



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.

DETERMINACIÓN DE LA ADHESIÓN E INVASIÓN DE LAS CEPAS 133
Y LAS MUTANTES *invA* E *invB* DE *Brucella melitensis* A CÉLULAS
EPITELIALES DE LA MUCOSA ORAL Y MACRÓFAGOS DE OVINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JORGE ALVA PÉREZ

Tutor principal: Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez.

Comité Tutoral: Efrén Díaz Aparicio.

Mireya de la Garza Amaya.

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.

DEDICATORIA.

A la inexorable maravilla de la vida en sus múltiples formas, ya sea en forma de *Brucella melitensis*, ya sea en forma de células, o en el trabajo de fines de semana.

A mis padres que me han formado con amor y cariño.

A mis amigos de siempre: Javier, Claudia, Miguel, Tony, Angel, Sergio, Arlene les dejo esto: “Ya no puedo darles el corazón, perdí mi apuesta por el rock and roll”.

A mis hermanos Alex, Rodrigo y Víctor: “El tiempo del miedo ha terminado”.

A mis amigos durante este periodo: Gaby, Mary, Víctor, Efrén, Betty, Rigo, Sarita, Francisco Aguilar, Jesús Vásquez, Lupe y todos los compañeros del laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis del Departamento de Microbiología.

A la familia García-Bravo, gracias por darme la oportunidad de ser un hijo más.

Y a ti Nora: “Dame tu mano y acercate a mi, no tengas miedo abre tus alas y volemos”, gracias por todo amor mío.

AGRADECIMIENTOS.

Especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de beca y por el financiamiento en la realización de esta tesis.

A la Dra. Mireya y a todo el personal del laboratorio de Biología Celular en CINVESTAV.

Al comité tutorial por el apoyo y la generosidad de sus conocimientos.

Un especial agradecimiento a Lupe y el Sr. Eduardo y familia en Capulhuac. Edo.de México. Gracias Lupe, sin tu ayuda no hubiera sido posible.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes por la oportunidad de seguir trabajando.

INDICE

RESUMEN.	1
ABSTRACT.	2
INTRODUCCIÓN.	3
1. Generalidades.	3
2. Características del género.	4
2.1. Genética.	4
3. Diagnóstico.	6
3.1. Generalidades de diagnóstico.	6
3.2. Diagnóstico serológico.	7
3.2.1. Diagnóstico de <i>B. abortus</i>.	7
3.2.2. Diagnóstico de <i>B. ovis</i>.	7
3.2.3. Diagnóstico de <i>B. melitensis</i>.	8
3.2.4. Diagnóstico de <i>B. canis</i>.	8
3.2.5. Diagnóstico de <i>B. suis</i>.	8
3.3 Diagnóstico en base a estudios moleculares y otras técnicas.	8
4. Patogenicidad y virulencia.	9
4.1 Factores relacionados con la virulencia.	11
4.1.1 Lipopolisacárido.	11
4.1.2. β-1,2 Glucano cíclico.	13
4.1.3. Sistema de secreción tipo IV (SSTIV).	15
4.1.4. Ureasa.	16
4.1.5. Sistema sensor regulador BvrR-BvrS y proteínas de membrana externa (OMP).	16
4.1.6. Disponibilidad de hierro.	18
4.1.7. Factores de defensa de <i>Brucella</i> spp. contra el daño oxidativo.	19
4.1.8 Otros factores.	22
5. Respuesta inmune.	24

6. El fenómeno de adhesión en las bacterias.	26
6.1. El fenómeno de adhesión e invasión en el género <i>Brucella</i>.	27
6.1.1. El papel de los genes <i>invA</i> e <i>invB</i> en la adhesión e invasión.	30
JUSTIFICACIÓN.	32
HIPÓTESIS.	32
OBJETIVO.	32
METODOLOGÍA.	33
Cepas bacterianas.	33
Cultivos celulares.	33
Cultivo primario de células bucoepiteliales de ovino (CBO).	33
Cultivo primario de macrófagos de ovino.	34
Infección para determinar la adhesión e invasión a las CBO.	35
Infección para determinar la adhesión y sobrevivencia intracelular a macrófagos.	36
Protocolo de inmunofluorescencia.	36
Estudio estadístico.	37
RESULTADOS.	38
Resultados de las infecciones en células bucoepiteliales de ovino (CBO).	38
Resultados de las infecciones en los macrófagos de ovino.	41
DISCUSIÓN.	46
CONCLUSIONES.	54
PERSPECTIVAS.	55
LITERATURA CITADA.	56

RESUMEN.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial de gran importancia en salud pública y animal. Las bacterias del género *Brucella* son gram-negativas, no producen esporas, son inmóviles y son patógenos intracelulares facultativos. Estas especies producen principalmente aborto en hembras gestantes y problemas reproductivos en machos, además tienen la capacidad de infectar tanto a células fagocíticas como no fagocíticas, por lo que pueden localizarse en cualquier tejido interfiriendo con la funcionalidad del mismo. Las especies más importantes son *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis*. Se reconocen como agentes patógenos que carecen de mecanismos de virulencia clásicos (toxinas, fimbrias, cápsula etc). En lugar de ello, las especies de este género se han adaptado a la forma de vida intracelular, creando para ello mecanismos de virulencia que les permitan sobrevivir y replicarse evadiendo la respuesta inmune, sobre todo en células del sistema mononuclear fagocítico. *Brucella* spp. debe mediar su internalización (invasión) a través de receptores específicos celulares. Por otro lado, debido a que también infecta a un rango muy amplio de células, es probable que *Brucella* presente más de un ligando, dando de esta forma especificidad por un amplio grupo de células (tropismo). Aunque se han caracterizado muchos factores moleculares para la invasión y sobrevivencia intracelular de *Brucella* spp., aún no se han caracterizado completamente todos los factores que intervienen en la virulencia del género. Recientemente se secuenció el genoma de *Brucella melitensis* y se encontraron dos marcos abiertos de lectura que codifican para los genes de invasión *invA* e *invB*. Estos genes presentan un 42% de identidad y un 76% de similitud con el locus de invasión *ialAB* de *Bartonella bacilliformis* y el gen *invA* de *Rickettsia prowazekii*. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de *invA* e *invB* en la adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular de *B. melitensis*. Se utilizaron cultivos primarios de células epiteliales de mucosa oral (CBO) y macrófagos de ovino para realizar los ensayos de adhesión, y de invasión y sobrevivencia intracelular con las cepas *B. melitensis* 133, *B. melitensis* 133 *invA*-Km y *B. melitensis* 133 *invB*-Km. En CBO la adhesión de la cepa BM 133 *invA*-Km fue significativamente mayor a los 30 y 60 minutos post-infección que las otras dos cepas. Ninguna cepa fue capaz de invadir a las CBO. En la infección con los macrófagos se observó que la adhesión no fue diferente para las tres cepas, excepto a las 12 horas postinfección en donde BM 133 *invB*-Km se adhirió hasta 12.8 veces más que la cepa parental y BM 133 *invA*-Km se adhirió hasta 4.6 veces más. En cuanto a la sobrevivencia y replicación intracelular se observó que BM 133 y BM 133 *invB*-Km sobrevivieron de manera similar, a diferencia de BM 133 *invA*-Km que sobrevivió hasta un 70% menos. Para BM 133 *invB*-Km el número de bacterias intracelulares fue significativamente mayor a las 12 y 48 horas post-infección que la cepa parental, aludiendo a un aumento en la virulencia de la especie. Estos resultados indican que el gen *invA* es determinante en la invasión y sobrevivencia intracelular de *B. melitensis*, mientras que *invB* no es determinante en dichos fenómenos. El aumento en la replicación intracelular de la cepa BM 133 *invB*-Km pudo deberse a un efecto compensatorio en la expresión de otros factores de virulencia. Aunque la adhesión fue mayor para las cepas mutantes, dicha adhesión no contribuyó a la invasión. Esta adhesión pudo deberse a un cambio en la expresión de las proteínas de la membrana interna y externa de *B. melitensis*, debido a que la invasión es un evento regulado genéticamente.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, *invA*, *invB*, adhesión, invasión.

ABSTRACT.

Brucellosis is a worldwide infectious disease of great importance in public and animal health. The *Brucella* species are gram negative, do not produce spores, they are motionless and they are facultative intracellular pathogens. These species produce abortion in pregnant females and reproductive problems in males; besides they have the capacity of infect also fagocytic and non fagocytic cells. This capacity is the responsible of localization of the bacteria in any organ or tissue interfering in the functionality. The most important species are *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis*. It's recognized that these pathogen species lack of classical virulence mechanisms (toxins, fimbriae, capsule, etc), instead these species are well adapted for the intracellular niche, making the virulence mechanisms necessary to survive and reproduce evading and overcoming the immune response, especially in cells of the fagocytic mononuclear system. *Brucella* spp. must control the invasion process using specific cellular receptors. Due to the ability to infect a broad range of cells it is possible that *Brucella* have more than one specific ligand, giving the characteristic of being a broad cell spectrum pathogen (tropism). Even though many molecular factors are well characterized for invasion and intracellular survival, the different factors involved in the virulence of the genus are poorly understood. Recently the genome of *B. melitensis* was sequenced and two open reading frames (ORF) were identified. These ORF'S code for the invasion genes *invA* and *invB*, and share a 42% of identity and 76% of similarity with the invasion locus *ialAB* of *Bartonella bacilliformis* and *invA* of *Rickettsia prowazekii*. The objective of this work was to investigate the play of *invA* and *invB* in the adhesion, invasion and intracellular survival of *B. melitensis*. Primary cell line of epithelial cells of oral mucosa (CBO) and macrophages of ovine was used for the realization of the experiments of adhesion and invasion for CBO, and intracellular survival for macrophages respectively. The strains used in this work were *B. melitensis* 133, *B. melitensis* 133 *invA*-Km and *B. melitensis* 133 *invB*-Km. The adhesion in CBO of the strain BM 133 *invA*-Km was significantly bigger than the other two strains at 30 and 60 minutes post-infection. The strains couldn't invade the CBO. In the infection of the macrophages the adhesion wasn't different for each strain, except for the 12 hours post-infection where BM 133 *invB*- Km adhered 12.8 more than the parental strain and BM 133 *invA*-Km adhered 4.6 more than the parental strain. In the intracellular survival and replication assay BM 133 and BM 133 *invB*-Km survive in a similar fashion, in contrast BM 133 *invA*-Km survive 70% less than the others. At 12 and 48 hours post-infection the number of intracellular bacteria for BM 133 *invB*-Km was significant bigger than the parental strain, suggesting an increase in the virulence. Together these results suggest that *invA* gene is determinant in the invasion and intracellular survival of *B. melitensis* whereas *invB* gene not. The increase in the intracellular replication of the strain BM 133 *invB*-Km could be due to a compensatory effect in the expression of others virulence factors. Even though the adhesion was important in the mutant strains, this adhesion didn't contribute to invasion. The adhesion observed in the mutant strains could be due mainly to a switch in the expression of outer and inner membrane proteins of *B. melitensis*, because is well known that the invasion process is a genetic event highly regulated.

Keywords: *Brucella melitensis*, *invA*, *invB*, adhesion, invasion.

INTRODUCCIÓN.

1. Generalidades.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta tanto a animales como al ser humano, cuyo agente etiológico se aisló por primera vez en 1887 por David Bruce a partir de hígado y bazo de soldados enfermos en la isla de Malta. Sin embargo, la enfermedad ya se había descrito con anterioridad en 1861 por Marston en la misma isla (1, 2).

Esta enfermedad es de distribución mundial y es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. La principal especie responsable de la brucelosis en el humano es *Brucella melitensis* y en menor medida *Brucella abortus* y *Brucella suis* (1). En América se aisló por primera vez el agente en 1914 en Estados Unidos a partir del aborto de cerdas enfermas, denominándose *Brucella suis*. En México está presente desde 1905 (1,3). Esta enfermedad produce diferentes trastornos en los animales domésticos, aunque el signo preponderante de la enfermedad es el aborto en las hembras. En los machos pueden presentarse signos como orquitis, epididimitis y en ocasiones infertilidad (4, 5). En los seres humanos la infección es adquirida principalmente por el consumo de productos lácteos contaminados y por el riesgo ocupacional. La enfermedad se presenta en cuadros agudos, subagudos, crónicos o puede ser asintomática. Los principales signos son: fiebre ondulante, escalofríos, cansancio generalizado y cefalea. La enfermedad puede avanzar y producir lesiones en cualquier tejido en donde se localicen las bacterias, produciendo daño hepático, esplenomegalia, osteomielitis, daño al sistema genitourinario y endocarditis (1, 6).

En la actualidad el género *Brucella* comprende seis especies muy relacionadas filogenéticamente entre sí, estas son: *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. abortus* y *B. neotomae*. Según la naturaleza de su lipopolisacárido (LPS) las especies de *Brucella* pueden ser lisas o rugosas. Así, tenemos que *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis* son especies lisas, cuyo LPS se encuentra completo, y *B. canis* y *B. ovis* son especies rugosas, cuyo LPS no contiene la cadena O. Se ha reconocido que este género afecta

también a pinípedos y a cetáceos, y se les ha nombrado a las especies infectantes como *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (1, 7, 8, 9).

2. Características del género.

Las especies del género *Brucella* son bacterias gram negativas, inmóviles, son cocabacilos cortos de 0.5 a 1.5 μ de largo y de 0.5 a 0.7 μ de diámetro. No se han descrito plásmidos para este género. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en un pH de 6.6 a 7.4. Son anaeróbicas facultativas (1, 2). Se ha descrito que *Brucella* puede sobrevivir en el suelo, en heces y en diversos fomites por periodos hasta por 4 meses (4, 10). Es sensible al calor, a los rayos UV, al etanol y a la mayoría de los desinfectantes comunes, a excepción de los cuaternarios de amonio. *Brucella* spp. puede sobrevivir durante varios periodos en condiciones de baja temperatura (1, 10). *Brucella* spp. pertenece al grupo α , subgrupo 2, de las proteobacterias de la familia *Rhizobiaceae*, y guarda una estrecha relación filogenética con los miembros de este grupo. Los miembros de este género forman en agar colonias pequeñas y traslúcidas con moderada turbidez, su crecimiento es lento y se estimula por la adición de proteína animal, extracto de levaduras y sangre (1). Estas bacterias contienen dos determinantes antigénicos de importancia epidemiológica y serológica, descritos como A (*B. abortus*) y M (*B. melitensis*), dependiendo de la aglutinación con sueros monoespecíficos. De esta manera se han descrito diversos serotipos o biovares en las diferentes especies. *B. melitensis* posee tres biotipos, *B. abortus* tiene ocho y *B. suis* cuatro (1, 3).

2.1. Genética

Recientemente se han secuenciado los genomas de las tres especies de *Brucella* más importantes en la producción mundial y en la salud pública, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* (11, 12, 13). Estas tres especies tienen aproximadamente 3 millones de pares de bases (Mb) distribuidos en dos cromosomas, un cromosoma grande de 2 Mb y uno chico de 1 Mb. Estas especies presentan una homología del 90% (gracias a los estudios de hibridación de ADN), por lo que se ha sugerido que el género sea monoespecífico (14). Los diferentes serotipos son variables en cuanto al contenido de nucleótidos, pero en

general mantienen un número constante de 3200 a 3400 genes (11, 12, 13). El análisis de la subunidad 16s del ARNr incluyó al género en el subgrupo $\alpha 2$ de las proteobacterias (14). Genéticamente *Brucella* spp. posee homología con genes de simbiosis en *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium leguminosarum* (15). Los genes *bac*, relacionados con la formación de nódulos en las bacterias del género *Rhizobia*, tienen homólogos con genes relacionados en la sobrevivencia intracelular de *Brucella* spp. (14), y el sistema de dos componentes sensor-regulador BvrR-BvrS, es similar a los genes *exoS* de *Sinorhizobium meliloti* (16).

Los primeros análisis genéticos en el género se realizaron investigando genes relacionados con la virulencia, utilizando principalmente transposones y plásmidos, algunos de estos estudios se han realizado haciendo mutaciones al azar (17, 18, 19). La clasificación de los genes de las tres especies puede dividirse de la siguientes forma: factores de virulencia, regulación, adquisición de metales, metabolismo (aminoácidos, azúcares, vitaminas, cofactores, nitrógeno y ácidos nucleicos), proteínas de estrés y chaperonas, oxidoreducción y otros genes de función desconocida (19, 20). La mayoría de los genes relacionados con la virulencia se encuentran en el cromosoma I, y los genes relacionados con el metabolismo se encuentran en el cromosoma II, los demás genes se encuentran distribuidos en ambos cromosomas de forma más o menos homogénea (13, 20, 21). La presencia de inserciones, deleciones y pseudogenes parece ser la principal razón para la especificidad de huésped y de diferencia de patogenicidad (19, 22). Gracias a los estudios de secuenciación y análisis genómico entre estas especies, *Brucella suis* no comparte el mismo ancestro común que *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* (23). De hecho, el biotipo 3 de *Brucella suis* contiene un solo cromosoma de 3.1 Mb (20). En general *Brucella* spp. no tiene evidencia de presencia de plásmidos; sin embargo, en *Brucella suis* se han encontrado genes de replicación de plásmido en el cromosoma 2. Se cree que la presencia de este cromosoma tiene su origen en la adquisición de un megaplásmido (13, 19). Estos genes de replicación diferencian a *Brucella suis* de *Brucella melitensis* (23).

3. Diagnóstico.

3.1 Generalidades del diagnóstico.

El diagnóstico de la brucelosis animal es sumamente importante, ya que desde el aspecto epizootiológico permite el control y la erradicación, así como de evitar que los microorganismos se diseminen en productos lácteos para el consumo humano (7). Puede ser difícil lograr el diagnóstico definitivo a través del aislamiento bacteriológico ya que la concentración bacteriana suele ser baja debido a la característica de ser una infección intracelular. Esto es muy importante ya que durante el curso de la infección no siempre hay una excreción continua y homogénea de bacterias, es por ello que se utilizan medios enriquecidos y diferenciales (1, 4). Las muestras de elección que se utilizan antemortem son: leche, semen (principalmente para *B. ovis*) y líquidos vaginales. Se puede utilizar el feto abortado completo para el aislamiento, del cual se toman muestras del contenido abomasal. Las muestras de elección a la necropsia son: bazo, hígado, linfonodos, médula ósea (para el diagnóstico de *B. canis*), útero y glándula mamaria. En el caso de *B. ovis* las glándulas accesorias del pene, así como el epidídimo son tejidos de elección para el aislamiento (24), el cual puede obtenerse hasta por un periodo de 6 semanas (con un plazo medio de 3 a 7 días). Para el aislamiento es necesario trabajar en un nivel de bioseguridad de tipo III (4). Los medios de cultivo recomendados para el aislamiento son: agar Farrell para un primoaislamiento a partir de muestras contaminadas; agar Brucella, agar tripticosa soya (TSA) y el medio bifásico de Ruiz-Castañeda (principalmente utilizado en muestras provenientes de seres humanos). Es necesario sembrar las muestras por duplicado para corroborar la necesidad de CO₂. Las pruebas bioquímicas de elección son: oxidasa, reducción de los nitratos a nitritos, catalasa y ureasa (1). Para la identificación de especie se recurre a la lisis por bacteriófagos. La sensibilidad a los colorantes (fucsina básica y tionina), así como la aglutinación con sueros monoespecíficos (A y M), ayudan a la diferenciación de la biovariedad (1, 4). En México según la norma oficial mexicana NOM-041-ZOO 1995, el aislamiento del agente constituye el diagnóstico definitivo; sin embargo, la importancia del uso de pruebas serológicas permiten llevar a cabo los programas de control y erradicación de esta enfermedad en el país (25).

