

01694



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES NO PATÓGENAS DE  
*Brucella melitensis* CON EL SISTEMA DE SELECCIÓN  
NEGATIVA.

TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA  
DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL  
ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTORAL  
FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES  
LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA  
MIREYA DE LA GARZA AMAYA

MEXICO, DF, NOVIEMBRE DE 2005

0350495



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

1000

## DEDICATORIAS

A MI ESPOSA ESTELA T. MENDEZ OLVERA  
Y MI HIJO SANTIAGO MARTINEZ MENDEZ, TODO MI AMOR PARA ELLOS.

"SIEMPRE JUNTOS".

A MI MAMÁ ANTONIA GOMEZ Y MI PAPÁ FRANCISCO MARTINEZ,  
POR SU AMOR, CONFIANZA Y EJEMPLO.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: DANIEL MARTINEZ  
GOMEZ

FECHA: 24 10 04 2005

FIRMA: 

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPPIT) con el proyecto: IN205701 "Patogénesis molecular de la Brucelosis: enfoque biotecnológico" y por SEP-CONACYT 2003 CO2-45271 "Patogenicidad molecular de *B. melitensis* y *B. ovis*: bases para el desarrollo de nuevos inmunógenos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado.

A los miembros del honorable jurado:

Presidente: Dr. Francisco Suárez Güemes.  
Vocal: Dra. Beatriz Arellano Reynoso.  
Vocal: Dr. Luis Servín González.  
Vocal: Dra. Mireya de la Garza Amaya.  
Secretario: Dr. Francisco Basurto Alcántara.  
Suplente: Dr. José Luis Puente García.  
Suplente: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

A los miembros de mi Comité Tutorial por su apoyo y enseñanzas

Un agradecimiento muy especial Dr. Antonio Verdugo por su paciencia, confianza y apoyo durante toda la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Luis Servín González por su apoyo en la realización de este trabajo y en mi formación como Doctor. Mil gracias por tu ejemplo Luis.

A la Dra. Guadalupe Pérez Ruíz por su confianza y por compartirme muchas de sus dudas, las cuales ahora son más también.

A mis alumnos de licenciatura por sus enseñanzas y comprensión. Lirio Calderón G, Mauricio Amaro N, Osvaldo López D, Antonio Mejía Z, Emilio Venegas C y Adolfo Ortiz R.

A mis amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular Elsa, Alfredo, Marcela, Luis, Alejandra, Ilanne, Adriana, Alma, Julio, Emma, Alfonso, Miriam, Sra. Francis, Elvia, Héctor y Xochitl.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su ayuda en la clonación y procesos de secuenciación.

Al Dr. Ricardo Oropeza y M en C Alfredo Castañeda R. por su ayuda en el marcaje de sondas para los ensayos de Dot blot.

A la M. en C. Ericka M. Carrillo por su ayuda en la traducción de textos.

A la M. en C. Estela T. Mendez Olvera por su ayuda en cultivo celular.

A mis amigos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

A mis amigos de otros Departamentos de la FMVZ-UNAM.

A mis amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mis amigos de la Facultad de Medicina, especialmente a la Dra. Yolanda López Vidal.

A mis amigos de la UAM Xochimilco, especialmente a Nora, Paty y Javier.

A mis suegros Bernardo y Gloria, por su apoyo y motivación.

A todos mis amigos que participaron de manera indirecta en la obtención de mi grado.

## RESUMEN

### IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES NO PATÓGENAS DE *Brucella melitensis* CON EL SISTEMA DE SELECCIÓN NEGATIVA.

Daniel Martínez Gómez.

Tutor Principal: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Con el fin de identificar genes de virulencia en *Brucella melitensis* se utilizó la técnica de la Selección Negativa, modificándola para su empleo con microorganismos de este género. Se identificaron 12 mutantes de *Brucella melitensis*, las cuales no tienen la capacidad de infectar cuyes. Las mutantes identificadas fueron caracterizadas parcialmente a través de las pruebas bioquímicas convencionales empleadas con especies del género *Brucella*, así como a través de ensayos de adhesión a células HeLa y Hep2, crecimiento en medios con pH ácido y ensayos de adhesión a componentes de la matriz extracelular (fibronectina, vitronectina y colágena). Los resultados obtenidos muestran que las doce mutantes identificadas, tuvieron un comportamiento homogéneo en las pruebas bioquímicas, excepto la mutante A20, la cual debido a su crecimiento limitado, dificultó la interpretación de estas pruebas. Las mutantes A11 y A14 mostraron el mismo patrón de adherencia a células Hela y Hep2, en comparación con la cepa silvestre de *B melitensis* 133, sin embargo en los ensayos de adhesión a componentes de la matriz extracelular, las mutantes A11 y A14 mostraron una menor capacidad de unión. Por otra parte la mutante A14 no fue capaz de crecer en medios con pH de 5.5 y 5.0. Este trabajo demuestra la utilidad de esta metodología en la identificación de mutantes no patógenas del género *Brucella*, las cuales mostraron “*in vitro*” su deficiencias en algunos aspectos involucrados con la sobrevivencia dentro del hospedador.

Este proyecto estuvo financiado por los proyectos PAPPIT IN205701 y SEP-CONACYT 2003 CO2-45271.

## SUMMARY

### Identification of *Brucella melitensis* non-pathogenic mutants by signature-tagged mutagenesis

Daniel Martínez Gómez.

Thesis Director: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

In order to identify virulence genes in *Brucella melitensis* the Negative Selection technique was used, which was modified for its use with microorganisms of this genus. Twelve mutants of *Brucella melitensis* were identified, which did not have the capability to infect guinea pigs. These mutants were characterized partly through conventional biochemical tests used with members of the genus *Brucella*, HeLa and Hep2 cell adhesion assays, growth assays in media with acid pH and binding assays to extracellular matrix components (fibronectin, vitronectin and collagen). The results obtained show that all the mutants had a homogeneous behavior in the biochemical tests, except mutant A20 that had a anormal growth. Mutant A14 was not able to grow in media pH 5.5 and 5.0. Mutants A11 and A14 showed the same adherence pattern on HeLa and Hep2 cells with respect to wild type; however showed a significant reduction ( $P \geq 0.05$ ) in binding to collagen. This work revealed the usefulness of this methodology to identify non pathogenic mutants of the genus *Brucella*, These mutants showed *in vitro* deficiencies in some aspects that could be related to their capacity to survive and replicate inside the host.

This work was financed by PAPPIT IN205701 y SEP- CONACYT 2003 CO2-45271.



## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN

Aspectos epidemiológicos. ....	1
Características bioquímicas del género <i>Brucella</i> . ....	4
Características genómicas en el género <i>Brucella</i> . ....	9
Respuesta inmune en la Brucelosis. ....	12
Patogénesis de la Brucelosis. ....	13

### MATERIALES Y MÉTODOS

Hipótesis y Objetivos .....	20
Medios de cultivo y bacterias. ....	21
Producción de mutantes. ....	21
Ensayos con cristal violeta. ....	22
Ensayos con acriflavina. ....	23
Selección Negativa de mutantes no patógenas. ....	23
Extracción de ADN de <i>B. melitensis</i> . ....	23
Construcción de sondas por medio de la PCR. ....	24
Ensayos de "Dot blot". ....	24
Caracterización parcial de las bacterias no patógenas seleccionadas. ....	25
Ensayos de adhesión en cultivo celular. ....	25
Ensayos de adhesión a matriz extracelular. ....	26
Ensayos de crecimiento bajo condiciones de pH ácido. ....	26

### RESULTADOS.

Generación del banco de mutantes de <i>B. melitensis</i> cepa 133 e inoculación en cuyes. ....	30
Obtención de ADN de los bancos de mutantes y construcción de sondas. ....	31
Hibridación tipo "Dot blot" con las sondas construidas. ....	31
Caracterización parcial de las mutantes seleccionadas. ....	31
Ensayos de crecimiento bajo condiciones de pH ácido. ....	32
Ensayos de adhesión en células HeLa y Hep2. ....	32

Ensayos de supervivencia intracelular en células HeLa .....	33
Ensayos de adhesión a proteínas de matriz extracelular.....	33
DISCUSIÓN.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	45

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	28
Figura 2.....	29
Figura 3.....	34
Figura 4.....	35
Figura 5.....	36
Figura 6.....	37
Figura 7.....	38

## INTRODUCCIÓN

### Aspectos epidemiológicos

La Brucelosis, según datos de la FAO (*Food and Agriculture Organization*), OMS (*Organización Mundial de la Salud*) y de la OIE (*Office International des Epizooties*), es una de las zoonosis bacterianas de mayor importancia en el mundo. Esta enfermedad es causada por microorganismos del género *Brucella*, que comprende varias especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*; así como varios aislamientos de mamíferos marinos, a partir de los cuales se han propuesto dos especies nuevas dentro de este género, *B. pinnipediae* y *B. cetaceae*. Recientemente, basándose en resultados de estudios en genética molecular, se ha sugerido que *B. melitensis* sea considerada especie única de este género, dejando las especies restantes como biovariedades con preferencia hacia hospederos específicos. Sin embargo, esta clasificación no contempla las nuevas especies, por lo que la nomenclatura anterior continúa utilizándose (1, 2, 3, 4). El género *Brucella* está comprendido dentro de la subdivisión Alfa-2 de las *Proteobacterias*, junto con otras bacterias que se asocian a eucariontes, ya sea como patógenos o como simbioses (5).

Para varios países la Brucelosis representa un problema serio de salud pública y un factor importante de pérdidas económicas por los problemas de infertilidad y/o abortos que origina en los animales domésticos. En Brasil, por ejemplo, la Brucelosis en ganado bovino tuvo una prevalencia del 4-5% en 1998, mientras que para porcinos la incidencia fue más baja alcanzando solo el 0.34%; curiosamente en ese país no se han reportado aislamientos de *B. melitensis*. Para el caso de los seres

humanos, en Brasil se ha reportado una incidencia de 0.28% (6). En el caso de otros países en América del sur, se encuentran datos distintos. En Venezuela se reporta una incidencia de 1.2% en bovinos; sin embargo existen regiones donde esta enfermedad alcanza porcentajes de 10.5% (7). En Chile la Brucelosis alcanza valores de 19.7% de seropositividad en hatos lecheros (8); en el caso de Paraguay para el ganado bovino se reporta una incidencia de 3-4%, no obstante, también se reportan regiones libres de *Brucella* spp. En Paraguay la incidencia en seres humanos fue de 508 individuos en los años 1980 a 1986 (9). En el caso de América Central no se cuenta con información, pero estimaciones hechas en los últimos diez años sugieren una prevalencia de 4-8%. En estas regiones la prevalencia de la enfermedad en seres humanos alcanza valores muy altos. Un estudio llevado a cabo en Costa Rica con 384 individuos de una población de alto riesgo compuesta por personas que trabajan en la industria pecuaria mostró una prevalencia del 45% (10).

En México algunos estados como Guanajuato reportan una prevalencia de 5.68% en ganado bovino. En el caso de ganado caprino el valor alcanzado para algunos estados es del 63.7% de hatos positivos. El número de casos humanos reportados en el 2005, en la semana 44 fue de 1 921 casos, en el año 2004 se reportaron 2347, aunque se considera que estos datos podrían encontrarse por debajo de la incidencia real de la enfermedad en nuestro país (11).

En México, como en otros países, las pérdidas económicas producidas por la brucelosis, han llevado a que se instauren programas permanentes de control y erradicación. Estos programas contemplan acciones concretas tendientes a reducir la

presencia de la Brucelosis en las explotaciones pecuarias. En México, la Campaña Nacional para la erradicación de la Brucelosis fue reinstaurada en el año 1994. Por lo general en todos estos programas se contempla como acción en contra de la brucelosis, la vacunación, la identificación de reactores positivos y su eliminación del hato si las condiciones económicas lo permiten. Todas estas acciones llevadas a cabo de manera continua y ordenada han logrado que el índice de la Brucelosis en algunos países se reduzca (11).

La aparición de enfermedades infecciosas es el resultado de la virulencia del microorganismo, su modo de transmisión y la susceptibilidad del hospedero. Aunque existen avances significativos en algunas de estas áreas, estos no han sido suficientes en el control de enfermedades producidas por agentes infecciosos como la Brucelosis. Incluso, recientemente, se reporta el resurgimiento o reaparición de algunos agentes infecciosos como *Mycobacterium tuberculosis* (12).

Todo el conocimiento básico que se genera en diversas áreas permite sugerir nuevas estrategias para el control de las enfermedades que afectan al hombre y a los animales. Un ejemplo son las vacunas de ADN, o las vacunas recombinantes, recientemente creadas, las cuales poseen un gran potencial para el control de patógenos importantes. En opinión de W. Ivan Morrison, director adjunto del Institute of Animal Health, Immunology and Pathology y consultor del IFPRI (Grupo Consultivo sobre Investigaciones Agrícolas Internacionales) *"Las oportunidades que presentan los adelantos en biotecnología solamente pueden explotarse debidamente si se entienden las características biológicas de los agentes patógenos seleccionados*

como objetivo y las enfermedades que causan" (12). De aquí la importancia de estudiar todos los mecanismos moleculares en la patogénesis de la Brucelosis, ya que solamente comprendiendo estos eventos se podrán diseñar estrategias efectivas para su control permanente.

