinal Fluid Res 3:13.
- ▣ Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ. 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. Development 129:4249-4260.
- ▣ Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. 2006. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. Crit Rev Immunol 26:149-188.
- ▣ Baldwin DN, Vanchinathan V, Brown PO, Theriot JA. 2003. A gene-expression program reflecting the innate immune response of cultured intestinal epithelial cells to infection by *Listeria monocytogenes*. Genome Biol 4:R2.
- ▣ Barichello T, Lemos JC, Generoso JS, Cipriano AL, Milioli GL, Marcelino DM, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. 2011. Oxidative stress, cytokine/chemokine and disruption of blood-brain barrier in neonate rats after meningitis by *Streptococcus agalactiae*. Neurochem Res 36:1922-1930.
- ▣ Barrila J, Radtke AL, Crabbe A, Sarker SF, Herbst-Kralovetz MM, Ott CM, Nickerson CA. 2010. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. Nat Rev Microbiol 8:791-801.
- ▣ Bartt R. 2000. *Listeria* and atypical presentations of *Listeria* in the central nervous system. Semin Neurol 20:361-373.
- ▣ Bauernfeind F, Hornung V. 2013. Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. EMBO Mol Med 5:814-826.
- ▣ Berche P. 1995. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. Microb Pathog 18:323-336.
- ▣ Berger O, Gan X, Gujuluva C, Burns AR, Sulur G, Stins M, Way D, Witte M, Weinand M, Said J, Kim KS, Taub D, Graves MC, Fiala M. 1999. CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. Mol Med 5:795-805.

- ▣ Bergman P, Johansson L, Wan H, Jones A, Gallo RL, Gudmundsson GH, Hokfelt T, Jonsson AB, Agerberth B. 2006. Induction of the antimicrobial peptide CRAMP in the blood-brain barrier and meninges after meningococcal infection. *Infect Immun* 74:6982-6991.
- ▣ Bergman P, Termen S, Johansson L, Nystrom L, Arenas E, Jonsson AB, Hokfelt T, Gudmundsson GH, Agerberth B. 2005. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem* 93:1132-1140.
- ▣ Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7:99-109.
- ▣ Bierne H, Travier L, Mahlakoiv T, Tailleux L, Subtil A, Lebreton A, Paliwal A, Gicquel B, Staeheli P, Lecuit M, Cossart P. 2012. Activation of type III interferon genes by pathogenic bacteria in infected epithelial cells and mouse placenta. *PLoS One* 7:e39080.
- ▣ Birmingham CL, Higgins DE, Brumell JH. 2008. Avoiding death by autophagy: interactions of *Listeria monocytogenes* with the macrophage autophagy system. *Autophagy* 4:368-371.
- ▣ Birmingham CL, Canadien V, Gouin E, Troy EB, Yoshimori T, Cossart P, Higgins DE, Brumell JH. 2007. *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* 3:442-451.
- ▣ Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. 2006. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem* 281:11374-11383.
- ▣ Blaser C, Wittwer M, Grandgirard D, Leib SL. 2011. Adjunctive dexamethasone affects the expression of genes related to inflammation, neurogenesis and apoptosis in infant rat pneumococcal meningitis. *PLoS One* 6:e17840.
- ▣ Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
- ▣ Böttcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamade U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R. 2003. Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. *Neurosci Lett* 344:17-20.
- ▣ Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. 2003. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43:281-291.
- ▣ Braun E, Zimmerman T, Hur TB, Reinhartz E, Fellig Y, Panet A, Steiner I. 2006. Neurotropism of herpes simplex virus type 1 in brain organ cultures. *J Gen Virol* 87:2827-2837.
- ▣ Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. 2010. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 23:467-492.
- ▣ Brouwer MC, van de Beek D, Heckenberg SG, Spanjaard L, de Gans J. 2006. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin Infect Dis* 43:1233-1238.
- ▣ Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-21.
- ▣ Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Gobin I, Veljkovic D, Abram M. 2006. Systemic and local CC chemokines production in a murine model of *Listeria monocytogenes* infection. *Mediators Inflamm* 2006:54202.
- ▣ Cabanes D, Lecuit M, Cossart P. 2008. Animal models of *Listeria* infection. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 9:Unit 9B.1.
- ▣ Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitao E, Sousa S, Cabanes D. 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2:379-394.

- ▣ Campoy E, Colombo MI. 2009. Autophagy subversion by bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 335:227-250.
- ▣ Cardoso FL, Brites D, Brito MA. 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev* 64:328-63.
- ▣ Cauwels A, Frei K, Sansano S, Fearn C, Ulevitch R, Zimmerli W, Landmann R. 1999. The origin and function of soluble CD14 in experimental bacterial meningitis. *J Immunol* 162:4762-4772.
- ▣ Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka, KV, Antel JP, Gold R. 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43, 231-242.
- ▣ Chauhan VS, Marriot I. 2007. Bacterial infections of the central nervous system: a critical role for resident glial cell in the initiation and progression of inflammation. *Curr Immunol Rev* 3:133-143.
- ▣ Chien HF, Yeh KY, Jiang-Shieh YF, Wei IH, Chang CY, Chang ML, Wu CH. 2005. Signal transduction pathways of nitric oxide release in primary microglial culture challenged with gram-positive bacterial constituent, lipoteichoic acid. *Neuroscience* 133:423-36.
- ▣ Cho KS, Kwon KJ, Jeon SJ, Joo SH, Kim KC, Cheong JH, Bahn GH, Kim HY, Han SH, Shin CY, Yang SI. 2013. Transcriptional Upregulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Rat Primary Astrocytes by a Proteasomal Inhibitor MG132. *Biomol Ther (Seoul)* 21:107-113.
- ▣ Cho S, Wood A, Bowlby MR. 2007. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol* 5:19-33.
- ▣ Clauss HE, Lorber B. 2008. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. *Curr Infect Dis Rep* 10:300-306.
- ▣ Cohen M, Braun E, Tsalenchuck Y, Panet A, Steiner I. 2011. Restrictions that control herpes simplex virus type 1 infection in mouse brain ex vivo. *J Gen Virol* 92:2383-2393.
- ▣ Cohen P, Bouaboula M, Bellis M, Baron V, Jbilo O, Poinot-Chazel C, Galiegue S, Hadibi EH, Casellas P. 2000. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem* 275:11181-11190.
- ▣ Coimbra RS, Voisin V, de Saizieu AB, Lindberg RL, Wittwer M, Leppert D, Leib SL. 2006. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. *BMC Biol* 4:15.
- ▣ Cole C, Thomas S, Filak H, Henson PM, Lenz LL. 2012. Nitric oxide increases susceptibility of Toll-like receptor-activated macrophages to spreading *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 36:807-820.
- ▣ Colombo MI. 2007. Autophagy: a pathogen driven process. *IUBMB Life* 59:238-242.
- ▣ Corr SC, O'Neill LA. 2009. *Listeria monocytogenes* infection in the face of innate immunity. *Cell Microbiol* 11:703-709.
- ▣ Cossart P. 2011. Pascale Cossart: the ins and outs of *Listeria*. Interview by Caitlin Sedwick. *J Cell Biol* 192:904-905.
- ▣ Cossart P, Toledo-Arana A. 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: An overview. *Microbes Infect* 10:1041-1050.
- ▣ Cossart P. 2007. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect* 9:1143-1146.
- ▣ Cossart P, Pizarro-Cerdá J, Lecuit M. 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 13:23-31.
- ▣ Coureuil M, Join-Lambert O, Lecuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. 2012. Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence* 3:164-172.

- ▣ Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, Ting JP, Duncan JA. 2009. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One* 4:e7446.
- ▣ Cremer TJ, Amer A, Tridandapani S, Butchar JP. 2009. *Francisella tularensis* regulates autophagy-related host cell signaling pathways. *Autophagy* 5:125-128.
- ▣ Curtis MM, Way SS. 2009. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126:177-185.
- ▣ Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. 2011. The Yin and Yang of Microglia. *Dev Neurosci* 33:199-209.
- ▣ **D**abiri GA, Sanger JM, Portnoy DA, Southwick FS. 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6068-6072.
- ▣ De Simoni A, Yu LM. 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nat Protoc* 1:1439-1445.
- ▣ Deckert M, Virna S, Sakowicz-Burkiewicz M, Lutjen S, Soltek S, Bluethmann H, Schluter D. 2007. Interleukin-1 receptor type 1 is essential for control of cerebral but not systemic listeriosis. *Am J Pathol* 170:990-1002.
- ▣ Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RB, Lambert H, Wallin RP, Chambers BJ, Barragan A. 2011. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 79:3046-3052.
- ▣ den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado MR, Wiedmann M. 2010. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* 11:688.
- ▣ Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. 2010. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 24:708-723.
- ▣ Deretic V. 2012. Autophagy: an emerging immunological paradigm. *J Immunol* 189:15-20.
- ▣ Deretic V. 2009. Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Curr Opin Immunol* 21:53-62.
- ▣ Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH, Gregory CD. 2003. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: The role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ* 10:371-382.
- ▣ Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A. 2012. Autophagy in astrocytes: a novel culprit in lysosomal storage disorders. *Autophagy* 8:1871-1872.
- ▣ Dibaj P, Steffens H, Zschuntzsch J, Nadrigny F, Schomburg ED, Kirchhoff F, Neusch C. 2011. In Vivo imaging reveals distinct inflammatory activity of CNS microglia versus PNS macrophages in a mouse model for ALS. *PLoS One* 6:e17910.
- ▣ Ding Y, Li L. 2008. Lipopolysaccharide preconditioning induces protection against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in organotypic midbrain slice culture. *Neurosci Bull* 24:209-218.
- ▣ Disson O, Lecuit M. 2012. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence* 3:213-221.
- ▣ Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Bruck W, Priller J, Nau R, Prinz M. 2006. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129:2394-2403.
- ▣ Dolník V. 1999. DNA sequencing by capillary electrophoresis (review). *J Biochem Biophys Methods* 41:103-119.

- ▣ Domínguez-Punaro MC, Segura M, Plante MM, Lacouture S, Rivest S, Gottschalk M. 2007. *Streptococcus suis* serotype 2, an important swine and human pathogen, induces strong systemic and cerebral inflammatory responses in a mouse model of infection. *J Immunol* 179:1842-1854.
- ▣ Dons L, Wedlewicz K, Jin Y, Bindseil E, Olsen JE, Kristensson K. 1999. Rat dorsal root ganglia neurons as a model for *Listeria monocytogenes* infections in culture. *Med Microbiol Immunol* 188:15-21.
- ▣ Doyle ME. 2001. Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. *FRI Briefings* 1-13.
- ▣ Dramsi S, Cossart P. 2003. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infect Immun* 71:3614-3618.
- ▣ Dramsi S, Levi S, Triller A, Cossart P. 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* 66:4461-4468.
- ▣ Drevets DA, Bronze MS. 2008. *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:151-165.
- ▣ Drevets DA, Leenen PJ, Greenfield RA. 2004a. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17:323-347.
- ▣ Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Van Rooijen N, Ehrchen J, Sunderkotter C, Leenen PJ. 2004b. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* 172:4418-4424.
- ▣ Drevets DA, Leenen PJ. 2000. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect* 2:1609-1618.
- ▣ Dussurget O. 2008. New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:1-38.
- ▣ Dyer RB, Collaco CR, Niesel DW, Herzog NK. 1993. *Shigella flexneri* invasion of HeLa cells induces NF-kappa B DNA-binding activity. *Infect Immun* 61:4427-4433.
- ▣ Edelson BT, Unanue ER. 2001. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* 14:503-512.
- ▣ Eajardo Olivares M, Santos Morano A, Zarallo Cortés L. 2008. Otitis media supurada por *Listeria grayi*. *Acta Pediatr Port* 39:12-13.
- ▣ Falsig J, Julius C, Margalith I, Schwarz P, Heppner FL, Aguzzi A. 2008. A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* 11:109-117.
- ▣ Fernández-Garayzábal JF, Suárez G, Blanco MM, Gibello A, Domínguez L. 1996. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. *Int J Syst Bacteriol* 46:832-834.
- ▣ Fleming SD, Campbell PA. 1997. Some macrophages kill *Listeria monocytogenes* while others do not. *Immunol Rev* 158:69-77.
- ▣ Flügel A, Schwaiger FW, Neumann H, Medana I, Willem M, Wekerle H, Kreutzberg GW, Graeber MB. 2000. Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes. *Brain Pathol* 10:353-364.
- ▣ Freitag NE, Port GC, Miner MD. 2009. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:623-628.
- ▣ Fujimoto S, Nakagami Y, Kojima F. 2004. Optimal bacterial DNA isolation method using bead-beating technique. *Memoirs Kyushu Univ Dep of Health Scis of Medical Sch* 3:33-38.

- ▣ Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. 1997. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471-477.
- ▣ Gähwiler BH. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4:329-342.
- ▣ Gerber J, Nau R. 2010. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* 23:312-318.
- ▣ Gianinazzi C, Schild M, Muller N, Leib SL, Simon F, Nunez S, Joss P, Gottstein B. 2005. Organotypic slice cultures from rat brain tissue: A new approach for *Naegleria fowleri* CNS infection in vitro. *Parasitology* 131:797-804.
- ▣ Gianinazzi C, Grandgirard D, Simon F, Imboden H, Joss P, Tauber MG, Leib SL. 2004. Apoptosis of hippocampal neurons in organotypic slice culture models: Direct effect of bacteria revisited. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:610-617.
- ▣ Gianinazzi C, Grandgirard D, Imboden H, Egger L, Meli DN, Bifrare YD, Joss PC, Tauber MG, Borner C, Leib SL. 2003. Caspase-3 mediates hippocampal apoptosis in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol* 105:499-507.
- ▣ Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P. 2006. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nat Protoc* 1:1165-1171.
- ▣ Gong L, Devenish RJ, Prescott M. 2012. Autophagy as a macrophage response to bacterial infection. *IUBMB Life* 64:740-747.
- ▣ Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
- ▣ Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Saunders BD. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1280-1288.
- ▣ Greiffenberg L, Goebel W, Kim KS, Daniels J, Kuhn M. 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: an electron microscopic study. *Infect Immun* 68:3275-3279.
- ▣ Guan Y, Ranoa DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, Tapping RI. 2010. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 184:5094-5103.
- ▣ Guldimann C, Lejeune B, Hofer S, Leib SL, Frey J, Zurbriggen A, Seuberlich T, Oevermann A. 2012. Ruminant organotypic brain-slice cultures as a model for the investigation of CNS listeriosis. *Int J Exp Pathol* 93:259-268.
- ▣ Gutiérrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119:753-766.
- ▣ Hamerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, Coughlin P, Aebersold R, Aderem A. 2002. Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol* 168:2415-2423.
- ▣ Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T. 2012. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol* 33:333-342.
- ▣ Hara H, Tsuchiya K, Nomura T, Kawamura I, Shoma S, Mitsuyama M. 2008. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *J Immunol* 180:7859-7868.
- ▣ Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889.

- ▣ Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guet C, Briere F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 174:2942-2950.
- ▣ Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, Minami T, Cho S, Takeno N, Nakashima A, Sakurai H, Saito S, Tsukada K, Saiki I. 2008. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells. *Eur J Cancer* 44:1022-1029.
- ▣ Hauf N, Goebel W, Serfling E, Kuhn M. 1994. *Listeria monocytogenes* infection enhances transcription factor NF-kappa B in P388D1 macrophage-like cells. *Infect Immun* 62:2740-2747.
- ▣ Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Ohga S, Muramori K, Matsumoto K, Bluestone JA, Nomoto K. 1992. A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J Exp Med* 175:49-56.
- ▣ Hirsch E, Irikura VM, Paul SM, Hirsh D. 1996. Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11008-11013.
- ▣ Hoarau JJ, Krejbich-Trotot P, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Thon-Hon GV, Kumar S, Neal JW, Gasque P. 2011. Activation and control of CNS innate immune responses in health and diseases: a balancing act finely tuned by neuroimmune regulators (NIReg). *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:25-43.
- ▣ Hoegen T, Tremel N, Klein M, Angele B, Wagner H, Kirschning C, Pfister HW, Fontana A, Hammerschmidt S, Koedel U. 2011. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J Immunol* 187:5440-5451.
- ▣ Hogue MJ. 1947. Human fetal brain cells in tissue cultures; their identification and motility. *J Exp Zool* 106:85-107.
- ▣ Holch A, Gottlieb CT, Larsen MH, Ingmer H, Gram L. 2010. Poor invasion of trophoblastic cells but normal plaque formation in fibroblastic cells despite actA deletion in a group of *Listeria monocytogenes* strains persisting in some food processing environments. *Appl Environ Microbiol* 76:3391-3397.
- ▣ Huuskonen J, Suuronen T, Miettinen R, van Groen T, Salminen A. 2005. A refined in vitro model to study inflammatory responses in organotypic membrane culture of postnatal rat hippocampal slices. *J Neuroinflammation* 2:25.
- ▣ Janot L, Secher T, Torres D, Maillet I, Pfeilschifter J, Quesniaux VF, Landmann R, Ryffel B, Erard F. 2008. CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of *Listeria monocytogenes* infection. *J Infect Dis* 198:115-124.
- ▣ Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:824-839.
- ▣ Jeon H, Boo YC. 2013. Senescent endothelial cells are prone to TNF-alpha-induced cell death due to expression of FAS receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 438:277-282.
- ▣ Jin Y, Lundkvist G, Dons L, Kristensson K, Rottenberg ME. 2004. Interferon-gamma mediates neuronal killing of intracellular bacteria. *Scand J Immunol* 60:437-448.
- ▣ Jin Y, Dons L, Kristensson K, Rottenberg ME. 2001. Neural route of cerebral *Listeria monocytogenes* murine infection: role of immune response mechanisms in controlling bacterial neuroinvasion. *Infect Immun* 69:1093-1100.

- ☐ Joseph B, Goebel W. 2007. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* 9:1188-1195.
- ☐ Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637-650.
- ☐ Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
- ☐ Kielian T, Bearden ED, Baldwin AC, Esen N. 2004. IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced experimental brain abscess. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:381-396.
- ☐ Kim H, Cooke MJ, Shoichet MS. 2011. Creating permissive microenvironments for stem cell transplantation into the central nervous system. *Trends Biotechnol* 30:55-63.
- ☐ Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, Hornung V. 2010. *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 40:1545-1551.
- ☐ Kim KS. 2008. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* 6:625-634.
- ☐ Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, y cols. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445-544.
- ☐ Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis* 2:721-736.
- ☐ Koedel U, Bernatowicz A, Paul R, Frei K, Fontana A, Pfister HW. 1995. Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* 37:313-323.
- ☐ Kuhn M, Goebel W. 1994. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun* 62:348-356.
- ☐ Kundu M, Thompson CB. 2008. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol* 3:427-455.
- ☐ Kushwaha K, Muriana PM. 2009. Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. *J Food Prot* 72:2125-2131.
- ☐ Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232:119-130.
- ☐ Lang Halter E, Neuhaus K, Scherer S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:641-647.
- ☐ Lara-Tejero M, Pamer EG. 2004. T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Microbiol* 7:45-50.
- ☐ Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, Creagh EM. 2010. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol* 3:17-28.
- ☐ Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2210-2214.
- ☐ Lecuit M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect* 9:1216-1225.
- ☐ Lecuit M. 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* 11:430-436.

- ▣ Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, Fedor-Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* 18:3956-63.
- ▣ Ledeboer A, Breve JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM. 2002. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci* 16:1175-1185.
- ▣ Leib SL, Kim YS, Black SM, Tureen JH, Tauber MG. 1998. Inducible nitric oxide synthase and the effect of aminoguanidine in experimental neonatal meningitis. *J Infect Dis* 177:692-700.
- ▣ Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Tauber MG. 1996. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 98:2632-2639.
- ▣ Levine B, Mizushima N, Virgin HW. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469:323-335.
- ▣ Li J, Lee DS, Madrenas J. 2013. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol* 4:347.
- ▣ Liu TB, Perlin DS, Xue C. 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence* 3:173-181.
- ▣ Liu D. 2008. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *Int J Food Microbiol* 122:229-242.
- ▣ Lorber B. 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis* 24:1-9.
- ▣ Lossi L, Gambino G, Salio C, Merighi A. 2010. Autophagy regulates the post-translational cleavage of BCL-2 and promotes neuronal survival. *ScientificWorldJournal* 10:924-929.
- ▣ Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. 2009. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 88:221-245.
- ▣ Mackaness GB. 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* 116:381-406.
- ▣ Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1966-1971.
- ▣ Mariani MM, Kielian T. 2009. Microglia in infectious diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:448-461.
- ▣ Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascues J. 2011. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25-40.
- ▣ Martínez-Borra J, López-Larrea C. 2012. Autophagy and self-defense. *Adv Exp Med Biol* 738:169-184.
- ▣ Martinon F, Tschopp J. 2007. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14:10-22.
- ▣ McCoy MK, Ruhn KA, Blesch A, Tansey MG. 2011. TNF: A key neuroinflammatory mediator of neurotoxicity and neurodegeneration in models of Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* 691:539-540.
- ▣ McCoy MK, Tansey MG. 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- ▣ McKellar RC. 1994. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 60:4219-4225.
- ▣ Miao EA, Rajan JV, Aderem A. 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* 243:206-214.

- ▣ Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. 2010a. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 11:1136-1142.
- ▣ Michelet C, Leib SL, Bentue-Ferrer D, Tauber MG. 1999. Comparative efficacies of antibiotics in a rat model of meningoencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1651-1656.
- ▣ Milillo SR, Friedly EC, Saldivar JC, Muthaiyan A, O'Bryan C, Crandall PG, Johnson MG, Ricke SC. 2012. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52:712-725.
- ▣ Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77:313-336.
- ▣ Monsonego A, Shani Y, Friedmann I, Paas Y, Eizenberg O, Schwartz M. 1997. Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated rat brain astrocytes. *J Biol Chem* 272:3724-3732.
- ▣ Moragas M, Martinez-Yelamos S, Murillo O, Fernandez-Viladrich P. 2010. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes* in adults: six cases and review of the literature. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:87-94.
- ▣ Mostowy S. 2013. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell Microbiol* 15:395-402.
- ▣ Müller N, Vonlaufen N, Gianinazzi C, Leib SL, Hemphill A. 2002. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *J Clin Microbiol* 40:252-255.
- ▣ Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77:313-336.
- ▣ Nakajima K, Kohsaka S. 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem* 130:169-175.
- ▣ Ng HH, Frantz CE, Rausch L, Fairchild DC, Shimon J, Riccio E, Smith S, Mirsalis JC. 2005. Gene expression profiling of mouse host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Genomics* 86:657-667.
- ▣ Nickerson CA, Richter EG, Ott CM. 2007. Studying host-pathogen interactions in 3-D: organotypic models for infectious disease and drug development. *J Neuroimmune Pharmacol* 2:26-31.
- ▣ Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE. 1997. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infect Immun* 65:5074-5081.
- ▣ Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J. 2005. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:435-452.
- ▣ O'Byrne C, Utratna M. 2010. *Listeria monocytogenes*: at the coalface of host-pathogen research. *Bioeng Bugs* 1:371-377.
- ▣ O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, Perry AK, Nguyen BO, Lane TF, Taniguchi T, Miller JF, Cheng G. 2004. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 200:437-445.

- ☐ O'Neil HS, Marquis H. 2006. *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect Immun* 74:6675-6681.
- ☐ Ogawa M, Sasakawa C. 2006. Shigella and autophagy. *Autophagy* 2:171-174.
- ☐ Ohta A, Sitkovsky M. 2001. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414:916-920.
- ☐ Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924.
- ☐ Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF. 2009. Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nat Neurosci* 12:872-878.
- ☐ Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* 301:79-96.
- ☐ Orvedahl A, Levine B. 2009. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* 16:57-69.
- ☐ Ousman SS, Kubes P. 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* 15:1096-1101.
- ☐ Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13766-13771.
- ☐ Özören N, Masumoto J, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Erturk I, Jagirdar R, Zhu L, Inohara N, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Núñez G. 2006. Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1beta/IL-18 secretion in response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 176:4337-4342.
- ☐ **P**adilla D, Acosta F, García JA, Real F, Vivas JR. 2009. Temperature influences the expression of fimbriae and flagella in *Hafnia alvei* strains: an immunofluorescence study. *Arch Microbiol* 191:191-198.
- ☐ Pamer EG. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 4:812-823.
- ☐ Parra MC, Baquero F, Perez-Diaz JC. 2008. The role of apoptosis in *Listeria monocytogenes* neural infection: listeriolysin O interaction with neuroblastoma Neuro-2a cells. *Infect Genet Evol* 8:59-67.
- ☐ Peel M, Donachie W, Shaw A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* 134:2171-2178.
- ☐ Peters M, Hewicker-Trautwein M. 1996. Studies on the cell tropism of *Listeria monocytogenes* in ovine fetal brain cell cultures. *Vet Microbiol* 49:169-179.
- ☐ Peters M, Hewicker-Trautwein M. 1994. Infection of murine fetal brain cell cultures with *Listeria monocytogenes*. *Vet Microbiol* 41:19-28.
- ☐ Peña F. 2010. Organotypic cultures as tool to test long-term effects of chemicals on the nervous system. *Curr Med Chem* 17:987-1001.
- ☐ Pizarro-Cerdá J, Kuhbacher A, Cossart P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- ☐ Pizarro-Cerdá J, Cossart P. 2006. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol* 208:215-223.
- ☐ Py BF, Lipinski MM, Yuan J. 2007. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* 3:117-125.

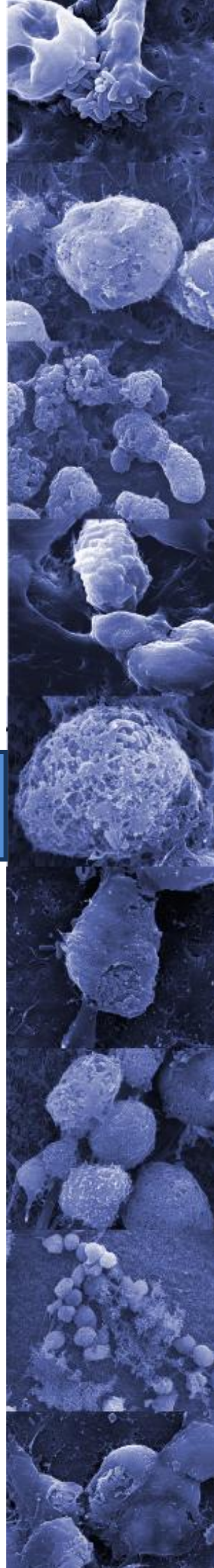
- ▣ **R**amaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. 2007. *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 40:4-13.
- ▣ Randow F, Münz C. 2012. Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol* 33:475-487.
- ▣ Remer KA, Jungi TW, Fatzer R, Tauber MG, Leib SL. 2001. Nitric oxide is protective in listeric meningoencephalitis of rats. *Infect Immun* 69:4086-4093.
- ▣ Remuzgo-Martínez S, Ramos-Vivas J. 2013. *Listeria monocytogenes* and macrophages. *Microb Focus* 5.1:4-6.
- ▣ Remuzgo-Martínez S, Pilares-Ortega L, Alvarez-Rodriguez L, Aranzamendi-Zaldunbide M, Padilla D, Icardo JM, Ramos-Vivas J. 2013a. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Rhodococcus equi* infection. *J Med Microbiol* 62:1144-1152.
- ▣ Remuzgo-Martínez S, Aranzamendi-Zaldunbide M, Pilares-Ortega L, Icardo JM, Acosta F, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. 2013b. Interaction of macrophages with a cytotoxic *Serratia liquefaciens* human isolate. *Microbes Infect* 15:480-490.
- ▣ Ribet D, Hamon M, Gouin E, Nahori MA, Impens F, Neyret-Kahn H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Dejean A, Cossart P. 2010. *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* 464:1192-1195.
- ▣ Rich KA, Burkett C, Webster P. 2003. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol* 5:455-468.
- ▣ Richter-Dahlfors A, Rhen M, Udekwi K. 2012. Tissue microbiology provides a coherent picture of infection. *Curr Opin Microbiol* 15:15-22.
- ▣ Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942-964; table of contents.
- ▣ Rosello A, Warnes G, Meier UC. 2012. Cell death pathways and autophagy in the central nervous system and its involvement in neurodegeneration, immunity and central nervous system infection: to die or not to die--that is the question. *Clin Exp Immunol* 168:52-57.
- ▣ **S**arfo BY, Armah HB, Irune I, Adjei AA, Olver CS, Singh S, Lillard Jr JW, Stiles JK. 2005. *Plasmodium yoelii* 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. *Malar J* 4:63.
- ▣ Sauer JD, Witte CE, Zemansky J, Hanson B, Lauer P, Portnoy DA. 2010. *Listeria monocytogenes* triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol. *Cell Host Microbe* 7:412-419.
- ▣ Schattgen SA, Fitzgerald KA. 2011. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev* 243:109-118.
- ▣ Scheidegger A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, Gianinazzi C, Muller N, Leib SL, Hemphill A. 2005. Differential effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on *Toxoplasma gondii* proliferation in organotypic rat brain slice cultures. *J Parasitol* 91:307-315.
- ▣ Schlüter D, Buck C, Reiter S, Meyer T, Hof H, Deckert-Schlüter M. 1999. Immune reactions to *Listeria monocytogenes* in the brain. *Immunobiology* 201:188-195.
- ▣ Schmidt H, Tlustochowska A, Stuert K, Djukic M, Gerber J, Schutz E, Kuhnt U, Nau R. 2001. Organotypic hippocampal cultures. A model of brain tissue damage in *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Neuroimmunol* 113:30-39.