3.2 Diagnóstico serológico.

Debido a la importancia de esta enfermedad en salud pública preferentemente el diagnóstico se basa en los resultados de pruebas serológicas. La principal ventaja es la rapidez en la obtención de los resultados. Una de las principales desventajas es la obtención de resultados falsos negativos, por lo que nunca se considera el resultado de una sola prueba serológica como verdadera (26). Es por ello que el aislamiento bacteriológico se considera como el resultado que determina el diagnóstico definitivo. Idealmente la especificidad de las pruebas diagnósticas debe permitir diferenciar a animales enfermos de animales vacunados y no tener reacciones cruzadas con otros patógenos (7). Se ha reportado en algunos casos reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio cholerae*, en pruebas serológicas aplicadas a pacientes humanos (27). La sensibilidad de las pruebas debe ser lo suficientemente alta para poder detectar concentraciones bajas de anticuerpos, sobre todo en animales en diferentes estadios de infección. (7, 28).

3.2.1. Diagnóstico de *B. abortus*.

Para una detección primaria de la brucelosis bovina se utilizan pruebas serológicas conocidas como tamiz. Estas pruebas tienen una alta sensibilidad por lo que eliminan la posibilidad de la aparición de resultados falsos negativos. Para el diagnóstico de *B. abortus* se utiliza la prueba de tarjeta (o rosa de Bengala) y la prueba de anillo en leche como pruebas tamiz. Si el resultado es positivo se pasa a las pruebas confirmatorias como la de rivanol o fijación del complemento, que detectan anticuerpos clase IgG presentes en una infección activa, diferenciando así a los anticuerpos clase IgM que en su mayoría están presentes en animales vacunados (29).

3.2.2. Diagnóstico de *B. ovis*.

Para el diagnóstico de *B. ovis* se utiliza principalmente la fijación del complemento, la inmunodifusión doble en gel (prueba de elección en la norma oficial mexicana) y las pruebas de ELISA (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas) (1, 4, 24). Recientemente se ha desarrollado la prueba de aglutinación de anticuerpos en leche utilizando como

antígenos tanto *B. canis* como *B. ovis* (26). Sin embargo aún no ha sido del todo estandarizada.

3.2.3. Diagnóstico de *B. melitensis*.

En la detección de *B. melitensis* se utiliza la prueba de tarjeta como prueba tamiz, y las pruebas confirmatorias son: la fijación del complemento, prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo, que diferencia animales vacunados de animales con infección activa, y las pruebas de ELISA directo o indirecto (30).

3.2.4. Diagnóstico de *B. canis*.

Para la detección de *B. canis* preferentemente se utiliza el hemocultivo, ya que estas bacterias perduran aún después de la infección aguda. Las pruebas serológicas de elección son prueba rápida de aglutinación en placa, prueba en placa modificada con β -mercaptoetanol y pruebas de ELISA (31).

3.2.5. Diagnóstico de *B. suis*.

Para el diagnóstico de *B. suis* se utilizan principalmente los métodos bacteriológicos. *B. suis* hidroliza la urea, produce ácido sulfhídrico (H_2S), crece en tionina y fucsina básica y reacciona con los antisueros específicos A y M (dependiendo del biotipo) (32). En México la situación de la brucelosis porcina no es del todo conocida, además de que la Norma Oficial Mexicana vigente no contempla pruebas específicas para este patógeno. Sin embargo, se conoce que en México están presentes los biotipos 1 y 3 (25, 32).

3.3. Diagnóstico en base a estudios moleculares y otras técnicas.

La prueba de fluorescencia polarizada es una técnica utilizada para la detección de *B. abortus* y *B. melitensis* y se basa en la polarización de luz emitida por anticuerpos (33). Esta prueba se ha utilizado con éxito tanto en Estados Unidos como en Canadá, y es una prueba oficial de diagnóstico en esos países, ya que ha demostrado ser una prueba con una

especificidad y sensibilidad similar a la prueba de fijación del complemento. En México no se ha contemplado como prueba oficial, sin embargo se ha utilizado con cierto éxito en el diagnóstico de *B. abortus* (34). La reciente secuenciación de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* ha puesto de manifiesto la gran homología que mantienen estas tres especies entre sí. Es por ello que varios investigadores han desarrollado pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) capaces de diferenciar entre estas tres especies, basándose en patrones moleculares únicos de cada especie (21, 35). La PCR se ha utilizado para la identificación de *Brucella* spp., a partir de muestras provenientes de sangre y leche principalmente. Se han utilizado fragmentos de los genes *omp2* y *omp31* como secuencias que se amplifican en la reacción y que diferencian entre especies de este género (35). Las técnicas moleculares han ayudado además a la diferenciación de cepas vacunales de las cepas de campo, no solamente con técnicas como PCR sino también a través del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP'S), una técnica molecular que emplea sitios de corte específicos en el genoma de *Brucella*, de esta forma se han reconocido patrones específicos para cada cepa (36). En el caso de la vacuna RB51 de *B. abortus* Vemulapalli *et al.* amplificaron el fragmento de inserción que interrumpe el gen *wboA* en esta cepa, diferenciándolo de esta forma de otras cepas (37). En la diferenciación de la cepa vacunal de *B. abortus* S19 la delección en dos de los genes del operón *ery* ha sido puesta de manifiesto también a través de PCR (37)

4. Patogenicidad y virulencia.

Las bacterias del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos que pueden infectar tanto a células fagocíticas como no fagocíticas (6). La vía oral es la ruta de entrada más común de la bacteria; sin embargo, cualquier mucosa (nasal, conjuntival etc.) puede servir como vía de entrada, incluyendo la vía venérea, en especial para *B. ovis* (1, 2, 4, 5).

Después de haber entrado al hospedador *Brucella* spp. se disemina por vía linfática. La bacteria encuentra el primer sitio de infección en los linfonodos en donde infecta intracelularmente a las células del sistema inmune, principalmente a los macrófagos, y de esta manera se disemina al resto del organismo. Es la capacidad de invadir intracelularmente lo que ha hecho que la brucelosis sea crónica y recurrente (3, 10, 39).

Aunque se han descrito como patógenos que carecen de los mecanismos de virulencia clásicos (fimbrias, flagelos, adhesinas), las bacterias de este género sobreviven y se replican intracelularmente, y son capaces de resistir la acción inmunológica del hospedero (40). Es por ello que se han estudiado los mecanismos que han desarrollado estas bacterias para adaptarse a la vida intracelular y por tanto poder sobrevivir a la respuesta inmune. Las estructuras de la membrana externa de *Brucella* (LPS, proteínas de membrana externa (OMP's) y hapteno-nativo (HN)), han contribuido a que esta bacteria evada la respuesta inmune, resista, e incluso inhiba la cadena de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas por fagocitos profesionales y participe en el reconocimiento a las células blanco (3). Se ha descrito que algunas cepas rugosas de este género tienen una virulencia menor a las cepas lisas, sin embargo existen cepas rugosas que son altamente patógenas para sus hospederos definitivos (*Brucella canis* y *Brucella ovis* para cánidos y ovinos respectivamente) (7).

La patogenia de este género bacteriano radica en la capacidad de evadir la destrucción intracelular y localizarse en el nicho final de replicación que le provea de los requerimientos necesarios para poder replicarse (41, 42). Para poder internalizarse a la célula, *Brucella* spp. necesita reorganizar de manera local el citoesqueleto (filamentos de actina) y activar a los microtúbulos por un proceso que se conoce como fagocitosis de tipo cremallera, esto se ha observado en células epiteliales (40, 43). En macrófagos se ha observado algo similar, involucrando de manera primordial el LPS de las especies lisas (44), realizándose debido a la activación de GTPasas de la subfamilia Rho en la membrana celular (sobre todo Cdc42), aunque se cree que *Brucella* no participa directamente en la activación de estas enzimas. Estas GTPasas se conocen como reguladores del arreglo de las proteínas del citoesqueleto, proceso que es dependiente de energía (45). La adhesión de *Brucella* es importante para la subsecuente internalización, de hecho la forma de entrada a las células hospedadoras determina el éxito de la infección. El fenómeno de adhesión será revisado con detalle más adelante.

Una vez que ha entrado la bacteria se aloja en una vesícula con características de endosoma temprano, ya que presenta proteínas tales como Rab5 y EEA1 (marcadores de endosoma temprano). La proteína Rab5 es una GTPasa que regula la fusión de vesículas

homotípicas y la vectorialidad del endosoma. Posteriormente, alrededor de los 30 minutos postinfección, *Brucella* spp. se desliga de la cascada de la endocitosis/fagocitosis, los marcadores de endosomas tempranos ya no se observan en las vesículas, y estos compartimentos no llegan a tener marcadores de endosomas tardíos (como Rab7 ó el receptor de manosa-6-fosfato), con lo cual se fusionaría el endosoma tardío con los lisosomas. La vesícula intracelular que contiene a la bacteria adquiere características típicas de un autofagosoma. Esta vesícula es multilamelar y adquiere el marcador de la proteína Lamp1 (endosoma tardío y lisosoma), posteriormente adquiere marcadores característicos del retículo endoplásmico, tales como calreticulina y el traslocador Sec61 β que son específicos de autofagosomas. Un autofagosoma normal se uniría con los lisosomas, y de esta manera la célula puede reciclar el material celular, además presentaría en su interior enzimas como la catepsina D (característica de lisosomas) (41). Esta enzima no se encuentra en los autofagosomas que contienen a la bacteria, de esta manera *Brucella* spp. se vuelve a desligar de la cascada de la autofagocitosis y por medio de una transportación retrógrada la bacteria alcanza su nicho de replicación final, que es el retículo endoplásmico en el área perinuclear y por tanto se provee de los nutrientes necesarios para su replicación (40, 45).

4.1. Factores relacionados con la virulencia.

4.1.1. Lipopolisacárido.

El LPS de *Brucella* spp. se ha descrito como uno de los factores principales que determinan la virulencia de la bacteria, además de ser el principal factor que otorga la antigenicidad al género (46, 47). A diferencia de otras bacterias, el LPS de *Brucella* spp. es muy característico, es el principal responsable de la protección contra péptidos catiónicos (defensinas, lisozimas) y contra la lisis mediada por el complemento (48). El LPS es de baja pirogenicidad y toxicidad a macrófagos. Además, es un pobre inductor de interferón gama (IFN- γ) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), aunque paradójicamente induce la producción de interleucina 12 (49, 50). El LPS está compuesto, como en otras bacterias gram negativas, de tres unidades estructurales: el lípido A, el centro oligosacárido y la cadena O. El lípido A está insertado en la membrana celular externa de la bacteria.

Formado por un esqueleto disacárido de aminoglucosa en uniones β 1-6 unido a cadenas saturadas de 16 a 18 átomos de carbono a través de enlaces amido o éster, no presenta etanolamina o arabinosamina como es el caso de las enterobacterias. Es gracias a esta conformación química que presenta baja endotoxicidad (51, 52). El núcleo oligosacárido, que se encuentra unido a la cadena O y al lípido A contiene quinovosamina (2-amino, 2,6-didesoxiglucosa), KDO (3-desoxi d-mano 2-octulosonato), glucosamina (2-amino, 2-desoxi-D-glucosa) y manosa. En ausencia de grupos fosfato ligados al núcleo oligosacárido, la carga negativa del LPS está dada por el KDO (53, 54). La cadena O del LPS es la parte que le da a la bacteria su determinación antigénica (52). En las especies de fenotipo liso la cadena O es un homopolímero de perosamina (4,6-didesoxi 4-formamido- α -D manopiranosil) con uniones α 1-2, con una longitud de hasta 100 subunidades glucosídicas (55). La manosa es precursor de la perosamina. Es esta cualidad la que le permite a especies de fenotipo liso adherirse a receptores de manosa, especialmente a células trofoblásticas en la placenta (56).

La presencia completa de la cadena O en las especies de fenotipo liso ha contribuido a una mayor virulencia al tener éste una menor capacidad de activar los macrófagos (43). Por otro lado, el fenotipo liso ha otorgado la capacidad a las bacterias de ser reconocido por anticuerpos y es el principal intercomunicador con el receptor TLR-4 (receptor tipo Toll) de las células presentadoras de antígenos (57). En el caso de linfocitos B interacciona con el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII), lo que sugiere la posterior activación de linfocitos T (58). Dentro de la célula se ha demostrado que la cadena O protege a la bacteria de la destrucción intracelular al inhibir la unión del fagosoma con el lisosoma, además de inhibir la apoptosis de macrófagos (48, 59). En un ensayo de infección con macrófagos de origen murino J774.A1, Pei y Ficht 2004, demostraron que cepas mutantes de fenotipo rugoso proveniente de *B. abortus* provocaban necrosis de macrófagos, pero no de células epiteliales, *in vitro* (60). Se sabe que fue necrosis y no apoptosis ya que el efecto citopático se comprobó por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), anexina V y por la morfología celular. En este mismo ensayo se comprobó que existió replicación bacteriana de las cepas mutantes, sin embargo el número de bacterias recuperadas disminuyó cuando se presentaba la necrosis celular alrededor de las ocho horas postinfección (60). Esta disminución del número de bacterias fue debida al efecto citopático

y no al efecto bactericida de los macrófagos. Bajo esta perspectiva, *Brucella* spp. utiliza mecanismos diferentes para la sobrevivencia y replicación intracelular, y por tanto no es completamente dependiente del LPS completo cuando se encuentra al interior de la célula. Otro ejemplo constituye el trabajo de Ugalde *et al.* 2000 en donde demuestran que las mutantes del gen fosfoglucomutasa (pgm), que carecen de la cadena O del LPS, de *B. abortus* son capaces de sobrevivir y replicarse intracelularmente, por lo que no es del todo necesaria la presencia del antígeno O en la sobrevivencia intracelular (61). De hecho, las cepas rugosas naturales *B. canis* y *B. ovis* se replican intracelularmente y no producen algún efecto citopático característico. En el caso de la cepa vacunal RB51, no se ha caracterizado completamente la estructura del LPS (37), y sin embargo en el experimento realizado por Pei y Ficht 2004, se demostró que existió cierto grado de necrosis en macrófagos (60). Estas diferencias pueden deberse a la estructura química de la molécula del LPS que no ha sido caracterizada completamente, además del bagaje genético de cada cepa bacteriana. Esto lleva a la hipótesis de que la expresión exponencial de la cadena O es inversamente proporcional a la producción de necrosis en macrófagos. En una infección natural *in vivo* la sobrevivencia en el hospedador de las diferentes cepas de *Brucella* parece radicar en la capacidad de ésta de inhibir la apoptosis en las células. Esta estrategia utilizada por las especies de *Brucella* ha permitido que las células bacterianas no estén expuestas al efecto de los anticuerpos y el complemento, al menos en la primera fase de infección (62). Esto explica, en parte, porqué en una infección *in vivo*, las cepas mutantes rugosas provenientes de cepas lisas son avirulentas.

4.1.2. β -1,2 Glucano cíclico.

Las bacterias gram negativas pueden resistir variaciones en la osmolaridad del medio. El periplasma es el responsable de mantener al citoplasma de las bacterias gram negativas isosmolar. Cuando existen presiones altas (de hasta 100 atmósferas) la bacteria tiene la capacidad de almacenar solutos osmóticamente activos, tales como el potasio o el glutamato (63). En el otro extremo, para evitar un choque hiposmótico, la acumulación de compuestos aniónicos no difusibles evita la contracción de la bacteria. Estos compuestos son oligosacáridos, glucanos cíclicos y algunos aniones (64). Los glucanos cíclicos son macromoléculas que se encuentran regulados osmóticamente, de tal forma que cuando se

presenta una crisis hiposmótica éstos se acumulan en mayor cantidad en el periplasma. Se han descrito con detalle en bacterias patógenas de plantas tales como *Agrobacterium* y *Sinorhizobium*. Su estructura es un anillo de poliglucosa en uniones β -1,2 (sin embargo el género *Bradyrhizobium* presenta enlaces β -1,3 y β -1,6) y se les han asignado diferentes funciones, tal como la estabilidad de membranas, así como de sus componentes, resistencia a ciertos antibióticos y a enzimas de degradación de polisacáridos (en patógenos de plantas). En *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti* los glucanos cíclicos son exportados al periplasma y al espacio extracelular por un mecanismo dependiente de energía (codificado por los genes *chvB* y *ndvB*). En estas bacterias se ha relacionado al glucano cíclico con el proceso de adherencia (19, 65).

Por pertenecer a la familia *Rhizobiaceae*, las especies del género *Brucella* guardan estrecha relación con las bacterias de este género. Es por ello que en esta bacteria también se ha descrito la presencia del β -1,2 glucanos cíclicos. Gracias a las propiedades anfipáticas de los glucanos cíclicos, en el caso de *Brucella* spp., se les han relacionado con la capacidad de secuestrar colesterol, uno de los elementos estructurales de las balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son dominios de membrana en células eucariotas que están conformadas por colesterol y esfingolípidos. Las proteínas que ahí se encuentran generalmente están unidas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), además de ser ricas en gangliósidos. Esta estructura mantiene a ciertas proteínas de membrana reunidas, y posee la característica de ser una estructura dinámica dentro de la bicapa lipídica. Pueden existir diferentes tipos de balsas lipídicas (que contienen un determinado tipo de proteínas) en la membrana celular de una sola célula. Se sabe que las balsas lipídicas son importantes en la transducción de señales hacia la célula, en procesos de inmunidad y en la organización del citoesqueleto (66, 67, 68). Es por ello que al glucano cíclico de *Brucella* se le ha relacionado con la capacidad de unirse a las balsas lipídicas de la membrana celular de los macrófagos y en células epiteliales. La entrada de esta bacteria a través de las balsas lipídicas le otorga la capacidad de entrar a la célula en una vacuola endocítica que escapa de la vía de degradación en células fagocíticas no profesionales, o de la unión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos. Esto es debido a que el endosoma/fagosoma que contiene a *Brucella* spp. está decorado con estas balsas lipídicas y por consiguiente estas estructuras

moleculares no son degradadas por las células. Además de adherencia, la unión a las balsas lipídicas permite a *Brucella* spp. sobrevivir intracelularmente (65, 66). Arellano-Reynoso *et al* demostraron que las mutantes *cgs*⁻ de *B. abortus* (gen de la sintetasa del glucano cíclico) son incapaces de detener la maduración del fagolisosoma en macrófagos, determinando la importancia de la interacción del glucano cíclico con las balsas lipídicas (65).

