



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE *Brucella*  
*melitensis* PRESENTES EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**ORTIZ RICO ADOLFO**

ASESORES:

**DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ  
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular del  
Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.**

**El presente trabajo es parte del proyecto aprobado y financiado por los proyectos  
PAPPIT IN205701, PAPPIT IN222907 y SEP-CONACyT2003-CO2-45271.**

## INDICE

1.0 RESUMEN.....	3
2.0 INTRODUCCIÓN.....	4
3.0 HIPÓTESIS.....	17
4.0 OBJETIVO GENERAL.....	17
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1 Condiciones de cultivo y cepas.....	18
5.2 Ensayos de liberación de proteínas.....	18
5.3 Obtención del número de microorganismos viables.....	18
5.4 Recuperación de proteínas en el sobrenadante.....	19
5.5 Geles de poliacrilamida con SDS.....	19
5.6 Tinción de proteínas con azul de Coomasie.....	20
5.7 Tinción de proteínas con nitrato de plata.....	20
5.8 Inmunotransferencia tipo Western Blot.....	21
6.0 RESULTADOS.....	23
6.1 Cinética de desarrollo en medios con cantidades crecientes de suero....	23
6.2 Detección de las proteínas en el sobrenadante.....	25
6.3 Análisis de las proteínas en el sobrenadante por inmunotransferencia tipo <i>Western blot</i> .....	27
7.0 DISCUSIÓN.....	34
8.0 CONCLUSIONES.....	37
9.0 PROSPECTIVAS.....	37
10.0 REFERENCIAS.....	38

## RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis de reporte obligatorio. A nivel mundial, esta zoonosis es considerada como la tercera en importancia después de la tuberculosis y la salmonelosis, es por esto que los trabajos de investigación para la comprensión de la patogénesis molecular son de gran relevancia ya que a partir de éstos se pueden conocer los mecanismos por los cuales la bacteria puede sobrevivir y permanecer durante periodos prolongados dentro del hospedero generando una infección crónica. En conjunto con otros ensayos, este trabajo podría generar información para diseñar nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico, el tratamiento y la eliminación de la enfermedad.

En el presente trabajo se estableció un modelo *in vitro* que simula algunas de las condiciones a las cuales se enfrenta *Brucella melintesis* durante la bacteremia con el fin de poder detectar la liberación al medio de componentes principalmente de tipo proteico. En este modelo *in vitro* la bacteria fue crecida en medio de cultivo RPMI adicionado con distintos porcentajes de suero fetal bovino (SFB). Las proteínas fueron recuperadas del medio por precipitación utilizando la técnica de metanol - cloroformo. El patrón electroforético de las proteínas recuperadas fue visualizado en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie y nitrato de plata. Posteriormente, se mostró la inmunoreactividad de las proteínas enfrentándolas a sueros de cabra positivos a *Brucella* spp por medio de la técnica de inmunotransferencia tipo *Western blot*, lográndose identificar bandas proteicas de *B. melitensis* con pesos moleculares alrededor de 46, 50 y 60 kDa.

## 2.0 INTRODUCCIÓN.

El establecimiento de la brucelosis como una zoonosis se debe a la estrecha convivencia entre el hombre y los animales. La brucelosis ha sido una zoonosis importante en múltiples culturas y regiones del mundo. En el tiempo de Hipócrates fueron descritas condiciones clínicas similares a las de la brucelosis, y se han detectado reminiscencias de un microorganismo semejante a *Brucella spp* en quesos carbonizados durante la era romana. Así mismo, esta enfermedad afectó a un significativo número de habitantes de Pompeya y posiblemente haya sido la causa de la quinta plaga que azotó a Egipto diezmando su ganado (1,2). Esta enfermedad infectocontagiosa está ampliamente distribuida en el mundo y afecta a un gran número de animales domésticos y silvestres, incluyendo el ganado bovino, ovino, caprino, suino, canino, roedores, y mamíferos marinos, así como al humano, por lo que es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la tercera zoonosis más importante después de la tuberculosis y la salmonelosis (3,4).

En humanos la brucelosis se presenta como una enfermedad debilitante crónica febril razón por la cual también se le llama "Fiebre Ondulante". En casos documentados en la ciudad de Nightingale, Florencia, se registran signos en pacientes hasta por más de 30 años. En los animales domésticos la principal afectación es a nivel reproductivo, manifestado como abortos e infertilidad, que producen grandes pérdidas económicas (5,6).

La brucelosis es causada por bacterias intracelulares facultativas del género *Brucella*, el cual comprende varias especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y las reciente incorporación *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, aisladas a partir de mamíferos marinos (7,8,9,10).

El primer aislamiento de microorganismos del género *Brucella*, fue hecho por David Bruce en 1887. En ese entonces fue llamado "*Micrococcus melitensis*", actualmente es conocido como *Brucella melitensis*, este aislamiento se realizó a partir de tejido esplénico de casos de humanos, que fallecieron como resultado "Fiebre ondulante" (10).

La presencia de este agente en nuestro país se describió durante el siglo XX y aunque los primeros reportes de casos humanos con brucelosis están registrados en 1905. Posteriormente se relacionaron dichos casos a la importación de cabras procedentes de España. El Dr. Ruiz-Castañeda es el responsable del registro de muchos casos, así como de la implementación del tratamiento y el diagnóstico en el país (11).

La brucelosis es una enfermedad bacteriana de gran importancia, ya que afecta la productividad pecuaria, debido al cuadro clínico que ocasiona y las restricciones que se imponen para el traslado de animales así como la exportación a mercados internacionales, de productos que pudieran estar contaminados. La Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis bovina de México (CONETB) estableció que las pérdidas alcanzaban más de 2,000 millones de pesos por año. En México se han aislado cinco de las ocho especies de *Brucella spp*, las especies no aisladas son *B. neotomae* y las especies relacionadas con mamíferos marinos. Si bien, la Campaña Nacional para la Erradicación de la Brucelosis Animal implementada en el país, logró eliminar un número importante de animales infectados en ciertas regiones, aún existen hatos de ganado bovino, caprino, ovino y probablemente suino, infectados. Por otra parte, los casos reportados a la Secretaría de Salud de brucelosis humana, son de personas que no están relacionadas con actividades rurales, pero que consumieron productos de animales infectados; no obstante, esta enfermedad se considera de tipo ocupacional, esto es en el personal que se encuentra expuesto a los diferentes procesos

de productos de animales infectados, así como aquel que realiza alguna manipulación del microorganismo directamente (11).

El género *Brucella* está agrupado en la subdivisión Alfaproteobacteria, junto con otros géneros como *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Rickettsia* (10,12,13). La clasificación en especies dentro del género *Brucella* está tradicionalmente establecida por preferencia de hospedero, aún cuando cuatro de estas ocho especies son consideradas como zoonosis. Las características de las distintas especies de *Brucella spp* se muestran en el cuadro 1 (8).

**Cuadro 1.** Características generales de las especies del genero *Brucella*.

Especies	Biotipo	Huésped animal	Primera descripción	Virulencia en humanos
<i>B. melitensis</i>	1-3	Cabras, ovejas, camellos	Bruce, 1887	++++
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Bovinos, yaks, camellos, búfalo	Bang, 1897	++ o +++
<i>B. suis</i>	1-5	Cerdos (1-3), Liebre silvestre (2), Caribú (4), roedores silvestres (5)	Traum, 1914	++++
<i>B. canis</i>	_____	Caninos	Carmichael y Bruner, 1968	+
<i>B. ovis</i>	_____	Ovinos	Van Drimmelen, 1953	-
<i>B. neotomae</i>	_____	Roedores	Stoanner y Lackman, 1957	-
<i>B. pinnipedialis</i> <i>B. ceti</i>	_____	Focas  Ballenas, delfines, marsopas	Ewalt y Ross, 1994	+  (* )

Pappas Georgios et al. Brucellosis. N England J Med 2005;352:2325-36.

\* Foster G, Osterman B S, Godfroid J, Jacques I and Cloeckaeer A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts .International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007;57:2688–2693.

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos pequeños (0.5-0.7µm X 0.6-1.5µm), Gram negativos, inmóviles, desprovistos de cápsula, espora y flagelos. Sin embargo estudios realizados en el genoma demuestran que este género posee la información genética para expresar un flagelo y se ha establecido la hipótesis de que su represión se debe a la actual adaptación de huésped (14).

La membrana externa de estos microorganismos está compuesta de fosfolípidos, proteínas y el lipopolisacárido (LPS). Con base en el tipo de LPS que expresan las diferentes especies del género *Brucella* se pueden clasificar en cepas lisas y rugosas, cabe mencionar que existen reportes donde se encuentran mutantes que pueden pasar de una clasificación a otra. Estas estructuras forman parte de una barrera de permeabilidad selectiva, que regula el paso de nutrimentos y otros solutos para el metabolismo de la bacteria. Así mismo las proteínas de membrana externa (PME) y el LPS constituyen estructuras altamente inmunogénicas (15).

Las PME han sido identificadas y clasificadas, de acuerdo a su peso molecular en grupos. En el grupo 1 se encuentran proteínas de 88-94 kDa, en el grupo 2 de 31-34 a 36-38 kDa y en el grupo 3 de 25-27 kDa. Las PME del grupo 2 han sido identificadas como porinas y se ha descrito que en *B. abortus* cepa S19, *B. canis* y *B. abortus* 1119-3 forman poros relativamente mas amplios que los de *B. melitensis* 115 y *B. abortus* 45-20. Esta diferencia en el diámetro de los poros podría explicar la diferente sensibilidad a los colorantes como la tionina y fucsina mostrada en las pruebas de clasificación de especie del género *Brucella* (15), considerando además que las proteínas de 31 a 34 kDa son más abundantes en *B. melitensis* que en *B. abortus* (17, 18,19).

El genoma de los organismos comprendidos del género *Brucella* tiene un tamaño de aproximadamente  $2.37 \times 10^6$  pb y los porcentajes de guanina citosina (G:C) son del 57 al 59%. Estudios de homología del ADN han mostrado que este género es altamente homogéneo, por lo que se ha sugerido que *B. melitensis* sea la única especie y el resto sean considerados biotipos. La secuencia completa genoma de *Brucella melitensis* fue completada en el año 2002, junto con la de *B. abortus* y *B. suis*. Para la primera especie se encontró que posee dos cromosomas independientes con un tamaño 1.1 y 2.2 Mpb con 57% de G:C y no se detectaron plásmidos. El análisis del genoma mostró que existen 3197 marcos abiertos de lectura (ORFs), contenidos en ambos cromosomas, 2060 en el cromosoma I y 1138 en el II, de los cuales a 2487 se les ha asociado ya una función (20, 21,22). El estudio de la secuencia del genoma ha permitido confirmar la relación que tiene este microorganismo con otros pertenecientes a las proteobacterias como lo es *Agrobacterium tumefaciens* (23).