- ▣ Schuppler M, Loessner MJ. 2010. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. *Int J Inflam* 704321.
- ▣ Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, Hayashi N, Adachi K, Nakano H, Futatsugi-Yumikura S, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Fujimoto J, Nakanishi K. 2002. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol* 169:3863-3868.
- ▣ Seveau S, Pizarro-Cerdá J, Cossart P. 2007. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes Infect* 9:1167-1175.
- ▣ Shen H, Whitmire JK, Fan X, Shedlock DJ, Kaech SM, Ahmed R. 2003. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 170:1443-1451.
- ▣ Siegel RM. 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 6:308-317.
- ▣ Sobolewska A, Motyl T, Gajewska M. 2011. Role and regulation of autophagy in the development of acinar structures formed by bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 90:854-864.
- ▣ Soeda S, Koyanagi S, Kuramoto Y, Kimura M, Oda M, Kozako T, Hayashida S, Shimeno H. 2008. Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system. *Thromb Haemost* 100:1014-1020.
- ▣ Spach DH, Jackson LA. 1999. Bacterial meningitis. *Neurol Clin* 17:711-735.
- ▣ Spellerberg B, Rosenow C, Sha W, Tuomanen EI. 1996. Pneumococcal cell wall activates NF-kappa B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb Pathog* 20:309-317.
- ▣ Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, De Keyser J, Haegeman G, Gerlo S. 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res Rev* 67:157-183.
- ▣ Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24:93-103.
- ▣ Stoppini L, Buchs PA, Brun R, Muller D, Duport S, Parisi L, Seebeck T. 2000. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *Int J Med Microbiol* 290:105-113.
- ▣ Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- ▣ Stubblefield Park SR, Widness M, Levine AD, Patterson CE. 2011. T cell-, interleukin-12-, and gamma interferon-driven viral clearance in measles virus-infected brain tissue. *J Virol* 85:3664-3676.
- ▣ Swaminathan B, Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9:1236-1243.
- ▣ **T**ambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. 2009. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 85:352-370.
- ▣ Täuber MG, Moser B. 1999. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis* 28:1-11; quiz 12.
- ▣ Termén S, Tollin M, Olsson B, Svenberg T, Agerberth B, Gudmundsson GH. 2003. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 60:536-549.
- ▣ Tilney LG, Portnoy DA. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597-1608.
- ▣ Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *MVZ-Córdoba* 10:511-543.

- ▣ Torres D, Barrier M, Bihl F, Quesniaux VJ, Mailliet I, Akira S, Ryffel B, Erard F. 2004. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 72:2131-2139.
- ▣ Tuomanen E. 1996. Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* 18:289-299.
- ▣ Vadia S, Arnett E, Haghighat AC, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK, Seveau S. 2011. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. *PLoS Pathog* 7:e1002356.
- ▣ Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.
- ▣ Veiga E, Cossart P. 2005. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat Cell Biol* 7:894-900.
- ▣ Vergara U. 2011. Sistema nervioso central y regulación de la respuesta inmune. *Avances en Ciencias Veterinarias* 26:41-52.
- ▣ Virna S, Deckert M, Lutjen S, Soltek S, Foulds KE, Shen H, Korner H, Sedgwick JD, Schluter D. 2006. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis. *J Immunol* 177:3972-3982.
- ▣ Vonlaufen N, Gianinazzi C, Muller N, Simon F, Bjorkman C, Jungi TW, Leib SL, Hemphill A. 2002. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Neospora caninum*: an alternative approach to study host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 32:533-542.
- ▣ Wan Y, Kim TW, Yu M, Zhou H, Yamashita M, Kang Z, Yin W, Wang JA, Thomas J, Sen GC, Stark R, Li X. 2011. The dual functions of IL-1 receptor-associated kinase 2 in TLR9-mediated IFN and proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 186:3006-3014.
- ▣ Wang C, Chou CH, Tseng C, Ge X, Pinchuk LM. 2011. Early gene response of human brain microvascular endothelial cells to *Listeria monocytogenes* infection. *Can J Microbiol* 57:441-446.
- ▣ Weber JR, Tuomanen EI. 2007. Cellular damage in bacterial meningitis: an interplay of bacterial and host driven toxicity. *J Neuroimmunol* 184:45-52.
- ▣ Williams MA, Schmidt RL, Lenz LL. 2012. Early events regulating immunity and pathogenesis during *Listeria monocytogenes* infection. *Trends Immunol* 33:488-495.
- ▣ Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, Brickey WJ, Huang MT, Taxman DJ, Duncan JA, Ting JP. 2009. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 183:2008-2015.
- ▣ Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. 2007. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2:147-159.
- ▣ Wirenfeltd M, Babcock AA, Vinters HV. 2011. Microglia - Insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system. *Histol Histopathol* 26:519-530.
- ▣ Wittwer M, Grandgirard D, Rohrbach J, Leib SL. 2010. Tracking the transcriptional host response from the acute to the regenerative phase of experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infec Dis* 10:176.
- ▣ Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. 2013. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6:7.

- ▣ Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2010. Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol* 30:693-702.
- ▣ Xu S, Han Y, Xu X, Bao Y, Zhang M, Cao X. 2010. IL-17A-producing gammadeltaT cells promote CTL responses against *Listeria monocytogenes* infection by enhancing dendritic cell cross-presentation. *J Immunol* 185:5879-5887.
- ▣ Zelenewicz LA, Shen H. 2007. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect* 9:1208-1215.
- ▣ Zhang J, Gao Y, Shen Y, Li K. 2009. Asymmetrical release of interleukin-6 by cultured cerebral cortical astrocytes treated with lipopolysaccharide. *Indian J Med Res* 129:164-169.
- ▣ Zhang JR, Tuomanen E. 1999. Molecular and cellular mechanisms for microbial entry into the CNS. *J Neurovirol* 5:591-603.
- ▣ Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, Cadwell K, Delgado MA, Ponpuak M, Green KG, Schmidt RE, Mizushima N, Deretic V, Sibley LD, Virgin HW. 2008. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe* 4:458-469.
- ▣ Zlotkin A, Chilmonczyk S, Eyngor M, Hurvitz A, Ghittino C, Eldar A. 2003. Trojan horse effect: Phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infect Immun* 71:2318-2325.
- ▣ Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Roord JJ, Van Furth AM. 2003. IL-1 receptor type 1 gene-deficient mice demonstrate an impaired host defense against pneumococcal meningitis. *J Immunol* 170:4724-4730.

Anexos



Anexo 1. Tablas suplementarias

Tablas S1-S5.....	200
Tablas S6-S10.....	220
Tablas S11-S12.....	230
Tablas S13-S14.....	238
Tabla S15.....	240
Tabla S16.....	244

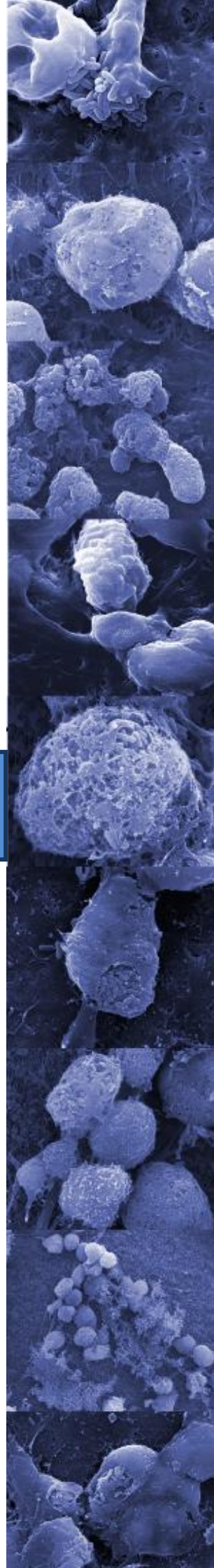


TABLA S1

1 HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2[^](-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	30,35	29,76	2,876317	2,57636	0,007827	0,010861	0,740741	1,3877
C5	Rn.21259	XM_342421	34,94	34,77	0,109697	0,404145	0,000326	0,000337	0,882344	1,0348
C8a	Rn.105718	XM_233251	35,00	34,73	0	0,453248	0,000312	0,000345	0,930244	1,1065
Camp	Rn.33146	XM_236642	34,94	33,98	0,109697	0,886585	0,000326	0,000583	0,521376	1,7892
Casp1	Rn.37508	NM_012762	29,14	28,66	1,363867	2,124359	0,018149	0,023228	0,348236	1,2799
Casp4	Rn.16195	NM_053736	27,71	27,27	0,941559	1,549097	0,048901	0,060875	0,365387	1,2449
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	29,54	25,74	2,68166	1,585129	0,013722	0,175393	0,312850	12,7816
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	32,47	31,63	1,005037	1,699127	0,001801	0,002958	0,372183	1,6426
Cd14	Rn.42942	NM_021744	28,23	25,80	0,398873	0,597746	0,034023	0,168638	0,141793	4,9565
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	32,96	32,38	1,795671	1,311831	0,001285	0,001763	0,251108	1,3717
Cd55	Rn.18841	NM_022269	33,13	32,85	0,567215	0,713045	0,001137	0,001276	0,781370	1,1219
Cfp	Rn.204119	XM_216784	28,65	28,16	2,060008	2,228034	0,025489	0,032773	0,511241	1,2858
Chuk	Rn.23019	XM_219857	28,07	27,45	1,658473	1,46113	0,038102	0,053735	0,044229	1,4103
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	27,76	27,21	1,324248	1,605127	0,047235	0,063607	0,118431	1,3466
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	31,10	31,70	1,602571	1,941039	0,004643	0,002831	0,209171	-1,6403
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	29,82	29,43	1,039423	1,111815	0,011302	0,013653	0,369705	1,208
Cybb	Rn.98491	NM_023965	27,85	26,98	1,268083	1,086109	0,044378	0,074257	0,026871	1,6733
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Fn1	Rn.1604	NM_019143	30,77	30,62	2,790394	1,933727	0,00585	0,00597	0,727552	1,0205
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	26,62	26,40	2,022433	2,330715	0,103617	0,111003	0,761385	1,0713
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	26,32	25,78	2,237908	2,365086	0,128158	0,171387	0,517435	1,3373
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	29,45	28,63	1,805999	1,468684	0,014572	0,023661	0,189748	1,6238

TABLA S1 (continuación)

I HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkkb	Rn.19222	NM_053355	29,53	28,87	2,09664	1,426195	0,013818	0,020128	0,254099	1,4567
II10	Rn.9868	NM_012854	32,36	30,90	0,452143	1,132446	0,001948	0,004928	0,431363	2,5303
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	31,22	30,52	2,513086	1,48406	0,004282	0,006384	0,515749	1,4907
IIIa	Rn.12300	NM_017019	31,64	25,77	2,230389	1,126469	0,003193	0,17258	0,122611	54,0417
IIIb	Rn.9869	NM_031512	29,89	24,02	1,823687	0,903493	0,010791	0,579146	0,098563	53,6684
IIIf10	Rn.84164	XM_342378	35,00	34,65	0	0,611991	0,000312	0,000366	0,836403	1,175
IIIf5	Rn.63170	XM_231101	33,57	32,44	0,622174	1,08657	0,00084	0,001687	0,309074	2,0083
IIIf6	Rn.218666	XM_231099	34,99	34,35	0,023094	0,810267	0,000315	0,000451	0,641037	1,4333
IIIf8	Rn.137499	XM_342377	35,00	34,57	0	0,744782	0,000312	0,000386	0,980424	1,2391
IIIf9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
IIIr1	Rn.9758	NM_013123	33,91	32,43	0,941081	0,888951	0,000662	0,001707	0,039436	2,5775
IIIr2	Rn.10758	NM_053953	33,09	32,27	0,808847	1,40716	0,001169	0,001902	0,441416	1,6275
IIIrap	Rn.10511	NM_012968	31,50	30,55	1,574622	0,844512	0,003519	0,006267	0,083189	1,781
IIIrap12	Rn.208232	XM_236512	33,37	33,34	0,392726	0,649538	0,000963	0,000906	0,852483	-1,0624
IIIr12	Rn.10235	NM_133575	34,73	33,88	0,473427	0,925437	0,000377	0,000625	0,446439	1,6579
IIIrm	Rn.162640	NM_022194	29,54	27,38	0,113725	0,919039	0,013691	0,056276	0,193323	4,1106
II6	Rn.9873	NM_012589	34,45	30,27	0,946854	1,654035	0,000455	0,007592	0,136819	16,6717
Irak1	Rn.22238	XM_343844	28,07	27,66	1,903926	1,2885	0,038102	0,046563	0,482451	1,2221
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	30,67	29,49	1,57513	1,182765	0,006284	0,013036	0,028483	2,0744
Irf1	Rn.6396	NM_012591	28,41	26,01	1,313659	0,609289	0,030032	0,146131	0,054193	4,8658
Lalba	Rn.10479	NM_012594	35,00	34,75	0	0,427239	0,000312	0,00034	0,910372	1,0913
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	33,17	33,23	1,582445	0,79019	0,001106	0,000978	0,739781	-1,1308
Lck	Rn.22791	XM_232763	32,69	32,90	2,070821	1,720475	0,001546	0,001226	0,496765	-1,2605
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	29,08	28,83	1,042417	1,450046	0,018919	0,020694	0,628280	1,0938
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	21,78	21,12	0,386825	0,563235	2,967675	4,312925	0,560731	1,4533
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	30,08	29,81	2,099556	1,478862	0,00946	0,010491	0,949545	1,1091

TABLA S1 (continuación)

1 HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	28,78	28,51	2,425785	1,890035	0,023292	0,025713	0,984431	1,1039
Mif	Rn.2661	NM_031051	23,11	23,46	1,089235	1,58765	1,180447	0,851847	0,166941	-1,3857
Myd88	Rn.37341	NM_198130	29,26	28,15	1,478423	1,494033	0,0167	0,033001	0,015754	1,9761
Ncf4	Rn.46120	XM_576306	29,98	29,76	1,196843	1,352196	0,010092	0,010811	0,580732	1,0713
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	28,25	26,71	1,622632	0,859089	0,033633	0,089954	0,058473	2,6746
Nfkb2	Rn.204814	NM_001008349	30,38	28,28	1,404789	0,669801	0,007648	0,030297	0,061650	3,9614
Nfkbia	Rn.12550	XM_343065	26,29	23,86	0,283078	0,53454	0,130248	0,645579	0,130873	4,9565
Nlrc4	Rn.144882	XM_216640	29,83	28,68	1,510177	1,414602	0,011249	0,022908	0,042865	2,0364
Nos2	Rn.10400	NM_012611	35,00	32,97	0	1,773669	0,000312	0,001171	0,171725	3,7564
Pglyrp1	Rn.2834	NM_053373	33,33	33,71	1,580169	1,455243	0,000994	0,0007	0,288456	-1,4214
Pglyrp3	Rn.109236	XM_574982	35,00	34,04	0	1,102376	0,000312	0,000556	0,451680	1,7851
Ppbp	Rn.67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Prg2	Rn.10674	NM_031619	34,98	34,91	0,034641	0,150111	0,000316	0,000304	0,906050	-1,0381
Proc	Rn.91064	NM_012803	33,69	32,39	0,438444	1,022562	0,000775	0,001755	0,455376	2,2647
Ptafr	Rn.10137	NM_053321	28,20	26,90	1,299192	1,381316	0,034738	0,078491	0,073853	2,2595
Serpina1	Rn.1419	NM_022519	34,69	33,12	0,349333	1,108708	0,000387	0,001058	0,297195	2,7308
Serpine1	Rn.29368	NM_012620	29,82	28,09	1,071276	0,535195	0,011275	0,034403	0,111858	3,0511
Sftpd	Rn.11348	NM_012878	34,87	33,54	0,23094	1,184497	0,000342	0,000787	0,324871	2,3016
Stab1	Rn.144136	XM_214279	31,57	31,41	2,975618	2,191354	0,00336	0,003461	0,782259	1,03
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	28,21	27,12	1,651252	1,370985	0,034419	0,067545	0,023470	1,9625
Tlr1	Rn.107212	XM_223421	29,59	28,01	1,458869	1,386735	0,013255	0,036364	0,082786	2,7435
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	35,00	0	0	0,000312	0,000287	0,854958	-1,0872
Tlr2	Rn.46387	NM_198769	28,58	27,05	1,669022	1,45294	0,026756	0,071067	0,016156	2,6561
Tlr3	Rn.15273	NM_198791	29,99	29,34	1,992486	2,135564	0,010045	0,014465	0,360638	1,4399
Tlr4	Rn.14534	NM_019178	30,14	29,59	1,967714	1,890935	0,009053	0,01222	0,413921	1,3497
Tlr6	Rn.163249	NM_207604	31,00	30,06	1,596757	1,646856	0,005	0,008781	0,085248	1,7565

TABLA S1 (continuación)

1 HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn.92495	NM_198131	29,61	28,99	1,512955	1,947717	0,013042	0,018479	0,238671	1,4168
Tnf	Rn.2275	NM_012675	30,27	25,35	0,576108	0,165227	0,008273	0,230366	0,069139	27,8447
Tnfrsf1a	Rn.11119	NM_013091	27,33	26,89	1,626171	1,414072	0,063343	0,07922	0,108328	1,2506
Tollip	Rn.137040	XM_341961	29,10	28,48	1,863044	1,364197	0,018659	0,026254	0,195961	1,407
Traf6	Rn.220435	XM_230377	28,44	27,77	1,654479	1,260569	0,029414	0,043145	0,031657	1,4668
Trem1	Rn.86337	XM_217336	30,98	30,43	0,18735	0,8	0,005058	0,006811	0,925624	1,3466
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	21,64	21,86	0,894949	1,298627	3,285243	2,582318	0,283394	-1,2722
Hprt1	Rn.47	NM_012583	26,87	26,55	0,759013	1,080555	0,087333	0,100273	0,775066	1,1482
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	22,67	22,55	1,050968	1,321981	1,608817	1,60066	0,900810	-1,0051
Ldha	Rn.107896	NM_017025	24,06	24,22	2,325045	1,723727	0,613868	0,503013	0,505485	-1,2204
Actb	Rn.94978	NM_031144	21,53	20,97	1,721811	1,435131	3,529181	4,79656	0,136919	1,3591

Tabla S1. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 1 hora después de la infección.

TABLA S2

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2[^](-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	29,69	29,86	0,490306	1,330614	0,010148	0,019768	0,098907	1,948
C5	Rn.21259	XM_342421	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
C8a	Rn.105718	XM_233251	34,87	35,00	0,225167	0	0,00028	0,000559	0,227057	1,9982
Camp	Rn.33146	XM_236642	33,89	33,74	0,362261	1,461175	0,000551	0,001336	0,052456	2,4261
Casp1	Rn.37508	NM_012762	28,38	29,90	0,202073	2,372221	0,025219	0,019139	0,896314	-1,3177
Casp4	Rn.16195	NM_053736	27,00	27,50	0,235018	1,931217	0,065638	0,10125	0,283104	1,5426
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	27,33	24,86	2,667433	0,806866	0,052097	0,632586	0,003269	12,1426
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	32,15	34,20	0,403774	1,385641	0,001849	0,000974	0,091968	-1,8982
Cd14	Rn.42942	NM_021744	26,19	25,34	2,441154	1,991415	0,114546	0,45355	0,20563	3,9595
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	32,09	33,87	0,485009	1,951444	0,001918	0,001221	0,575019	-1,5706
Cd55	Rn.18841	NM_022269	32,49	33,93	0,684787	0,957566	0,001454	0,001177	0,973826	-1,2351
Cfp	Rn.204119	XM_216784	27,83	29,44	0,308275	2,397005	0,036923	0,026449	0,922945	-1,396
Chuk	Rn.23019	XM_219857	26,95	28,02	0,378021	1,09546	0,067796	0,070446	0,795475	1,0391
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	27,62	28,81	0,665157	2,23395	0,042512	0,040931	0,789971	-1,0386
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	30,95	32,16	0,798394	1,465617	0,004227	0,003996	0,699674	-1,058
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	29,17	31,42	0,28391	1,082466	0,014552	0,006704	0,010363	-2,1705
Cybb	Rn.98491	NM_023965	27,45	27,22	1,300461	2,253087	0,047939	0,122938	0,206917	2,5645
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Fn1	Rn.1604	NM_019143	29,06	31,62	1,407267	1,90014	0,015705	0,00581	0,357374	-2,7032
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	26,03	25,99	0,22053	1,361727	0,127981	0,288371	0,136583	2,2532
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	33,57	0	1,329148	0,000256	0,001504	0,295636	5,878
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	25,87	27,09	0,815046	1,899851	0,143322	0,134841	0,908004	-1,0629
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	28,31	29,16	0,20664	1,913775	0,026412	0,031966	0,443810	1,2103

TABLA S2 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkb	Rn.19222	NM_053355	28,38	28,95	0,800021	1,302165	0,025219	0,037146	0,403290	1,4729
II10	Rn.9868	NM_012854	31,35	31,95	0,448367	1,086385	0,003204	0,004643	0,391849	1,4493
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	29,72	31,28	0,478435	1,27597	0,009939	0,007371	0,539195	-1,3485
II1a	Rn.12300	NM_017019	30,39	26,72	3,148539	2,545866	0,006247	0,174262	0,108997	27,8963
II1b	Rn.9869	NM_031512	28,64	24,89	3,077862	1,835329	0,02106	0,616711	0,074350	29,2832
II1f10	Rn.84164	XM_342378	34,72	34,89	0,266896	0,190526	0,000311	0,000604	0,213920	1,939
II1f5	Rn.63170	XM_231101	32,73	32,79	0,525008	0,400042	0,001231	0,002582	0,238146	2,0975
II1f6	Rn.218666	XM_231099	34,86	35,00	0,242487	0	0,000282	0,000559	0,229772	1,9844
II1f8	Rn.137499	XM_342377	34,80	35,00	0,34641	0	0,000294	0,000559	0,249556	1,9035
II1f9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
II1r1	Rn.9758	NM_013123	30,99	33,00	1,133902	1,579884	0,004112	0,002232	0,419094	-1,8421
II1r2	Rn.10758	NM_053953	32,01	33,23	0,844768	0,859089	0,002028	0,001912	0,672564	-1,0604
II1rap	Rn.10511	NM_012968	29,62	31,52	0,560268	1,674823	0,010652	0,006255	0,583055	-1,7029
II1rap12	Rn.208232	XM_236512	33,24	33,66	0,137477	0,604511	0,000866	0,001419	0,205620	1,6381
II1r12	Rn.10235	NM_133575	33,78	34,47	0,380832	0,462853	0,000595	0,00081	0,320166	1,3616
II1rm	Rn.162640	NM_022194	27,89	27,00	2,644434	1,93539	0,035256	0,143521	0,223082	4,0709
II6	Rn.9873	NM_012589	32,79	28,23	2,15251	2,785145	0,001184	0,060903	0,192077	51,4584
Irak1	Rn.22238	XM_343844	27,19	28,37	0,612944	1,228061	0,057406	0,055271	0,952064	-1,0386
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	29,69	29,51	0,275923	1,621121	0,010125	0,02508	0,123196	2,4771
Irf1	Rn.6396	NM_012591	27,23	25,68	0,566657	2,481377	0,055836	0,358323	0,122257	6,4174
Lalba	Rn.10479	NM_012594	34,98	34,31	0,028868	1,195115	0,000259	0,000902	0,167355	3,487
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	32,22	33,91	0,50797	1,544323	0,001761	0,001193	0,449368	-1,4756
Lck	Rn.22791	XM_232763	32,39	32,98	0,606822	1,190588	0,001558	0,002269	0,255553	1,456
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	28,69	29,32	0,226495	1,489396	0,020296	0,028676	0,168959	1,4129
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	22,40	23,20	2,982119	3,755334	1,591808	1,98986	0,749889	1,2501
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	29,21	30,44	0,439356	0,860697	0,014121	0,013194	0,679574	-1,0703

TABLA S2 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	27,95	29,26	0,518845	1,053391	0,033898	0,029963	0,539760	-1,1313
Mif	Rn.2661	NM_031051	23,58	24,93	0,248462	0,732757	0,702547	0,602625	0,438090	-1,1658
Myd88	Rn.37341	NM_198130	28,05	28,56	0,135769	1,185636	0,031701	0,048675	0,128458	1,5355
Ncf4	Rn.46120	XM_576306	29,81	29,33	0,485009	1,046757	0,009316	0,028478	0,000717	3,0568
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	25,81	26,17	0,505206	2,044171	0,149754	0,255135	0,251959	1,7037
Nfkb2	Rn.204814	NM_001008349	27,94	27,36	0,601193	1,975281	0,034212	0,111311	0,134120	3,2535
Nfkbia	Rn.12550	XM_343065	25,42	23,62	0,941134	1,249053	0,195332	1,494159	0,001668	7,6493
Nlrc4	Rn.144882	XM_216640	28,97	29,09	0,459601	2,138504	0,016677	0,033633	0,271169	2,0167
Nos2	Rn.10400	NM_012611	32,01	27,45	2,590502	1,801675	0,002032	0,104579	0,048596	51,4584
Pglyrp1	Rn.2834	NM_053373	32,90	33,94	0,026458	0,980765	0,001097	0,001166	0,640024	1,0634
Pglyrp3	Rn.109236	XM_574982	34,58	34,94	0,561278	0,103923	0,000343	0,000583	0,302707	1,6998
Ppbp	Rn.67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Prg2	Rn.10674	NM_031619	35,00	35,00	0	0	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Proc	Rn.91064	NM_012803	32,95	33,46	0,726108	0,546016	0,001057	0,001623	0,340939	1,5355
Ptafr	Rn.10137	NM_053321	26,79	27,87	0,166433	2,173323	0,075747	0,078527	0,655471	1,0367
Serpina1	Rn.1419	NM_022519	33,60	34,17	0,461303	0,24379	0,000675	0,000997	0,375435	1,4763
Serpine1	Rn.29368	NM_012620	28,10	27,80	2,659154	1,574685	0,03055	0,082431	0,517062	2,6982
Sftpd	Rn.11348	NM_012878	34,21	34,81	0,68252	0,218251	0,000441	0,00064	0,409392	1,4493
Stab1	Rn.144136	XM_214279	30,80	33,11	0,520288	2,431193	0,004701	0,002073	0,436084	-2,2679
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	26,71	28,01	0,098489	1,980715	0,080066	0,070936	0,795659	-1,1287
Tlr1	Rn.107212	XM_223421	28,20	27,43	0,707696	1,997006	0,028439	0,106039	0,099851	3,7287
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	33,74	0	1,162196	0,000256	0,00134	0,000519	5,2367
Tlr2	Rn.46387	NM_198769	26,94	27,27	0,851136	2,058867	0,06811	0,118476	0,383060	1,7395
Tlr3	Rn.15273	NM_198791	29,45	31,52	0,91309	2,849427	0,011957	0,006255	0,844404	-1,9114
Tlr4	Rn.14534	NM_019178	29,54	31,34	1,002646	1,970211	0,01126	0,007087	0,574599	-1,5889
Tlr6	Rn.163249	NM_207604	30,13	30,93	0,26727	1,653491	0,007463	0,009416	0,444404	1,2617

TABLA S2 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn.92495	NM_198131	28,91	30,28	0,300721	1,94055	0,017466	0,014707	0,859972	-1,1876
Tnf	Rn.2275	NM_012675	29,34	26,44	1,769925	2,196429	0,012964	0,2111	0,119894	16,2834
Tnfrsf1a	Rn.11119	NM_013091	26,37	27,27	0,254231	1,432492	0,101578	0,118476	0,480302	1,1663
Tollip	Rn.137040	XM_341961	27,91	28,97	0,44658	1,093435	0,03477	0,03655	0,914405	1,0512
Traf6	Rn.220435	XM_230377	27,42	28,26	0,546839	1,121175	0,048833	0,05965	0,540750	1,2215
Trem1	Rn.86337	XM_217336	31,91	31,77	1,830738	3,139315	0,002178	0,005248	0,416209	2,4094
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	21,69	22,41	0,215716	1,155177	2,603887	3,456551	0,239095	1,3275
Hprt1	Rn.47	NM_012583	26,43	27,71	0,436616	1,269816	0,096991	0,087333	0,563451	-1,1106
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	22,32	23,17	0,075498	1,346192	1,678687	2,031671	0,320083	1,2103
Ldha	Rn.107896	NM_017025	24,21	25,28	0,076376	0,326241	0,451876	0,47063	0,684071	1,0415
Actb	Rn.94978	NM_031144	20,68	22,40	0,175594	1,769303	5,21982	3,464547	0,541550	-1,5066

Tabla S2. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 3 horas después de la infección.