4.1.3 Sistema de secreción tipo IV (SSTIV).

El SSTIV bacteriano está especializado en la secreción de macromoléculas en el citosol de las células eucariotas. En *Agrobacterium tumefaciens*, patógeno de plantas, el SSTIV está implicado en la introducción del plásmido Ti que transforma a la célula vegetal normal en célula neoplásica (69). En *Bordetella pertussis* la secreción de la toxina pertúsica está controlada por el SSTIV (70). En *Brucella* spp. el SSTIV está conformado por 12 proteínas reguladas por el operón *virB* (localizado en el cromosoma II) y está involucrado en la sobrevivencia intracelular y en la fusión del endosoma/fagosoma que contiene a *Brucella* con el retículo endoplásmico (71). Aún no se conoce la molécula efectora de este sistema ni sabe en concreto cómo el sistema de secreción tipo IV (que ha sido descrito en el grupo de las proteobacterias, así como en *Helicobacter pylori* y *Legionella pneumophila*) funciona exactamente en *Brucella* spp., sin embargo, se le ha relacionado con la multiplicación y sobrevivencia intracelular al controlar la maduración del fagosoma que contiene a la bacteria (42, 71). Las mutaciones que se han realizado en el operón *virB* de *Brucella* han resultado en cepas imposibilitadas para alojarse en el nicho final de replicación, además de la fusión del fagosoma que contiene a *Brucella* spp. con lisosomas, tanto en células fagocíticas profesionales como células epiteliales, sugiriendo por tanto que este factor de virulencia es determinante en la localización final de la bacteria. (42, 70, 72, 73). Por otro lado, la acidificación del fagosoma que contiene a *Brucella* spp. es necesaria para la expresión del SSTIV y para la replicación intracelular (42, 71, 74). Dentro del genoma de *Brucella* se ha encontrado el gen *pncA*, que produce la enzima nicotinamidasas/pirazinamidasas. Esta enzima está involucrada en la síntesis de NAD en el metabolismo bacteriano. Sin embargo, también se le ha relacionado con la resistencia de *B. abortus* al ambiente ácido dentro del fagosoma, probablemente bajo la regulación del operón *virB* (75). En un estudio realizado por Kim *et al* 2004. se demostró que las mutantes

de *B. abortus* carentes de *pncA* no podían obtener nutrientes dentro del retículo endoplásmico, sin embargo si invadían de la misma forma que la cepa parental (75). En concordancia con lo observado, recientemente se demostró que las mutantes rugosas de *B. melitensis* producen necrosis y oncosis de macrófagos debido a mutaciones en el operón *virB* o en los genes relacionados a este operón (76). Estos resultados sugieren por tanto un papel activo del operón *virB* para el mantenimiento y establecimiento de la infección y en la replicación intracelular. Sin embargo en una infección *in vivo* se ha demostrado que el SSTIV es importante después de 5 días postinfección, esto es, que no es determinante en el establecimiento de la infección, sino en evadir la inmunidad adaptativa (73, 77). Debido a esta propiedad se evaluaron las cepas mutantes de *virB2* de *B. abortus* y *B. melitensis* como probables candidatos de vacunas, con buenas perspectivas (78, 79, 80). En otros estudios se le ha relacionado al operón *virB* con la capacidad de penetrar a macrófagos en un proceso dependiente de balsas lipídicas (42, 81, 82, 83).

4.1.4. Ureasa.

Se ha demostrado la actividad ureolítica del género (a excepción de *B. ovis* que es ureasa negativa). El genoma de *Brucella* spp. revela dos operones designados *ure1* y *ure2* que generan la enzima hidrolítica ureasa, esta enzima es una metaloproteasa que necesita níquel para ser activa (84). La importancia de esta enzima radica en la neutralización del pH ácido para la sobrevivencia y la posterior colonización en el hospedador, sobretodo si la infección se presenta por la vía oral (resistencia al pH ácido del estómago y el tracto intestinal superior). Este factor de virulencia se ha observado en los patógenos *Kliebsiella* spp., *Yersinia enterocolítica*, y *Helicobacter pylori*. Cepas mutantes de *B. suis* y *B. abortus* deficientes en alguno de los genes del operón *ure1* se recuperan en menor cantidad de bazo y linfonodos de ratones infectados por vía oral, que las cepas silvestres. Es por ello que se ha sugerido que la ureasa producida por *Brucella* spp. es un factor importante de virulencia cuando se presenta la infección por la vía oral. No se ha demostrado que la actividad ureolítica sea importante en el control de la acidificación del fagosoma que contiene a *Brucella* en la infección intracelular (84, 85).

4.1.5. Sistema sensor regulador BvrR-BvrS y proteínas de membrana externa (OMP).

El sistema regulador-sensor de *Brucella* BvrR-BvrS por sus siglas en inglés “Brucella virulence related regulator-Brucella virulence related sensor” es muy similar a los sistemas ChvI-ExoS de *Rhizobium meliloti* y ChvI-ChvG de *Agrobacterium tumefaciens*. Está compuesto de dos proteínas (BvrR-BvrS) en la membrana interna que regulan la expresión de algunas proteínas de membrana externa y periplásmicas en función del ambiente externo. El objetivo primordial de este sistema es la resistencia a péptidos catiónicos, peróxido de hidrógeno, metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno, así como a la obtención de algunos nutrientes y en la estabilidad de la membrana externa (16, 86, 87, 8). Se ha observado que la mutación de este sistema tiene múltiples efectos en la virulencia. Las mutantes no alcanzan el nicho de replicación final en el retículo endoplásmico, son susceptibles a péptidos catiónicos, presentan una menor invasión y las cepas lisas desarrollan un fenotipo rugoso (16, 88, 89, 90).

Las proteínas de membrana externa fueron identificadas como proteínas que resistían la extracción por medio de detergentes aniónicos y al EDTA (ácido etilendiaminotetracético). Algunas de estas proteínas estaban fuertemente ligadas al LPS y a la membrana externa. Se clasificaron según su masa molecular. Así, se tienen tres grupos o familias de proteínas de membrana externa (Omp), el grupo 1 con un peso de 88 a 94 Kda, el grupo 2 con un peso de 36 a 38 Kda, y el grupo 3 con un peso de 25 a 34 Kda (53). Hay diferentes patrones de expresión de estas proteínas en las especies y serovariedades de *Brucella*. Las Omp de la familia 3 parecen estar reguladas por el sistema BvrR-BvrS, especialmente Omp22 y Omp25 (89, 90), las Omp de la familia 2 se han descrito como porinas y adhesinas (53, 56). Las proteínas de la familia 1 son lipoproteínas y están relacionadas con la estabilidad membranal asociado a la capa de peptidoglucano (1). Además, estas proteínas están asociadas con la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-12, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10) a través del receptor TLR2 (56).

Las proteínas de la familia 3 se encuentran en mayor proporción que las otras (90), se han descrito 7 proteínas de esta familia: Omp31, Omp31b, Omp25 (Omp3a), Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp 22 (Omp3b). Omp25 esta relacionado con la inhibición de TNF-

α en la infección de macrófagos y con la secreción de proteínas periplásmicas en medios ácidos (91). Se ha considerado a Omp31 como sideróforo (92). Se han descrito mutaciones en algunas proteínas de esta familia que producen una mayor susceptibilidad a péptidos catiónicos, peróxido de hidrógeno, polimixina B y desoxicolato de sodio. En el caso de las proteínas Omp25 y Omp22 la mutación del sistema sensor-regulador produce que no se expresen estas proteínas, a excepción de *B. abortus* y *B. suis*. En *B. abortus* Omp25 naturalmente no está presente (90). La membrana externa guarda una proporción entre las diferentes proteínas que la conforman (principalmente Omp31, Omp25 y Omp22). La mutación de cualquiera de ellas produce diversos cambios en la virulencia. Por otro lado, la complementación de los genes mutados no restaura la estabilidad membranal y dichas cepas continúan presentando el fenotipo avirulento de las cepas mutantes en los modelos murino y caprino (86, 90, 93). Al parecer, la regulación de la expresión y proporción de la mayoría de las proteínas de la membrana externa está a cargo del sistema sensor-regulador. De hecho las proteínas Omp22 y Omp25 están relacionadas estrechamente con el lípido A del LPS, razón por la cual la mutación del sistema regulador-sensor produce un fenotipo rugoso en las cepas de fenotipo liso (86). Sin embargo, Manterola *et al.* 2007 encontraron que la mutación de Omp22 en *B. abortus* no produce el fenotipo avirulento en el modelo murino (89). Esto puede ser debido probablemente a las características de la membrana externa de *B. abortus*, además de un efecto compensatorio de la proporción de otros factores de virulencia. En el caso particular de las cepas naturales de fenotipo rugoso (*B. canis* y *B. ovis*) la estabilidad membranal (dada por Omp31, Omp25d, y Omp22 principalmente) cobra una alta relevancia, ya que al carecer naturalmente de la cadena O del LPS, estas proteínas juegan un papel muy importante en la comunicación para la subsecuente invasión y posterior replicación celular (90). Sola-Landa *et al.* demostraron que el sistema sensor-regulador de *Brucella* spp. (BvrS-BvrR) también regula la internalización celular, probablemente a través de Omp31 y Omp25 (16).

4.1.6 Disponibilidad de hierro.

Entre los muchos factores que determinan una infección exitosa, la disponibilidad de hierro es determinante en el establecimiento de la infección. Como parte de la defensa contra los diferentes microorganismos el hospedador limita la disponibilidad de hierro,

además de que este se encuentra en su forma reducida como hemo. Patógenos tales como *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, así como muchos otros han desarrollado sideróforos, receptores de membrana específicos para hemo y hemoproteínas para la captación de hierro en el hospedador. En el caso de *Brucella* spp. se han descrito dos sideróforos: brucebactina y 2,3-ácido dihidrobenzoico (2,3-DHBA) (94), como proteína de unión a hemina (la forma oxidada del hierro en el hospedador) se ha mencionado a Omp31 (92) y como transportador de hemo se ha encontrado una proteína homóloga a ShuA de *Shigella dysenteriae*, denominada como BhuA (93). La expresión de los sideróforos 2,3-DHBA y de brucebactina están regulados por el operón *dhbCEBA* cuya expresión está regulado por hierro (94). Martínez y col. en 2006, encontraron que la proteína Irr (Iron Response Regulator, por sus siglas en inglés) es un regulador en la región promotora del operón *dhbCEBA*. Esta proteína regula de manera negativa la biosíntesis de hemo dentro de la bacteria cuando el hierro es insuficiente. La mutación de Irr en *B. abortus* no produce un fenotipo avirulento en el modelo murino, además la mutante incrementó la resistencia al peróxido de hidrógeno y tuvo una mayor actividad de catalasa que la cepa parental de *B. abortus* (95). En el caso específico del gen *bhuA* la mutación del mismo produce una atenuación significativa en el modelo murino. Las mutantes *bhuA* de *B. abortus* son incapaces de mantener una infección crónica en el bazo de ratones infectados, indicando por tanto que esta proteína si es determinante en la infección por *B. abortus* (93). Parece ser que la disponibilidad de hierro dentro del fagosoma que contiene a *Brucella* spp. no es un problema, gracias a que el pH ácido hace más soluble al hierro, encontrándose en su forma reducida. Es por ello que el ambiente ácido hace más favorable la adquisición de hierro para la bacteria, por lo que la mutación en los genes que codifican para brucebactina y 2,3-DHBA no resulta en una disminución de la virulencia (94, 95, 96). Sin embargo la mutación en el transporte del hierro si produce el fenotipo avirulento.

4.1.7 Factores de defensa de *Brucella* spp. contra el daño oxidativo.

El ambiente al que se enfrenta *Brucella* spp. después de ser fagocitada o invadir intracelularmente es altamente dañino. La secreción de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno, así como algunas enzimas (lisozimas) contribuyen a la defensa del hospedador a

la infección intracelular (en células del sistema reticuloendotelial, principalmente macrófagos). El estrés oxidativo es la estrategia mayormente usada por los macrófagos para el control intracelular de la bacteria. Aunque muchas células bacterianas mueren, las que sobreviven cambian la transcripción génica con el objetivo de sobrevivir en este ambiente hostil, principalmente debido al pH ácido, tal es el caso de la expresión de genes del SSTIV (45, 47, 71, 87, 88). La primera herramienta con la que *Brucella* spp. cuenta para protegerse de los metabolitos reactivos de oxígeno es la activación enzimática de catalasa y Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) de localización periplásmica y Mn superóxido dismutasa (Mn SOD) de localización citoplasmática (96). La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. Al igual que los genes de Cu-Zn SOD y Mn-Fe SOD, el gen que codifica para la catalasa son inducibles en respuesta al estrés oxidativo (97). Sin embargo, se ha demostrado que esta enzima no es determinante en la virulencia del género, aunque las mutantes de catalasa en *B. melitensis* exhiben una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno y a los radicales libres (-OH) (98). Esto puede ser debido a que existe otro mecanismo capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno como las enzimas alquil hidroxiperóxido-reductasas (*ahpC* y *ahpD*). Estas enzimas protegen del daño oxidativo, al proteger a la bacteria de los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno. Aunque se han identificado en el genoma de *Brucella* spp. poco se sabe acerca de su funcionamiento, estructura y la contribución exacta en la virulencia, hasta ahora los resultados no han sido concluyentes (99). Por otro lado, las superóxido-dismutasas (SOD) son metaloenzimas capaces que mutar el anion superóxido (O₂⁻) en oxígeno y peróxido de hidrógeno, este último es después descompuesto por la catalasa (96, 99). La presencia de Mn-Fe SOD en el citoplasma ayuda a detoxificar a la célula de los metabolitos producidos en la respiración aerobia, mientras que los Cu-Zn SOD protegen a *Brucella* spp. del estallido respiratorio en los macrófagos. La mutación de estas enzimas ha tenido diferentes resultados no del todo concluyentes, sin embargo se cree que contribuyen de manera significativa en el establecimiento de la infección intracelular. En cuanto al estrés oxidativo que se presenta por parte de los productos del metabolismo de nitrógeno (principalmente óxido nítrico) *Brucella* spp, posee un sistema de desnitrificación realizado por cuatro enzimas que reducen el nitrato a nitrógeno gaseoso (nitrato reductasa, nitrito reductasa, reductasa de óxido nítrico y reductasa de óxido nitroso), evitando de esta manera que los reactivos del metabolismo del nitrógeno (óxido nítrico NO, principalmente) dañen la

membrana celular. La presencia de este sistema permite a las especies de *Brucella* adaptarse al medio intrafagosomal, en donde la tensión de oxígeno es baja. Además, en el metabolismo microbiano, permite transferir electrones a través del metabolismo del nitrógeno (respiración anaeróbica) (99, 100, 101). La mutación de *norD* (reductasa de óxido nítrico) en *B. suis* produce un fenotipo avirulento en el modelo murino (100). Por otro lado, la mutación en el regulador *nnrA*, en *B. melitensis* que está involucrado en la expresión de reductasa de nitrato (*nirK*), reductasa de óxido nítrico (*norB*) y reductasa de óxido nitroso (*nosZ*) produce atenuación en macrófagos y no hay recuperación de las mutantes después de 4 semanas en ratones infectados (101).

La acidificación del fagosoma también pone de manifiesto la expresión de un grupo muy particular de proteínas, que también pertenecen a la primera línea de defensa contra el ambiente hostil dentro del fagosoma. Se han descrito genes que contribuyen a responder a los diferentes agentes estresantes a los que se enfrenta *Brucella* spp. Dentro de estos se encuentran las proteínas chaperonas ClpB, las proteínas chaperonas DnaJ-DnaK, y el producto del gen *htrA* (19, 86). Las proteínas chaperonas DnaJ-DnaK han mostrado un claro efecto en la virulencia, ya que las cepas mutantes de *B. melitensis* resultan ser atenuadas en el modelo caprino (17). En *B. suis* se ha observado que la transcripción de estas proteínas de choque térmico (DnaJ-DnaK) se activan cuando existe acidificación del fagosoma (97, 102). Aunque las proteínas ClpB, así como el producto del gen *htrA* se han involucrado en la resistencia al estrés intramacrofágico, no se les ha relacionado con un efecto directo sobre la virulencia del género (19).

La segunda línea de defensa contempla dos grupos de genes involucrados en la reparación del daño oxidativo sobre el ADN bacteriano. Estos son los genes *recA* y *radA* pertenecientes al sistema SOS (103) y el gen *xthA-I* que produce la exonucleasa III que participa en el sistema de reparación por escisión de base, “BER”, por sus siglas en inglés: Base Excision Repair (104). Ambos grupos de genes están altamente regulados, reconocen el daño en el ADN y promueven la reparación del mismo eliminando las bases dañadas (debido a la oxidación). Aunque la mutación de ambos sistemas produce microorganismos más sensibles al estallido respiratorio, no se ha comprobado que las mutantes sean menos virulentas que las cepas parentales.

Al parecer la activación de todos estos genes tiene que ver con la transición a la fase estacionaria. La regulación se presenta cuando las condiciones no son las ideales para la replicación bacteriana (como lo es el estrés oxidativo). El gen *hfq* codifica una proteína de unión al ARN denominada como proteína huésped I (HF-I). Esta proteína está implicada directamente en la transición hacia la fase estacionaria en muchas bacterias. Descrita originalmente en *E. coli*, HF-I es requerida para la eficiente traducción del factor σ de la proteína Rpo. Este a su vez redirecciona la ARN polimerasa hacia un conjunto de genes en *E. coli* necesarios para la transición hacia la fase estacionaria. Se han construido cepas mutantes de este gen *hfq* y del gen *rpo* y se ha observado que estas cepas son defectivas en mantenerse en condiciones de mínima nutrición, así como en condiciones de estrés (presencia de metabolitos de oxígeno, así como condiciones de bajo pH). En *B. abortus* se ha demostrado que la presencia de este gen es coadyuvante en el mantenimiento de la infección intracelular en macrófagos. Debido a las condiciones ácidas y de estrés prevalentes en el fagosoma, *B. abortus* resiste la acción microbicida gracias a este mecanismo. Se ha observado que las cepas mutantes *hfq* de *B. abortus* son incapaces de mantener la infección intracelular tanto *in vitro* como *in vivo*. Este mecanismo no influye en el establecimiento de la infección, pero sí en el mantenimiento de la misma. También se ha corroborado este sistema en *B. melitensis* (96, 105, 106).

4.1.8 Otros factores.

La secuenciación del genoma de *Brucella* puso de manifiesto el gen *bepC*, homólogo al sistema TolC de *E. coli* (11, 12, 13). Este sistema se ha relacionado con la resistencia a diferentes antibióticos y agentes tóxicos. La conformación proteica de este sistema permite expulsar los agentes antimicrobianos al formar un túnel entre la membrana externa y la membrana interna, expandiendo por tanto el espacio periplásmico. Este sistema es dependiente de energía. La mutación de *bepC* en *B. suis* resulta en atenuación en el modelo murino, además de una menor resistencia a sales biliares, eritromicina, tetraciclina y norfloxacin (107).

Aunque se ha caracterizado a *Brucella* spp. como una bacteria inmóvil, la presencia de genes para la formación de flagelo se ha confirmado en el genoma de *B. melitensis* (108). Se ha demostrado la expresión de flagelo en la fase estacionaria, y está relacionado en la cronicidad de la infección en el modelo murino (109).

El sistema “quórum sensing”, que ha sido descrito extensamente en bacterias como *E. coli*, trata de la regulación génica intraespecie, a través de la síntesis, detección y respuesta de moléculas de N-acil homoserin lactonas (AHL). Las moléculas AHL se unen a un regulador transcripcional (regulador tipo Lux-R) que modifican la transcripción de genes de virulencia, replicación entre otros (110). La secuenciación de *Brucella* demostró la existencia de un activador transcripcional tipo Lux-R (VjbR) para el gen flagelar *fliF* y el operón *virB*. Aunque no se han encontrado AHL's en cultivos de *Brucella* spp., en el sobrenadante de cultivo de *B. melitensis* se ha encontrado N-dodecanoil-DL-homoserin-lactonas (C12-HSL), moléculas que se han demostrado como represores de la transcripción de los genes *fliF* y el operón *virB*. También se le ha relacionado con la regulación de proteínas de membrana externa, incluyendo al sistema BvrS-BvrR y con la probable formación de biopelículas (biofilms) (111).