#### Características bioquímicas del género *Brucella*.

El género *Brucella* está conformado por cocobacilos Gram negativos, no móviles, no esporulados, sin cápsula. Son microorganismos aerobios aunque algunas especies crecen mejor con bajas tensiones de CO<sub>2</sub>. Su metabolismo es de tipo oxidativo, tienen oxidasa, catalasa, ureasa y reducen los nitratos a nitritos. Debido a que no fermentan azúcares las pruebas de identificación bioquímica tradicionales no son útiles en su caracterización. Las pruebas empleadas en la identificación de microorganismos de este género son la fagotipificación, el crecimiento en medios con diferentes concentraciones de tionina y fucsina, la producción de la enzima ureasa y la producción de H<sub>2</sub>S (13).

Cabe aclarar en este punto que considerar a *Brucella* spp como un microorganismo aerobio se debe básicamente a los primeros ensayos desarrollados para conocer la biología de este microorganismo. Actualmente se sabe que esta bacteria es capaz de utilizar nitratos y oxígeno como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria, característica que permite que estos microorganismos sobrevivan dentro de células eucariontes o en medios carentes de oxígeno (14). Robertson y col (15) han descrito que el sistema de transporte de electrones de *B. abortus* está conformado por deshidrogenasas, flavoproteínas, citocromos  $\alpha$ ,  $\alpha_3$ , b, c y o. En este

trabajo los autores muestran también que el sistema de transporte de electrones es particularmente resistente a varios inhibidores como el dicumarol,  $\text{NaN}_3$  y KCN.

Por otra parte, el catabolismo de la glucosa en *Brucella* spp se lleva al cabo por la vía de las hexosas-monofosfato acoplada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Bacterias de este género no llevan al cabo la glucólisis, porque carecen de la enzima fructosa 6 fosfato cinasa. La utilización de la glucosa es estimulada por la presencia de oxígeno, por lo tanto se puede suponer que esta vía es más común cuando la bacteria es cultivada en medios artificiales, en condiciones aerobias, sin embargo, en condiciones anaerobias la situación cambia. A pesar de que los microorganismos del género *Brucella*. Son capaces de emplear distintos carbohidratos, adonitol, ribosa, maltosa, manosa, ramnosa y trehalosa, como fuentes de energía y carbono, sólo uno de ellos parece ser importante durante la patogénesis de la brucelosis, el eritritol. Este azúcar inhibe la utilización de glucosa y a partir de que se describió su presencia en el tracto reproductivo de rumiantes, diversas investigaciones se han realizado para conocer como se lleva a cabo su catabolismo en *Brucella* spp. Actualmente se tiene descrita la ruta de utilización del eritritol hasta fosfato de dihidroxiacetona y después hasta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (16). Sangari y col (17) han identificado el operón *ery*, el cual contiene 4 genes. Tres de ellos (*eryA*, B y C) codifican enzimas directamente involucradas en el catabolismo de este azúcar. El cuarto gen, *eryD*, codifica para el represor sensible a la presencia de eritritol. Además de la regulación del operón por este represor se ha descrito también una región con una alta homología para activadores transcripcionales del tipo IHF de *Escherichia coli*. En un inicio Sangari y col. reportaron que las mutaciones en el gen

*eryB* no afectaban la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* en macrófagos, explicando con esto que el limitado crecimiento de la cepa 19 de *B. abortus* en el tejido del aparato reproductivo de los rumiantes, se debía principalmente a su incapacidad para metabolizar este azúcar, dejándolo como un producto tóxico para si misma (18). Recientemente, Burkhardt y col. (19) han reportado que mutaciones en el gen *eryC* sí afectan la sobrevivencia de *B. suis* dentro de macrófagos e incluso sugieren la presencia de pequeñas cantidades de eritritol dentro de las vacuolas que albergan a *B. suis*, cambiando con esto la concepción que se tenía sobre el papel del eritritol en la patogénesis de la Brucelosis. Ahora se sugiere que el eritritol es un compuesto tóxico para los microorganismos del género *Brucella*, quienes deben de tener la capacidad de transformarla con el fin de evitar su toxicidad.

No obstante que los microorganismos del género *Brucella* no llevan a cabo la glucólisis, como ya se ha mencionado, se ha descrito en *B. abortus* la presencia del gen *pgm*, que codifica para una Glucosa 6 Fosfato Mutasa, la cual transforma glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato. Este último compuesto puede ser transformado a UDP-glucosa y participar activamente en la formación del lipopolisacárido (LPS), una de las estructuras de patogenicidad más importantes en los microorganismos del género *Brucella*, ya que mutantes en este gen pierden la capacidad de sobrevivir en ratones (20).

Contrario a lo anterior, mutaciones en el gen *galE*, que codifica para una UDP-galactosa epimerasa, no tuvieron efecto alguno tanto en la formación del LPS como en la virulencia de *B. abortus* y *B. melitensis*. Este dato sugiere que en los



microorganismos del género *Brucella*, la galactosa es utilizada por la vía de Delay-Dodoroff y que, además, este azúcar no participa en la formación del LPS bacteriano (14).

Por otra parte, se ha descrito en *B. abortus* la presencia de un sistema de alta afinidad para la captación de zinc, pero no se ha encontrado un sistema de baja afinidad, como en el caso de *E. coli*. Este elemento es un cofactor importante de varias enzimas y necesario para la sobrevivencia de la bacteria dentro de macrófagos y células HeLa, como se muestra en las bacterias mutantes en el gen *znuA*. En este caso la invasión de la mutante no se afectó, pero si su sobrevivencia intracelular, incluso varias vacuolas conteniendo a *B. abortus znuA*<sup>-</sup> colocalizaron con el marcador lisosomal Lamp1 y Catepsina D, lo que indica que hubo fusión con los lisosomas (21).

En *Brucella suis* se ha identificado el operón *nik*, el cual está conformado por seis genes (*nikABCDE* y *nikR*), que forman un sistema de captación de níquel, el cual es necesario como núcleo en las enzimas con actividad de ureasa. Bacterias con mutaciones polares en el gen *nikA*, mostraron deficiente actividad de ureasa, aunque contrario a lo que se esperaba, no mostraron deficiencia en ensayos de sobrevivencia intracelular en macrófagos THP1 (22).

Un hecho que ha llamado la atención en lo que se refiere a genes del metabolismo, en la virulencia de *Brucella*, es el papel que juegan *nirK* y *nirV*, los cuales participan en procesos de desnitrificación. En una investigación realizada por Seung-Hun y col.

(23) se complementaron los genes *nirK* y *nirV* en *B. neotomae*, la cual de forma natural tiene incompletos. Se emplearon los genes de *B. suis* para esta complementación y contrario a lo que se esperaba, esta cepa perdió virulencia cuando se evaluó en ratones IRF1 negativos (incapaces de producir interferón), lo que hace reconsiderar el papel de estos genes en la patogénesis de algunos microorganismos del género *Brucella* (24).

A pesar de que varios de estos genes intervienen en la sobrevivencia del microorganismo dentro del hospedador y que han sido identificados por sistemas para la identificación de genes de virulencia, muchos de ellos no codifican para factores de virulencia, es decir, para la mayoría de los patógenos la virulencia es el resultado de un proceso multifactorial que requiere por lo menos de dos componentes genéticos generales. El primero de ellos codifica para aquellos elementos necesarios en los procesos fisiológicos requeridos para el metabolismo y la sobrevivencia del microorganismo; estos componentes se encuentran en todas las bacterias, patógenas y no patógenas. El segundo componente contiene genes de virulencia de bacterias patógenas, que codifican para toxinas, adhesinas, invasinas y algunos otros factores. Lo anterior explica porque en ocasiones algunos genes para la sobrevivencia, aparecen como genes importantes en la virulencia de los microorganismos, sin embargo cuando las secuencias son analizadas se les asigna la verdadera importancia en la patogénesis. En el caso de *Brucella*, la participación de algunos genes en la virulencia es difícil de esclarecer, ya que no se conocen los mecanismos de patogenicidad y los factores de virulencia clásicos, no existen en esta bacteria (25).

### Características genómicas en el género *Brucella*.

El estudio del genoma de *Brucella* comenzó en la década de los sesenta, cuando la homología en el ADN fue utilizada como método para demostrar la relación entre diferentes microorganismos causantes de aborto (26). Esta homología, cercana al 90%, encontrada entre los microorganismos del género *Brucella* llevaría después a la conclusión de que este género es mono-específico, considerándose a *B. melitensis* como única especie (27). A pesar de que esta nomenclatura fue sido adoptada por el GenBank, aún se emplea la nomenclatura clásica en algunos textos.

El primer mapa del genoma de microorganismos del género *Brucella*, fue obtenido en *B. melitensis* por Allardent- Servent y col. mediante ensayos de hibridación de distintos fragmentos, separados por electroforesis de pulsos en campos (28). Previamente se había intentado realizar un mapa del cromosoma de *B. abortus* S19, sin embargo el primer reporte de un mapa circular, en *Brucella*, fue realizado por Allardent- Servent y col en 1991. En este primer reporte estos investigadores mencionaron la existencia de un solo cromosoma en esta bacteria y dos años más adelante corrigieron este error y demostraron la existencia de dos cromosomas independientes en *B. melitensis* (29).

Junto con el desarrollo de mapas de los cromosomas, otro aspecto que generó interés en el género *Brucella*, fue identificar diferencias entre especies, así como con otros géneros. El análisis de secuencias repetidas o secuencias de inserción aportó avances en este punto. Para *Brucella* spp se han descrito varios de estos elementos,

un ejemplo son las secuencias repetidas Bru-RS1 y Bru-RS2, palíndromos relacionados con la secuencia de inserción IS711, señalados como posibles sitios de alta frecuencia de recombinación. El número total de copias de las secuencias Bru-RS entre las especies de *Brucella* es muy similar, no así para IS711, que ha sido útil para diferenciar las especies del género (30,31).

Actualmente se cuenta con la secuencia completa de los genomas de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. En el caso de *B. melitensis* el tamaño del genoma es de 3,295,5574 pares de bases (pb), divididos en dos cromosomas circulares de 2,117,787 y 1,177,787 pb. El contenido de GC es de 57% y esta especie no contiene plásmidos. A partir de esta secuencia se ha podido predecir la existencia de 3198 marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés), distribuidos en ambos cromosomas, 2060 en el cromosoma I y 1138 en el II (32). El genoma de *B. melitensis* contiene tres operones de RNAr, dos de ellos ubicados en el cromosoma I separados por 200 kpb, el tercero se encuentra en el cromosoma II (33). También se reporta la presencia de 54 genes para ARN de transferencia (32). En el caso de *B. suis* biovariedad 1 se sabe que tiene dos cromosomas de 2.1 Mpb y 1.15 Mpb al igual que las otras especies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis* y *B. neotomae*). En caso de las biovariedades 2 y 4 de *Brucella suis* se sabe también que tienen dos cromosomas, pero con un tamaño de 1.85 Mpb y 1.35 Mpb, mientras que un solo cromosoma fue encontrado en *B. suis* biovariedad 3 con un tamaño de 3.1 Mpb (34).

Además de la secuencia del genoma, otros trabajos han descrito una gran variedad de genes, que confirman la estrecha relación de este organismo con otras proteobacterias como *Agrobacterium*. Jeong A Kim y col. describieron en 1997 dos genes de *B. abortus*, una ciclodesaminasa de ornitina y una arginasa que tienen una alta similitud, 65 y 72%, respectivamente, con los del plásmido Ti de *Agrobacterium* (35).

La secuenciación del genoma de *Brucella* está permitiendo vislumbrar un panorama general de su proteoma y posibilita asociar estos productos con familias de proteínas altamente conservadas. Sánchez y col. (36) obtuvieron secuencias de fragmentos del genoma de *B. abortus* generados al azar, un total de 633.5 kb; (~20% del genoma en 1899 clonas) y determinaron que el 37% de ellas no muestra homología con secuencias de la base de datos del GenBank, lo que representa secuencias codificantes nuevas o específicas de *B. abortus*. El resto de las clonas es homólogo a secuencias de microorganismos del género *Brucella* spp. (3.9%), otras alfa 2 proteobacterias (14%) y de otros organismos (45.2%). Un hallazgo relevante en este trabajo fue la identificación de secuencias en *B. abortus* con homología con *shdA* de *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *aidA-1* de *E. coli* enteropatógena, *virG* de *Shigella* spp. (patógenos de mamíferos), así como con genes del aparato flagelar, los cuales en un inicio se pensó que correspondían a un Sistema de Secreción Tipo III. Esta hipótesis ya ha sido descartada y ahora se reporta la presencia de un flagelo en *B. melitensis* involucrado en la patogénesis en un modelo de ratón, este punto será tratado más ampliamente en el apartado de patogénesis de la Brucelosis (37).

De la comparación de los genomas disponibles de *B. suis* y *B. melitensis* se ha podido destacar que estas bacterias difieren en sólo 74 genes, para el resto de las secuencias existe una alta similitud (38).