TABLA S3

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	31,11	29,40	2,175554	1,759574	0,007802	0,017709	0,152646	2,2698
C5	Rn.21259	XM_342421	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
C8a	Rn.105718	XM_233251	34,49	34,77	0,889119	0,392598	0,000749	0,000427	0,388004	-1,7541
Camp	Rn.33146	XM_236642	34,21	32,37	0,744401	1,543578	0,000906	0,002265	0,305820	2,5013
Casp1	Rn.37508	NM_012762	30,57	28,90	2,88306	1,585129	0,011291	0,025103	0,131946	2,2232
Casp4	Rn.16195	NM_053736	28,43	25,54	2,239174	1,219932	0,049882	0,257742	0,005587	5,1670
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	31,58	23,24	2,964698	1,727146	0,005607	1,263419	0,003643	225,3463
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	33,23	34,40	1,580475	1,045004	0,001791	0,000555	0,045001	-3,2281
Cd14	Rn.42942	NM_021744	30,58	24,18	2,622461	2,068437	0,011239	0,661586	0,107506	58,8648
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	33,30	33,27	1,970685	1,343093	0,001706	0,001211	0,283362	-1,4083
Cd55	Rn.18841	NM_022269	32,49	32,40	1,522312	1,039279	0,002998	0,002214	0,784401	-1,3541
Cfp	Rn.204119	XM_216784	30,26	29,10	2,79611	2,297847	0,013998	0,021803	0,446479	1,5576
Chuk	Rn.23019	XM_219857	28,07	26,98	2,019538	1,197386	0,064168	0,094995	0,077788	1,4804
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	29,10	27,45	1,974867	1,562701	0,031351	0,068267	0,185705	2,1775
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	31,64	31,73	1,609441	0,854576	0,005391	0,003522	0,479828	-1,5305
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	30,48	31,56	2,230814	1,386879	0,012074	0,003953	0,001644	-3,0539
Cybb	Rn.98491	NM_023965	29,78	26,53	1,915994	1,498299	0,019614	0,129468	0,103739	6,6009
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
Fn1	Rn.1604	NM_019143	31,75	29,86	2,425909	1,106451	0,005006	0,012845	0,052181	2,5657
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	27,37	25,91	2,200273	1,880931	0,104001	0,198976	0,068726	1,9132
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	35,00	35,00	0,005774	0	0,000526	0,000365	0,556036	-1,4413
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	31,66	0	0,47571	0,000525	0,003697	0,231197	7,0421
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	27,27	27,65	2,437601	1,798119	0,111465	0,059705	0,154894	-1,8669
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	30,24	27,76	2,263854	1,654479	0,014259	0,055194	0,039194	3,8709

TABLA S3 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkb	Rn.19222	NM_053355	29,90	28,14	2,286854	0,975346	0,018007	0,042413	0,051747	2,3554
II10	Rn.9868	NM_012854	31,47	32,01	1,870722	1,523625	0,006065	0,002894	0,260114	-2,0956
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	30,96	31,93	2,049415	2,005094	0,008637	0,003066	0,959382	-2,8167
II1a	Rn.12300	NM_017019	34,14	24,89	0,832006	1,916046	0,000955	0,404441	0,014772	423,436
II1b	Rn.9869	NM_031512	33,53	23,62	1,349679	2,283689	0,001458	0,975355	0,025274	669,0638
II1f10	Rn.84164	XM_342378	34,65	35,00	0,600444	0	0,000668	0,000365	0,450723	-1,8285
II1f5	Rn.63170	XM_231101	32,89	33,65	1,65784	1,276923	0,002272	0,000929	0,305105	-2,4464
II1f6	Rn.218666	XM_231099	34,40	34,85	1,03923	0,265581	0,000796	0,000406	0,342286	-1,9597
II1f8	Rn.137499	XM_342377	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
II1f9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
II1r1	Rn.9758	NM_013123	33,00	30,77	1,807106	1,633595	0,002095	0,006836	0,001412	3,2625
II1r2	Rn.10758	NM_053953	32,95	33,16	1,448804	1,890749	0,002179	0,001304	0,243566	-1,6709
II1rap	Rn.10511	NM_012968	30,61	29,26	2,819858	1,492861	0,011008	0,019559	0,129158	1,7769
II1rap12	Rn.208232	XM_236512	33,46	33,54	0,932166	0,555008	0,001523	0,001007	0,581287	-1,5129
II1r12	Rn.10235	NM_133575	34,01	34,54	1,230623	0,660782	0,001045	0,000503	0,250398	-2,0763
II1rm	Rn.162640	NM_022194	31,93	26,40	2,128168	1,802526	0,004409	0,141676	0,215262	32,1334
II6	Rn.9873	NM_012589	34,83	25,61	0,300222	0,407308	0,000592	0,244968	0,086703	413,7647
Irak1	Rn.22238	XM_343844	28,11	27,38	2,094214	1,177412	0,062413	0,071827	0,428259	1,1508
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	31,88	28,20	2,63109	1,188991	0,004575	0,040686	0,021244	8,8931
Irf1	Rn.6396	NM_012591	29,46	24,27	2,106213	0,983616	0,024484	0,62014	0,011982	25,3281
Lalba	Rn.10479	NM_012594	34,83	34,74	0,300222	0,450333	0,000592	0,000437	0,552094	-1,3541
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	33,32	32,87	1,503729	1,44611	0,001682	0,001595	0,953970	-1,0551
Lck	Rn.22791	XM_232763	33,39	32,57	1,504427	0,609289	0,001603	0,001972	0,501413	1,2306
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	30,36	29,28	2,09271	1,255538	0,013121	0,019246	0,197408	1,4668
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	25,67	23,67	1,567206	2,188858	0,33712	0,939957	0,357209	2,7882
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	30,27	29,77	2,477183	1,357584	0,013901	0,013672	0,856684	-1,0168

TABLA S3 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	29,16	28,40	2,075219	1,185425	0,030005	0,035501	0,355051	1,1832
Mif	Rn.2661	NM_031051	24,23	24,03	2,053444	1,580854	0,918913	0,717309	0,205308	-1,2811
Myd88	Rn.37341	NM_198130	29,55	27,83	2,432098	1,440498	0,02295	0,052702	0,002350	2,2963
Ncf4	Rn.46120	XM_576306	31,22	28,46	2,805405	2,16611	0,007212	0,033898	0,057494	4,7002
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	28,87	24,67	2,504057	1,49527	0,03677	0,468894	0,008003	12,7521
Nfkb2	Rn.204814	NM_001008349	30,68	25,94	2,00565	1,006048	0,010462	0,195332	0,013925	18,6702
Nfkbia	Rn.12550	XM_343065	27,89	23,02	2,26073	1,636123	0,072527	1,474951	0,000926	20,3365
Nlrc4	Rn.144882	XM_216640	31,21	28,58	2,261445	1,524238	0,007246	0,031264	0,130779	4,3149
Nos2	Rn.10400	NM_012611	35,00	25,73	0	1,03732	0,000525	0,225938	0,096435	430,3401
Pglyrp1	Rn.2834	NM_053373	33,82	33,70	1,205999	0,353836	0,001187	0,000899	0,711629	-1,3201
Pglyrp3	Rn.109236	XM_574982	34,32	34,80	1,177795	0,340637	0,000841	0,000418	0,305964	-2,0102
Ppbp	Rn.67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
Prg2	Rn.10674	NM_031619	35,00	35,00	0	0	0,000525	0,000365	0,556774	-1,4379
Proc	Rn.91064	NM_012803	32,91	33,69	1,73079	1,585129	0,00224	0,000903	0,217114	-2,4806
Ptafr	Rn.10137	NM_053321	29,25	27,30	2,30899	1,926197	0,028321	0,076098	0,192919	2,6870
Serpina1	Rn.1419	NM_022519	33,79	34,33	1,359755	0,743572	0,001212	0,000581	0,282300	-2,0859
Serpine1	Rn.29368	NM_012620	31,36	25,41	1,575532	0,872028	0,006545	0,280745	0,034145	42,8929
Sftpd	Rn.11348	NM_012878	34,03	34,65	1,26259	0,606218	0,001031	0,000465	0,241840	-2,2150
Stab1	Rn.144136	XM_214279	33,00	32,62	1,980412	1,288526	0,002105	0,001901	0,758904	-1,1075
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	28,74	27,31	2,555902	1,566174	0,04033	0,075398	0,174875	1,8695
Tlr1	Rn.107212	XM_223421	31,06	27,24	2,404766	1,788044	0,008058	0,079146	0,100030	9,8219
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	34,05	0	0,82203	0,000525	0,000704	0,785085	1,3404
Tlr2	Rn.46387	NM_198769	30,10	26,24	2,408492	1,545973	0,015639	0,157927	0,043767	10,0983
Tlr3	Rn.15273	NM_198791	30,29	30,62	2,270073	1,471643	0,013773	0,007585	0,058493	-1,8159
Tlr4	Rn.14534	NM_019178	30,42	30,04	2,422168	1,57513	0,012557	0,011391	0,586864	-1,1024
Tlr6	Rn.163249	NM_207604	31,80	30,49	2,204027	1,81023	0,004836	0,0083	0,04219	1,7163

TABLA S3 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn.92495	NM_198131	30,77	31,14	2,329514	1,582056	0,009829	0,005302	0,125396	-1,8538
Tnf	Rn.2275	NM_012675	32,93	25,51	2,012991	1,139605	0,00221	0,26255	0,004181	118,8227
Tnfrsf1a	Rn.11119	NM_013091	27,74	26,33	2,081762	1,432981	0,08066	0,148376	0,003303	1,8395
Tollip	Rn.137040	XM_341961	28,91	28,08	2,22599	1,21396	0,035847	0,044215	0,247460	1,2334
Traf6	Rn.220435	XM_230377	28,57	27,05	2,11079	1,081866	0,045374	0,090079	0,063655	1,9853
Trem1	Rn.86337	XM_217336	33,39	31,41	1,399476	1,236986	0,001606	0,004407	0,218144	2,7435
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	22,56	22,20	2,007619	1,631237	2,924115	2,60991	0,210972	-1,1204
Hprt1	Rn.47	NM_012583	27,29	26,88	1,867735	1,13782	0,109677	0,101344	0,726545	-1,0822
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	23,49	23,28	2,267796	1,790084	1,531204	1,231713	0,192138	-1,2431
Ldha	Rn.107896	NM_017025	24,99	24,29	2,06505	1,671496	0,542615	0,611603	0,578341	1,1271
Actb	Rn.94978	NM_031144	22,20	21,25	2,371757	1,783741	3,752885	5,018768	0,222062	1,3373

Tabla S3. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 5 horas después de la infección.

TABLA S4

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	31,44	29,15	1,535752	0,675154	0,004522	0,020418	0,004399	4,5148
C5	Rn.21259	XM_342421	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
C8a	Rn.105718	XM_233251	34,54	34,27	0,802517	0,664605	0,00053	0,000586	0,733984	1,1055
Camp	Rn.33146	XM_236642	34,89	33,15	0,105357	0,312143	0,000415	0,00127	0,041521	3,0624
Casp1	Rn.37508	NM_012762	29,71	28,10	0,724523	1,016514	0,015002	0,042179	0,016774	2,8115
Casp4	Rn.16195	NM_053736	27,98	25,62	0,79877	0,384361	0,049767	0,23586	0,147350	4,7393
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	29,95	22,39	4,66275	0,681469	0,012703	2,207888	0,001198	173,8059
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	33,38	33,81	0,888313	1,243436	0,001181	0,000804	0,618867	-1,4695
Cd14	Rn.42942	NM_021744	28,77	24,23	2,536382	1,197177	0,028916	0,615288	0,012524	21,2786
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	33,55	33,98	0,552298	0,666858	0,001048	0,000716	0,249679	-1,4627
Cd55	Rn.18841	NM_022269	33,12	33,14	1,633595	0,919366	0,001411	0,001285	0,479807	-1,0983
Cfp	Rn.204119	XM_216784	29,90	29,98	0,270986	1,172192	0,013151	0,011486	0,676610	-1,1450
Chuk	Rn.23019	XM_219857	28,17	27,69	0,536315	0,383536	0,043626	0,056043	0,478070	1,2846
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	28,92	27,78	0,831445	1,001798	0,026	0,052653	0,135253	2,0251
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	32,41	32,14	1,669621	0,547205	0,002319	0,002558	0,983985	1,1029
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	30,09	30,42	0,883572	1,60126	0,011555	0,008428	0,503054	-1,3711
Cybb	Rn.98491	NM_023965	29,30	26,76	0,310483	1,010149	0,01998	0,106777	0,001170	5,3443
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
Fn1	Rn.1604	NM_019143	31,31	30,66	0,10583	0,84006	0,00496	0,007153	0,147047	1,4419
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	27,96	25,69	0,711407	0,49339	0,050578	0,223653	0,008041	4,4219
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	34,87	35,00	0,219393	0	0,00042	0,000353	0,822835	-1,1881
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	32,48	0	0,822456	0,000384	0,002021	0,177908	5,2586
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	27,16	26,99	0,425088	1,44244	0,088062	0,091252	0,732653	1,0362
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	29,99	28,89	0,070238	0,659571	0,012356	0,02445	0,034855	1,9789

TABLA S4 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkb	Rn.19222	NM_053355	29,66	29,40	1,030873	0,74054	0,015567	0,01713	0,878067	1,1004
II10	Rn.9868	NM_012854	31,11	30,55	1,380193	1,51575	0,005685	0,007737	0,594094	1,3609
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	30,86	31,17	1,85696	0,749867	0,006776	0,005023	0,440024	-1,3491
II1a	Rn.12300	NM_017019	33,47	25,98	2,411618	0,583866	0,00111	0,183349	0,030884	165,192
II1b	Rn.9869	NM_031512	32,65	24,89	2,30163	0,29023	0,001959	0,389402	0,013582	198,7301
II1f10	Rn.84164	XM_342378	35,00	34,69	0	0,534072	0,000384	0,000439	0,613816	1,1418
II1f5	Rn.63170	XM_231101	32,82	32,85	1,03732	0,900722	0,001746	0,001567	0,667351	-1,1137
II1f6	Rn.218666	XM_231099	34,44	34,42	0,975722	0,505404	0,000568	0,000529	0,730487	-1,0733
II1f8	Rn.137499	XM_342377	35,00	34,06	0	0,811316	0,000384	0,000676	0,065337	1,7589
II1f9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
II1r1	Rn.9758	NM_013123	32,90	31,58	0,815741	0,774683	0,001644	0,003771	0,041489	2,2942
II1r2	Rn.10758	NM_053953	33,06	31,62	1,420845	1,132004	0,001475	0,003685	0,093641	2,499
II1rap	Rn.10511	NM_012968	31,59	30,16	0,40612	1,062262	0,004076	0,010115	0,159039	2,4817
II1rap12	Rn.208232	XM_236512	33,05	33,29	0,993042	0,445009	0,001482	0,001158	0,567227	-1,2793
II1r12	Rn.10235	NM_133575	33,36	33,63	1,275265	0,652253	0,001198	0,000911	0,394933	-1,3152
II1rn	Rn.162640	NM_022194	30,97	26,14	1,404789	1,528441	0,006293	0,163724	0,022210	26,0161
II6	Rn.9873	NM_012589	34,69	27,40	0,536936	0,897051	0,000476	0,06852	0,166350	143,808
Irak1	Rn.22238	XM_343844	28,23	28,39	0,595343	0,63	0,042043	0,034498	0,710286	-1,2187
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	31,92	29,59	0,529182	0,606163	0,003258	0,014982	0,176314	4,5985
Irf1	Rn.6396	NM_012591	29,12	26,25	0,750355	1,138083	0,022687	0,152407	0,274709	6,7179
Lalba	Rn.10479	NM_012594	35,00	34,68	0	0,42332	0,000384	0,000441	0,570246	1,1471
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	34,25	32,75	0,722311	0,330454	0,00648	0,00168	0,094552	2,5931
Lck	Rn.22791	XM_232763	32,84	32,55	0,513939	1,366345	0,001714	0,00193	0,578243	1,1261
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	29,93	28,85	0,716263	1,12	0,012881	0,02508	0,136294	1,9471
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	24,41	22,15	2,795067	2,939461	0,592409	2,613531	0,434743	4,4117
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	29,94	30,35	0,630106	0,686464	0,012792	0,008847	0,288396	-1,4459

TABLA S4 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn,4090	XM_341399	28,88	29,02	1,282199	0,393743	0,026793	0,022241	0,502860	-1,2047
Mif	Rn,2661	NM_031051	23,79	24,03	0,52	0,632218	0,910459	0,708415	0,081356	-1,2852
Myd88	Rn,37341	NM_198130	29,24	27,99	0,508167	0,667633	0,020876	0,045626	0,029447	2,1856
Ncf4	Rn,46120	XM_576306	30,93	29,32	0,988551	0,41509	0,00644	0,018107	0,127572	2,8115
Nfkb1	Rn,2411	XM_342346	28,68	27,17	0,596853	0,903567	0,030635	0,080548	0,237751	2,6293
Nfkb2	Rn,204814	NM_001008349	30,46	27,78	0,391067	1,449563	0,00892	0,052532	0,242617	5,8889
Nfkbia	Rn,12550	XM_343065	27,10	23,65	1,092581	0,24	0,092014	0,92189	0,05069	10,019
Nlrc4	Rn,144882	XM_216640	30,95	29,23	0,37	0,920018	0,006366	0,019317	0,001686	3,0342
Nos2	Rn,10400	NM_012611	34,55	25,56	0,785196	0,801332	0,000526	0,244742	0,044269	465,0794
Pglyrp1	Rn,2834	NM_053373	33,60	33,56	1,296765	0,41328	0,001014	0,000958	0,644231	-1,0585
Pglyrp3	Rn,109236	XM_574982	34,22	34,08	1,351	0,940868	0,00066	0,000667	0,761915	1,0102
Ppbp	Rn,67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
Prg2	Rn,10674	NM_031619	35,00	35,00	0	0	0,000384	0,000353	0,982575	-1,0882
Proc	Rn,91064	NM_012803	32,91	32,43	1,09052	1,072583	0,001633	0,002092	0,58124	1,2816
Ptafr	Rn,10137	NM_053321	29,04	28,07	0,318957	0,685055	0,02398	0,043065	0,00271	1,7958
Serpina1	Rn,1419	NM_022519	33,41	33,52	0,982395	0,976183	0,001157	0,000987	0,606984	-1,1718
Serpine1	Rn,29368	NM_012620	29,95	23,20	3,349662	1,134255	0,012703	1,262252	0,005086	99,3651
Sftpd	Rn,11348	NM_012878	33,81	33,94	1,413164	1,040785	0,000875	0,000738	0,550607	-1,1854
Stab1	Rn,144136	XM_214279	33,17	33,29	0,308599	1,573573	0,001363	0,001153	0,708016	-1,1826
Tgfb1	Rn,40136	NM_021578	28,73	28,51	0,28006	0,828191	0,029592	0,031745	0,701857	1,0728
Tlr1	Rn,107212	XM_223421	30,31	27,91	0,974389	1,18292	0,009898	0,048116	0,009118	4,8613
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	34,66	0	0,583124	0,000384	0,000446	0,572339	1,1604
Tlr2	Rn,46387	NM_198769	29,64	27,34	0,477912	0,773822	0,015785	0,07143	0,0029	4,5253
Tlr3	Rn,15273	NM_198791	30,56	29,63	0,57735	0,483356	0,008323	0,014572	0,046905	1,7508
Tlr4	Rn,14534	NM_019178	30,32	29,60	0,298161	0,524436	0,009852	0,014878	0,044008	1,5101
Tlr6	Rn,163249	NM_207604	31,65	31,07	0,398372	1,1241	0,003919	0,005383	0,140807	1,3736

TABLA S4 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ^{-Avg.(Delta(Ct))}		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn,92495	NM_198131	30,33	30,55	0,298664	1,57477	0,009784	0,007719	0,580756	-1,2675
Tnf	Rn,2275	NM_012675	32,21	28,53	1,808157	0,606658	0,002652	0,031236	0,180425	11,7778
Tnfrsf1a	Rn,11119	NM_013091	27,65	27,42	0,269629	0,664254	0,062702	0,067733	0,631631	1,0802
Tollip	Rn,137040	XM_341961	28,91	29,02	1,576113	0,825247	0,026121	0,022344	0,577193	-1,1690
Traf6	Rn,220435	XM_230377	28,49	28,13	0,723809	0,434856	0,035028	0,041311	0,694899	1,1794
Trem1	Rn,86337	XM_217336	32,99	29,34	3,295456	1,81299	0,001544	0,017899	0,270110	11,5889
Rplp1	Rn,973	NM_001007604	22,19	22,27	0,411866	0,802143	2,753627	2,393851	0,251523	-1,1503
Hprt1	Rn,47	NM_012583	26,47	26,61	0,788057	0,670249	0,141741	0,11875	0,381845	-1,1936
Rpl13a	Rn,92211	NM_173340	23,28	23,11	0,59079	1,002397	1,293548	1,340403	0,936799	1,0362
Ldha	Rn,107896	NM_017025	24,58	24,50	0,600999	0,793494	0,526559	0,51027	0,799673	-1,0319
Actb	Rn,94978	NM_031144	21,74	21,17	0,468224	0,808764	3,761566	5,143201	0,152754	1,3673

Tabla S4. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 12 horas después de la infección,

TABLA S5

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	30,61	30,03	0,686027	0,995707	0,008514	0,012499	0,005108	1,4682
C5	Rn.21259	XM_342421	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
C8a	Rn.105718	XM_233251	33,86	34,58	1,026207	0,45299	0,000897	0,000532	0,375641	-1,6849
Camp	Rn.33146	XM_236642	34,29	33,28	0,631295	0,731186	0,000667	0,001314	0,011793	1,9688
Casp1	Rn.37508	NM_012762	29,37	28,35	1,200181	1,554445	0,020109	0,039959	0,182429	1,9871
Casp4	Rn.16195	NM_053736	27,56	26,62	0,668306	0,743326	0,070511	0,132862	0,282945	1,8843
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	30,84	24,40	2,751951	1,283212	0,007293	0,618995	0,001858	84,8789
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	32,05	34,43	1,850468	0,506853	0,003138	0,000591	0,240196	-5,3123
Cd14	Rn.42942	NM_021744	29,08	25,09	1,220014	0,955528	0,024586	0,381918	0,000263	15,5337
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	33,04	33,52	1,327303	1,34143	0,001587	0,001107	0,376796	-1,4333
Cd55	Rn.18841	NM_022269	33,06	33,06	0,886059	0,477598	0,001562	0,001527	0,852529	-1,0229
Cfp	Rn.204119	XM_216784	29,61	30,24	1,71	1,987595	0,017067	0,010756	0,477344	-1,5867
Chuk	Rn.23019	XM_219857	27,63	27,89	0,315647	0,698665	0,067483	0,054839	0,267242	-1,2306
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	28,23	27,65	0,910439	1,232234	0,044419	0,064914	0,260069	1,4614
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	32,40	32,47	1,680833	0,446132	0,002468	0,002293	0,66591	-1,0762
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	29,52	30,64	1,024028	1,690799	0,018123	0,008171	0,334155	-2,2181
Cybb	Rn.98491	NM_023965	28,77	26,23	1,281718	1,602529	0,03055	0,1737	0,026295	5,6857
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
Fn1	Rn.1604	NM_019143	31,93	30,02	0,430155	1,585318	0,00341	0,012528	0,033277	3,6739
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	27,14	26,35	0,635925	0,835125	0,094557	0,160206	0,394246	1,6943
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	34,61	35,00	0,474271	0	0,000535	0,000398	0,666461	-1,3435
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	34,70	0	0,513842	0,000407	0,000489	0,544268	1,2008
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	26,59	26,90	1,445234	1,537834	0,13844	0,109424	0,513335	-1,2652
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	29,55	29,00	0,553655	0,67951	0,017833	0,025524	0,119114	1,4313

TABLA S5 (continuación)

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkb	Rn.19222	NM_053355	28,98	29,01	0,632376	0,483839	0,026412	0,025289	0,908254	-1,0444
II10	Rn.9868	NM_012854	30,58	31,14	1,670459	1,681022	0,008693	0,005791	0,354496	-1,5011
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	30,79	30,90	1,225003	0,536874	0,00755	0,006807	0,658226	-1,1091
II1a	Rn.12300	NM_017019	32,53	28,38	1,86827	1,047107	0,00226	0,039227	0,015548	17,3556
II1b	Rn.9869	NM_031512	32,34	26,84	2,465083	1,52218	0,002566	0,113545	0,024247	44,2417
II1f10	Rn.84164	XM_342378	33,96	34,66	0,932094	0,504777	0,000837	0,000504	0,390275	-1,6617
II1f5	Rn.63170	XM_231101	32,09	32,93	1,448355	0,940709	0,003052	0,001675	0,293635	-1,8226
II1f6	Rn.218666	XM_231099	34,00	35,00	0,880682	0	0,000814	0,000398	0,330508	-2,0458
II1f8	Rn.137499	XM_342377	34,89	34,36	0,190526	0,558241	0,000439	0,000621	0,206672	1,4149
II1f9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
II1r1	Rn.9758	NM_013123	33,22	31,65	0,985343	1,311272	0,001398	0,004048	0,022877	2,8959
II1r2	Rn.10758	NM_053953	33,76	31,84	1,517443	1,939313	0,000959	0,003548	0,106187	3,6995
II1rap	Rn.10511	NM_012968	30,50	30,58	0,926301	1,105637	0,009188	0,008537	0,672574	-1,0762
II1rap12	Rn.208232	XM_236512	32,82	33,39	0,249867	0,228546	0,00184	0,001217	0,355414	-1,5115
II1r12	Rn.10235	NM_133575	33,15	33,63	0,806866	0,61037	0,001464	0,001031	0,281474	-1,4201
II1rm	Rn.162640	NM_022194	30,47	26,87	1,322132	1,561805	0,009425	0,111208	0,011967	11,7996
II6	Rn.9873	NM_012589	33,79	30,15	2,095781	0,718146	0,000942	0,011449	0,058149	12,1594
Irak1	Rn.22238	XM_343844	27,78	28,33	0,574195	0,48645	0,060679	0,040423	0,287523	-1,5011
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	30,71	30,18	0,522526	0,227156	0,007944	0,011239	0,605499	1,4149
Irf1	Rn.6396	NM_012591	28,52	26,97	0,288444	0,32909	0,036331	0,104001	0,200882	2,8626
Lalba	Rn.10479	NM_012594	34,59	35,00	0,611583	0	0,00054	0,00398	0,633201	-1,3568
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	33,86	31,75	1,216977	0,55908	0,000895	0,003794	0,027838	4,2398
Lck	Rn.22791	XM_232763	32,58	32,09	0,596518	0,790021	0,002173	0,002998	0,100291	1,3794
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	29,55	29,05	0,817088	1,292182	0,01775	0,024541	0,248904	1,3826
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	22,78	21,55	2,515956	3,070413	1,946209	4,462957	0,386722	2,2932
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	29,82	29,83	0,47648	0,582266	0,014721	0,014358	0,949693	-1,0253

TABLA S5 (continuación)

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	28,56	29,01	0,548847	0,707413	0,035419	0,025231	0,10899	-1,4038
Mif	Rn.2661	NM_031051	24,23	24,63	0,742765	0,975107	0,71071	0,525344	0,252401	-1,3528
Myd88	Rn.37341	NM_198130	29,02	28,27	0,955667	1,091604	0,02569	0,042237	0,048562	1,6441
Ncf4	Rn.46120	XM_576306	31,17	29,56	0,715984	0,539259	0,005802	0,017273	0,024762	2,9773
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	28,11	27,05	0,558957	0,81267	0,048161	0,098618	0,010442	2,0477
Nfkb2	Rn.204814	NM_001008349	29,93	28,08	0,330051	0,213776	0,013703	0,048183	0,089489	3,5162
Nfkbia	Rn.12550	XM_343065	26,66	27,93	1,080185	6,12895	0,131883	0,053586	0,630931	-2,4612
Nlrc4	Rn.144882	XM_216640	30,29	29,06	1,147054	1,167733	0,010628	0,024428	0,022994	2,2985
Nos2	Rn.10400	NM_012611	34,87	26,46	0,225167	0,72037	0,000445	0,147761	0,000697	331,7609
Pglyrp1	Rn.2834	NM_053373	33,05	33,60	0,372693	0,44658	0,001573	0,001048	0,296818	-1,5011
Pglyrp3	Rn.109236	XM_574982	33,51	34,36	1,287841	0,635059	0,001141	0,00062	0,269676	-1,8395
Ppbp	Rn.67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000407	0,000398	0,839738	-1,0229
Prg2	Rn.10674	NM_031619	34,80	34,94	0,340637	0,103923	0,000466	0,000415	0,968256	-1,1245
Proc	Rn.91064	NM_012803	32,03	33,23	1,599292	1,225275	0,003182	0,001357	0,231403	-2,3446
Ptafr	Rn.10137	NM_053321	28,74	28,27	1,317662	1,185341	0,03112	0,04214	0,564494	1,3541
Serpina1	Rn.1419	NM_022519	32,81	34,01	1,377691	0,956574	0,001861	0,000788	0,164348	-2,3609
Serpine1	Rn.29368	NM_012620	29,53	23,49	2,360706	0,995138	0,018082	1,160436	0,000626	64,1777
Sftpd	Rn.11348	NM_012878	33,25	34,21	1,488568	0,973721	0,001366	0,00069	0,254414	-1,9807
Stab1	Rn.144136	XM_214279	32,68	32,79	1,42095	1,746797	0,002032	0,001841	0,807416	-1,1039
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	28,93	28,40	1,516784	0,848842	0,027407	0,038509	0,568206	1,4051
Tlr1	Rn.107212	XM_223421	30,34	27,81	1,439317	1,33949	0,010266	0,057965	0,009181	5,6464
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	34,87	0	0,23094	0,000407	0,000436	0,735089	1,0723
Tlr2	Rn.46387	NM_198769	28,83	27,50	1,426336	1,532068	0,029238	0,07186	0,139478	2,4577
Tlr3	Rn.15273	NM_198791	30,48	30,64	1,345821	1,610041	0,009316	0,00819	0,781775	-1,1376
Tlr4	Rn.14534	NM_019178	30,33	29,59	1,551848	1,508156	0,010337	0,016879	0,399459	1,6328
Tlr6	Rn.163249	NM_207604	31,38	30,87	1,322838	1,576779	0,005004	0,006951	0,493152	1,3891

TABLA S5 (continuación)

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn.92495	NM_198131	29,66	29,93	1,233045	1,869661	0,016485	0,013335	0,67255	-1,2363
Tnf	Rn.2275	NM_012675	32,39	30,05	1,51596	0,433474	0,002491	0,012299	0,089145	4,9383
Tnfrsf1a	Rn.11119	NM_013091	27,64	27,44	0,56359	0,580775	0,067017	0,075085	0,635506	1,1204
Tollip	Rn.137040	XM_341961	28,44	28,58	0,576223	0,682862	0,038491	0,03407	0,575974	-1,1297
Traf6	Rn.220435	XM_230377	28,01	28,36	0,575587	0,647019	0,051737	0,039775	0,366403	-1,3007
Trem1	Rn.86337	XM_217336	33,08	30,49	1,036774	1,565642	0,00154	0,009045	0,059379	5,8726
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	22,15	22,63	0,344287	1,114645	3,011885	2,111107	0,021541	-1,4267
Hprt1	Rn.47	NM_012583	26,71	26,90	0,425676	1,001449	0,127391	0,109171	0,026471	-1,1669
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	22,94	23,27	0,452806	1,071883	1,733875	1,354725	0,200157	-1,2799
Ldha	Rn.107896	NM_017025	25,13	24,26	0,95268	0,650922	0,38086	0,6805	0,0953	1,7867
Actb	Rn.94978	NM_031144	21,76	21,47	0,558062	1,031552	3,946754	4,706539	0,059216	1,1925

Tabla S5. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 24 horas después de la infección.

TABLA S6

1 HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ccl2*	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	29,54	25,74	0,013722	0,175393	0,312850	12,7816
Cd14**	Molécula CD14	28,23	25,80	0,034023	0,168638	0,141793	4,9565
Il10**	Interleucina 10	32,36	30,90	0,001948	0,004928	0,431363	2,5303
Il1a**	Interleucina 1 alfa	31,64	25,77	0,003193	0,17258	0,122611	54,0417
Il1b**	Interleucina 1 beta	29,89	24,02	0,010791	0,579146	0,098563	53,6684
Il1f5*	Familia de las interleucinas 1, miembro 5 (delta)	33,57	32,44	0,00084	0,001687	0,309074	2,0083
Il1r1***	Receptor de interleucinas 1, tipo I	33,91	32,43	0,000662	0,001707	0,039436	2,5775
Il1rn**	Antagonista del receptor de interleucinas 1	29,54	27,38	0,013691	0,056276	0,193323	4,1106
Il6**	Interleucina 6	34,45	30,27	0,000455	0,007592	0,136819	16,6717
Irak2***	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	30,67	29,49	0,006284	0,013036	0,028483	2,0744
Irf1**	Factor regulador de interferón 1	28,41	26,01	0,030032	0,146131	0,054193	4,8658
Nfkb1*	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	28,25	26,71	0,033633	0,089954	0,058473	2,6746
Nfkb2**	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	30,38	28,28	0,007648	0,030297	0,061650	3,9614
Nfkbia**	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	26,29	23,86	0,130248	0,645579	0,130873	4,9565
Nlrc4***	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	29,83	28,68	0,011249	0,022908	0,042865	2,0364
Nos2*	Oxido nítrico sintasa inducible 2	35,00	32,97	0,000312	0,001171	0,171725	3,7564
Proc**	Proteína C	33,69	32,39	0,000775	0,001755	0,455376	2,2647
Ptafr*	Receptor del factor pro-plaquetas	28,20	26,90	0,034738	0,078491	0,073853	2,2595
Serpina1**	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	34,69	33,12	0,000387	0,001058	0,297195	2,7308
Serpine1**	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	29,82	28,09	0,011275	0,034403	0,111858	3,0511
Sftpd**	Proteína surfactante D	34,87	33,54	0,000342	0,000787	0,324871	2,3016

TABLA S6 (continuación)

1 HORA DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr1*	Receptor tipo Toll 1	29,59	28,01	0,013255	0,036364	0,082786	2,7435
Tlr2***	Receptor tipo Toll 2	28,58	27,05	0,026756	0,071067	0,016156	2,6561
Tnf**	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	30,27	25,35	0,008273	0,230366	0,069139	27,8447

*** Genes sobreexpresados en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes regulados > de 2 veces.

Tabla S6. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 1 h después de la infección.