Otro factor de virulencia interesante dentro de este género es la adquisición de colina por parte del huésped para la formación de fosfatidilcolina (FC) en la membrana de *Brucella* spp. Debido a que la mayoría de los agentes patógenos contienen en su membrana celular fosfatidiletanolamina la presencia de FC en la membrana de *Brucella* resulta intrigante. Como fosfolípido la FC provee de mayor estabilidad membranal, así como resistencia a péptidos catiónicos, uno de los factores que explican la resistencia de estas bacterias a la destrucción celular. Además, la presencia de FC en la membrana puede ser importante para pasar desapercibida por el sistema inmune, al mimetizarse con las membranas celulares del hospedador. La síntesis de FC está a cargo de la enzima sintasa de colina (Pcs), en donde la vía biosintética es dependiente de colina proveída por la célula hospedadora. *Brucella* spp. también presenta el gen que codifica para la síntesis de FC a través de la enzima N- metil-transferasa (PmtA), sin embargo se ha demostrado que no es esencial en la síntesis de FC. La mutación del gen *pcs* en *B. abortus* produce células capaces de establecer una infección exitosa *in vivo* e *in vitro* aunque no pueden desarrollar infecciones crónicas (112, 113).

Como se puede observar, *Brucella* spp. posee todo un sistema de factores coordinado para poder sobrevivir y replicarse dentro de las células. La presencia de más de un sistema o factor de virulencia asegura una infección exitosa, mismos que parecen superponerse uno al otro (efecto de redundancia). Esto es el resultado de la evolución de la bacteria y de las diferentes estrategias que ha adoptado para evitar ser destruida produciendo el menor daño posible. Un ejemplo de ello lo conforman las especies lisas de *Brucella* que inhiben la necrosis en las células infectadas (60). Es entonces que la principal estrategia de este género bacteriano constituye el pasar desapercibida por el hospedador y beneficiarse del mismo (114). En el siguiente apartado se hablará de la respuesta del hospedador a estas estrategias utilizadas por *Brucella* spp.

5. Respuesta inmune.

En las infecciones producidas por el género *Brucella* la respuesta inmune se presenta tanto de tipo celular, en una primoinfección, como humoral, cuando se ha controlado la infección y, sobretodo, en reinfecciones. En animales susceptibles genéticamente o inmunodeprimidos, el sistema inmune no puede controlar la infección y la enfermedad se convierte en crónica (115). Se ha observado una mayor resistencia a la infección por *B. abortus* en bovinos cuyo gen *nrampl* se expresa en macrófagos que en bovinos que no lo expresan (56). Por parte de la bacteria, la capacidad de sobrevivir al efecto adverso dentro del fagosoma en células fagocíticas profesionales pone de manifiesto la habilidad de ésta de residir en los mismos y prolongar la infección. Esta es la principal estrategia utilizada por *Brucella* spp, de evadir la respuesta inmune permaneciendo oculta dentro de las células evitando su activación y la muerte celular (60, 62).

La capacidad de infectar intracelularmente a las células del sistema reticuloendotelial ha puesto en relevancia el tipo de respuesta que surge después de la infección. Una de las respuestas es la activación de las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas y los macrófagos que se caracteriza por producir una respuesta inmune de tipo celular, denominada también como respuesta inmune del tipo 1 (62). Sin embargo, en la infección de células dendríticas (DC) se ha observado la inhibición de la maduración

(incapaces de producir TNF- α y presentar antígenos a linfocitos T), de esta manera haciendo crónica la infección y transformando a las DC como reservorios del patógeno (39, 116, 117). La cronicidad de la infección corresponde a una respuesta caracterizada por la activación de linfocitos tipo Th2. Se ha relacionado a la proteína Omp25 y al sistema BvrR-BvrS como los principales factores que inhiben la maduración de las células dendríticas (117). La activación tanto de macrófagos como de células dendríticas desencadena la producción de citocinas como IL-12, IL-6 y TNF- α . Esta activación promueve la producción de IFN- γ que se reconoce como la citocina clave en el control de la brucelosis (118), sin embargo se ha reconocido como la principal citocina causante de aborto en ratonas gestantes infectadas por *B. abortus* (119). Una de las principales funciones del IFN- γ (junto con TNF- α) es la inducción de la NO sintasa (NOS) dentro de los fagocitos profesionales. Se ha demostrado que *Brucella* aumenta los niveles de AMPc, cuyo efecto es antiinflamatorio inhibiendo además la transcripción de NOS, y aumentando la expresión de IL-10 de efecto antiinflamatorio, de esta manera disminuye el efecto del IFN- γ (120). Como responsable del efecto antiinflamatorio se ha responsabilizado en parte al LPS y a algunas proteínas de membrana externa (118).

Por otro lado, la respuesta humoral también es importante ya que contribuye en la opsonización de *Brucella*, gracias a los anticuerpos de la clase IgG2 o IgG3 (62, 121). Se ha observado que la fagocitosis de *Brucella* spp. opsonizada con anticuerpos o factores del complemento (a través de receptores Fc) aumenta significativamente en contraste con la bacteria que no es opsonizada. Esta vía de entrada correlaciona positivamente con la muerte intracelular de la bacteria, a través de la activación de NADPH oxidasa (114, 118). Sin embargo, *B. abortus* puede inhibir la activación de las células fagocíticas, aún después de haber entrado a macrófagos por vía Fc. De hecho la entrada de *Brucella* a través de la unión con el receptor Fc en células fagocíticas promueve una respuesta inmune del tipo 2, secretando citocinas anti-inflamatorias (como IL-10) que por tanto van en detrimento de la respuesta inmune celular (inhibición de IFN- γ). Si la activación de los macrófagos se presenta principalmente por esta vía esta acción promovería la cronicidad de la infección (118).

La activación celular se presenta gracias a la interacción con los receptores TLR-2, TLR-4 y TLR-9 que son determinantes en la señalización que provoca la fagocitosis de *Brucella* así como su subsecuente destrucción. Estas proteínas reconocen patrones específicos de patógenos (PAMP'S), considerados como estructuras antigénicas. En el caso de *Brucella* spp. el TLR4 detecta el LPS (lípidido A), el TLR-2 detecta las lipoproteínas de membrana y el TLR-9 detecta DNA desnudo (57, 122). La unión con estos receptores promueve el reclutamiento de moléculas de señalización, tales como MyD88, NF- κ B, TIRAP, TRIF y TICAM-2. Estas moléculas activan la cascada de señalización para la transcripción de los genes que codifican para IFN- γ , iNOS y TNF- α principalmente (122). Por su parte *Brucella* evita la interacción de receptores bacterianos con TLR's. De hecho, la entrada de *Brucella* completamente virulenta es a través de balsas lípidicas, independiente a TLR/MyD88 (118). Se ha caracterizado la proteína Btp1 de *B. abortus* como la responsable de evitar la maduración de DC a través de interferir la unión con TLR-2 (116).

Una vez que se ha procesado el antígeno este se presenta a través del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) que sigue a la posterior activación a linfocitos T, esto se ha observado principalmente en el procesamiento del LPS de cepas lisas (58). En el caso de las cepas rugosas la estimulación además se presenta por otras estructuras. En *B. ovis* las proteínas de membrana externa (principalmente las lipoproteínas) han sido descritas como estimuladoras de IL-2 e IFN- γ (123).

Como conclusión se tiene entonces que *Brucella* spp. es un microorganismo capaz de desencadenar una respuesta inmune, sin embargo la principal estrategia utilizada por este género es de evitar esta respuesta, produciendo por tanto el menor daño posible al hospedador, beneficiándose del parasitismo intracelular.

6. El fenómeno de adhesión en las bacterias.

Un factor esencial en la patogenicidad de cualquier bacteria es la capacidad que tiene ésta de adherirse a células específicas, ya que es el primer paso en la colonización e infección. Se conoce como adhesina a cualquier molécula de superficie de la bacteria capaz

de unirse a un receptor celular o un sustrato (tales como las proteínas de matriz extracelular, biomateriales, etc). Un receptor es cualquier molécula de superficie celular capaz de interactuar con la adhesina bacteriana y originar una respuesta celular. Estos son los dos componentes esenciales que conforman la adhesión de la bacteria a células. Para que una bacteria pueda adherirse a la superficie celular, y de esta manera llevar a cabo su virulencia, es necesario primero, vencer la fuerza de cargas. Tanto la superficie bacteriana como la celular tienen cargas negativas, esta fuerza de repulsión es vencida por las diferentes adhesinas. En general las adhesinas son hidrofóbicas, de esta manera pueden interactuar con la membrana extracelular. Esta primera unión (unión hidrofóbica) es reversible y débil, y en general es utilizada para exponer la superficie de ambos componentes para una unión más fuerte en donde la adhesión se vuelva irreversible (66, 124, 125).

Las adhesinas y los receptores pueden ser de diferente naturaleza química tales como lectinas, proteínas y carbohidratos (124). Existen varios mecanismos de adherencia, por medio de fimbrias o pili, por medio de proteínas de membrana externa, cápsula, LPS, o alguna combinación de éstos (125). En *Escherichia coli* se han descrito pili (prolongaciones proteináceas) que interactúan con glicolípidos o glicoproteínas de membrana (126).

6.1 El fenómeno de adhesión e invasión en el género *Brucella*.

En el caso de *Brucella* spp., sin embargo, se ha demostrado que el grado de adhesión es bajo en comparación con otras bacterias (tales como *Shigella*, *Salmonella* y *Listeria*). Es por ello que se menciona que el grado de virulencia correlaciona mejor con la capacidad de invadir a las células que de adherirse a ellas. Sin embargo, la interacción membranal entre bacteria y célula hospedadora determina el éxito de la infección además de determinar la especificidad entre las diferentes células (tropismo) (127). Las bacterias de este género son capaces de infectar una gran variedad de tipos celulares tales como linfocitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales e inclusive eritrocitos (128). Es por ello que el conocimiento de receptores específicos que indiquen la particularidad de infección cobra una gran importancia.

Como se ha mencionado con anterioridad, las especies de *Brucella* penetran a las células por una fagocitosis de tipo cremallera; sin embargo también pueden ser fagocitadas por opsonización vía activación del complemento o por receptores Fc (40, 43, 44). Bajo estas condiciones de internalización se presenta la muerte intracelular de la bacteria (activación de los mecanismos de defensa celulares). Es por ello que si se favorece la entrada a las células en base a mecanismos propios de *Brucella* esta puede invadir eficientemente y replicarse intracelularmente.

Se ha reportado que las cepas rugosas tienen mayor capacidad de adherencia que las cepas lisas, debido a su hidrofobicidad, ya que al carecer de la cadena O del LPS tienen mayor exposición de estructuras de membrana externa (43, 47). Sin embargo, a la cadena O del LPS se le ha relacionado con la capacidad de adhesión, ya que gracias a su estructura química (homopolímero de perosamina) tiene la capacidad de unirse a receptores de manosa (56). Esto indica entonces que la expresión del fenotipo rugoso representa un nuevo reordenamiento en la exposición de proteínas de membrana externa, que adquieren mayor contacto con la superficie celular; por lo que la superficie de contacto es mayor al no existir la cadena O del LPS, lo que podría significar que existen otros factores de adherencia para las cepas rugosas. Se ha observado un mecanismo de adherencia a leucocitos murinos por parte de *B. abortus* que puede ser inhibida por LPS y α -metilmanosamina, aludiendo a un mecanismo de adhesión mediado por lectinas (47). Campbell *et al.* 1994 y más recientemente Castañeda-Roldán *et al.* 2004 demostraron este tipo de adhesión por receptores de lectina y fibronectina (matriz extracelular) además de la adhesión mediada por residuos de ácido siálico y sulfatados (heparán sulfato) en la superficie de células epiteliales (56, 127). Los resultados de estas investigaciones sugieren que existen estructuras de membrana externa, además del LPS que promueven la adherencia de esta bacteria tanto en células fagocíticas no profesionales como en células fagocíticas.

Otro factor importante que se ha sugerido en la adherencia e internalización de *Brucella* spp. es la presencia del β 1-2 glucano cíclico. Debido a su hidrofobicidad, esta molécula, presente en la membrana de la bacteria, es capaz de interactuar con los microdominios lipídicos (balsas lipídicas) de la membrana celular y secuestrar el colesterol. La entrada de esta bacteria a través de las balsas lipídicas le otorga la capacidad de entrar a la célula en

una vacuola endocítica que escapa de la vía de degradación en células fagocíticas no profesionales, o de la unión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos. Esto es debido a que el endosoma/fagosoma que contiene a *Brucella* spp. está decorado con estas balsas lipídicas y por consiguiente estas estructuras moleculares no son degradadas por las células. Además se ha demostrado que dentro de las balsas lipídicas existen proteínas de señalización capaces de reordenar el citoesqueleto y de esta forma promover la internalización de *Brucella*. (6, 44, 65). Este fenómeno también se ha observado en *B. suis*, en donde además del colesterol está implicado como receptor el gangliósido GM1 (83) como factor de adhesión.

Aunque no se han descrito pili para *Brucella* spp, los genes para la formación de estas estructuras en el SSTIV están presentes (*virB2*, *virB3*, *virB4*, *virB5*) (71). Esta estructura y la funcionalidad de la misma relacionada con la adherencia no se ha determinado en *Brucella* spp. (129). La proteína VirB12 de *Brucella* representa una proteína nueva no descrita en el operón homólogo de *A. tumefaciens*. Esta proteína de 19 kDa contiene un consenso de lipoproteína que al parecer es una secuencia señal que es escindida y da una proteína funcional de 17.5 kDa. Homólogos de esta proteína han sido descritos en *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas syringae*, en estas especies la proteína F (similar a un 27% en composición nucleotídica y a un 45% de similitud en aminoácidos a la proteína VirB12) es esencial en la adhesión de las raíces de plantas a las cuales infecta (71). Se ha demostrado que esta proteína es esencial en la virulencia de *Brucella* spp., sin embargo no se ha determinado el papel de esta proteína como probable adhesina, lo cual debido a las características puede ser crucial en el proceso de adhesión. Además de lo descrito anteriormente, como factor de adherencia se ha encontrado que en *Brucella* spp. el SSTIV interviene en el reclutamiento de las balsas lipídicas para poder penetrar en los macrófagos. Kim *et al.* 2004 encontraron que *B. abortus* invade a los macrófagos murinos gracias a la interacción con la proteína SR-A (scavenger receptor A, o proteína de captación A). Este proceso es dependiente del operón *virB*, ya que regula la transducción de señales para la formación del fagosoma, proceso que además es inhibible con LPS purificado de la misma bacteria y de *E. coli* (81). En otro estudio, Watarai *et al.* 2003 demostraron un mecanismo de entrada a macrófagos también dependiente exclusivamente del operón *virB*. En esta ocasión se encontró una regulación genética de la expresión de la proteína Hsp60,

probable adhesina que interactúa con una proteína de membrana prion (PrP^C) que promueve la entrada a macrófagos (82). Parece ser entonces que el SSTIV es fundamental en el desarrollo de la infección de *Brucella* spp. y que interviene en distintas etapas de la misma, muy probablemente regulando la expresión de diversos genes de adhesión e invasión. Sin embargo, se ha discutido sobre si este mecanismo de entrada dependiente del operón *virB* permite la sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos. Es importante mencionar que la ausencia de PrP^C no inhibe la internalización de la bacteria a macrófagos, pero si inhibe su replicación. En el caso de *B. suis* el SSTIV sólo se expresa después de que el endosoma que lo contiene se ha acidificado, además sólo una fracción de la cantidad de bacteria que es internalizada escapa de la destrucción intracelular (42). A pesar de ello, la hipótesis que surge es la presencia de más de un mecanismo de adherencia a las células.

Se ha sugerido el papel de la proteína de membrana Omp2b como posible adhesina. La estructura terciaria de esta proteína es de barril- β por lo que se conoce como una porina (56). Esta proteína de membrana externa guarda un 51% a 53% de similitud con la proteína Omp43 de *Bartonella henselae*, la cual se ha descrito como adhesina a células endoteliales (14, 130). El tripéptido RGD presente en el dominio extracelular de la proteína es el que le da la capacidad de unión. Es este tripéptido el que es reconocido por receptores del tipo integrinas principalmente en leucocitos. En este estudio se comprobó que dicha secuencia era reconocida por CD11a. Esta proteína es expresada mayormente en linfocitos maduros, y en menor medida en macrófagos (56, 29).

En células epiteliales es necesaria la activación de protein-quinasas para la internalización de esta bacteria (45). El sistema de dos componentes BvrS-BvrR, también está involucrado en la adhesión, ya que las mutantes bacterianas tienen menor capacidad de activar las GTPasas (16). Como se puede observar, *Brucella* spp. se puede adherir a las células fagocíticas y no fagocíticas por diversos mecanismos, sin embargo, sobresalen los mecanismos que están mediados por glicoconjugados (glucanos cíclicos, lectinas, proteoglicanos), como se ha descrito en la mayoría de las bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Mycoplasma bovis*, *Actinobacillus* spp.) (131, 132, 133). Aunque se han descrito los mecanismos de adhesión, los diferentes receptores celulares así como las adhesinas que

participan en ésta no han sido identificadas en su totalidad, ya que se ha observado que existen varios mecanismos de adhesión para *Brucella* spp.

6.1.1. El papel de los genes *invA* e *invB* en la adhesión e invasión.

El análisis en la secuencia de la cepa 16M de *B. melitensis* ha puesto de manifiesto la existencia de los genes *invA* e *invB*. En el análisis de los aminoácidos de las proteínas correspondientes a estos genes se ha observado que guardan un 42% de identidad y un 76% de similitud con proteínas de invasión y adhesión descritas en *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bartonella bacilliformis* (IalAB) y *Rickettsia prowazekii* (InvA). De los genes de estas proteínas, únicamente el locus *ialAB* de *Bartonella bacilliformis* e *invA* de *Rickettsia prowazekii* están asociados con la invasión y sobrevivencia intracelular (134, 135). Los gen *invA* produce un polipéptido que contiene el dominio NUDIX (enzimas cuyo sustrato son dominios de nucleósidos difosfatados (NDP) unidos a otra molécula “X”). Este dominio pertenece a una familia de hidrolasas cuyo sustrato son los derivados de nucleósidos difosfatados y oligofosfatados. La función principal es la de controlar moléculas de señalización (nucleósidos de estrés, como la diadenosina tetrafosfato) que inducen estrés en la bacteria. Ejemplos de los procesos regulados por estas moléculas de señalización son el estrés oxidativo por parte de fagocitos profesionales, así como replicaciones prematuras bacterianas, por lo que el gen *invA* contribuye a la sobrevivencia de la bacteria al inactivar estas moléculas (136). Se ha descrito también que esta hidrolasa además transforma nucleótidos fosfatados en ADP y ATP (135, 137). Se ha reconocido que el locus de invasión *ialAB* presente en *Bartonella bacilliformis* es necesario para la invasión a eritrocitos. Los productos de dichos genes (170 aminoácidos de la proteína IalA, y 186 aminoácidos de IalB) actúan de manera conjunta para invadir eritrocitos de origen humano. En *E. coli* de fenotipo de mínima invasividad se encontró que este cambia únicamente a alta invasividad cuando se expresan ambos genes. El gen *ialB* expresa una proteína (19.9 kDa) que es muy parecida a la adhesina afimbrial Ail de *Yersinia enterocolitica*. En los eritrocitos la penetración de *B. bacilliformis* es independiente de actina (ya que los eritrocitos no contienen actina en su citoesqueleto). Se cree que la proteína IalA en eritrocitos tiene actividad de ATPasa por medio del cual se

presenta la internalización de la bacteria, a través de la activación de calcio en la membrana celular, lo que produce un flujo de este catión y la entrada de la bacteria (138).