Las diversas manifestaciones clínicas en los individuos infectados por *Brucella spp*, ya sean humanos o animales, están relacionadas con la replicación y el aumento en el número de microorganismos en el hospedero. Este incremento en el número de microorganismos, se debe a la habilidad de este patógeno para evadir los mecanismos de defensa y proliferar dentro de los macrófagos. Como es bien sabido la infección por microorganismos del género *Brucella* se puede dar por la ingestión, la inhalación, la exposición conjuntival, soluciones de continuidad en la piel y a través de la vía congénita. Por cualquiera de estas vías, la bacteria penetra las mucosas y es fagocitada por neutrófilos y macrófagos (24,25).

En trabajos donde se describe la sobrevivencia de microorganismos del género *Brucella* dentro de los macrófagos en los cuales la bacteria puede infectar, persistir y replicarse por periodos muy prolongados dentro del hospedero; se hace notar que la diseminación a otros tejidos es muy frecuente. La internación de *Brucella spp* está determinada por microdominios en la superficie celular, conocidos como "lipid rafts", los cuales son cúmulos de glicosilfosfatidilinositol con proteínas ancladas, glicosfingolípidos y colesterol. Estos microdominios no solo juegan un papel importante en la internación de la bacteria, sino también en la replicación intracelular (25).

En las células fagocíticas *Brucella spp* puede multiplicarse estableciéndose una bacteremia transitoria. Posteriormente es transportada a los linfonódulos regionales, donde continúa replicándose y alcanza una distribución más amplia a través de la linfa (26, 27). Durante esta fase bacterémica *Brucella spp* puede llegar a la glándula mamaria, en la cual continua replicándose, ocasionando que el microorganismo sea excretado a través de la leche en grandes cantidades (28).

Dentro de los macrófagos, *Brucella spp* se localiza en vacuolas características, donde está sometida a condiciones de estrés, que incluyen reducción en el pH, privación nutricional, exposición a radicales del oxígeno e intermediarios del nitrógeno (27). Si el patógeno se mantiene por un periodo prolongado bajo estas condiciones, se activa una gran variedad de genes, que le permiten adaptarse al ambiente intracelular. Por lo que se sugiere que una bacteria en un ambiente intracelular experimenta una modificación en la expresión de proteínas en su superficie (29), inducida por las condiciones de estrés (30).

Dentro del Brucelosoma como se le ha llamado al nicho de replicación, *Brucella spp* puede sobrevivir y replicarse, inhibiendo la unión fagolisosomal y promoviendo la rápida

acidificación del medio. En estos compartimientos la bacteria puede permanecer durante periodos prolongados en las células hospedero generando una infección crónica (31).

Los signos clínicos clásicos de la brucelosis son aborto después del quinto mes de gestación, retención placentaria, metritis, placentitis e infertilidad temporal. En el caso de los animales domésticos, es la infección placentaria la que origina el aborto. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual se produce el aborto es que la endotoxina de *Brucella spp* promueve la producción de cortisol fetal, esto deprime la cantidad de progesterona e incrementa la síntesis de estrógenos por la placenta. Esta respuesta hormonal se encuentra asociada con el incremento en la producción de prostaglandina 2 alfa por el endometrio, resultando en la falta de irrigación y causante de la expulsión prematura del feto y la placenta (32).

En machos, los órganos reproductivos infectados son las vesículas seminales, el epidídimo y los testículos, por lo cual se produce orquitis y epididimitis. En este caso, el número de microorganismos excretados en el semen varía, llegándose a observar entre 100 a 50,000 bacterias por mililitro. Las concentraciones de microorganismos más altas se presentan durante la fase aguda de la enfermedad; después la excreción puede reducirse e incluso no eliminarse (33,34,35,36,37,38).

Otras lesiones en casos crónicos pueden ser higromas, pequeños granulomas y abscesos. Existe variación en la aparición y grado de los signos después de la exposición, debidos a factores como la respuesta vacunal, la edad, estado gestacional, dosis de exposición y la virulencia de la bacteria (33, 36, 37, 38).

Los métodos diagnósticos para la brucelosis son los mismos que para cualquier

enfermedad infecciosa, por lo tanto el aislamiento del microorganismo es la prueba contundente, sin embargo esto no resulta muy fácil. Las pruebas serológicas como la aglutinación son sencillas y rápidas de realizar, las cuales detectan anticuerpos en contra del LPS de las cepas lisas. Uno de los inconvenientes del diagnóstico por estas pruebas son los resultados falsos positivos, generados por la similitud del antígeno O del LPS de *Brucella spp*, con el de otros microorganismos, en particular con *Yersinia enterocolitica* 0:9 (39,40). Otra complicación en el diagnóstico se debe a la utilización de vacunas con cepas lisas, como es el caso de la cepa vacunal S19 para bovinos y Rev 1 para pequeños rumiantes (41).

Para el diagnóstico de la brucelosis se han implementado pruebas más sensibles como ELISA (42,43). En esta prueba se han empleado distintos antígenos, con resultados variables. A la fecha se continúa estudiando antígenos alternativos potencialmente útiles en el diagnóstico serológico (44). Actualmente la técnica de fluorescencia polarizada (FPA) ofrece una valiosa alternativa dentro del grupo de ensayos serológicos convencionales. En este ensayo se mide la cantidad de fluorescencia en una partícula en solución la cual está en rotación. La velocidad de rotación se incrementa conforme el tamaño de la partícula también se incrementa. Esta prueba se puede adaptar a la detección de otros anticuerpos y antígenos con el consecuente cambio de velocidad de rotación, por otra parte para esta técnica se deben utilizar antígenos muy pequeños (20 kDa), por lo que pueden ser utilizados péptidos sintetizados a partir de secuencias de proteínas altamente inmunogénicas (45).

En lo que concierne al diagnóstico de brucelosis producida por cepas rugosas de *Brucella*, como son *B. ovis* y *B. canis*, así como la evaluación de la respuesta inducida por la vacuna RB51, se han desarrollado ensayos de aglutinación, ELISA y FPA, con extractos

de LPS obtenidos a partir de cepas rugosas (46,47).

Los inmunoensayos en los cuales se evalúa la respuesta celular, han sido usados también en el diagnóstico de la enfermedad. Uno de estos ensayos es la prueba de hipersensibilidad tardía (tipo IV), en el cual se realizan inoculaciones intradérmicas de antígeno proteico de *Brucella spp*, la cual se manifiesta como una prominencia en el sitio de inoculación. Esta prueba ofrece ventajas debido a su especificidad (48,49).

Ensayos diagnósticos basados en producción de interferón- $\gamma$  por las células de los animales sospechosos al ser estimuladas por antígenos específicos, muestran ventajas sobre las pruebas serológicas, en estudios recientes se ha demostrado que tienen una mayor especificidad en el diagnóstico de la brucelosis en porcinos (5, 50).

Finalmente, con respecto a los ensayos moleculares los cuales han sido mas promisorios para la detección de antígenos que para la detección de anticuerpos, se piensa que podrían tener desventajas debido a que la cantidad de microorganismos en sangre puede ser baja, el mayor número se presenta en la fase aguda de la enfermedad. La controversia gira alrededor de si el suero o la sangre son las muestras adecuadas para ensayos de amplificación (51,52). La amplificación de varios genes blanco, se ha logrado a partir de muestras de leche, sangre, tejidos y semen (5).

En el estudio de la virulencia de *Brucella spp* se han realizado varios trabajos para conocer la expresión de proteínas bajo distintas condiciones de estrés, específicamente aquellas condiciones que se encuentran dentro del hospedero, ya que se considera que dichas proteínas pudieran ser factores de virulencia.

En el caso de microorganismos del género *Brucella*, existen algunos ejemplos de este tipo de proteínas, por ejemplo, se encuentran las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, las cuales déstoxifican compuestos de hidrógeno. La expresión de estas enzimas es controlada por reguladores que detectan las concentraciones intracelulares de este compuesto (53,54). Otros factores de virulencia descritos comprenden proteínas de la membrana externa (Omps), tales como Omp25, la cual inhibe la secreción de TNF  $\alpha$  en macrófagos humanos (56).

Algunas PME son expresadas por cambios ambientales, lo que da como resultado variaciones en el fenotipo celular (57). Por lo tanto, las PME de una bacteria que se adapta y multiplica *in vivo* van a diferir de las PME de una bacteria cultivada en un medio estándar en condiciones de laboratorio. En un estudio proteómico de *B. melitensis* 16M conducido a la expresión de proteínas en medio de cultivo de laboratorio, se detectaron 883 proteínas de las cuales 440 se pueden asociar con rutas bioquímicas de respuesta a condiciones de estrés, especificidad de hospedero, patogenicidad y virulencia, se desconoce la función del resto (58).

En estudios realizados con *Campylobacter jejuni*, se ha demostrado que hay PME que se expresan sólo durante el desarrollo del microorganismo *in vivo* en íleon de conejo y estas mismas proteínas estimulan una respuesta inmune importante en humanos (56).

La atmósfera del cultivo también influye en la expresión de PME. Por ejemplo, se ha reportado que *ompC* de *E. coli* reprime su expresión cuando es cultivada en un medio de baja osmolaridad y en aereación constante, en cambio aumenta su expresión cuando la bacteria es cultivada en anaerobiosis. En contraste, *ompF* no es afectada por los cambios de oxigenación (58), sin embargo, agentes tóxicos como el etanol, ácidos débiles,

antibióticos y condiciones ambientales de estrés oxidativo, disminuyen su expresión y aumentan la síntesis de *micF* de *E. coli* (60).

Así mismo al someter a la bacteria a los distintos componentes del suero se induce la liberación de ciertas moléculas, esto ha sido demostrado a través de modelos experimentales de sepsis, en los cuales se cultivo *Salmonella enterica* serovariedad *Abortus equi* en presencia de suero humano, en los cuales se han detectado en el sobrenadante, fragmentos de membrana que contienen LPS, OmpA, y una proteína de 17 kDa (60). Así mismo complejos que contienen LPS y tres PME (35, 18 y 5-9 kDa) han sido detectados en un modelo experimental de sepsis en ratones, utilizando *E.coli* J5.

De igual forma se ha realizado este tipo de ensayos con *S. gallinarum*, la cual fue cultivada en caldo nutritivo, caldo nutritivo con suero de aves libres de patógenos específicos (SPF) y caldo nutritivo con suero calentado previamente a 56°C, de los cuales se extrajeron las PME de las bacterias cultivadas en estos medios, donde se puede observar que hay una disminución importante de una proteína de 30 kDa en las bacterias cultivadas en caldo nutritivo con suero de animales SPF, la cual fue detectada por inmunotransferencia tipo *Western blot* del precipitado del sobrenadante de este medio (62).

Los componentes bacterianos liberados al torrente sanguíneo son de gran importancia en la patogénesis de la sepsis por Gram negativos ya que son parte de la adaptación del microorganismo al medio para su sobrevivencia o replicación (63,61). Los datos antes mencionados permiten concluir que en los procesos de sepsis, la expresión de PME debe de cambiar para la adaptación del patógeno a las condiciones dentro del hospedero.

Finalmente Gamazo y colaboradores han realizado ensayos de detección de elementos pertenecientes a *B. ovis* y *B. melitensis*, los cuales han sido liberados al medio de cultivo.

