

11674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“ELABORACIÓN DE UN INMUNÓGENO DE MEMBRANA  
EXTERNA DE *B. ovis* UTILIZANDO ADN COMO ADYUVANTE Y SU  
EVALUACIÓN EN UN SISTEMA MURINO”**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. ADÁN CHÁVEZ CASTILLO

ASESORES:

DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ

DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

<b>Tema</b>	<b><u>Página</u></b>
Introducción	1
<b>Historia</b>	2
<b>Etiología</b>	3
<b>Composición Antigénica</b>	5
El Lipopolisacárido (LPS)	5
Proteínas Periplásmicas	6
Proteínas citoplasmáticas	6
Proteínas de membrana externa	6
<b>Diagnóstico de Brucelosis</b>	8
Diagnóstico Bacteriológico	8
Diagnóstico Serológico	8
Pruebas enzimáticas (ELISA)	9
Diagnóstico mediante PCR	11
<b>Efecto adyuvante del ADN</b>	11
<b>Control y Profilaxis de la Brucelosis</b>	13
<i>B. melitensis</i> Rev 1	13
Vacunas fabricadas con brucelas muertas o sus fracciones antigénicas	14
<i>B. abortus</i> RB51	15
Otras vacunas elaboradas con cepas rugosas	17
Vacunas recombinantes	18
Vacunas con ADN desnudo	19
Diferencias genéticas	19
<b>Planteamiento General del Proyecto</b>	20
<b>Objetivos</b>	21
<b>Material y Métodos</b>	22
Extracción del ADN de <i>B. ovis</i> y <i>B. abortus</i>	22
Extracción de la Proteínas de Membrana Externa de <i>B. ovis</i>	23
Electroforesis de ADN en gel de agarosa	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de membrana externa	24
Determinación de la concentración de las proteínas de membrana externa de <i>B. ovis</i> mediante el método de Bradford	26
Preparación e inoculación del inmunógeno	27
Método de extracción del bazo de ratón y conteo de UFC/ml	27
Métodos Estadísticos	28
<b>Resultados y Discusión</b>	29
<b>Conclusiones</b>	43
<b>Anexo</b>	44
<b>Bibliografía</b>	50

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1. Características Bioquímicas de <i>B. ovis</i>	4
2. Concentración y pureza de ADN de <i>B. ovis</i> y <i>B. abortus</i>	37
3. Evaluación protectora de los inmunógenos en base al conteo de log de UFC/ml en bazo de ratón	40

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% de ADN de <i>B. ovis</i> y <i>B. abortus</i>	36
2. Determinación espectrofotométrica de la presencia de ADN de <i>B. ovis</i> y <i>B. abortus</i>	38
3. Gel de poliacrilamida al 12% mostrando las proteínas de membrana externa de <i>B. ovis</i>	39
4. Log de UFC de <i>B. ovis</i> /ml en relación a distintos tratamientos experimentales	41
5. Grado de protección conferido por diferentes tratamientos experimentales en modelo murino desafiado con <i>B. ovis</i> de campo	42



## INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad originada, tanto en el hombre como en los animales, por microorganismos del género *Brucella*. Son cocobacilos Gram negativos, pequeños, aerobios (solo *B. abortus* y *B. ovis* requieren CO<sub>2</sub>), inmóviles y de crecimiento lento. Aunque se reconocen seis especies los estudios de hibridación de DNA demuestran que se trata de una sola especie, *Brucella melitensis*, con biovariedades. La afinidad por el huésped y la tradición hace que continúe utilizándose la antigua nomenclatura. De las seis especies (biovariedades) solo cuatro se asocian con la enfermedad en el humano: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* (*B. ovis* y *B. neotomae* no producen patología en el hombre). *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* siempre se encuentran en fase lisa (presencia de lipopolisacárido) (Timoney, 1992).

*Brucella ovis* produce una enfermedad clínica o subclínica en ovinos que está caracterizada por lesiones genitales en carneros y placentitis en ovejas. Por lo tanto las principales consecuencias de la enfermedad son fertilidad reducida en carneros, abortos infrecuentes en ovejas y una mortalidad perinatal incrementada (Blasco, 1990. Bulgin, et. al., 1983). La infección de los ovinos machos producida por *B. ovis* adopta curso crónico y se caracteriza por la inflamación del epidídimo y el testículo de los carneros (Beer, 1981). La enfermedad ha sido reportada en Australia, Nueva Zelanda, República Eslovaca, Francia, Alemania, Hungría, Rumania, Rusia, España, Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Brasil, China, Perú, Uruguay y Sudáfrica, pero probablemente ocurra en más países que se dedican a la cría de ovinos (Alton ,et. al.,1988. Brown, et. al., 1971. Ekdahl, et. al., 1968). No existen reportes de infección de *B. ovis* en el humano. (Hausler, et.al., 1991).

*B. ovis* es un parásito intracelular facultativo que puede sobrevivir dentro de los fagocitos mononucleares utilizando diferentes mecanismos de evasión como son:

- resistencia a enzimas lisosomales y/o a los productos de oxígeno reactivo,
- impedimento de la unión fagosoma – lisosoma y
- escape del fagosoma dentro del citoplasma (Blasco, 1990).

Al ser una bacteria intracelular facultativa puede evadir los mecanismos de defensa extracelulares como son la opsonización por anticuerpos y el complemento. Los estudios actuales sobre los mecanismos inmunológicos de la brucelosis sirven de base para presentar alternativas en la vacunación. El nuevo producto deberá tener por lo menos la misma capacidad inmunogénica de la cepa

S 19 de *B. abortus* o Rev. 1 de *B. melitensis* y eliminar las *desventajas* que estas representan como son: la producción de aborto y de anticuerpos que interfieran con las pruebas de diagnóstico para *B. ovis* y *B. melitensis* de las cuales se hablará más adelante, además la cepa Rev 1 es patógena para el humano y su uso está prohibido en países libres de *B. melitensis*. Se han intentado desarrollar vacunas con microorganismos muertos que sean tan efectivas como la Rev 1, pero el éxito que se ha obtenido es limitado (Blasco, 1990. Jiménez de Bagues, et. al. 1994).

Se han evaluado las proteínas de membrana externa (OMP) de *Brucella* como posibles antígenos para pruebas de diagnóstico y elaboración de inmunógenos biosintéticos (Santos, et. al., 1984). El papel de los grupos principales de OMP, en la inmunidad protectora contra las infecciones de *Brucella*, esta actualmente bajo investigación.

## HISTORIA

El primer miembro del género *Brucella* fue aislado en 1887 por David Bruce de los bazos de pacientes que murieron por fiebre de Malta o del Mediterráneo. El agente etiológico fue designado como *Brucella melitensis*. Diez años después, un veterinario danés, Frederick Bang, aisló a *Brucella abortus* a partir de un feto bovino abortado. *B. suis* fue aislada en 1914 por Jacob Traum a partir de un lechón abortado, y *B. ovis* y *B. canis* fueron descritas inicialmente en 1956 y 1969, respectivamente. Estas dos últimas especies están mucho más adaptadas a su hospedero en comparación a *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* (Timoney et. al., 1992)

Simmons y Hall publicaron sobre un caso de epididimitis ovina en 1953, ocurrido en Australia y describen a la bacteria causante como un microorganismo parecido a la *Brucella* (*Brucella-like*) (Simmon et. al. 1953). Buddle y Boyes en el mismo año reportan una caso ocurrido en Nueva Zelanda y describen al microorganismo como una *Brucella* (mutante). Buddle reporta, en el año de 1956, y describe a la bacteria como una nueva especie de *Brucella*, a la que nombró *Brucella ovis*. El subcomité de taxonomía de brucelas, aceptó en forma oficial este nombre en 1965 (Buddle et. al., 1953; Buddle, 1956). Hay muchos casos reportados como los ocurridos en Estados Unidos en 1956, Argentina en 1961, Uruguay en 1966, Chile en 1989 (Kennedy et. al., 1956; Szyfres, 1961; Casas et. al., 1966; Tamayo, 1989).

En México se realizaron estudios en los cuales se intentó demostrar la presencia de *B. ovis*, efectuando exámenes de tipo clínico, bacteriológico y serológico en diversos rebaños de ovinos

Tabasco, localizados en diferentes regiones del país; también se tomaron muestras en el rastro de Ferrería. No fue posible encontrar animales con manifestaciones clínicas o lesiones macroscópicas sugestivas de la epididimitis causada por *B. ovis*. Tampoco fue posible aislar el microorganismo en las muestras trabajadas, pero se logró determinar la presencia de los anticuerpos específicos contra *B. ovis* (Suárez et. al., 1974).

Fue hasta el año de 1979 cuando se publicó el primer reporte de aislamiento de *B. ovis* en México. Esto se logró a partir de un borrego de raza Suffolk, que fue importado en 1977 e introducidos a un rebaño en el estado de Guanajuato (Pérez et. al., 1979).

### **ETIOLOGIA**

*Género Brucella*: Son bacilos cortos o cocoides con unas medidas de 0.5 – 0.7 X 0.6 – 1.55  $\mu\text{m}$ , que se disponen aisladamente y, raras veces, en cadenas cortas, no forman cápsulas ni esporas, son inmóviles y gram negativos. Las brucelas son fácilmente teñidas por los colorantes anilínicos habituales, sin embargo, se han desarrollado métodos de tinción especiales para su mejor identificación microscópica ( tanto en el material patológico como en cultivos mixtos) en base a la álcali –resistencia de este género de bacterias. De ellas se han establecido las tinciones de Koster, Hansen y Stamp (Beer, 1981).

La hibridación con ADN muestra que el género es un grupo genético muy restringido, con la clara excepción de *Brucella ovis*, la cual es la única especie que muestra menos del 100 por ciento de homología con otras especies del género. (Timoney et. al., 1992).

En particular *B. ovis* presenta las siguientes características:

Es un cocobacilo Gram negativo, se observa aislado y muy rara vez en cadenas cortas, sus medidas van de 0.1 - 0.5  $\mu\text{m}$  por 0.3 a 1.5  $\mu\text{m}$ . No son capsuladas ni forman esporas, no son móviles. Forman colonias circulares, con margen entero circular, convexas con superficie lisa brillante, con el centro opaco y la superficie translúcida. Es una bacteria intracelular facultativa y anaerobia facultativa. La temperatura óptima para su crecimiento es de 37C y el pH de 6.6 a 7.4. Es necesario agregar de 5 – 10% de CO<sub>2</sub> a la atmósfera donde se incuba, además de que el medio donde se siembra debe ser enriquecido con 5% de suero de bovino o 5% de extracto de levadura, las colonias pueden observarse a las 72 hrs. de incubación. Los medios para sembrar la bacteria son básicos como el agar soya tripticasa,

agar *Brucella* y agar papa entre otros. En caso de contaminación o sospecha de ello se puede utilizar un medio selectivo ( Comité mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis, 1986; Hagan, 1957).

<b>CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE <i>B. ovis</i></b>	
Catalasa	Marcadamente positiva
Oxidasa	Negativo
Ureasa	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Rojo de Metilo	Negativo
Indol	Negativo
Nitratos	Negativo
Citrato	Negativo
Leche Tornasol	Negativo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Crecimiento en presencia de Fuchina básica	Positivo en concentraciones (1:50 000- 1:100 000)
Crecimiento en presencia de Tionina	Positivo en concentraciones (1:25 000)
Sucrosa, lactosa, maltosa, glucosa, galactosa, xilosa, levulosa, manosa, arabinosa, manitol, dulcitol, sorbitol, salicín, inositol y rafinosa	Negativo
Lisis por el bacteriófago Tb	Negativo
Hemólisis en agar sangre	Negativo

**Cuadro 1.** Principales características bioquímicas de *Brucella ovis* utilizadas para su identificación a nivel diagnóstico (Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis, 1986; Hughes et. al., 1968; Kennedy et. al., 1956)

*Brucella ovis* sólo se presenta en forma rugosa, carece de los antígenos A y M que si contienen las biovariedades lisas. Por esta razón sólo presenta aglutinación cruzada con *B. canis* y con las variantes rugosas de otras especies de *Brucella*. Estos antígenos son lipopolisacáridos, que al ser sometidos a un análisis químico se pudo establecer que están formados por un polisacárido ( que a su

vez está compuesto por glucosa, glucosamina y azúcar no identificado), lípidos, proteínas y KDO (ácido-2-ceto-2-desoxioctulosónico) (Afzal et. al., 1987; Díaz, 1968; Díaz et. al., 1968, Renoux, 1955; Suárez, 1990).

Un estudio realizado a los polinucleótidos de ADN del género *Brucella* demostró una homología completa entre *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, posteriormente se demostró la homología de *B. canis*. Se descubrió que en el ADN de *B. ovis* faltan ciertas secuencias de polinucleótidos comunes a las demás especies del género. La mayor parte de los polinucleótidos de *B. ovis* son análogos de las demás especies de *Brucella* (Hoyer et. al., 1968; Hoyer et. al., 1968).

### **COMPOSICION ANTIGÉNICA**

Se han identificado en la membrana externa, en el espacio periplásmico y en el citoplasma varios antígenos importantes tanto a nivel diagnóstico como a nivel protector. La membrana externa de *Brucella* esta constituida por lipopolisacárido (LPS), proteínas y fosfolípidos.

#### **El lipopolisacárido (LPS).**

La membrana externa contiene lipopolisacárido y proteínas de membrana externa, ambos con propiedades antigénicas. El LPS puede encontrarse tanto como lipopolisacárido-liso (LPS-S) el cual contiene a la cadena-O y lipopolisacárido rugoso (LPS-R) el cual carece de dicha cadena, en cepas de *Brucella* lisas (S) y rugosas (R), respectivamente. La cadena-O o el polisacárido-O (O-PS) es el principal antígeno inmunodominante en repuestas serológicas de infecciones causadas por brucelas S y se ha demostrado que es el antígeno más expuesto en la estructura de la superficie de este tipo de brucelas. EL O-PS es además el primer antígeno protector identificado en el modelo murino por experimentos de inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-O-PS o inmunización activa con S-LPS u O-PS conjugado con un acarreador proteico. Los O-PS contienen varios epitopes identificados por MAbs, por ejemplo: A, M y epitopes comunes (C), las cepas dominantes en A y M pueden tener reacción cruzada con *Yersinia enterocolitica* 0:9 (Cloeckaert, 1997).

### **Proteínas Periplásmicas**

Se han descubierto un cierto número de proteínas periplásmicas inmunogénicas tales como BCSP31, superóxido dismutasa Cu/Zn, y más recientemente la proteína BP26 llamada también Omp28. En particular, parece ser que BP26/Omp28 poseen propiedades diagnósticas ya que se ha encontrado que son inmunodominantes en animales infectados tales como vacas, borregos, cabras incluyendo al ser humano. De estas proteínas no se ha llegado a evaluar su actividad protectora. La inmunización de ratones con BCSP31 o Cu/Zn SOD no produce protección contra *B. abortus*, sin embargo, la inmunización con un péptido sintético derivado de Cu/Zn SOD confiere protección en el modelo murino (Cloeckaert. 1997).