El mecanismo de patogenicidad de *Bartonella* spp. en células diferentes a los eritrocitos incluye la formación del “invasoma”. Esta estructura que se forma en la superficie de las células es un acúmulo de bacterias que propician la entrada de *Bartonella* spp. a las células. Este mecanismo es dependiente de actina, y para propiciarlo *Bartonella* spp. necesita de la activación de GTPasas tales como Rho, Rac y Cdc 42 (139). Este mecanismo de invasión resulta ser muy similar al descrito en *Brucella* spp, ya que además de activar estas GTPasas para inducir un rearrreglo del citoesqueleto y producir su endocitosis, también forma microcolonias en la superficie de las células (127).

Recientemente se ha demostrado la presencia de la proteína InvB de *B. melitensis* bajo condiciones de estrés intracelular (97) y Commander *et al.* 2007 demostraron la relevancia de esta proteína como factor de invasión en *B. melitensis*, además de probarlo como inmunógeno en el modelo murino obteniendo buenos resultados (140).

Con base en el conocimiento de la adhesión e invasión de *Brucella* spp., y con el objetivo de conocer el probable papel de los genes *invA* e *invB* en la invasión y en la adhesión se propuso realizar ensayos de adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular con cepas mutantes de los genes *invA* e *invB* construidas a partir de la cepa *B. melitensis* 133, y comparar los resultados con la cepa parental.

JUSTIFICACIÓN.

Aunque se han conocido algunos mecanismos de adhesión e invasión de *Brucella* spp., no se conoce como influyen los genes *invA* e *invB* sobre estos fenómenos en las células. Por otro lado, aunque la adhesión e invasión son dos eventos diferentes se ha observado que el locus de invasión (*ialAB*) de *Bartonella* spp. influye en ambos procesos, por lo que no son mutuamente excluyentes. Mientras que el producto del gen *ialA* pertenece a una familia de hidrolasas de nucleósidos polifosfatados, el producto del gen *ialB* está relacionado con la adhesión. Ambos genes trabajan de manera conjunta, ya que se ha observado en *E. coli* con fenotipo mínimo invasivo la expresión de sólo uno de los genes, pero no ambos, no induce significativamente el fenotipo de invasión. En base a que los genes *invA* e *invB* de *Brucella melitensis* guardan un 42% de identidad y un 76% de similitud con el locus *ialAB* de *Bartonella bacilliformis* e *invA* de *Rickettsia prowazekii*, y en vista de la participación de ambos genes tanto en la invasión como en la adhesión se propone entonces conocer la participación de ambos genes tanto en la adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular de *Brucella melitensis*.

HIPÓTESIS.

Si se interrumpe el gen *invA* de *Brucella melitensis* habrá una menor capacidad de invasión pero no afectará la adhesión a células epiteliales de la mucosa oral y a macrófagos de ovino. Por otro lado, si se interrumpe el gen *invB* se verá afectada tanto la adhesión como la invasión de este patógeno en células epiteliales de la mucosa oral y a macrófagos de ovino.

OBJETIVO.

Conocer si los genes *invA* e *invB* están involucrados en los mecanismos de invasión y adhesión de *Brucella melitensis* en células epiteliales de la mucosa oral y macrófagos de ovino.

METODOLOGÍA.

Cepas bacterianas.

Se utilizó la cepa 133 de *B. melitensis* proveniente de una cabra del estado de Coahuila, México. Esta cepa fue aislada en el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. La cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-Km (resistente a kanamicina) se construyó a partir de la cepa 133 de *B. melitensis* y presenta una interrupción del gen *invA* por inserción de un casete de kanamicina. La cepa mutante *B. melitensis* 133 *invB*-Km (resistente a kanamicina) se construyó a partir de la cepa 133 de *B. melitensis* y presenta una interrupción del gen *invB* por inserción de un casete de kanamicina. Ambas cepas son el resultado del trabajo doctoral del Dr. Rigoberto Hernández Castro (141). Las cepas bacterianas se mantuvieron en agar brucella o caldo tripticasa soya. La cepa *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km y la cepa *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km se conservaron en agar *Brucella* con 50µg/ml de kanamicina.

Cultivos celulares.

Se utilizaron células de bucoepiteliales de ovino y macrófagos de sangre periférica de ovino para los experimentos de adhesión, invasión y sobrevivencia intracelular de las diferentes cepas.

Cultivo primario de células bucoepiteliales de ovino (CBO).

Las células epiteliales se obtuvieron a través de un cultivo primario utilizando el método descrito por Perrier *et al.* 2002 (142), con algunas modificaciones. Brevemente se describe a continuación: se obtuvieron muestras de tejido de mucosa oral de ovinos recién sacrificados, estas muestras se pusieron inmediatamente en medio de cultivo celular DMEM (Gibco) con penicilina 1000 U/ml, estreptomycinina 1 mg/ml y anfotericina B 10 µg/ml (Sigma), y se incubaron por 24 horas a 4° C. Posteriormente se diseccionó el

tejido conectivo del epitelial para dejar fragmentos de 1 a 1.5 cm². Los explantes resultantes se pusieron en una placa de cultivo celular de 6 pozos de 9.6 cm² por pozo, sembrando una densidad de 4 a 5 explantes por pozo. Se permitió que se adhiriera durante diez minutos para después inundar el tejido con 1 ml por pozo de medio SFKM B (medio de cultivo celular para queratinocitos (Gibco) que contenía 5% de suero fetal bovino, 0.2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 2 µg/ml de hidrocortisona y 40 µg/ml de insulina). A cada pozo se le agregaron además 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 100 µg/ml de gentamicina y 1 µg/ml de anfotericina B. Después de 48 horas de incubación a 37° C con 5% de CO₂ cada explante se sembró individualmente en pozos de 2 cm², previo lavado con solución amortiguadora de fosfatos 1x (PBS) estéril. A cada explante se le pusieron 300 µl de medio SFKM B y 10 veces la concentración de antibióticos utilizada en la primera suspensión de los tejidos (10x). La adición de antibióticos se eliminó al segundo pase del cultivo primario de células. Se cosecharon células de cada explante por 15 días cada 48 horas, posterior a la eliminación del antibiótico.

Cultivo primario de macrófagos de ovino.

La técnica utilizada para la obtención de macrófagos de ovino a través de sangre periférica es una adecuación de la técnica descrita por Gutiérrez-Pabello y Adams, 2003 (143). Brevemente se describirá la técnica empleada: se tomaron 200 ml de sangre periférica a dos borregos machos adultos sanos de la raza Dorset (100 ml por borrego) a través de punción venosa con 13 ml de solución anticoagulante estéril citratos-dextrosa (citrato trisódico 22 g, ácido cítrico 8 g, dextrosa 24.5 g, aforado a 1 L con agua destilada, todos los reactivos de Sigma), se centrifugó la sangre a 1000 g durante 30 minutos para obtener la capa de leucocitos. Del volumen recuperado se agregó medio volumen de la solución amortiguadora estéril PBS-citrato (solución amortiguadora de fosfatos 10 ml, citrato trisódico 3.72 g, aforado a 1L con agua destilada) y se mezclaron ambos volúmenes suavemente. La capa de leucocitos-PBS citrato se agregó cuidadosamente a un gradiente formado de percoll (SIGMA) con una densidad específica de 1.080 g/l. El volumen requerido para el gradiente de percoll fue la mitad de volumen de la mezcla leucocitos-PBS citrato. Posteriormente se centrifugaron los leucocitos-PBS citrato-percoll a 1000 g en una

centrífuga de columpio refrigerada durante 20 minutos, para obtener por centrifugación isopícnica los monocitos. Estos se lavaron en tres ocasiones por centrifugación con plasma autólogo y la solución PBS-citrato a 500 g por 10 minutos, con el objetivo de eliminar trazas de percoll. Posterior a la descontaminación de las células se procedió a su conteo para determinar la concentración (células totales). La concentración celular se resuspendió de 10 ml de medio CRPMI (medio para cultivo celular RPMI 1640 (Gibco) 500 ml, L-glutamina (In-vitro) 5.5 ml, MEM-aminoácidos no esenciales (In-vitro) 5.5 ml, piruvato de sodio (Sigma) 5.5 ml, bicarbonato de sodio 7.5% (In-vitro) 12 ml.) y se le agregó 10% de suero autólogo. Las células fueron puestas en placas de 24 pozos sembrando 500 µl por pozo. Las células se incubaron durante 24 horas con 5 % de CO₂ y 37° C de temperatura. Después de esta incubación se les cambió el medio a los macrófagos y el sobrenadante se utilizó para contar las células no adherentes (leucocitos diferentes a macrófagos). La concentración de macrófagos adheridos se determinó como el resultado de la sustracción de las células totales menos las células no adherentes. A los macrófagos se les cambió rutinariamente el medio, al 3° pase se les cambió el medio CRPMI con 10% de suero autólogo por medio CRPMI con 4% de suero autólogo. Los macrófagos fueron utilizados para las infecciones a los 13 días post-obtención.

Infección para determinar la adhesión e invasión a las CBO.

Para la infección de las CBO se utilizaron 50,000 células que fueron resuspendidas en tubos de 1.5 ml (infección en suspensión). Cada infección contó con un grupo de células que no se infectaron. Las células fueron inoculadas con las cepas de *Brucella melitensis* 133, o las mutantes, o resuspendidas únicamente en PBS 1x (grupo testigo negativo). Se utilizó una multiplicidad de infección de 500 bacterias por célula (MOI: 500). Posterior a la inoculación de las células, éstas se centrifugaron durante 10 minutos a 500 g. Se incubaron durante 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos a una temperatura de 37° C con 5% de CO₂ para la determinación del número de bacterias adheridas, y 30, 60, 120 y 240 minutos para la determinación del número de bacterias intracelulares. Para la determinación de bacterias adheridas, posterior al tiempo de incubación, a las células infectadas se les realizaron 3 lavados por centrifugación a 500 g por 10 minutos con PBS 1x estéril. Para la

cuantificación de las bacterias intracelulares las células infectadas fueron incubadas durante una hora con 100 µg de gentamicina (Sigma) para eliminar las bacterias extracelulares. Antes de incubar con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS 1x estéril por 10 minutos para determinar el número de bacterias intracelulares, las células infectadas fueron lavadas por centrifugación a 500 g por 10 minutos tres veces con PBS 1x estéril. A ambos grupos de células (adherida e intracelular) se les determinó la concentración bacteriana a través de dilución y siembra en agar *Brucella*. Cada infección contó con 3 réplicas y se repitió cada infección al menos 3 veces.

Infección para determinar la adhesión y sobrevivencia intracelular a macrófagos.

Para la infección de los macrófagos se utilizó una concentración de 3.5 a 4.0×10^5 macrófagos. Las infecciones se realizaron en las mismas placas en donde las células fueron sembradas (infección en placa). Cada infección contó con un grupo de células que no se infectaron. Las células fueron inoculadas con las cepas de *Brucella melitensis* 133, o las mutantes, o resuspendidas únicamente con PBS 1x (grupo testigo negativo). Se utilizó una MOI: 20. Posterior a la inoculación de las células la placa se centrifugó durante 10 minutos a 500 g. Las células se incubaron durante 0, 4, 12, 24 y 48 horas para la determinación tanto de bacterias extracelulares (adherida) como de bacterias intracelulares. Para la determinación de las bacterias intracelulares los pozos fueron incubados durante una hora con 100 µg de gentamicina (Sigma) para eliminar las bacterias adheridas (a excepción de la hora 0). Antes de incubar con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS 1x estéril por 10 minutos para determinar el número de bacterias intracelulares, las células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS 1x estéril. Para la determinación de bacterias totales después del tiempo de incubación, los grupos de células fueron lavados 5 veces para eliminar el mayor número de bacterias extracelulares. Después se incubó con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS 1x estéril por 10 minutos. A ambos grupos de células (intracelular y total) se les determinó la concentración bacteriana a través de diluciones e inoculación en placas de agar *Brucella*. La concentración de bacterias adheridas resultó de la sustracción de las bacterias totales menos las bacterias intracelulares. Cada infección contó con 3 réplicas y 3 repeticiones independientes.

Protocolo de inmunofluorescencia.

Para las CBO se utilizó poli-L-lisina como polímero de adhesión a cubreobjetos circulares especiales para inmunofluorescencia. Después de la infección se fijaron los cubreobjetos con metanol a -20°C o con paraformaldehído (PFA), subsecuentemente se lavaron los cubreobjetos y, si se fijó con PFA, se utilizó NH_4Cl 50mM en PBS 1x para bloquear los radicales libres. Para bloquear los receptores Fc se utilizó PBS 1x-saponina 0.1% más 10% de suero de equino. Se marcaron las bacterias que se encontraron adheridas a la membrana celular a través de la incubación con anticuerpos primarios, en donde se incubaron las células con IgG anti-*Brucella* de ratón a una dilución 1:1000 en PBS 1x-saponina 0.1% más 5% de suero de equino por 30 minutos. Después de un lavado PBS 1x-saponina 0.1%, los cubreobjetos se incubaron con Alexafluor 488 goat-antimouse en una dilución 1:1000 realizada en PBS-saponina 0.1% más 5% de suero de equino por 30 minutos. En el caso de los grupos de células que no se inocularon (testigo negativo) se utilizó el anticuerpo PAN-anticytokeratin (Sigma) para marcar los filamentos intermedios de citoqueratina, por lo que se permeabilizó la membrana celular con PBS-saponina 0.1% más 5% de suero de equino por 40 minutos. Después del lavado con PBS-saponina 0.1% los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo anticitoqueratina diluido 1:100. Para obtener los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS-saponina 0.1%, una vez en PBS 1x, y una vez en agua corriente y se montaron los cubreobjetos en portaobjetos especiales agregando $7\mu\text{l}$ de mowiol, dejando secar durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron visualizados con un microscopio de inmunofluorescencia en los objetivos 40x y 100x con aceite de inmersión.

Estudio estadístico.

Para el análisis de los resultados del experimento de adhesión e invasión de cada grupo celular se diseñó un modelo factorial con comparación de grupos de tratamiento e inferencia a través de la prueba de Tukey. Se trabajó con un nivel de significancia esperado de 0.05.

RESULTADOS.

Resultados de las infecciones en células bucoepiteliales de ovino (CBO).

Se comprobó la naturaleza epitelial de las CBO en todas las infecciones realizadas, ya que en el grupo testigo negativo de cada infección realizada más del 90% de las células se tiñeron con el anticuerpo contra los filamentos intermedios de citoqueratina (Fig. 1a). Se comprobó el fenómeno de adhesión de las cepas que participan en este experimento con las CBO a través la técnica de inmunofluorescencia (Fig 1b, 1c), indicando entonces que existe una interacción entre ambas células.

La infección producida por las diferentes cepas probadas en este trabajo demuestra la interacción que existe entre *B. melitensis* 133 (BM 133), *B. melitensis* 133 *invA*-Km (BM 133 *invA*-Km) y *B. melitensis* 133 *invB*-Km (BM 133 *invB*-Km) y la membrana celular de las CBO. Esta adhesión ha sido comprobada con la técnica de inmunofluorescencia (fig. 1b, 1c). En el conteo de bacterias intracelulares no se aisló ninguna colonia en el agar, por lo que se concluye que las diferentes cepas no invadieron a las CBO en los diferentes tiempos de incubación probados. Esto pudo deberse principalmente a las características de las CBO ya que son células terminales en franco proceso de muerte celular. Estas células mantienen su estructura; sin embargo, el metabolismo celular se encuentra disminuido (144) haciendo improbable que las cepas bacterianas utilicen los mecanismos celulares necesarios para poder sobrevivir en ellas. Los resultados del conteo de bacterias adheridas en las infecciones de las CBO se muestran en el cuadro 1 y en la figura 2:

Cuadro 1. Promedio y desviación estándar del número de bacterias adheridas por célula bucoepitelial de ovino.

Cepa	Tiempo de incubación en minutos.					
	5	15	30	60	120	240
BM <i>invB</i> -Km	0	16.8 +/-5.5	11.5 +/-4.4	20 +/-6.3	7.04 +/-2.3	4.4 +/-1.7
BM <i>invA</i> -Km	0	13.3 +/-0.5	77.3 +/-16.4*	205.3 +/-78.5*	5.8 +/-1.9	6.5 +/-2
BM 133	0	11.5 +/-3.5	32 +/-1.5	18 +/-5.3	8.2 +/-0.9	5.4 +/-1.4
T	0	0	0	0	0	0

*Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes. BM 133: *Brucella melitensis* 133, BM *invA* Km: *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km, BM *invB* Km: *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km T: control negativo. Inóculo: 500 bacterias por célula. El valor con asterisco (*) es estadísticamente significativo.

Durante los primeros 5 minutos de infección se observa que no hay adhesión a la membrana celular. Los tiempos de infección subsecuentes demuestran que la adhesión bacteriana de las tres cepas es estadísticamente similar entre ellas a excepción de la adhesión de la cepa BM 133 *invA*-Km a los 30 y a los 60 minutos respectivamente ($p < 0.05$). Se ha determinado que desde los primeros 5 minutos de infección *Brucella* spp. tiene interacción con la membrana de células epiteliales, creando las condiciones para producir su internalización (44). Bajo el esquema seguido en este experimento se demuestra que el fenómeno de adhesión para *B. melitensis* empieza a los 15 minutos de infección y que existe una adhesión homogénea de las tres cepas a los 15, 120 y 240 minutos. Recordando que la MOI fue de 500, a los 15 minutos se observó que para las tres cepas existió un porcentaje de adhesión promedio del 3%, a los 30 y 60 minutos de infección, las cepas BM 133 y BM 133 *invB*-Km, presentaron un porcentaje de adhesión del 4% y a los 120 y 240 minutos existió un porcentaje de adhesión del 1% para todas las cepas. En los resultados de los dos últimos tiempos de infección probados (120 y 240 minutos) se observa que el fenómeno de adhesión empieza a disminuir (porcentaje de adhesión 1%). Aunque no es estadísticamente significativo se puede predecir el comportamiento de la infección después de los 240 minutos, las células bacterianas empiezan a desprenderse de la membrana celular probablemente a las características de las células empleadas. Los resultados demuestran que no hay diferencia en la adhesión de la cepa BM 133 y la cepa BM 133 *invB*-Km, por lo que la mutación en el gen *invB* probablemente no interfiere en el proceso de adhesión de *B. melitensis* en las CBO. Por otro lado los resultados en la adhesión de la cepa BM 133 *invA*-Km a los 30 minutos (porcentaje de adhesión del 15.5%) y 60 minutos (porcentaje de adhesión del 41.2%) indica una mayor adhesión (estadísticamente significativa) en contraste con BM 133 *invB*-Km y BM 133. A los 60 minutos de infección casi la mitad del inóculo (205.3 UFC/CBO) se encuentra adherido a la membrana celular. Posterior a los 60 minutos de infección la concentración de bacterias adheridas vuelve a ser similar a las cepas BM133 y BM 133 *invB*-Km. Este resultado muestra que la interrupción del gen *invA* aumenta significativamente la adhesión de *Brucella melitensis* a los 30 y 60 minutos post-infección.