### Respuesta inmune en la Brucelosis.

Los microorganismos patógenos han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir y multiplicarse dentro de los hospedadores, entre ellas la habilidad para evadir la respuesta inmune. *Brucella* no es la excepción, diversas investigaciones se han llevado a cabo para descifrar los eventos inmunológicos ocurridos durante la Brucelosis. Domand y col (39) trabajando con macrófagos humanos describieron varios eventos que resaltan una falla en los mecanismos de defensa del sistema inmune. Trabajando con *B. suis* describieron que monocitos y macrófagos humanos no entran en apoptosis, como resultado de la infección por este microorganismo, también describieron que estas células no secretan factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), como resultado de la infección por *B. suis*, curiosamente, esta interleucina es secretada por macrófagos murinos, los cuales tienen la capacidad de eliminar las infecciones por *Brucella* spp. La falla en la secreción de  $TNF\alpha$ , se ha asociado a la expresión de una proteína de la membrana externa, Omp25, ya que bacterias mutantes en esta proteína, indujeron la secreción de esta interleucina.

Por otra parte, Ottones y col (40) han descrito el papel de linfocitos gamma-delta en el control de la infección por *Brucella*, en este caso, estas células participan secretando interferon gamma, favoreciendo con ello la respuesta inmune celular. Esta interleucina ha sido descrita como un factor importante en resistencia a la

infección por *Brucella*, descrita en el ratón, y se ha asociado a la interleucina 10 como factor que contribuye a la susceptibilidad (41).

### Patogénesis de la Brucelosis.

Un aspecto importante en la patogénesis de la Brucelosis es la capacidad de los microorganismos del género *Brucella* para invadir y sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales y no profesionales; sin embargo, la información al respecto es limitada y no siempre homogénea. Harricane y col. (42), en experimentos con macrófagos infectados con *Brucella*, reportaron que fagosomas conteniendo *Brucella* viva carecen de anexina I y que también otras funciones en el macrófago se ven afectadas, como la producción de IFN gamma. En otro trabajo, Kusumawati y col. (43), ensayando con macrófagos murinos, confirman el mismo fenómeno y agregan que sólo las bacterias opsonizadas son fagocitadas, asociando este evento a cambios en la membrana del macrófago, como la acumulación de actina. Sin embargo, a la fecha se reporta que tanto microorganismos opsonizados como no opsonizados son fagocitados y que la vía de entrada no afecta la capacidad de microorganismos virulentos de *B. abortus* de evitar la fusión fagosoma-lisosoma (44, 45).

Pizarro-Cerdá y col. (46) trabajando en el mismo rubro con células HeLa, reportaron la colocación de microorganismos patógenos de *B. abortus* con el marcador endosomal temprano EEA1, así como con el marcador del retículo endoplásmico (RE) sec61 beta. Los microorganismos no patógenos de *B. abortus* no colocaron con este último y siempre se asociaron a la presencia del marcador lisosomal catepsina

D. Además de este marcaje especial (sec 61 beta) los microorganismos patógenos de *B. abortus* se ubicaron en una región perinuclear y colocalizaron con el marcador autofagosomal monodansil-cadaverina. En resumen se establecen en un nicho asociado al RE, favorable para su replicación. Este evento ha sido estudiado recientemente por Celli y col. (47) quienes reportaron el mismo comportamiento con microorganismos patógenos de *B. abortus*, en macrófagos derivados de la médula ósea de ratones C57 BL/6, contrario a lo reportado por Arenas con macrófagos murinos de la línea J774 (48). Estos investigadores también mostraron el papel que juega el sistema de secreción tipo IV encontrado en *B. abortus*, *B. suis*, y *B. melitensis*, el cual le sirve a las bacterias de estas especies, para formar el nicho de replicación antes descrito. Cabe aclarar en este punto que esta localización cercana al RE ya había sido reportada por Anderson y Cheville (49), al estudiar trofoblastos de placentas de caprinos infectados por *B. abortus*.

Porte y col. (50) estudiaron el pH del fagosoma que contiene a *Brucella* y describieron que el ambiente se acidifica rápidamente después de la infección, lo cual es esencial para la replicación de la bacteria dentro de macrófagos J774. Previamente Detilleux y col. (51) habían reportado el papel de algunos inhibidores del metabolismo sobre el desarrollo de *B. abortus* en células Vero. En este trabajo se muestra que inhibidores del citoesqueleto y de la acidificación endosomal reducen la infección de *B. abortus* en estas células.

La participación del citoesqueleto en la infección de *Brucella spp* en células epiteliales es corroborada por los trabajos de Guzmán-Verri y col. (52) y Chávez y



col. (53), los cuales demostraron la participación de GTPasas pequeñas de la familia de Rho y Rab en la internalización de *B. abortus* e incluso se observó la activación específica de Cdc 42 con cepas patógenas de *B. abortus* (53). Guzmán-Verri también reporta que inhibidores de la Tirosina cinasa y MAP cinasa bloquean la invasión de *B. abortus*, datos similares habían sido reportados por Detilleux y col (51, 52).

En todos los trabajos mencionados anteriormente en este capítulo se plantea que los microorganismos patógenos del género *Brucella* tienen la capacidad de evadir la fusión fagolisosomal, lo cual es dependiente de la viabilidad de la bacteria. Esto sugiere la existencia de mecanismos involucrados en este proceso, como los sistemas de secreción descritos en otras bacterias, como *Salmonella enterica*, *Yersinia spp*, *Shigella spp*, etc (54). Al respecto, Halling (55) describió tres genes homólogos a los del flagelo y uno al gen que codifica para LcrD (regulador del sistema de secreción tipo III, en *Yersinia spp*) en *B. abortus*. Este mismo autor sugiere la existencia del sistema de secreción tipo III (descrito en enterobacterias), que podría estar involucrado en los procesos de invasión y evasión de la fagocitosis; sin embargo esta hipótesis ya ha sido desechada.

No obstante lo anterior, actualmente se describe en microorganismos patógenos del género *Brucella*, la presencia de un sistema de secreción tipo IV, importante en la sobrevivencia intracelular. O'Callaghan y col (56), evaluando mutantes por transposición en *B. suis*, identificaron un sistema de secreción tipo IV, y demostraron que la virulencia de *Brucella* se atenúa al mutar algunos de los componentes. Este

mismo sistema ha sido identificado en *B. abortus* por Sieira y col. (57), quienes reportan diferencias en algunos genes del sistema, en comparación con *B. suis*. Recientemente, con la secuenciación del genoma de *B. melitensis* se ha descrito también la presencia de genes para este sistema de secreción.

A la fecha se desconocen las moléculas efectoras secretadas por este sistema, que permiten a los microorganismos patógenos del género *Brucella*, manipular el tránsito intracelular (47). En un intento por identificar estas moléculas efectoras, Lavigne y col. (58) desarrollaron un sistema, utilizando fusiones traduccionales con la toxina YopP de *Y. enterocolitica*. Con este sistema han identificado el gen *bvfA*, que codifica para una proteína de 11 kDa, este gen no muestra homología con ninguno de los genes reportados a la fecha, y su mutación en *B. suis* afectó su sobrevivencia intracelular. A la fecha se continúa con la búsqueda de los efectores secretados por el sistema de secreción tipo IV.

Por otra parte, Sola-Landa y col (59) identificaron un sistema de dos componentes en *B. abortus*, homólogo al de *Rhizobium meliloti* y *A. tumefaciens*. Este sistema es importante en la regulación de la infección en estos dos patógenos de plantas, e incluso cepas patógenas de *Brucella* mutadas en estos genes perdieron la capacidad de evadir la fusión fagolisosomal.

El LPS del fenotipo liso tiene un papel importante en la sobrevivencia de la bacteria, como lo muestran las vacunas de mutantes rugosas avirulentas. Se sugiere que la cadena O del LPS es determinante en la patogenicidad y que, junto con alguna

proteína de la membrana externa, es responsable del bloqueo de la actividad bactericida del suero y de fagocitos. Lo anterior permite a la bacteria sobrevivir dentro de fagocitos mononucleares y polimorfonucleares. Sin embargo, aunque el LPS de *Brucella* muestra propiedades comunes a las de endotoxinas de otras bacterias Gram negativas, su actividad es menos tóxica que la del LPS de las enterobacterias (60). Esta molécula tiene una participación muy activa en la patogénesis de la Brucelosis, primero en la alteración de rutas de señalización de las células evitando la liberación de IL6 y TNF $\alpha$  (61) y evitando que las células a las que infecta entren a apoptosis (62). Segundo interactuando con las moléculas del MHC II, en la membrana de la célula, evitando con ello la presentación de antígenos en linfocitos B (63) y macrófagos peritoneales murinos (64,65). Incluso se podría pensar que esta interacción LPS membrana celular puede determinar el sitio de entrada de *Brucella* spp, en zonas conocidas como "lipid rafts", sin embargo también existen evidencias que apuntan a la presencia de receptores específicos (66, 67, 68, 69, 70), por lo que no se puede descartar la posibilidad de un receptor que participe en la invasión de *Brucella* spp en las células hospedadoras. Dentro de toda esta discusión sobre el papel del LPS y, particularmente, los polisacáridos en la patogenia de *Brucella* spp, recientemente Arellano y col (71) han descrito el papel de los glucanos cíclicos en la sobrevivencia intracelular, mostrando que estos compuestos tienen la capacidad de integrarse en la membrana del fagosoma que contiene a *Brucella* spp, justamente en los "lipid rafts", lo anterior abre nuevas expectativas sobre los mecanismos empleados por microorganismos patógenos para evadir la fusión del fagosoma con los lisosomas (72).

Por otra parte, la sobrevivencia de *Brucella* spp dentro de macrófagos también se ha asociado con la síntesis de proteínas de 17, 24, 28, 60 y 62 kDa. La proteína de 62 kDa corresponde a un homólogo de GroEL (Hsp62), y la proteína de 60 kDa es una variante de la misma. La expresión de la proteína de 24 kDa correlaciona con la sobrevivencia de la bacteria en condiciones ácidas (pH menor a 4). Las proteínas de 17 y 28 kDa aparentemente son inducidas en macrófagos y su expresión también se correlaciona con la supervivencia intracelular (73).

Algunas bacterias contienen enzimas destoxicantes que neutralizan los mecanismos bactericidas de los macrófagos, los cuales se basan en la producción de metabolitos dependientes de oxígeno, como los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno. Un ejemplo de enzimas destoxicantes bacterianas es la superóxido dismutasa (SOD), que participa en la patogénesis de *Nocardia asteroides* y *S. flexneri*. En *B. abortus* existen dos distintos tipos de SOD, una Cu/Zn y una Mn. La catalasa también forma parte de este grupo de enzimas de defensa contra los sistemas dependientes de oxígeno, como lo demuestra la mutante FJS1 de *B. abortus* 2308, carente en esta enzima, la cual tuvo una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno que la cepa silvestre (73).

En la actualidad, muchas metodologías han sido descritas para la identificación de genes de virulencia, la selección de ellas depende del conocimiento que se tenga acerca de la biología básica del microorganismo que se quiere estudiar, así como las herramientas moleculares disponibles (plásmidos, transposones, fagos, etc). De acuerdo a estas características se seleccionó el Sistema de la Selección Negativa

descrita por Holden y col. (74), como metodología para la identificación de genes de virulencia en el género *Brucella sp.* Este sistema emplea un transposón Tn5 que se introduce al azar en el genoma del microorganismo en estudio, generando con esto, mutaciones en distintos genes. Una de las características relevantes de los transposones empleados, es que se les han insertado secuencias (Nk<sub>20</sub>) que marcan de forma distinta a cada transposón, esta secuencia permite identificar a cada una de las mutantes (ver figura 1). Las mutantes son evaluadas entonces, en animales para la experimentación, es decir se infectan con grupos de 90 mutantes, y dado que se tienen secuencias que marcan a cada una de las mutantes, se puede conocer la secuencias con las que se realizó la infección y de las que sobrevivieron, por medio de la técnica de Dot blot. Las mutantes que no sobrevivieron en el animal, no son identificadas en la técnica de Dot blot, por lo tanto la señal ausente en un pozo marca la presencia de una mutante incapaz de sobrevivir dentro de los animales inoculados. Estas mutantes son recuperadas del banco original y se identifica y caracteriza el gen interrumpido por el transposon (ver figura 2). Este sistema permitió la identificación de la Isla de patogenicidad II en *Salmonella Typhimurium*.

El objetivo de esta trabajo fue identificar genes relacionados con la virulencia de *Brucella melitensis*, en especial aquellos relacionados con la supervivencia intracelular, ya que esta característica es fundamental en el desarrollo de la infección. La identificación de dichos genes permitirá crear el conocimiento básico para el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas útiles en el control, diagnóstico y profilaxis de la Brucelosis.

## **HIPÓTESIS**

El sistema de la "Selección Negativa" permitirá la identificación de genes de virulencia en *Brucella melitensis*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y caracterizar genes de virulencia en *Brucella melitensis*, mediante distintos métodos moleculares, con fin de tener un conocimiento más amplio en la patogénesis molecular de la Brucelosis.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Construir un banco de transposones necesario para la técnica de Selección Negativa.
2. Emplear este banco de transposones para generar un banco de mutantes en *Brucella melitensis*.
3. Seleccionar las mutantes no patógenas mediante la técnica de Selección Negativa.
4. Identificar las mutantes seleccionadas empleando los criterios utilizados con microorganismos del género *Brucella*.
5. Evaluar las mutantes no patógenas en cultivos celulares.
6. Identificar y caracterizar parcialmente los genes interrumpidos por el transposon, en las mutantes no patógenas seleccionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo y bacterias. En este trabajo se utilizó una cepa silvestre de *Brucella melitensis* biotipo 1 (cepa de referencia mexicana 133), la cual fue cultivada en agar o caldo Brucella<sup>1</sup>, TSA<sup>2</sup> y LB adicionados con kanamicina<sup>3</sup> (10 ug/ml) y ácido nalidíxico<sup>4</sup> (12 ug/ml). También se utilizaron las líneas celulares HeLa<sup>5</sup> y Hep2<sup>6</sup>. La cepa de *E. coli* S17λ<sub>pir</sub> y los plásmidos empleados, fueron gentilmente donados por el Dr. David Holden.