Específicamente el caso de los "Blebs", los cuales son fragmentos de membrana formados de lipopolisacarido y proteínas de membrana externa (OMPs), que han sido recuperados de los sobrenadantes a través de la técnica de "Hot Saline", las proteínas de estos extractos se presume son pertenecientes al grupo 3 de OMPs y que son altamente inmunogénicas. De igual manera se conoce de la liberación de de fragmentos de membrana que se liberan durante el crecimiento exponencial de *Bucella melitensis* (64,65).

### **3.0 HIPÓTESIS.**

La presencia del suero en el medio induce la liberación de proteínas de *Brucella melitensis*, que pueden ser identificadas en el sobrenadante del medio de cultivo.

### **4.0 OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar parcialmente las proteínas de *Brucella melitensis* liberadas al medio de cultivo adicionado con suero.

### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Purificar proteínas a partir del medio de cultivo donde se cultivó *Brucella melitensis*.
2. Caracterizar las proteínas obtenidas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
3. Identificar la inmunoreactividad de las proteínas con la técnica de inmunotransferencia tipo *Western blot* (WB), con sueros procedentes de caprinos positivos a Brucelosis por aislamiento y negativos.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

**5.1 Condiciones de cultivo y cepas.** Se utilizó una cepa de *Brucella melitensis* biotipo 1 (cepa de referencia mexicana 133), la cual fue cultivada en agar tripticasa soya (TSA<sup>1</sup>), a 37 °C por 72 h. Previo a su empleo, esta cepa fue caracterizada a través de pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos del género *Brucella*. (Triple azúcar hierro (TSI), citrato, urea, ácido sulfídrico-indol-motilada (SIM), y producción de ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en tubos de TSA con tiras de papel impregnado de acetato de plomo).

**5.2 Ensayos de liberación de proteínas.** A partir del cultivo de *B. melitensis* en agar TSA, se colectaron diez colonias y se inocularon en un matraz con 100 ml de caldo Brucella<sup>2</sup>. Este matraz fue incubado a 37 °C por un periodo de 24 h en agitación. Transcurrido este tiempo, el crecimiento, expresado como número de microorganismos viables fue obtenido a través del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Posteriormente, diez tubos con medio de cultivo celular RPMI<sup>3</sup>, adicionado con suero fetal bovino (SFB) sin calentar<sup>4</sup> a concentraciones crecientes comenzando con 0% hasta llegar al 90% en incrementos de 10% fueron inoculados con 100 µl del cultivo de *Brucella* realizado en el matraz. A partir de 1, 12 y 24 h, de todos los tubos se colectaron alícuotas de 3 ml y se obtuvo el número de UFC.

**5.3 Obtención del número de microorganismos viables.** Para el cálculo de UFC, en el medio, se colectaron 100 µl del medio RPMI o caldo Brucella según el ensayo y se realizaron diluciones décuples seriadas en caldo Brucella hasta obtener una dilución 10<sup>-6</sup>. A partir de esta dilución se sembró una caja de TSA con 50 µl mediante la técnica de

---

<sup>1</sup> BIOXON

<sup>2</sup> BBL

<sup>3</sup> GIBCO

<sup>4</sup> SIGMA

estría cerrada, posteriormente, las cajas se incubaron a 37° C durante 72 h. El número de UFC se obtuvo de manera manual.

**5.4 Recuperación de proteínas en el sobrenadante.** Para la obtención de las proteínas en el sobrenadante, se tomaron a la 1, 12 y 24 h, alícuotas de 3 ml de cada uno de los tubos con medio RPMI adicionado con suero e inoculados con *B. melitensis*. Cada muestra fue centrifugada a 5,000 x g, después el sobrenadante fue filtrado en membranas<sup>5</sup> de 0.45 µm. De estos filtrados se precipitaron las de proteínas por la técnica de metanol<sup>6</sup>-cloroformo<sup>7</sup>, para lo cual, a una muestra de 400 µl, se le adicionaron 400 µl de metanol y 100 µl de cloroformo, mezclando todo por inversión. Después, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min, el sobrenadante fue retirado teniendo cuidado de conservar la interfase, en la cual se encuentran contenidas las proteínas, finalmente se adicionaron 300 µl de metanol y se centrifugó a 12,000 x g por 5 min. El metanol fue retirado, conservando la pastilla, los residuos de metanol se eliminaron con un equipo de centrifugación con vacío. La pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua desionizada y conservada a -70 °C hasta su uso. Este mismo procedimiento fue utilizado con muestras de medio de cultivo celular RPMI, caldo Brucella, suero fetal bovino (SFB) y una solución de albúmina sérica bovina<sup>8</sup> utilizadas como controles en los ensayos de liberación de proteínas.

**5.5 Geles de poliacrilamida con SDS-PAGE.** Las proteínas obtenidas a partir de los sobrenadantes de los distintos medios inoculados fueron analizadas en geles de

---

<sup>5</sup> MILLIPORE

<sup>6</sup> BAKER

<sup>7</sup> BAKER

<sup>8</sup> SIGMA

poliacrilamida<sup>9</sup> al 12% con SDS<sup>10</sup> en 0.375 M Tris<sup>11</sup>, pH 8.8 (separador) y geles al 4% 0.125 M Tris, pH 6.8 (concentrador). La electroforesis se realizó en una cámara Miniprotean II (BIO-RAD®) con una corriente de 70v durante 3h. Previo a su separación por electroforesis, las proteínas contenidas en las pastillas fueron desnaturalizadas parcialmente. Para lo cual primero fueron mezcladas en una proporción de 1:5 con buffer de muestra (25 mM Tris, pH 6.8, 10% SDS, 1 % 2β-mercapto-etanol<sup>12</sup>, 15 % glicerol<sup>13</sup>, 0.005% azul de bromofenol<sup>14</sup>) y después calentadas a 100 °C durante 5 min (66). Las proteínas en los geles fueron teñidas con azul de Coomasie<sup>15</sup> y con nitrato de plata<sup>16</sup> (67, 68).

**5.6 Tinción de proteínas con azul de Coomasie.** Al término de la electroforesis los geles fueron transferidos a un contenedor de plástico con tapa y se les añadió solución teñidora de Coomasie (45.5% metanol, 10% ácido acético<sup>17</sup> y 0.05% azul de Coomasie R 250) en volumen suficiente hasta cubrir el gel. El gel con la solución fue incubado durante toda la noche en agitación constante a 50 rpm. Al día siguiente el gel fue lavado con la solución desteñidora (54.5% de H2O destilada, 36.4% de etanol y 9.1% de ácido acético) hasta que las bandas de proteína fueran evidentes (66). Finalmente, el gel fue fijado y documentado mediante fotografía en un equipo digitalizador (Biorad, Fluor S).

**5.7 Tinción de proteínas con nitrato de plata.** Transcurrida la electroforesis, los geles fueron fijados en solución I (10% isopropanol<sup>18</sup>, 10% ácido acético) en contenedores de

---

<sup>9</sup> SIGMA

<sup>10</sup> SIGMA

<sup>11</sup> US RESEARCH

<sup>12</sup> SIGMA

<sup>13</sup> SIGMA

<sup>14</sup> ALDRICH

<sup>15</sup> GIBCO

<sup>16</sup> SIGMA

<sup>17</sup> FERMONT

<sup>18</sup> SIGMA

plástico con tapa durante 20 min en agitación constante (50 rpm), al terminar se cambió a una solución II (isopropanol al 10%), en la cual permaneció durante 20 min en agitación constante (50 rpm). Posteriormente se cambió a una solución III (glutaraldehído 3.75%), esta solución fue preparada en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) sin cloruros, con un pH 7.4, el gel se mantuvo en agitación constante (50 rpm) en esta solución por 60 min. Posteriormente se retiró la solución de glutaraldehído y se realizaron 5 lavados con agua de 15 min en agitación constante. La solución teñidora (0.36% NaOH<sup>19</sup>, 0.30% NH<sub>4</sub>OH<sup>20</sup> y 10% AgNO<sub>3</sub>) se preparó en oscuridad, se vertió en el contenedor de plástico con el gel y se mantuvo en oscuridad con agitación constante durante 30 min; al retirar la solución de plata, la reacción fue revelada con una solución de ácido cítrico<sup>21</sup> (0.005%) y formaldehído<sup>22</sup> (37%). La reacción fue detenida con ácido acético (10%) (68). El gel fue documentado mediante fotografía.

**5.8 Inmunotransferencia tipo *Western Blot*.** Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS al 12% mediante electroforesis. Posteriormente, las proteínas contenidas en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa<sup>23</sup>. La transferencia se realizó en una cámara de electrotransferencia Mini trans-blot<sup>24</sup>, el buffer de transferencia fue el recomendado por el fabricante (25mM trizma<sup>25</sup>, 192mM glicina<sup>26</sup> y 20% de metanol), Las condiciones empleadas fueron una corriente de 100V, durante 1:30 h. Con el fin de corroborar la eficiencia del proceso de transferencia, las membranas

---

<sup>19</sup> MERCK

<sup>20</sup> JT BAKER

<sup>21</sup> JT BAKER

<sup>22</sup> SIGMA

<sup>23</sup> HYBOND

<sup>24</sup> BIO-RAD

<sup>25</sup> SIGMA

<sup>26</sup> SIGMA

fueron teñidas con rojo de Ponceau<sup>27</sup>. Brevemente, el colorante se aplicó a las membranas, durante 2 min y luego se decoloraron con agua bidestilada, hasta observar las proteínas. La tinción fue eliminada al colocar las membranas con agua en abundancia y manteniéndolas en agitación. Una vez desteñidas las membranas fueron bloqueadas incubándolas en leche descremada al 3%<sup>28</sup> durante 12 h en agitación. Al término de este tiempo, el exceso de leche fue retirado mediante lavados con una solución de TBS-T (100mM Tris-HCl<sup>29</sup> pH 7.5, 0.9% NaCl y 0.05% de Tween 20<sup>30</sup>) y TBS (100mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl). Las membranas bloqueadas fueron enfrentadas a sueros de cabra positivos por aislamiento y negativos al aislamiento de *Brucella spp.* Ambos grupos de sueros se utilizaron en una dilución de 1:1,500 en una solución de TBS-T con 1% de leche descremada, las membranas se incubaron con estos sueros durante 24 h en agitación, posteriormente, se realizaron lavados con TBS-T y TBS.

Después de la incubación con los sueros de cabra, la membrana fue enfrentada con un conjugado (anti IgG caprina unida a peroxidasa<sup>31</sup>) en una dilución 1:3,000 en una solución de TBS durante 1h en agitación, después fue lavada con TBS-T y TBS. Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo fue revelada empleando una solución sustrato-cromógeno (20 ml de metanol, 60mg 4-cloro-naphtol<sup>32</sup>, 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>33</sup> al 30%) y 100 ml de TBS. La reacción se detuvo con agua fría, la membrana se documentó mediante fotografía, conservada en oscuridad y refrigeración (69).