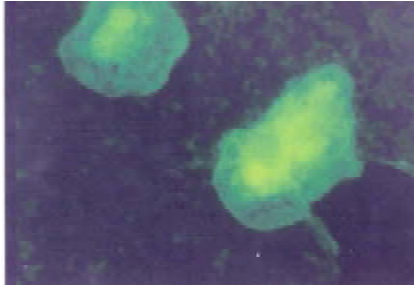


Fig 1a

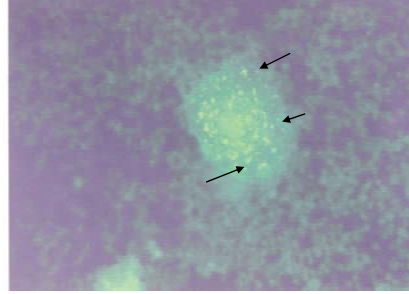


Fig 1b

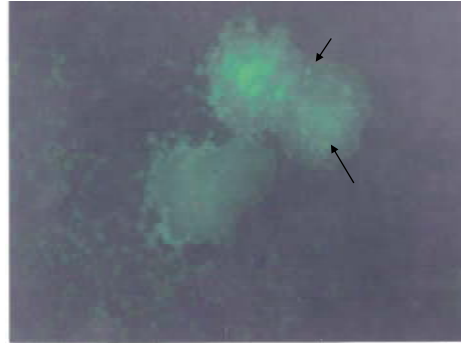


Fig 1c

Figura 1. Resultados de inmunofluorescencia de la infección de las células bucoepiteliales de ovino (CBO). Los cubreobjetos fueron visualizados en un microscopio de inmunofluorescencia bajo el objetivo 100x. Figura 1a: CBO que sirvieron de control negativo en las infecciones mostrando marcaje de filamentos intermedios de citoqueratina. Figura 1b: célula que muestra bacterias adheridas a su membrana celular (infección de CBO con BM 133 con un tiempo de infección de 15 minutos). Figura 1c: célula que muestra bacterias adheridas a su membrana celular (infección CBO con BM 133 con un tiempo de infección de 240 minutos). Las flechas indican la posición de las bacterias.

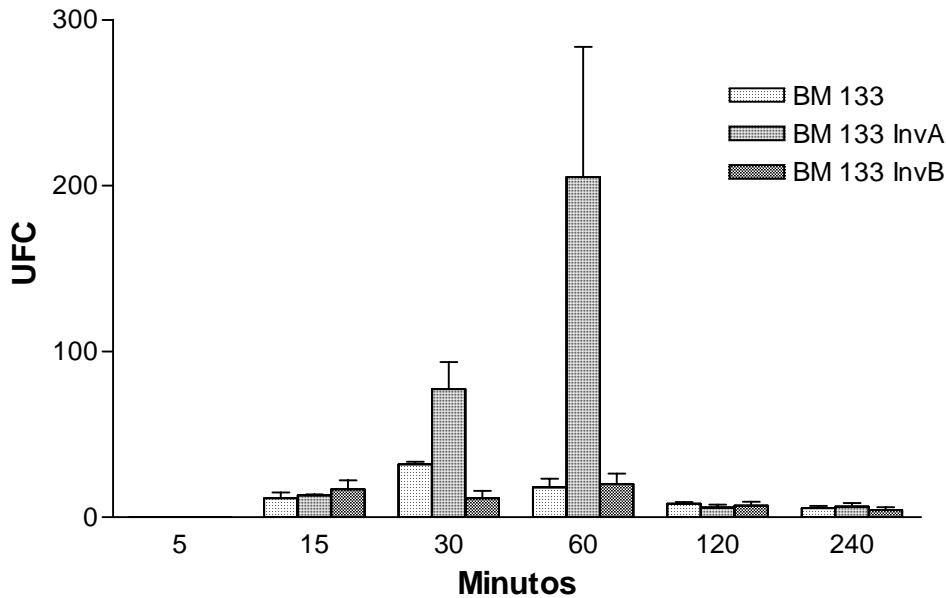


Figura 2. Número de bacterias adheridas por célula bucoepitelial (CBO) de 5 a 240 minutos postinfección por *Brucella melitensis* 133 (BM 133), *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km (BM 133 InvA) y *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km (BM 133 InvB). La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes.

Resultados de las infecciones en los macrófagos de ovino.

Para las infecciones en los macrófagos de ovino se homogeneizaron los resultados de todos los ensayos de infección en 5.6×10^5 células. Debido a las características celulares los macrófagos no pudieron despegarse una vez que se encontraban en los pozos donde fueron sembrados. Es por ello que la concentración celular en cada infección varió de 5.3×10^5 células a 6.0×10^5 células. Se determinó la viabilidad celular en base a su capacidad adherente. En total se realizaron cinco infecciones con tres repeticiones distintas con los tiempos de incubación 0, 4, 12, 24 y 48 horas para la evaluación de las capacidades de adhesión y sobrevivencia intracelular. Los resultados de las infecciones se muestran en el cuadro 2 para la concentración bacteriana adherida y en el cuadro 3 para la concentración bacteriana intracelular.

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar del número de bacterias ($\times 10^4$) adheridas en 5.6×10^5 macrófagos.

Cepa	Tiempo de incubación en horas.				
	0	4	12	24	48
BM <i>invB</i> -Km	5.9 +/- 0.22	0.88 +/- 0.075	210 +/- 90	500 +/- 4*	550 +/- 8.6*
BM <i>invA</i> -Km	1.8 +/- 0.075*	2.9 +/- 1.1	110 +/- 8.8	190 +/- 6.3*	200 +/- 2.7*
BM 133	6.8 +/- 0.87	11 +/- 1.4*	52 +/- 6.5	66 +/- 5.5*	43 +/- 3.1*
T	0	0	0	0	0

*Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes. BM 133: *Brucella melitensis* 133, BM *invA*-Km: *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km, BM *invB* Km: *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km T: control negativo. Inóculo: 20 bacterias por célula. El valor con asterisco (*) es estadísticamente significativo.

Cuadro 3. Promedio y desviación estándar del número de bacterias intracelulares ($\times 10^4$) en 5.6×10^5 macrófagos.

Cepa	Tiempo de incubación en horas.				
	0	4	12	24	48
BM <i>invB</i> -Km	5.9 +/- 0.22	0.43 +/- 0.18	4.0 +/- 0.81*	13 +/- 0.8	18 +/- 1.7*
BM <i>invA</i> -Km	1.8 +/- 0.075*	1.0 +/- 0.43	1.2 +/- 0.17	0.9 +/- 0.071*	0.82 +/- 0.06*
BM 133	6.8 +/- 0.87	1.0 +/- 1.4	1.6 +/- 0.81	11 +/- 1.7	14 +/- 0.35*
T	0	0	0	0	0

*Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes. BM 133: *Brucella melitensis* 133, BM *invA*-Km: *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km, BM *invB* Km: *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km T: control negativo. Inóculo: 20 bacterias por célula. El valor con asterisco (*) es estadísticamente significativo.

Los resultados en la hora cero representan el índice de infección, esto significa que es el número de bacterias que se adhirieron y entraron a los macrófagos a partir del inóculo original. Si se toma como referencia la concentración de bacterias de la cepa parental (BM 133) que infectaron a los macrófagos (6.8×10^4 : 100%) se obtiene que para la cepa BM 133 *invA*-Km existió un porcentaje de infección de 26.4% y para BM 133 *invB*-Km un porcentaje de infección de 86.8%. La capacidad de infección de la cepa BM 133 *invA*-Km es estadísticamente menor ($p < 0.05$) que las cepas BM 133 y BM 133 *invB*-Km. Esta tendencia se mantiene durante todos los tiempos de infección probados donde se evalúa la capacidad de invasión y sobrevivencia intracelular. La cepa BM 133 *invA*-Km tiene una menor capacidad de invasión y sobrevivencia intracelular en los macrófagos de ovino (Fig. 3).

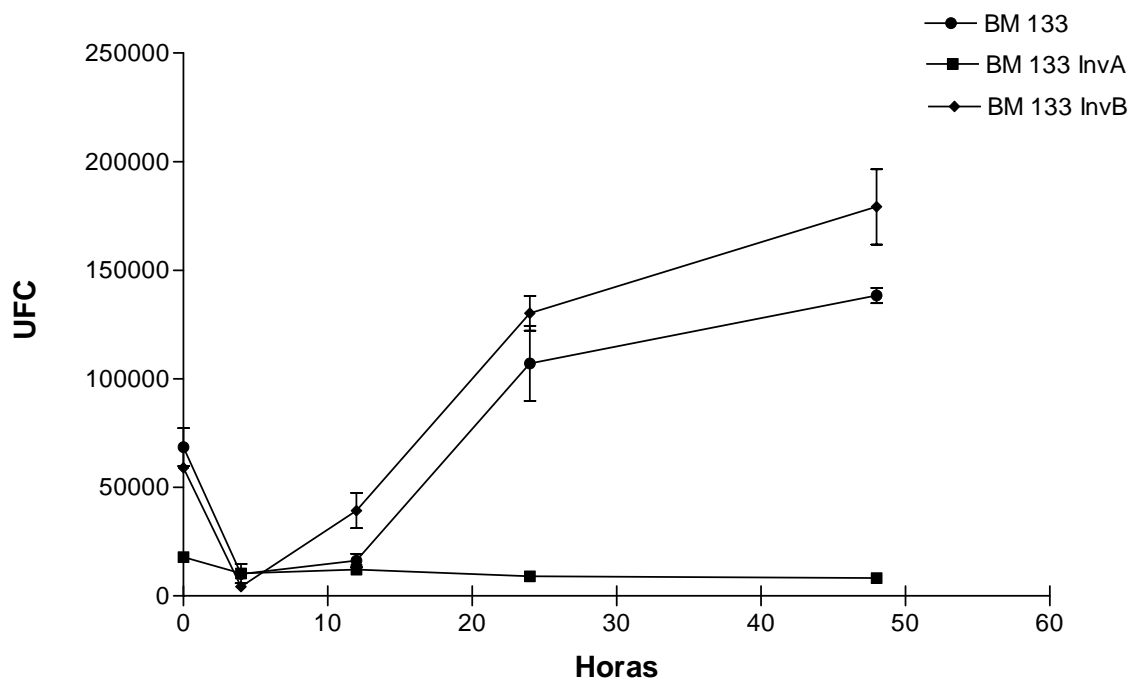


Figura 3. Número de bacterias intracelulares en los ensayos con los macrófagos (inóculo: 20 bacterias por célula). *Brucella melitensis* 133 (BM 133), *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km (BM 133 InvA) y *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km (BM 133 InvB). Las barras indican la desviación estándar

A las 4 horas post-infección se observa una caída en el número de bacterias intracelulares para todas las cepas. Este periodo corresponde a la muerte intracelular de una proporción importante de la bacteria que ha invadido a los macrófagos. Este hecho ha sido observado en repetidas ocasiones por diversos investigadores (40, 47, 62, 88). Posterior a las 4 horas post-infección tanto la cepa BM 133 como la cepa BM 133 *invB*-Km tienen un comportamiento ascendente en el número de bacterias intracelulares. La replicación bacteriana es evidente después de las 12 horas post-infección para estas dos cepas. La cepa BM 133 *invB*-Km tiene una capacidad mayor de sobrevivencia y replicación intracelular que la cepa parental ($p < 0.05$) a las 12 y 48 horas respectivamente. Sin embargo ambas cepas tienen comportamientos de replicación intracelular muy similares entre sí. La cepa BM 133 *invA*-Km no logra sobrevivir intracelularmente, por lo que este resultado sugiere que el gen *invA* es determinante en la virulencia de *B. melitensis* en macrófagos ovinos. Por el otro lado, en base a los resultados se observa que el gen *invB* no es determinante en la virulencia de *Brucella melitensis* en macrófagos de ovino. De hecho la mutación del gen *invB* produce una mayor capacidad de sobrevivencia y replicación intracelular a las 48

horas (1.8×10^5) que la cepa parental (1.4×10^5), por lo que podría sugerir un cambio en la expresión de los factores de virulencia en beneficio de la bacteria.

Como se ha mencionado la adhesión es importante ya que, en el caso de bacterias intracelulares, promueve la invasión bacteriana (125). En el caso de *Brucella* spp. la forma de entrada a las células determina el éxito de la infección, para de esta forma pasar desapercibida por los mecanismos de defensa intracelulares (99, 114, 118). En relación con este trabajo se observa cómo la adhesión en las primeras 4 horas es homogénea para las cepas BM 133 *invA*-Km (2.3×10^4) y BM 133 *invB*-Km (8.8×10^3). En contraste la cepa parental se adhiere en mayor proporción que las cepas mutantes ($p < 0.05$) a las 4 horas post-infección (Fig. 4).

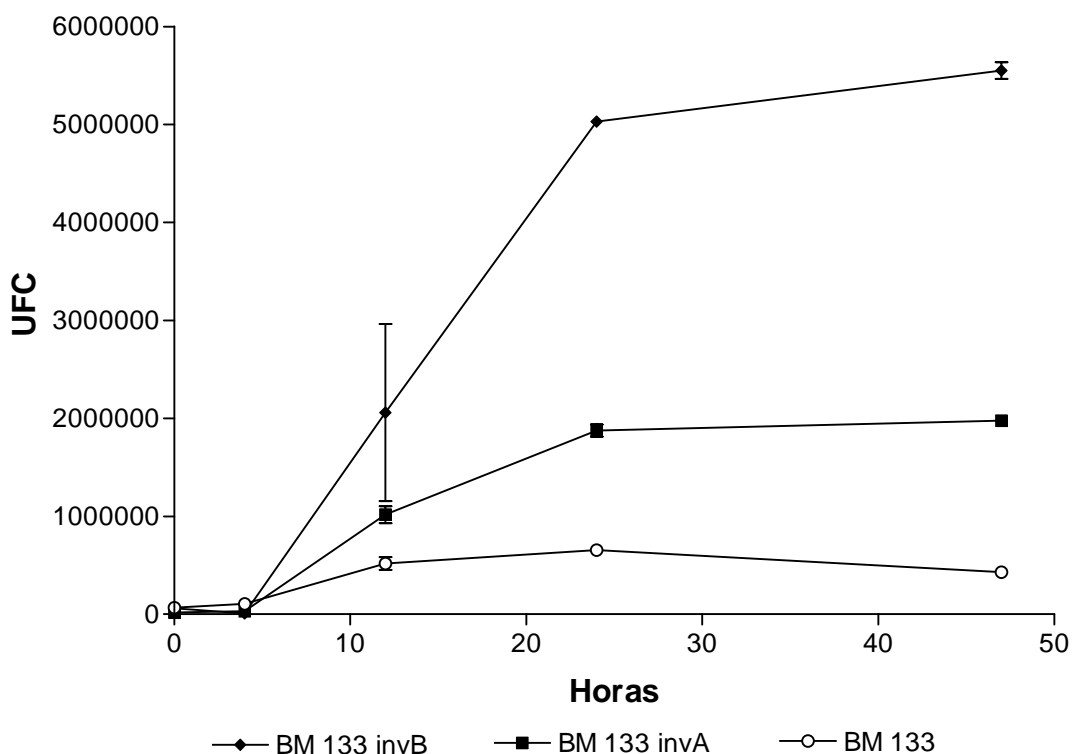


Figura 4. Número de bacterias adheridas en los ensayos con los macrófagos (inóculo: 20 bacterias por célula). *Brucella melitensis* 133 (BM 133), *Brucella melitensis* 133 *invA*-Km (BM 133 InvA) y *Brucella melitensis* 133 *invB*-Km (BM 133 InvB). Las barras indican la desviación estándar.

A las 12 horas post-infección se observa que todas las cepas presentaron diferentes concentraciones de bacteria adherida, que si bien resultan ser dramáticas gráficamente no son estadísticamente diferentes (debido en parte por la desviación estándar en los resultados de adhesión de la cepa BM 133 *invB*-Km ($p > 0.05$)). Posterior a las 12 horas post-infección la cepa BM 133 *invB*-Km se adhiere a los macrófagos de ovino de 7.5 (24 horas post-infección) a 12.8 (48 horas post-infección) veces más que la cepa parental (BM 133), y en el caso de la cepa BM133 *invA*-Km se adhiere a los macrófagos de 2.8 (24 horas post-infección) a 4.6 (48 horas post-infección) veces más ($p < 0.05$). Este resultado indica que la mutación de los genes *invA* e *invB* aumentó significativamente las propiedades de adhesión de *Brucella melitensis*.

DISCUSIÓN.

Las especies del género *Brucella* son capaces de invadir intracelularmente tanto a células fagocíticas como no fagocíticas. Debido a que son bacterias intracelulares han desarrollado mecanismos muy particulares de virulencia para poder sobrevivir intracelularmente explotando la maquinaria celular en su beneficio, causando el menor daño posible al hospedador. La invasión y sobrevivencia intracelular son claves en el desarrollo de la infección para la posterior replicación intracelular. La interacción entre la bacteria y las células del sistema mononuclear fagocítico anterior a la invasión es determinante en el éxito de la infección, pues si la bacteria es fagocitada por macrófagos o células dendríticas las probabilidades de sobrevivencia intracelular disminuyen drásticamente, ya que se activan los mecanismos para destruir a las mismas y presentar los antígenos a las células T. Es por ello que *Brucella* debe promover la internalización bajo sus propias condiciones (2, 5, 40, 43, 44, 47, 88, 114, 118). En el caso de las células epiteliales la infección en las mismas contribuye a la diseminación de la bacteria entre los diferentes tejidos (incluyendo a los trofoblastos, lo que contribuye a la patología reproductiva característica). Además, se ha observado la capacidad de *Brucella* spp. de adherirse a proteínas de matriz extracelular, que por tanto contribuye a la diseminación de la infección (127, 128). Aunque hay un gran avance en el conocimiento de los mecanismos de adhesión que inicia la invasión a las células todavía no se conoce exactamente como *Brucella* spp. determina el tropismo por un determinado tipo celular, y debido a que este género infecta tanto células no fagocíticas como células fagocíticas el conocimiento de adhesión cobra una gran importancia (6, 14, 16, 42, 44, 45, 47, 56, 65, 71, 81, 82, 83, 124, 127, 129, 130).

Los resultados expuestos en este trabajo demuestran la capacidad de BM 133, BM 133 *invA*-Km y BM 133 *invB*-Km de adherirse a macrófagos ovinos, a células epiteliales de mucosa oral de ovino (CBO) y de sobrevivir y replicarse en macrófagos de ovino. Se decidió utilizar las CBO ya que no se conoce con exactitud el papel de las células epiteliales orales en la infección por *Brucella* spp. Estas bacterias son capaces de infectar cualquier mucosa, y debido a las características del hospedador, la mucosa oral juega un papel muy importante (ingestión de alimentos contaminados, en el caso de consumo humano). En los ovinos y caprinos (hospedadores definitivos de *Brucella melitensis*) la

mucosa oral se encuentra en contacto con una gran variedad de patógenos, debido al continuo contacto con el suelo. Es por ello importante la evaluación de la mucosa oral en la infección por *Brucella* spp. Por ser una vía de entrada de muchos patógenos, la mucosa oral se encuentra provista de tejido linfoide (tonsilas palatinas y sublinguales) además de que por otro lado la propia saliva contiene elementos microbicidas, tales como defensinas y lisozimas (145). Los queratinocitos orales son capaces de presentar la molécula MHC II en su superficie, capaces de producir citocinas tales como IL-1 e IL-8 por lo que se cree que estas células son inmunológicamente activas y capaces de presentar antígenos (142, 145). Para poder producir enfermedad, el patógeno debe romper con las barreras fisiológicas que le impiden infectar a las células. En el caso particular de *Brucella* spp. se conoce que la infección por la vía oral produce infección en los linfonodos retrofaríngeos, parotídeos y submandibulares además de invadir a las células epiteliales de la mucosa intestinal, así como de células dendríticas y macrófagos tisulares (tejido linfoide asociado a mucosas). Por tanto la infección oral es una vía importante para la entrada de *Brucella* spp. (60, 84, 85). Una vez dentro de la región gástrica *Brucella* spp. puede resistir el pH ácido del estómago y de la región gastroduodenal (85). Durante este experimento no se observó que las diferentes cepas bacterianas invadieran a las CBO, probablemente a las características de senilidad celular observadas en las mismas. Sin embargo, la adhesión a las CBO pone de manifiesto la capacidad de *B. melitensis* de infectar éstas células. Debido a que estas células pueden ser inmunológicamente activas es probable que además de diseminar la infección a través de la mucosa oral también exista la posibilidad de la presentación de antígenos y que exista un proceso inflamatorio en este nivel. Futuras investigaciones dilucidarán este hecho.