Producción de mutantes. En la generación de mutantes se siguió la metodología reportada como "Signature targeting" descrita por Holden y col (74), con algunas modificaciones, hechas por nuestro grupo. En esta técnica se utiliza un transposón Tn5 contenido en un plásmido suicida el cual tiene unido en uno de sus extremos la secuencia: 5'-CTAGGTACCTACAACCTCAAGCTT[NK20]AAGCTTGGTTAGAATGGGTACCATG-3', donde N=A, C o G y K= G o T. Esta secuencia fue amplificada con los iniciadores: P1-5'CATGGTACCCATTCTAACCAAG-3' y P2- 5'CTAGGTACCTACAACCTCAAGC-3', para generar las sondas empleadas en los ensayos de Dot blot (ver figura 1). Los plásmidos con los transposones marcados en un extremo fueron transformados en una cepa de *E. coli* S17λ *pir* mediante la técnica de electroporación, empleando protocolos convencionales (75). Se seleccionaron 90 transformantes (por su capacidad para amplificar sondas que hibridaban a una temperatura de 56°C), para formar un banco de plásmidos suicidas. Este banco fue utilizado para la generación

---

<sup>1</sup> OXOID

<sup>2</sup> OXOID

<sup>3</sup> GIBCO

<sup>4</sup> SIGMA

<sup>5</sup> IN VITRO

<sup>6</sup> IN VITRO

de mutantes mediante la conjugación de cada una de las 90 transformantes con *B. melitensis*. La conjugación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Sangari (76), en este procedimiento, 50 ml de LB fueron inoculados con siete colonias de la cepa patógena de *B. melitensis* empleada en este trabajo y 90 tubos con 10 ml de LB con 100 ug/ml de kanamicina y 100 ug/ml de ampicilina fueron inoculados cada uno con una de las 90 transformantes seleccionadas, estos cultivos fueron incubados con agitación continua (150 rpm) por 20 horas y 12 horas respectivamente, a 37°C. Al término de este tiempo se tomaron 500 ul del cultivo de *B. melitensis* y 500 ul del cultivo de cada una de las transformantes, se mezclaron y se suspendieron, con ayuda de un vortex, en 10 ml de una solución 10 mM MgSO<sub>4</sub><sup>7</sup>, dejándose reposar 15 min a temperatura ambiente. Las bacterias fueron recuperadas por filtración, cada uno de los filtros fue colocado sobre una placa de agar TSA<sup>8</sup> e incubado por seis horas a 37°C. Después las bacterias contenidas en los filtros fueron recuperadas con lavados de 1 ml de caldo Brucella con 10 ug/ml de kanamicina y 12 ug/ml de ácido nalidíxico, e incubadas por 12 horas. Finalmente la selección de mutantes que pudieran haberse generado se realizó sembrando placas de agar Brucella con 10 ug/ml de kanamicina y 12 ug/ml de ácido nalidíxico e incubadas a 37°C por 10 días.

Ensayos con cristal violeta. Individualmente cada una de las mutantes de *B. melitensis* fue sembrada en secciones en placas de agar TSA con 10 ug/ml de kanamicina. Estas placas fueron después incubadas a 37°C por 72 h. Las colonias obtenidas fueron evaluadas por medio de tinción con cristal violeta (2% cristal violeta,

---

<sup>7</sup> JT BAKER

<sup>8</sup> ACUMEDIA



20% de etanol<sup>9</sup>, 0.8% oxalato de amonio<sup>10</sup>), de acuerdo al protocolo descrito por Alton (13).

Ensayos con acriflavina. Para confirmar el fenotipo liso de las mutantes seleccionadas, 30 ul de acriflavina neutra<sup>11</sup> al 1% fueron mezclados con una colonia de *Brucella* spp crecida en agar TSA, con el fin de observar si existía o no aglutinación. Todas las mutantes obtenidas fueron evaluadas mediante tinción con cristal violeta y aglutinación con acriflavina (77).

Selección Negativa de mutantes no patógenas. Las mutantes lisas obtenidas fueron inoculadas, en grupos de 90, en cobayos de 500 grs, por vía intraperitoneal, utilizando los criterios de infección y aislamiento del CENID-MICROBIOLOGÍA-INIFAP. A las dos semanas los cobayos fueron sacrificados con métodos humanitarios y las mutantes fueron recuperadas de bazo. De estas mutantes recuperadas se obtuvo ADN y se construyeron 90 sondas usando la técnica de PCR con los iniciadores P1 y P2. Al mismo tiempo se tomó una muestra de todas las mutantes inoculadas y se construyeron sondas utilizando nuevamente los iniciadores P1 y P2. La identificación de genes de virulencia se hizo comparando, a través de la técnica *dot blot*, los grupos de bacterias recuperadas y el total de mutantes. La señal ausente en un pozo indicó que la cepa estaba mutada en genes relacionados con la supervivencia dentro del cuye, como ya se ha mencionado (ver figura 2).

Extracción de ADN de *B. melitensis*. La extracción de ADN de las mutantes y de la cepa silvestre se realizó empleando el protocolo de CTAB<sup>12</sup>/NaCl<sup>13</sup> (75).

---

<sup>9</sup> JT BAKER

<sup>10</sup> SIGMA

<sup>11</sup> SIGMA

<sup>12</sup> SIGMA

Construcción de sondas por medio de la PCR. Empleando el ADN obtenido de las mutantes recuperadas se realizó una PCR empleando los iniciadores P1 y P2 antes descritos. Las condiciones empleadas fueron 30 ciclos a 95°C 1 min, 65°C 1 min y 72°C 45 seg. El producto de esta amplificación fue visualizado en geles de poliacrilamida y empleado como molde para una segunda amplificación en la cual se introdujo en la mezcla de PCR, citosina marcada con P<sup>32</sup> en la posición alfa<sup>14</sup> (10 uCu/mMol). El producto de esta amplificación fue digerido con la enzima *Hind* III<sup>15</sup> y empleado como sonda.

Ensayos de Dot blot. Cada uno de los bancos de 90 mutantes empleados en los escrutinios con los cuyes, fueron crecidos en placas esterilizables de 96 pozos con fondo en V<sup>16</sup>. Estas placas fueron centrifugadas a 4 000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue retirado y las bacterias fueron resuspendidas con 100 ul de TE 10:1 (10 mM Tris<sup>17</sup> HCl<sup>18</sup> pH 8.0, 1 mM EDTA<sup>19</sup> pH 8.0), para la obtención de ADN las bacterias fueron lisadas adicionando a cada pozo 3 ul de proteinasa K<sup>20</sup> (20 mg/ml) y 5 ul de SDS<sup>21</sup> al 10%. Estas placas fueron incubadas a 37°C durante 30 min, Transcurrido este tiempo a cada pozo se agregó 75 ul de una solución de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y la placa se centrifugó a 4000 x g durante 25 min. Empleando un sistema de Dot blot para transferencia con vacío<sup>22</sup> se transfirieron

---

<sup>13</sup> GIBCO

<sup>14</sup> AMERSHAM

<sup>15</sup> INVITROGENE

<sup>16</sup> NUNC

<sup>17</sup> USB

<sup>18</sup> JT BAKER

<sup>19</sup> SIGMA

<sup>20</sup> GIBCO

<sup>21</sup> SIGMA

<sup>22</sup> BIO RAD

50 ul del sobrenadante de todos los pozos a placas de Nylon<sup>23</sup>, previo a su transferencia el ADN fue desnaturalizado agregando 5 ul de una solución de NaOH<sup>24</sup> 10N a cada pozo. Terminada la transferencia la membrana fue expuesta a luz Ultravioleta<sup>25</sup> y lavada con una solución 6X SSC. Estas membranas fueron incubadas durante 18 horas con cada una de las sondas según el caso, lavadas con una solución 4X SSC y puestas en contacto con película radiográfica durante 96 hrs. Al término de este tiempo la película fue revelada y conservada para su análisis (75).

Caracterización parcial de las bacterias no patógenas seleccionadas. Las mutantes seleccionadas en los ensayos de *Dot blot*, fueron sometidas a una identificación de acuerdo a los protocolos descritos por Alton (13). A estas mutantes también se les realizó un PCR género específico.

Ensayos de adhesión en cultivo celular. Sólo se utilizaron aquellas bacterias mutantes que fueron escogidas mediante la selección negativa. Los ensayos de infección de cultivos se evaluaron mediante tinción con Giemsa. Para realizar esto, monoestratos de células HeLa y Hep2 con una confluencia del 80% fueron infectados con 100 ul de una suspensión  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *B. melitensis* (MOI 200:1) suspendidas en medio DMEM<sup>26</sup> adicionado con 10% de suero fetal bovino. Las placas fueron incubadas durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, después fueron lavadas tres ocasiones con PBS y a cada pozo se le adiciono 300 ul de DMEM. A diferentes tiempos (2, 4, 8, 12 y 24 horas) los pozos fueron lavados con PBS y las

---

<sup>23</sup> GIBCO

<sup>24</sup> JT BAKER

<sup>25</sup> AMERSHAM

<sup>26</sup> GIBCO

células fueron fijadas por 15 min con una solución de metanol<sup>27</sup> al 70% en PBS. Los pozos fueron teñidos con Giemsa<sup>28</sup> al 10% y observados en un microscopio invertido<sup>29</sup>, para la evaluación del tipo de adhesión presentada.

Ensayos de adhesión a matriz extracelular. Con el fin de evaluar la adhesión de cada una de las mutantes a matriz extracelular se utilizó el procedimiento descrito por Giron y col (70). Para lo cual, colágena<sup>30</sup>, vitronectina<sup>31</sup> y fibronectina,<sup>32</sup> fueron fijadas en placas de poliestireno de fondo plano para lectura colorimétrica<sup>33</sup>, a concentraciones de 10, 5, 1, 0.1 ug/ml. A cada pozo se le adicionaron 100 ul de una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^4$  UFC/ml) y se incubaron por 1.5 h a 37°C. Las placas fueron lavadas con PBS con 0.05% de Tween 20<sup>34</sup> y se les adicionó suero inmune de conejo anti-*B. melitensis*, a una dilución de 1/450, dejándose incubar 1.5 hr a 37°C. Nuevamente las placas fueron lavadas y se adicionó anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa<sup>35</sup> a una dilución de 1/1500, dejándose incubar nuevamente 1.5 hr. Transcurrido este tiempo las placas fueron lavadas y reveladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ABTS<sup>36</sup> en buffer citrato (pH 5.0). Las lecturas de absorbancia a 405 nm fueron realizadas en un lector de ELISA<sup>37</sup> a los 25 min.

Ensayos de crecimiento en medios con pH ácido. Dado que una de las condiciones a las cuales se enfrentan los parásitos intracelulares, es la acidificación de la vacuola

---

<sup>27</sup> JT BAKER

<sup>28</sup> SIGMA

<sup>29</sup> NIKON, modelo T300

<sup>30</sup> SIGMA

<sup>31</sup> SIGMA

<sup>32</sup> SIGMA

<sup>33</sup> NUNC

<sup>34</sup> SIGMA

<sup>35</sup> SIGMA

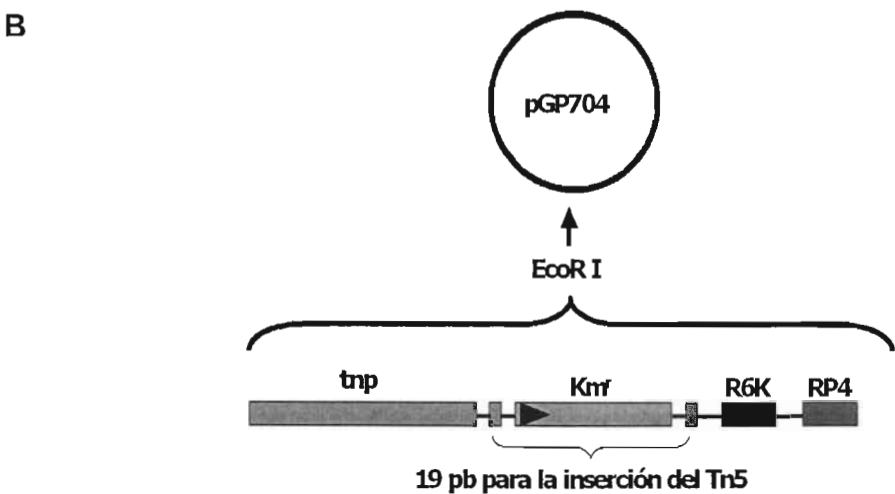
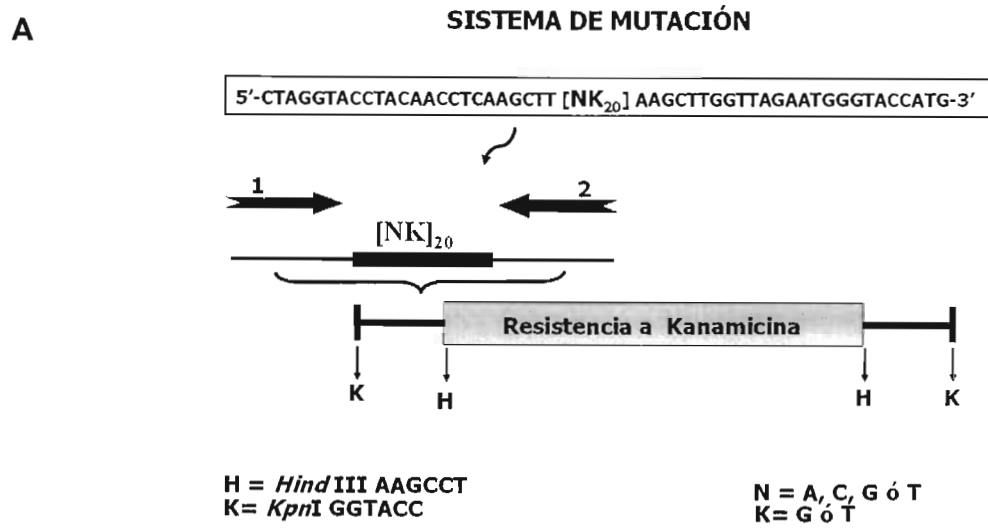
<sup>36</sup> SIGMA