---

<sup>27</sup> SIGMA

<sup>28</sup> NESTLE

<sup>29</sup> J.T. BACKER

<sup>30</sup> ALDRICH

<sup>31</sup> DAKO

<sup>32</sup> SIGMA

<sup>33</sup> JT BAKER

## 6.0 RESULTADOS

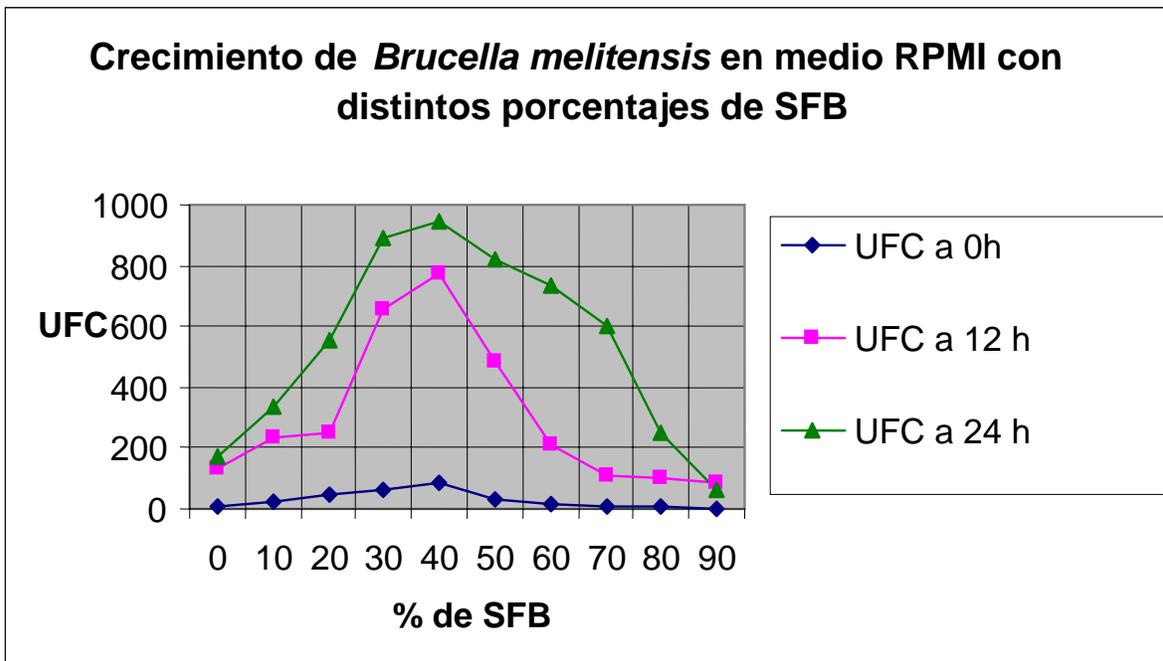
**6.1 Cinética de desarrollo en medios con cantidades crecientes de suero.** Con el fin de conocer la influencia del suero en el desarrollo de *B. melitensis*, se realizaron cinéticas en tubos con medio RPMI con cantidades crecientes de suero (0 al 90%). A 1, 12 y 24 h se colectaron alícuotas de los cultivos y se sembraron en agar TSA para obtener las UFC.

El cultivo con medio RPMI sin SFB (cultivo 1), mostró un incremento en el número UFC a las 24 h, comparado con la lectura a las 12 h (cuadro 1). De igual forma en el medio RPMI con 40% de SFB (cultivo 5), se observó un notable incremento en las UFC. Por el contrario, en el medio RPMI con 90% de SFB (cultivo 10) el número de UFC disminuyó de forma significativa a las 24 h. Por otra parte, si se compara el crecimiento observado en el medio sin SFB con el adicionado con 40% SFB, se aprecia que en el segundo el número de UFC fue casi cinco veces mayor. Sin embargo, en el medio con 90% SFB, el número de UFC fue menor comparado con el medio sin SFB, este fenómeno se observó nuevamente a las 24 h. Un aspecto importante en la cinética con el medio RPMI con distintas cantidades de suero, fue que el desarrollo de la bacteria fue menor en medios que contenían 0 al 20% de suero y también 60 al 90%; comparado con los medios adicionados con 30 al 50% donde el desarrollo fue mayor (Figura 1).

## Crecimiento de *Brucella melitensis* en medio RPMI con distintos porcentajes de SFB

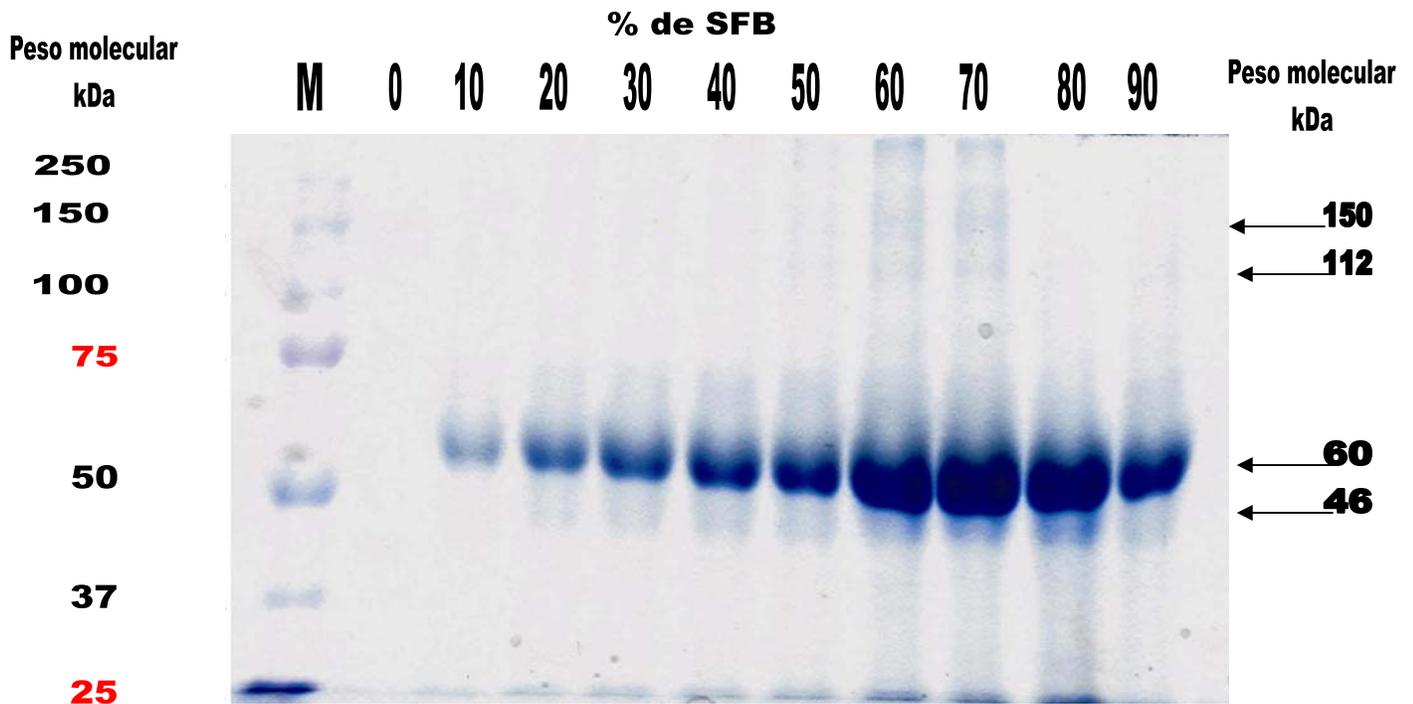
Número de UFC obtenido por hora				
# de tubo	% de SFB	1	12	24
1	0	4	133	168
2	10	20	231	336
3	20	47	247	552
4	30	62	656	892
5	40	87	771	943
6	50	28	486	823
7	60	17	211	732
8	70	8	113	599
9	80	7	101	253
10	90	2	83	62

**Cuadro 1.** Número de UFC obtenido en cada uno de los cultivos con medio RPMI adicionados con diferentes porcentajes de SFB e inoculados con *Brucella melitensis* en tres distintas lecturas (1, 12 y 24 h).

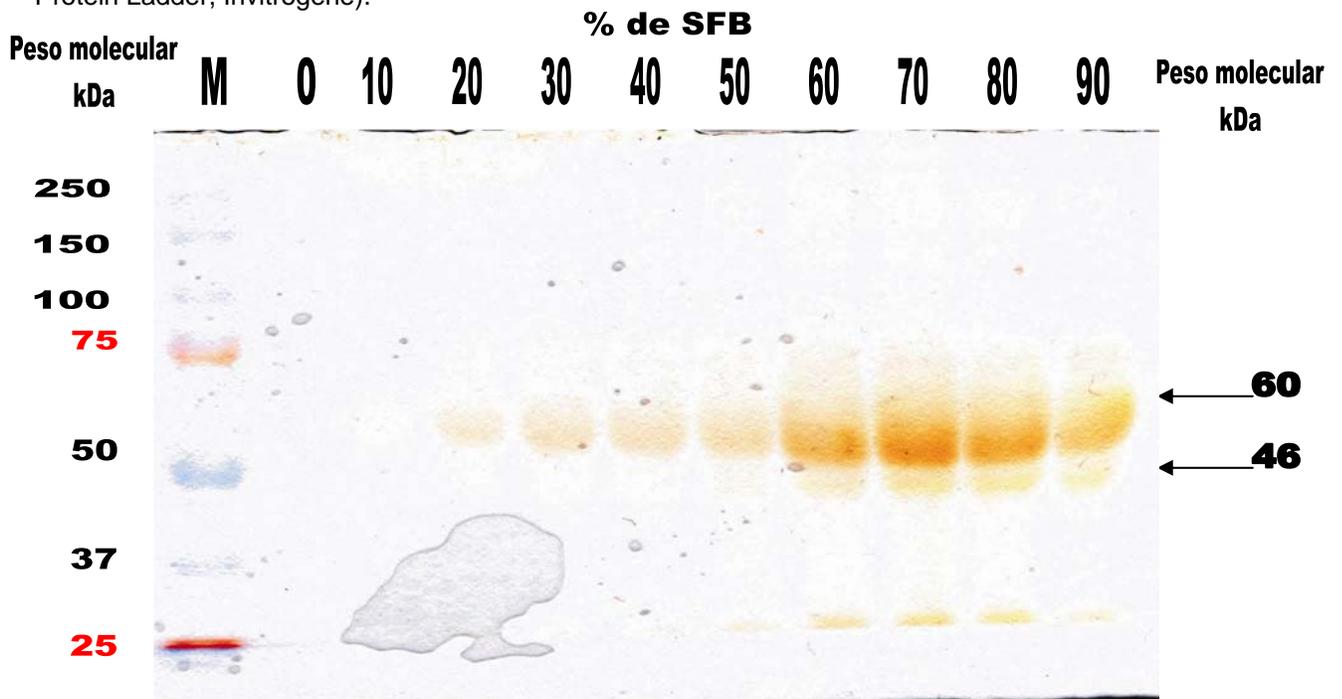


**Figura 1.** Número de UFC obtenido en cada uno de los cultivos con medio RPMI adicionados con diferentes porcentajes de SFB e inoculados con *Brucella melitensis* en tres distintas lecturas (1, 12 y 24 h).