Se decidió utilizar macrófagos debido a que son éstas células, junto con las células dendríticas, el nicho ecológico definitivo de *Brucella* spp. (39, 47). Por ser los ovinos hospedadores definitivos de *B. ovis* y ocasionales de *B. melitensis* se decidió utilizar un cultivo primario de macrófagos de esta especie animal con el objetivo de conocer la relevancia en la infección por *B. melitensis*. Aunque es bien conocido el comportamiento de la infección en macrófagos murinos, por ser el modelo celular más ampliamente utilizado, la importancia en la infección de células de los hospedadores definitivos puede traer a la luz un conocimiento más acertado de lo que ocurre *in vivo*.

En cuanto al fenómeno de adhesión en las CBO se puede observar una adhesión baja por parte de BM 133 (de 5.4 a 32 bacterias adheridas por CBO) y BM 133 *invB*-Km (de 4.4 a 20 bacterias adheridas por CBO) en proporción al inóculo utilizado (MOI: 500). Para BM 133 *invA*-Km existió una adhesión significativamente mayor a los 30 minutos (77.3 bacterias adheridas por CBO) y 60 minutos (205.3 bacterias adheridas por CBO) post-infección. Aunque estas cepas bacterianas no pudieron invadir a las CBO, se sabe que la invasión a células epiteliales ocurre dentro de los primeros 5 minutos de infección (96). No es la proporción de bacterias adheridas lo que favorece la invasión sino la especificidad de la unión con los receptores celulares, lo que además determina el tropismo celular (124). La adhesión de *Brucella* spp. en células epiteliales está relacionado con moléculas que contienen residuos de ácido N-acetil-neuramínico, así como de heparan sulfato (127). El mayor número de bacterias adheridas en el caso de BM 133 *invA*-Km corresponde probablemente a un mayor número y exposición de moléculas de adhesión que hacen que haya una mayor predilección por la superficie celular epitelial. Esto también se observó en los macrófagos, en donde a las 24 y 48 horas la adhesión de BM 133 *invA*-Km fue de 2.8 a 4.6 veces mayor que la cepa parental, mientras que para BM 133 *invB*-Km fue de 7.5 a 12.8 veces mayor que la cepa parental. En las células epiteliales no se observa que BM 133 *invB*-Km tuviera una adhesión estadísticamente mayor en ninguno de los tiempos probados. Parece ser que el aumento en la adhesión de BM 133 *invB*-Km es evidente después de 12 horas post-infección, aludiendo también a un efecto en la exposición de ligandos bacterianos. Para este tipo celular se ha encontrado receptores específicos para *Brucella* como GM1, PrP^C y SR-A, en un mecanismo mediado por balsas lipídicas, que interactúan con el LPS y Hsp60 (82, 83, 146). Es importante mencionar que ambos tipos celulares son muy diferentes entre sí fisiológicamente, y por tanto, no se pueden extrapolar conclusiones entre los resultados de adhesión de un tipo celular y otro. Considerando que la invasión se presenta como la primera etapa de la infección, la adhesión que contribuye a la invasión bacteriana es importante entonces dentro de esta etapa. La adhesión que ocurre posterior a este tiempo (después de los 30 minutos post-infección) puede que no suceda de manera natural en la infección por *Brucella* spp. y que por tanto no contribuya efectivamente a la virulencia del género. En infecciones *in vitro* se ha reportado que *B. abortus* y *B. melitensis* tienen la capacidad de adherirse y de formar microcolonias en la membrana celular de células epiteliales y de macrófagos hasta por 72 horas post-infección (127). En ese estudio

se demostró, por observación con microscopia electrónica, que las bacterias que formaban las microcolonias cambiaron de morfología (de morfología cocobacilar a una morfología más redondeada) en tiempos posteriores a las 48 horas post-infección, y que se desarrolló un efecto citopático en las células (127). Como la mayoría de los experimentos de invasión contempla la eliminación de bacterias adheridas, por medio de tratamiento con gentamicina, para evaluar invasión y sobrevivencia intracelular, este efecto no es observable. Como se puede notar, la adhesión es un fenómeno que es irreversible (uniones covalentes ligando-receptor) y que continúa en el transcurrir del tiempo de infección (124). Sin embargo, debido al número de bacterias puede existir una competencia dinámica entre los receptores. Si se ocupan todos los receptores celulares, como pudiera presentarse en infecciones *in vitro*, pueden existir efectos adversos en la membrana celular hospedadora, afectando de esta manera la adhesión de las bacterias. En este trabajo se observó que BM 133 disminuyó la adhesión en células epiteliales de 120 a 240 minutos (de 8.2 a 5.4 bacterias por CBO) y de 24 a 48 horas en macrófagos (de 6.6×10^5 a 4.3×10^5). Estos resultados pueden sugerir entonces un efecto adverso en la membrana celular hospedadora (como se mencionó anteriormente), que no es observable en las cepas mutantes. En contraste la adhesión observada posterior a las 4 horas post-infección en macrófagos y después de los 15 minutos post-infección en células epiteliales puede representar una mayor capacidad de interacción con los receptores celulares en el caso de las cepas mutantes. Esta mayor adhesión puede deberse entonces a cambios en la morfología, expresión y/o número de ligandos bacterianos. Debido a que en las cepas mutantes hay una gran adhesión bacteriana en comparación con la cepa parental este probable efecto adverso sobre la membrana celular hospedadora no es observable, sin embargo en la infección de macrófagos se puede observar en la cinética de adhesión de BM 133 *invA*-Km y BM 133 *2invB*-Km que después de 24 horas la concentración bacteriana adherida tiende a estabilizarse (Figura. 4), y en CBO la adhesión de ambas cepas mutantes disminuye drásticamente después de los 60 minutos postinfección, inclusive llegando a ser igual que la adhesión de la cepa parental (Figura. 2). Para comprobar que el aumento en la capacidad de adhesión de las cepas mutantes es debido a cambios de la membrana procariótica será necesario realizar un análisis de las proteínas de membrana externa y comparar con la cepa parental.

Hasta la fecha se han caracterizado alrededor de 200 genes y marcos abiertos de lectura (ORF'S) involucrados con la virulencia de *Brucella* spp, la mayoría localizada en el cromosoma I. La secuenciación de *B. melitensis* 16M puso de manifiesto la presencia de 716 ORF'S que no tienen asignación (ya sea por su poca caracterización o por su similitud con genes de otros microorganismos), de estos BMEI1584 (*invB*) y BMEI0215 (*invA*) son el objeto de este estudio (11). Estos genes muestran un 76% de similitud y un 42% de identidad con el locus de invasión *ialAB* de *Bartonella bacilliformis* y del gen *invA* de *Rickettsia prowazekii*. El gen BMEI0215 (*invA*) produce un polipéptido presuntivo de 178 aminoácidos. Se conoce como un gen cuyo producto es una pirofosfohidrolasa perteneciente a las proteasas con dominio MutT, cuyo sustrato son dinucleósidos polifosfatados, estas son moléculas de señalización intracelular. Estas hidrolasas se conocen también como hidrolasas NUDIX (hidrólisis de nucleósidos difosfatados unidos a otra molécula "X") por lo que se describe como una invasina. Además se trata de una metaloproteasa pues necesita Mg o Zn para ser activa (135, 136 137). Este ORF se encuentra flanqueado por los genes BMEI0216 corriente arriba y BMEI0214 corriente abajo. El gen BMEI0216 produce una proteína hipotética transglicosilada con una posible localización en la membrana interna, cuya mutación produce disminución en la invasión en células epiteliales (147). Corriente abajo se encuentra el gen BMEI0214. Según la conformación de aminoácidos este gen produce una proteasa de acción periplásmica. La transcripción del gen *invA* se presenta de 5' a 3', corriente arriba el gen BMEI0216 se transcribe de manera opuesta, por lo que la atenuación observada en macrófagos se debe a la mutación de *invA* y no al efecto polar de BMEI0216. Por otro lado el gen BMEI1584 (*invB*) produce un polipéptido presuntivo de 173 aminoácidos. Es una proteína pobremente caracterizada, sin embargo en bacterias del género *Bartonella* spp. forma, conjuntamente con el gen *ialA*, el locus de invasión *ialAB* esencial para la invasión a eritrocitos humanos (138), en *Yersinia enterocolitica* el gen *ail* (con el que guarda un 63% de similitud) se describe como una adhesina afimbrial (148). Esta proteína se encuentra en la membrana interna de la bacteria, contiene una secuencia señal de peptidasa en el extremo N terminal (138). La transcripción de este gen es de 5' a 3'. Se encuentra flanqueado por los genes BMEI1585 corriente arriba y BMEI1583 corriente abajo. El gen BMEI1585 produce una bomba de eflujo dependiente de sodio. Esta bomba está relacionada con el desecho de complejos tóxicos, tales como antibióticos. Corriente abajo, el gen BMEI1583 codifica para

una histidina cinasa. Esta proteína está involucrada en la reparación del ADN debido al daño oxidativo. Corriente arriba el gen BMEI1585 se transcribe de manera opuesta (3' a 5'), por lo que los efectos observados en este trabajo (mayor adhesión después de las 12 horas que la cepa parental, así como una mayor sobrevivencia y replicación intracelular en macrófagos) corresponde a la mutación del gen *invB* descartando un efecto polar en BMEI1585. Como puede observarse los genes que flanquean tanto a *invA* como a *invB* están relacionados con la reparación del daño oxidativo y con la invasión. Ambos genes están flanqueados corriente arriba por proteínas membranales y en ambos casos estas proteínas se transcriben de manera opuesta. Caro-Hernández *et al.* 2007 y Manterola *et al.* 2007 observaron que la mutación de Omp31 y Omp25 en *B. abortus* y *B. ovis* aumenta la expresión membranal de omp's de la misma familia. Este efecto se describe como compensatorio y la restauración del gen por complementación no produce una expresión de proteínas de membrana externa iguales a la cepa parental (89, 90). Debido a que la invasión es un proceso altamente regulado por *Brucella*, y aunque no existe un efecto polar en los resultados observados por las mutantes, no se descarta que la mutación de ambos genes no afectara la expresión de BMEI0216 y de BMEI585, y de otras proteínas membranales. Esto pudiera explicar porqué la mutación de *invA* e *invB* produce una adhesión significativamente mayor tanto en CBO, como en macrófagos, al estar expuestos en mayor proporción posibles ligandos bacterianos. Para validar esta hipótesis se propone la realización de un perfil proteico membranal de las cepas BM 133 *invA*-Km y BM 133 *invB*-Km, y compararlas con la cepa parental BM 133.

Según la descripción de estos genes (*invA* e *invB*), se puede notar la participación de ambos en el fenómeno de invasión y sobrevivencia intracelular. En la evaluación de estos fenómenos en la infección de los macrófagos de ovino se puede observar que el índice de infección es significativamente menor para BM 133 *invA*-Km en comparación con BM 133 *invB*-Km y que con BM 133 (Cuadro 3, Figura. 3). Esta menor invasión tiene repercusiones en el desarrollo de la infección, pues en todos los tiempos probados la mutante BM 133 *invA*-Km no logra sobrevivir y replicarse intracelularmente en los mismos niveles que la cepa BM 133 *invB*-Km ni que la cepa parental. El gen *invA* está relacionado directamente con la invasión al promover la sobrevivencia intracelular, ya que limita la concentración de nucleósidos polifosfatados relacionados con actividades

antimicrobianas relacionadas con el estrés oxidativo (divisiones prematuras celulares, inducción de muerte bacteriana e inhibición de los canales de transporte de ATP sensibles a potasio) (135, 136). Además se ha demostrado en *Rickettsia prowazekii* que la hidrólisis por InvA produce ATP, que es utilizada como fuente de energía en las infecciones por este patógeno (135). Si dentro de *B. melitensis* este gen también participa en la generación de ATP utilizable como energía, pudiera ser que fuera una fuente importante de obtención de energía después de la internalización. Por tanto se ven afectadas dos funciones principales atribuidas a la mutación de *invA*, que es el control de moléculas de estrés oxidativo y la generación de energía. Esto puede explicar entonces porque la mutación de este gen produce el fenotipo avirulento en macrófagos ovinos. Gracias a estas evidencias se puede decir entonces que la transcripción de este gen es de crucial importancia para la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis*, como se puede observar en la atenuación debido a la mutación. Hasta la fecha no se ha reportado ningún trabajo donde se estudie la contribución del gen *invA* en la virulencia del género, por lo que este es el primer reporte donde se observa que la contribución del gen *invA* es determinante en la virulencia de *B. melitensis*, ya que la mutación de este gen produce un fenotipo avirulento en macrófagos ovinos. En contraste para la mutante BM 133 *invB*-Km existió una mayor capacidad de invasión a macrófagos ovinos a las 12 horas post-infección y una mayor replicación intracelular a las 48 horas postinfección que la cepa parental (cuadro 3, figura 3). La mutación del gen *invB* no contribuyó a desarrollar un fenotipo avirulento, de hecho existió un aumento significativo de la replicación celular a las 48 horas post-infección en comparación con la cepa parental, indicando entonces un aumento en la virulencia. El gen *invB* produce una proteína de localización membranal que en *Bartonella* spp. está relacionado con la invasión y en el caso de *Yersinia enterocolitica* está relacionado con la adhesión (138, 148). La expresión de este gen en *B. melitensis* está relacionada con la invasión, pues no se ha determinado la expresión de este gen anterior a la invasión (97). En relación a los genes que flanquean a *invB* el gen BME1585 es de llamar la atención debido a que forma una bomba capaz de desintoxicar a la bacteria. Aunque existe una transcripción opuesta ambos genes pueden estar participando de manera conjunta en la eliminación de factores dañinos (metabolitos reactivos de oxígeno, enzimas etc.), en este aspecto *invB* pudiera estar funcionando como una proteína sensora. En *Brucella* spp. participan muchos factores en la captación de señales externas que determinan la transcripción génica

adecuada para la adaptación al ambiente hostil intracelular. Evidencias de ello está la participación del operón *virB*, el sistema de dos componentes BvrS-BvrR, así como las proteínas directamente involucradas en la señalización intracelular como DnaK y GroEL (16, 70, 97). Esto puede explicar la falta de atenuación de la cepa BM 133 *invB*-Km, ya que *Brucella melitensis* no es dependiente de un solo mecanismo en la detección de señales de estrés intracelular. Con respecto al aumento en la invasión y replicación intracelular observada en este trabajo, la mutación de *invB* pudo haber desencadenado una mayor expresión en los demás factores de invasión, debido a que es un proceso genético altamente regulado (95), esto podría explicar el aumento en la virulencia en la infección de los macrófagos ovinos.

Hasta la fecha sólo existe un reporte de la proteína *invB* donde se analizan sus capacidades inmunogénicas. Commander *et al.* 2007 demostraron, a través de una vacuna de ADN, que *invB* podía proteger de un desafío virulento de *B. melitensis* a ratones Balb/c (140). Por otro lado, en este trabajo los resultados observados en los macrófagos de ovino demuestran que *invB*, no contribuye significativamente a la virulencia de la especie.

CONCLUSIONES.

El gen *invA* de *B. melitensis* es esencial en la virulencia, ya que la mutación de este gen afecta la sobrevivencia intracelular en macrófagos de ovino. La mutación del gen probablemente afecta dos funciones principales que son la obtención de energía relacionado a las condiciones de estrés intramacrofágico y la destrucción de nucleósidos polifosfatados relacionados con actividades antimicrobianas. La adhesión que contribuye a la invasión de esta cepa no se ve afectada (primeras 4 horas post-infección en macrófagos de ovino), sin embargo la adhesión aumentada de esta cepa (posterior a las 4 horas post-infección, y principalmente en células epiteliales de la mucosa oral a los 30 y 60 minutos post-infección) puede deberse principalmente a la afectación en la síntesis de estructuras de membrana celular, tales como BMEI0216 asociado a una proteína transglicosilada y BMEI0214 relacionada con una proteasa de acción periplásmica. Esta afectación en la transcripción génica puede no deberse específicamente a la mutación de *invA* sino a que la invasión es un fenómeno altamente regulado.

El gen *invB* de *B. melitensis* no contribuye de manera esencial en la virulencia, ya que la mutación no afectó las capacidades de invasión y sobrevivencia intracelular en macrófagos de ovino. El aumento en la replicación intracelular a las 12 y 48 horas post-infección pudo deberse al efecto compensatorio en la sobreexpresión de otros factores de virulencia. Se cree que se trata de una proteína cuya función es sensora, debido a su localización en la membrana interna y a la transcripción de los genes que se encuentran tanto corriente arriba como corriente abajo de este gen (genes relacionados con la defensa del daño oxidativo). El aumento en la capacidad de adhesión puede deberse a la afectación en la transcripción de genes relacionados con estructuras de la membrana celular (el gen BMEI1585 es una bomba de eflujo relacionada con la eliminación de tóxicos). La adhesión que contribuye a la invasión no se vio afectada, indicando que *invB* no contribuye a la adhesión de la especie. Al igual que en el caso del gen *invA* la afectación en la transcripción génica pudo deberse principalmente a que la invasión es un fenómeno altamente regulado.

PERSPECTIVAS

Para confirmar que el gen *invA* realmente es indispensable en la invasión y sobrevivencia intracelular será necesario realizar ensayos de invasión y sobrevivencia intracelular en macrófagos de ovino con la restauración del gen en la cepa mutante (complementación).

Para confirmar la teoría de que la adhesión aumentada en las cepas mutantes se debe a una afectación en la expresión de estructuras de membrana externa de *B. melitensis*, será necesario realizar un perfil proteico de la membrana celular de las cepas mutantes y compararlas con la cepa parental BM 133.

Se ha probado las características inmunogénicas de la proteína *invB*. Debido a que en este reporte se demuestra que la interrupción del gen no disminuye la virulencia, se propone evaluar el tránsito intracelular y realizar infecciones en ratones para probar si se provoca una mayor respuesta inmunológica que la cepa parental BM 133.

LITERATURA CITADA

1. López Merino A. Capítulo 7. *Brucella* En Microbios en línea. Editores: Martínez-Romero E. Martínez-Romero JC. Centro de Investigación Sobre la Fijación del Nitrógeno. Disponible en: URL: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>.
2. Clarridge JE. Miscellaneous gram-negative cocobacilli: *Pasteurella*, *Francisella*, *Bordetella* and *Brucella*. En: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF *et al.* (editores). *Clinical and Pathogenic Microbiology 2nd*. Ed. Mosby-Year Book Inc.1994.
3. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3: 213-221.
4. Walker RL. Chapter 37. *Brucella*. En Hirsch DC, Zee CY. (editores) *Veterinary Microbiology Blackwell science*. Massachusetts E.U. 1999.
5. Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 1990; 17: 209-229.
6. Briones G. Factores de virulencia de *Brucella abortus*: caracterización bioquímica y genética del glucano 1-2 cíclico y estudio de su participación en la virulencia. Universidad nacional de gral. De San Martín. Instituto de investigaciones biotecnológicas. Tesis de doctorado 2001.
7. Suárez Güemes F. Capítulo de introducción. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
8. Subcommittee on taxonomy of *Brucella*. International Committee on Systematics of Prokaryotes 2006 ICSP. Disponible en URL: <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>.
9. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jaques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; (11): 2688-2693.
10. Capítulo 19. *Haemophilus*, *Bordetella*, *Brucella*. En. Brooks GF., Butel JS., Morse SA. (Editores). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.*, Ed. El manual moderno. 2002 México.
11. DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 2002 (90); 587-592.