### **Proteínas citoplasmáticas.**

La última categoría de proteínas inmunogénicas comprende las proteínas citoplasmáticas, tales como las proteínas de estrés GroEL, GroES, DnaK, HtrA, la proteína ribosomal L7/L12, las proteínas Ssb, UvrA, bacterioferritina; y proteínas con funciones conocidas denominadas como p15, p17 y p39. Algunas de estas (L7/L12, UvrA, GroEL y GroES) se ha encontrado que estimulan una respuesta inmune celular tipo Th1 con la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . La inmunización de ratones con proteína recombinante L7/L12 ha mostrado otra característica, ya que es capaz de ejercer protección contra *B. abortus*, probablemente por su capacidad de ejercer una respuesta inmune celular de tipo Th1. De hecho, esta es la única proteína antigénica que ha sido claramente identificada para proteger contra *B. abortus*. Otras proteínas tales como p15, p17 y p39 tienen interés para el diagnóstico serológico de brucelosis. En conclusión, la protección contra brucelas-S puede ser mediada por antígenos de superficie tales como LPS-S, protección mediada por anticuerpos, así como por proteínas intracelulares tales como L7/L12 por medio de la inducción de respuesta inmune celular. Así, los estudios para identificar antígenos protectivos puede no estar restringido a la superficie celular como antes se creía (Cloeckaert. 1997).

### **Proteínas de Membrana Externa (OMPs)**

Las proteínas de membrana externa (OMPs) se identificaron inicialmente a principios de 1980 mediante técnicas de extracción selectiva y clasificadas de acuerdo a su peso molecular aparente. Las OMP principales son proteínas de 25 a 27 kDa y 31 a 34 kDa, ambas denominadas proteínas del grupo 3 (Riezu-Boj et. al. 1990), las proteínas de 36 a 38 kDa (denominadas porinas) del grupo 2 y las de 88



a 94 kDa del grupo 1 (Douglas et. al. 1984, Bowden et. al. 1995, Cloeckaert, et al., 1996a, Moriyón et. al.1998). Estas proteínas han sido caracterizadas por el uso de anticuerpos monoclonales, clonación genética y ahora se han encontrado un conjunto de proteínas adicionales. Los nombres asignados de estas proteínas son: Omp10, Omp16, y Omp19 identificadas como lipoproteínas; Omp25 y Omp31, dos proteínas homólogas del grupo 3; proteínas porinas Omp 2a/Omp2b; y Omp1 u OMP de 89 kDa del grupo 1. Las OMPs se encuentran expuestas en la superficie de *Brucella*, lo cual se ha comprobado por el uso de Mabs y técnicas tales como la de ELISA, microscopía inmunoelectrónica, y citometría de flujo. Sin embargo, parecen estar mucho menos accesibles en cepas de *Brucella* S que en R, probablemente debido al impedimento estérico causado por la presencia de la cadena-O en el LPS-S de la cepas de *Brucella* lisas. Esta característica puede explicar además porque los Mabs contra OMPs producen una baja o nula protección contra el desafío con *B. abortus* S en el modelo murino. En contraste, los Mabs contra OMP-R, en particular contra la Omp31, producen alto grado de protección en ratones desafiados con *B. ovis* R. Las propiedades inmunológicas de las principales OMPs (Omp25, Omp31 y Omp2b) parece ser de poca relevancia en infecciones producidas por *Brucella*-S ya que se ha visto que la inmunización con proteínas recombinantes produce baja o nula actividad protectora contra *B. abortus* S y/o *B. melitensis* S. Además la respuesta de anticuerpos contra OMPs en ganado vacuno y ovino son bajas y variables y por lo tanto parece ser que las OMPs al parecer son inmunógenos pobres en hospederos primarios y no son recomendables para el diagnóstico. Sin embargo, los principales genes que codifican para OMP se ha encontrado que poseen interesantes características para propósitos de tipificación molecular para poder diferenciar entre especies de *Brucella*, biovariedades, y cepas (Cloeckaert. 1997).

Los genes de las principales OMPs muestran diversidad entre las especies, biovariedades y cepas de *Brucella*, permitiendo con ello su diferenciación y la identificación mediante marcadores polimórficos que tenderán a pretender nuevas estrategias en el conocimiento del desarrollo de *Brucella*, variabilidad antigénica en la familia *Brucellae* y futuros prospectos en el campo del desarrollo de vacunas. (Cloeckaert, et al., 1996b).

La mayoría de la variación en cuanto al peso molecular de las OMP, se debe a la asociación que estas tienen con subunidades de diversos tamaños del peptidoglicano. Los OMP (grupo 3) son también los mayores componentes de la fracción insoluble de la pared celular, lo cual les confiere importantes propiedades como vacuna ( Dubray and Charriaut, 1983 ).

Los genes que codifican para los OMP principales de *Brucella* han sido clonados y secuenciados, denominándose *omp2a* y *omp2b* para las proteínas del grupo 2; *omp25* y *omp31* para las OMP de las proteínas pertenecientes al grupo 3 y *omp 1* para la proteína de 89 kDa del grupo 1 (Cloeckert, et al., 1996b).

### **DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS (*B. ovis*)**

El diagnóstico de la brucelosis se basa en la sospecha clínica de la enfermedad, pero es necesario tener la confirmación en el laboratorio, bien demostrando las brucelas en cultivos o bien determinando los anticuerpos. El problema de los cultivos es su lentitud para crecer ya que en ocasiones *Brucella* tarda en recuperarse más de 15-30 días en forma pura.

Las cadena-O juega un papel central en el diagnóstico de la brucelosis ya que éste es una antígeno inmunodominante capaz de inducir respuesta de anticuerpos en muchos animales expuestos a brucelas de tipo liso y muchas pruebas de diagnóstico serológico están basadas en la detección de anticuerpos dirigidos hacia la cadena O (Caroff et al., 1984. Moreno et al., 1984).

#### **Diagnóstico bacteriológico**

El aislamiento de *B. ovis* constituye el diagnóstico directo confirmativo. Para el aislamiento de *B. ovis* de animales vivos la muestra recomendada es el semen recogido en bolsas de plástico tras la electroeyaculación, o bien la toma de muestra de la cavidad prepucial con hisópos. Las muestras más idóneas de los carneros infectados son el epidídimo, glándulas bulbouretrales, vesículas seminales, ampollas del conducto deferente, diversos nódulos linfáticos (principalmente iliacos), testículos y bazo (Díaz E., et. al. CENID).

#### **Diagnóstico serológico**

Puesto que los síntomas clínicos son inespecíficos en la mayoría de los casos, la historia epidemiológica es muy importante a la hora de establecer el diagnóstico. El diagnóstico se basa en el aislamiento de la bacteria a partir de semen, prepucio, epidídimo, testículos y bazo. Unicamente un 20-30% de los diagnósticos de enfermedad brucelar se acompañan de este aislamiento; así pues la demostración de anticuerpos anti-*Brucella* se convierte en la forma alternativa y rápida de diagnóstico (Cloeckert. 1997).



La respuesta humoral se caracteriza por un aumento de la IgM en las fases iniciales, seguido por el cambio en la síntesis de IgG a los 7-14 días. Durante la recuperación las concentraciones de IgG disminuyen a lo largo de los meses. El estancamiento en esta caída de los títulos o una segunda elevación hará sospechar la persistencia de la infección, una recaída o reinfección. La IgM, incluso después del periodo de convalescencia puede ser detectable durante mucho tiempo pero a títulos muy bajos con muy discretas oscilaciones en su concentración. Las pruebas serológicas para el diagnóstico de esta infección se basa en la presencia de anticuerpos dirigidos fundamentalmente contra el antígeno somático O lipopolisacárido o las proteínas del microorganismo. Actualmente el diagnóstico indirecto se basa en las pruebas de ELISA para IgM, IgG e IgA específica.

También existen intentos para utilizar la PCR en su diagnóstico. La fijación de complemento se utiliza ya muy poco al igual que otras pruebas que empleaban sulfitorreductores ( 2-ME o DTT) y que se comentaran más adelante. La interpretación de los resultados obtenidos con estas pruebas, ya sea en una sola muestra o mejor en muestras seriadas, pueden aclarar en muchos casos si existe una primoinfección, una recaída o una reinfección, dato muy importante para el pronóstico tal y como se comentó anteriormente (Cloekaert. 1997).

### **Pruebas enzimáticas (ELISA)**

Desde hace algún tiempo están apareciendo diferentes trabajos y publicaciones sobre la aplicación de los ensayos enzimáticos al diagnóstico serológico de la brucelosis. En casi todos ellos el antígeno ligado a la fase sólida es el lipopolisacárido de la pared bacteriana (*Brucella abortus* 99) más o menos purificado. Se ha utilizado el microorganismo entero y en otros proteínas de membrana. Del análisis de la literatura está claro que estas pruebas pueden detectar inmunoglobulinas específicas con sensibilidades que oscilan entre el 93 y 97% con una especificidad del 98%. Esta sensibilidad parece aumentar si el antígeno empleado es de naturaleza proteica. La aplicación experimental de estas pruebas evidenció la posibilidad de diagnosticar infecciones brucelares en estadios muy tempranos en los que la serología convencional aún no era positiva e incluso en algunos casos, confirmados por aislamiento del microorganismo, en los que nunca fue positiva. La valoración de los resultados obtenidos con ELISA debe de ser individualizada esto es, comparando las concentraciones de las diferentes clases de anticuerpos a lo largo de la enfermedad medidas contra un punto de corte que deberá establecerse. La principal aportación de ellas es la posibilidad de medir por separado las diferentes clases de inmunoglobulina IgM, IgG, e IgA específica. Los trabajos más interesantes son

aquellos que tratan de correlacionar estos niveles con los resultados de las pruebas clásicas y con la situación clínica del animal. En este sentido, se ha obtenido una buena correlación entre los niveles de IgM y los títulos de seroaglutinación así como los de IgG con la prueba Coombs y la Fijación de Complemento. Esto indica que las concentraciones de IgM están más elevadas en la fase aguda de la enfermedad que en las recaídas y fases crónicas en las que el predominio de anticuerpos se debe a la IgG (Cloeckaert, 1997).

Desde el punto de vista cinético está suficientemente demostrado que durante la fase aguda existe una respuesta de anticuerpos clásica: aumento de IgM e IgG y que a lo largo de la evolución el título de IgM va descendiendo. Aunque algunos autores postulaban lo contrario, los anticuerpos de clase IgM no vuelven a elevarse de forma significativa en los casos de una nueva recaída o de reinfección. La IgM puede detectarse con títulos decrecientes durante unos 8-10 meses. En los casos que evolucionan a la curación, la IgG específica puede ser detectada con títulos progresivamente decrecientes aproximadamente unos 30 meses y sólo se mantienen estables y elevados o aumentan en los casos de reinfección o recaída. En la prueba de ELISA la IgA alcanza igualmente valores elevados en todas las formas de enfermedad y ocupa una posición intermedia entre ambas con persistencias medias de 18 meses. Al igual que en ELISA la IgG se eleva en las recaídas y reinfecciones. El problema de la utilización de estas pruebas surge de la poca experiencia clínica que existe para correlacionar los resultados con la evolución clínica. Pocos autores se han planteado la realización de ELISA total (IgG + IgM + IgA) como prueba diagnóstica única de gran sensibilidad para la búsqueda de anticuerpos. En este sentido parece que en el 99% de los pacientes con aislamiento positivo de brucella tienen esta prueba positiva a pesar de poder ser negativas alguna de las pruebas clásicas. La medida de la avidéz de los anticuerpos por su antígeno también puede cuantificarse fácilmente con la metodología ELISA. Existen algunos trabajos que demuestran con esta técnica baja avidéz en el 70% de los pacientes con fase aguda y alta avidéz en el resto de las formas clínicas. La aplicación de ELISA en la infección del sistema nervioso central (SNC) ha abierto los horizontes de su diagnóstico. El 99% de los líquidos cefaloraquídeos (LCR) probados en estos casos son positivos para IgG y aproximadamente un 70-80% lo son también para IgM e IgA. Es una prueba muy específica de tal manera que su negatividad descarta prácticamente la neurobrucelosis. En esta forma clínica sólo la positividad de las pruebas clásicas (Rosa de bengala y aglutinación) puede confirmar la afectación del SNC pero existen falsos negativos por falta de sensibilidad (Cloeckaert, 1997).

## **Diagnóstico mediante PCR**

La microbiología molecular también ha entrado en el diagnóstico de esta infección. La característica es la sensibilidad que muestra para la detección de brucella en diferentes muestras (sangre, médula, leche, orina etc.). Igualmente los protocolos de extracción y las regiones blanco a amplificar son tan variadas que es difícil decidir cual de ellas será la adecuada. PCR es empleada también para la determinación de la especie infectante y estudios epidemiológicos. No cabe duda que en un futuro próximo, dada la dificultad y tiempo empleado en el aislamiento, la PCR tomará un evidente protagonismo en los laboratorios clínicos. Es fácil prever que, a pesar de la gran variedad de pruebas serológicas disponibles en la actualidad para el diagnóstico de la brucelosis, en el futuro sólo se emplearán la prueba de Rosa de bengala, Coombs y las pruebas ELISA para determinar los anticuerpos totales y las diferentes clases de inmunoglobulinas. PCR tomará el protagonismo para el diagnóstico rápido dejando el aislamiento para trabajos más especializados. Con ello se acortará el tiempo necesario para el diagnóstico aportando además información útil para definir el estadio evolutivo o forma clínica de la enfermedad y el tipo de tratamiento más adecuado para cada uno de ellos (Cloeckaert, 1997).

## **EFEECTO ADYUVANTE DEL ADN**

Los adyuvantes utilizados en vacunas que desencadenan una respuesta tipo Th1 pueden ser usados para promover inmunidad contra parásitos intracelulares o virus. Se están investigando estrategias con vacunas que contienen ADN bacteriano (ADNb) como estimulante de una respuesta tipo Th1 y de linfocitos T citotóxicos para ser utilizadas contra parásitos intracelulares (Klinman et. al. 1997, Huang, et. al., 1999).

La inmunidad dirigida hacia bacterias intracelulares está mediada típicamente por linfocitos CD4<sup>+</sup> de la subpoblación Th1. Las células Th1 se caracterizan por la producción de interferón – gamma (IFN- $\gamma$ ) y por la capacidad para estimular una respuesta por parte de linfocitos T citotóxicos (Paul, et. al., 1994). La interleucina 12 (IL-12), es un producto de las células presentadoras de antígeno, que es crítica para el desarrollo de una respuesta inmune del tipo Th1 (Trinchieri, 1995). Debido a la inefectividad para combatir ciertos patógenos intracelulares, que están correlacionados con una respuesta inmune tipo Th2 (Trinchieri, 1997), se han creado estrategias para producir vacunas que contengan adyuvantes que dirijan la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th1. Se ha comprobado

que el ADN bacteriano (ADNb) de *B. abortus*, es capaz de estimular altas cantidades de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-12) que promueven la respuesta tipo Th1, tanto *in vivo* como *in vitro*, en ausencia de preparaciones conteniendo IFN- $\gamma$  exógeno. La inducción de IFN- $\gamma$  es un indicativo de la actividad del potencial adyuvante del ADNb (Huang, et. al., 1999).