**6.2 Detección de las proteínas en el sobrenadante.** Después de precipitar las proteínas del sobrenadante del medio, se visualizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Los resultados obtenidos mostraron que en el medio RPMI sin SFB no se observó banda alguna, a pesar de haber obtenido una pastilla en la precipitación con el método de metanol-cloroformo (Figura 2, carril 1). Mientras para el resto de los cultivos con medio, los cuales tenían diferentes porcentajes de SFB (0 a 90%), se pudo observar una banda con un peso aproximado de 60 kDa (Figura 2 carriles 2 al 10). Solo en los tubos con medio RPMI con 60 y 70% de suero inoculados con *B. melitensis*, se pudieron observar bandas de un peso aproximado de 112 y 150 kDa (Figura 2, carriles 7 y 8). De igual forma, solo en los medios RPMI con 20 al 90 % de SFB inoculados con *B. melitensis* se observó una banda de un peso molecular aproximado de 46 Kda (Figura 2, carriles 3 al 10). Con el fin de visualizar todas las proteínas contenidas en el sobrenadante de los medios, un gel con las mismas muestras de proteínas mostradas en la figura 2, se tiñó con nitrato de plata. Al igual que con la tinción de Coomasie, se detectó una banda con un peso aproximado de 60 kDa, en los medios que contenían 20 al 90 % de SFB (Figura 3, carriles 3 al 10). También se lograron observar las bandas de peso molecular aproximado de 46 kDa, en los medios que contenían 60 al 90% de SFB (Figura 3, carriles 7 al 10).



**FIGURA 2.** Foto de un gel de poliacrilamida SDS teñido con azul de Coomasie en el cual se muestran las proteínas obtenidas de los sobrenadantes del medio RPMI con cantidades crecientes de suero (0 al 90%), inoculados con *B. melitensis*. En el carril 1, 0% de SFB, carril 2 al 10, 10 al 90% SFB respectivamente. Carril M, marcador de peso molecular (Benchmark, Pre stained Protein Ladder, Invitrogene).

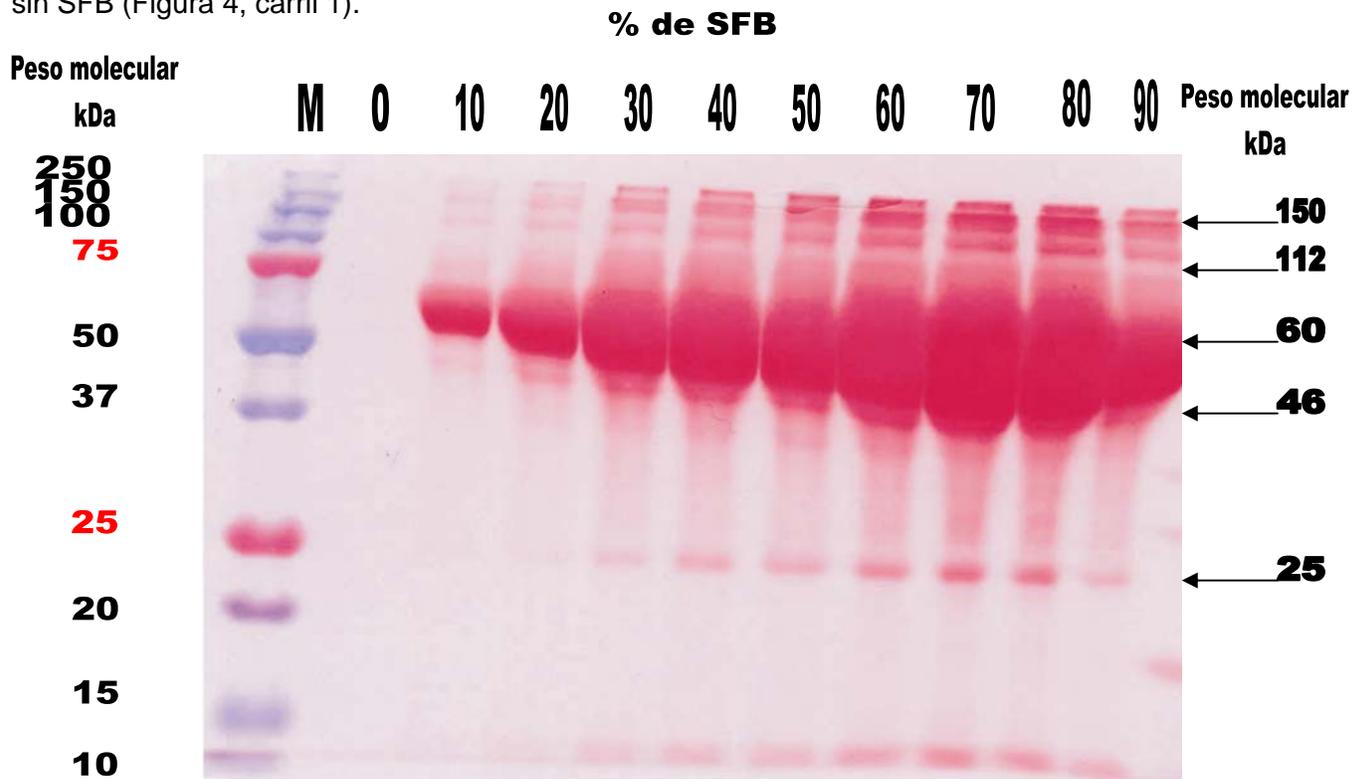


**FIGURA 3.** Foto de un gel de poliacrilamida SDS teñido con nitrato de plata, en el cual se muestran las proteínas obtenidas de los sobrenadantes del medio RPMI con cantidades crecientes de suero

(0 al 90%), inoculados con *B. melitensis*. En el carril 1, 0% de SFB, carril 2 al 10, 10 al 90% SFB respectivamente. Carril M, marcador de peso molecular (Benchmark, Pre stained Protein Ladder, Invitrogene).

### 6.3 Análisis de las proteínas en el sobrenadante por la técnica de

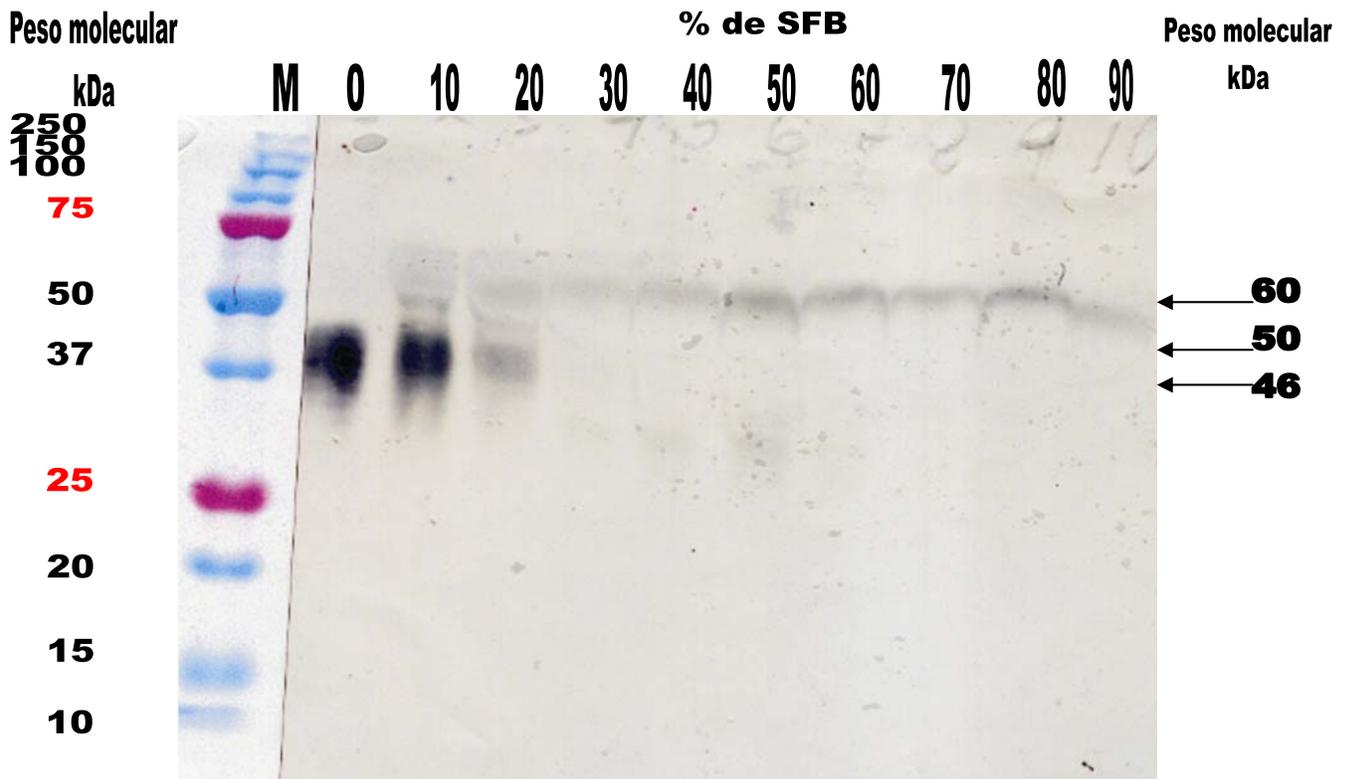
**inmuntransferencia tipo *Western blot*.** Una vez visualizadas las proteínas en geles de poliacrilamida SDS, se procedió a realizar los ensayos tipo *Western* con 10 sueros de cabra, positivos a *B. melitensis* por aislamiento bacteriológico y 10 sueros negativos de cabra, procedentes de un hato libre de brucelosis. Las proteínas fueron transferidas y teñidas con rojo de Ponceau, para corroborar la transferencia. En la membrana se tiñó una banda de un peso molecular aproximado 46 kDa en los medios con 10 al 90% de SFB (Figura 4, carriles 2 al 10) De igual forma se observaron bandas con un peso aproximado de 112 y 150 kDa (Figura 4, carriles 2 al 10) y sola una banda de 25 kDa en los medios con 30 al 90% SFB (Figura 4, carriles 4 al 10), así como una banda de peso aproximado de 60 kDa (Figura 4, carriles 2 al 10). No se observaron bandas en el medio sin SFB (Figura 4, carril 1).