12. Paulsen IT, Seshadri R *et al.* The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 99; (20):13148-13153.
13. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005 187; (8): 2715-2726.
14. Gándara B, López-Merino A, Rogel MA, Martínez-Romero E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2001 39; (1): 235-240.
15. De Hertogh B, Lahlimi L, Lambert C, Letesson JJ, Depiereux E. Design and implementation of a database for *Brucella melitensis* genome annotation. *Vet. Microbiol.* 2008; (127): 369-378.
16. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Jesús GM, 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. *Mol. Microbiol.* 1998 (29); 1: 125-138.
17. Zygmunt M, Hagijs S, Walker J, Elzer P. Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microb. Infect.* 2006; (8): 2849-2854.
18. Wu Q, Pei J, Turse C, A Ficht T. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiol.* 2006; (6). Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/102>.
19. Delrue R.M, Lestrade P, Tibor A, Letesson J.J, De Bolle J. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004 (231); 1-12.
20. Matthew SD. Comparative genome analysis of three *Brucella* spp. and a data model for automated multiple genome comparison. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Biology. 2003: 1-60.
21. Ratushna GV, Sturgill MD, Ramamoorthy SA, Reichow S, He Y, Lathigra R, Sriranganathan N, Halling MS, Boyle MS, Gibas JC. Molecular targets for rapid

- identification of *Brucella* spp. BMC Microbiol. 2006 (6):13. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/13>.
22. Parkhill JM, Sebahia A, *et al.* Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat. Genet. 2003; (35): 32–40.
 23. Chain P, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Agüero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. Infect. Immun. 2005; 73 (12): 8353–8361.
 24. Morales-Álvarez JF. Epididimitis ovina. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano-Reynoso B, *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
 25. Norma oficial mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.
 26. Lopez G, Escobar GI, Ayala SM, Lucero NE. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. Vet. Microbiol. 2006 (116): 232-238.
 27. 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.
 28. Pérez JL, Aparicio ED, Pérez-González R, Adams GL. Evaluación serológica de la vacuna rugosa rfbk de *Brucella abortus* en un hato de bovinos con brucelosis. Téc. Pec. México. 1999 37; (2): 1-10.
 29. Aparicio ED, Leal-Hernández M, Cantú-Covarrubias A. Brucelosis bovina. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
 30. Aparicio ED. Pruebas diagnósticas en brucelosis caprina. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
 31. Vásquez-Navarrete J. Diagnóstico de la brucelosis canina (*B. canis*) y preparación de antígenos rugosos. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L,

- Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
32. Elizalde-Castañeda P, Paredes-Medina JC. Brucelosis porcina. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
 33. Stournara A, Minas A, Bourtzi-Chatzopoulou E, Stack J, Koptopoulos G, Petridou E, Sarris K. Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Vet. Microbiol.* 2007; (119): 53-64.
 34. Pfeiffer CR. Diagnóstico de brucelosis bovina por medio de fluorescencia polarizada. En Diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
 35. Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous Detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect Dis.* 2007 (60): 137-139.
 36. Grimont E, Verger JM, Cornelis P, Limet J, Lefevre M, Grayon M, Regnault B, Van Broeck J, Grimont P. Molecular typing of *Brucella* with cloned ADN probes. *Res. Microbiol.* 1992 143; (1): 55-65.
 37. Vemulapalli R, McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; (6): 760-764.
 38. Martínez-Chavarría LC, Verdugo-Rodríguez A, Hernández-Castro R. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. *Vet. Méx.* 2006, 37 (4):479-486.
 39. Billard E, Cazevieuille C, Dornand J, Gross A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infec. Immun.* 2005 73; (12): 8418-8424.

40. Pizarro Cerdá J. Asociación de patógenos bacterianos a células eucariotas: el caso del parasitismo intracelular de *Brucella abortus*. Rev. Costarric. Cienc. Med. 1999; 20: 1-2.
41. Pizarro CJ, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. Infect. Immun. 1998; (66) 2387-2392.
42. Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Microbiol. 2004; (7): 93-97.
43. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in non phagocytic cells in vitro. Infect. Immun. 1990 (58); 7: 2320-2328.
44. Jiménez de Bagües MP, Gross A, Terraza A, Dornand J. Regulation of the mitogen-activated protein kinases by *Brucella* spp. expressing a smooth and rough phenotype: relationship to pathogen invasiveness. Inf. Immun. 2005 (73); 5: 3178-3183.
45. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 2002; 90: 281-297.
46. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ, Genus *Brucella*. En: Krieg NR, Holt JG (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology vol.1 The Williams and Wilkins, Baltimore. 1984: 377-388.
47. Pizarro Cerdá J, Moreno E, Gorvel JP, *Brucella abortus* invasion within professional and non professional phagocytes. En: Gordon S (editor): Phagocytosis: microbial invasion Serie: Advances in cellular and molecular biology of membranes and organelles. cap. 10 201-232. Ed. Elsevier. Cleveland 1999.
48. Fernández-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop II RM, Robertson GL, Hoover DL. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O polysaccharides inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. Infect. Immun. 2003; 71; 2110-2119.
49. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. Ann. Inst. Pasteur. 1987; 138: 84-87.
50. Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liataurd JP, Dornand J. Live *Brucella* spp. fail to induce tumour necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. Infect. Immun. 1994; (62): 5267-5274.

51. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Walters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16s rRNA and lipid A reveal phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class proteobacteria. *J. Bacteriol.* 1990 172; 3569-3576.
52. Moriyón I, López-Goñi I. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. En *Diagnóstico de brucelosis animal*. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B *et al.* (editores). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México 2000.
53. Moriyón I, López-Goñi I. Structures and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int. Microbiol.* 1998; (1): 19-26.
54. Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; (8): 60-66.
55. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ, Meikle PJ, Perry MB, Peters T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect. Immun.* 1989; (57): 2829-2836.
56. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; (41): 295-306.
57. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philip MT. Lipoproteins, not lipopolysaccharides, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 2004; 173: 4635-4642.
58. Forestier C, Moreno E, Méresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, Gorvel JP. Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect. Immun.* 1999; 67 (8): 4048-4054.
59. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosome genesis and inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003 (71); 1481-1490.
60. Pei J, Ficht TA. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect. Immun.* 2004 (72) 440-450.
61. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of

- lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infec. Immun.* 2000; 68 (10): 5716-5723.
62. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes. Infect.* 2001; 3: 43-48.
63. Csonka LN, Hanson AD. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991; (45): 569-606.
64. Breedveld MW, Miller K. Cyclic glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 1994; (58): 145-161.
65. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. Cyclic B-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 2005 (6); 6: 618-625.
66. Mañes S, Del Real G, Martínez C. Review. Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; (3): 557-568.
67. Munro S. Lipid rafts: illusive or elusive. *Cell.* 2003; (115): 377-388.
68. Hanfoum S, He HT, Hoessli C. Microdomains in lymphocyte signaling: beyond GPI-anchored proteins. *Trends. Immunol.* 2000; 21(2) 1-6.
69. Zupan JR, Ward D, Zambryski P. Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 1998; (1): 649-655.
70. O'Callaghan, Cazevielle C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne G, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. A homologue of *Agrobacterium tumefaciens* VirB, and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 1999; (33): 1210-1220.
71. Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, *et al.* Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.* 2002; (90): 341-348.
72. Patey G, Qi Z, Bourg G, Baron C, O'Callaghan D. Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* virB8 and a pSB102 virB8 homologue allows heterologous complementation. *Infec. Immun.* 2006; 74 (8): 4945-4949.
73. Rajashekara G, Glover DA, Banai M, O'Callaghan D, Splitter GA. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (*virB4*), GR024 (*gale*), and

- GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infect. Immun.* 2006; 74 (5): 2925–2936.
74. Porte, F., Liautard, J.P. and Kohler, S. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.* 1999; (67): 4041–4047.
75. Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, Makino S, Shirahata T, Watarai M. *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. *FEMS. Microbiol. Lett.* 2004 (234); 289-295.
76. Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infect. Immun.* 2008; (76): 130–137.
77. García-Rolán H, Tsolis RM. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. *Infect. Immun.* 2007 75; (6): 2965–2973.
78. Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Ficht TA. Aerosol infection of BALB/c mice with *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* and protective efficacy against aerosol challenge. *Infect. Immun.* 2007 75; (10): 4923–4932.
79. Kahl-McDonagh MM, Elzer PH, Hagius SD, Walker JV, Perry QL, Seabury CM, Den Hartigh AB, Tsolis RM, Adams LG, Davis DS, Ficht TA. Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine* 2006 (24): 5169–5177.
80. Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 2006 (74); 7: 4048–4057.
81. Kim S, Watarai M, Suzuki H, Makino S, Kodama T, Sibirata T. Lipid Rafts microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb. Pathog.* 2004 (37); 11-19.
82. Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* 2003 198; (1): 5-17.

83. Naroeni A, Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside GM1 in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.* 2002 70; (3): 1640–1644.
84. Sangari FJ, Seoane A, Rodríguez MC, Agüero J, García-Lobo JM. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect. Immun.* 2007 75; (2): 774–780.
85. Bandara AB, Contreras A, Contreras-Rodriguez A, Martins AM, Dobrean V, Poff-Reichow S, Rajasekaran P, Sriranganathan N, Schurig GG, Boyle SM. *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 2007; 7 (57).
86. Lamontagne J, Butler H. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J. Proteome. Res.* 2007; (6): 1519-1529.
87. Köhler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, Liautard JP. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet. Microbiol.* 2002 (90); 299-309.
88. Rittig MG, Alvarez-Martínez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B. Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect. Immun.* 2001 (69); 6: 3995-4006.
89. Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, De Miguel MJ, Moriyón I, Grilló MJ, López-Goñi I, Moreno E. The BvrR-BvrS outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect. Immun.* 2007 175; (10): 4867-4874.
90. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, De Miguel MJ, Martín-Martín AI, Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis* *Infect Immun.* 2007; 75: (8) 4050–4061.
91. Boigegrain, R. A., I. Salhi, M. T. Alvarez-Martinez, J. Machold, Y. Fedon, M. Arpagaus, C. Weise, M. Rittig, B. Rouot. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect. Immun.* 2004 (72): 5693–5703.
92. Delpino MV, Cassataro J, Fossati CA, Goldbaum FA, Baldi PC. *Brucella* outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes. Infect.* 2006; (8): 1203-1208.

93. Paulley JT, Anderson ES, Roop MR II. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance for chronic infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 2007 75; (11): 5248-5254.
94. Bellaire BH, Elzer PH, Hagius S, Walker J, Baldwin CL, Roop RM. II Genetic organization and iron-responsive regulation of the *Brucella abortus* 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis operon, a cluster of genes required for wild-type virulence in pregnant cattle. *Infect Immun* 2003 (71) 1794–1803.
95. Martínez M, Ugalde RA, Almirón. Irr regulates brucebactin and 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis, and is implicated in the oxidative stress resistance and intracellular survival of *Brucella abortus*. *Microbiology.* 2006 (152), 2591–2598.
96. Roop II MR, Robertson GT, Ferguson GP, Milford LE, Winkler ME, Walker GC. Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the brucellae to their intracellular home. *Vet. Microbiol.* 2002; (90): 349-363.
97. Teixeira-Gomes AP, Cloeckert A, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun.* 2000 (68): 5 2954–2961.
98. Sha Z, Stabel TJ, Mayfield JE. *Brucella abortus* catalase is a periplasmic protein lacking a standard signal sequence. *J. Bacteriol.* 1994 (176) 7375–7377.
99. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classical virulence genes. *Vet. Microbiol.* 2008 128; 1-14.
100. Loisel-Meyer S, Jiménez de Bagüés MP, Bassères E, Dornand J. Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. *Infect. Immun.* 2006; 74 (3) :1973–1976.
101. Haine V, Dozot M, Dornand J, Letesson JJ, De Bolle X. NOTES. NnrA Is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (4): 1615–1619.
102. Delpino MV, Estein SM, Fossati CA, Baldi PC, Cassataro J. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 2007 25; (37-38): 6721-6729.

103. Roux CM, Booth NJ, Bellaire BH, Gee JM, R. Roop RM II, Kovach ME, Tsolis RM, Elzer PH, Ennis DG. RecA and RadA proteins of *Brucella abortus* do not perform overlapping protective DNA repair functions following oxidative burst. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (14): 5187–5195.
104. Hornback ML, Roop RM II. The *Brucella abortus xthA-1* gene product participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (4): 1295–1300.
105. Martin RR., Gee JM., Robertson TG., Richardson JM. *Et al.* *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003 57: 57-76.
106. Delory M, Hallez R, Letesson JJ, De Bolle X. An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (21): 7707–7710.
107. Posadas DM, Martín FA, Sabio y García JV, Spera JM, Delpino MV, Baldi P, Campos E, Cravero SL, Zorreguieta A. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence *Infect. Immun.* 2007, (75); 1: 379–389.
108. Léonard S, Ferooz J, Haine V, Danese I, Fretin D, Tibor A, De Walque S, De Bolle X, Letesson JJ. FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 2007 189; (1): 131–141.
109. Fretin, D, Fauconnier, A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM. Danese I, Vandenhautte J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell. Microbiol.* 2005; (7): 687–698.
110. Kaper JB, Sperandio V. Minireview. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 2005 73; (6): 3197–3209.
111. Uzureau S, Godefroid M, Deschamps C, Lemaire J, De Bolle X, Letesson JJ. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* 2007 189; (16): 6035–6047.

112. Comerci DJ, Altabe S, De Mendoza D, Ugalde RA. *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J. Bacteriol.* 2006 188; (5): 1929–1934.
113. Conde-Alvarez R, Grilló MJ, Salcedo SP, De Miguel MJ, Fugier E, Gorvel JP, Moriyón I, Iriarte M. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell. Microbiol.* 2006 8; (8): 1322-1335.
114. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE* 2(7): e631. doi: 10.1371/journal.pone.0000631. Disponible en URL: <http://www.plosone.org>.
115. Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky GO. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. *Vet. Méx* 2001, 32; (2): 131-139.
116. Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, Muller A, Lapaque N, Demaria O, Alexopoulou L, Comerci DJ, Ugalde RA, Pierre P, Gorvel JP. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* 2008 4(2): e21. doi:10.1371/journal.ppat.0040021. Disponible en URL: <http://www.plosone.org>.
117. Billard E, Dornand J, Gross A. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect. Immun.* 2007, 75; (10): 4980-4989.
118. Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria brucella: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critic. Rev. Immunol.* 2006, 26; (5):407–442.
119. Kim S, Lee DS, Watanabe K, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.* 2005, 5: (22) doi:10.1186/1471-2180-5-22. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/22>.

120. Erdogan S, Celik S, Aslantas O, Kontas T, Ocak S. Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis*-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. Res. Vet. Sci. 2007, 82; 181–186.
121. Wyckoff III JH. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 2002 (90); 395-415.
122. Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E.. MyD88-dependent activation of B220_CD11b_LY-6C_ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. J. Immunol. 2007: 5182-5191. Disponible en URL: <http://www.jimmunol.org>.
123. Salas-Téllez E, Núñez del Arco A, Tenorio V, Díaz-Aparicio E, De La Garza M, Suárez-Güemes F. Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon- γ in mice. Can. J. Vet. Res. 2005, 69; 53-57.
124. Chapter1. Principles of bacterial adhesion. En Ofek I., Doyle RJ. Bacterial adhesion to cells and tissues. Ed.. Chapman and Hall. New York, 1994.
125. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: a molecular approach 2nd Ed. ASM Press, Virginia USA 2002.
126. Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald D, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. Vet. Microbiol. 2002 (84); 231-241.
127. Castañeda-Roldán EI, Avelino FF, Dall AM, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón J. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. Cell. Microbiol. 2004 (6); 5: 435-445.
128. Rocha-Gracia RA, Castañeda-Roldán EI, Giono-Cerezo S, Girón J. *Brucella* spp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. FEMS. Microbiol. Lett. 213 (2002) 219-224.
129. Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Ahmed AK, Poner C, Krall L, Domke N, Baron C. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. J. Biol. Chem. 2005; 280(28): 26349-26359.

130. Burgess WOA, Paquet JY, Letesson JJ, Anderson BE. Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb. Pathog.* 2000 (29); 73-80.
131. Cravioto A, Gross RJ, Scotland M, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 1979 (3); 95-99.
132. Thomas A, Sachse K, Farnir F, Dizier I, Mainil J, Linden A. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. *Microb. Pathog.* 2003 (34); 141-148.
133. Hammer-Barrera R, Godínez D, Enriquez IV, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zúñiga R, Talamas-Rohana P, Suárez-Güemes F, De la Garza M. Adherence of *Actinobacillus plueurooneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can. J. Vet. Res.* 2004; (68): 33-41.
134. Coleman SA, Minnick MF. Establishing a direct role for *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*ialB*) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect. Immun.* 2001; (69) 7: 4373-4381.
135. Gaywee J, Xu W, Radulovic S, Bessman MJ, Azad AF. The *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) encodes a nudix hydrolase active on adenosine (5′)-pentaphospho-(5′)adenosine. *Moll. Cell. Proteomics.* 1.3 2002 (179-185). Disponible en URL <http://www.mcponline.org>.
136. Cartwright JL., Britton P., Minnick MF., MacLennan AG. The *ialA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (di)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 (256); 474-479.
137. Gaywee J, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. Transcriptional analysis of *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) during host cell invasion. *Infect. Immun.* 2002 (70); 6346-6354.
138. Mitchell SJ, Minnick MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect. Immun.* 1995 (63); 1552-1562.
139. Dehio C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2004 (58); 365-390.

140. Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine* 2007 (25); 43–54.
141. Hernández-Castro R. Caracterización de genes de invasión celular de *Brucella melitensis*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México D.F. 2007.
142. Perrier S, Kherratia C, Deschaumes S, Ughetto J, Kemeny L. Il-1ra and Il-1 production in human oral mucosa epithelial cells in culture: differential modulation by TGF- β 1 and Il-4. *Clin. Exp. Immun.* 2002 (127); 53-59.
143. Gutierrez-Pabello JA, Adams GL. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. *Vet. Méx.* 2003 (34); 277-281.
144. Lebedinger M, Lehner T. Characterization of mononuclear cells in the human oral mucosa. *Arch. Oral. Biol.* 1981; (26): 1041-1049.
145. Villarroel-Dorrego M, Speight PM, Barrett AW. Expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y moléculas co-estimuladoras en carcinomas orales in vitro. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; (10): 188-195.
146. Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. Mini-review. *Res. Microbiol.* 2006, 157; 93–98.
147. Hernández-Castro R, Verdugo-Rodriguez A, Puente JL, Suárez-Güemes F. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization on HeLa cells. *Microb. Pathog.* 2008, (1): 28-33.
148. Miller VL, Falkow, S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 1988, 56: 1242–1248.