Las secuencias de ADN que consisten en dinucleótidos no metilados tipo CpG flanqueados por dos purinas en la región 5' (óptimamente GpA) y dos pirimidinas en la región 3' (óptimamente TpC o TpT) estimulan el sistema inmune innato para producir una serie de citocinas inmunomoduladoras. Los hexámeros que poseen estas secuencias son veinte veces más comunes en ADN microbiano que en ADN de mamíferos debido a las diferencias en la frecuencia de utilización y los patrones de metilación de los dinucleótidos CpG en procariotes en comparación a los de eucariotes (Krieg et. al. 1995, Ballas et. al. 1996, Yi et. al. 1996, Macfarlane et. al. 1998). Las citocinas que se producen por la presencia de estas secuencias incluyen a IL-12 e IFN- $\gamma$ , que promueve el desarrollo de respuesta de células T citotóxicas Th1-dependientes, e IL-6 que promueve la activación de células B y la secreción de anticuerpos (Klinman et. al., 1997)

Las secuencias CpG no metiladas actúan como adyuvantes contribuyendo tanto a la producción de citocinas y de anticuerpos después de la vacunación con ADN (Klinman et. al., 1997).

El ADN bacteriano posee efectos estimulatorios en células del sistema inmune de mamíferos. El ADN de mamíferos no posee actividad inmunoestimuladora. Las secuencias tipo CpG inducen una fuerte respuesta inflamatoria tipo Th1 y existe evidencia acumulada que ha revelado el potencial terapéutico de el ADN que posee secuencias tipo CpG como adyuvantes para estrategias de vacunación para cáncer, alergia y enfermedades infecciosas (Hemmi et. al., 2000).

El mecanismo molecular por medio del cual las secuencias CpG activan las células del sistema inmune está mediado por un receptor llamado TLR9 (Toll – like receptor). De esta forma, el sistema inmune de vertebrados puede distinguir entre el ADN propio y el ADN bacteriano gracias a el receptor TLR9 (Underhill et. al. 1999, Hemmi et. al., 2000).

El ADN bacteriano conteniendo secuencias tipo CpG puede ser mezclado con antígenos para promover una fuerte respuesta inmune tipo Th1 (Yi et. al. 1998).

La elección de este adyuvante en este trabajo de investigación fue debido a que puede estimular distintos tipos de células del sistema inmune, guiando al aumento de la respuesta tipo Th1 caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-18, y TNF- $\alpha$ . La producción de estas citocinas representa un evento temprano en los mecanismos de defensa contra patógenos intracelulares

tales como *Brucella spp.* Además se sabe que las regiones CpG aumentan la producción de células T citolíticas CD8<sup>+</sup>. Todos estos mecanismos se ha demostrado que están involucrados en la protección contra *Brucella* (Al -Mariri et. al., 2001).

## CONTROL Y PROFILAXIS DE LA BRUCELOSIS OVINA

La brucelosis animal es una enfermedad que afecta a varios animales domesticos y salvajes. Existen seis especies de *Brucella* que están asociados con distintos hospederos: *B. abortus* (ganado vacuno), *B. canis* (perros), *B. malitensis* (cabras), *B. netomae* (ratas del desierto), *B. ovis* (ovejas) y *B. suis* (cerdos). Recientemente se han descrito brucelas que infectan mamíferos marinos (Roos, et al. 1996). Varias de las brucelas son capaces de infectar humanos, haciendo de esta enfermedad una zoonosis. Al ser las brucelas parásitos intracelulares facultativos; la patogénesis de la brucelosis y la naturaleza de la respuesta inmune protectora está fuertemente relacionada con esta característica.

La prevención de la infección y por tanto de la enfermedad, pueden ser llevadas a cabo mediante la vacunación. Como regla general, la inducción de una respuesta inmune efectiva y duradera hacia parásitos intracelulares facultativos requiere del uso de vacunas vivas y en algunos casos de aplicaciones múltiples de antígenos protectores apropiados en presencia de adyuvantes que favorezcan los mecanismos de respuesta inmune mediada por células (CMI). En el caso de *B. ovis* se ha empleado la vacuna elaborada con la cepa de *B. melitensis* Rev-1 (Schurig, 1997).

A continuación se muestra una descripción de las principales vacunas usadas para la prevención de la brucelosis ovina:

### ***B. melitensis* Rev 1.**

La vacuna Rev 1 es de una cepa de *B. melitensis* viva y atenuada originada de una cepa aislada de *B. melitensis* virulenta que se volvió dependiente de estreptomycin para su crecimiento, pero perdió esta característica después de varios cultivos. Esta provee protección en cabras y ovejas contra la infección con *B. melitensis* y en carneros contra la infección con *B. ovis* (Blasco et al., 1987). Esta vacuna es atenuada cuando se compara con las cepas de campo pero retiene algo de virulencia. Dependiendo de la dosis administrada durante la gestación, los abortos pueden ocurrir frecuentemente; aparentemente en carneros la vacuna es avirulenta o de muy baja virulencia. Rev 1 es un organismo liso el cual puede inducir serología positiva que interfiere con el diagnóstico (Schurig, 1997).



En relación a las actuales estrategias de vacunación contra brucelosis causada por *B. ovis* se sabe que la vacunación administrada vía subcutánea o conjuntival es el medio más práctico y económico para mediar el control en áreas con alta incidencia. La vacuna viva de *B. melitensis* Rev. 1 aunada a una bacterina de *Brucella ovis* es probablemente la mejor profilaxis disponible hasta el momento contra la infección producida por *Brucella ovis* (Blasco, 1990).

Cuando esta vacuna es administrada en animales jóvenes, la vacuna es segura y raramente aparecen efectos adversos. Sin embargo, es limitada la información concerniente a la seguridad cuando es administrada en carneros adultos. Un estudio ha reportado que la vacunación conjuntival de carneros de 13 meses de edad no produce efectos indeseables y protege contra *B. ovis*, aunque el número de animales en este estudio fue limitado (Marin, et. al., 1990).

La vacuna atenuada de *B. melitensis* Rev 1 ha sido utilizada para vacunar borregos y cabras. La vacuna es capaz de inducir protección y estimula el desarrollo de anticuerpos humorales, que interfieren con las pruebas serológicas; las cuales pueden ser utilizadas para detectar animales infectados.

#### **Vacunas fabricadas con brucelas muertas o sus fracciones antigénicas.**

Una amplia variedad de combinaciones han sido probadas en esta área incluyendo cepas muertas aisladas de campo pero, a excepción de la cepa 45/20, la aceptación práctica de éstas preparaciones ha sido menor. Una variedad de razones incluyendo los costos de producción, la baja protección y los problemas serológicos juegan un papel en este aspecto. *B. melitensis* cepa H38, una cepa lisa y muerta suspendida en formol con adyuvante, indujo buena protección contra abortos, pero produjo positividad serológica y reacciones locales inaceptables. Además, la combinación de brucelas muertas con anticuerpos específicos fue probada para reducir la actividad aglutinogénica pero la protección no fue muy satisfactoria (Schurig, 1997).

Las fracciones antigénicas extraídas de *Brucella* han sido utilizadas particularmente en asociación con una variedad de adyuvantes y la inmunidad puede inducirse con algunas de estas preparaciones. La cantidad de investigaciones en esta área es vasta, particularmente con animales de laboratorio. Las preparaciones usadas han sido células muertas enteras (Montaraz et al., 1986. Woodard et al., 1980), envolturas celulares (Montaraz et al., 1986.), proteínas de membrana externa (Montaraz et al., 1986. Winter et al., 1983), residuos insolubles de extractos calientes con SDS de envolturas celulares (PG), antígenos solubles de *Brucella* (BASA) (Dzata et al., 1991), proteínas periplásmicas y

proteínas extraídas con sales (Pugh, et al., 1996), proteínas de *Brucella* químicamente modificadas, LPS liso y rugoso (Pugh et al., 1996), superóxido dismutasa Cu/Zn recombinante (SOD) y péptidos sintéticos de éste. Han sido usados varios adyuvantes, con la intención de desencadenar una respuesta CMI, entre los que se encuentran dimicolato de trealosa (TDM), muramil dipéptido (MDP), adyuvante incompleto de Freund (FIA), bromuro de dimetil-dioctadecil amonio (DDA), polímeros plurónicos y monofosforil lípido A (MPL) (Montaraz et al., 1986. Woodard et al., 1980. Winter et al., 1983. Dzata et al., 1991. Pugh, et al., 1996. Pugh et al., 1994. Tabatabai, 1994). Es interesante hacer notar que, el papel de la SOD Cu/Zn en la virulencia es controversial, los péptidos seleccionados de esta proteína confirieron inmunidad protectora en animales de laboratorio mientras que la SOD recombinante entera no. Además la inmunización de ratones con anticuerpos anti-idiotípicos que mimetizan la cadena-O del LPS pueden inducir inmunidad protectora (Schurig, 1997).

### ***Brucella abortus* RB51.**

Las características de la cepa 45/20, un organismo rugoso con poca o nula habilidad para inducir anticuerpos anti-cadena-O, puede inducir protección significativa contra infecciones *con B. abortus*; los organismos rugosos pueden ser usados para inducir respuestas inmunes protectoras evitando los problemas diagnósticos enunciados anteriormente. La estrategia fue encontrar un mutante que fuera verdaderamente rugoso (esencialmente sin cadena-O), estable y suficientemente atenuado. La atenuación sólo tiene que ser en cierto grado tal que permita la colonización por unas pocas semanas para inducir una respuesta CMI considerable y protectora. Tales características las reúne un derivado obtenido de *B. abortus* cepa 2308 crecida en presencia de rifampicina y denominada *B. abortus* cepa RB51. "R" es debido a que es rugosa y "B" por *Brucella*; 51 no se refiere al número de pases que fueron necesarios para seleccionar la cepa; sino que se refiere a una nomenclatura usada por un laboratorio interno en el tiempo en el que esta fue elaborada. La cepa RB51 se transformó para carecer de cadena-O, esta rugosidad es muy estable después de múltiples pases *in vitro* e *in vivo* a través de varias especies de animales. Debido a la falta esencial de cadena-O, esta no induce anticuerpos anti-cadena-O detectables por las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de brucelosis a pesar de la edad, dosis o frecuencia de las aplicaciones. La cepa RB51 es atenuada como se ha indicado por estudios llevados a cabo en ratones, cobayos, cabras y ganado vacuno donde se ha eliminado en un tiempo relativamente corto y no tiene, o en forma muy reducida, características abortivas. RB51 es una vacuna viva, altamente atenuada recomendada para el uso en bovinos. Cuando se usó en protocolos de

vacunación simple el efecto protector en ganado vacuno es similar al inducido por la cepa 19. Aplicada como una dosis única en becerros, su efecto protector es similar al del inducido por la cepa 19 sin embargo, la gran ventaja es que no da serología (Karhel, 1998).

La vacuna cepa RB51 protege al ganado bovino y a los cerdos contra infección con *B.abortus* y *B.suis* respectivamente. En el bovino al igual que en cerdos, caprinos, ovinos, ratones y cuyes la vacunación con RB51 no genera anticuerpos contra la cadena-O y por lo tanto, no interfiere con el diagnóstico serológico. Los animales pueden ser vacunados repetidamente a varias edades manteniéndose la serología negativa y aumentando la inmunidad del rebaño (Schurig, 1991).

Experimentos recientes llevados a cabo en campo, bajo condiciones de alta y baja prevalencia de brucelosis, indicaron que la inmunidad inducida por la cepa RB51 (al menos un año después de la vacunación) es similar o mejor que la inmunidad inducida por la cepa 19. Se ha establecido en el modelo murino que la inmunidad conferida por la cepa RB51 es solamente mediada por células T, a partir de experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos dirigidos contra la cepa RB51 los cuales no indujeron protección, mientras que la transferencia pasiva de células T adaptadas si proporcionaron protección. Los estudios en el ratón indican que la cepa RB51 puede proteger contra las infecciones por *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis* y *B.ovis*. Las células T citotóxicas son capaces de eliminar a los macrófagos infectados con *Brucella*, las cuales fueron inducidas por vacunación con la cepa RB51. Desde 1996, la cepa RB51 de *B. abortus* es la vacuna oficial en USA para la profilaxis de la brucelosis en el ganado bovino y el empleo de la cepa 19 ha sido prohibido. Otros países donde la vacuna ha recibido aprobación oficial y se emplea actualmente son: Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica, México, Paraguay y Venezuela. Cada país usa métodos ligeramente diferentes para administrar la vacuna (Karhel, 1998).

La cepa RB51 en el modelo murino es capaz de proteger contra infecciones con *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis* (Winter, 1996). Trabajando con varias especies de animales se ha confirmado una excelente capacidad protectora en cerdos contra la infección con *B. suis* bajo condiciones de campo y trabajando con cabras se ha encontrado que la cepa RB51 puede proteger contra *B. melitensis*, aunque se necesitan definir los protocolos de vacunación óptimos en esta especie animal. Un estudio llevado a cabo en borregos indica que la RB51 no induce inmunidad protectora en esta especie si se aplica sólo una dosis (Jiménez de Bagues, 1995), la revacunación aumenta la inmunidad. Todas las especies permanecen serológicamente negativas después de la vacunación con RB51 en todas las pruebas serológicas convencionales para detección de Brucelosis. En la actualidad,



han sido vacunados más de 5 millones de becerros con la dosis recomendadas de  $3.4 \times 10^{10}$  organismos sin efectos adversos. En observaciones no publicadas se ha reportado protección eficaz cuando la inmunización inicia con animales no mayores de cuatro meses. Las vacas preñadas pueden ser vacunadas en forma segura con  $10^9$  organismos sin la inducción de placentitis o abortos. La inoculación intravenosa de  $10^{10}$  organismos produjo infección placentaria y fetal pero no el aborto, sugiriendo que la vacunación de adultos no preñados con altas dosis puede ser segura aunque, son necesarios estudios controlados empleando la ruta recomendada y un gran número de ganado (Palmer, et. al. 1996). La administración oral de RB51 en ratones y ganado vacuno demuestra que la inmunidad protectora puede inducirse abriendo una campaña de inmunización para animales salvajes. Finalmente, aunque la cepa RB51 tiene un excelente récord de estabilidad, la naturaleza exacta de las mutaciones aún no se conoce. Lo más probable que RB51 tiene una alteración en el gen *rfbU* y algunos genes adicionales indefinidos que se encuentran controlando el ensamble y transporte de la molécula de LPS; aunque están por definirse la naturaleza exacta de las mutaciones en la cepa RB51 (Schurig, 1997).

#### **Otras vacunas elaboradas con cepas rugosas.**

Teniendo establecida la utilidad de las capas rugosas para la inducción de inmunidad protectora en una variedad de especies animales contra alguna variedad de *Brucella spp.* se especula que las mutantes rugosas de *B. melitensis* o *B. suis* puede inducir inmunidad protectora que puede ser superior a la inducida por la cepa RB51. Se ha identificado que el gen *rfbU* en *Brucella* que codifica para manosil transferasa, una enzima necesaria para el ensamble de la cadena-O de *Brucella*. Usando la secuencia del gen *rfbU* de *Brucella* se han construido mutantes por disrupción con *B. melitensis* 16M y *B. suis* (biotipo 4 ) generando mutantes rugosos de *B. melitensis* VTRM1 y *B. suis* VTRS1 (Schurig, 1997).