**FIGURA 4.** Foto de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, en la cual se observan las proteínas transferidas Carriles 1 al 10, proteínas obtenidas de los sobrenadantes del

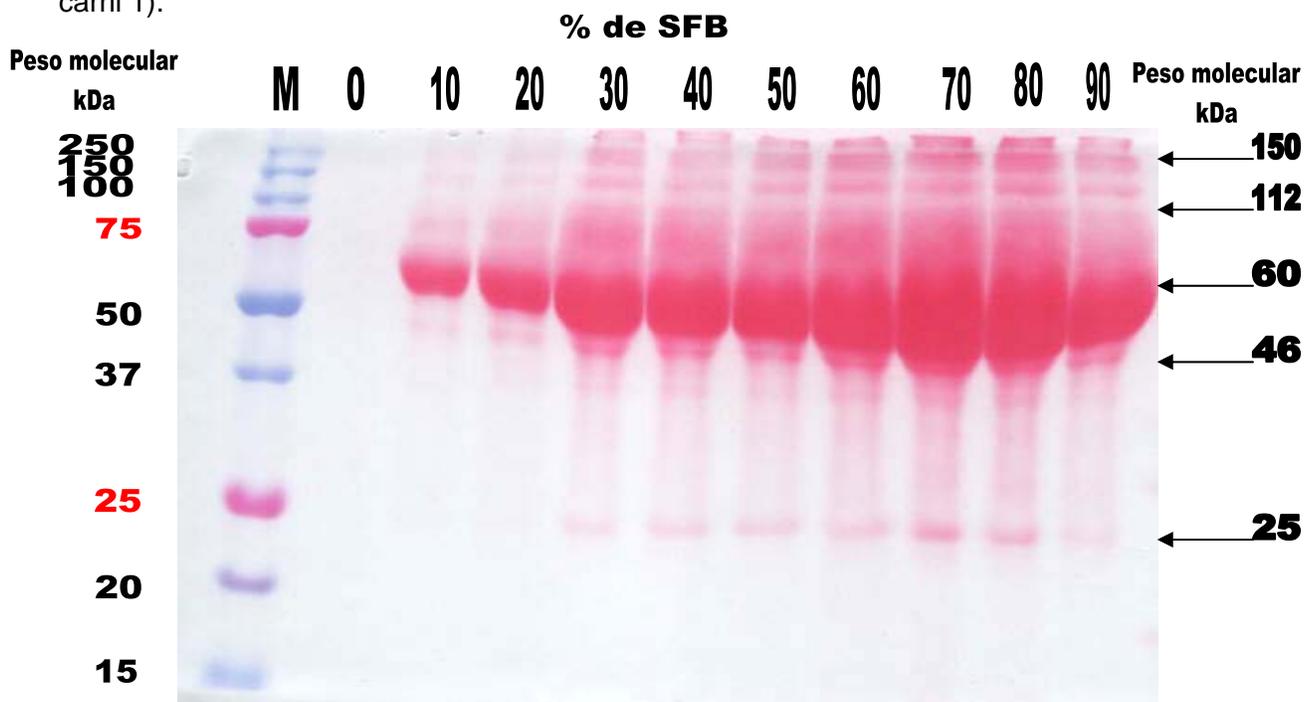
medio RPMI con cantidades crecientes de suero (0 al 90% respectivamente), inoculados con *B. melitensis*. Carril M, marcador de peso molecular (Precision Plus, Protein standards, Prestained, Bio-Rad).

Al retirar la tinción de rojo de Ponceau de esta membrana con las proteínas de los sobrenadantes del medio RPMI con SFB en cantidades crecientes (0 al 90%) inoculados con *Brucella melitensis*, la membrana fue enfrentada con sueros de cabra positivos a *Brucella spp* por aislamiento. Se detectaron bandas correspondientes a proteínas con inmunoreactividad a los sueros de cabra positivos a *Brucella spp* (figura 5, carriles 1 al 10). En los medios con 0, 10 y 20% de SFB se pudo observar una banda con un peso aproximado de 46 kDa (figura 5, carriles 1 al 3), de igual forma se observa una banda con un peso aproximado de 50 kDa en los medios con 10 y 20% de SFB, respectivamente (figura 5, carriles 2 y 3), así como una banda de un peso aproximado de 60 kDa en los medios con 10 al 90% SFB (Figura 5, carriles 2 al 10).



**FIGURA 5.** Foto de una membrana de nitrocelulosa a la le fueron transferidas proteínas de los sobrenadantes del medio RPMI con cantidades crecientes de suero (Carriles 1 al 10 con 0 al 90% de SFB respectivamente), inoculados con *B. melitensis* enfrentadas a sueros de cabra positivos a *Brucella spp*, en la cual se muestra las proteínas con inmunoreactividad a dichos sueros. Carril M marcador de peso molecular (Precision Plus, Protein standards, Prestained, Bio-Rad).

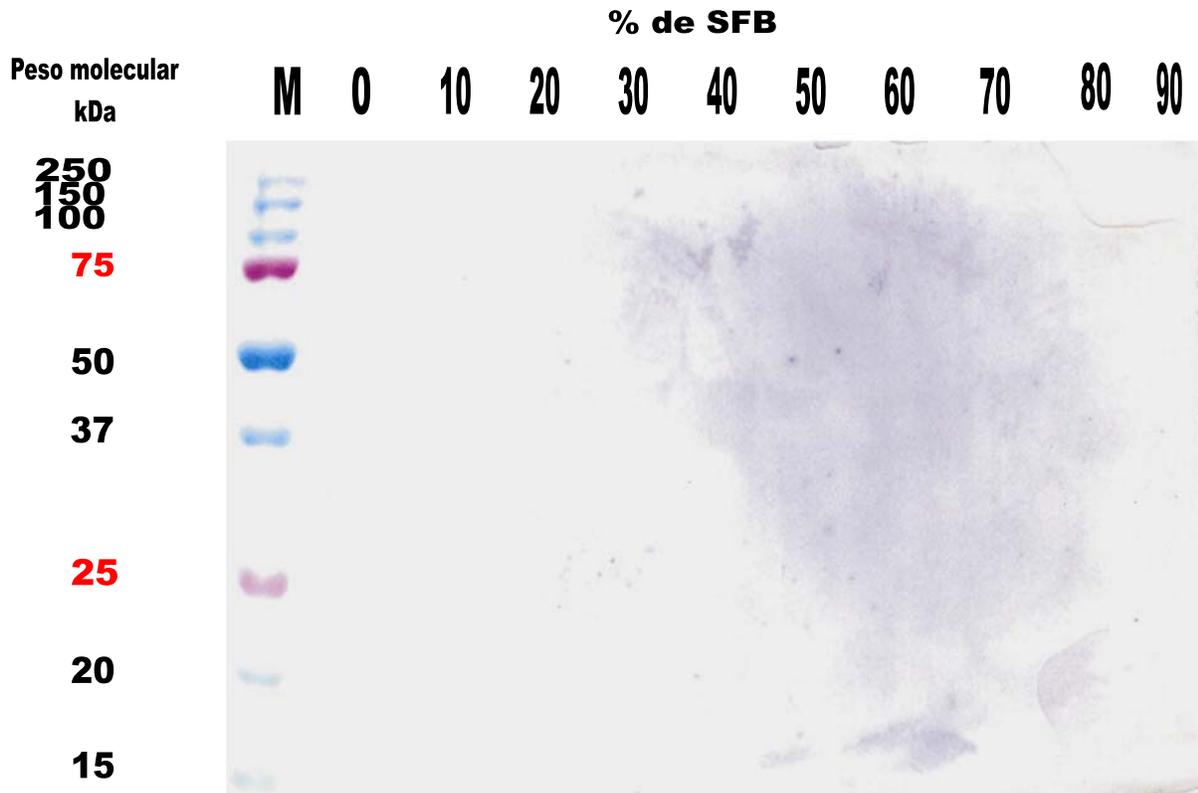
Por otra parte una membrana con las mismas proteínas obtenidas a partir de los sobrenadantes de medio con SFB en cantidades crecientes (0 al 90%), inoculados con *B. melitensis*, las cuales habían sido previamente reconocidas por los sueros positivos, fueron enfrentadas a una mezcla de sueros negativos a *Brucella spp* de cabras provenientes de un hato libre, en un ensayo de tipo *Western blot*. Antes de enfrentarla a los sueros fue teñida con rojo de Ponceu, con el fin de corroborar la transferencia adecuada de las proteínas. Con esta tinción la membrana mostró una banda de 46 kDa en los medios con 10 al 90% de SFB (Figura 6, carriles 2 al 10). De igual forma se observaron bandas con pesos superiores a los 75 kDa (Figura 6, carriles 2 al 10) y una banda con un peso aproximado de 60 kDa en los medios con 10 al 90% de SFB (Figura 6, carriles 2 al 10). Se observa una sola una banda de 25 kDa en los medios con 30 al 90% SFB (Figura 6, carriles 4 al 10). No se observan bandas en el medio sin SFB (Figura 6, carril 1).



**FIGURA 6.**Foto de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, en la cual se muestra las proteínas transferidas. Carriles 1 al 10, proteínas obtenidas de los sobrenadantes del medio RPMI con cantidades crecientes de suero (0 al 90% respectivamente), inoculados con *B.*

*melitensis*. Carril M, marcador de peso molecular (Precision Plus, Protein standards, Prestained, Bio-Rad).

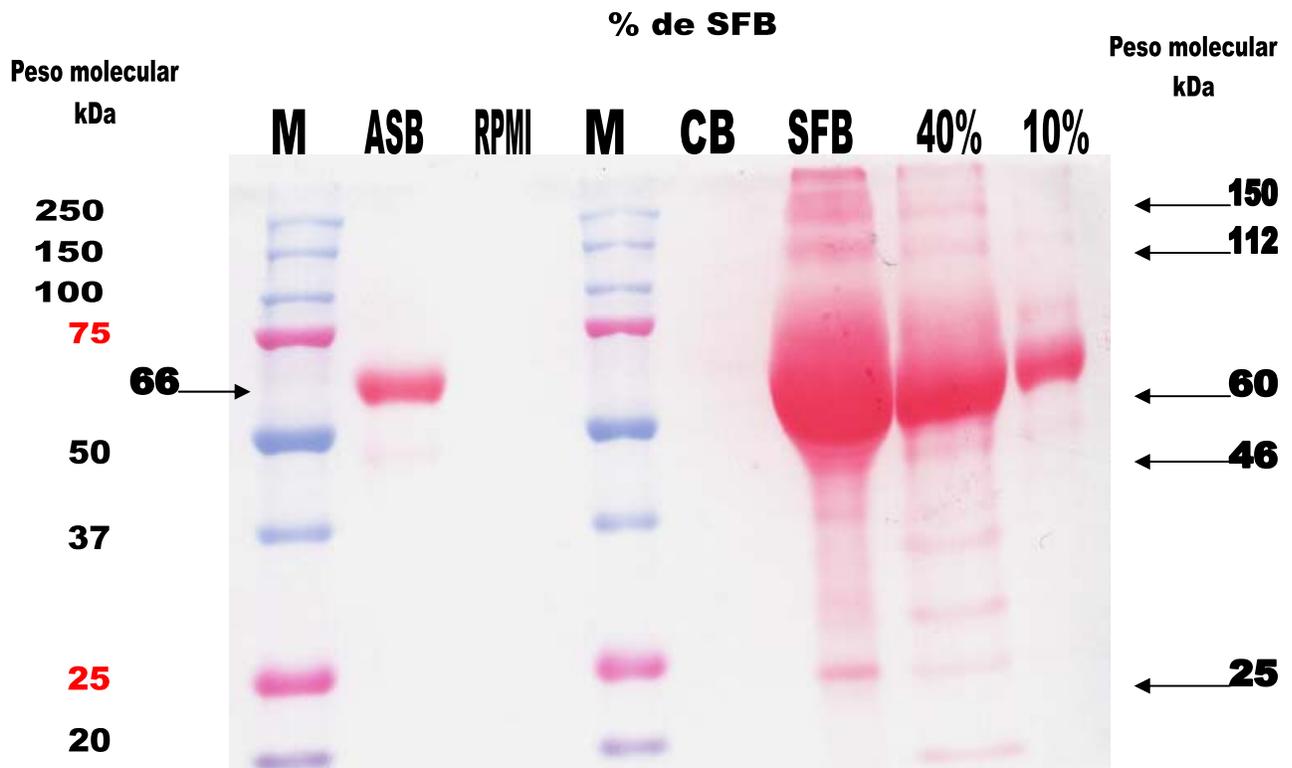
Al enfrentar las proteínas en esta membrana con los sueros de cabra negativos a *Brucella spp*, se observó que en los medios con 0 al 90% de SFB, no existía inmunoreactividad de alguna de las proteínas transferidas a esta membrana, con los sueros (figura 7, carriles 1 al 10).