TABLA S7

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2^Δ(-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
C5*	Componente 5 del complemento	35,00	35,00	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Camp*	Péptido antimicrobiano catelicidina	33,89	33,74	0,000551	0,001336	0,052456	2,4261
Ccl2***	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	27,33	24,86	0,052097	0,632586	0,003269	12,1426
Cd14*	Molécula CD14	26,19	25,34	0,114546	0,45355	0,20563	3,9595
Cxcr4***	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)	29,17	31,42	0,014552	0,006704	0,010363	-2,1705
Cybb*	Citocromo b-245, polipéptido beta	27,45	27,22	0,047939	0,122938	0,206917	2,5645
Fn1*	Fibronectina 1	29,06	31,62	0,015705	0,00581	0,357374	-2,7032
Hmox1*	Hemo oxigenasa (decycling) 1	26,03	25,99	0,127981	0,288371	0,136583	2,2532
Ifna1*	Interferón-alfa 1	35,00	35,00	0,000256	0,000559	0,200219	2,1866
Il1a*	Interleucina 1 alfa	30,39	26,72	0,006247	0,174262	0,108997	27,8963
Il1b**	Interleucina 1 beta	28,64	24,89	0,02106	0,616711	0,074350	29,2832
Il1f5*	Familia de las interleucinas 1, miembro 5 (delta)	32,73	32,79	0,001231	0,002582	0,238146	2,0975
Il1rn*	Antagonista del receptor de interleucinas 1	27,89	27,00	0,035256	0,143521	0,223082	4,0709
Il6*	Interleucina 6	32,79	28,23	0,001184	0,060903	0,192077	51,4584
Irak2*	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	29,69	29,51	0,010125	0,02508	0,123196	2,4771
Irf1*	Factor regulador de interferón 1	27,23	25,68	0,055836	0,358323	0,122257	6,4174
Lalba*	Lactalbúmina, alfa	34,98	34,31	0,000259	0,000902	0,167355	3,487
Ncf4***	Factor citosólico 4 de neutrófilos	29,81	29,33	0,009316	0,028478	0,000717	3,0568
Nfkb2*	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	27,94	27,36	0,034212	0,111311	0,134120	3,2535
Nfkbia***	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	25,42	23,62	0,195332	1,494159	0,001668	7,6493
Nlrc4*	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	28,97	29,09	0,016677	0,033633	0,271169	2,0167
Nos2***	Oxido nítrico sintasa inducible 2	32,01	27,45	0,002032	0,104579	0,048596	51,4584
Serpine1*	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	28,10	27,80	0,03055	0,082431	0,517062	2,6982

TABLA S7 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Stab1*	Estabilina 1	30,80	33,11	0,004701	0,002073	0,436084	-2,2679
Tlr1*	Receptor tipo Toll 1	28,20	27,43	0,028439	0,106039	0,099851	3,7287
Tlr10***	Receptor tipo Toll 10	35,00	33,74	0,000256	0,00134	0,000519	5,2367
Tnf**	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	29,34	26,44	0,012964	0,2111	0,119894	16,2834
Trem1*	Receptor expresado en células mieloides 1	31,91	31,77	0,002178	0,005248	0,416209	2,4094

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes sobreexpresados o reprimidos (-) regulados > de 2 veces.

Tabla S7. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 3 h después de la infección.

TABLA S8

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a*	Receptor Adenosina A2a	31,11	29,40	0,007802	0,017709	0,152646	2,2698
Camp*	Péptido antimicrobiano catelicidina	34,21	32,37	0,000906	0,002265	0,305820	2,5013
Casp1*	Caspasa 1	30,57	28,90	0,011291	0,025103	0,131946	2,2232
Casp4***	Caspasa 4, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis	28,43	25,54	0,049882	0,257742	0,005587	5,1670
Ccl2***	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	31,58	23,24	0,005607	1,263419	0,003643	225,3463
Ccr3***	Receptor de quimiocinas 3 (motivo C-C)	33,23	34,40	0,001791	0,000555	0,045001	-3,2281
Cd14**	Molécula CD14	30,58	24,18	0,011239	0,661586	0,107506	58,8648
Clec7a*	Familia 7 del dominio de lectinas tipo C, miembro a	29,10	27,45	0,031351	0,068267	0,185705	2,1775
Cxcr4***	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)	30,48	31,56	0,012074	0,003953	0,001644	-3,0539
Cybb*	Citocromo b-245, polipéptido beta	29,78	26,53	0,019614	0,129468	0,103739	6,6009
Fn1*	Fibronectina 1	31,75	29,86	0,005006	0,012845	0,052181	2,5657
Ifngr2***	Receptor de interferón gamma 2	30,24	27,76	0,014259	0,055194	0,039194	3,8709
Ikkkb*	Inhibidor del polipéptido ligero kappa potenciador de genes en las células B, quinasa beta	29,90	28,14	0,018007	0,042413	0,051747	2,3554
Il10*	Interleucina 10	31,47	32,01	0,006065	0,002894	0,260114	-2,0956
Il12rb2*	Receptor de interleucina 12, beta 2	30,96	31,93	0,008637	0,003066	0,959382	-2,8167
Il1a*	Interleucina 1 alfa	34,14	24,89	0,000955	0,404441	0,014772	423,436
Il1b***	Interleucina 1 beta	33,53	23,62	0,001458	0,975355	0,025274	669,0638
Il1f5*	Familia de las interleucinas 1, miembro 5 (delta)	32,89	33,65	0,002272	0,000929	0,305105	-2,4464
Il1r1***	Receptor de interleucinas 1, tipo I	33,00	30,77	0,002095	0,006836	0,001412	3,2625
Il1r12*	Receptor tipo 2 de interleucinas 1	34,01	34,54	0,001045	0,000503	0,250398	-2,0763
Il1rn**	Antagonista del receptor de interleucinas 1	31,93	26,40	0,004409	0,141676	0,215262	32,1334
Il6**	Interleucina 6	34,83	25,61	0,000592	0,244968	0,086703	413,7647
Irak2***	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	31,88	28,20	0,004575	0,040686	0,021244	8,8931
Irf1***	Factor regulador de interferón 1	29,46	24,27	0,024484	0,62014	0,011982	25,3281

TABLA S8 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Lyz2*	Lisozima 2	25,67	23,67	0,33712	0,939957	0,357209	2,7882
Myd88***	Gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide	29,55	27,83	0,02295	0,052702	0,002350	2,2963
Ncf4*	Factor citosólico 4 de neutrófilos	31,22	28,46	0,007212	0,033898	0,057494	4,7002
Nfkb1***	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	28,87	24,67	0,03677	0,468894	0,008003	12,7521
Nfkb2***	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	30,68	25,94	0,010462	0,195332	0,013925	18,6702
Nfkbia***	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	27,89	23,02	0,072527	1,474951	0,000926	20,3365
Nlrc4*	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	31,21	28,58	0,007246	0,031264	0,130779	4,3149
Nos2**	Oxido nítrico sintasa inducible 2	35,00	25,73	0,000525	0,225938	0,096435	430,3401
Pglyrp3*	Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 3	34,32	34,80	0,000841	0,000418	0,305964	-2,0102
Proc*	Proteína C	32,91	33,69	0,00224	0,000903	0,217114	-2,4806
Ptafr*	Receptor del factor pro-plaquetas	29,25	27,30	0,028321	0,076098	0,192919	2,6870
Serpina1*	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteínasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	33,79	34,33	0,001212	0,000581	0,282300	-2,0859
Serpine1***	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	31,36	25,41	0,006545	0,280745	0,034145	42,8929
Sftpd*	Proteína surfactante D	34,03	34,65	0,001031	0,000465	0,241840	-2,2150
Tlr1*	Receptor tipo Toll 1	31,06	27,24	0,008058	0,079146	0,100030	9,8219
Tlr2***	Receptor tipo Toll 2	30,10	26,24	0,015639	0,157927	0,043767	10,0983
Tnf***	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	32,93	25,51	0,00221	0,26255	0,004181	118,8227
Trem1*	Receptor expresado en células mieloides 1	33,39	31,41	0,001606	0,004407	0,218144	2,7435

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes sobreexpresados o reprimidos (-) regulados > de 2 veces.

Tabla S8. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 5 h después de la infección.

TABLA S9

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2^Δ(-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a***	Receptor Adenosina A2a	31,44	29,15	0,004522	0,020418	0,004399	4,5148
Camp***	Péptido antimicrobiano catelicidina	34,89	33,15	0,000415	0,00127	0,041521	3,0624
Casp1***	Caspasa 1	29,71	28,10	0,015002	0,042179	0,016774	2,8115
Casp4**	Caspasa 4, peptidasa de cisteína relacionada con apoptosis	27,98	25,62	0,049767	0,23586	0,147350	4,7393
Ccl2***	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	29,95	22,39	0,012703	2,207888	0,001198	173,8059
Cd14***	Molécula CD14	28,77	24,23	0,028916	0,615288	0,012524	21,2786
Clec7a*	Familia 7 del dominio de lectinas tipo C, miembro a	28,92	27,78	0,026	0,052653	0,135253	2,0251
Cybb***	Citocromo b-245, polipéptido beta	29,30	26,76	0,01998	0,106777	0,001170	5,3443
Hmox1***	Hemo oxigenasa (decycling) 1	27,96	25,69	0,050578	0,223653	0,008041	4,4219
Il1a***	Interleucina 1 alfa	33,47	25,98	0,00111	0,183349	0,030884	165,192
Il1b***	Interleucina 1 beta	32,65	24,89	0,001959	0,389402	0,013582	198,7301
Il1r1***	Receptor de interleucinas 1, tipo I	32,90	31,58	0,001644	0,003771	0,041489	2,2942
Il1r2*	Receptor de interleucinas 1, tipo II	33,06	31,62	0,001475	0,003685	0,093641	2,499
Il1rap**	Proteína accesoria de receptores de interleucinas 1	31,59	30,16	0,004076	0,010115	0,159039	2,4817
Il1rn***	Antagonista del receptor de interleucinas 1	30,97	26,14	0,006293	0,163724	0,022210	26,0161
Il6**	Interleucina 6	34,69	27,40	0,000476	0,06852	0,166350	143,808
Irak2**	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	31,92	29,59	0,003258	0,014982	0,176314	4,5985
Irf1**	Factor regulador de interferón 1	29,12	26,25	0,022687	0,152407	0,274709	6,7179
Lbp**	Proteína de unión al lipopolisacárido	34,25	32,75	0,00648	0,00168	0,094552	2,5931
Lyz2*	Lisozima 2	24,41	22,15	0,592409	2,613531	0,434743	4,4117
Myd88***	Gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide	29,24	27,99	0,020876	0,045626	0,029447	2,1856
Ncf4**	Factor citosólico 4 de neutrófilos	30,93	29,32	0,00644	0,018107	0,127572	2,8115
Nfkb1*	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	28,68	27,17	0,030635	0,080548	0,237751	2,6293

TABLA S9 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Nfkb2**	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	30,46	27,78	0,00892	0,052532	0,242617	5,8889
Nfkbia**	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	27,10	23,65	0,092014	0,92189	0,050690	10,019
Nlrc4***	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	30,95	29,23	0,006366	0,019317	0,001686	3,0342
Nos2***	Oxido nítrico sintasa inducible 2	34,55	25,56	0,000526	0,244742	0,044269	465,0794
Serpine1***	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	29,95	23,20	0,012703	1,262252	0,005086	99,3651
Tlr1***	Receptor tipo Toll 1	30,31	27,91	0,009898	0,048116	0,009118	4,8613
Tlr2***	Receptor tipo Toll 2	29,64	27,34	0,015785	0,07143	0,002900	4,5253
Tnf**	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	32,21	28,53	0,002652	0,031236	0,180425	11,7778
Trem1*	Receptor expresado en células mieloides 1	32,99	29,34	0,001544	0,017899	0,270110	11,5889

*** Genes sobreexpresados en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes regulados > de 2 veces.

Tabla S9. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 12 h después de la infección.

TABLA S10

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2^Δ(-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ccl2***	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	30,84	24,40	0,007293	0,618995	0,001858	84,8789
Ccr3*	Receptor de quimiocinas 3 (motivo C-C)	32,05	34,43	0,003138	0,000591	0,240196	-5,3123
Cd14***	Molécula CD14	29,08	25,09	0,024586	0,381918	0,000263	15,5337
Cxcr4*	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)	29,52	30,64	0,018123	0,008171	0,334155	-2,2181
Cybb***	Citocromo b-245, polipéptido beta	28,77	26,23	0,03055	0,1737	0,026295	5,6857
Fn1*	Fibronectina 1	31,93	30,02	0,00341	0,012528	0,033277	3,6739
Il1a***	Interleucina 1 alfa	32,53	28,38	0,00226	0,039227	0,015548	17,3556
Il1b***	Interleucina 1 beta	32,34	26,84	0,002566	0,113545	0,024247	44,2417
Il1f6*	Familia de las interleucinas 1, miembro 6	34,00	35,00	0,000814	0,000398	0,330508	-2,0458
Il1r1***	Receptor de interleucinas 1, tipo I	33,22	31,65	0,001398	0,004048	0,022877	2,8959
Il1r2*	Receptor de interleucinas 1, tipo II	33,76	31,84	0,000959	0,003548	0,106187	3,6995
Il1rn***	Antagonista del receptor de interleucinas 1	30,47	26,87	0,009425	0,111208	0,011967	11,7996
Il6**	Interleucina 6	33,79	30,15	0,000942	0,011449	0,058149	12,1594
Irf1**	Factor regulador de interferón 1	28,52	26,97	0,036331	0,104001	0,200882	2,8626
Lbp***	Proteína de unión al lipopolisacárido	33,86	31,75	0,000895	0,003794	0,027838	4,2398
Lyz2*	Lisozima 2	22,78	21,55	1,946209	4,462957	0,386722	2,2932
Ncf4***	Factor citosólico 4 de neutrófilos	31,17	29,56	0,005802	0,017273	0,024762	2,9773
Nfkb1***	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	28,11	27,05	0,048161	0,098618	0,010442	2,0477
Nfkb2**	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	29,93	28,08	0,013703	0,048183	0,089489	3,5162
Nlrc4***	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	30,29	29,06	0,010628	0,024428	0,022994	2,2985
Nos2***	Oxido nítrico sintasa inducible 2	34,87	26,46	0,000445	0,147761	0,000697	331,7609
Proc*	Proteína C	32,03	33,23	0,003182	0,001357	0,231403	-2,3446

TABLA S10 (continuación)

24 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Serpina1*	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	32,81	34,01	0,001861	0,000788	0,164348	-2,3609
Serpine1***	Inhibidor de peptidasas serina (o cisteína), clado E, miembro 1	29,53	23,49	0,018082	1,160436	0,000626	64,1777
Tlr1***	Receptor tipo Toll 1	30,34	27,81	0,010266	0,057965	0,009181	5,6464
Tlr2*	Receptor tipo Toll 2	28,83	27,50	0,029238	0,07186	0,139478	2,4577
Tnf**	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	32,39	30,05	0,002491	0,012299	0,089145	4,9383
Trem1*	Receptor expresado en células mieloides 1	33,08	30,49	0,00154	0,009045	0,059379	5,8726

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes regulados > de 2 veces.

Tabla S10. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 24 h después de la infección.

TABLA S11

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2[^](-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Akt1	Rn.11422	NM_033230	30,23	30,75	0,269162	0,928754	0,017726	0,009685	0,207264	-1,8302
App	Rn.2104	NM_019288	23,88	23,98	0,216028	0,373154	1,445932	1,060688	0,100173	-1,3632
Arsa	Rn.23323	NM_001034933	30,87	31,35	0,252602	1,045118	0,011375	0,006412	0,192415	-1,7740
Arsb	Rn.94004	NM_033443	28,11	28,22	0,23231	0,528568	0,077053	0,055939	0,244029	-1,3775
Atg12	Rn.6224	NM_001038495	28,71	29,43	0,345526	0,75923	0,050836	0,024265	0,033417	-2,0951
Atg16l1	Rn.101734	NM_001108809	29,87	30,23	0,39689	0,704157	0,022697	0,013888	0,156155	-1,6343
Atg16l2	Rn.104199	NM_0011915560	31,96	32,24	0,430846	1,392244	0,005343	0,003454	0,772672	-1,5469
Atg3	Rn.3084	NM_134394	26,68	26,56	0,196031	0,18888	0,207618	0,177083	0,181384	-1,1724
Atg4b	Rn.163086	NM_001025711	29,09	29,31	0,18256	0,599442	0,039064	0,026278	0,128701	-1,4866
Atg4c	Rn.23378	NM_001107948	28,81	28,73	0,339649	0,522708	0,047213	0,039282	0,506051	-1,2019
Atg5	Rn.98385	NM_001014250	29,28	29,03	0,36409	0,173769	0,034165	0,031962	0,587521	-1,0689
Atg7	Rn.162765	NM_001012097	30,24	30,45	0,131306	0,521297	0,017522	0,011965	0,138233	-1,4644
Atg9a	Rn.35248	NM_001014218	29,57	29,76	0,329669	0,237084	0,027944	0,019203	0,049708	-1,4551
Bad	Rn.36696	NM_022698	28,35	28,86	0,216583	0,4334	0,065244	0,035835	0,011965	-1,8207
Bak1	Rn.14598	NM_053812	29,24	28,48	0,179893	0,807743	0,035045	0,046795	0,359590	1,3353
Bax	Rn.10668	NM_017059	28,58	28,30	0,285799	0,765909	0,055373	0,053105	0,888350	-1,0427
Bcl2	Rn.9996	NM_016993	31,00	31,50	0,397494	0,556487	0,010371	0,005759	0,067863	-1,8008
Bcl2l1	Rn.10323	NM_031535	27,70	26,81	0,227555	0,938699	0,102143	0,148394	0,300706	1,4528
Becn1	Rn.2776	NM_053739	27,02	26,99	0,037166	0,177042	0,16327	0,131215	0,025814	-1,2443
Bid	Rn.31142	NM_022684	30,70	28,87	0,299947	1,054474	0,012797	0,035711	0,097412	2,7905
Bnip3	Rn.2060	NM_053420	25,75	25,79	0,080258	0,589844	0,393745	0,301975	0,333926	-1,3039
Casp3	Rn.10562	NM_012922	29,08	29,03	0,025325	0,380908	0,039155	0,031907	0,305899	-1,2272
Casp8	Rn.54474	NM_022277	32,86	32,08	0,443713	0,989685	0,002857	0,003859	0,400163	1,3508
Cdkn1b	Rn.29897	NM_031762	28,83	29,18	0,146292	0,786305	0,046671	0,028706	0,118379	-1,6258
Cdkn2a	Rn.48717	NM_031550	34,82	34,55	0,980178	0,621382	0,000736	0,000694	0,766463	-1,0603

TABLA S11 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))			
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Valor p	Nivel de expresión relativa
Cln3	Rn.102386	NM_001006971	29,74	29,70	0,151089	0,437497	0,024895	0,020123	0,270890	-1,2371
Ctsb	Rn.100909	NM_022597	23,32	22,64	0,039004	0,295991	2,126774	2,675855	0,120847	1,2582
Ctsd	Rn.11085	NM_134334	24,53	24,84	0,286673	0,988161	0,917216	0,583377	0,436682	-1,5723
Ctss	Rn.11347	NM_017320	24,43	23,96	0,494194	0,45272	0,987601	1,073632	0,756636	1,0871
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	31,59	32,90	0,216675	0,942293	0,006906	0,002178	0,008916	-3,1708
Dapk1	Rn.23108	NM_001107335	31,68	32,42	0,821378	1,695385	0,006458	0,003038	0,480893	-2,1255
Eif2ak3	Rn.24897	NM_031599	30,26	30,70	0,181773	0,767401	0,017321	0,010027	0,066537	-1,7275
Eif4g1	Rn.101803	XM_213569	29,16	29,26	0,649031	1,662302	0,037128	0,027158	0,960816	-1,3671
Esr1	Rn.10595	NM_012689	34,32	34,45	0,746973	0,330871	0,001041	0,000744	0,222560	-1,3991
Fadd	Rn.16183	NM_152937	31,11	31,38	0,130184	1,183794	0,009632	0,006269	0,606920	-1,5363
Fas	Rn.162521	NM_139194	32,34	30,07	0,260502	0,923485	0,004097	0,015517	0,036894	3,7877
Gaa	Rn.162368	NM_199118	27,20	27,66	0,274302	1,031993	0,144119	0,082612	0,208452	-1,7445
Gabarap	Rn.8411	NM_172036	26,74	26,31	0,395779	0,47057	0,1987	0,20986	0,782571	1,0562
Gabarapl2	Rn.64537	NM_022706	31,85	31,91	0,296819	0,620996	0,00574	0,004342	0,347194	-1,3221
Hdac1	Rn.1863	NM_001025409	28,03	27,46	0,270939	0,147142	0,081447	0,094732	0,224520	1,1631
Hdac6	Rn.13453	XM_228753	29,08	29,08	0,422139	0,584047	0,039155	0,030927	0,40973	-1,2660
Hgs	Rn.21	NM_019387	28,59	28,71	0,324008	1,0849	0,054991	0,039899	0,62615	-1,3782
Hsp90aa1	Rn.119867	NM_175761	23,49	23,51	0,131154	0,307521	1,890367	1,466625	0,129493	-1,2889
Hspa8	Rn.120392	NM_024351	23,43	23,64	0,218238	0,814083	1,975202	1,337928	0,239257	-1,4763
Htt	Rn.11193	NM_024357	30,54	30,86	0,415172	1,494593	0,014298	0,00899	0,645200	-1,5905
Ifna2	N/A	XM_233152	32,83	32,85	0,138352	0,755542	0,002917	0,002267	0,477303	-1,2867
Ifna4	Rn.218577	NM_001106667	35,00	34,99	1,091	0,342769	0,000648	0,000513	0,437074	-1,2646
Ifng	Rn.10795	NM_138880	35,00	35,00	1,091	0,359514	0,000648	0,000509	0,433715	-1,2734
Igf1	Rn.6282	NM_178866	28,30	28,56	0,481541	0,432738	0,067389	0,044118	0,154163	-1,5275
Ins2	Rn.989	NM_019130	34,68	34,10	0,959417	0,797602	0,000807	0,000952	0,770822	1,1787
Irgm	Rn.20356	NM_001012007	28,79	27,54	0,52363	1,591636	0,048094	0,089622	0,154475	1,8635

TABLA S11 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Lamp1	Rn.40177	NM_012857	24,80	24,81	0,197993	0,518887	0,760665	0,596668	0,332737	-1,2749
Map1lc3a	Rn.3135	NM_199500	27,56	27,79	0,138352	0,680428	0,112552	0,075494	0,191366	-1,4909
Map1lc3b	Rn.41412	NM_022867	25,70	25,78	0,217627	0,265774	0,408573	0,303023	0,06233	-1,3483
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	29,02	29,24	0,121414	0,451328	0,040912	0,02768	0,064462	-1,4780
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	29,99	29,93	0,688971	0,808073	0,020886	0,017128	0,654419	-1,2194
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	29,99	26,93	0,896416	1,371611	0,020838	0,13655	0,148427	6,5531
Ambra1	Rn.133954	NM_001134341	28,45	28,23	0,19637	0,181977	0,060595	0,055456	0,403938	-1,0927
Pik3c3	Rn.30010	NM_022958	28,67	28,79	0,174646	0,242151	0,052145	0,037681	0,032232	-1,3838
Pik3cg	Rn.152697	NM_001106723	31,02	29,76	0,609263	0,716229	0,010228	0,019237	0,230324	1,8808
Pik3r4	Rn.8917	NM_001108777	29,48	29,82	0,165231	0,591087	0,029742	0,018453	0,051368	-1,6118
Prkaa1	Rn.87789	NM_019142	29,17	29,10	0,306596	0,518823	0,036787	0,030501	0,480682	-1,2061
Prkaa2	Rn.64583	NM_023991	30,31	30,29	0,75517	0,668218	0,016731	0,013346	0,495717	-1,2537
Psen1	Rn.44440	NM_019163	28,21	27,92	0,118749	0,839545	0,071727	0,068989	0,822100	-1,0397
Pten	Rn.22158	NM_031606	27,02	27,00	0,449735	0,230486	0,16327	0,130761	0,272401	-1,2486
Rab24	Rn.6295	NM_001015023	27,21	27,33	0,24271	0,277736	0,143786	0,104025	0,054977	-1,3822
Rb1	Rn.55115	NM_017045	28,71	28,79	0,211632	0,648314	0,050836	0,037812	0,324623	-1,3444
Rblcc1	Rn.33137	NM_001107901	27,54	27,58	0,286394	0,309272	0,11386	0,087021	0,137138	-1,3084
RGD1359310	Rn.4038	NM_001007659	28,54	28,48	0,228709	0,229599	0,057194	0,046795	0,152308	-1,2222
Rgs19	Rn.88166	NM_021661	30,18	29,61	0,160752	0,400594	0,018266	0,021307	0,379748	1,1665
Rps6kb1	Rn.4042	NM_031985	28,85	28,60	0,273352	0,485185	0,046028	0,043135	0,866018	-1,0671
Snca	Rn.1827	NM_019169	27,37	27,86	1,261143	0,76314	0,128396	0,071918	0,222698	-1,7853
Sqstm1	Rn.107103	NM_181550	28,44	28,57	0,263517	0,985351	0,061016	0,043813	0,567332	-1,3927
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	29,54	28,89	0,339089	1,272445	0,028531	0,035219	0,509364	1,2344
Tgm2	Rn.10	NM_019386	30,42	28,18	0,215224	1,406156	0,015467	0,057412	0,142942	3,7119
Tm9sf1	Rn.12071	NM_001012155	28,88	29,49	0,180669	0,925619	0,044977	0,023196	0,050517	-1,9390
Dram2	Rn.1279	NM_001025018	27,95	27,40	0,066843	0,117852	0,086091	0,098584	0,061067	1,1451

TABLA S11 (continuación)

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tnf	Rn.2275	NM_012675	33,56	26,38	0,326662	0,424824	0,001763	0,200615	0,001203	113,8113
Tnfsf10	Rn.83627	NM_145681	34,88	34,06	0,991841	0,961913	0,000706	0,000975	0,570990	1,3808
Tp53	Rn.54443	NM_030989	29,72	28,96	0,112434	0,923698	0,025184	0,033609	0,323712	1,3345
Tp73	Rn.103860	NM_001108696	34,27	34,79	0,550056	0,224256	0,001075	0,000589	0,049282	-1,8251
Ulk1	Rn.24509	NM_001108341	30,09	30,73	0,522304	0,91289	0,019487	0,009803	0,137943	-1,9878
Uvrag	Rn.99218	NM_001107536	29,79	30,00	0,328585	0,66706	0,024047	0,016317	0,200299	-1,4738
Wipi1	Rn.203725	NM_001127297	29,17	29,92	0,665769	0,911575	0,036957	0,017247	0,112599	-2,1428
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	22,66	22,35	0,23921	0,104932	3,352723	3,271608	0,747094	-1,0248
Hprt1	Rn.47	NM_012583	27,82	27,23	0,466034	0,397151	0,094208	0,110913	0,522370	1,1773
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	23,48	23,18	0,217167	0,271162	1,899123	1,843567	0,861878	-1,0301
Ldha	Rn.107896	NM_017025	25,48	25,35	0,281995	0,573664	0,474781	0,408951	0,701476	-1,1610
Actb	Rn.94978	NM_031144	22,60	22,19	0,291321	0,425015	3,511287	3,655326	0,778828	1,0410

Tabla S11. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Autofagia de rata” 5 horas después de la infección.