VRM1 y RS1 fueron probadas en ratones para detectar su virulencia ( evaluándola en el bazo después de la infección intraperitoneal) y su habilidad para proteger ratones con infecciones por cepas de *Brucella* homólogas y heterólogas. La virulencia de VTRM1 y VTRS1 fue más baja que la virulencia de sus cepas parentales pero la atenuación llevada a cabo no fue tan acentuada como con la cepa RB51, esta característica indica que *rfbU* está involucrado en la virulencia pero además sugiere que otros genes pueden jugar un importante papel en la atenuación. Varios grupos están trabajando en la atenuación de *Brucella*, ya sea interrumpiendo o borrando una variedad de genes de virulencia

potenciales, por ejemplo, *B. melitensis* 16M con el gen *pur E* interrumpido parece que realmente si se logra la atenuación y posee buenas características de protección. Las cepas VTRM1 y VTRS1 inducen inmunidad contra la infección con *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis* aisladas a partir de una gran variedad de especies animales. En muchas instancias, la protección conferida por VTRM1 y VTRS1 es superior a la protección inducida por RB51, probablemente porque estas cepas se replican más vigorosamente y aumentan su cantidad en mejor forma que la cepa RB51 y esta característica puede inducir una fuerte respuesta CMI. Ninguna de las cepas induce anticuerpos contra la cadena-O. Están en progreso los estudios usando VTRM1 en cabras y VTRS1 en cerdos (Schurig, 1997).

### **Vacunas recombinantes**

El uso de inmunógenos de *Brucella*, como antígenos recombinantes, para inducir una respuesta inmune protectora en animales está siendo investigado por varios grupos. La estrategia está en identificar aquellos antígenos de *Brucella* que son verdaderamente capaces de inducir un respuesta protectora tipo CMI. Varias pruebas *in vitro* como la producción de citocinas (IFN, IL2, IL12, etc.) proliferación linfocitaria específica de antígeno, células T citotóxicas inducidas por células infectadas con *Brucella* y pruebas *in vivo* (hipersensibilidad retardada) pueden ser usadas para seleccionar los posibles antígenos protectores pero, estas investigaciones por el momento no han sido completamente desarrolladas y no garantizan la selección de un antígeno protector. Los antígenos recombinantes pueden ser liberados con un sistema de vector apropiado o purificados a partir de bacterias recombinantes, plantas o virus de insectos (Baculovirus) e inyectados en presencia de adyuvantes apropiados y/o citocinas estimuladoras. Por ejemplo, algunos niveles de protección han sido inducidos con las proteínas recombinantes purificadas de *Brucella* L7/L12 indicando que, si el antígeno apropiado es seleccionado, el desarrollo de estas vacunas puede ser exitoso. *Salmonella typhimurium* x4064 expresando una proteína de *Brucella* de 31kDa que ha sido usada para la inmunización oral de ratones y ha producido anticuerpos séricos y locales contra las proteínas recombinantes, aunque la respuesta CMI fue pobre. Se han usado varias vacunas recombinantes utilizando virus *Vaccinia* expresando una variedad de antígenos de *Brucella* como el HtrA, GroEL, GroES, Cu/Zn SOD y YajC entre otras para inducir respuesta inmunes celulares y humorales en ratones. A partir de estos estudios esta claro que las vacunas con virus *vaccinia* recombinantes son capaces de expresar antígenos de *Brucella* y de inducir respuestas inmunes específicas *in vivo* hacia estos antígenos (Toth et. al., 1995). Muchas investigaciones en este campo tienen la necesidad de optimizar vectores y niveles de

producción de antígenos recombinantes para llevar a cabo una respuesta CMI apropiada y protectora. Hay que recordar que aunque se posean antígenos realmente protectores y no se poseen mecanismos eficientes de liberación, no se puede ejercer una presentación apropiada del antígeno y los mecanismos necesarios de procesamiento para la inducción de una respuesta CMI (Schurig, 1997).

### **Vacunas con ADN desnudo.**

Recientemente las vacunas con "ADN desnudo" se han desarrollado para inducir respuestas inmunes hacia antígenos seleccionados. En principio, el gen codificante para el antígeno seleccionado expresado con un promotor eucariótico (por ejemplo el promotor CMV) es liberado al hospedero en un plásmido. Bajo condiciones adecuadas de liberación de estas vacunas, las células presentadoras de antígeno en el hospedero son transfectadas y capaces de sintetizar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos, resultando eventualmente en una respuesta celular específica de células T y B para el antígeno seleccionado. En este sentido se han producido respuestas inmunes hacia proteínas de *Brucella* GroEL y Cu/Zn SOD (superóxido dismutasa) en ratones usando el "ADN desnudo", aunque los experimentos todavía están en progreso. En la actualidad, es difícil llevar a cabo un programa de inmunización para animales usando tecnología de "ADN desnudo" por que a pesar de los costos que esto implica, no se están desarrollando infraestructuras que disminuirán los costos dramáticamente (por ejemplo purificaciones de grandes volúmenes de plásmido). Las metodologías de "ADN desnudo" pueden usarse para determinar que genes codifican para antígenos protectores en periodos muy cortos de tiempo. Una vez que los genes sean identificados, o los antígenos para los cuales ellos codifican, pueden ser incorporados a diversas vacunas. Las vacunas de "ADN desnudo" combinan tanto el efecto adyuvante de las regiones CpG y la expresión intracelular y persistente del antígeno (Al -Mariri et. al., 2001).

### **Diferencias Genéticas.**

Finalmente no hay que olvidar que la respuesta inmune a un antígeno incluyendo la respuesta a *Brucella spp*, esta gobernada por la carga genética de un individuo y aunque algunos individuos pueden ser protegidos por inmunización con un antígeno particular bajo formas particulares de liberación otros no; algunos individuos en la población son resistentes a Brucelosis mientras que otros casos no lo son; y las cepas pueden estar atenuadas para una especie de animales o individuos y en otros casos no (Schurig, 1997).

## PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROYECTO

La protección contra *B. ovis* puede producirse usando una vacuna subcelular multivalente, y es posible que un antígeno dominante o un buen adyuvante o ambos puedan proteger usando una vacuna subcelular monovalente. (Al-Mariri et. al., 2001).

La eficacia de protección contra *B. ovis* de las vacunas vivas como por ejemplo la de *Brucella abortus* cepa RB51, ha sido evaluada en carneros usando la vacuna de *B. melitensis* cepa Rev 1 como vacuna de referencia, y se ha observado que la vacuna RB51 no confiere inmunidad protectora contra *B. ovis* en carneros (Blasco et. al., 1987).

Aunque la vacuna Rev 1 protege contra la infección con *B. ovis* en carneros y es una vacuna atenuada; retiene algo de virulencia. Además Rev 1 es un organismo que puede dar resultados falsos positivos en pruebas serológicas lo cual puede interferir con el diagnóstico de la brucelosis ovina (Blasco et. al., 1987).

La localización intracelular de esta bacteria implica que se requiere una respuesta inmune mediada por células, que hace que la respuesta tipo Th1 sea crucial para controlar la infección (Al-Mariri et. al., 2001).

Aunque el papel de *B. ovis* como bacteria intracelular facultativa capaz de sobrevivir en macrófagos ha sido establecido, los experimentos de transferencia pasiva han demostrado que en ratón, la protección es atribuible parcialmente a inmunidad mediada por células. La identidad del tipo o tipos celulares protectores aún no ha sido totalmente demostrada, aunque se ha observado la inducción de una población dominante CD4<sup>+</sup>/Th1 (Jiménez de Bagües, 1994).

Tanto el tipo de antígeno y el microorganismo administrado al hospedero ( así como la dosis y la ruta de inmunización) son factores importantes que influyen el tipo de respuesta inmune; y está bien establecido que la presencia de ciertas citocinas en el sitio de inoculación, es crucial para la respuesta de células-T, además los adyuvantes utilizados son de gran importancia. Se ha demostrado que los oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen una región inmunoestimuladora CpG no metilada (5'-purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina-3'), llamados CpG-ODN pueden actuar como adyuvante para eliminar patógenos intracelulares. Es por ese motivo que en este trabajo se decidió tomar este adyuvante descrito recientemente, y probar su efecto potencial con antígenos tipo OMP de *Brucella* que han sido previamente descritos (Al-Mariri et. al., 2001).

Debido a la importancia económica reconocida de la brucelosis ovina y a los esfuerzos para desarrollar una vacuna alternativa a Rev1, se conoce muy poco acerca de la naturaleza de la inmunidad protectora a esta enfermedad. Este es un punto que contrasta con los estudios realizados en *B. abortus*, en donde el modelo murino ha sido empleado extensamente en años recientes para estudiar una gran variedad de interacciones hospedero-parásito y el desarrollo de inmunidad protectora (Blasco et. al., 1987).

Por lo anterior, en el presente trabajo se elaboró un inmunógeno, utilizando los componentes de la membrana externa de *B. ovis* como antígeno, ya que se sabe por ejemplo, que la Omp31 es un buen candidato para el desarrollo de vacunas subcelulares contra la infección con *B. ovis* (Vizcaíno et. al., 2001) y se comprobó la efectividad del ADN de *B. abortus* como adyuvante; para inducir una respuesta inmune efectiva contra antígenos de la membrana externa de *B. ovis*, y se evaluó dicha efectividad en un modelo murino, ya que en México la NOM de la campaña contra la brucelosis no señala el uso de vacuna alguna contra *B. ovis*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Elaborar un inmunógeno de proteínas de membrana externa empleando ADN de *B. ovis* como adyuvante.

### **Objetivos Particulares**

- Lograr la extracción de proteínas de membrana externa de *B. ovis* y ADN de *B. ovis* y *B. abortus*.
- Preparar inmunógenos que contengan proteínas de membrana externa de *B. ovis* empleando ADN de *B. ovis* y/o *B. abortus* como adyuvante.
- Evaluar en un modelo murino la capacidad de Omp y ADN de *B. ovis* para inducir protección contra el desafío experimental con *B. ovis* cepa de campo.



## MATERIAL Y METODOS

La cepa de *Brucella ovis* que se utilizó para el desarrollo de este trabajo experimental fue la cepa REO 198, una cepa de crecimiento independiente de CO<sub>2</sub> y la cepa vacunal de *Brucella abortus* RB 51, proporcionadas por CENID – Microbiología, INIFAP – SAGARPA.

### 1. Extracción del ADN de *B. ovis* y *B. abortus*.

Se sembraron las cepas (*B. ovis* y *B. abortus*) en agar brucella y se incubaron a 37°C / 72 hrs, se cosecharon en solución salina fisiológica estéril y se inactivaron a 85°C / 30 min. Para obtener el pellet de microorganismos se centrifugaron a 1000 X g / 10 min. y se decantó cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendieron en 5 ml de solución 1 y se agregaron 15 µl de lisozima (20 mg de lisozima / ml - SIGMA EC 3.2.1.17. L 7651), se dejó reposar durante 45 min. en baño de hielo o también puede hacerse a 37°C durante toda la noche, se agregó 1 ml de solución STEP y después 30 µl de proteinasa K con una concentración de 20 mg de proteinasa K / ml ( EC. 3.4.21.64 P2308), se homogeneizó perfectamente y se calentó de 50-60 °C /1 hr agitando periódicamente hasta aclarar; se agregó un volumen de solución fenólica amortiguada y después se agitó durante 5 min. en vórtex, enseguida se centrifugó a 3500 rpm / 15 min y se desechó la fase orgánica y se le agregaron 750 µl de solución de acetato de potasio, después se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezclaron lentamente, después de lo cual se obtuvo la mezcla de ADN/ARN. El alcohol fue decantado y se agregaron 5 ml de TE 10:1 y enseguida 2 µl de RNAsa (2-5 mg de RNAsa / ml), se dejó reposar 1 hr. a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche y se añadió un volumen de cloroformo se emulsificó con agitación y se centrifugó a 3500 rpm/15 min, se descartó la fase orgánica y se agregaron 750 µl de solución de acetato de potasio a la fase acuosa y mezclaron, enseguida se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezclaron, se decantaron y finalmente se disolvió el ADN en 2ml de TE 10:1 y conservar a –20 °C hasta su utilización (Sambrook, et. al. 1989).

NOTA: La preparación de cada una de las soluciones viene indicada en el anexo.

## **2. Extracción de las Proteínas de Membrana Externa de *B. ovis*.**

Se cultivaron los microorganismos en Caldo brucella, con agitación a 37 °C/48 hrs, se centrifugaron a 1000 X g /15 min./4 °C, se lavó la pastilla con HEPES 10mM y se centrifugó a 1000 X g / 15 min. /4 °C. La pastilla fue resuspendida en HEPES 10mM, p-metilsulfóxido (PMSF) 0.1M y EDTA 2 mM, enseguida se sonicó (6 pulsos de 60 seg.) y se centrifugó a 1000 X g /15 min./4 °C. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 150 000 X g / 1 hr./4 °C (el sobrenadante contiene las proteínas del citosol y la pastilla las membranas totales). La pastilla fue resuspendida en HEPES 10mM + Sarcocyl al 1%, se agitó 30 min./ 37 °C y se centrifugó a 150 000 X g / 1 hr. /4 °C. El sobrenadante fue decantado, el cual contiene a la membrana interna. Finalmente la pastilla se resuspendió en agua destilada estéril, la cual contiene a las proteínas de membrana externa (Morton, 1996).

## **3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.**

Se preparó un gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X (Tris base 0.9M, ácido bórico 0.9M, EDTA 20 mM, pH 8.1 – 8.2, ajustar con ácido bórico, diluir dicha solución 1:20) y se calentó en microondas 30-60 segundos hasta disolver completamente la agarosa, enseguida se enfrió y se agregaron 2 µl de Bromuro de etidio (10 mg/ml). La mezcla se incorporó rápidamente a la cámara de electroforesis y se esperó a que el gel solidificara. El gel fue sumergido en TBE 0.5X y se adicionó a cada pozo 5 µl de muestra de ADN amortiguador de corrida tipo III (5 µl de muestra + 1 µl de amortiguador 6X), posteriormente se realizó el corrimiento a electroforético a 80 V / 30 – 40 min. y una vez finalizado el mismo, se extrajo el gel y se observó en el transluminador UV para detectar la presencia de ADN.

Además de detectar ADN por corrimiento electroforético en geles de agarosa se procedió a determinar tanto su concentración y pureza mediante espectrofotometría a 260 nm y por la relación de densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm ( $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ ), respectivamente (Sambrook, et. al. 1989).

#### 4. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida de las Proteínas de Membrana Externa de *Brucella ovis* (Laemmli. 1970).

El método mostrado a continuación describe la preparación de muestras por SDS – PAGE, el método estándar de Laemmli .

La máxima cantidad de proteína que puede cargarse en un pozo para una muestra típica en un gel es de 1-5  $\mu\text{g}$  para una banda individual y 30 – 50  $\mu\text{g}$  para una mezcla compleja. Los volúmenes aplicados al gel pueden ser de 10 – 50  $\mu\text{l}$  aproximadamente.

Se adiciona el amortiguador de muestra directamente a las proteínas previamente extraídas. Para muestras que se encontraban previamente en suspensión, se adicionan 0.25 volúmenes de amortiguador de muestra concentrado, después glicerol al 10% ( siempre y cuando la muestra no contenga previamente glicerol o sucrosa) y se mezcla perfectamente.