<sup>37</sup> BIO RAD

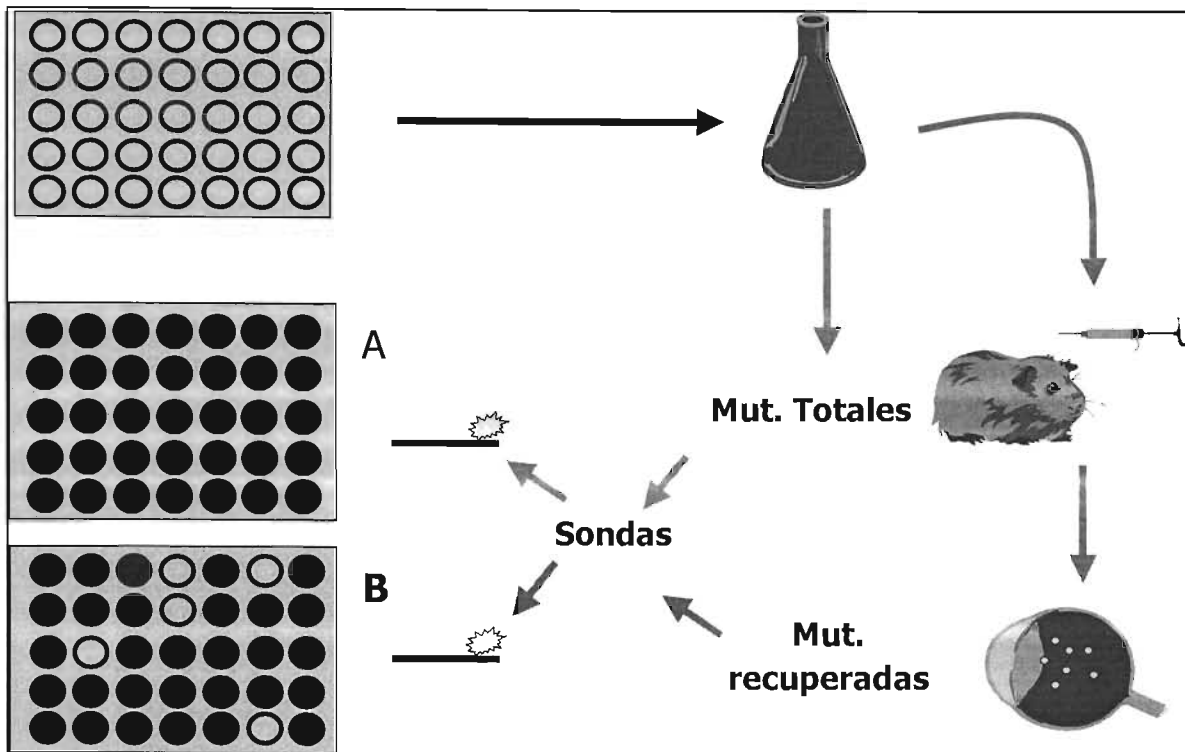
que los contiene, se evaluó el crecimiento de las mutantes en medios con pH ácido, para lo cual, cada una de las mutantes fue crecida en 50 ml de caldo Brucella<sup>38</sup> hasta la fase estacionaria (36 h), después se realizaron subcultivos en caldo Brucella con pH 6.5, 5.5, 5.0, acidificado con ácido cítrico<sup>39</sup>. Estos cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas y después se realizó el conteo de UFC en placas de agar Brucella.

---

<sup>38</sup> OXOID  
<sup>39</sup> MERCK



**Figura 1.** Esquema que muestra la composición de los plásmidos utilizados en la mutagénesis de *B. melitensis*. En **A** se señala el sitio donde se insertó la secuencia de marcaje, en uno de los extremos del gen de resistencia a kanamicina. En **B** se observa la estructura completa del plásmido, incluyendo origen de replicación R6K, el cual es dependiente de la proteína *λpir*, el sitio RP4 sirve para la transferencia por conjugación de este vector.



**Figura 2.** Esquema donde se muestra el procedimiento para la selección de mutantes no patógenas. De un banco de mutantes inicial se extrae ADN con el cual se construyen sondas, las cuales al ser enfrentadas con el banco inicial muestran un reconocimiento de las 90 mutantes (A). A partir del mismo banco se preparan inóculos, los cuales son administrados a cuyes, estos animales después son sacrificados, para la obtención de órganos de donde son recuperadas bacterias. De éstas se extrae ADN y se generan nuevamente sondas para hibridación, las cuales al ser enfrentadas con el banco inicial no reconocen a las 90 mutantes iniciales inoculadas (B). La ausencia de una señal indica la ausencia de una mutante, la cual no pudo ser recuperada del cobayo ya que portaba una mutación que limitó su sobrevivencia, la cual puede ser recuperada del banco original de mutantes.

## RESULTADOS.

Generación del banco de mutantes de *Brucella melitensis* cepa 133 e inoculación en cuyes. Empleando el banco de 90 plásmidos, seleccionados por sus capacidades de amplificación de sondas e hibridación a la misma temperatura, se generó un banco de aproximadamente 10 000 mutantes de *B. melitensis*, las cuales fueron evaluadas mediante las pruebas de aglutinación con acriflavina, para seleccionar sólo aquellas que mostraran un fenotipo liso. De este banco inicial sólo se tomaron 900 mutantes para generar 10 sub-bancos 90 mutantes cada uno. Cabe aclarar en este punto que no todas las mutantes fueron evaluadas por su fenotipo liso o rugoso, sólo realizó la selección hasta conseguir 900 mutantes que mostraran un fenotipo liso evidente en la prueba de aglutinación con acriflavina. Estos sub-bancos de mutantes fueron inoculados en cobayos de 500 grs por vía intraperitoneal (un cobayo por banco). Los cobayos fueron sacrificados a las dos semanas y su bazo fue recuperado, macerado y sembrado en agar *Brucella* con suero fetal bovino y antibiótico. El número total de colonias recuperado no fue contabilizado debido a que no era necesario para los fines de este trabajo; sin embargo, se observaron variaciones en la cantidad de colonias por caja obtenidas de los distintos cuyes.

Obtención de ADN de los bancos de mutantes y construcción de sondas. A partir de cultivos de 50 ml en caldo *Brucella* se extrajo ADN, a partir del cual generaron las sondas empleadas en los ensayos de Dot blot. Estas sondas fueron primero visualizadas en geles de poliacrilamida previo a su marcaje radioactivo. Las sondas



fueron digeridas con la enzima HindD III<sup>40</sup>, para eliminar los segmentos constantes, dejando sólo el segmento intermedio con un tamaño de 40 pares de bases, el cual es diferente en cada transposón (figura 3).

Hibridación tipo Dot blot con las sondas construidas. Una vez construidas las sondas con todas las mutantes y con las mutantes recuperadas de cinco cobayos se procedió a realizar los ensayos de Dot blot. A partir del bazo de uno de los cobayos no se recuperaron 12 mutantes, las cuales posiblemente no pudieron sobrevivir dentro del cobayo (figura 4). En los otros animales no fue posible identificar mutantes no patógenas debido a que en todos los pozos se observaron señales de hibridación, algunas muy débiles.

Caracterización parcial de las mutantes seleccionadas. Las 12 mutantes seleccionadas fueron sometidas a las bioquímicas, TSI, urea, SIM, producción de H<sub>2</sub>S en TSA y oxidasa. Todas las mutantes mostraron los resultados característicos del género *Brucella* spp, con excepción de la mutante A20, la cual mostró una actividad de ureasa débil al igual que una producción de H<sub>2</sub>S, probablemente debido al lento crecimiento mostrado por esta mutante. Todas las mutantes fueron analizadas mediante las pruebas de crecimiento en fucsina y tionina, no mostrando resultados diferentes a la cepa silvestre empleada en este trabajo. Por otra parte, todas las mutantes fueron sometidas a análisis mediante la técnica de PCR para la amplificación de un segmento de 300 pb del gen que codifica a la proteína Omp31, específica del género *Brucella* spp. Los resultados obtenidos en esta parte mostraron amplificación positiva en todas las mutantes. Las mutantes A11 y A14 fueron

---

<sup>40</sup> GIBCO

empleadas para amplificar el gen que confiere resistencia a kanamicina, los resultados obtenidos muestran una amplificación positiva en ambos casos.

Ensayos de crecimiento a pH ácido. Con el fin de evaluar la capacidad de seis mutantes no patógenas obtenidas (A11, A14, A20, A24, A32 y A40), de crecer bajo condiciones de pH ácido, se decidió realizar una prueba de tolerancia a pH de 6, 5.5 y 5.0. Los resultados obtenidos mostraron que sólo la mutante A14 no fue capaz de crecer a pH 5.5 y 5.0. Las mutantes A11, A20, A24, A32 y A40 sí tuvieron la capacidad de crecer en los medios ácidos. Las UFC obtenidas para cada mutante fueron variables, superando en todos los casos  $1 \times 10^7$  UFC/ml. En el caso de la mutante A20 el crecimiento fue nulo, solo que no fue considerado dada la capacidad limitada de crecimiento mostrado por esta mutante en medio normal.

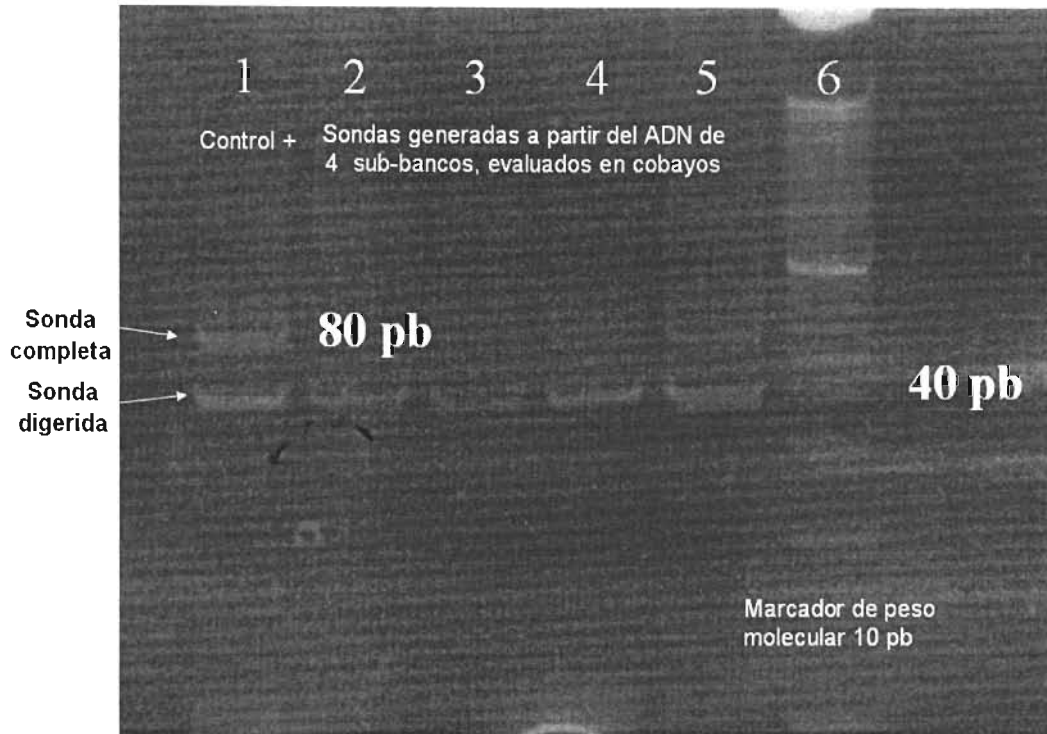
Ensayos de sobrevivencia intracelular. Junto con los ensayos de adhesión a células HeLa se realizaron ensayos de sobrevivencia intracelular. Los resultados mostraron que las dos mutantes evaluadas A11 y A14 no tuvieron la capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de estas células (ver figura 5).