**FIGURA 7.**Foto de una membrana de nitrocelulosa con proteínas de los sobrenadantes del medio RPMI con 0 al 90% de SFB (Carriles 1 al 10 respectivamente), inoculados con *B. melitensis*, la cual fue enfrentada a sueros de cabra negativos a *Brucella spp*, provenientes de un hato libre. No se observa inmunoreactividad con estos sueros. Carril M marcador de peso molecular (Precision Plus, Protein standards, Prestained, Bio-Rad).

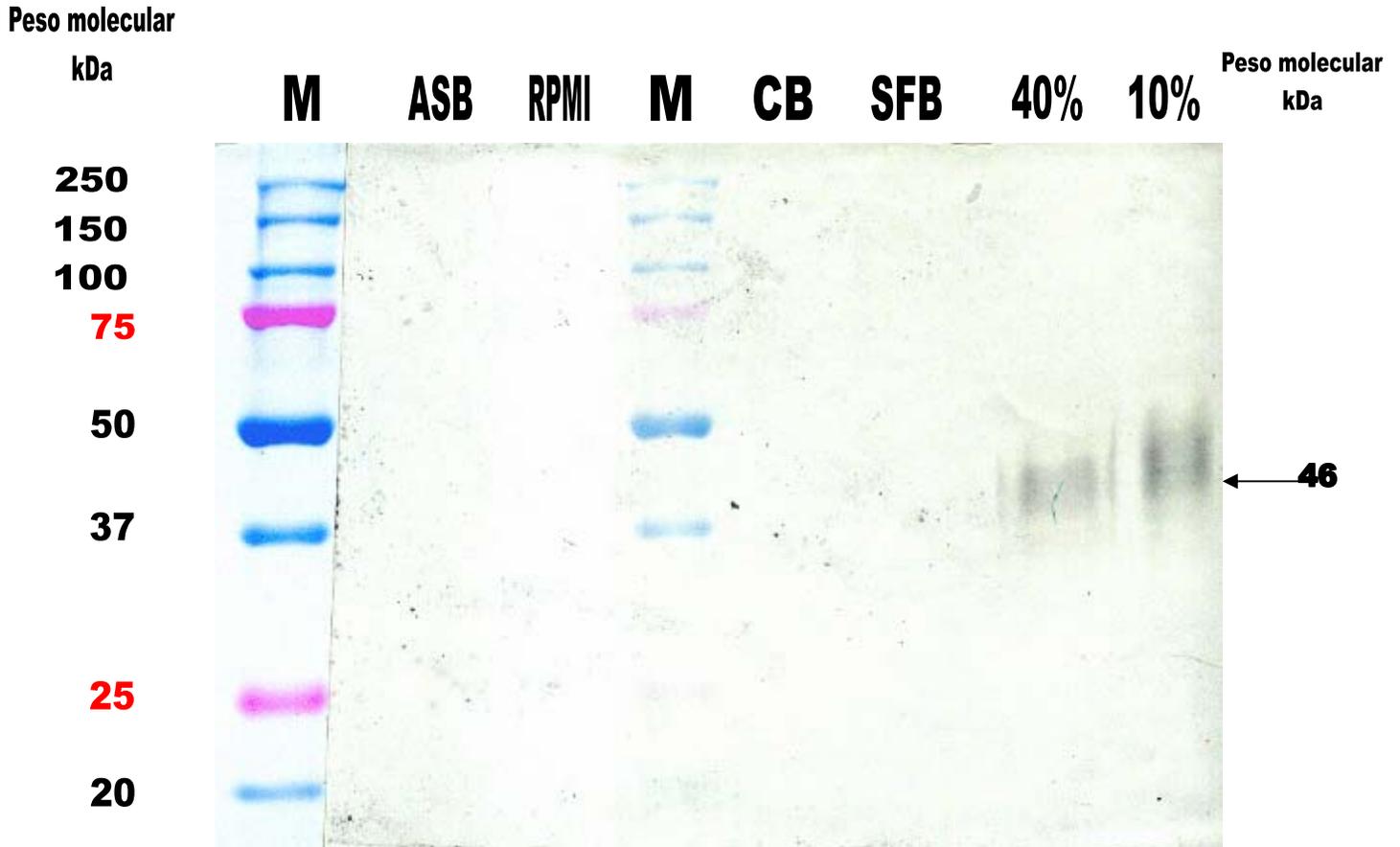
Por otra parte, empleando el mismo protocolo de metanol-cloroformo se precipitaron proteínas de muestras de medio de RPMI, CB, SFB y sobrenadante de medio de cultivo celular RPMI con SFB al 40 y 10% inoculado con *B. melitensis*. Las pastillas obtenidas junto con una solución de ABS fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa.

Nuevamente la membrana se tiñó con rojo de Ponceu para visualizar las proteínas transferidas y posteriormente enfrentarlas a sueros de cabra positivos a *Brucella* spp en un ensayo de tipo *Western blot*. Con la tinción de rojo de Ponceu se pudo observar la ABS como una banda de aproximadamente 66 kDa (Figura 8, carril ABS), en los precipitados de medio RPMI y caldo Brucella no se observó ninguna banda (Figura 8, carriles RPMI y CB respectivamente); en cambio se observaron nuevamente las bandas de un peso aproximado de 46 kDa en los precipitados de SFB, sobrenadantes de medio RPMI inoculados con 40 y 10% de SFB, inoculados con *Brucella melitensis*, así mismo, la banda de un peso aproximado de 60 kDa en estos mismos medios; se observan también bandas superiores a los 75 kDa (Figura 8, carriles SFB, 1 y 2), mientras que solo se observan bandas menores a 37 kDa en los precipitados de SFB y sobrenadante de medio RPMI inoculado con 40% de SFB (Figura 8, carriles SFB y 1).



**Figura 8.** Foto de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau, en la cual se muestran las proteínas transferidas. En el carriles: ABS, albúmina sérica bovina; RPMI ( medio de cultivo celular RPMI); CB (caldo Brucella); SFB (suero fetal bovino); 40 y 10% (precipitados de sobrenadantes de medio de cultivo celular RPMI con 40% y 10% de SFB inoculado con *B. melitensis* respectivamente y M marcador de peso molecular (Precision Plus, Protein standards, Prestained, Bio-Rad).

Una vez desteñida esta membrana se enfrentó a sueros de cabra positivos a *Brucella spp.* En esta membrana se detectaron bandas de 37 a 50 kDa en los precipitados de proteínas de medio de cultivo celular RPMI con SFB al 40 y 10%, inoculados con *Brucella melitensis* (figura 9, carriles 1 y 2). Por el contrario, en los precipitados del medio de cultivo RPMI, caldo brucella, suero fetal bovino y con la ABS, no se observaron bandas con inmunoreactividad a los sueros de cabra (Figura 9, carriles ABS, RPMI, CB, SFB).



**Figura 9.** Foto de una membrana de nitrocelulosa en la que se transfirieron los precipitados de medio de cultivo celular RPMI (carril RPMI), caldo Brucella (carril CB), suero fetal bovino (carril SFB), medio de cultivo celular RPMI con 40% de SFB inoculado con *B. melitensis* (carril 1), medio de cultivo celular RPMI con 10% de SFB inoculado con *B. melitensis* (carril2) y albúmina sérica bovina; los cuales fueron enfrentados a sueros de cabra positivos a *Brucella spp.* Se pueden observar bandas de proteínas que tienen inmunoreactividad con dichos sueros.

## 7.0 DISCUSIÓN

Con el fin de establecer un modelo *in vitro* que permita simular algunas condiciones a las cuales se enfrenta *B. melitensis* durante procesos de bacterémicos, se cultivó esta bacteria en medio RPMI, adicionado con distintos porcentajes de SFB. A partir del sobrenadante del cultivo, se logró identificar bandas proteicas de *B. melitensis* con un peso molecular aproximado de 46, 50 y 60 kDa.

Previamente, se habían descrito en *Brucella* spp elementos capaces de evitar la acción de algunos mecanismos bactericidas presentes en el suero (24, 70). Por otra parte, se ha descrito también, en este organismo, una exigencia de suero en su primo aislamiento (13). En este trabajo se observó que el suero tiene una influencia positiva en cantidades del 10 al 40%, sobre el desarrollo de *B. melitensis in vitro*, en este aspecto podemos considerar que algunos componentes en el suero como la glucosa, vitaminas y minerales podrían ser los responsables de inducir una replicación más eficiente de este microorganismo. Sin embargo, en medios adicionados con porcentajes del 50 al 90% se observó un efecto inhibitorio en la replicación del microorganismo. Este resultado podría estar vinculado con el poder bactericida del suero, el cual está dado por la presencia de la lisozima y complemento principalmente, en este punto se debe considerar que este fenómeno sólo se presentó a concentraciones altas de suero, sugiriendo que los mecanismos de evasión de la bacteria fueron superados (70).

Previamente, Gamazo y colaboradores habían reportado la liberación de proteínas entre 25 y 30 kDa, sin embargo, en este trabajo estas bandas no fueron observadas, esto podría deberse a que el medio en el que se cultivaron el microorganismo no contaba con

elementos pertenecientes al suero (65). Las proteínas liberadas por *B. melitensis* y recuperadas del medio, se detectaron mediante electroforesis, observando bandas con un peso aproximado de 60 kDa en los medios que contenían del 10 al 90% de SFB, de 46 kDa en los que contenían de 20 al 90% y de más de 100 kDa en los medios que contenían 60 y 70% de SFB. Estos datos sugieren que la presencia de suero en el medio de cultivo, favorecieron la liberación de proteínas con distinto peso molecular al obtenido por Gamazo y colaboradores (65).

Por otra parte se realizó la tinción de geles con nitrato de plata con la finalidad de conocer algunas características de las proteínas recuperadas del medio, si bien se sabe que la tinción de plata tiene una mayor sensibilidad, por otro lado esta tinción no es efectiva con proteínas cargadas negativamente o con aquellas que contienen modificaciones con azúcares sulfatados (71). Los resultados obtenidos en este trabajo, cuando se tiñen con nitrato de plata, se detectan solo bandas con un peso aproximado de 60 kDa, en los medios que contenían 20 al 90 % de SFB. De igual forma se observan bandas menores a 50 kDa, en los medios que contenían 60 al 90%. En comparación con la tinción de azul de Coomasie se detectaron bandas superiores a los 100 kDa las cuales no se aprecian con la tinción de nitrato de plata. Este resultado sugiere que estas proteínas podrían tener una carga negativa o contener modificaciones con azúcares sulfatados (71).