TABLA S12

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Akt1	Rn.11422	NM_033230	29,74	30,12	0,809835	0,170171	0,018444	0,015647	0,343194	-1,1788
App	Rn.2104	NM_019288	23,77	24,02	0,482321	0,420347	1,161509	1,069547	0,845996	-1,0860
Arsa	Rn.23323	NM_001034933	31,05	31,49	0,504083	0,631981	0,007456	0,006043	0,719278	-1,2338
Arsb	Rn.94004	NM_033443	28,90	29,22	0,674463	1,403448	0,033093	0,029147	0,807176	-1,1354
Atg12	Rn.6224	NM_001038495	28,11	28,84	0,808476	0,445122	0,057352	0,03793	0,236513	-1,5120
Atg16l1	Rn.101734	NM_001108809	29,24	29,86	0,851136	0,194679	0,026205	0,018769	0,114993	-1,3962
Atg16l2	Rn.104199	NM_0011915560	31,68	31,88	0,516269	0,382481	0,004807	0,004604	0,941036	-1,0442
Atg3	Rn.3084	NM_134394	26,29	26,38	0,609016	0,186078	0,202034	0,208338	0,698243	1,0312
Atg4b	Rn.163086	NM_001025711	28,59	29,02	0,710235	0,14151	0,04112	0,033423	0,235525	-1,2303
Atg4c	Rn.23378	NM_001107948	28,33	28,86	0,710422	0,458992	0,049127	0,037343	0,059650	-1,3156
Atg5	Rn.98385	NM_001014250	29,18	29,13	0,375899	0,236414	0,027255	0,03097	0,399942	1,1363
Atg7	Rn.162765	NM_001012097	30,02	30,37	0,640495	0,564292	0,015191	0,013157	0,557265	-1,1546
Atg9a	Rn.35248	NM_001014218	29,29	29,94	0,288444	0,286981	0,025254	0,017665	0,166152	-1,4297
Bad	Rn.36696	NM_022698	28,05	28,96	0,617846	0,114746	0,059512	0,035024	0,025557	-1,6992
Bak1	Rn.14598	NM_053812	29,09	28,57	1,125448	0,600076	0,028942	0,045658	0,246090	1,5775
Bax	Rn.10668	NM_017059	27,92	28,11	0,795005	0,193477	0,065124	0,063131	0,879191	-1,0316
Bcl2	Rn.9996	NM_016993	30,91	31,99	0,712905	0,343511	0,008235	0,004273	0,017779	-1,9272
Bcl2l1	Rn.10323	NM_031535	27,66	27,51	0,889288	0,962687	0,078346	0,095689	0,540921	1,2214
Becn1	Rn.2776	NM_053739	26,62	27,02	0,580115	0,228528	0,160354	0,1336693	0,282430	-1,1994
Bid	Rn.31142	NM_022684	30,09	28,73	1,086477	0,430929	0,014471	0,041078	0,069293	2,8386
Bnip3	Rn.2060	NM_053420	25,17	25,33	0,550121	0,513225	0,4381	0,432119	0,944420	-1,0138
Casp3	Rn.10562	NM_012922	28,78	28,65	0,670025	0,515687	0,03588	0,04327	0,209365	1,2059
Casp8	Rn.54474	NM_022277	32,63	31,79	0,851606	0,880809	0,002488	0,0049	0,158284	1,9693
Cdkn1b	Rn.29897	NM_031762	28,63	28,98	0,72473	0,62902	0,039996	0,034423	0,908914	-1,1619
Cdkn2a	Rn.48717	NM_031550	35,00	34,68	0	0,635	0,000482	0,000661	0,326346	1,3701

TABLA S12 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Cln3	Rn.102386	NM_001006971	29,64	29,92	0,333067	0,729018	0,019768	0,017942	0,926898	-1,1018
Ctsb	Rn.100909	NM_022597	23,74	23,24	0,378594	0,531288	1,180447	1,839738	0,030610	1,5585
Ctsd	Rn.11085	NM_134334	24,97	25,77	0,640104	1,351946	0,503245	0,319082	0,578643	-1,5772
Ctss	Rn.11347	NM_017320	24,61	25,46	0,548847	1,54802	0,645878	0,396255	0,711744	-1,6300
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	30,69	31,99	1,11216	0,660454	0,00957	0,004273	0,045444	-2,2395
Dapk1	Rn.23108	NM_001107335	30,34	31,44	0,686027	0,508953	0,012225	0,006278	0,031788	-1,9473
Eif2ak3	Rn.24897	NM_031599	29,88	30,45	0,588586	0,304467	0,016739	0,012469	0,070849	-1,3424
Eif4g1	Rn.101803	XM_213569	28,66	29,14	0,787909	0,411906	0,039083	0,030809	0,535949	-1,2685
Esr1	Rn.10595	NM_012689	34,25	34,74	0,485627	0,306417	0,000813	0,000636	0,339388	-1,2781
Fadd	Rn.16183	NM_152937	31,12	30,78	0,611991	0,287909	0,00712	0,009902	0,199798	1,3909
Fas	Rn.162521	NM_139194	32,19	31,01	0,78	0,884209	0,003383	0,008443	0,158449	2,4955
Gaa	Rn.162368	NM_199118	27,40	28,53	0,405134	0,740293	0,093385	0,047186	0,138937	-1,9791
Gabarap	Rn.8411	NM_172036	26,67	26,76	0,338674	0,276571	0,15525	0,160095	0,913646	1,0312
Gabarapl2	Rn.64537	NM_022706	31,57	31,66	0,212211	0,755954	0,005212	0,005371	0,668894	1,0306
Hdac1	Rn.1863	NM_001025409	27,97	27,58	0,38527	0,362985	0,063197	0,090685	0,04156	1,4349
Hdac6	Rn.13453	XM_228753	28,72	29,49	0,432666	0,1843	0,03749	0,024256	0,068721	-1,5456
Hgs	Rn.21	NM_019387	28,00	28,39	0,77436	0,207364	0,061896	0,051815	0,528525	-1,1946
Hsp90aa1	Rn.119867	NM_175761	22,98	23,38	0,572975	0,242006	2,0037	1,675394	0,301421	-1,1960
Hspa8	Rn.120392	NM_024351	23,25	23,71	0,871856	0,469494	1,665552	1,325926	0,373138	-1,2561
Htt	Rn.11193	NM_024357	29,92	30,29	0,548088	0,230705	0,016319	0,013907	0,613775	-1,1734
Ifna2	N/A	XM_233152	32,71	31,75	0,858545	1,546157	0,002359	0,005047	0,364966	2,1388
Ifna4	Rn.218577	NM_001106667	35,00	35,00	0	0	0,000482	0,00053	0,844793	1,0995
Ifng	Rn.10795	NM_138880	35,00	35,00	0	0	0,000482	0,00053	0,844793	1,0995
Igf1	Rn.6282	NM_178866	28,68	30,91	0,73	1,174631	0,038544	0,009018	0,008497	-4,2742
Ins2	Rn.989	NM_019130	34,15	33,03	0,898907	1,470068	0,000868	0,002085	0,334274	2,4035
Irgm	Rn.20356	NM_001012007	28,73	27,04	1,08362	0,59084	0,037318	0,132311	0,100113	3,5455

TABLA S12 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ⁻ (-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Lamp1	Rn.40177	NM_012857	25,07	25,34	0,529182	0,802849	0,469544	0,430624	0,978523	-1,0904
Map1lc3a	Rn.3135	NM_199500	27,07	27,84	0,652482	0,325372	0,117386	0,075861	0,066126	-1,5474
Map1lc3b	Rn.41412	NM_022867	25,28	25,97	0,715006	0,129711	0,405939	0,276816	0,004967	-1,4665
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	28,63	29,37	0,51643	0,433705	0,039904	0,02636	0,033079	-1,5138
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	28,95	29,59	0,855628	0,355762	0,031966	0,022632	0,030775	-1,4124
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	29,20	27,91	1,681943	0,376685	0,026818	0,072143	0,115861	2,6901
Ambra1	Rn.133954	NM_001134341	28,21	28,30	0,799396	0,144864	0,053512	0,05515	0,796194	1,0306
Pik3c3	Rn.30010	NM_022958	28,22	28,76	0,335609	0,190679	0,052897	0,040163	0,237274	-1,3171
Pik3cg	Rn.152697	NM_001106723	30,94	30,16	1,036645	1,110886	0,008066	0,015192	0,206180	1,8836
Pik3r4	Rn.8917	NM_001108777	29,39	29,84	0,388501	0,247117	0,023617	0,018965	0,160394	-1,2453
Prkaa1	Rn.87789	NM_019142	29,02	29,30	0,912707	0,439166	0,030381	0,027575	0,663467	-1,1018
Prkaa2	Rn.64583	NM_023991	29,33	30,12	0,928565	0,355809	0,02462	0,01562	0,186268	-1,5763
Psen1	Rn.44440	NM_019163	27,85	28,13	0,987185	0,286865	0,068678	0,061939	0,559620	-1,1088
Pten	Rn.22158	NM_031606	26,36	26,80	0,857108	0,302159	0,19291	0,156529	0,037048	-1,2324
Rab24	Rn.6295	NM_001015023	26,50	26,92	0,650333	0,5003	0,17507	0,144036	0,623567	-1,2155
Rb1	Rn.55115	NM_017045	28,46	29,05	0,665607	0,783597	0,04479	0,032736	0,506985	-1,3683
Rblcc1	Rn.33137	NM_001107901	26,91	27,36	0,603573	0,09609	0,131457	0,106174	0,124740	-1,2381
RGD1359310	Rn.4038	NM_001007659	28,10	28,47	0,663049	0,23429	0,057751	0,049105	0,447980	-1,1761
Rgs19	Rn.88166	NM_021661	29,72	29,74	1,010066	0,366458	0,018702	0,020362	0,652827	1,0887
Rps6kb1	Rn.4042	NM_031985	28,32	28,66	0,699809	0,222467	0,049583	0,043045	0,596230	-1,1519
Snca	Rn.1827	NM_019169	25,69	26,74	0,498698	0,540802	0,306226	0,162611	0,025959	-1,8832
Sqstm1	Rn.107103	NM_181550	27,95	28,70	0,591805	0,527534	0,063784	0,041723	0,118878	-1,5287
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	29,49	29,75	1,090917	0,558152	0,021985	0,020186	0,811649	-1,0891
Tgm2	Rn.10	NM_019386	30,63	27,79	1,436698	0,879105	0,009976	0,0784	0,130479	7,8589
Tm9sf1	Rn.12071	NM_001012155	28,71	29,34	0,651997	0,680067	0,037751	0,026867	0,464143	-1,4051
Dram2	Rn.1279	NM_001025018	27,78	27,75	0,554617	0,0706871	0,071926	0,080744	0,532702	1,1226

TABLA S12 (continuación)

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tnf	Rn.2275	NM_012675	33,06	28,92	1,023198	0,586202	0,001847	0,036009	0,028461	19,4968
Tnfsf10	Rn.83627	NM_145681	34,94	32,81	0,09815	1,516539	0,000502	0,002416	0,226442	4,8154
Tp53	Rn.54443	NM_030989	29,10	29,54	0,934309	0,573556	0,028876	0,02343	0,488529	-1,2324
Tp73	Rn.103860	NM_001108696	33,82	34,59	0,420991	0,82	0,001091	0,000705	0,646641	-1,5474
Ulk1	Rn.24509	NM_001108341	29,21	30,12	0,646323	0,175404	0,026633	0,015674	0,020546	-1,6992
Uvrag	Rn.99218	NM_001107536	30,01	29,70	1,600281	0,342673	0,015332	0,020862	0,552911	1,3607
Wipi1	Rn.203725	NM_001127297	29,45	30,02	0,568243	0,641424	0,022603	0,016712	0,424080	-1,3525
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	22,49	22,52	0,615332	0,382971	2,807592	3,030383	0,358132	1,0794
Hprt1	Rn.47	NM_012583	26,63	26,91	0,549029	0,589541	0,159984	0,144286	0,819608	-1,1088
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	23,45	23,65	0,667108	0,259743	1,443262	1,38463	0,685419	-1,0423
Ldha	Rn.107896	NM_017025	24,81	25,01	0,635059	0,423202	0,56357	0,5413	0,745440	-1,0411
Actb	Rn.94978	NM_031144	22,53	22,51	0,980153	0,901369	2,737135	3,051461	0,621655	1,1148

Tabla S12. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Autofagia de rata” 12 horas después de la infección.

TABLA S13

5 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN

Símbolo	Descripción	AVG Ct		2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
		Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Atg12***	Homólogo de ATG12 relacionado con la autofagia (<i>S. cerevisiae</i>)	28,71	29,43	0,050836	0,024265	0,033417	-2,0951
Bid*	Agonista de muerte con dominio de interacción BH3	30,70	28,87	0,012797	0,035711	0,097412	2,7905
Cxcr4***	Receptor de quimiocina 4 (motivo CXC)	31,59	32,90	0,006906	0,002178	0,008916	-3,1708
Dapk1*	Proteína quinasa 1 asociada a muerte	31,68	32,42	0,006458	0,003038	0,480893	-2,1255
Fas***	Fas (Miembro de la superfamilia del receptor de TNF 6)	32,34	30,07	0,004097	0,015517	0,036894	3,7877
Nfkb1*	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	29,99	26,93	0,020838	0,13655	0,148427	6,5531
Tgm2*	Transglutaminasa 2, polipéptido C	30,42	28,18	0,015467	0,057412	0,142942	3,7119
Tnf***	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	33,56	26,38	0,001763	0,200615	0,001203	113,8113
Wipi1*	Dominio de repetición WD interactuando con fosfoinositida 1	29,17	29,92	0,036957	0,017247	0,112599	-2,1428

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes sobreexpresados o reprimidos (-) regulados > de 2 veces.

Tabla S13. Expresión de genes de autofagia modulados por la infección con diferencias de expresión > ó < de 2 con respecto a sus controles, 5 horas después de la infección.

TABLA S14

12 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Bid*	Agonista de muerte con dominio de interacción BH3	30,09	28,73	0,014471	0,041078	0,069293	2,8386
Cxcr4***	Receptor de quimiocina 4 (motivo CXC)	30,69	31,99	0,00957	0,004273	0,045444	-2,2395
Fas*	Fas (Miembro de la superfamilia del receptor de TNF 6)	32,19	31,01	0,003383	0,008443	0,158449	2,4955
Ifna2*	Gen 2 de la familia de interferones alfa	32,71	31,75	0,002359	0,005047	0,364966	2,1388
Igf1***	Factor de crecimiento insulínico tipo 1	28,68	30,91	0,038544	0,009018	0,008497	-4,2742
Ins2*	Insulina 2	34,15	33,03	0,000868	0,002085	0,334274	2,4035
Irgm*	Familia GTPasa M relacionada con la inmunidad	28,73	27,04	0,037318	0,132311	0,100113	3,5455
Nfkb1*	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	29,20	27,91	0,026818	0,072143	0,115861	2,6901
Tgm2**	Transglutaminasa 2, polipéptido C	30,63	27,79	0,009976	0,0784	0,130479	7,8589
Tnf***	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	33,06	28,92	0,001847	0,036009	0,028461	19,4968
Tnfsf10**	Miembro 10 de la superfamilia de ligandos de factores de necrosis tumoral	34,94	32,81	0,000502	0,002416	0,226442	4,8154

*** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de p <0,05.

** Genes sobreexpresados en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes regulados > de 2 veces.

Tabla S14. Expresión de genes de autofagia modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 12 horas después de la infección.

TABLA S15

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2[^](-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a	Rn.11180	NM_053294	31,00	27,00	1	1	0,003906	0,0625	0,1039	16,0010
C5	Rn.21259	XM_342421	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
C8a	Rn.105718	XM_233251	34,33	33,67	0,57735	1,154701	0,000388	0,000615	0,27033	1,5874
Camp	Rn.33146	XM_236642	32,33	31,67	0,57735	0,57735	0,00155	0,002461	0,291142	1,5874
Casp1	Rn.37508	NM_012762	29,33	29,33	0,57735	0,57735	0,012402	0,012402	0,91804	1,0000
Casp4	Rn.16195	NM_053736	30,00	29,67	0	0,57735	0,007812	0,009843	0,293548	1,2599
Ccl2	Rn.4772	NM_031530	26,00	23,33	1	1,154701	0,125	0,793701	0,204424	6,3496
Ccr3	Rn.9890	NM_053958	35,00	34,33	0	1,154701	0,000244	0,000388	0,400801	1,5874
Cd14	Rn.42942	NM_021744	25,00	24,00	1	1	0,25	0,5	0,255415	2,0000
Cd1d1	Rn.11120	NM_017079	31,67	31,67	0,57735	0,57735	0,002461	0,002461	0,864245	1,0000
Cd55	Rn.18841	NM_022269	30,33	30,00	0,57735	0	0,006201	0,007812	0,460527	1,2599
Cfp	Rn.204119	XM_216784	30,67	30,67	0,57735	0,57735	0,004922	0,004922	1	1,0000
Chuk	Rn.23019	XM_219857	28,00	28,00	0	0	0,03125	0,03125	1	1,0000
Clec7a	Rn.15743	XM_001067977	28,00	28,00	1	1	0,03125	0,03125	0,920436	1,0000
Colec12	Rn.31273	NM_001025721	27,00	27,00	0	0	0,0625	0,0625	1	1,0000
Crp	Rn.16463	NM_017096	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Cxcr4	Rn.44431	NM_022205	28,33	29,33	2,081666	2,081666	0,024803	0,012402	0,64733	-1,9999
Cybb	Rn.98491	NM_023965	24,67	24,33	1,154701	0,57735	0,31498	0,39685	0,697846	1,2599
Defb4	Rn.2267	NM_022544	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Dmbt1	Rn.10107	XM_001080554	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Fn1	Rn.1604	NM_019143	23,67	23,67	1,154701	1,154701	0,629961	0,629961	0,919247	1,0000
Hmox1	Rn.3160	NM_012580	24,00	24,33	1	1,527525	0,5	0,39685	0,990964	-1,2599
Ifna1	Rn.196548	NM_001014786	35,00	34,67	0	0,57735	0,000244	0,000308	0,454365	1,2599
Ifnb1	Rn.138105	NM_019127	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Ifngr1	Rn.19927	NM_053783	28,00	28,00	0	0	0,03125	0,03125	1	1,0000
Ifngr2	Rn.23305	XM_340967	30,00	30,00	0	0	0,007812	0,007812	1	1,0000

TABLA S15 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Ikkb	Rn.19222	NM_053355	30,00	29,00	0	0	0,007812	0,015625	0,004989	2,0001
II10	Rn.9868	NM_012854	31,33	27,67	0,57735	1,154701	0,0031	0,039373	0,056705	12,6992
II12rb2	Rn.207395	XM_231873	32,33	32,00	0,57735	0	0,00155	0,001953	0,460527	1,2599
II1a	Rn.12300	NM_017019	29,00	23,00	2	1	0,015625	1	0,094613	64,0000
II1b	Rn.9869	NM_031512	25,33	21,67	1,527525	1,154701	0,198425	2,519842	0,061203	12,6992
II1f10	Rn.84164	XM_342378	33,67	33,33	0,57735	0,57735	0,000615	0,000775	0,432031	1,2599
II1f5	Rn.63170	XM_231101	31,67	31,00	0,57735	1	0,002461	0,003906	0,379365	1,5874
II1f6	Rn.218666	XM_231099	34,33	34,00	0,57735	0	0,000388	0,000488	0,269346	1,2599
II1f8	Rn.137499	XM_342377	33,33	33,33	0,57735	0,57735	0,000775	0,000775	0,91804	1,0000
II1f9	Rn.152030	XM_575079	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
II1r1	Rn.9758	NM_013123	28,67	27,33	0,57735	0,57735	0,019686	0,049606	0,051187	2,5198
II1r2	Rn.10758	NM_053953	30,67	30,33	0,57735	0,57735	0,004922	0,006201	0,539183	1,2599
II1rap	Rn.10511	NM_012968	33,67	33,00	0,57735	0	0,000615	0,000977	0,147804	1,5874
II1rap12	Rn.208232	XM_236512	33,67	34,00	0,57735	0	0,000615	0,000488	0,454365	-1,2599
II1r12	Rn.10235	NM_133575	30,67	30,00	0,57735	0	0,004922	0,007812	0,147804	1,5874
II1rm	Rn.162640	NM_022194	24,00	23,33	1	0,57735	0,5	0,793701	0,407379	1,5874
II6	Rn.9873	NM_012589	28,00	22,67	0	0,57735	0,03125	1,259921	0,005028	40,3175
Irak1	Rn.22238	XM_343844	28,33	28,33	0,57735	0,57735	0,024803	0,024803	0,91804	1,0000
Irak2	Rn.17123	NM_001025422	30,67	29,00	0,57735	0	0,004922	0,015625	0,004556	3,1748
Irf1	Rn.6396	NM_012591	29,00	28,67	0	0,57735	0,015625	0,019686	0,39376	1,2599
Lalba	Rn.10479	NM_012594	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Lbp	Rn.48863	NM_0172208	28,00	27,67	0	0,57735	0,03125	0,039373	0,454365	1,2599
Lck	Rn.22791	XM_232763	32,33	32,33	0,57735	0,57735	0,00155	0,00155	0,91804	1,0000
Ly96	Rn.141496	NM_001024279	27,67	27,67	0,57735	1,154701	0,039373	0,039373	0,727081	1,0000
Lyz2	Rn.2283	NM_012771	21,33	21,33	0,57735	0,57735	3,174802	3,174802	0,91804	1,0000
Mapk14	Rn.88085	NM_031020	29,67	30,33	0,57735	0,57735	0,009843	0,006201	0,136526	-1,5874

TABLA S15 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2⁻(-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Mapk8	Rn.4090	XM_341399	30,00	30,00	0	0	0,007812	0,007812	1	1,0000
Mif	Rn.2661	NM_031051	24,67	24,67	0,57735	0,57735	0,31498	0,31498	0,934691	1,0000
Myd88	Rn.37341	NM_198130	28,00	28,33	0	0,57735	0,03125	0,024803	0,460527	-1,2599
Ncf4	Rn.46120	XM_576306	28,33	28,33	0,57735	0,57735	0,024803	0,024803	0,91804	1,0000
Nfkb1	Rn.2411	XM_342346	27,00	25,00	0	0	0,0625	0,25	0,000804	4,0000
Nfkb2	Rn.204814	NM_001008349	28,33	26,67	0,57735	0,57735	0,024803	0,078745	0,023224	3,1748
Nfkbia	Rn.12550	XM_343065	27,00	24,67	1	0,57735	0,0625	0,31498	0,078214	5,0397
Nlrc4	Rn.144882	XM_216640	29,33	27,67	1,527525	1,154701	0,012402	0,039373	0,168543	3,1748
Nos2	Rn.10400	NM_012611	29,00	24,33	2	0,57735	0,015625	0,39685	0,01475	25,3984
Pglyrp1	Rn.2834	NM_053373	32,00	32,33	0	0,57735	0,001953	0,00155	0,565122	-1,2599
Pglyrp3	Rn.109236	XM_574982	33,33	33,33	0,57735	0,57735	0,000775	0,000775	0,91804	1,0000
Ppbp	Rn.67082	NM_153721	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Prg2	Rn.10674	NM_031619	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Proc	Rn.91064	NM_012803	32,33	32,33	0,57735	0,57735	0,00155	0,00155	0,91804	1,0000
Ptafr	Rn.10137	NM_053321	28,00	27,67	1	1,154701	0,03125	0,039373	0,553559	1,2599
Serpina1	Rn.1419	NM_022519	33,33	32,33	0,57735	0,57735	0,000775	0,00155	0,094611	2,0000
Serpine1	Rn.29368	NM_012620	23,67	23,33	0,57735	0,57735	0,629961	0,793701	0,667969	1,2599
Sftpd	Rn.11348	NM_012878	34,00	33,33	1	0,57735	0,000488	0,000775	0,407379	1,5874
Stab1	Rn.144136	XM_214279	29,00	29,33	1	1,154701	0,015625	0,012402	0,740143	-1,2599
Tgfb1	Rn.40136	NM_021578	26,67	26,33	0,57735	0,57735	0,078745	0,099213	0,432031	1,2599
Tlr1	Rn.107212	XM_223421	29,00	28,33	1	1,154701	0,015625	0,024803	0,426616	1,5874
Tlr10	N/A	XM_223422	35,00	35,00	0	0	0,000244	0,000244	1	1,0000
Tlr2	Rn.46387	NM_198769	25,67	25,00	1,154701	1	0,15749	0,25	0,383663	1,5874
Tlr3	Rn.15273	NM_198791	32,33	31,00	2,309401	0	0,00155	0,003906	0,482707	2,5198
Tlr4	Rn.14534	NM_019178	28,67	29,67	0,57735	0,57735	0,019686	0,009843	0,062527	-2,0000
Tlr6	Rn.163249	NM_207604	30,00	29,67	1	0,57735	0,007812	0,009843	0,714243	1,2599

TABLA S15 (continuación)

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN			AVG Ct		Desviación estándar		2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Unigen	GenBank	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Tlr9	Rn.92495	NM_198131	29,67	30,33	0,57735	0,57735	0,009843	0,006201	0,195392	-1,5874
Tnf	Rn.2275	NM_012675	29,67	25,00	1,527525	1	0,009843	0,25	0,040083	25,3984
Tnfrsf1a	Rn.11119	NM_013091	27,67	27,33	0,57735	0,57735	0,039373	0,049606	0,380763	1,2599
Tollip	Rn.137040	XM_341961	29,33	29,00	0,57735	0	0,012402	0,015625	0,269346	1,2599
Traf6	Rn.220435	XM_230377	29,00	28,33	0	0,57735	0,015625	0,024803	0,154742	1,5874
Trem1	Rn.86337	XM_217336	29,67	29,67	1,527525	1,154701	0,009843	0,009843	0,816281	1,0000
Rplp1	Rn.973	NM_001007604	22,00	22,00	0	0	2	2	1	1,0000
Hprt1	Rn.47	NM_012583	25,00	25,00	0	0	0,25	0,25	1	1,0000
Rpl13a	Rn.92211	NM_173340	23,33	23,33	0,57735	0,57735	0,793701	0,793701	1	1,0000
Ldha	Rn.107896	NM_017025	24,00	23,67	0	0,57735	0,5	0,629961	0,293548	1,2599
Actb	Rn.94978	NM_031144	20,67	21,00	0,57735	0	5,039684	4	0,293548	-1,2599

Tabla S15. Análisis cuantitativo (media de las Ct obtenidas de 3 ensayos independientes, desviación estándar, valores del doble ΔC_t , valor p y nivel de expresión relativa) de todos los genes presentes en la matriz de “Respuesta inmunitaria innata y adaptativa de rata” 3 horas después de la infección de cultivos celulares primarios obtenidos del tejido cerebral.

TABLA S16

3 HORAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN		AVG Ct		2⁻(-Avg.(Delta)(Ct))		Valor p	Nivel de expresión relativa
Símbolo	Descripción	Grupo control	Tejido infectado	Grupo control	Tejido infectado		
Adora2a**	Receptor Adenosina A2a	31,00	27,00	0,003906	0,0625	0,1039	16,0010
Ccl2**	Quimiocina (motivo C-C) ligando 2	26,00	23,33	0,125	0,793701	0,204424	6,3496
Cd14*	Molécula CD14	25,00	24,00	0,25	0,5	0,255415	2,0000
Cxcr4*	Receptor de quimiocinas 4 (motivo C-X-C)	28,33	29,33	0,024803	0,012402	0,64733	-1,9999
Ikkb***	Inhibidor del polipéptido ligero kappa potenciador de genes en las células B, quinasa beta	30,00	29,00	0,007812	0,015625	0,004989	2,0001
Il10**	Interleucina 10	31,33	27,67	0,0031	0,039373	0,056705	12,6992
Il1a**	Interleucina 1 alfa	29,00	23,00	0,015625	1	0,094613	64,0000
Il1b**	Interleucina 1 beta	25,33	21,67	0,198425	2,519842	0,061203	12,6992
Il1r1**	Receptor de interleucinas 1, tipo I	28,67	27,33	0,019686	0,049606	0,051187	2,5198
Il6***	Interleucina 6	28,00	22,67	0,03125	1,259921	0,005028	40,3175
Irak2***	Quinasa 2 asociada al receptor de interleucinas 1	30,67	29,00	0,004922	0,015625	0,004556	3,1748
Nfkb1***	Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	27,00	25,00	0,0625	0,25	0,000804	4,0000
Nfkb2***	Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, p49/p100	28,33	26,67	0,024803	0,078745	0,023224	3,1748
Nfkbia**	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	27,00	24,67	0,0625	0,31498	0,078214	5,0397
Nlrc4*	Familia NLR, dominio CARD contiene 4	29,33	27,67	0,012402	0,039373	0,168543	3,1748
Nos2***	Oxido nítrico sintasa inducible 2	29,00	24,33	0,015625	0,39685	0,01475	25,3984
Serpina1**	Inhibidor peptidasa de serpinas, clado A (antiproteinasa alfa 1, antitripsina), miembro 1	33,33	32,33	0,000775	0,00155	0,094611	2,0000
Tlr3*	Receptor tipo Toll 3	32,33	31,00	0,00155	0,003906	0,482707	2,5198
Tlr4**	Receptor tipo Toll 4	28,67	29,67	0,019686	0,009843	0,062527	-2,0000
Tnf***	Factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, miembro 2)	29,67	25,00	0,009843	0,25	0,040083	25,3984

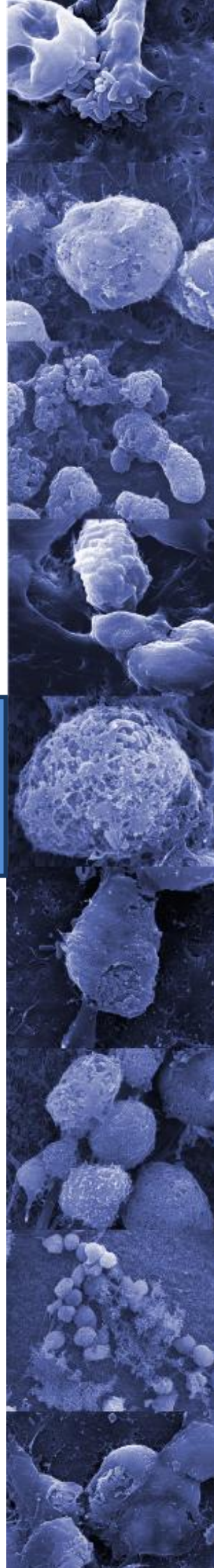
*** Genes sobreexpresados en tejidos infectados respecto a los controles regulados > de 2 veces y con un valor de $p < 0,05$.

** Genes sobreexpresados o reprimidos (-) en tejidos infectados con diferencias > de 2 en sus Ct con respecto a los controles y regulados > de 2 veces (consistentemente regulados).

* Genes sobreexpresados o reprimidos (-) regulados > de 2 veces.

Tabla S16. Expresión de genes de respuesta inmunitaria modulados por la infección con diferencias de expresión > de 2 con respecto a sus controles, 3 horas después de la infección de cultivos celulares primarios obtenidos del tejido cerebral.

Anexo 2. Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis



Microglial Activation and Expression of Immune-Related Genes in a Rat Ex Vivo Nervous System Model After Infection with Listeria monocytogenes

Sara Remuzgo-Martínez, Lilian Pilares-Ortega, Jose M. Icardo, Elsa Maria Valdizan, Verónica Inés Vargas, Angel Pazos, and Jose Ramos-Vivas

Glia. 2013 Apr; 61(4):611-22.