Ensayos de adhesión en células HeLa y Hep2. Previamente Girón y col. (70) habían mostrado que la adhesión de *B. abortus* a estas células muestra un comportamiento localizado. Con el fin de verificar algún cambio en el patrón de adhesión, las mutantes A11 y A14 fueron empleadas en ensayos de adhesión con células HeLa y Hep2. Los resultados obtenidos muestran, para la mayor parte de las células, un patrón de adherencia difuso para *B. melitensis* cepa 133; distinto a la adhesión difusa en *B. abortus*, reportada por Girón y col (70). Es necesario aclarar en este punto que en algunas células se observó un patrón de adherencia localizado. En el caso de las mutantes A11 y A14, el patrón observado correspondió a adhesión difusa. Este

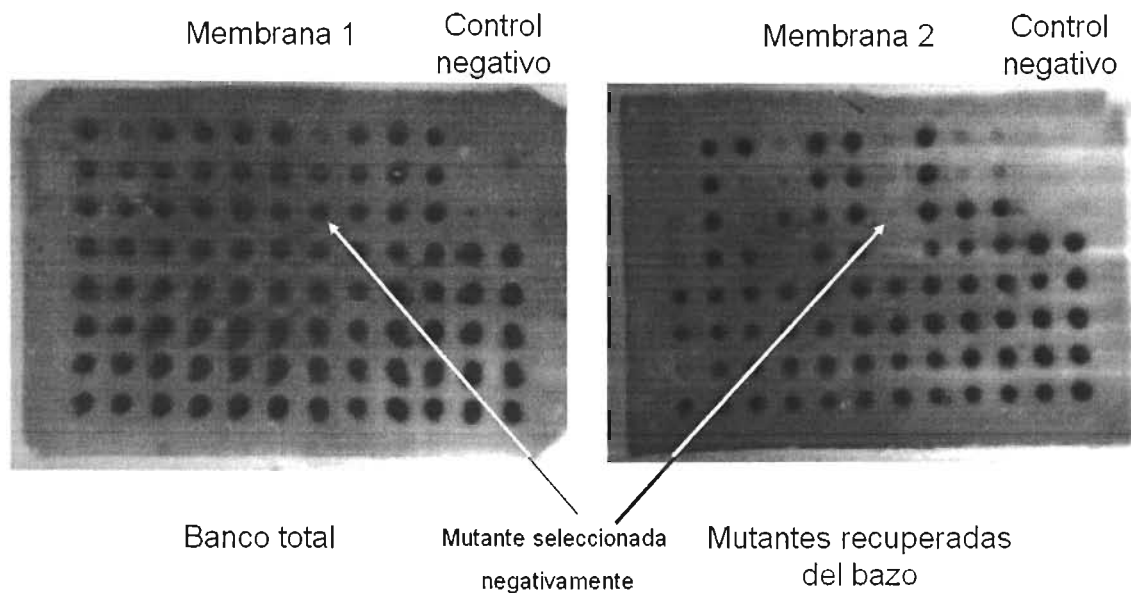
evento fue apreciado desde las dos primeras horas de infección y permaneció a lo largo del ensayo, aún a las 36 horas donde el número de células desprendidas era alto (figura 6).

Ensayos de adhesión a matriz extracelular. Sólo se realizaron los ensayos de adhesión a matriz extracelular con las mutantes A11 y A14. Las lecturas de densidad óptica obtenidas a los 15 min, con la cepa 133 y las mutantes muestran que no existen diferencias significativas para el caso de vitronectina y fibronectina. Sin embargo, en el caso de la colágena ambas mutantes mostraron una deficiencia en la adhesión la cual se observó en las tres concentraciones empleadas en este trabajo (figura 7), esta diferencia fue estadísticamente significativa en ambos casos ( $P \geq 0.05$ ). Este comportamiento no se vio afectado por el tiempo en el cual se realizó la lectura, conservándose la tendencia hasta los 30 min.

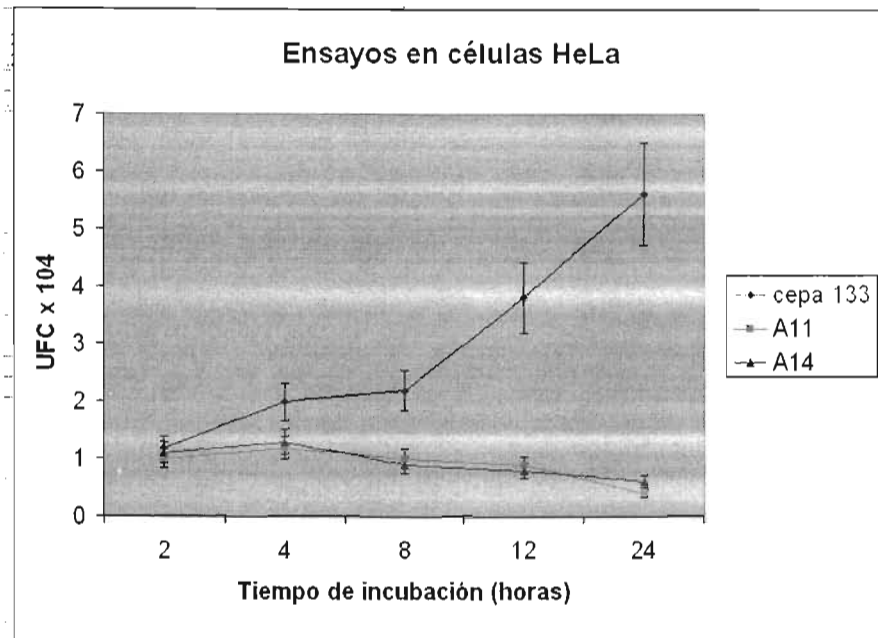
Avances en la obtención de secuencias de los genes interrumpidos por el transposón. Se extrajo ADN de cada una de las mutantes seleccionadas. Este ADN fue digerido con la enzima EcoRI, la cual no corta el gen de kanamicina insertado en cada una de las mutantes. El ADN digerido fue visualizado y purificado de geles de agarosa. En la purificación en ADN digerido fue dividido en segmentos de 2-4, 4-6 y >6 Kbp. Cada uno de los segmentos fue evaluado, mediante PCR, para ver si contenían el gene de resistencia a kanamicina, los segmentos positivos fueron clonados en el vector pUC18. Las transformantes fueron sembradas en agar LB con ampicilina y kanamicina a 50 y 25 ug/ml respectivamente. En un primer ensayo no fue posible clonar ninguno de los fragmentos que contienen el gen de resistencia a kanamicina. En un segundo ensayo se tiene pensado utilizar mayores cantidades de ADN, con el fin de aumentar las probabilidades de clonar el fragmento deseado.



**Figura 3.** Foto de un gel de poliacrilamida teñido con bromuro de etidio, donde se muestra, la sonda completa sin digerir de 80 pb; el producto de la digestión de 4 sondas generadas a partir del ADN extraído de las bacterias recuperadas en el bazo de distintos cobayos, se aprecia el producto de 40 pb, y marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogene).



**Figura 4.** Foto del Dot blot, donde se observan los resultados obtenidos cuando se evaluaron los dos grupos distintos de sondas. En la membrana 1 (izquierda) se muestra una hibridación de todos los pozos, obtenida cuando se emplea en la generación de las sondas el ADN de todas las mutantes. En la membrana 2 (derecha) se aprecia la hibridación de la mayor parte de los pozos, obtenida cuando se emplea en la construcción de las sondas el ADN de las mutantes recuperadas del bazo del cobayo. Los pozos carentes de señal señalan la ausencia de esa mutante en los tejidos recuperados del cuye.

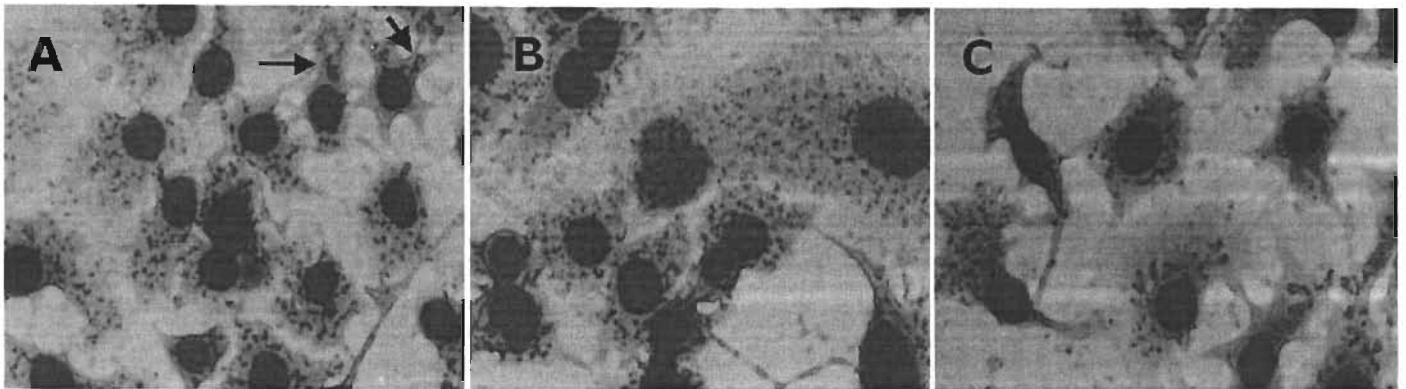


**Figura 5.** Gráfica donde se muestra el crecimiento intracelular de las mutantes A11 y A14 en células HeLa. Como se aprecia en la figura ninguna de las dos mutantes tuvo la capacidad de crecer en estas células.

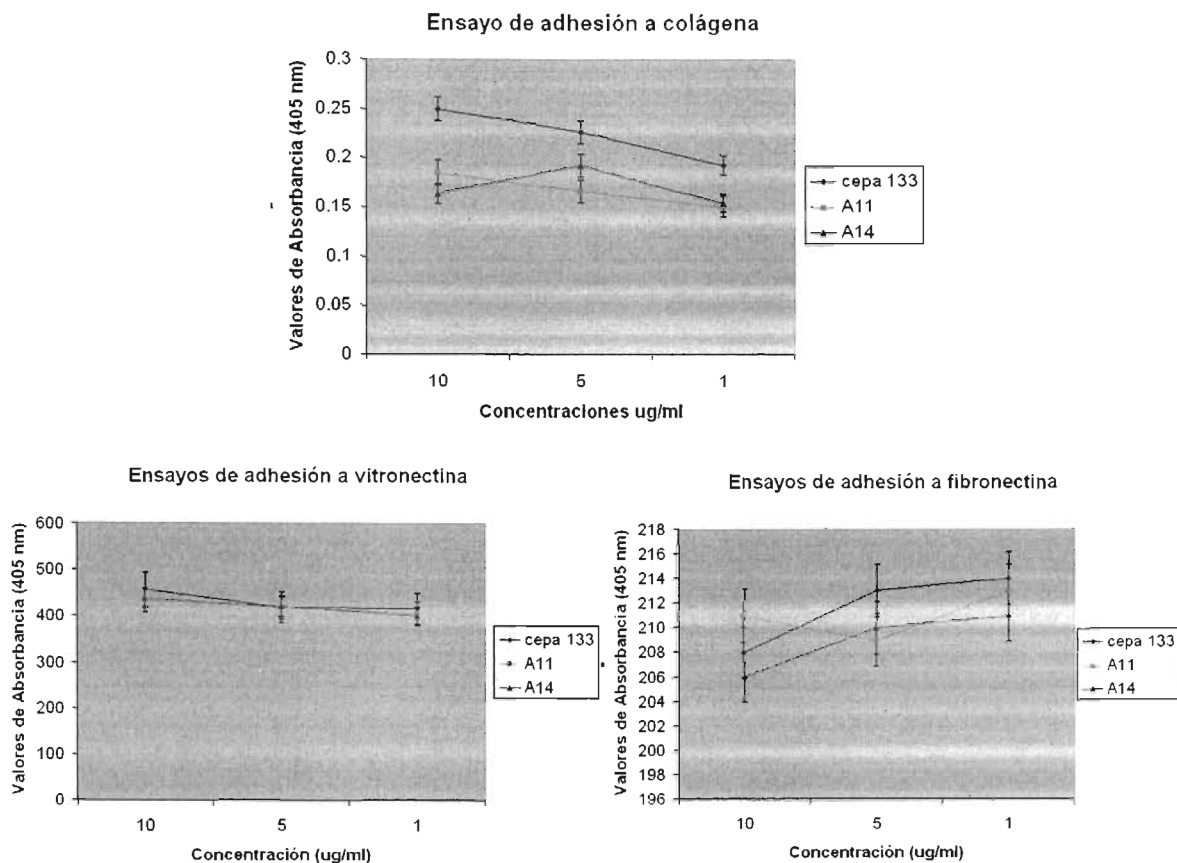
*B. melitensis* 133.

Mutante A11

Mutante A14



**Figura 6.** Ensayos de adhesión a células HeLa, donde se observaron distintos patrones de adhesión. A) *B. melitensis* cepa 133, B) mutante A11 y; C) mutante A14. Nótese que los patrones no varían considerablemente, excepto por el patrón de adherencia localizado (fechas) observado en algunas células con *B. melitensis* cepa 133. Este patrón no fue visto con ninguna de las mutantes evaluadas.