Finalmente, en el ensayo de tipo *Western blot* se observan bandas de proteínas de un peso aproximado de 46, 50 y 60 kDa con inmunoreactividad a los sueros de cabras positivas a *Brucella spp*, de acuerdo con estos resultados se puede establecer que las proteínas del sobrenadante detectadas por los sueros fueron liberadas al medio de cultivo por la presencia de componentes del suero.

En este trabajo se identificaron componentes de *B. melitensis* liberados al medio, en presencia de suero, el análisis de estos componentes mostró que no solo se trataba de proteínas sino de algunos otros componentes de distinta naturaleza, es posible que algunos de estos componentes se encuentren asociados, tal es el caso de proteínas y LPS, como se ha demostrado para el caso de los "Blebs", sin embargo son necesarias mas pruebas para comprobar que se trata de estos (64).

## **8.0 CONCLUSIONES**

La presencia del suero fetal bovino en el medio de cultivo tiene una influencia positiva en el crecimiento de *Brucella melitensis*.

Las concentraciones mayores al 40% de suero fetal bovino inhiben el crecimiento de *B. melitensis*.

El suero fetal bovino indujo la liberación de proteínas de *B. melitensis* al medio de cultivo.

## **9.0 PROSPECTIVAS**

Repetir el ensayo con suero calentado para inactivar el complemento adicionado al medio de cultivo.

Purificar la banda proteica y obtener la secuencia de aminoácidos.

Repetir el ensayo con sueros de diferentes grupos de animales infectados con otras bacterias.

Repetir el ensayo con otras especies de *Brucella spp.*

## 10.0 REFERENCIAS

1. Capasso L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* 2002; 45: 122-127.
2. Pappas G, Panagopoulou P, Cristou L and Akritidis N. Brucella as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2229-2236.
3. Young DA. Florence Nightingale's fever. *Br Med J* 1995; 311: 1697-1700.
4. World Health Organization. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: report of WHO Meeting. Switzerland (Geneva): WHO1997.
5. Cutler SJ, Whatmore AM and Commander NJ. Brucellosis-new aspects of an old disease. *J of Appl Microbiol* 2005; 98: 1270-1281.
6. Robertson GT and Roop II RM. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* 1999; 34: 690-700.
7. Champneys DW. Undulant fever a neglected problem. *Lancet* 1950; 1: 477-485.
8. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M and Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352: 2325-2336.
9. Foster G, Osterman B S, Godfroid J, Jacques I and Cloeckeaer A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007;57:2688–2693.
10. Teixeira-Gómez AP, Cloeckeaert A and Zygmunt MS. Characterization of Heat, Oxidative, and Acid Stress Responses in *Brucella melitensis*. 2000; Mayo: 2954-2961.
11. Luna-Martínez JE, Mejía TC. Brucellosis in México: current status and trends. *Vet Microbiol* 2002; 90:19-30.
12. Moreno E, Stackebrandt 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. *J Bacteriol* 1990; 172: 3569-3576.
13. Al Dahouk S, Toamso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis- a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 2003; 49:48-505.
14. Fretin D., Fauconnier A., Köhler S., Halling S., Léonard S., Nijskens C., Ferooz J., Lestrade P., Delrue R. M., Danese I., Vandenhoute J., Tibor A., De Bolle X., and Letesson J. J. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 2005; 7: 687-698.

15. Blasco JM. Brucellosis. Tratado de veterinaria Práctica. España: Madrid, 1994; 57: 27-57.
16. Douglas JT, Rosemberg EY, Nikaido, Versteatre DR, Winter AJ. Porints of *Brucella* especies. Infec Immnun 1984;44: 16-21.
17. Sowa BA, Kelly KA, Fitc TA, Frey M, Adams LG. SDS soluble and peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 1991; 27: 351-369.
18. Verstreate DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*, isolation and characterization. Infec Immun 1982; 35: 979-989.
19. Bowden RA, Cloeckert A, Zygmunt M, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by Enzyme linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infec Immun 1995; 63: 3945-3952.
20. Sanchez DO, Zandomeni RO, Cravero S, et al. Gene discovery trough genomic sequencing of *Brucella abortus*. Infect Immun 2001; 69: 443-448.
21. Paulsen IT, Sesharadi R, Nelson KB, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci 2002; 99:13148-13153.
22. DelVecchio VG, Kaptral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The Genome of *Brucella melitensis*. Vet Microbiol 90: 587-592.
23. 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.
24. Ko J and Splitter GA. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. C M R 2005; Jan: 64-78.
25. Watari Masahisa, Interaction between *Brucella abortus* and cellular prion protein in lipid raft microdomains. Microbes and infec 2004;6:93-100.
26. Canning PC. Phagocyte function in resistance to Brucellosis. In Advances in Brucellosis Research. USA: Texas A & M University 1990.
27. Baldwin CL and Winter AJ. Macrophage-Pathogen Interactions. New York: Marcel Dekker 1994.
28. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. Zinsser Microbiology. 20<sup>th</sup> ed. Connecticut USA: Appleton and Lange, 1992.
29. Celli J, Salcedo SP and Gorvel JP. From the cover: *Brucella* coops the small GTPase sar 1 for intracellular replication. Proc Natl Acad Sci 2005; 102:1673-1678.

30. Kohler S, Teyssier J, Cloeckert A, Rouot B and Liautard JP. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* 1996; 20: 701-712.
31. Liautard JP, A Gross, Dornand J and Kohler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella spp.* *Microbiol* 1996; 12:197-206.
32. Rhyan J, Gidlewski T, Roffe T, Aune K, Philo M L, Ewalt R D. Pathology of brucellosis in bison from Yellowstone National Park. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37: 101-109.
33. Corbel MJ, MacMillan P. Brucellosis. . *Microbiology and microb infec.* 9th ed. Gran Bretaña :Topley and Wilson editors: Arnold, 1998.
34. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Manual de microbiología médica.* 4ª ed. México (D.F.): Manual Moderno, 1970.
35. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. *Diagnóstico de brucelosis animal.* México D.F. SAGARPA, 2001.
36. Joklik W, Willett H, Amos B, Wilfert C. *Zinsser Microbiology.* 20<sup>th</sup> ed. Connecticut USA: Appleton and lange, 1992.
37. Bernard D, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. *Microbiology.* 4a ed. Philadelphia, Pensilvania: Lippincott Company, 1990.
38. De Bagües Jiménez MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella spp.* relationship to virulence. *Infect. Immun* 2004; 72: 2429-2433.
39. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination test and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 359-372.
40. Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Ross GP, Joyce MA, Fenwick S, Heesemann J, Wolf-Watz, H et al. Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants. *Vet Microbiol* 1995; 47: 271-280.
41. Shuring G, Sriranganathan N. and Gorvel. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90:479-496.
42. Nielsen KH, Kelly L, Gall D, Nicoletti P and Kelly W. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine Brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46:285-291.
43. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D and Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human Brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3245-3248.

44. Nielsen K, Lin M, Gall D and Jolley M. Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods* 2000; 22:71-76.
45. Jolley M and Nasir M. The use of fluorescence polarization assay for detection of infectious diseases. *Comb Chem High Throughput Screen* 2003; 6:235-244.
46. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M and Nielsen K. Development and validation of indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 1997; 54:357-368.
47. Nielsen K, Smith P, Conde S, Draghi de Benitez, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, et al. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis* and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25:171-182.
48. Pouillot R, Garin-Bastuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufour B and Moutou F. The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine Brucellosis. *Vet res*; 28:365-374.
49. Saegerman C, Vo TK, Waele L, Gilson D, Bastin A, Dubray G, Flanagan P, Limet JN, et al. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance. *Vet Rec* 1999; 145:214-218.
50. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan AP and Satunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec* 1999; 144:483.
51. Zerva L, Bourantas K, Mltka S, Kansouzidou A and Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human Brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1161-1664.
52. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Bobboyianni C, Papadopoulou C and Levidoutou S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:194-199.
53. Baldwin CL and Winter AJ. 1994 *Macrophage-Pathogen Interactions*. Zwillig, B.S., and Eisenstein, T.K. (eds). New York: Marcel Dekker, pp. 363-380.
54. Aréstegui Mirta B., El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet Mex* 2001; 32:2.
55. Kohler S, Teyssier J, Cloeckaert A, Rouot B and Liautard JP. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* 1996; 20: 701-712.
56. Panigrahi P, Losonsky G, DeTolla LJ, Morris JG Jr. Human immune response to *Campylobacter jejuni* proteins expressed in vivo. *Infect Immun* 1993; 61: 1167.
57. Nakae T. Outer-membrane permeability in bacteria. *CRC Crit Rev Microbiol* 1986; 13: 1-62.

58. Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics* 2002; 2:1047-1060.
59. Ni Bhriain N, Dorman CJ and Higgins CF. An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol Microbiol* 1989; 3: 933-942.
60. Delihias N. Regulation of gene expression by trans encoded antisense RNA. *Mol Microbiol* 1995; 15:411-414.
61. Hellman J, Loisel PM, Tehan MM. Outer membrane protein A, Peptidoglycan-Associated Lipoprotein, and Murein Lipoprotein Are Released by *Escherichia coli* Bacteria into Serum. *Inf and Immun* 2000; May 68-5: 2566-2572.
62. X. Vega XM, Huerta LA, Lopez YV, Martínez DG y Verdugo AR. Influencia de proteínas sericas de aves SPF en la liberación al medio de cultivo de ompA de *Salmonella* serovariedad gallinarum (Tesis de licenciatura). DF México: Universidad Nacional Autónoma de México.
63. Hellman J, Loisel PM, Zanzot EM. Release of Gram-Negative Outer-Membrane Proteins into Human Serum and Septic Blood and Their Interactions with Immunoglobulin in Antiserum to *Escherichia coli* J5. *J Inf Diseases* 2000; 181: 1034-43.
64. Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM and Díaz R. Comparative analysis of Proteins Extracted by Hot Saline or Released Spontaneously into Outer Membrane Blebs from Field Strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect and Immun* 1989; 5: 1419-1426.
65. Gamazo C and Moriyon I. Release of Outer Membrane Fragments by Exponentially Growing *Brucella melitensis* Cells. *Infect Immun* 1987; Mar:609-615.
66. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. One Dimensional Gel Electrophoresis Using the O'Farrell System. *Current Protocols in Immunology*. 1ed. United States:New York 1994.
67. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. Stained proteins by Coomassie Blue. *Current Protocols in Immunology*. 1ed. United States:New York 1994.
68. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. Stained proteins by Nitrate Silver. *Current Protocols in Immunology*. 1ed. United States:New York 1994.
69. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. Immunoblotting and immunodection. *Current Protocols in Immunology*. 1ed. United States:New York 1994.
70. Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffman EM. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Veterinary Microbiology* 1999; 68:235-244.

71. Golberg HA and Warner KJ. The staining of Acidic Proteins on Polyacrylamide Gels: Enhanced Sensitivity and Stability of "Stains-All" Staining in Combination with Silver Plate. *Analytical Biochemistry* 1997;251:227-233.