Amortiguador de muestra para SDS - PAGE
Tris – HCl, pH 6.8, 0.0625 M
SDS 2%
$\beta$ - mercaptoetanol 5%
Glicerol 10%
Azul de bromofenol 0.01 %

Amortiguador de muestra para SDS – PAGE 5X
Tris – HCl, pH 6.8, 0.312 M
SDS 10%
$\beta$ - mercaptoetanol 25%
Glicerol 10%
Azul de bromofenol 0.05 %

Enseguida se calienta la muestra a 100 C durante 1 minuto y se centrifuga en una microfuga de 2 – 5 minutos y se utiliza el sobrenadante.

Se ensamblan los contenedores del gel (placas de vidrio y espaciadores) en el aparato para colocar los moldes. Se deben de elegir espaciadores de 0.75 – 1.0 mm para trabajos de rutina.



Después se prepara la solución del gel separador a partir de una solución madre. Para las soluciones mostradas abajo, 10 ml de gel separador de X%, usar X/3 ml de solución madre de acrilamida, 2.5 ml de amortiguador de separación, y  $7.5 - X/3$  ml de agua desionizada y dejar el gel a temperatura ambiente.

*Solución madre de acrilamida*

Acrilamida al 30 %

Bisacrilamida 0.8 %

*Amortiguador de gel separador (4X)*

Tris – HCl 3.0 M, pH 8.8

*Solución de persulfato de amonio*

Persulfato de amonio en agua 12.5%. Fresco.

Se adicionan 5  $\mu$ l de TEMED y 50  $\mu$ l de solución de persulfato de amonio por cada 10 ml de solución de gel y se mezclan, enseguida se vierte inmediatamente en el molde para el gel, se cubre el gel separador con agua saturada con isobutanol y se deja que polimerice a temperatura ambiente.

Enseguida se prepara la solución de gel concentrador. Para un gel concentrador de 4 ml, usar 670  $\mu$ l de solución madre de acrilamida, 1.0 ml de amortiguador para gel concentrador, 2.3 ml de agua desionizada y se deja a temperatura ambiente.

*Amortiguador para gel concentrador (4X)*

Tris – HCl 0.5 M, pH 6.8

Ajustar el pH a temperatura ambiente con HCl.

Después de que el gel ha polimerizado aspirar la cubierta del gel separador, enjuagar brevemente con agua desionizada y remover el exceso de agua de la superficie. Enseguida se adicionan 5  $\mu$ l de TEMED Y 30  $\mu$ l de persulfato de amonio a 4 ml de solución de gel concentrador, mezclar la solución y pipetear en el molde del gel e inmediatamente insertar el peine para formar los pozos para las muestras, teniendo cuidado de no formar burbujas.

Una vez que se halla llevado a cabo la polimerización, se retira cuidadosamente el peine, se enjuagan los pozos con agua desionizada, se inserta en el aparato de electroforesis y se adiciona amortiguador de corrida en la parte superior e inferior de los electrodos de la cámara. Debe de asegurarse de que no existan goteras ni burbujas debajo del gel y en los pozos de muestra.

Amortiguador de corrida

Tris – base 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0.1 %, pH 8.8

No ajustar el pH.

Se colocan las muestras de proteína en los pozos usando una micropipeta o una jeringa de microlitros. Los volúmenes de 10 – 50  $\mu$ l o más son aceptables, dependiendo del tamaño de los pozos de muestra; enseguida se conectan los electrodos y se aplica en forma constante un voltaje de 80 – 200 V hasta que el colorante esté a aproximadamente un centímetro de la base del gel. Una vez finalizado el tiempo de corrimiento, se desconecta la corriente, se remueve el gel del molde separando las placas cuidadosamente y el gel se tiñe.

#### *Solución de Tinción*

Azul de Coomasie al 0.25 % en

Acido acético – metanol – agua bidestilada (1: 4 : 5).

#### *Solución desteñidora*

Puede usarse cualquiera de las siguientes:

Acido acético – metanol – agua bidestilada (1: 5 : 4)

Acido acético – metanol – agua bidestilada (5: 5 : 1).

### **5. Determinación de la concentración de Proteínas de Membrana Externa mediante el Método de Bradford (Bradford. 1976).**

Se empleó el método de Bradford para conocer la concentración de proteínas de membrana externa obtenidas a partir de la extracción selectiva con Sarcocyl (anexo I).

## **6. Preparación e Inoculación del inmunógeno y evaluación de la efectividad de la vacunación en el modelo murino.**

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 4 – 6 semanas de edad y de aproximadamente 20 – 25 g de peso. Se formaron seis grupos de 10 animales cada uno, a los cuales se les inoculó una dosis de proteínas de membrana externa de 93 µg / ratón y de ADN de 8.9 µg / ratón.

**Grupo 1:** Proteínas de membrana externa

**Grupo 2:** Proteínas de membrana externa + ADN de *B. ovis*

**Grupo 3:** Proteínas de membrana externa + ADN de *B. abortus* RB51

**Grupo 4:** ADN de *B. ovis*

**Grupo 5:** ADN de *B. abortus*

**Grupo 6:** Solución Salina Fisiológica Estéril (control).

La inmunización se realizó vía intramuscular, en un volumen de 0.2 ml / ratón.

Se inoculó cada grupo de ratones (día cero), después de 21 días se realizó un desafío con *B. ovis* cepa de campo, inoculando aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/ml vía intraperitoneal en 0.5ml de solución salina fisiológica estéril. Se sacrificaron grupos de 3-4 ratones a los 7, 14 y 21 días post - desafío, enseguida se realizó un conteo de UFC en agar Brucella para cada muestra.

## **7. Método de extracción del bazo de ratón y conteo de UFC (Araya. 1989)**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical; enseguida se extrajo el bazo asépticamente. Los bazos se almacenaron en refrigeración en tubos Eppendorf estériles, hasta su utilización.

Los bazos fueron macerados con 1 ml de SSF estéril; este macerado se utilizó como solución stock de siembra. A partir del stock, se realizaron diluciones decimales  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , y después se procedió a sembrar en agar brucella.

Cada siembra se realizó con un volumen de 10 µl por cuadruplicado para cada una de las diluciones y se incubó a 37 °C / 24-48 hrs. en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación se procedió al conteo de UFC y se realizaron los cálculos necesarios para un volumen de 1 ml.

Se calculó la media para cada conteo de UFC / ml (cuatro valores por dilución,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ), promediando los valores para cada grupo y para cada determinado tiempo (7, 14 y 21 días). Enseguida dichos valores se convirtieron a unidades logarítmicas (log base 10) (Montaraz, 1986).

### **8. Métodos estadísticos**

La media del conteo de UFC de *B. ovis* de campo/ml en agar *Brucella* fue obtenida promediando los valores por triplicado y enseguida se transformaron a unidades logarítmicas, según el método reportado por Montaraz y Winter (Montaraz. 1986). Las unidades logarítmicas de protección fueron calculadas por la sustracción de cada conteo a partir de la media del conteo correspondiente al grupo control, según el método reportado por Araya y colaboradores (Araya. 1989). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante la Prueba de Rango Múltiple de Duncan utilizando el programa computacional SAS (SAS Institute INC. Cary, NC, USA. 1989 - 1995 Ver. 6.11), empleando  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha demostrado que *B. ovis* se replica efectivamente en bazo para producir una infección crónica y asintomática que puede ser combatida a través de una respuesta inmune (Jiménez, 1994) y que los ratones BALB/c, reconocidos como un modelo usado para brucelosis causada por *B. abortus* pueden ser usados para realizar estudios en *B. ovis* (Bowden, 1995; Bowden, 2000; Jiménez, 1994).

Riezu-Boj (1986), menciona que las proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y proteínas citoplasmáticas, son antígenos cuya importancia debe ser establecida para las pruebas de diagnóstico en infecciones causadas por *B. ovis* y que estos antígenos pueden ser utilizados como posibles inmunógenos para la elaboración de una vacuna.

Una parte importante del proceso experimental fue la obtención del antígeno (Omp de *B. ovis*) y el ADN brucelar; este último obtenido mediante la técnica de fenol - cloroformo, cuyos resultados fueron constatados mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 1), corroborado por su determinación espectrofotométrica mediante espectros de absorción y establecimiento de pureza en el UV cercano, donde se observa su absorción característica a 260 nm (fig. 2). Como puede apreciarse en el cuadro 2, la pureza del ADN tanto de *B. ovis* como de *B. abortus* se encuentra dentro de los rangos admisibles, ya que la relación de DO a 260 y 280 nm (la cual provee un estimado de pureza de los ácidos nucleicos), en ambos casos, es cercana a 1.8; específicamente: 1.89 para *B. ovis* y 1.99 para *B. abortus*, corroborando que no existe contaminación por fenol o proteínas en las muestras, ya que si ésta existiera, la relación de densidades ópticas sería significativamente menor a 1.6 (Sambrook, 1989).

Con lo que respecta a la extracción de las proteínas de las Omp de *B. ovis*, una vez obtenidas las Omp mediante precipitación selectiva con sarcocyl; se determinaron sus pesos moleculares aproximados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En la figura 3 se muestra el corrimiento electroforético de Omp de *B. ovis*, donde se observa la presencia de Omp de los grupos 1, 2 y 3, que coinciden con los pesos moleculares reportados en la literatura (Douglas et. al. 1984, Bowden et. al. 1995a, Moriyón et. al. 1998), los cuales incluyen a Omp de 25 - 27 kDa, 31 a 34 kDa, 36 a 38 kDa y Omp de 10, 16.5, 19, y 89 kDa, entre las que destacan un importante grupo de proteínas (Omp grupo 3), de las cuales se ha demostrado su elevada capacidad inmunogénica; debido a que poseen determinantes antigénicos expuestos en la superficie de *B. ovis* (Riezu - Boj, et. al. 1990); ya que los antígenos protectores en brucelosis, definidos en el modelo murino, están localizados en la membrana externa de *Brucella spp.* La inmunidad protectora puede ser mediada tanto por anticuerpos como por

células T (Bowden, 1995), particularmente el grupo de proteínas 3 expuestas en la superficie puede inducir una respuesta inmune protectora contra *B. ovis* (Jiménez de Bagües, 1994). Una vez verificada la presencia de dichas proteínas en cada una de las fracciones, estas fueron utilizadas para ser inoculadas como inmunógeno en el modelo murino.

La protección conferida por cada una de las preparaciones inmunogénicas en ratones BALB/c contra el desafío experimental con la cepa de *B. ovis* de campo (con un pase en ratón para aumentar su virulencia) fue evaluada por la disminución en el conteo de UFC en el bazo con relación al grupo control. En el cuadro 3 puede observarse el promedio de log de UFC/ml, su desviación estándar, así como el correspondiente grado de protección en diferentes etapas del tratamiento experimental (7, 14 y 21 días). Las unidades logarítmicas de protección fueron calculadas sustrayendo los valores promedio individuales del grupo experimental correspondiente, al valor promedio del grupo control. En este experimento la protección fue definida como una reducción estadísticamente significativa en el número de bacterias en el bazo de ratones inmunizados, comparado con los ratones control que sólo recibieron solución salina fisiológica (Montaraz, 1986).

En la figura 4 se grafica el conteo del log de UFC/ml de *B. ovis* en bazo de ratón a los 7, 14 y 21 días post-desafío, en donde puede observarse una disminución en las UFC en la mayoría de los tratamientos experimentales en relación al grupo control en las tres etapas del estudio; a excepción del tratamiento con ADN de *B. ovis* a los 7 días post-desafío y el de Omp con ADN de *B. abortus* a los 14 días post-desafío, en donde el conteo de UFC rebasa en cada caso a los conteos del grupo control; pero en todos los demás casos se logró la disminución estadísticamente significativa en el conteo de UFC para cada tratamiento; lo cual se consigue para todos los grupos experimentales a los 21 días post-desafío, donde se advierte que se consiguió proteger a los ratones contra el desafío experimental con *B. ovis* de campo cuando se aplicaron cada uno de los tratamientos, en especial cuando se aplicaron sólo las Omp, que es donde se observa la mayor disminución a los 21 días post-desafío.

A partir del cuadro 3 se graficó el logaritmo de protección conferido por cada uno de los tratamientos experimentales en relación al grupo control (Fig. 5), en donde se nota que en la mayoría de los tratamientos se ha logrado proteger en el modelo murino contra el desafío experimental con *B. ovis* de campo, y que a los 21 días se ha conseguido protección en todos los casos, en especial cuando se utilizan sólo Omp como inmunógeno (denotadas como ME en el gráfico).

En base a los resultados obtenidos y a la protección conferida por cada tratamiento experimental, se advierte que en general todos los grupos confieren protección en mayor o menor



grado, debido a que existen diferencias estadísticamente significativas de todos los tratamientos respecto al grupo control (cuadro 3); siendo más significativa esta diferencia, especialmente a los 14 y 21 días, en aquellos ratones que recibieron sólo Omp como antígeno de protección (ver figura 5); lo cual indica que las Omp por sí mismas, son capaces de proteger contra el desafío experimental con *B. ovis* de campo; aún en ausencia de ADN de *B. ovis* o *B. abortus*, y que el ADN de ambas especies, al contrario de lo que se pensaba, realmente no está ejerciendo un efecto adyuvante, por que en vez de aumentar la respuesta protectora contra Omp, la disminuye; lo cual es muy notorio a los 14 y 21 días post-desafío en la figura 5, donde se puede ver que en las preparaciones en donde las Omp se encuentran acompañadas con cualquiera de los dos tipos de ADN (*B. ovis* o *B. abortus*), la protección es significativamente menor a aquellas que sólo contienen Omp, donde el grado de protección es muy elevado en relación al ejercido por la mayoría de los demás grupos experimentales; a excepción de la preparación que emplea sólo ADN de *B. ovis* a los 14 días.

Lo resultados anteriores confirman el efecto protector de las Omp de *B. ovis*, el cual ya había sido evaluado en ratones BALB/c, tanto para *B. ovis* PA como para *B. melitensis* 16M en ratones con una infección primaria de *B. ovis*, donde se demostró un alto nivel de resistencia a la reinfección, lo cual fue evidenciado por conteos bacterianos en bazo, los cuales tuvieron un decremento aproximado de 10,000 veces en comparación al grupo control a las dos semanas post-desafío (Jiménez de Bagües, 1994).

Por otro lado, también ya se habían realizado investigaciones acerca del efecto adyuvante del ADN de *B. abortus* cuando se utilizaba con antígenos tales como LPS y lisados bacterianos. El ADN bacteriano que contiene secuencias inmunoestimuladoras (CpG) estimula el sistema inmune innato, lo cual puede influenciar en el tipo de respuesta adaptativa de células T; aumentando la respuesta Th1 y la de linfocitos T citotóxicos. La comparación directa entre LPS de diferentes bacterias y el ADN bacteriano demostró que este último tiene mayor capacidad de inducción de IL-12 e IFN- $\gamma$  (citocinas asociadas a inmunidad protectora contra bacterias intracelulares) y que son características de la respuesta Th1 *in vivo* e *in vitro* en células de bazo (Huang, 1999).

El ADN bacteriano puede estimular diferentes poblaciones celulares o subpoblaciones para producir IL-12 (células B, monocitos, células dendríticas y PMN). Las secuencias CpG contenidas en el ADN bacteriano, estimulan directamente a las células B y macrófagos, promoviendo la producción de IL-12 por las células B (Huang, 1999). En el reporte de Huang y cols. (1999) se demuestra por primera vez que el ADN bacteriano induce IL-12, lo cual es aumentado por la presencia de IFN- $\gamma$ .