**Figura 7.** Ensayos de adhesión a matriz extracelular. Las gráficas muestran los valores de absorbancia ( $A_{405}$ ) obtenidos con colágena, vitronectina y fibronectina. Nótese que en el caso de colágena, ambas mutantes mostraron lecturas menores que la cepa silvestre ( $P \geq 0.05$ ). En el caso de vitronectina y fibronectina no existió diferencia estadística.



## DISCUSIÓN.

En este trabajo se presenta una primer evaluación de 900 mutantes, que conservan el fenotipo liso. Los resultados obtenidos muestran que el sistema empleado en este trabajo, es útil en la identificación de mutantes no patógenas y, con las modificaciones propuestas en este trabajo, es mucho más fácil de realizar. Las doce mutantes obtenidas de esta primera selección han mostrado su deficiencia en algunos aspectos relacionados con la sobrevivencia dentro del hospedador, como crecimiento en medio con pH ácido o multiplicación en células HeLa. Es importante mencionar que en nuestro ensayo las mutantes fueron seleccionadas por conservar un fenotipo liso (detectable por la prueba de aglutinación con acriflavina y corroborado con la prueba de tinción con cristal violeta). La idea de esta preselección de mutantes fue, básicamente, intentar identificar genes no relacionados con la formación del LPS, dado que para *Brucella* spp, es ya conocido el hecho de que las mutantes rugosas de variedades lisas tienen disminuida su virulencia. Cabe aclarar en este punto que las 900 mutantes evaluadas no eran todas con fenotipo liso de las 10 000 mutantes del banco inicial. El empleo de 900 mutantes obedeció más bien a cuestiones de espacio disponible para el alojamiento de animales en los ensayos biológicos.

En la comprensión de la patogénesis a nivel molecular de las infecciones bacterianas y virales, cada vez es más necesaria la identificación de los genes que codifican para las proteínas responsables de la virulencia de los microorganismos de interés. Esta situación ha cambiado incluso el enfoque de estudio tradicional de las enfermedades infecciosas y actualmente se habla de los postulados moleculares de Koch (78). En

el presente trabajo se adaptó una metodología, descrita para *Salmonella enterica*, para la identificación de genes de virulencia en el género *Brucella* spp. Esta metodología permitió la identificación de una islas de patogenicidad en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Su empleo en *B. melitensis*, realizado en este trabajo, ha permitido la identificación de 12 mutantes no patógenas, como ya se ha mencionado. En la adaptación se han propuesto dos modificaciones sustanciales que permiten que este sistema sea mucho más eficiente. La primera de ellas consistió en hacer una selección de un banco de 90 plásmidos, para la generación de mutantes, con base en su capacidad de hibridar bajo las mismas condiciones. Este evento incluyó el hecho de que las regiones variables contenidas en cada uno de los plásmidos fuera amplificada eficientemente. Es decir, dado que en la construcción de las sondas se utilizó ADN obtenido de los 90 plásmidos en conjunto, en los casos en los cuales una de las regiones variables no hubiese sido amplificada en la PCR, su ausencia sería evidente con los resultados obtenidos en los ensayos de Dot blot. De esta forma se pudo tener un banco de plásmidos, con el cual la amplificación de todas las regiones variables era constante y, como ya se mencionó, las condiciones de hibridación muy similares. La construcción de este banco de plásmidos fue crucial en la identificación de las mutantes no patógenas, dado que en este momento se tenía la certeza que las señales ausentes se debían a que estas mutantes no se encontraban en los tejidos del cobayo infectado experimentalmente, y no a fallas al momento de la hibridación o la amplificación. La segunda modificación propuesta consiste en la utilización de iniciadores que amplifican la región variable, para la generación de las sondas, que tienen una temperatura de alineamiento (TM) más

alta que la reportada por Holden (74), lo que permite que la inespecificidad, sea eliminada y que no existan amplificaciones inespecíficas con el ADN de *Brucella* spp.

Con estas dos modificaciones, este sistema fue empleado para la generación de mutantes en *B. melitensis* cepa 133, las cuales fueron inoculadas en cuyes. Este modelo animal ya ha sido usado previamente como modelo experimental en la brucelosis. En la infección se empleó una dosis de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, que aunque alta en comparación con la empleada en ratones ( $1 \times 10^4$  UFC/ml), fue necesaria dado que el inóculo era una mezcla de bacterias mutantes y se debía de tener la certeza de que la ausencia de crecimiento dentro de hospederos no fuera resultado de una dosis no infectante. Con esta dosis los cobayos enfermaron y se pudo lograr de ellos el aislamiento de varias mutantes del bazo. El aislamiento de las mutantes fue facilitado por el hecho de que cada una de ellas tiene resistencia a kanamicina y ácido naladixico. Aunque las placas de agar brucella, donde se sembraron las muestras de bazo, mostraron crecimiento de una variedad de colonias blancas pequeñas. Sin embargo, esto no representó un problema, ya que aun en presencia de contaminantes los iniciadores diseñados en este trabajo, sólo amplifican la región variable de la secuencia que marca a cada una de las mutantes.

El hecho de saber que todas las mutantes fueran lisas fue útil en la selección de pruebas que se aplicarían a aquellas mutantes seleccionadas en los ensayos con los cuyes. Es decir no se evaluó la sensibilidad a péptidos catiónicos y la resistencia al complemento ya que estas características no se asocian a la presencia de LPS, y todas nuestras mutantes lo tenían. En su lugar se decidió evaluar la capacidad de

crecimiento a pH ácido, la capacidad de adhesión a células epiteliales y la capacidad de adhesión a componentes de la matriz extracelular. Más pruebas para su evaluación serán necesarias como crecimiento en macrófagos murinos y humanos. De igual forma se necesitará cada una de las secuencias de los genes interrumpidos con el transposon Tn5, en la obtención de estas secuencias también se han hecho modificaciones que facilitarán la obtención de las mismas.

Las 12 mutantes fueron caracterizadas con las pruebas bioquímicas descritas para este género, los resultados obtenidos en esta parte nos permitieron identificar una mutante cuyo crecimiento estaba reducido en medios de cultivo. La ausencia de esta cepa en los tejidos del cobayo se debe básicamente a su lento crecimiento, mas que a la ausencia de gen relacionado con su virulencia, aunque se debe de considerar que la virulencia es el resultado de dos condiciones: la capacidad del microorganismo para crecer bajo las condiciones del hospedero y factores de virulencia que existan en el microorganismo estudiado. En el caso de la mutante A20, la hipótesis sería, que si no tenía la capacidad de crecer en medios específicos para *Brucella*, mucho menos lo podría hacer bajo las condiciones adversas encontradas dentro del hospedero. Para el resto de las mutantes ésta no fue una limitante ya que todos crecían de forma muy similar a la cepa silvestre en agar y caldo *Brucella*.

Otra de las mutantes, la identificada como A14, perdió su capacidad de crecimiento en medio con pH ácido, una condición que es encontrada dentro de los macrófagos. Reportes previos sobre este aspecto han mostrado, por una parte, la capacidad de *B. melitensis* y *B. abortus* para crecer a pH de hasta 5.5 y, por otra, la inducción

diferencial de proteínas bajo estas condiciones. Algunas de estas proteínas con expresión diferente son DnaK (79) y HdeA (80). En el caso de DnaK se ha mostrado que su expresión es aumentada bajo condiciones de estrés no solamente ácido, sino oxidativo, incluso cuando este gen fue mutado en *B. abortus* la virulencia se redujo. Por otra parte, recientemente se ha descrito que *B. abortus* carente de HdeA muestra una sensibilidad mayor a pH ácido; sin embargo el comportamiento de esta cepa en ratones no muestra diferencias en comparación con la cepas patógenas. En nuestro caso debemos de considerar que la mutante sensible a pH ácido no tuvo la capacidad de crecer dentro del hospedero. Otras de las mutaciones que pueden llegar a afectar la sobrevivencia de *Brucella* spp a pH ácido son aquellas que afectan los activadores transcripcionales directamente involucrados con la respuesta al estrés en estos microorganismos, tal es el caso del factor *hfq*.

En lo que respecta a los ensayos de adhesión, las dos mutantes evaluadas no mostraron diferencias evidentes con la cepa silvestre de *B. melitensis* 133. Sin embargo no se observó el patrón de adherencia localizada reportada por Girón y col, en *B. abortus*. El patrón de adherencia para el caso de la cepa silvestre fue difuso, con algunas células con adhesión localizada. Esta diferencia en los patrones de adhesión podría deberse a la forma en la cual se interpretan los resultados dado que para algunas células es difícil establecer el tipo de adhesión que se está observando. Este comportamiento no fue igual cuando se evaluó, la capacidad de adherirse a matriz extracelular. En este caso ambas mutantes mostraron una capacidad reducida de adherirse a colágena, a diferencia de la cepa silvestre. La importancia de este evento en la patogénesis de la Brucelosis no se conoce aun. Recientemente, Girón y

col. han reportado la capacidad de adhesión de *B. abortus* a diferentes componentes de la matriz extracelular. La importancia que tiene este evento en la patogénesis de microorganismos intracelulares, se ve ejemplificada por *N. gonorrhoeae* donde la adhesión a vitronectina permite la invasión a células HeLa (81). Por lo tanto, se asume que la adhesión de *Brucella* spp a componentes de la matriz extracelular pudiera ser importante en la diseminación y colonización del microorganismo a diferentes órganos y tejidos, sin embargo se requieren de más trabajos para comprobar esta hipótesis.

Finalmente, se debe de considerar que la virulencia es el resultado de la expresión coordinada de varios genes, el resultado de que uno de ellos no esté puede afectar la capacidad de replicación y por lo tanto da lugar a la eliminación del microorganismo del hospedador.

## CONCLUSIONES

El sistema de Selección Negativa, es una metodología útil en la identificación de mutantes no patógenas en *Brucella melitensis*, con las modificaciones sugeridas en este trabajo.

La adhesión a matriz extracelular podría estar relacionada con la patogenicidad de *Brucella melitensis* dentro del hospedador.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Corbel MJ. Brucella. En: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. Vol. 2. Systematic bacteriology. 9th ed. USA: Oxford University Press, Inc., 1998: 799-827.
2. Verger JM, Plomet M. *Brucella melitensis*. USA, 1985: Martinus Nijhoff Publishers.
3. Moyer NP, Holcomb LA. *Brucella*. En: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 6th ed. USA: American Society for Microbiology, 1995: 549-555.
4. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Diseases 1997; 3: 213-221.
5. Moreno E, Stackebrand E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and Lipid A Reveal a Phylogenetic Relationship with members of the Alpha-2 Subdivision of the class *Proteobacteria*. Journal of Bacteriology 1990, 172: 3569-3576.
6. Padilla P F, Picao G V S, Pereira L A. Brucellosis in Brazil. Veterinary Microbiology 2002, 90; 52-62.
7. Vargas OFJ. Brucellosis in Venezuela. Veterinary Microbiology 2002, 90: 39-44.
8. Rivera AS, Ramírez MC, Lopetegui PI. Eradication of bovine brucellosis in the 10<sup>th</sup> Region de Los Lagos, Chile. Veterinary Microbiology 2002, 90: 45-53.
9. Baumgarten D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. Veterinary Microbiology 2002, 90: 63-69.
10. Moreno E. Brucellosis in Central America. 2002, 90: 31-38.
11. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Veterinary Microbiology 2002, 90: 19-30.
12. Morrison W I. Biotecnología y Vacunas de uso veterinario. Visión 2020 1999, 2:3-.
13. Alton G G, Jones L M, Angus R D, Verger J M. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris, France, 1988.
14. Essenberg R C, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I. Sugar metabolism by Brucellae. Veterinary Microbiology 2002, 90: 249-261.
- 15.- Rest R F, Robertson D C. Characterization of the Electron Transport System in *Brucella abortus*. Journal of Bacteriology 1975, 122: 139-144.



- 16.- Sperry J F, Robertson D C. Erythritol Catabolism by *Brucella abortus*. Journal of Bacteriology 1975, 121: 619-630.
- 17.- Sangari F J, Agüero J, García-Lobo J M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. Microbiology 2000, 146: 487-495.
- 18.- Sangari F J, Grilló M J, Jiménez de Bagüés M P, González C M I, García L J, Blasco J M, Agüero J. The defect in the metabolism of erythritol of the *Brucella abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. Vaccine 1998, 16; 1640-1645.
- 19.- Burkhardt S, Jiménez de Bagüés M P, Liautard J P, Köhler. Analysis of the Behavior of *eryC* Mutants of *Brucella suis* Attenuated in Macrophages. Infection and Immunity 2005, 73; 6782-6790.
- 20.- Ugalde J E, Czubener C, Feldman M F, Ugalde R A. Identification and Characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. Infection and Immunity 2000, 68: 5716-5723.
- 21.- Kim S, Watabe K, Shirahata T, Watarai M. Zinc Uptake System (*znuA* Locus) of *Brucella abortus* is Essential for Intracellular Survival and Virulence in Mice. Journal of Veterinary Medical Science 2002, 66: 1059-1063.
- 22.- Jubier M V, Rodrigue A, Ouahrani B S, Layssac M, Mandrand B M A, Köhler S, Liautard J P. Identification of the *nik* gene Cluster of *Brucella suis* Regulation and Contribution to Urease Activity. Journal of Bacteriology 2001, 183: 426-434.
- 23.- Seung-Hun B, Gireesh R, Splitter G A, James P S. Denitrification Genes Regulate *Brucella* Virulence in Mice. Journal of Bacteriology 2004, 186; 6025-6031.
- 24.- Laurent P. Denitrification in Pathogenic bacteria: for better or worst? TRENDS in Microbiology 2005, 13; 191-192.
- 25.- Groisman EA, Howard O. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 1998; 87: 791-794.
- 26.- Michaux C S, Jumas B E, Allardet S A, Bourg G, Boschioli M L, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella* genome at the beginning of the post-genomic era. Veterinary Microbiology 2002, 90: 581-585.