[DOI: 10.1002/glia.22459](https://doi.org/10.1002/glia.22459)

Absence of core autophagy gene expression in an ex vivo central nervous system model infected with Listeria monocytogenes

Sara Remuzgo-Martínez, David San Segundo, Carolina Santa Cruz, Ignacio Beares, Elsa María Valdizán, Jose Manuel Icardo, Jose Ramos-Vivas

Inmunología. Volume 32, Issue 3, July–September 2013, Pages 87–93

[DOI: 10.1016/j.inmuno.2013.04.001](https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.04.001)

Listeria monocytogenes and Macrophages

Sara Remuzgo-Martínez and Jose Ramos Vivas

[Microbiology Focus](https://doi.org/10.1128/microbiol.focus.00000-13) . Volume 5.1, 2013

El modelo de cultivo cerebral para el estudio de patógenos que afectan al sistema nervioso central

Sara Remuzgo-Martínez, Elsa Valdizán, José Manuel Icardo y José Ramos-Vivas

[SEM@foro](https://doi.org/10.1016/j.semforo.2013.12.001) Revista de la Sociedad Española de Microbiología nº 56, Diciembre 2013

Microglial Activation and Expression of Immune-Related Genes in a Rat *Ex Vivo* Nervous System Model After Infection with *Listeria monocytogenes*

SARA REMUZGO-MARTÍNEZ,¹ LILIAN PILARES-ORTEGA,² JOSE M. ICARDO,³ ELSA MARIA VALDIZÁN,^{4,5,6} VERÓNICA INÉS VARGAS,^{4,5,6} ÁNGEL PAZOS,^{4,5,6} AND JOSÉ RAMOS-VIVAS^{1*}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Cantabria, Spain

²Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

³Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

⁴Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

⁵Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (UC-CSIC-SODERCAN), Santander, Spain

⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Spain

KEY WORDS

microglia; immune response; *Listeria monocytogenes*; organotypic model

ABSTRACT

A wide variety of microorganisms has previously been identified as causes of brain infection. Among them, *Listeria monocytogenes* has a particular tropism for the central nervous system. To gain knowledge about the immune response elicited by *L. monocytogenes* in the brain, we used a rat *ex vivo* organotypic nervous system culture as a model for *Listeria* infection. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that activated microglial cells showing a typical amoeboid morphology are quickly recruited to the surface of the explants after the infection. After bacterial engulfment, these cells appear to act as Trojan horses, releasing the engulfed bacteria inside the brain tissue. We describe cycles of microglial phagocytosis, necrotic cell death and the subsequent removal of cell debris for the first time. Furthermore, we used this *ex vivo* model to assess the expression profiles of immune relevant genes up to 24 h postinfection by means of q-PCR-arrays, finding that a number of inflammation-promoting genes are upregulated. Shortly after infection by *L. monocytogenes*, upregulated genes were those that encoded molecules involved in Th1 responses, being the Ccl2 chemokine and members of the interleukin1- β family the most abundant immunomodulatory signals expressed. After 5 h of infection, *L. monocytogenes* caused a substantial increase in the expression of TLR1 and TLR2 genes, as well as in several downstream genes of the TLR signaling pathways. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

sively studied (Lorber, 1997; Mylonakis et al., 1998; Drevets and Bronze, 2008; Moragas et al., 2010). CNS listeriosis occurs either via bacterial migration through the axons of the cranial nerves, by invasion and replication inside of brain endothelial cells and/or by infection of phagocytes which ultimately reach the brain tissue (Drevets and Bronze, 2008). Transport of intracellular bacteria by infected phagocytes is a mechanism named “the Trojan horse” and is used by *Listeria* and other pathogens (Zlotkin et al., 2003; Lecuit, 2005; Dellacasa-Lindberg et al., 2011; Lachenmaier et al., 2011).

The study of the mechanisms of infectious diseases in the brain has classically relied on the use of animal models and two-dimensional (2D) cell cultures. However, 2D monolayers lack of the structural complexity and the physiological relevance of the *in vivo* tissue preparations, since they are limited predictors of the infection process (Barrila et al., 2010). In contrast, the use of animal models is time-consuming and depends on the availability of costly animal facilities. The introduction of the *ex-vivo* nervous system model (3D organotypic slice cultures) has incorporated a fundamental experimental tool in this field of study. Key features of the *ex vivo* model include well-defined cellular architecture, the presence of axonal projections, and the preservation of the *in vivo* 3D organization and long-term thickness of the preparation. Thus, the model mimics the morphological and functional features of the *in vivo* parental tissues (Stopini et al., 1991). Brain slice culture is now a widely accepted experimental model used for molecular biology,

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a Gram-positive bacillus with high tropism for the central nervous system (CNS) (Clauss and Lorber, 2008). Listeriosis of the CNS appears as a meningoencephalitis or rhomboencephalitis, with clinical signs of meningitis, cranial nerve deficits, sensorimotor impairments, as well as other signs of encephalitis (Mylonakis et al., 1998). Furthermore, *Listeria* is able to cause brain abscesses, either with or without meningitis, although this has not been exten-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III; Grant number: PS: CP08/100; Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias; Grant number: FIS: PS09/00466; Grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación; Grant number: SAF07-61862 and SAF2011-25020; Grant sponsor: Spanish Ministerio de Economía y Competitividad; Grant number: CGL2008-04559/BOS.

*Correspondence to: Jose Ramos-Vivas, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla and Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV), 39011, Santander, Cantabria, Spain. E-mail: ifimav.jvivas@fmdv.org

Received 14 April 2012; Accepted 5 December 2012

DOI 10.1002/glia.22459

Published online 16 January 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

neurogenesis, electrophysiology and immunohistochemistry studies (Noraberg et al., 2005; Cho et al., 2007; Lossi et al., 2009; Pena, 2010). In addition, slice cultures have been used to study infections of the CNS with several pathogens such as *Streptococcus pneumoniae* (Gianinazzi et al., 2004; Coimbra et al., 2006), *Naegleria fowleri* (Gianinazzi et al., 2005), and *Trypanosoma brucei brucei* (Stoppini et al., 2000).

In brain tissue, microglia constitutes the monocyte-lineage immune effector cell. During bacterial infection, microglial cells play an important role in defense, by phagocytosing pathogens and removing cellular debris (Chan et al., 2003; Rock et al., 2004; Mariani and Kielian, 2009). However, microglial activation also has a detrimental role, since activated cells release proinflammatory cytokines that might cause damage to the brain, as it has been well documented during *S. pneumoniae* infections (Coimbra et al., 2006).

The microglia-bacterial pathogens interaction has been mainly studied *in vitro* using immortalized cell lines, yet this kind of study has barely been performed in 3D cultures. We report here, for the first time, the infection with *L. monocytogenes* of organotypic slice cultures from rat brains. As *L. monocytogenes* is a model organism for cellular microbiology and for host-pathogen interaction studies, this pathogen is an attractive model for studying the microglia-bacteria interactions in an *ex vivo* context. In this sense, these biological interactions have been analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Moreover, q-PCR arrays have been used to quantify the mRNA levels of 84 genes implicated in the innate and adaptive immune responses of the rat brain tissue against a clinical isolate of *L. monocytogenes*. A detailed analysis of the proinflammatory cytokines expressed along the course of the infection is also reported. The main goal of the present work is to gain understanding of the complex response of the CNS to bacterial insults to develop innovative and neuroprotective therapies.

MATERIALS AND METHODS

Organotypic Cultures

To obtain healthy organotypic slice cultures with high viability on membrane inserts, we used the interface method, introduced by Stoppini et al. (1991). Organotypic explants were obtained from newborn (7–10-day-old) Sprague Dawley rats. Their brains were carefully and quickly removed and placed in a Petri dish with Dulbecco's Modified Eagle Medium, on a cold plate to reduce metabolic activity and to facilitate smooth slicing. Brain slices, 300- μ m thick, were collected using a vibrating microtome (Microm HM 650V; Thermo Scientific). The cultures were kept in six-well-plates at 37°C in a 5%-CO₂-enriched atmosphere for at least one week before bacterial infections. The culture medium was a mixture of Basal Medium Eagle 1 \times (50%, Gibco-Invitrogen), normal horse serum (25%, Gibco-Invitrogen) and Hank's solution (25%, Gibco). Glutamine (200 mM),

D-glucose (3,74 mM, Sigma), and the antibiotics penicillin, streptomycin and amphotericin b (Gibco-Invitrogen) were also added. The medium was filtered using a 0.2- μ m pore sterile filter (Millipore). All animal care and experimental procedures were according to the Spanish legislation and the European Communities Council Directive on the "Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes" (86/609/EEC).

Bacterial Strain

Listeria monocytogenes strain HUMV-4251 was isolated from human cerebrospinal fluid at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain. Species-specific identification was made using primers specific to a portion of the hemolysin (hlyA) gene unique to *L. monocytogenes* (Kushwaha and Muriana, 2009), and confirmed by partial 16S ribosomal DNA gene sequencing.

Bacterial Infections

Listeria monocytogenes was grown on blood agar plates and cultured overnight in 10 mL of Brain Heart Infusion Broth. The suspension was centrifuged for 4 min at 5,000 rpm and then resuspended in cell culture medium with a final concentration of $\sim 10^{10}$ cfu mL⁻¹. The exact number of colony forming units (CFUs) was determined by serial dilution in phosphate buffered saline (PBS), and plating onto BHI plates. The organotypic culture medium was replaced with fresh, antibiotics-free medium at least 1 h before infections. Tissue cultures were infected on the surface with 2 μ L of medium containing 10⁷ bacteria and processed at different time points. Controls were inoculated with cell culture medium alone. To assess bacterial viability at each time point, tissues were mechanically disaggregated and the number of CFUs was determined by serial dilution in PBS and plating onto BHI plates. All data are given as mean \pm SD percentage of the number of bacteria recovered from original inoculum, from three independent experiments.

RNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) from three independent infected organotypic cultures and three controls at each time point (1, 3, 5, 12, and 24 h). The RNA concentration was quantified with a NanoDrop spectrophotometer and RNA quality was checked by electrophoresis on 1.5% agarose gel. For q-PCR arrays, the RNA was cleaned after ethanol precipitation and cDNA was generated from 400 ng of the total RNA using the SABiosciences's RT² First Strand Kit, according to the manufacturer's protocol (Qiagen), including the DNase treatment step.

Gene Expression by q-PCR cDNA Arrays

Gene expression quantification was performed using a rat innate and adaptive immune response array (PARN-052, SABiosciences-Qiagen). This kit profiles the expression of 84 genes involved in the host response to bacterial infection and sepsis, including five reference genes, namely Ribosomal protein P1 (Rplp1, GeneBank: NM_001007604), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1, GeneBank: NM_012583), Ribosomal protein L13A (Rpl13a, GeneBank: NM_173340), Lactate dehydrogenase A (Ldha, GeneBank: NM_017025) and Beta actin (Actb, GeneBank: NM_031144). This array includes genes related to the toll-like receptor (TLR) Signaling Pathways, genes involved in acute-phase response, complement activation, inflammatory response, antibacterial humoral response, as well as genes involved in septic shock. The entire list of genes present in the array is available online at <http://www.sabiosciences.com/ArrayList.php>. Amplification, data acquisition, and the melting curve were carried out by means of the CFX-Manager software (BioRad). The PCR cycling program was set as follows: stage 1: 95°C for 10 min, stage 2: 95°C for 15 sec followed by 60°C for 1 minute repeated for 40 cycles. The threshold cycle (C_t) and melting curve of each gene were automatically established and recorded by the software.

Data and Statistical Analysis

Results were analyzed using the PCR Array Data Analysis Web Portal (SABiosciences). The delta C_t (ΔC_t) method was used for PCR array data analysis. The normalized (ΔC_t) for each gene of interest (GOI) was calculated by subtracting the average C_t of the five housekeeping genes from the C_t of each GOI. Next, the double delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) for each GOI was calculated by deducting the average ΔC_t of GOI in the sham group from the ΔC_t of each GOI. The fold-change of each GOI compared with the sham group was calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$. C_t data were uploaded into the data analysis template on the manufacturer's website (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) and the P values were calculated based on a Student's t -test of the replicate ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) values for each gene in the control and infected groups. Fold-regulation represents fold-change results in a biologically meaningful way. A fold-change value greater than 1 indicates positive- or an upregulation, and the fold-regulation is equal to the fold-change. Fold-change values less than 1 indicate negative or down-regulation, and the fold-regulation is the negative inverse of the fold-change.

Quantification of Secreted IL-6 and IL-1 β by ELISA

IL-6 and IL-1 β levels in the media of brain organotypic cultures were quantified by ELISA using kits from Invitrogen (Camarillo, CA) and Thermo Scientific (Rockford, IL, USA), respectively. Following *L. monocytogenes*

infection, the culture medium was collected at different time points and filtered (0.22 μ m), and 50 μ L of supernatant were used for IL-6 and IL-1 β quantification according to the manufacturer's instructions. The optical density value was read on an ELISA microplate reader (Multiskan FC; Thermo Scientific) with an absorbance wavelength of 450 nm, and the concentrations were determined by the standard curve. At least two independent slice cultures were measured in duplicate and expressed as mean \pm standard error for the samples.

SEM

Brain organotypic cultures infected with *L. monocytogenes* recovered at different time intervals (30 min, 45 min, 1, 3, 5, 12, 18, and 24 h) were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4°C. Samples were then dehydrated in a series of graded acetone solutions, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine coat ion sputter JFC-1100 (JEOL) and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 KV.

Light Microscopy of Semithin Sections

Brain organotypic cultures were fixed in 3% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in graded acetone and propylene oxide, and embedded in Araldite (Fluka, Buchs, Switzerland). Semithin sections were cut with an LKB III ultratome, stained with 1% toluidine blue, and observed with a Zeiss Axioskop 2 *plus* microscope equipped with an AxioCam HRc digital camera.

RESULTS

SEM and Light Microscopic Observations

Control brain organotypic cultures inspected under SEM showed a smooth appearance. In most cases the continuity of the slices was disrupted by the presence of a central gap of variable size (Fig. 1A), and occasionally, small gaps were also present. The surface of the slices appeared to be formed by extremely flat cells (Fig. 1B) alternating with a dense mat of thin cell prolongations. Scattered cells across the explant surface appeared activated and showed several cell prolongations (Fig. 1B, inset). Dead cells could also be discerned (not shown), yet in low numbers. As an exception, the area surrounding the central gap was characterized by the presence of ciliated (ependyme) cells, non-ciliated cells and a few interconnected multipolar cells (Fig. 1C). The gaps in the slice allowed observation of the rough surface of the membrane insert. A variable number of cells had migrated from the brain tissue and appeared on the insert surface (Fig. 1D). Similarly, migrating cells were detected along the outer border of the explants (not shown).

Infection of the explants with *L. monocytogenes* modified the appearance of the explant surface dramatically. The smooth surface was disrupted and many cells

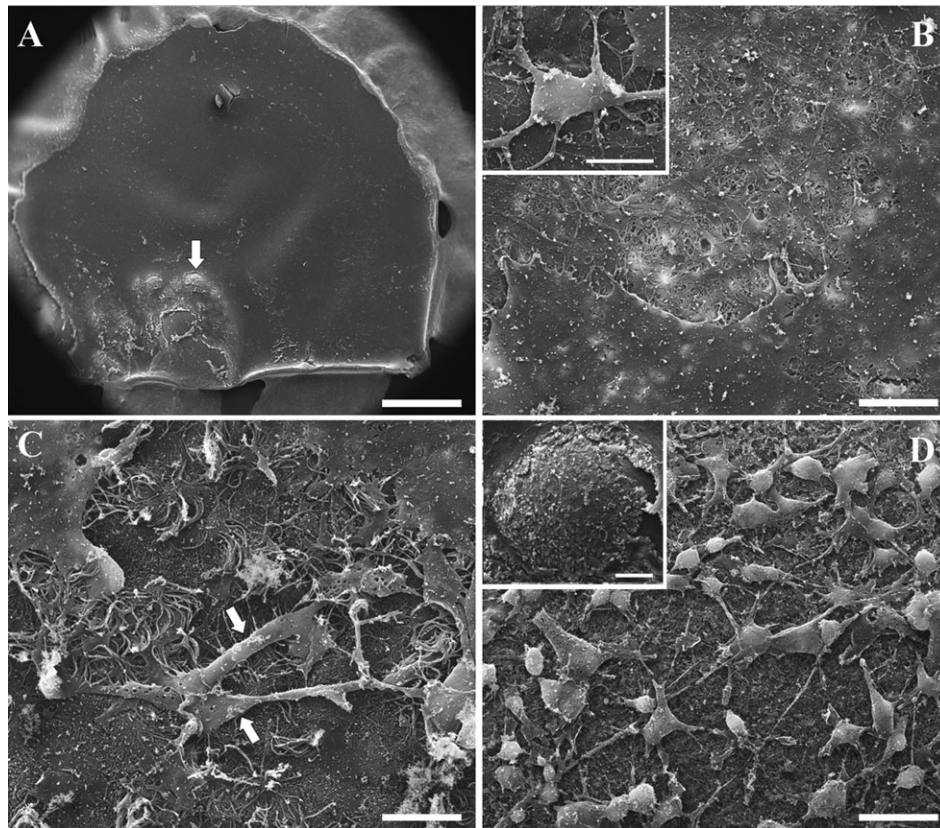


Fig. 1. Control brain organotypic cultures. (A) This panel shows one half of the entire brain slice. The cutting line appears at the bottom. Note the smooth appearance and the presence of a central gap (arrow). (B) Extremely flat cells and a dense mat of thin cell prolongations form the explant surface. Inset: Detail of an activated cell. (C) Close to the

central gap, ciliated and non-ciliated cells and multipolar cells (arrows) are observed. (D) Cells have migrated onto the insert. Inset: Panoramic of the gap. Original magnifications: (A), $\times 50$; (B), $\times 5000$; (C) $\times 5,000$; (D), $\times 2,000$, inset $\times 600$. Scale bars: (A), 1 mm; (B), 10 μm ; Inset of (B), 5 μm ; (C), 10 μm ; (D), 25 μm ; Inset of (D), 50 μm .

showed activated phenotypes with a protruding nucleus and ameboid forms. This was evident as early as 30 min postinfection (Fig. 2A). In addition, dead cells were frequently observed. Cells coming from the brain tissue were massively recruited to the surface of the explants (Fig. 2B), and many bacteria appeared to be either in the process of being internalized, or located inside the cell protruding under the cell membrane (Fig. 2C). In addition, areas dominated by the presence of ciliated cells were observed (Fig. 2D). Examination of the infected explants with the light microscope confirmed the presence of strong cell activity on explant surface (Fig. 2E). By contrast, control explants presented a smooth, regular surface (Fig. 2F). Forty-five minutes after the infection, many infected cells were clearly damaged and showed large membrane pores through which internalized bacteria could be observed (Fig. 3A). In addition, groups of bacteria enclosed by a thin membrane layer appeared to be in the process of cell extrusion (Fig. 3B). One hour after the infection, cell activity was less evident. The surface of the explants showed a few ramified cells, groups of bacteria, cell debris (Fig. 3C), and a few cell prolongations packed with bacteria that appeared to be disappearing under the explant surface (Fig. 3D). Cell activity on the explant surface was also low at 3 and 5 h after the infection. Three hours

after the infection, observation of the explant thickness along the margin of the central gaps revealed the presence of cells with spherical protrusions, many of them filled with bacteria (Fig. 4A). In addition, clumps of free bacteria and rounded cell pouches filled with bacteria accumulated on the filter surface (Fig. 4B). These aggregations were first detected 1 h after infection, but appeared more numerous at 3 h after the inoculation. Five hours after the infection the explant surface showed some activated cells and cell debris filled with bacteria (Fig. 5A,B), and many cells appeared damaged or dead. On the whole, dead cells in the infected cultures were characterized by the rupture or the disappearance of the cell membrane and exposure of the nuclear and cytoplasmic components (Fig. 3C,5B). However, apoptotic cell fragments could not be identified.

Cell activity increased on the explant surface 12 h after the infection. New phagocytic cells, as well as cells filled with bacteria, reappeared on the surface of the organotypic cultures (Fig. 6A). Many of these cells appeared to be releasing spherical, phagosome-like bodies filled with bacteria. Other cells were engulfing infected cells, phagosome-like bodies and free bacteria (Fig. 6A,B). Cell activity was also high at 18 and 24 h after the infection (Fig. 7A). However, significant differences between these two periods of infection could not

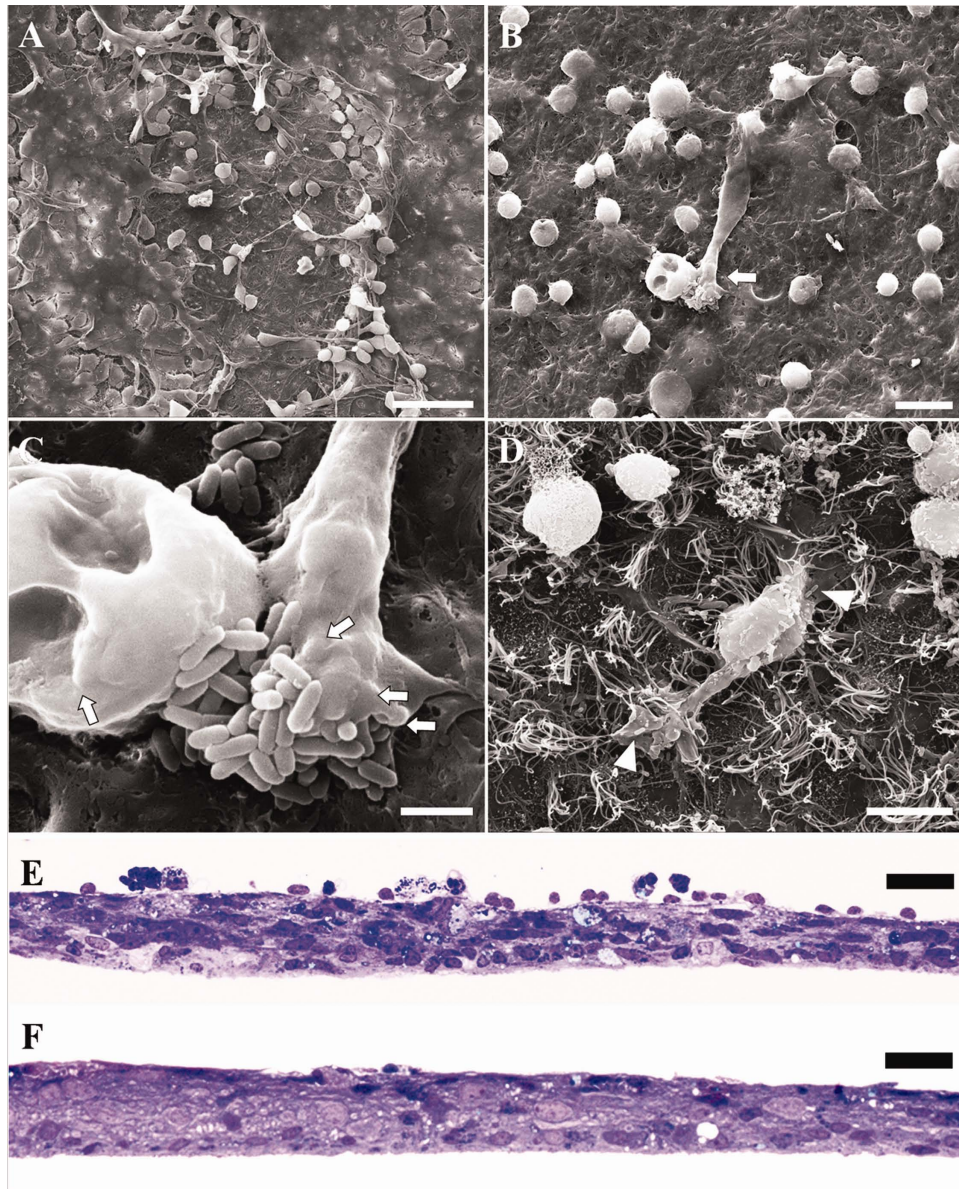


Fig. 2. 30 min postinfection. This composite shows SEM (A–D) and light microscopy (E–F) micrographs of 30 min postinfection (A–E) and control (F) organotypic cultures. (A) Numerous cells become activated at the explant surface. (B) Several cells appear to emerge from the infected tissue. Many of them are rounded; others are elongated (arrow). (C) Detail of the area indicated by arrow in (B). Numerous bacteria are being phagocytosed and protrude under the cell membrane

(arrows). (D) The ciliated area also shows activated cells in contact with bacteria (arrowheads). (E) Semithin section. Activated cells appear on the explant surface. (F) Semithin section. The explant surface is smooth in the controls. Magnification: (A), $\times 4,000$; (B and C), $\times 5,000$; (E and F), $\times 400$. Scale bars: (A and B), 20 μm ; (C), 2 μm ; (D), 10 μm ; (E and F), 25 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

be observed, as damaged cells continued to release phagosome-like bodies packed with bacteria (Fig. 7B). Activated microglia extended wide lamellae and were seen engulfing phagosomes and free bacteria (Fig. 7B,C). Large, rounded cell bodies (Fig. 7C), burst cells (Fig. 7D, inset), cell debris, and free bacteria were also frequently observed on the explant surface (Fig. 7D). It should be noted that the peripheral area of the explants was mostly free from cell activity throughout the post-infection periods (Fig. 7A).

Kinetics of Bacterial Load in the Brain Tissue

To determine whether *L. monocytogenes* is able to survive in brain organotypic cultures, the number of viable bacteria was counted at several time points. Figure 8 indicates that the *L. monocytogenes* strain used in this study was able to survive very efficiently throughout the duration of the experiment. However, a considerable reduction in the initial number of CFUs was observed with time.

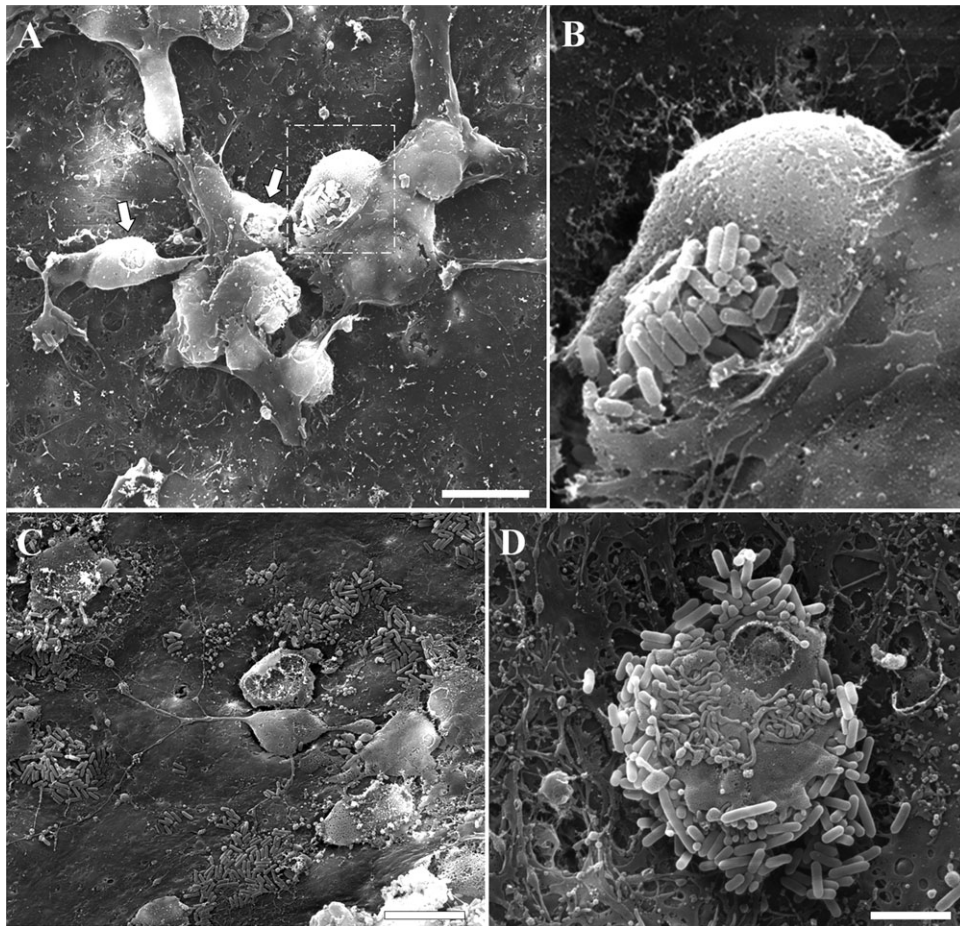


Fig. 3. 45 min and 1 h postinfection. (A) 45 min postinfection. Several cells on the explant surface show large membrane pores (arrows) that expose intracellular bacteria. (B) Detail of the boxed area in (A). Intracellular bacteria enclosed by a membranous envelope appear to be in the process of extrusion. (C) 1 h postinfection. The culture surface

shows a superficial cell with numerous cell prolongations, groups of bacteria, and several dead cells. (D) 1 h postinfection. A cell prolongation, full of bacteria, appears to be penetrating the tissue. Magnification: (A and C), $\times 5,000$; (B), $\times 10,000$; (D), $\times 15,000$. Scale bars: (A–C), 20 μm ; (D), 5 μm .

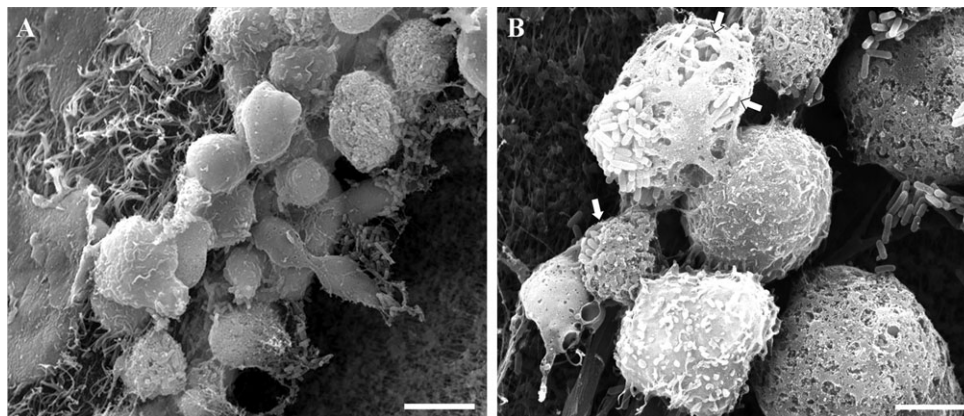


Fig. 4. 3 h postinfection. SEM micrographs of infected organotypic cultures. 3 h postinfection. (A) Free border of the brain slice along the central gap. Rounded cells, numerous membrane pouches filled with bacteria, and free bacteria can be observed. At the upper left corner, the explant surface shows ciliated ependyme cells. The membrane

insert appears on the lower right corner. (B) Phagosome-like bodies of variable size, and free bacteria, accumulate on the insert surface. Note bacteria inside phagosomes (arrows). Magnification: (A), $\times 5,000$; (B), $\times 10,000$. Scale bars: a, 10 μm ; b, 5 μm .