Aún cuando se ha demostrado que el ADN por sí mismo posee un efecto inmunoestimulador en el modelo murino; en la presente investigación los resultados obtenidos en cuanto al efecto protector del ADN brucelar *per se*, una vez que han sido desafiados los ratones con *B. ovis* de campo, muestra que a los 7 días post-desafío, como se ve en la figura 5, en el caso de ADN de *B. ovis* la protección ejercida es casi nula, en cambio, el efecto protector es mayor en el caso del ADN de *B. abortus*, posiblemente debido a que las diferencias en cuanto a la constitución genética entre las dos especies, provoque un efecto inmunoestimulador tardío por parte del ADN de *B. ovis* en los esplenocitos de ratón y que en cambio, como ya se ha demostrado por Huang (1999) es posible que el ADN de *B. abortus* sea reconocido más tempranamente y sea capaz de ejercer un efecto protector mayor en menor tiempo, lo cual podría explicar de alguna forma las diferencias tan marcadas que existen al utilizar ADN de *B. ovis* y *B. abortus* a los 7 días post-desafío. Sin embargo, a los 14 días post-desafío el comportamiento en cuanto el grado de protección es opuesto al que se observó a los 7 días, ya que aquí existe una mayor protección ejercida cuando se emplea el ADN de *B. ovis*, en comparación al de *B. abortus* (fig. 5), probablemente debido a que al inocular a los ratones con ADN de *B. ovis* se desencadenó una respuesta de reconocimiento durante los primeros días post-desafío, que aunque fue muy pobre, fue suficiente para alertar al sistema inmune, como para montar una potente respuesta alrededor del día 14, sin olvidar que las bacterias que fueron inoculadas son *B. ovis* y que éstas, al ser procesadas por el sistema inmune, previamente estimulado con ADN de *B. ovis*, permita que aproximadamente a los 14 días post-desafío se monte una respuesta inmune protectora muy eficaz y específica; lo cual hace pensar que en el genoma de *B. ovis* a diferencia de otras especies de *Brucella*, existen ciertas diferencias que provocan un reconocimiento desigual por parte del sistema inmune. En cambio, el grado de protección en el caso de ADN de *B. abortus* disminuye a los 14 días, tal vez porque la elevada cantidad de ADN de *B. ovis* contenido en las bacterias con las cuales se desafió, y que se han desarrollado en altas cantidades, presuntamente debido a la ausencia de una reinmunización, impidan que el ADN de *B. abortus*, que seguramente se encuentra en mucho menor cantidad, sea incapaz de mantener una respuesta inmune protectora, lo cual podría explicar la disminución de la protección a los 14 días.

Una vez pasados los 14 días post-desafío, en el día 21 pudo detectarse que se restablece el comportamiento mostrado a los 7 días, aunque en una forma mucho más homogénea entre los dos grupos experimentales, ya que ahora las diferencias entre ambos no son muy marcadas; en el caso de ADN de *B. ovis*, en el día 21, se nota una disminución de la protección en relación al día 14,



probablemente por la ausencia de una reinmunización, en cambio, en el caso de *B. abortus*, el aumento de protección, posiblemente fue desencadenado debido a que el aumento de *B. ovis* que se replicaron en el bazo en días anteriores y que son procesadas por el sistema inmune, pudo haber ejercido un proceso parecido a una reinmunización; lo cual provocó el desencadenamiento de una respuesta de memoria ejercida por la inoculación en días anteriores de ADN de *B. abortus*, lo cual podría provocar un aumento de la protección alrededor del día 21 post-desafío.

Cuando se emplea Omp junto con ADN brucelar (ADN de *B. ovis* y *B. abortus*) se observa en ambos casos una disminución de la protección hacia el día 14, tal vez por que la gran variedad de Omp presentes en la preparación posiblemente podrían tener alguna interacción inespecífica con el ADN o entre proteínas obstruyendo y ocultando motivos en el ADN, relevantes para poder llevar a cabo el efecto adyuvante o epitopes importantes para desencadenar una adecuada protección, comparado a lo que se observa en el día 14 cuando el ADN de *B. ovis* o las Omp se inoculan solos. Las mismas razones podrían explicar el comportamiento observado cuando se inocula ADN de *B. abortus* solo y con Omp.

El reestablecimiento de la protección alrededor del día 21, en ambos casos, es probable que se deba a una respuesta inmune potenciada por el estímulo provocado por la presencia cada vez mayor de *B. ovis* replicándose en el bazo, lo cual podría jugar un papel reinmunizante, una vez que las bacterias han sido procesadas; y podría desencadenar una respuesta de memoria inmunológica en el ratón, confiriendo nuevamente protección.

En la presente investigación, aunque se logró corroborar que el ADN de *B. abortus* y de *B. ovis* pueden ejercer por sí mismos protección en ratones desafiados con *B. ovis* de campo, no se pudo observar el efecto adyuvante esperado cuando éstos eran aplicados junto con Omp; ya que como se mencionó antes, las Omp, por sí mismas, ejercen mejor efecto protector al ser inoculadas solas que con el ADN brucelar.

No debemos olvidar que las preparaciones de ADN que se emplearon aquí, son de ADN genómico desnudo, sólo disuelto en solución salina fisiológica estéril y desconocemos el estado real en el que éste se encontraba al momento de la inoculación (hidrólisis, desnaturalización, superenrollamiento, apareamiento inespecífico intercatenario, etc.), lo cual puede influenciar los resultados finales esperados, por lo que deben ampliarse los estudios en el diseño de estrategias para diseñar vehículos adecuados para mantener la integridad tanto del inmunógeno como del adyuvante.

Aunque se ha especulado acerca de las posibles explicaciones a los resultados obtenidos en este trabajo, existen evidencias científicas que podrían ayudar a explicar las diferencias con respecto a la protección conferida por los dos tipos de ADN utilizados como adyuvante (Fig. 5); en el sentido de que aunque ambas pertenecen al género *Brucella*, se sabe que *B. ovis* posee diferencias genéticas en relación a las otras especies de *Brucella* (Cloekaert et. al., 1996c). Lo cual podría explicar los diferentes resultados obtenidos al utilizar como adyuvante el ADN de *B. ovis* o el de *B. abortus*. Se conoce poco acerca de la conservación de epitopes de Omp en las cepas silvestres de *B. ovis* (Bowden, 1995a). En una investigación realizada por Bowden y cols. (1995a) trabajando con anticuerpos monoclonales dirigidos contra Omp en *Brucella spp.*, menciona que la falta de unión de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra dos Omp de 25- a 27- kDa de *B. ovis* parece ser debido a diferencias estructurales en las proteínas de *B. ovis* en relación a otras especies de *Brucella*. Esto puede ser importante para el diseño de vacunas subcelulares contra epididimitis ovina causada por *B. ovis*; además comprobó que los extractos ricos en OMP del grupo 3 de *B. ovis* (25 – 27 kDa) y otras proteínas de menor peso molecular, protegen tanto a borregos como a ratones contra infecciones experimentales con *B. ovis*.

Dentro de las diferencias genéticas una de ellas está a nivel del gen *omp25* el cual tiene una deleción localizada en el extremo 3' del gen. Esta deleción tiene importantes consecuencias para la expresión de epitopes en la superficie de células-B lo cual puede ser considerado para el desarrollo de vacunas contra infecciones causadas por *B. ovis*. La deleción de 36 pb encontrada en el gen *omp25* de *B. ovis* es única y distingue esta especie de las otras especies de *Brucella*. La ocurrencia de un mayor número de secuencias de inserción en *B. ovis* que en las otras especies de *Brucella* la hace diferente fenotípica y genotípicamente de las otras especies del mismo género (Cloekaert et. al., 1996c).

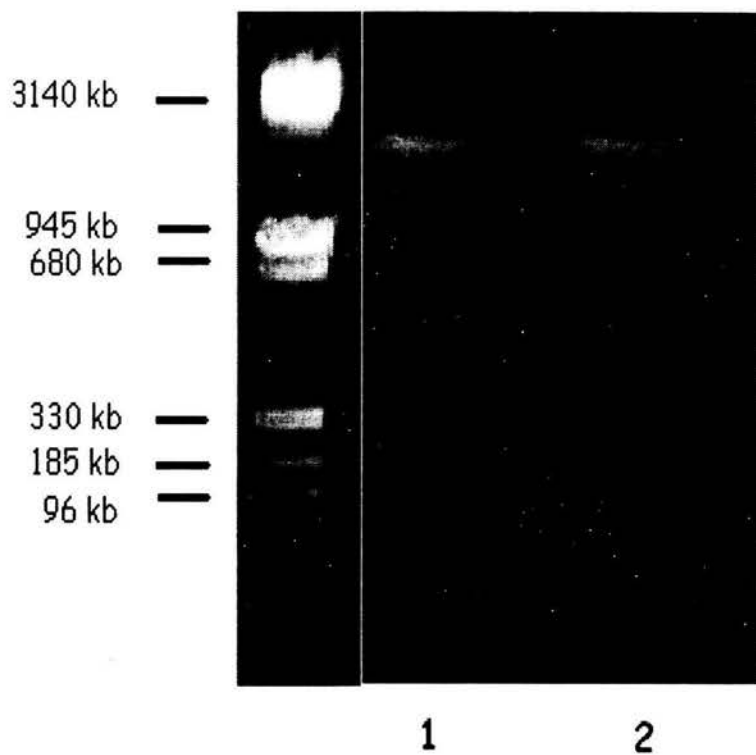
Fue determinada la secuencia de nucleótidos de una inserción descubierta previamente en *B. ovis* y se encontró que tiene las características de una secuencia de inserción (IS). El elemento designado IS711, de 842 pb, es similar en contenido de G + C al del genoma de *Brucella* y está unido por repeticiones invertidas de 20 pb (IR). Ninguna base de datos de ADN o proteínas tiene semejanza a los IS711 encontrados en *B. ovis* o sus productos génicos deducidos. (Halling et. al., 1993. Ouahrani et. al., 1993), lo cual podría explicar de forma no concluyente los diferentes grados de protección en ratones BALB/c observados aquí entre las especies de *B. ovis* y *B. abortus*.

Existen otras diferencias genotípicas al nivel de los genes *omp31*, que aunque estos parecen ser altamente conservados en el género *Brucella*, la sustitución de nueve nucleótidos ha sido detectada en

el gen de *B. ovis*, comparados a los de las otras especies, lo cual da como resultado diferentes propiedades antigénicas en las proteínas Omp31. El mapeo de epitopes de Omp31 de *B. ovis* usando anticuerpos monoclonales identificó dos regiones inmunodominantes en la proteína, lo cual depende de la conformación de la proteína que provoca diferencias entre *B. ovis* y otras especies de *Brucella* debido a la diferencia en 7 aminoácidos observados entre las Omp31 de diferentes especies (Vizcaino et al., 2001). Las razones por las cuales en algunos casos existe la ausencia de efecto adyuvante puede ser por la ruta de inmunización usada en este trabajo (i.m.), o más probablemente el intervalo entre la inmunización y el desafío (21 días), comparado a las condiciones usadas en otros trabajos previamente reportados (menor a 14 días). Elkins y colaboradores reportaron que la protección contra un patógeno es óptima varios días después del tratamiento con ADN y persiste por cerca de 2 semanas (Elkins et al., 1999). Cabe aclarar que a pesar de la concentración tan elevada de bacterias (del orden de  $10^8$ ) que se utilizaron como dosis de desafío, hubo protección significativa en todos los tratamientos experimentales, además no hay que olvidar que no se empleó una dosis de refuerzo durante la experimentación, lo cual muy probablemente hubiera conferido mayor protección en el modelo murino.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la capacidad inmunogénica de las proteínas de membrana externa de *B. ovis* y el efecto que ejerce el ADN de *Brucella* para conferir protección en un modelo murino contra el desafío experimental con *B. ovis* de campo, dejando abierta la posibilidad de elaborar inmunógenos con proteínas de membrana externa de *B. ovis* y ADN brucelar para ser utilizados en el control de la epididimitis ovina causada por *B. ovis* y eliminar las desventajas aunadas a las vacunas utilizadas actualmente para el tratamiento de la epididimitis ovina (interferencia con el diagnóstico, y patogenicidad para el ser humano); aunque deben ampliarse aún más las investigaciones en este campo. Una ventaja importante del uso de ADN desnudo como adyuvante radica en la simplicidad extrema de la preparación de la vacuna y la administración, acompañada con la ausencia de aceites y agentes emulsificantes en el producto inyectado.

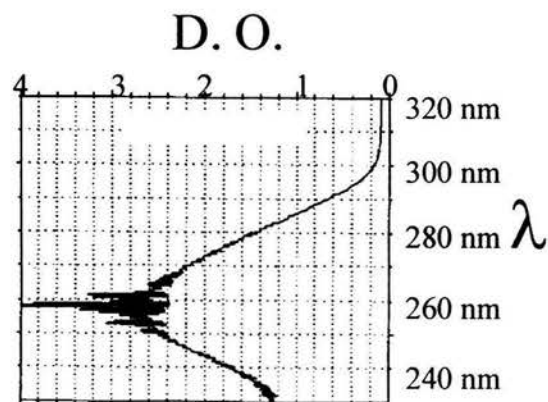
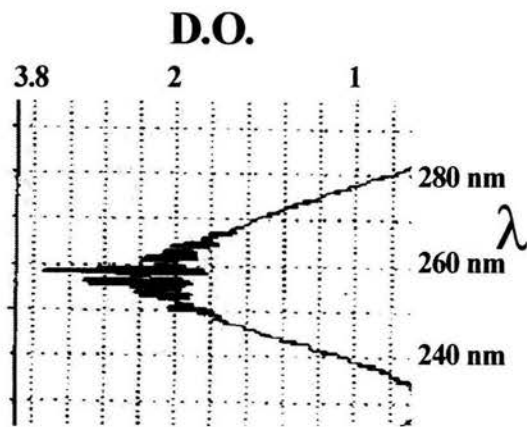
Aunque no se logró observar un efecto adyuvante ejercido por el ADN brucelar, es importante recalcar que a la fecha no se ha reportado aún la protección conferida por las proteínas de membrana externa de *B. ovis* cuando son administradas junto con el ADN de *B. abortus* o *B. ovis* en un modelo murino desafiado con *B. ovis* de campo, ni se había comparado el efecto adyuvante del ADN de *Brucella ovis* con respecto al de *B. abortus*, dejando abierta la posibilidad de realizar estudios más profundos al respecto.



**Figura 1.** Patrón de corrimiento electroforetico en gel de agarosa al 1% de ADN de *Brucella ovis* (carril 1) y *Brucella abortus* (carril 2) teñidos con bromuro de etidio. Se observa una banda única y sin degradación aparente en ambos casos de aproximadamente 2100 kb pares de bases y similares para ambas muestras.

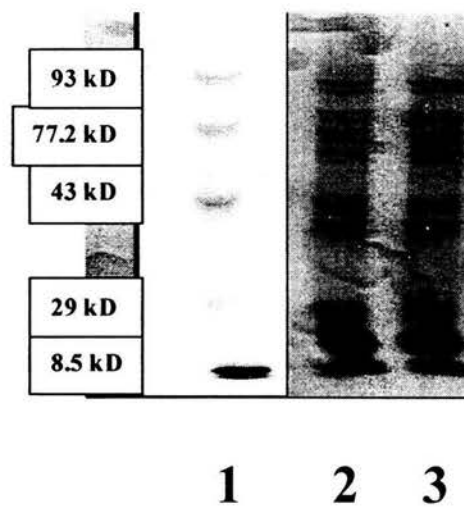
**Cuadro 2.** Determinación espectrofotométrica de la concentración y pureza de ADN de *Brucella ovis* y *Brucella abortus*.