- 27.- Vizcaino N, Cloeckert A, Verger J M, Grayon M, Fernandez L L. DNA Polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and Infection* 2000, 2; 1089-1100.
- 28.- Allardent-Servent A, Carles N M J, Bourg G, Michaux S, Ramuz M. Physical Map of the *Brucella melitensis* 16 M chromosome. *Journal of Bacteriology* 1991, 173: 2219-2224.
- 29.- Michaux S, , Paillison J, Carles N M J, Bourg G, Allardent-Servent A, Ramuz M. Presence of Two Independent Chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M Genome. *Journal of Bacteriology* 1993, 175: 701-705.
- 30.- Halling SM, Bricker BJ. Characterization and occurrence of two repeated palindromic DNA elements of *Brucella* spp.: Bru-RS1 and Bru-RS2. *Molecular Microbiology* 1994; 14: 681-689.
31. Halling SM, Tatum FM, Bricker BJ. Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* 1993; 433: 123-127.
- 32.- DelVecchio V G, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mújer C V. The Genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 2002, 90: 587-592.
- 33.- Bricker B J. Characterization of the three ribosomal RNA operons *rnaA*, *rnaB* and *rnaC*, from *Brucella melitensis*. *Gene* 2000, 255: 117-126.
- 34.- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Molecular Microbiology* 1998; 27: 99-106.
- 35.- Kim JA, Mayfield JE. *Brucella abortus* arginase and ornithine cyclodeaminase genes are similar to Ti plasmid arginase and ornithine cyclodeaminase. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1354: 55-57.
- 36.- Sánchez DO, Zandomeni RO, Cravero S, Verdun RE, Pierrou E, Faccio P, Diaz G, Lanzavecchia S, Agüero F, Frasch ACC, Andersson SGE, Rossetti OL, Grau O, Ugalde RA. gen discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 2001; 69: 865-868.
- 37.- Fretin D, Fauconier A, Köhler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue R M, Danese I, Vendenhaute J, Tibor A, Debolle X, Letesson J J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular Microbiology* 2005, 7: 687-698.

- 38.- Tsolis R M. Comparative genome analysis of the  $\alpha$ -*Proteobacteria*: Relationships between plant and animal pathogens and host specificity. PNAS 2002, 99: 12503-12505.
- 39.- Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard J P. The innate immune response against *Brucella* in humans. Veterinary Microbiology 2002 90; 383-394.
- 40.- Ottonnes F J, Liautard J, Gross A, Rabenoelina F, Liautard J P, Favero J. Activation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells by a *Brucella suis* non-peptidic fraction impairs bacterial intracellular multiplication in monocytic infected cells. Immunology 2000 100; 252-258.
- 41.- Baldwin C, Parent M. Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection. Veterinary Microbiology 2002 90;367-382.
- 42.- Harricane MC, Caron E, Porte F, Liatuard JP. Distribution of annexin I during non-pathogen or pathogen phagocytosis by confocal imaging and immunogold electron microscopy. Cell Biology Inter 1996; 20: 193-203.
- 43.- Kusumawati A, Cazevieille C, Porte F, Bettache S, Liatuard JP, Widada JS. Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. Microbial Pathogenesis 2000; 28: 343-352.
- 44.- Bellaire B H, Roop II R M, Cardelli J A. Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic Endoplasmic Reticulum-Negative, Lamp1 positive Phagosomes in Human Monocytes. Infection and Immunity 2005, 73; 3702-3713.
- 45.- Ritting M G, Alvarez M M T, Porte F, Liautard J P, Rouot B. Intracellular Survival of *Brucella* spp in Human Monocytes Involves Conventional Uptake but Special Phagosomes. Infection and Immunity 2001, 69; 3995-4006.
- 46.- Pizarro-Cerdá J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, López-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infection and Immunity 1998; 66: 5711-5724.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 47.- Celli J, Chastellier C, Franchini D M, Pizarro C. J, Moreno E, Gorvel J P. *Brucella* Evades Macrophage Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Experimental Medicine* 2003, 198; 545-556.
- 48.- Arenas G N, Staskevich A S, Aballay A, Mayorga L S. Intracellular Trafficking of *Brucella abortus* in J774 Macrophages. *Infection and Immunity* 2000, 68; 4255-4263.
- 49.-Anderson T D, Cheville N F. Ultrastructural Morphometric Analysis of *Brucella abortus*-Infected Trophoblasts in Experimental Placentitis. *American Journal of Pathology* 1986, 124; 226-237.
- 50.- Porte F, Liatuard JP, Köhler E. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 4041-4047.
- 51.- Detilleux P G, Deyoe B L, Cheville N F. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in Vero cells. *American Journal of Veterinary Research* 1991, 52; 1658-1664.
- 52.- Guzmán-Verri C, Chaves O E, von Eichel S C, Lopez G I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel J P, Moreno E. GTPases of the Rho subfamily Are Required for *Brucella abortus* Internalization in Nonprofessional Phagocytes: Direct Activation of Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276; 44435-44443.
- 53.- Chaves O E, Guzmán-Verri C, Méresse S, Desjardins M, Pizarro C J, Badilla J, Gorvel J P, Moreno E. Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cellular Microbiology* 2002, 4; 683-675.
- 54.- Schuch R. and Maurelli A T. The Type III Secretion Pathway: Dictating the Outcome of Bacterial-Host Interactions, en *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, editado por Brogden K. 3a edición, American Society for Microbiology 2000, Washington, USA.
- 55.- Halling SM. On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microbial Compendium Genomics* 1998; 3: 21-29.
- 56.- O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet S A, Boschioli M L, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens*

- VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology* 1999, 33, 1210-1220.
- 57.- Sieira R, Comerci D J, Sánchez D O, Ugalde R A. A Homologue of an Operon Required for DNA Transfer in *Agrobacterium* Is Required in *Brucella abortus* for virulence and Intracellular Multiplication. *Journal of Bacteriology* 2000, 182; 4849-4855.
- 58.- Lavigne J P, Patey G, Sangari F J, Bourg G, Ramuz M, O'Callaghan D, Charachon S M. Identification of a New Virulence Factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infection and Immunity* 2005, 73; 5524-5529.
- 59.- Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*, 1998; 29: 125-138.
- 60.- Sangari FJ, Agüero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update. *Microbiología* 1996; 12: 207-218.
- 61.- Rittig M G, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gemsa D, Foulonge V, Rouot B, Dornand J. Smooth and Rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 2003, 74; 1-11.
- 62.- Fernandez P C M, Zelazowska E B, Nikolich M, Hadfield T L, Roop II R M, Robertson G L, Hoover D L. Interactions Between *Brucella melitensis* and human Phagocytes: Bacterial Surface O-Polysaccharide Inhibits Phagocytosis Bacterial Killing and Subsequent Host Cell Apoptosis. *Infection and Immunity* 2003, 71; 2110-2119.
- 63.- Forestier C, Moreno E, Méresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, Gorvel J P. Interaction of *Brucella abortus* Lipopolysaccharide with major Histocompatibility Complex Class II Molecules in B Lymphocytes. *Infection and Immunity* 1999, 67;4048-4054.
- 64.- Forestier C, Moreno E, Pizarro-Cerda J, Gorvel J P. Lysosomal Accumulation and Recycling of Lipopolysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages an In Vitro and In Vivo Study. *Journal of Immunology* 1999, 162; 6784-6791.

- 65.- Forestier C, Deleuil F, Lapaque N, Moreno E, Gorvel J P. *Brucella abortus* Lipopolysaccharide in Murine Peritoneal Macrophages Acts as a Down-Regulator of T Cell Activation. *Journal of Immunology* 2000, 165; 5202-5210.
- 66.-Porte F, Naroemi A, Ouahrani-Bettache S, Liautard J P. Role of the *Brucella suis* Lipopolysaccharide O Antigen in Phagosomal Genesis and in Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion in Murine Macrophages. *Infection and Immunity* 2003, 71; 1481-1490.
- 67.- Naroeni A, Porte F. Role de Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages. *Infection and Immunity* 2002, 70;1640-1644.
- 68.- Mechanisms of Binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994, 41; 295-306.
- 69.- Rocha G R C, Castañeda R E I, Giono C S, Giron J A. *Brucella* sp bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiology Letters* 2002, 213; 219-224.
- 70.- Rocha G R C, Avelino F F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Giron J A. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cellular Microbiology* 2004, 6; 435-445.
- 71.- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Sb1alcedo S, Briones G, Ciocchini A E, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel J P. Cyclic  $\beta$ -1-2 glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology* 2005, 6; 618-625.
- 72.- Roy Craig R. Trimming the fat: a *Brucella abortus* survival strategy. *Nature Immunology* 2005, 6; 546-548.
- 73.- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Diseases* 1997; 3: 213-221.
- 74.- Holden DW, Hensel M. Signature tagged mutagenesis. *Methods in Microbiology* 1998, 27; 359-369.
- 75.- Sambrock J, Fritsch E F, Manniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Segunda Edición Cold Spring Harbor, USA, 1989.
- 76.- Sangari F J, Agüero J. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microbial Pathogenesis* 1991, 11; 443-446.

- 77.- Díaz A E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de Brucelosis Animal. INIFAP México 2001.
- 78.- Falkow S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. Rev Infec Dis 1988; 10: S274-S276.
- 79.- Kohler S, Ekaza E, Paquet J I, Walravens K, Teyssier J, Godfroid J, Liautard J J. Induction de dnaK through Its native heat shock promoter is necessary for Intramacrophagic Replication of *Brucella suis*. Infec Immun 2002; 70(3): 1631-1634.
- 80.- Valderas M W, Alcántara RB, Baumgartner JE, Bellaire BH, Robertson GT, Ng WL, Richardson JM, Winkler ME, Roop RM. Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. Veterinary Microbiology 2005; 107;307-12.
- 81.- Dehio M, Gomez-Duarte OG, Dehio C, Meyer TF. Vitronectin-dependent invasion of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae* involves alpha (v) integrin receptors. FEBS Lett 1998; 424 (1-2): 84-8.

# TECNICA PECUARIA EN MEXICO

Mérida, Yucatán; 19 de agosto de 2005.

**Daniel Martínez Gómez**  
**Luis Servín González**  
**Antonio Verdugo Rodríguez**

**Re: 538**

Estimados autores:

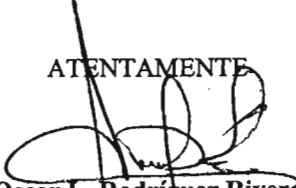
Tengo el agrado de comunicar a ustedes que su trabajo titulado **IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES APATÓGENAS DE *BRUCELLA MELITENSIS* CON EL SISTEMA DE SELECCIÓN NEGATIVA**, con clave 538, ha sido **aceptado con modificaciones como Artículo**, por nuestro cuerpo arbitral, para su publicación en la revista Técnica Pecuaria en México. Adjunto les estamos enviando copia del trabajo, varias hojas de observaciones técnicas de nuestros revisores, así como correcciones editoriales, las cuales deberán considerar para la elaboración del manuscrito final. Si difieren con alguna(s) de estas observaciones, e hicieron caso omiso de ella(s) en su versión final, deberán argumentar por escrito su desacuerdo al respecto.

La versión final deberá venir impresa en un solo original, ya sin enumerar los renglones, y en disquete conteniendo exclusivamente la misma información enviada en el original; dicho disquete deberá estar libre de virus, ya que el hecho de estar contaminado será motivo para no publicar el trabajo. Los trabajos deberán estar elaborados en Word para Windows. Las gráficas y figuras deberán estar independientes del texto y no incluidas como imagen; elaborarse en Word, Excel o en su defecto en Power Point. No se aceptarán documentos elaborados en otros programas diferentes a los especificados.

Al envío de su versión final deberán devolvernos toda la documentación que les adjuntamos, incluyendo el formato de verificación; la falta de devolución de cualquier documento, retrasará la publicación del trabajo.

## OBSERVACIONES

- |  |
|--|
| 1. Acortar la sección de Introducción.   |
| 2. Eliminar las metodologías que ya han sido descritas en la literatura, y sólo poner la cita correspondiente. |
| 3. Recuerden que la impresión de fotos y figuras es en blanco y negro. Mejorar la impresión de las mismas.     |
| 4. Se anexa archivo en disco que contiene algunas observaciones técnicas.                                      |

ATENTAMENTE  
  
Oscar L. Rodríguez Rivera  
Editor General

c.c.p. Expediente  
c.c.p. Minutario

Calle 31-D # 257 x 24, Col. Alemán, 97148, Mérida, Yucatán.  
Tel. y Fax 01(999)926-30-46  
tecpecu@prodigy.net.mx  
rodriguez.oscar@inifap.gob.mx