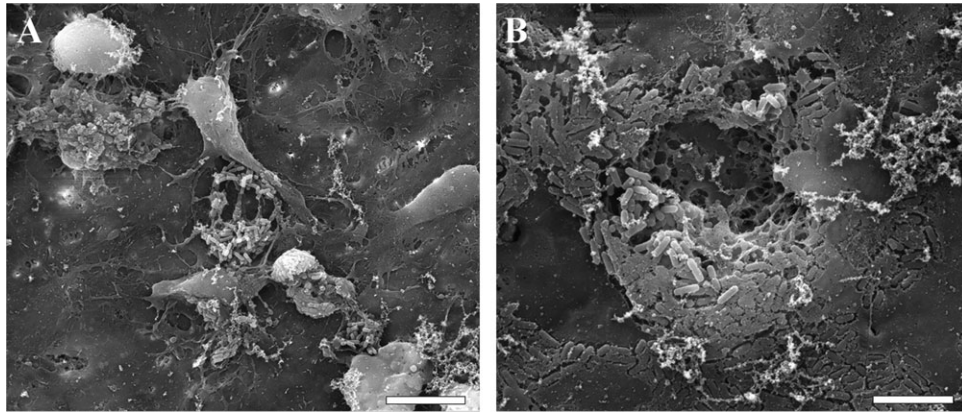


Fig. 5. 5 h postinfection. SEM micrographs of organotypic cultures 5 h postinfection. (A) A few activated cells, bacteria and cell debris remain on the surface of the culture. (B) Dead, flattened cells on the

culture surface have lost large membrane areas. Intracellular bacteria and cytoplasmic components can be observed. Magnification: (A), $\times 5,000$; (B), $\times 10,000$. Scale bars: (A), 20 μm ; (B), 5 μm .

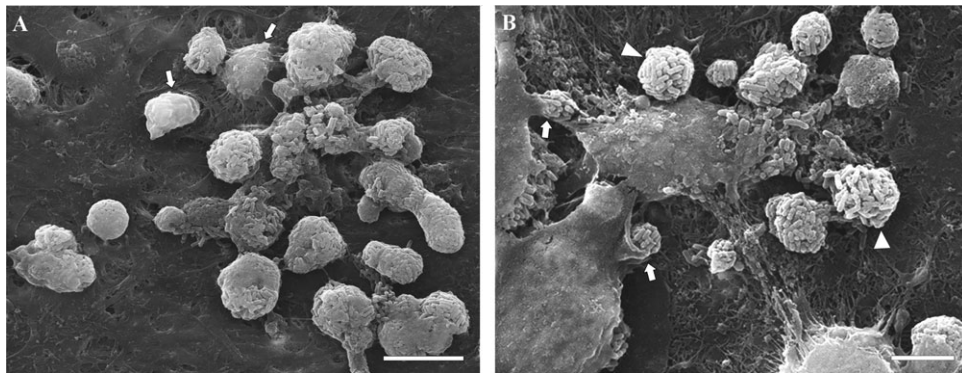


Fig. 6. 12 h postinfection. SEM micrographs of tridimensional organotypic slice cultures infected with *L. monocytogenes* for 12 h. (A) Phagocytic activated cells (arrows), bacteria, and cell debris are present on the surface of the culture. (B) Phagosome-like particles of different size

filled with bacteria (arrowheads) and large cell corpses are being phagocytosed by activated microglia. Arrows indicate phagocytosis of bacterial clumps. Original magnification: (A and B), $\times 4,000$; Scale bars: (A), 10 μm ; (B), 5 μm .

Overview of Gene Regulation

We used q-PCR arrays to identify genes that were regulated in rat brain organotypic cultures following the *ex vivo* infection with a clinical isolate of *L. monocytogenes*. The expression levels of 36 out of the 84 genes included in the q-PCR arrays used were clearly modified by the infection (Table 1). After the initial triggering of proinflammatory signals (1 h postinfection), probably due to the activation of microglial cells, most changes in gene expression occurred 5 h after the infection (19 genes upregulated and 2 down-regulated). 27 and 18 genes were upregulated at 12 and 24 h postinfection, respectively. A complete list of the genes modulated by the infection, their Gene Bank accession numbers, *P*-value, and fold expression change is shown in Tables S1–S5 (Supp. Info.). The genes for *Ccl2*, *CD14*, *Il1 α* , *Il1 β* , *Il1rn*, *Il6*, *Irf1*, *Nos2*, *Serpine1*, and *Tnf* were highly upregulated throughout the duration of the experiment. Chemokine receptors 3 (C-C motif) and 4 (C-X-C motif) were the only down-regulated genes. In contrast, several genes relevant to the innate immune response were not modulated by the infection. Among

these were TLRs such as *Tlr3*, *Tlr4*, *Tlr6*, and *Tlr9*, and enzymes such as lysozyme. Moreover, other genes (*Il10*, *Il1rap*, *Il6*, *Proc*, *Serpina1*, and *Sftpd*) were consistently modulated by the infection at different time points, despite a *P*-value greater than 0.05.

ELISA was used to confirm the induction and release of the cytokines IL-6 and IL-1 β . *L. monocytogenes* induced a significant increase in the expression of the two cytokines 5 h after the infection (Fig. 9). The level of expression of both cytokines peaked at 12 h postinfection, decreasing at 24 h postinfection.

DISCUSSION

Most of our knowledge on the immune response to listeriosis is based on studies of chronic and systemic infections carried out in rodents (Michelet et al., 1999; Pamer, 2004; Lecuit, 2007). The *ex vivo* organotypic cultures used here constitute a versatile tool to study, in experimentally controlled conditions, a large variety of biological pathways relevant to the cerebral phase of bacterial listeriosis. To unravel the interaction of

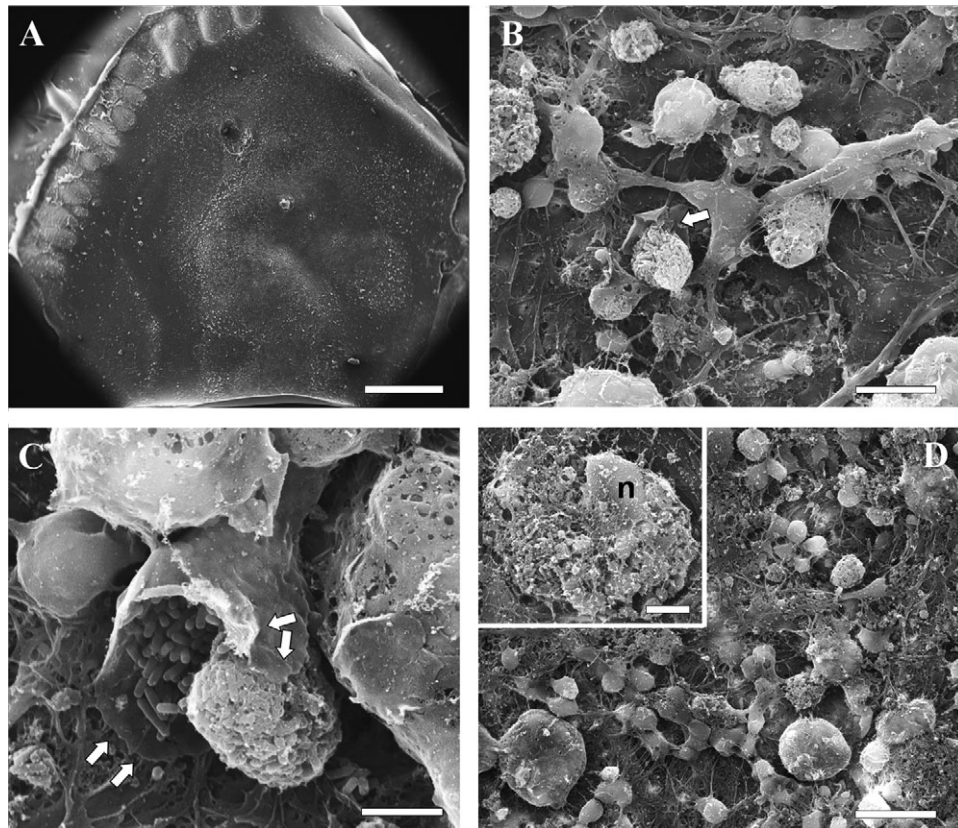


Fig. 7. 24 h postinfection. SEM micrographs of infected organotypic cultures. 24 h postinfection. (A) This panel shows one half of the entire brain slice. The cutting line is parallel to the bottom. The roughness of the surface is due to cell activation (compare to Fig. 1A). (B) Activated cells, phagosome-like bodies, cell debris and free bacteria appear at the explant surface. One of the phagosomes is partially surrounded by a lamellar expansion (arrow). (C) A large cell pseudopodium (arrows) is

engulfing cell debris and free bacteria. (D) Rounded cell bodies, cell debris and free bacteria accumulate on the explant surface. Inset: A burst cell shows a mixing of cytoplasmic debris and bacteria. The nucleus (n) appears conserved. Magnification: (A), $\times 50$; (B), $\times 5000$; (C), $\times 10,000$; (D), $\times 2,000$; Inset, $\times 7,000$. Scale bars: (A), 1 mm; (B), 10 μm ; (C), 5 μm ; (D), 25 μm ; Inset of (D), 5 μm .

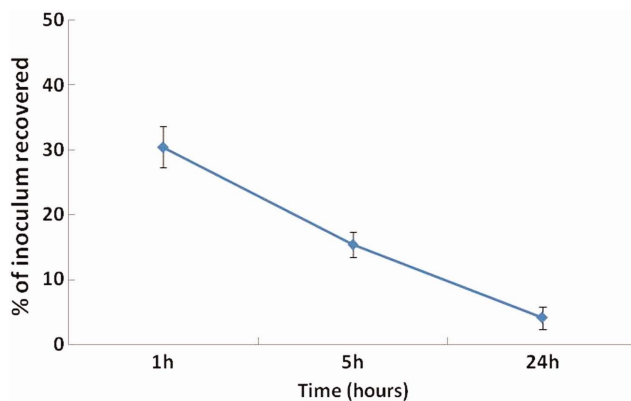


Fig. 8. Overtime survival of *L. monocytogenes* in brain tissue. Organotypic cultures were infected with *L. monocytogenes* for 1, 5, and 24 h. All data are given as mean \pm SD of the number of bacteria recovered expressed as a % of the original inoculum, from three independent experiments measured. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

L. monocytogenes with the cerebral tissue, we have selected the analysis of the innate and adaptive immune response using q-PCR arrays. In addition, the interaction of *Listeria* with the explanted tissue was analyzed by SEM.

The q-PCR arrays reveal that 30 genes were either up- or down-regulated more than twofold over the course of the experiments (statistically significant, $P < 0.05$). For instance, several TLRs are upregulated at different time points ($P < 0.05$). TLRs play key roles in the recognition of microbial components and in the modulation of the innate immune responses (Kawai and Akira, 2011). TLR1 and TLR2 were upregulated as early as 1 h postinfection, with their expression remaining relatively constant throughout the study. However, upregulation of TLR10 did not occur until 3 h after the infection (5 times, $P < 0.05$). The TLR-interacting protein genes involved in the NF- κ B signaling, MyD88 and Irak2 were also significantly upregulated up to 12 h postinfection. In addition, the expression of several of the TLRs downstream target genes, such as Ccl2, Il1 α , Il1 β , Il1rn, Il6, and Tnf, increased in brain tissue 5 h after *Listeria* infection.

The Ccl2 chemokine (also known as MCP-1) is a chemo attractant protein and a potent neuromodulator of the CNS. Ccl2 appears to play an important role in the recruitment of monocytes into the infection site during mouse listeriosis (Bubonja et al., 2006). Another important upregulated gene during the experimental

TABLE 1. Gene Expression after Infection of Organotypic cultures with *L. monocytogenes*

Symbol	Description	Fold regulation				
		Time postinfection				
		1 h	3 h	5 h	12 h	24 h
Adora2a	Adenosine A2a receptor				4.5148 ^a	
Camp	Cathelicidin antimicrobial peptide				3.0624 ^a	
Casp1	Caspase 1				2.8115 ^a	
Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase			5.167 ^a	4.7393 ^b	
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2		12.1426 ^a	225.3463 ^b	173.8059 ^a	84.8789 ^a
Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3			(-) 3.2281 ^a		
Cd14	CD14 molecule	4.9565 ^b		58.8648 ^b	21.2786 ^a	15.5337 ^a
Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4		(-)2.1705 ^a	(-) 3.0539 ^a		
Cybb	Cytochrome b-245, beta polypeptide				5.3443 ^a	5.6857 ^a
Hmox1	Heme oxygenase (decycling) 1				4.4219 ^a	
Ifngr2	Interferon gamma receptor 2			3.8709 ^a		
Il10	Interleukin 10	2.5303 ^b				
Il1a	Interleukin 1 alpha	54.0417 ^b		423.436 ^a	165.192 ^a	17.3556 ^a
Il1b	Interleukin 1 beta	53.6684 ^b	29.2832 ^b	669.0638 ^a	198.7301 ^a	44.2417 ^a
Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I	2.5775 ^a		3.2625 ^a	2.2942 ^a	2.8959 ^a
Il1rap	Interleukin 1 receptor accessory protein				2.4817 ^b	
Il1rn	Interleukin 1 receptor antagonist	4.1106 ^b		32.1334 ^b	26.0161 ^a	11.7996 ^a
Il6	Interleukin 6	16.6717 ^b		413.7647 ^b	143.808 ^b	12.1594 ^b
Irak2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	2.0744 ^a		8.893 ^a	4.599 ^b	
Irf1	Interferon regulatory factor 1	4.8658 ^b		25.3281 ^a	6.7179 ^b	2.8626 ^b
Lpb	Lipopolysaccharide binding protein				2.5931 ^b	4.2398 ^a
Myd88	Myeloid differentiation primary response gene 88			2.2963 ^a	2.1856 ^a	
Ncf4	Neutrophil cytosolic factor 4		3.0568 ^a		2.8115 ^b	2.9773 ^a
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1			12.7521 ^a		2.0477 ^a
Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	3.9614 ^b		18.6702 ^a	5.8889 ^b	3.5162 ^b
Nfkbia	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	4.9565 ^b	7.6493 ^a	20.3365 ^a	10.019 ^b	
Nlr4	NLR family, CARD domain containing 4	2.0364 ^a			3.0342 ^a	2.2985 ^a
Nos2	Nitric oxide synthase 2, inducible		51.4584 ^a	430.3401 ^b	465.0794 ^a	331.7609 ^a
Proc	Protein C	2.2647 ^b				
Serpina1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, member 1)	2.7308 ^b				
Serpine1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	3.0511 ^b		42.8929 ^a	99.3651 ^a	64.1777 ^a
Sftpd	Surfactant protein D	2.3016 ^b				
Tlr1	Toll-like receptor 1				4.8613 ^a	5.6464 ^a
Tlr2	Toll-like receptor 2	2.6561 ^a		10.098 ^a	4.5253 ^a	
Tlr10	Toll-like receptor 10		5.2367 ^a			
Tnf	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	27.8447 ^b		118.8227 ^a	11.7778 ^b	4.9383 ^b

Immune-related genes in organotypic cultures whose transcript levels exhibited twofold or greater modulation after infection with *L. monocytogenes* at the indicated time-points.

^aDenote genes upregulated or down-regulated (-) in infected tissues with respect to the controls with a fold regulation >2 and a P-value <0.05.

^bDenote genes consistently upregulated or down-regulated (-), in all the infected tissues with respect to controls and a fold regulation >2.

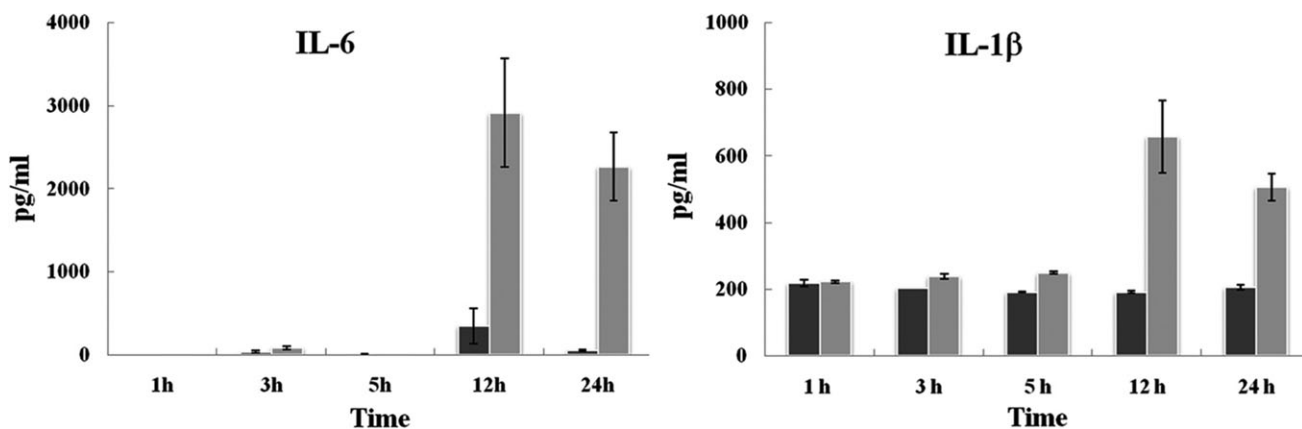


Fig. 9. ELISA of IL-6 and IL-1 β . Bargrams show IL-6 and IL-1 β levels (mean \pm SEM) in rat organo-typic slice culture media, as assessed by ELISA. Controls were inoculated with cell culture medium alone.

infection was the myeloid differentiation antigen CD14. CD14 binds bacterial ligands and receptors to the phagocyte surface, and mediates phagocytosis of bacteria and clearance of cell debris (Devitt et al., 2003).

The upregulation of TLRs, Ccl2, CD14, and genes of the NF-kB pathway observed in our study fits well with the activation of phagocytes and with bacterial phagocytosis. *In vivo*, microglial cells, the resident innate

immune effector cells of the CNS, express most types of TLRs (Olson and Miller, 2004). Activated microglia are attracted to the site of infection and show amoeboid forms (Rock et al., 2004; Djukic et al., 2006; Wittwer et al., 2010). Also, *in vivo*, other monocyte types may be attracted to the site of infection (Drevets et al., 2004). However, in our *ex vivo* model, invading inflammatory cells, or cells that cross the blood brain barrier to the site of infection, can be discarded, and thus, the phagocytes showing amoeboid forms and capturing large amounts of bacteria should correspond to microglial cells activated by the presence of *Listeria*.

One of the features that allows *L. monocytogenes* to establish an infection is its ability to overcome the innate immune response of the macrophages (Dussurget, 2008). We show here that *L. monocytogenes* is quickly captured by activated microglia. However, intracellular survival of *L. monocytogenes* appears to represent an important pathogenic mechanism in invasive infections. The infected microglia moves towards the inner side of the explant, carrying bacteria inside the tissue, suggesting the existence of a Trojan horse mechanism, where infected phagocytes release their dangerous cargo inside the mice brains (Drevets et al., 2004). Furthermore, *L. monocytogenes* has the ability to do a cell-to-cell spread (Pizarro-Cerda and Cossart, 2006) which may increase the severity of the infection. Our SEM observations also indicate that microglial cells may die in situ (on tissue surface) or they may return to the surface filled up with uncontrolled bacterial cargo, and die. Following this, other microglial cells become activated and appear to be responsible for further bacterial phagocytosis and the removal of cell debris. These cycles may perpetuate the infection by *L. monocytogenes*. Alternatively, continuous cycles of microglial cell lysis and phagocytosis, concomitant with the release of bactericidal products (i.e., continuous nitric oxide production), could induce bacterial death. In agreement with this hypothesis, the total bacterial load in the infected explants decreases with time. Moreover, phagocytic and proinflammatory activities could also be responsible for the formation of brain abscesses that accumulate necrotic material containing inflammatory cells, proteins, bacteria and cellular debris.

In addition to their beneficial effects, microglial activation can elicit responses that may contribute to brain tissue damage. Activated microglia release several cytokines/chemokines and other secretory products, including metalloproteinases and excitatory amino acids, which potentially contribute to inflammation and neuro-pathogenesis (Czeh et al., 2011). We observed that gene expression of the inflammatory mediators Ccl2, Il1 α , Il1 β , Il6, and Tnf increases more than 100-fold after *Listeria* infection. The inflammatory cytokines encoded by those genes can exacerbate secondary brain injury after the infection (Denes et al., 2010; Wirenfeldt et al., 2011). For instance, TNF- α is rapidly produced after infection with *L. monocytogenes* (Virna et al., 2006). Furthermore, TNF damages the brain by disturbing the blood-brain-barrier, contributes to edema formation, attracts increas-

ing numbers of inflammatory cells, and induces neuronal cell death (McCoy and Tansey, 2008; McCoy et al., 2011). We have also confirmed the existence of post-transcriptional control mechanisms in the regulation of the expression of several of those proteins. *L. monocytogenes* induced a significant increase in the levels of the IL-6 and IL-1 β cytokines 5 h after the infection. Cytokine levels peaked 12 h postinfection and decreased at 24 h postinfection. The ELISA method indicated that protein levels of both cytokines increased after mRNA gene expression. Gene expression data indicated the existence of a delay between the highest level of gene expression and the peak of protein levels.

Damage to neurons and astrocytes may also arise from the generation of reactive oxygen and nitrogen intermediates (Rock et al., 2004; Gerber and Nau, 2010; Czeh et al., 2011). *In vivo* studies have demonstrated that the lipoteichoic acid, a wall component of Gram-positive bacteria, can induce microglia to release nitric oxide (NO) via signal transduction pathways that involve multiple receptors, including CD14 (Chien et al., 2005). We have detected upregulation of Nos2 (inducible nitric oxide synthase 2) 3 h after the infection (51-fold regulation) and at the subsequent time-points (430-, 465-, and 331-fold regulation at 5, 12, and 24 h postinfection, respectively). However, other studies indicate that the role of NO in infections could be protective (Remer et al., 2001).

Listeria infection also upregulated other genes, such as the serine peptidase inhibitor Serpine1 and the adenosine A2a receptor. Serpin protein superfamily regulates the function of serine and cysteine proteases in diverse processes (i.e., complement activation, fibrinolysis, and extracellular matrix degradation) and several members of this superfamily are expressed during the infection by intracellular pathogens such as *Mycobacterium* and *Salmonella* (Hamerman et al., 2002). Data from these works suggest that serpins regulate intracellular proteases. In our study, Serpine1 appeared upregulated at 5, 12, and 24 h postinfection. The adenosine A2a receptor (Adora2a) was upregulated at 12 h postinfection. Genetic and pharmacological evidence indicates that endogenous adenosine receptors play a nonredundant, protective role in inflammatory processes (Ohta and Sitkovsky, 2001). It is likely that they play a similar protective role following *Listeria* infection.

Interestingly, an antimicrobial peptide is also upregulated in our model system. Antimicrobial peptides are evolutionarily conserved components of the innate immune system that defend against invading bacteria. The rat homologue of the human cathelicidin LL-37, rCRAMP (cathelicidin antimicrobial peptide, "Camp"), is present in rat brain extracts and exhibits *in vitro* activity against the neuropathogenic bacterium *Neisseria meningitidis* (Bergman et al., 2005). The upregulation of rCRAMP mRNA in our model suggests that rCRAMP could also play a role in the innate immunity of the CNS against *L. monocytogenes*.

Collectively, our results show that TLR1, TLR2, TLR10, MyD88-dependent target genes (all Interleukin-1 family

related genes) and several cytokines and chemokines, are implicated in the innate immune response against *L. monocytogenes*. As a general conclusion, brain tissue infection with *L. monocytogenes* provokes the activation of a mix of proinflammatory and anti-inflammatory signals. A direct effect of this unbalance may be the triggering of cell death mechanisms.

Cell death, when induced by bacterial pathogens, eliminates host cells and suppresses immune functions. Two main modes of cell death can be identified: apoptosis (anti-inflammatory) and necrosis (proinflammatory), and each one is controlled by the activity of specific caspases (Siegel, 2006). For instance, an inflammatory form of cell death called pyroptosis is Caspase-1 dependent (Miao et al., 2011). Caspase-1 induces pyroptotic cell death through the activation of the cytokine interleukin-1 β . In our study, the expression of Caspase-1 remains unchanged in relation to the controls, except at 12 h postinfection (2.8 upregulation). This would suggest the existence of apoptotic cell death in our tissue model. However, morphologic signs of apoptosis, such as the release of apoptotic fragments, were never observed. On the contrary, the presence of membrane pores and large areas of membrane disruption, burst cells exposing cytoplasmic components together with bacteria, irregular cell remnants and conservation of the cell nucleus, suggest a necrotic cell death. Interestingly, we found that interleukin-1 β was highly upregulated 5 h after the infection and that most of the cell death occurs after this time period. Previous studies have shown that several bacterial pathogens induce pyronecrosis, a different form of necrosis that is Caspase-1-independent but IL-1 β dependent (Willingham et al., 2007; Craven et al., 2009; Willingham et al., 2009). The gene expression data and the cell morphology suggest that a similar form of necrosis occurs in the present *ex vivo* model.

Finally, it should be noted that Caspase-1 activation and pyroptosis depend on the presence of protein complexes, termed inflammasomes. For instance, the NLR4 inflammasome induces caspase-1 activation, secretion of IL-1 β and pyroptosis during *L. monocytogenes* infection of marrow-derived murine macrophages (Wu et al., 2010). We have found that the Nlrc4 inflammasome gene is upregulated at several time points during *L. monocytogenes* infection while Caspase-1 is not. Clearly, further studies are needed to precisely determine the role of inflammasomes during bacterial infection of the CNS.

In conclusion, we have used *ex vivo* organotypic cultures from rat brains for the first time to examine the basis of the interactions between *L. monocytogenes* and the nervous tissue. Our study analyzes the expression of 84 genes, describing, at least partially, the immune response of the brain tissue. In addition, the use of SEM allows study the response of microglial cells to the presence of pathogens. Cycles of microglial phagocytosis, necrotic cell death and the subsequent removal of cell debris are observed for the first time. Our observations are compatible with a Trojan horse mechanism of cerebral listeriosis. This model system could be of

help in the design of specific immunomodulatory therapies for this and other important opportunistic infections.

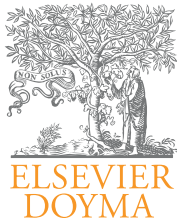
ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Beatriz Romero Presno for excellent technical assistance. The authors thank the Servicio de Inmunología-HUMV for support. SRM holds a research contract from the Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV). LPO is recipient of a fellowship from the Agencia Española para la Cooperación Internacional (AECI). VIV is recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2008-006088). JRV holds a Miguel Servet contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

REFERENCES

- Barrila J, Radtke AL, Crabbe A, Sarker SF, Herbst-Kralovetz MM, Ott CM, Nickerson CA. 2010. Organotypic 3D cell culture models: Using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 8:791–801.
- Bergman P, Termen S, Johansson L, Nystrom L, Arenas E, Jonsson AB, Hokfelt T, Gudmundsson GH, Agerberth B. 2005. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat. *J Neurochem* 93:1132–1140.
- Bubonja M, Wraber B, Brumini G, Gobin I, Veljkovic D, Abram M. 2006. Systemic and local CC chemokines production in a murine model of *Listeria monocytogenes* infection. *Mediators Inflamm* 2006:54202.
- Chan A, Seguin R, Magnus T, Papadimitriou C, Toyka KV, Antel JP, Gold R. 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: Termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43:231–242.
- Chien HF, Yeh KY, Jiang-Shieh YF, Wei IH, Chang CY, Chang ML, Wu CH. 2005. Signal transduction pathways of nitric oxide release in primary microglial culture challenged with gram-positive bacterial constituent, lipoteichoic acid. *Neuroscience* 133:423–436.
- Cho S, Wood A, Bowlby MR. 2007. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol* 5:19–33.
- Clauss HE, Lorber B. 2008. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. *Curr Infect Dis Rep* 10:300–306.
- Coimbra RS, Voisin V, de Saizieu AB, Lindberg RL, Wittwer M, Leppert D, Leib SL. 2006. Gene expression in cortex and hippocampus during acute pneumococcal meningitis. *BMC Biol* 4:15.
- Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, Ting JP, Duncan JA. 2009. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One* 4:e7446.
- Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. 2011. The Yin and Yang of Microglia. *Dev Neurosci* 33:199–209.
- Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RB, Lambert H, Wallin RP, Chambers BJ, Barragan A. 2011. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 79:3046–3052.
- Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. 2010. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 24:708–723.
- Devitt A, Pierce S, Oldreive C, Shingler WH, Gregory CD. 2003. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: The role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ* 10:371–382.
- Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Bruck W, Priller J, Nau R, Prinz M. 2006. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain* 129:2394–2403.
- Drevets DA, Bronze MS. 2008. *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:151–165.

- Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Van Rooijen N, Ehrchen J, Sunderkotter C, Leenen PJ. 2004. The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* 172:4418–4424.
- Dussurget O. 2008. New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:1–38.
- Gerber J, Nau R. 2010. Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* 23:312–318.
- Gianinazzi C, Grandgirard D, Simon F, Imboden H, Joss P, Tauber MG, Leib SL. 2004. Apoptosis of hippocampal neurons in organotypic slice culture models: Direct effect of bacteria revisited. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:610–617.
- Gianinazzi C, Schild M, Muller N, Leib SL, Simon F, Nunez S, Joss P, Gottstein B. 2005. Organotypic slice cultures from rat brain tissue: A new approach for *Naegleria fowleri* CNS infection in vitro. *Parasitology* 131:797–804.
- Hamerman JA, Hayashi F, Schroeder LA, Gygi SP, Haas AL, Hampson L, Coughlin P, Aebersold R, Aderem A. 2002. Serpin 2a is induced in activated macrophages and conjugates to a ubiquitin homolog. *J Immunol* 168:2415–2423.
- Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637–650.
- Kushwaha K, Muriana PM. 2009. Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. *J Food Prot* 72:2125–2131.
- Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O. 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232:119–130.
- Lecuit M. 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* 11:430–436.
- Lecuit M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect* 9:1216–1225.
- Lorber B. 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis* 24:1–9.
- Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. 2009. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 88:221–245.
- Mariani MM, Kielian T. 2009. Microglia in infectious diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:448–461.
- McCoy MK, Ruhn KA, Blesch A, Tansey MG. 2011. TNF: A key neuro-inflammatory mediator of neurotoxicity and neurodegeneration in models of Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol* 691:539–540.
- McCoy MK, Tansey MG. 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: Implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- Miao EA, Rajan JV, Aderem A. 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* 243:206–214.
- Michelet C, Leib SL, Bentue-Ferrer D, Tauber MG. 1999. Comparative efficacies of antibiotics in a rat model of meningoencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1651–1656.
- Moragas M, Martinez-Yelamos S, Murillo O, Fernandez-Viladrich P. 2010. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes* in adults: Six cases and review of the literature. *Enferm Infect Microbiol Clin* 28:87–94.
- Mylonakis E, Hohmann EL, Calderwood SB. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77:313–336.
- Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, Meyer M, Gramsbergen JB, Zimmer J. 2005. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:435–452.
- Ohta A, Sitkovsky M. 2001. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414:916–920.
- Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916–3924.
- Pamer EG. 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 4:812–823.
- Pena F. 2010. Organotypic cultures as tool to test long-term effects of chemicals on the nervous system. *Curr Med Chem* 17:987–1001.
- Pizarro-Cerda J, Cossart P. 2006. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol* 208:215–223.
- Remer KA, Jungi TW, Fatzer R, Tauber MG, Leib SL. 2001. Nitric oxide is protective in listeric meningoencephalitis of rats. *Infect Immun* 69:4086–4093.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942–964; table of contents.
- Siegel RM. 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 6:308–317.
- Stoppini L, Buchs PA, Brun R, Muller D, Duport S, Parisi L, Seebeck T. 2000. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Trypanosoma brucei brucei*. *Int J Med Microbiol* 290:105–113.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173–182.
- Virna S, Deckert M, Lutjen S, Soltek S, Foulds KE, Shen H, Korner H, Sedgwick JD, Schluter D. 2006. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis. *J Immunol* 177:3972–3982.
- Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, Brickey WJ, Huang MT, Taxman DJ, Duncan JA, Ting JP. 2009. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 183:2008–2015.
- Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. 2007. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2:147–159.
- Wirenfeldt M, Babcock AA, Vinters HV. 2011. Microglia—Insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system. *Histol Histopathol* 26:519–530.
- Wittwer M, Grandgirard D, Rohrbach J, Leib SL. 2010. Tracking the transcriptional host response from the acute to the regenerative phase of experimental pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis* 10:176.
- Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 2010. Involvement of the AIM2, NLRP3, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol* 30:693–702.
- Zlotkin A, Chiltonczyk S, Eyngor M, Hurvitz A, Ghittino C, Eldar A. 2003. Trojan horse effect: Phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infect Immun* 71:2318–2325.



Inmunología

www.elsevier.es/inmunologia



Original article

Absence of core autophagy gene expression in an *ex vivo* central nervous system model infected with *Listeria monocytogenes*

Sara Remuzgo-Martínez^a, David San Segundo^b, Carolina Santa Cruz^b, Ignacio Beares^b, Elsa María Valdizán^{c,d,e}, Jose Manuel Icardo^f, Jose Ramos-Vivas^{a,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Cantabria, Spain

^b Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Cantabria, Spain

^c Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

^d Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (UC-CSIC-SODERCAN), Santander, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Spain

^f Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2013

Accepted 2 April 2013

Available online 14 June 2013

Keywords:

Autophagy

Listeria monocytogenes

Gene expression

Organotypic cultures

Central nervous system

ABSTRACT

Recent studies have suggested that autophagy can act as a protective immune mechanism against *Listeria monocytogenes* infection. *L. monocytogenes* is a Gram-positive, facultatively intracellular bacterium that causes invasive diseases in humans and animals, particularly in the central nervous system (CNS). Human listeriosis of the CNS can manifest in many ways, including meningitis and brain abscesses. The initial line of defence against bacterial colonisation is provided by microglia, resident phagocytes of the CNS parenchyma. Microglial cells are also well known for clearing dead and dying neural cells after injury, and therefore play a key role in infectious diseases and neurodegeneration.

Little is known about the role of the autophagy pathway in host-pathogen interactions in the brain as most *in vitro* studies have used macrophages or epithelial cells to study this interaction. In the present work, a quantitative real time-PCR array analysis was performed to assess autophagy-related gene expression in a brain rat *ex vivo* organotypic nervous system model during *L. monocytogenes* infection. We found that, in brief, core autophagy gene expression is not modulated by the infection, despite the presence of intense microglial phagocytic activity on the brain tissue surface that can be seen by scanning electron microscopy. We conclude that, in our model, autophagy could play a role in homeostasis in the damaged brain tissue instead of an immune-relevant pathway.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: ifimav.jvivas@fmdv.org (J. Ramos-Vivas).

Ausencia de expresión de genes centrales de autofagia en un modelo *ex vivo* de sistema nervioso central infectado con *Listeria monocytogenes*

R E S U M E N

Palabras clave:

Autofagia
Listeria monocytogenes
 Expresión génica
 Cultivos organotípicos
 Sistema nervioso central

Estudios recientes han evidenciado que la autofagia puede actuar como un mecanismo inmune protector frente a la infección con *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* es una bacteria grampositiva, intracelular facultativa, que causa enfermedades invasivas en humanos y animales, especialmente en el sistema nervioso central (SNC). La listeriosis humana en el SNC puede manifestarse de diferentes maneras, incluyendo meningitis y abscesos cerebrales. La línea principal de defensa frente a las infecciones bacterianas es proporcionada por la microglía, fagocitos residentes del parénquima del SNC. Las células de microglía son conocidas, también, por eliminar las células dañadas o muertas tras un daño cerebral, y por lo tanto desempeñan un papel clave en las enfermedades infecciosas y neurodegenerativas.

Se sabe poco sobre el papel de la autofagia en las interacciones entre el hospedador y el patógeno, debido a que la mayoría de los estudios *in vitro* han usado macrófagos o células epiteliales. En el presente trabajo hemos utilizado matrices de PCR en tiempo real para analizar la expresión de genes de autofagia en un modelo organotípico de cerebro de rata infectado con *L. monocytogenes*. Hemos observado que, en general, la expresión de genes centrales de la autofagia no está modulada por la infección, a pesar de la presencia de una intensa actividad fagocítica de la microglía en la superficie del tejido cerebral, observada mediante microscopía electrónica de barrido. Concluimos que, en nuestro modelo, la autofagia podría desempeñar un papel clave en la homeostasis del tejido dañado en lugar de tener un papel inmune relevante.

© 2013 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Introduction

Autophagy is a fundamental homeostatic process in which cellular cytoplasmic targets are sequestered within double-membraned autophagosomes and subsequently delivered to lysosomes for degradation.¹ In addition to the degradation of damaged organelles, autophagy has received attention as a crucial component of innate defence against a variety of infectious agents, including parasites, viruses and bacteria.²⁻⁴ Therefore, the many presently recognised roles of autophagy in innate and adaptive immunity have been steadily increasing in complexity.^{5,6} Autophagy of virulent pathogens has emerged as a powerful method of eliminating intracellular bacteria while the exact mechanism of bacterial recognition by autophagy remains unknown.^{7,8} Moreover, the role of autophagy in bacterial elimination by microglia, the resident immune cells in the central nervous system (CNS), is much less clear.

Listeria monocytogenes, a Gram-positive, facultative intracellular bacterium, is responsible for severe foodborne infections in humans. More than 50% of cases correspond to septicaemia, and around 25% to CNS infections.⁹ This pathogen has the ability to cross the intestinal, placental and blood-brain barriers.¹⁰ Listeriosis occurs primarily in immunocompromised individuals, causing septicaemia, brain abscesses, meningitis; and spontaneous abortion in pregnant women. *L. monocytogenes* has been shown to interact with the host autophagic machinery.^{11,12} However, most studies on *Listeria* and autophagy have been carried out using epithelial or macrophage cell lines, not neurons or microglia.

Microglial activation is a key factor in the defence of the neural parenchyma against infectious diseases, inflammation, trauma, ischaemia and neurodegeneration. Recently, we used a CNS model to study the interactions between *L. monocytogenes* and microglia *ex vivo*.¹³ In this model, cycles of microglial phagocytosis against *L. monocytogenes* and necrotic cells were clearly shown, accompanied by a strong expression of immune relevant genes.

As autophagy eliminates intracellular pathogens in a process without damaged intracellular organelles, and some immune defence components induce or increase autophagy, it is important to study the cooperation between immune and autophagic genes. In the present work, quantitative RT-PCR array analyses were performed to study autophagy-related gene expression in a rat *ex vivo* organotypic nervous system model.

Materials and methods

Bacterial strain

L. monocytogenes strain HUMV-4251 was isolated from human cerebrospinal fluid at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain. Species-specific identification was confirmed by partial 16S ribosomal DNA gene sequencing.

Organotypic cultures

Organotypic explants were obtained from newborn (7–10-day-old) Sprague Dawley rats. Their brains were carefully and

quickly removed and placed in a Petri dish with Dulbecco's Modified Eagle Medium, on a cold plate to reduce metabolic activity and to facilitate smooth slicing. Brain slices, 300- μm thick, were collected using a vibrating microtome (Microm HM 650V; Thermo Scientific). The cultures were kept in six-well-plates at 37 °C in a 5%-CO₂-enriched atmosphere for at least one week before bacterial infections. The culture medium was a mixture of Basal Medium Eagle 1 \times (50%, Gibco-Invitrogen), normal horse serum (25%, Gibco-Invitrogen) and Hank's solution (25%, Gibco). Glutamine (200 mM), D-glucose (3.7 mM, Sigma), and the antibiotics penicillin, streptomycin and amphotericin b (Gibco-Invitrogen) were also added. The medium was filtered using a 0.2- μm pore sterile filter (Millipore). All animal care and experimental procedures were according to the Spanish legislation and the European Communities Council Directive on the "Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes" (86/609/EEC).

Bacterial infections

L. monocytogenes was grown on blood agar plates and cultured overnight in 10 mL of Brain Heart Infusion (BHI) Broth. The suspension was centrifuged for 4 min at 5000 rpm and then resuspended in cell culture medium with a final concentration of $\sim 10^{10}$ cfu mL⁻¹. The number of colony forming units (CFUs) was determined by serial dilution in phosphate buffered saline (PBS), and plating onto BHI plates. The organotypic culture medium was replaced with fresh, antibiotics-free medium at least 1 h before infections. Tissue cultures were infected on the surface with 2 μL of medium containing 10⁷ bacteria. Controls were inoculated with cell culture medium alone.

Scanning electron microscopy (SEM)

Brain organotypic cultures infected with *L. monocytogenes* recovered at 5 and 12 h, and the respective controls were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4 °C. Samples were then dehydrated in a series of graded acetone solutions, dried by sputter JFC-1100 (JEOL) and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 kV.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from four independent infected organotypic cultures and three controls at each time point (5 and 12 h) using TRIzol (Invitrogen). The RNA concentration was quantified with a NanoDrop spectrophotometer and RNA quality was checked by electrophoresis on 1.5% agarose gel. For q-PCR arrays, the RNA was cleaned after ethanol precipitation and cDNA was generated from 400 ng of the total RNA using the SABiosciences's RT² First Strand Kit, according to the manufacturer's protocol (Qiagen), including the DNase treatment step.

Gene expression by q-PCR cDNA arrays and statistical analysis

Gene expression quantification was performed using a rat autophagy array (PARN-084, SABiosciences-Qiagen). This kit

profiles the expression of 84 genes involved in autophagy (Table S1). The array includes genes that encode components of the molecular machinery and key regulators modulating autophagy in response to both extracellular and intracellular signals, genes involved in autophagic vacuole formation, genes responsible for protein targeting to membrane and protein transport, protein ubiquitination, genes linking autophagosomes with lysosomes, co-regulators of autophagy and apoptosis, and autophagy genes induced by intracellular pathogens (Table S2). Moreover, the array includes five reference genes namely ribosomal protein P1 (Rplp1), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt1), ribosomal protein L13A (Rpl13a), lactate dehydrogenase A (Ldha), and beta actin (Actb).

Amplification and data acquisition were carried out by using the CFX-Manager software (BioRad). The PCR cycling programme was set as follows: stage 1: 95 °C for 10 min, stage 2: 95 °C for 15 s followed by 60 °C for 1 min, repeated for 40 cycles. The threshold cycle (C_t) of each gene was automatically established and recorded by the software.

The delta C_t (ΔC_t) method was used for PCR array data analysis. The normalised (ΔC_t) for each gene of interest (GOI) was calculated by subtracting the average C_t of the five housekeeping genes from the C_t of each GOI. Next, the double delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) for each GOI was calculated by deducting the average ΔC_t of GOI in the sham group from the ΔC_t of each GOI. The fold-change of each GOI compared with the sham group was calculated as $2^{\Delta\Delta C_t}$. C_t data were uploaded into the data analysis template on the manufacturer's website (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) and the *p* values were calculated based on a Student's test of the replicate ($2^{\Delta\Delta C_t}$) values for each gene in the control and infected groups.

Results

Before *L. monocytogenes* infection, under SEM, the surface of the brain slices appeared to be formed by extremely flat cells (Fig. 1A). During *Listeria* infection, the smooth surface was disrupted and many microglial cells coming from the inside of the tissue were massively recruited to the surface of the brain slices (Fig. 1B). Five hours after the infection, the explant surface showed microglial activated cells and cells filled with bacteria. New phagocytic cells reappeared on the surface of the organotypic cultures to phagocyte free bacteria and cellular debris (Fig. 1C and D). Cell activity increased on the explant surface 12 h after infection, and microglial cells were engulfing infected cells, phagosome-like bodies released from dead microglial cells, and free bacteria. Often, the plasma membrane of infected cells lost its integrity, cytosolic and organellar contents were released into the surrounding environment, and the nuclei were not fragmented (Fig. 1E). Control tissues had a normal appearance with no detectable phenotypic changes (Fig. 1F).

We used qPCR arrays to identify a large number of genes of the autophagy pathway that could be specifically modulated by the infection of *L. monocytogenes* in the brain. A list of all studied genes, their *p*-value, and fold regulation is shown in Tables S3 and S4. Our data show that all components of the

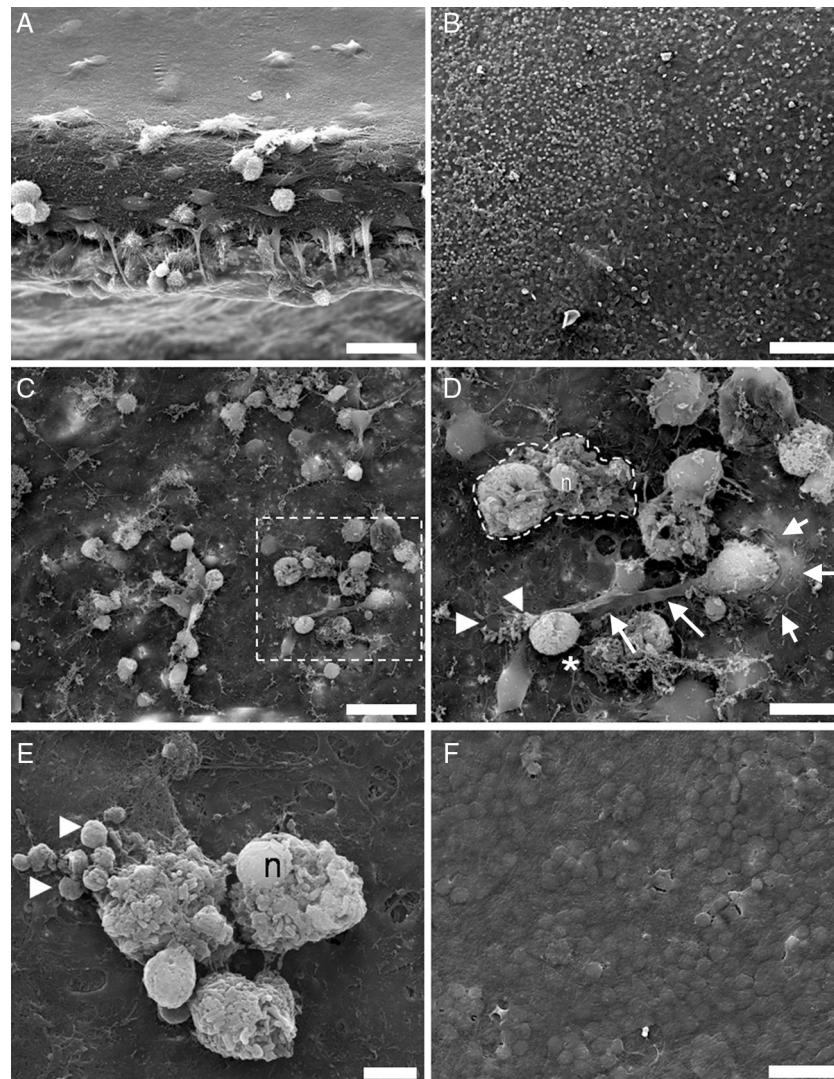


Fig. 1 – SEM analysis of control and infected brain organotypic cultures. (A) Shows the thickness of an organotypic culture, with the surface covered by cells forming a flat surface. (B) Activation of microglia by *L. monocytogenes* shows numerous round cells which emerge from the tissue. (C) 5 h after infection, bacteria and cell debris are engulfed by microglia. (D) A microglial cell emerging through a protrusion (short arrows) in the tissue is trying to engulf free bacteria (arrowheads) and a big phagosome/cell filled with bacteria (asterisk), by means of a large cell pseudopodium (long arrows). The dotted line marks a necrotic cell with intact nuclei (n). (E) At 12 h postinfection, numerous cell corpses with intact nuclei (n), cell debris, and phagosome-like particles of different size (arrowheads) are present at the surface of the tissues. (F) Surface of control tissue at 12 h. Magnifications: (A, C, F) 2000 \times ; (B) 500 \times ; (D) 5000 \times ; (E) 7585 \times . Scale bars: (A, D, F) 25 μm ; (B) 100 μm ; (C) 10 μm ; (E) 5 μm .

autophagy machinery and other key regulators of autophagy are present and likely functional in newborn rat brains. The expression levels of 7 out of the 84 genes included in the autophagy q-PCR arrays used were clearly modified by the infection (Table 1 and Fig. 2). Tumour necrosis factor (TNF) was the most highly upregulated gene after infections. The expression of the Chemokine (C-X-C motif) receptor 4, and the insulin-like growth factor 1 was downregulated. Only one core autophagic gene (Atg12) was also downregulated by the infection whereas the others (Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg9, and Atg16) were not. Other important genes involved in autophagic vacuole formation present in the arrays were also

not modulated by the infection, between them, Wipi1 and Ulk1. Important co-regulators of autophagy and apoptosis such as Bad, Bak1, Bax, Bcl2, Bid, Caspases 3 and 8, Tp53 and Tp73 were also not modulated by the infection.

Discussion

L. monocytogenes has been used as a model intracellular pathogen to study basic aspects of innate and acquired immunity. Complications from *L. monocytogenes* CNS infection include brain abscesses and inflammation where microglial

Table 1 – Gene expression modulated by the infection.

Symbol	GenBank	Description	Fold regulation Time postinfection	
			5 h	12 h
Atg12	NM.001038495	ATG12 autophagy related 12 homologue (<i>S. cerevisiae</i>)	(-) 2.0951 ^a	
Cxcr4	NM.022205	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	(-) 3.17 ^a	(-) 2.2395 ^a
Fas	NM.139194	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	3.7877 ^a	
Igf1	NM.178866	Insulin-like growth factor 1		(-) 4.2742 ^a
Tgm2	NM.019386	Transglutaminase 2, C polypeptide		7.8589 ^b
Tnf	NM.012675	Tumour necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	113.8113 ^a	19.4968 ^a
Tnfsf10	NM.145681	Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 10		4.8154 ^b

The results correspond to the mean values of three and four independent experiments (controls and infected tissues respectively), and are expressed as changes of infected tissues compared with uninfected controls. Fold-regulation represents fold-change results in a biologically meaningful way. A fold-change value greater than 1 indicates positive, or an upregulation, and the fold-regulation is equal to the fold-change. A fold less than 1 indicate negative or downregulation, and the fold-regulation is equal to the fold-inverse of the fold-change.

^a Genes upregulated or downregulated (-) in infected tissues with respect to the controls with a fold regulation >2 and a p-value <0.05.

^b Genes consistently upregulated in all the infected tissues with respect to the controls and a fold regulation >2.

activation plays a key role. Microglial cells are quickly activated in response to *L. monocytogenes*, producing a large array of cytotoxic factors which can affect the other cell types, leading to a neuroinflammation and abscess formation.¹³ Macroautophagy (here referred to as autophagy) has been recently proposed to be a component of the innate cellular immune response against intracellular pathogens.¹⁴ However, the interaction between pathogens and the autophagic pathway has mainly been studied using macrophage and epithelial cell lines, not microglia, and therefore information is lacking about autophagic events which may take place in the brain parenchyma. In the present study, we used q-PCR arrays containing 84 genes to analyse the expression profiles of

autophagic genes in response to *L. monocytogenes* infection in the rat brain. Based on a previous study dealing with the kinetics of immune-related gene expression, the time points of 5 h and 12 h were selected because they provided good gene expression response with more than 20 genes modulated by the infections.¹³ Moreover, the intercellular spread of *L. monocytogenes* begins between 3 and 5 h postinfection *in vitro*.^{15,16} Our results revealed that only a few genes of the core autophagic pathway were either up- or downregulated more than twofold over the course of the infections. In fact, only the expression of the core autophagy gene *Atg12* was modulated by the infection. Surprisingly, the gene expression of other *Atg* genes (i.e. *Atg3*, *Atg4*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg9* and *Atg16*)

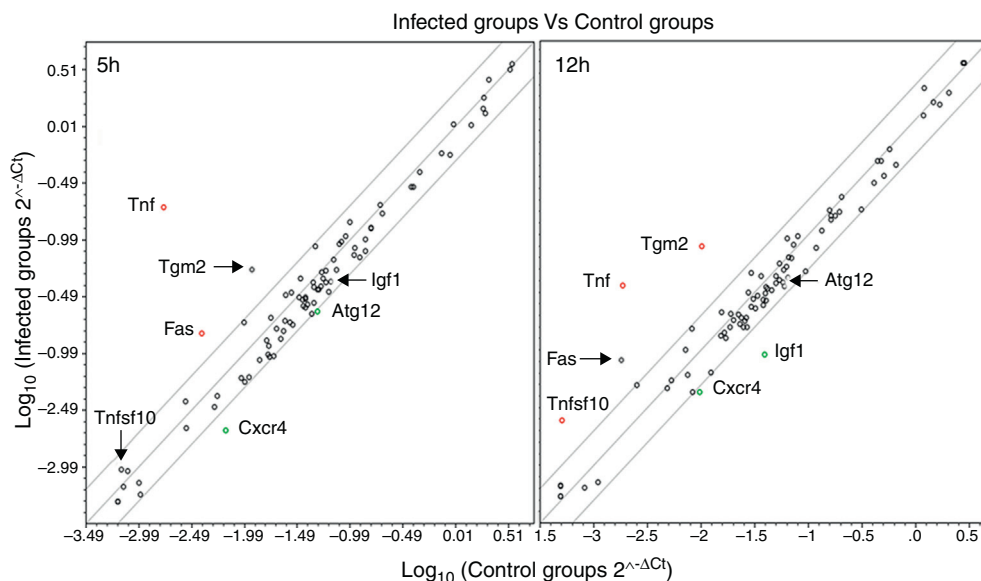


Fig. 2 – Scatter plots comparing the expression of genes involved in the autophagy response in rat brains infected with *L. monocytogenes* and the expression of these genes in non-infected tissues at 5 and 12 h. Each circle represents an individual gene. The central line indicates unchanged gene expression. The boundary lines indicate a twofold difference. Genes outside the boundary lines have twofold (>2, red dots or <2, green dots) altered expression ($p < 0.05$ and are consistently up- or downregulated) in brains infected with *L. monocytogenes* compared with the expression in control tissues. Black dots outside the boundary lines indicate a fold regulation >2 (with $p > 0.05$). Black dots inside the boundary lines indicate no change in regulation (<2-fold in either direction).

remains unchanged with respect to the uninfected tissues. These results are in agreement with other studies reported elsewhere, where some pathogenic bacteria also manipulate autophagy regulation at the level of gene transcription. For example, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* and *Burkholderia cenocepacia* can downregulate the transcription of important Atg genes.¹⁷⁻¹⁹ Other microorganisms have evolved strategies to evade or subvert host autophagy to survive and establish a persistent infection.^{20,21}

The expression of TNF and CXCR4 correlates well with our previous observations.¹³ This reinforces the robustness of the infection model and demonstrate that these cytokines play an active role during the response to *L. monocytogenes* infection in the brain. TNF plays an important role for pathogen control, limiting brain damage in a murine cerebral model of listeriosis.²² The inflammatory mediator CXCR4 was downregulated by the infection, at both 5 and 12 h postinfection, whereas the insulin-like growth factor 1 was only at 12 h. These genes act as co-regulators of the autophagy pathway.^{23,24}

Interestingly, transglutaminase 2 (Tgm2) was consistently upregulated in all the infected tissues with respect to the controls at 12 h (despite not statistically significant, Table S4). Tissue transglutaminase 2 belongs to a family of transglutaminase proteins that confers mechanical resistance from proteolysis and stabilises proteins. Tgm2 is also expressed in rat brain astrocytes *in vitro*, and is induced by the inflammation-associated cytokines interleukin-1 β and to a lesser extent by TNF- α .²⁵ Importantly for our work, Akar and coworkers showed that tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells.²⁶ However, the role and the mechanisms that regulate Tgm2 expression in brain tissues remain elusive.

As judged from the modest increase in core autophagy gene expression in the 5-12 h time course, a weak autophagic programme was activated in the rat brain after *L. monocytogenes* infection. Thus, identification of mechanisms or virulence factors exploiting autophagy may provide a new strategy for therapeutic intervention in infectious diseases. On the other hand, it has been hypothesised that basal levels of autophagy occur continuously inside of cells, and that an increase in autophagy can be stimulated by microbial infections.²⁰ In this sense, there are many ways to study autophagy, from transmission scanning electron microscopy to immunofluorescence, and one limitation of the present study is that we used only real-time PCR to measure autophagic gene expression. However, our results offer an approach for capturing the whole picture of gene expression of core autophagy genes in the brain, and highlight the need to study context-specific host-pathogen interactions in brain infections, where autophagy seems to play a role in homeostasis, predominantly in a housekeeping process. Moreover, to date, few reports on the role of the autophagy pathway in the CNS have been published, and the results obtained also contribute to an understanding of the participation of microglia in the brain abscesses caused by *L. monocytogenes* and the genesis of brain injury associated with the pathogen.

The role of autophagy during *L. monocytogenes* infection in the brain is only just beginning to be appreciated. Increased knowledge about the autophagic pathway itself in the brain,

in an organotypic context, or even in immortalised microglial cell lines, should be gained to understand the biology of neurotropic pathogens and their interaction with this degradative and immunologically relevant pathway. A better understanding of the participation of microglial cells in brain abscess formation and neuronal cell death opens up the possibility of manipulating microglial cells to reduce the impact of neuroinflammation. In addition, characterisation of the autophagic pathway in the brain awaits further experimentation which will contribute to our knowledge of the intracerebral immune response to *L. monocytogenes* and of the expanding functions of autophagy in innate and adaptive immune responses.

Ethical disclosures

Protection of human and animal subjects.

The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the responsible Clinical Research Ethics Committee and in accordance with those of the World Medical Association and the Helsinki Declaration.

Confidentiality of Data.

The authors declare that no patient data appears in this article.

Right to privacy and informed consent.

The authors declare that no patient data appears in this article.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

SRM holds a research contract from the Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV). JRV holds a Miguel Servet contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. The Instituto de Salud Carlos III (PS: CP08/100) and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS: PS09/00466) provide the financial support for this study and grants to JRV. EMV was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grants SAF07-61862 and SAF2011-25020). JMI was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grant CGL2008-04559/BOS). We thank Verónica Inés Vargas and Beatriz Romero Presno for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.04.001>.

REFERENCES

1. Kundu M, Thompson CB. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:427-55.

2. Deretic V. Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:53-62.
3. Randow F, Münz C. Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2012;33:475-87.
4. Deretic V, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:767-77.
5. Martínez-Borra J, López-Larrea C. Autophagy and self-defense. *Adv Exp Med Biol.* 2012;738:169-84.
6. Deretic V. Autophagy: an emerging immunological paradigm. *J Immunol.* 2012;189:15-20.
7. Colombo MI. Autophagy: a pathogen driven process. *IUBMB Life.* 2007;59:238-42.
8. Mostowy S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell Microbiol.* 2013;15:395-402.
9. Disson O, Lecuit M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence.* 2012;3:213-21.
10. Cossart P, Toledo-Arana A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 2008;10:1041-50.
11. Rich KA, Burkett C, Webster P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol.* 2003;5:455-68.
12. Py BF, Lipinski MM, Yuan J. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy.* 2007;3:117-25.
13. Remuzgo-Martínez S, Pílares-Ortega L, Icardo JM, Valdizán EM, Vargas VI, Pazos A, et al. Microglial activation and expression of immune-related genes in a rat *ex vivo* nervous system model of infection with *Listeria monocytogenes*. *Glia.* 2013;61:611-22.
14. Amano A, Nakagawa I, Yoshimori T. Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J Biochem.* 2006;140:161-6.
15. Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 1989;109:1597-608.
16. Dabiri GA, Sanger JM, Portnoy DA, Southwick FS. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:6068-72.
17. Deuretzbacher A, Czymmek N, Reimer R, Trülsch K, Gaus K, Hohenberg H, et al. Beta1 integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol.* 2009;183:5847-60.
18. Marich JP, Cremer TJ, Clay CD, Gavrillin MA, Wewers MD, Marsh CB, et al. Microarray analysis of human monocytes infected with *Francisella tularensis* identifies new targets of host response subversion. *PLoS ONE.* 2008;3:e2924.
19. Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, Caution K, Kotrange S, Abdelaziz DH, et al. Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. *Autophagy.* 2011;7:1359-70.
20. Campoy E, Colombo MI. Autophagy subversion by bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;335:227-50.
21. Orvedahl A, Levine B. Eating the differ: autophagy in inherited diseases. *Cell Death Differ.* 2009;16:57-69.
22. Virna S, Deckert M, Lutjen S, Soltek S, Foulds KE, Shen H, et al. TNF is important for pathogen control and limits brain damage in murine cerebral listeriosis. *J Immunol.* 2006;177:3972-82.
23. Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, Minami T, Cho S, Takeno N, et al. Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells. *Eur J Cancer.* 2008;44:1022-9.
24. Sobolewska A, Motyl T, Gajewska M. Role and regulation of autophagy in bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol.* 2011;90:854-64.
25. Monsonogo A, Shani Y, Friedmann I, Paas Y, Eizenberg O, Schwartz M. Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase and cytokine-treated rat brain astrocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:3724-32.
26. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2007;5:241-9.