ADN	PUREZA			Concentración ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
	DO 260 nm	DO 280 nm	$\text{DO}_{260 \text{ nm}} / \text{DO}_{280 \text{ nm}}$	
<i>Brucella ovis</i>	0.178	0.094	1.89	89
<i>Brucella abortus</i>	0.444	0.223	1.99	222



**Figura 2.** Espectros de absorción ( Densidad óptica [D.O.] contra longitud de onda [ $\lambda$ ] en nanómetros) de ADN genómico de *B. ovis* (arriba) y *B. abortus* (abajo). Las muestras fueron diluídas (1:50) en agua destilada estéril para ser leídas.





**Fig 3.** Corrimiento electroforético de Omp de *B. ovis*. Gel de poliacrilamida al 12 % teñido con Azul de Coomasie mostrando las proteínas de membrana externa de *B. ovis* en dos diferentes muestras indicadas por los carriles 2 y 3. El marcador de peso molecular está señalado con el número 1.

**Cuadro 3.** Valor promedio del log de UFC / ml  $\pm$  Desviación estándar para cada uno de los grupos experimentales a distintos tiempos (7, 14 y 21 días) y log de protección para cada grupo experimental. El conteo se realizó del filtrado de macerado de bazo de ratones BALB/c y se utilizaron 10 ratones por cada tratamiento experimental (n=10).

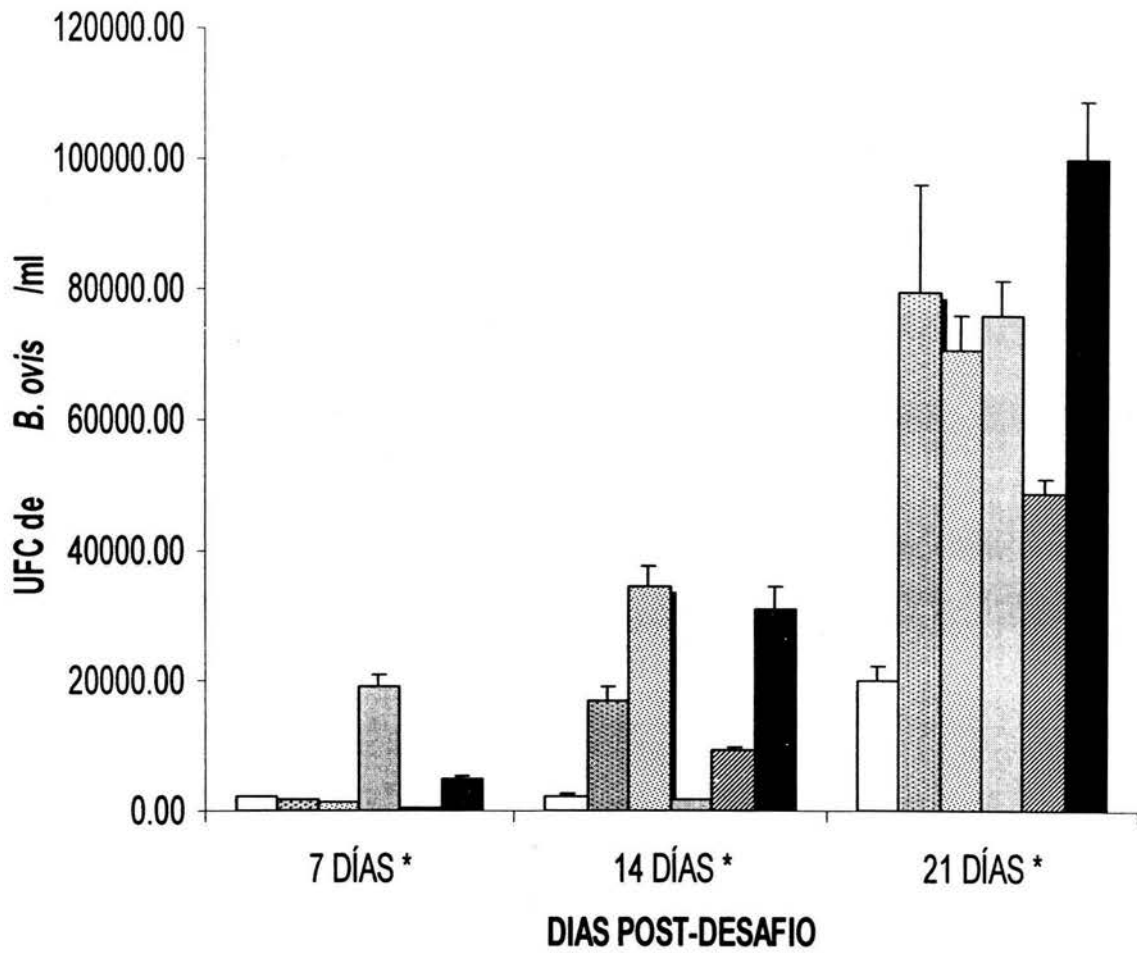
TRATAMIENTO n = 10/Tratamiento	7 DÍAS *	14 DÍAS *	21 DÍAS *	Log DE PROTECCIÓN		
				7 días	14 días	21 días
ME	3.35 $\pm$ 1.63(A)	3.38 $\pm$ 2.17(A)	4.30 $\pm$ 3.39(A)	0.35	1.11	1.23
ME + ADN OVIS	3.21 $\pm$ 1.72(A)	4.23 $\pm$ 3.30(B)	4.90 $\pm$ 4.22(B)	0.49	0.26	0.63
ME + ADN ABORT	3.07 $\pm$ 1.72(B)	4.54 $\pm$ 3.47(C)	4.85 $\pm$ 3.70(B)	0.63	-0.04	0.68
ADN OVIS	4.28 $\pm$ 3.26(C)	3.21 $\pm$ 2.47(D)	4.88 $\pm$ 3.73(B)	-0.58	1.28	0.66
ADN ABORT	2.52 $\pm$ 1.52(B)	3.96 $\pm$ 2.88(E)	4.69 $\pm$ 3.30(C)	1.18	0.53	0.84
CONTROL	3.7 $\pm$ 2.28(D)	4.49 $\pm$ 3.55(F)	4.99 $\pm$ 3.95(D)	0	0	0

\* Las medias con diferente letra son significativamente diferentes, haciendo la comparación entre tratamientos a los 7, 14 y 21 días (columnas). Elaborado mediante Prueba de rango múltiple de Duncan SAS System.  $\alpha = 0.05$

ME = Membrana externa

ADN OVIS = ADN de *B. ovis* REO 198

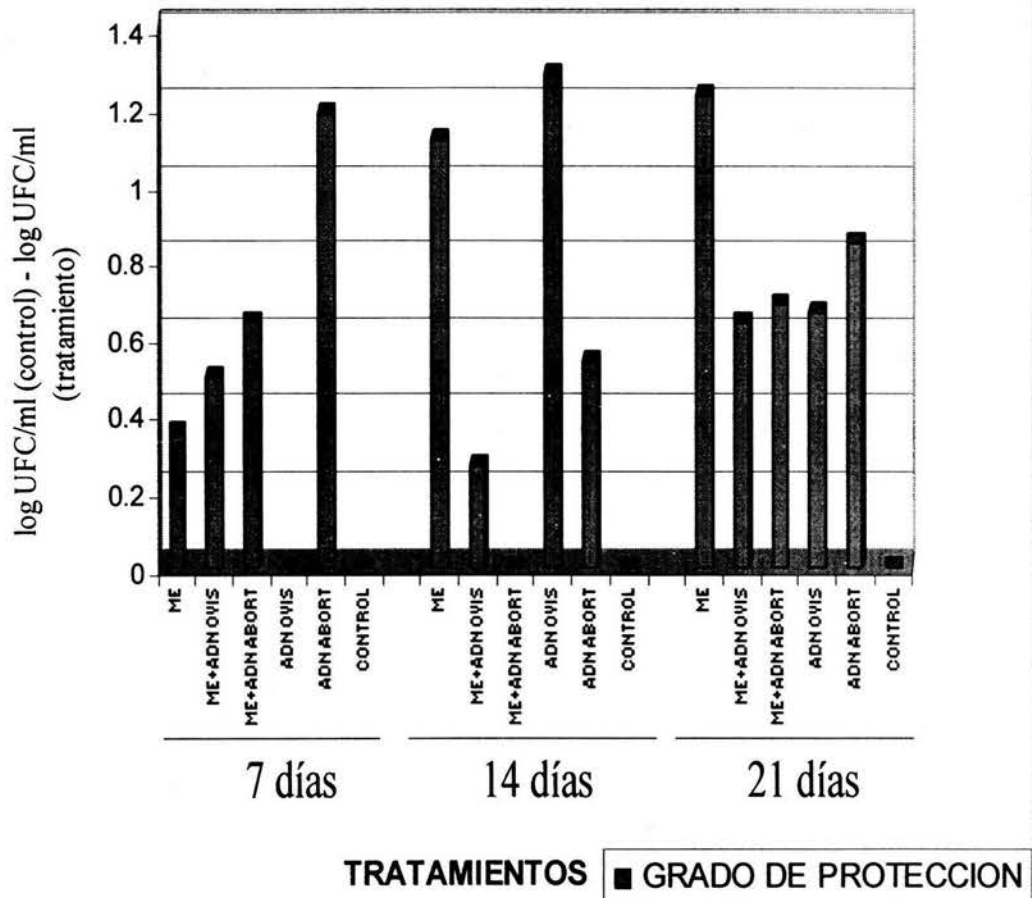
ADN ABORT = ADN de *B. abortus* RB51



□ ME ▨ ME + ADN OVIS ▩ ME + ADN ABORT ▧ ADN OVIS ▦ ADN ABORT ■ CONTROL

**Fig 4.** Conteo de UFC/ml de *B. ovis* en bazos de ratón BALB/c previamente inmunizados y desafiados. Se muestran los conteos de UFC / ml de *B. ovis* a los 7, 14 y 21 días post-desafío para cada uno de los tratamientos experimentales, así como su correspondiente desviación estándar. Los conteos fueron realizados a partir de filtrados de macerados de bazo, sembrados en agar brucella a los días post-desafío indicados. Se utilizaron grupos de 3-4 ratones en cada tratamiento.

**GRADO DE PROTECCION CONFERIDO POR DIFERENTES TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES EN MODELO MURINO DESAFIADO CON *B. ovis* DE CAMPO**



**Fig. 5.** Evaluación protectora contra el desafío de ratones BALB/c con cepa de *B. ovis* de campo. Los tratamientos experimentales están agrupados de acuerdo a los días post-desafío: 7, 14 y 21. Las unidades logarítmicas de protección se calcularon sustrayendo los promedios de los conteos de UFC/ml en cada tratamiento experimental a la media del conteo del grupo control, los cuales se muestran en el cuadro 3.

## CONCLUSIONES

- En todos los grupos experimentales se observaron diferencias estadísticamente significativas en el conteo de UFC en el bazo de ratones BALB/c contra el desafío experimental con *B. ovis* de campo con relación al grupo control.
- Tanto el inmunógeno (Omp de *B. ovis*) y el adyuvante (ADN de *B. ovis* y *B. abortus*), bajo las condiciones experimentales de este proyecto, tuvieron mayor efecto protector en ratones BALB/c desafiados experimentalmente con *B. ovis* de campo; aunque es necesario realizar más estudios al respecto.
- Las Omp de *B. ovis* poseen poder antigénico por sí mismas y ejercieron la mejor protección cuando se administraron sin ADN de *B. abortus* o *B. ovis*.

## ANEXO

### **CRECIMIENTO Y PROPAGACION DE *Brucella* PARA LA OBTENCION DE BIOMASA**

Cultivar en matraces de 2 l con 500 a 800 ml de caldo *Brucella* o soya tripticaseína con 0.5% de extracto de levadura. Cada matraz se inocula con aproximadamente  $10^{12}$  células viables obtenidas de un cultivo de 48 hrs. en agar de cualquiera de los dos medios mencionados anteriormente. Transcurridas 36 – 48 hrs. de incubación en agitación continua a 150 r.p.m. / 37 °C , la pureza de los cultivos se verifica mediante tinción de Gram. Las bacterias se recogen por centrifugación a 8000g / 20 min. / 4 °C y se lavan con solución salina fisiológica estéril.

### **PREPARACION DE SOLUCIONES USADAS EN LA EXTRACCION ADN**

**(aproximadamente para 20 muestras)**

#### **SOLUCION 1**

Tris – HCl 1M pH=8.0	5 ml
EDTA 0.5 M pH=8.0	10 ml
Agua estéril	85 ml

#### **SOLUCION STEP**

SDS 10%	1 ml
Tris – HCl 1M pH = 8.0	1 ml
EDTA 0.5 M pH = 8.0	16 ml
Agua estéril	2 ml

#### **SOLUCION TE 10:1**

Tris – HCl pH = 8.0 1M	2 ml
EDTA 0.5 M pH = 8.0	0.4 ml
Agua estéril	197.6 ml



## **SOLUCION DE ACETATO DE POTASIO**

Disolver 29.44 g. (3 M) de acetato de potasio en agua estéril y ajustar a pH = 5.0 con ácido acético.

## **FENOL AMORTIGUADO**

Colocar en un recipiente ámbar 500 ml de fenol fundido (65 – 68 °C) o líquido; agregar 500 ml de Tris – HCl 0.5 M pH = 8.0, agitar con agitador magnético y esperar de 15 – 20 min. de reposo hasta que se formen las dos fases. Sacar el Tris con una pipeta procurando no tomar fenol de la parte inferior, enseguida agregar 500 ml de Tris 0.1 M nuevamente, dejar reposar en frío y esperar a observar las dos fases. Después del reposo el fenol puede ser utilizado.

### **ADVERTENCIAS:**

- Todas las soluciones deben ser estériles.
- El etanol debe de estar frío para realizar la precipitación.
- Se emplean aproximadamente tres tubos de ensayo por cada extracción.
- La extracción de ADN puede interrumpirse en las siguientes etapas:
  - \* Después de agregar lisozima. Dejar a 37 °C toda la noche.
  - \* Agregar RNAsa y dejar toda la noche en refrigeración.
  - \* Dejar secar el ADN toda la noche a temperatura ambiente (después de haber decantado el etanol y el acetato de potasio a temperatura ambiente)

## **ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Brucella ovis***

### **PREPARACION DE REACTIVOS**

La preparación de los reactivos empleados se lleva a cabo de la siguiente manera:

1- Amortiguador 4x pH = 8.8. - Esta solución se emplea para la preparación del gel de separación, y se prepara pesando 18.154gr. del reactivo Tris-OH más 2ml de SDS al 20% , llevando al final la solución a un volumen de 100ml con agua bidestilada.

Amortiguador 4x      pH = 8.8	
Tris-OH	18.165g
SDS 20%	2ml
Agua bidestilada	100ml

2.- Amortiguador 4x pH = 6.8 .- Esta solución se emplea para la preparación del gel concentrador y se prepara pesando 6.055gr. del reactivo Tris-OH más 2ml de SDS al 20%, llevando al final la solución a un volumen de 100 ml con agua bidestilada.

Amortiguador 4x      pH = 6.8	
Tris-OH	6.055g
SDS 20%	2ml
Agua bidestilada	100ml

3.- Amortiguador de corrida 10x.- Esta solución se emplea para llevar a cabo el corrimiento de la electroforesis, esta solución se encuentra a una concentración de 10x quiere decir que esta muy concentrada por lo que es una solución madre de la cual se puede emplear para llevar a cabo varias corridas, de esta solución ya preparada se puede tomar 1ml y llevarlo a 10ml , que es la concentración a la que se va a utilizar.

Para la preparación de esta solución se pesan 144.1gr de Glicina, 30.2gr. de Tris-OH y 10 gr. de SDS llevando todo a un volumen de 1000ml con agua bidestilada. Si se requiere preparar menos volumen de solución buffer de corrida las proporciones de cantidades de reactivos es diferente.

Amortiguador de corrida 10x		
Glicina	144.1g	36g
Tris-OH	30.2g	7.5g
SDS	10g	2.5g
Agua bidestilada	1000 ml	250 ml

4.- Acrilamida – Bis-acrilamida 30%.- Esta solución se prepara pesando 60gr. de acrilamida y 1.74gr. de bis-acrilamida llevando a un volumen de 200ml con agua desionizada.

<b>Acrilamida – Bisacrilamida 30%</b>	
Acrilamida	60g
Bis-acrilamida	1.74g
Agua desionizada	200ml

5.- Persulfato de amonio.- Es un reactivo que se emplea en su presentación comercial. Se prepara al 12.5% (12.5 gr. / 100 ml de agua).

6.-TEMED 8.4%.- Es un reactivo que de su presentación comercial se prepara al 8.4% para poder ser utilizado.

7.- Azul de Coomasie.- Es una solución que se emplea para teñir los geles obtenidos después de una corrida, esta solución se prepara pesando 0.25gr. de azul de coomasie y llevarlo a un volumen de 100ml de una solución de CH<sub>3</sub>COOH – Etanol – Agua bidestilada con un a proporción de (5:4:1). Teniendo al final una solución de azul de Coomasie al 25% 0.25% en CH<sub>3</sub>COOH – Etanol – Agua bidestilada (5:4:1)

8.- Solución Desteñidora.- Esta solución se emplea para eliminar el exceso de solución de azul de coomasie en el gel, se puede utilizar cualquiera de las tres relaciones siguientes :

CH<sub>3</sub>COOH – Etanol – Agua bidestilada (5:4:1)

Metanol – agua bidestilada - CH<sub>3</sub>COOH (5:4:1)

Metanol - CH<sub>3</sub>COOH – Agua bidestilada (5:5:1)

9.- Gel concentrador 5%.- Es el gel que se utiliza para aplicar la muestra antes de iniciar el corrimiento y se prepara de la siguiente manera:

Buffer pH 6.8	1.5ml
Acri – Bis	1ml
Agua bidestilada	3.5 ml
TEMED	40µl
Persulfato	80µl

10.-Gel de corrida.- Es el gel que se emplea para llevar a cabo la separación de las proteínas y se pueden emplear a diferentes concentraciones.

Gel de Corrida				
	7.5%	10%	12%	20%
Buffer pH 8.8 (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5
Acril – Bis (ml)	2.5	3.3	3.75	6.6
Agua bidestilada (ml)	5	4.2	3.74	0.9
Temed al 8.4% (μl)	100	100	100	100
Persulfato de amonio 12.5% (μl)	200	200	200	200

11.-Muestra.- Para la aplicación en el gel se prepara de la siguiente manera:

15 μl solución de corrimiento + 15μl muestra

**PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE  
PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B	P
ALBUMINA*	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	-	-
PBS**	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	-	0.1	-
BRADFORD	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
PROBLEMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1

Todas la unidades están dadas en ml.

\* Solución stock de concentración 1mg de albúmina / ml

\*\* Solución buffer de fosfatos pH 7.4

P = Solución problema

B = se preparó con 0.1 ml de PBS + 1.9 ml de reactivo de Bradford

## LAVADO DEL MATERIAL

Debido a que no siempre se tiene la infraestructura necesaria para utilizar en cada extracción material nuevo; este puede reutilizarse siempre y cuando se tengan las precauciones de lavado que a continuación se mencionan:

Lavar con extran® (3 ml / 2 l de agua corriente) y dejar reposar en dicha solución durante un día, enjuagar perfectamente con agua corriente el exceso de extran® y dejar en una solución de agua con cloro concentrado durante un día, enjuagar el exceso de cloro y hervir con agua destilada caliente durante 3 hrs. , después reposar con agua destilada fría durante un día, secar en horno y esterilizar.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## BIBLIOGRAFIA

- Adams G.** (1997). "Pathology of brucellosis in domestic animals: A mini-review". 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9. Booklet publishing sponsored by IDEXX Laboratories, Inc.
- Afzal M., Scott J.** (1987). Isolation and antigenic reactivity of *Brucella ovis* outer membrane proteins. *J. Clin. Microbiol.* **25**:2132-2135.
- Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J., Walravens K. And Leteson J.** (2001). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with Bacterioferritin or P39 recombinant Proteins with CpG Oligodeoxynucleotides as Adjuvant. *Infect. Immun.* **69**: 4816-4822.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., & Verger J.M.** (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
- Araya, L. N., P. H. Elzer, G. E. Rowe, F. M. Enright, and A. J. Winter.** (1989). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.* **143**: 3330-3337.
- Ballas Z. K., et. al.** (1996). Induction of NK Activity in Murine and Human Cells by CpG Motifs in Oligodeoxynucleotide and Bacterial DNA. *J. Immunol.*, **157**: 1840-1845.
- Beer J.** Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos. Enfermedades producidas por bacterias y hongos e intoxicaciones. Acribia, Tomo II. 1981
- Blasco J. M. et. al.** (1987). Immunization with *B. melitensis* Rev1 against *B. ovis* infection of rams. *Vet. Microbiol.* **14**: 381-392.
- Blasco J.M., Barberan, M.** OVIS. Epidemiología, Patogenia y Cuadro Clínico. Ed. Luzán5. Publicación Bimestral. España. 1989.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 – 254.
- Marín C. M.** (1990). Brucelosis ovina: Etiología, Diagnóstico bacteriológico. *Ovis* 8, 15-22.
- Bowden R. A., Cloeckert A., Zygmunt M. S., and Dubray G.** (1995). Outer – membrane protein – and rough lipopolysaccharide – specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J. Med. Microbiol.* **43**, 344-347.



- Bowden R. A., et. al.** (1995a). Surface Exposure of Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Epitopes in *Brucella* Species Studied by Enzyme – Linked Immunoabsorbent Assay and Flow Cytometry. *Infect. Immun.*, **63**:3945-3952.
- Bowden R. A., Estein S. M. , et. al.** (1999) Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice monoclonal antibodies. *Microb. Infect.*, **2**, 481-488.
- Buddle M. B., Boyes B. W. A.** (1953) *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zeal. *Aust. Vet. J.* **29**, 145-153.
- Buddle, M. B.** Studies on *Brucella ovis*. A cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg.* 1956; **54**: 351 – 364.
- Bulguin, M.S. and Anderson, B. C.** (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *JAVMA.* 182(4): 372-374.
- Caroff, M. et. al.** (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of *B. abortus*. *Infect. Immun.* **46** , 384 – 388.
- Cloekaert, A., J.M.: Verger, M. Grayon, and N. Vizcaíno.** (1996a). Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol. Let.* **145**: 1-8.
- Cloekaert, A., M. S. Zygmunt, G. Bezard, and G. Dubray.** (1996b). Purification and antigenic analysis of the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Res. Microbiol.* **147**: 225-235.
- Cloekaert A., Verger J. M., Grayon Maggy, Zygmunt M. S. and Gre'Pinet O.** (1996c). Nucleotide Sequence and Expression on the Gene Encoding the Major 25-Kilodalton Outer Membrane Protein of *Brucella ovis*: Evidence for Antigenic Shift, Compared with Other *Brucella Species*, due to a Deletion in the Gene. *Infect. Immun.*, **64**: 2047-2055.
- Cloekaert, A.** “Antigens of *Brucella*”. (1997). 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9. Booklet publishing sponsored by IDEXX Laboratories, Inc.
- DeLong, W. J.** (1979). Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. *Am. J. Vet. Res.* **40**: 101-102.
- Díaz E., et. al.** Diagnóstico de Brucelosis Animal. CENID. Microbiología, INIFAP-SAGAR.
- Díaz R., & Bosseray N.** (1973). Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vét.*, **4**, 283-292.
- Douglas J. T.** (1984). Porins of Brucellosis. *Infect. Immun.*, **44**:16-21.

- Dubray, G. and Charriaut, C.** (1983). Evidence of three major polipeptide species and two major polysaccharide species in *Brucella* outer membrane. *Ann. Rech. Vet.* **14** : 311-318.
- Dzata, G. K. et. al.** (1991). The effects of adjuvants on immune responses in cattle injected with a *B. abortus* soluble antigen. *Vet. Microbiol.* **29**, 27-48.
- Ekdahl M.O., Money D.F. & Martin C.A.** (1968). Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, **16**, 81-82.
- Elkins K. L., Rhinchart-Jones T. R., Stibitz S., Conover J. S. and Klinman D.M.** (1999). Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte – dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J. Immunol.* **162** : 2291 – 2298.
- Gándara B., López A., Rogel M., Martínez E.** (2001). Limited Genetic Diversity of *Brucella spp.* *J. Clin. Microbiol.* **39**: 235 – 240.
- Gyles C. and Cohen Ch.** Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowa State University Press/Ames. 2ª imp. 1988.
- Halling S. M., Tatum F.M. and Bricker B. J.** (1993). Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene.* **133**:123-137.
- Hausler, W.J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J.** (1991). *Manual of Clinical Microbiology.* 5th De. p 457-461. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Hemmi H., et. al.** (2000). A Toll-Like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**: 740-745.
- Hitchcock, P.L.; Lerve, P.H.; Makelä, E.T.; Reitschel, W.; Strittmatter, W. and Mornson, D.C.** (1986) Lipopolysaccharide nomenclature. Past, present and future. *J. Bacteriol.* **166** : 699-705.
- Huang L. Y.,Krieg A. M., Eller N., Scott D. E.** (1999). Induction and Regulation of Th1 – Inducing Cytokines by Bacterial DNA, Lyopolisaccharide, and Heat – Inactivated Bacteria. *Infect. and Immun.*, **67** , 6257–6263.
- Jiménez de Bagues M. P., Elzer P. H., Blasco J. M., Marín C. M., Gamazo C. and Winter A. J.** (1994) Protective Immunity to *Brucella ovis* in BALB/c Mice following Recovery From Primary Infection or Immunization with Subcellular Vaccines. *Infect Immun.*, **62**, 632 –638.
- Jiménez de Bagues M. P. et. al.** (1995). *B. abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *B. ovis* in rams. *Vaccine.* **13** (3) 301 – 304.
- Karhel, S. C.** (1998). *Brucella abortus* strain RB51 vaccine: its advantages and risks. *Am. J. Vet. Med. Assoc.* **213**:12-22.

- Klinman D. M., Yamshchikov G. and Ishigatsubo Y.** (1997). Contribution of CpG motifs to the Immunogenicity of DNA Vaccines. *J. Immunol.* **158**: 3635-3639.
- Krieg A. M.** (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**:546-549.
- Macfarlane D. E., et. al.** (1998). Antagonism of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotid by Quinacrine, Chloroquine, and Structurally Related Compounds. *J. Immunol.*, **160**:1122-1131.
- Marin C.M., Barberan M., Jimenez de Bagues M.P. & Blasco J.M.** (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev. 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 209-215.
- Montaraz, J. A., and A. J. Winter.** 1986. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **53**:245-251.
- Moreno, E. et. al.** 1984. *Infect. Immun.* **43**, 779.
- Moriyón I., et. al.** (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl. Microbiol.*, **1**:19-26.
- Ouahrani S., Michaux S., Sri Widada J., Bourg G., Tournebize R., Ramuz M. and Liautard J. P.** (1993). Identification and sequence analysis of S6501, an insertion sequence in *Brucella spp.*: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3265-3273.
- Palmer, M. D. et. al.** (1996). *Vet. Pathol.* **33**:682-691.
- Paul, W. E., and R. A., Seder.** (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.*, **76**, 241-251.
- Pugh, G. W. et. al.** 1994. *Infect. Immun.* **62** (12), 5327-5334.
- Pugh, G. W. et. al.** 1996. *Infect Immun.* **84** (2), 548-546
- Riezu – Boj J. I., et. al.** (1990). Antibody Response to *Brucella ovis* Outer Membrane Proteins in Ovine Brucellosis. *Infect. Immun.* **58**: 489-494.
- Roos, H. M. et. al.** 1996. *Vet. Rec.* **136**:647 - 848
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. edit. Cold Spring Harbor Lab. Press. (New York). 1989.
- Santos J.M., Verstrete D.R., Perera V.Y. & Winter A.J.** (1984). Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, **46**, 188-194.
- Schurig, G. G., R. M. Roop II, T. Bagchi, S. Boyle, D. Buhrman, and N. Sriranganathan.** 1991. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* **28**:171-188

- Schurig G.** (1997). "Brucella Vaccines". 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9. Booklet publishing sponsored by IDEXX Laboratories, Inc.
- Searson, J.** (1982). Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Aust. Vet. J.* ; **58**: 5-7.
- Simmon, G. C.; Hall, W.T.** Epididymitis of rams. *Aust. Vet. J.* 1953; **29**:33-40.
- Steme, M. et. al.** 1971. *J. Med. Microbiol.* **4**, 185.
- Tabatabai, L. B.** 1994. *Vaccine.* **12** (10), 919-924
- Timoney J., Gillespie J., Scott F., Barlough J.** Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals with reference to Etiology, Epizotiology, Pathogenesis, Immunity, Diagnosis, and antimicrobial susceptibility. 8<sup>a</sup> Ed., Comstock Publishing Associates (Cornell University Press) London, 1992.
- Toth. T. E. et. al.** (1995). *Vet. Microbiol.* **45**: 171 – 183.
- Trinchieri, G.** (1995). IL-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **3**, 251-276.
- Trinchieri, G.** (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, Interferon-gamma). *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 17-23.
- Underhill D. M., et. al.** (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* **401**: 811-815.
- Vizcaíno N., Kittelberger R., Cloeckaert A., Marín C. M. and Fernández – Lago L.** (2001). Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect. Immun.* **69**:7020-7028.
- Winter, A. J. et. al.** 1983. *Infect. Immun.* **42** (3): 1159-1167
- Woodard, L. F. et. al.** 1980. *Infect Immun.* **30** (2), 409-412.
- Yi Ae-Kyung, et. al.** (1996). IFN- $\gamma$  Promotes IL-6 and IgM Secretion in Response to CpG Motifs in Bacterial DNA and Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, **156**:558-564.
- Yi Ae-Kyung and Krieg A. M.** (1998). Cutting Edge: Rapid Induction of Mitogen-Activated Protein Kinase by Immune Stimulatory CpG DNA. *J. Immunol.*, **161**:4493-4497.