



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“Desarrollo de mutantes *virB* de *Brucella ovis*, para su
estudio en los modelos celular y murino”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA**

P R E S E N T A:

MARISELA LEAL HERNÁNDEZ

Tutor

EFRÉN DÍAZ APARICIO.

Comité Tutor

FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES.

ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTÉZUMA.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

- A mis padres **Estela Hernández** y **Fernando Leal**, por todo que me han enseñado y por que sin su apoyo no lo hubiese logrado una vez más, infinitamente gracias LOS AMO.
- A **Frida Isabel** y **María Fernanda** porque son la razón más grande en mi vida para no desistir, porque las quiero y quiero lo mejor para ustedes mis pequeños pretextos.
- A **Wilfrido** porque eres parte mi vida, sin tu apoyo no sería tan fácil gracias por tu amor, comprensión y por estar cuando te necesito TE AMO.
- A mi hermana **Blanca** por tener la gran paciencia y el inmenso amor para mis pequeñas gracias por tu tiempo.
- A mis hermanos **Fernando, Imelda** y **Angel** que cada día que pasa es un reto más el poder convivir con ustedes, que las diferencias no permitan que estemos lejos.
- A **Cecy, Isaac** y **Dianita** por formar parte de mi vida y por darle sentido a esos pequeños momentos mis pinochos los quiero.

Le doy las gracias a DIOS por permitir que formen parte de mi familia los
quiero a todos.

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Efrén Díaz Aparicio por la invitación a formar parte de este trabajo, tu ayuda y apoyo brindado.
- Dr. Francisco Suárez Güemes por todo el apoyo recibido.
- Dr. Rodolfo Ugalde, Dr. Diego Comerci y Dr. Rodrigo Sieira por su valiosa ayuda para la obtención de las mutantes.
- Dr. Víctor Tenorio por toda la asesoría cuando la necesito y por su amistad gracias.
- Dr. Alejandro de la Peña por sus oportunas correcciones.
- Dra. Idalia Enríquez por que no me dejaste desistir gracias.
- Dr. Rigoberto Hernández por tu apoyo, amistad, ayuda y paciencia que siempre tienes para explicarme las cosas.
- Dra. Beatriz Arellano y Jorge Alva por su ayuda en los cultivos celulares.
- MC Gaby Palomares por toda tu ayuda y tu amistad Gracias.
- Dr. Enrique Salas por tu ayuda y consejos gracias.
- Dra. Cynthia González por tu amistad mil gracias.
- MVZ. Rafael Pérez Gracias porque se puedo contar contigo.
- Sara Nieto por tu amistad y ayuda incondicional.
- MC Pedro Mejía por tu amistad y consejos gracias.
- A todas las personas que en algún momento de este trabajo me ayudaron (Dr Aguilar, Dr Jesús, Antonio V, Nayeli, René Soto, Sr Lupe, Gicela), Gracias.
- A los miembros de mi jurado, por sus oportunas correcciones para mejorar la calidad de este trabajo.
- Al INIFAP por permitirme hacer uso de sus instalaciones
- A la UNAM por permitirme seguir con mi formación académica.
- Este trabajo fue financiado con recursos del proyecto “Patogenicidad molecular de *Brucella melitensis* y *Brucella ovis*: Bases para el desarrollo de nuevos inmunógenos”, CONACyT 45271 IV.

ÍNDICE	PÁGINA
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
1.1 <i>Brucella ovis</i>	2
1.2 Tránsito intracelular	3
1.3 Factores de virulencia	8
1.3.1 LPS	8
1.3.2 Glucano Cíclico β -1,2	9
1.3.3 Sistema de Secreción Tipo IV <i>virB</i>	9
1.4 Inmunidad	14
1.4.1 Celular	14
1.4.2 Humoral	16
Justificación	18
Antecedentes	18
Hipótesis	19
Objetivos	19
Material y Métodos	20
Resultados	33
Discusión	49
Conclusiones	58
10. Recomendaciones	59
Referencias	60

LISTA DE FIGURAS

Figura	PÁGINA
1a. Modelo del tráfico en <i>Brucella</i> .	6
1. b. Modelo de la evasión de la muerte lisosomal a través de la expresión de factores de virulencia.	7
2. Esquema del sistema <i>virB</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	12
3. Amplificación de los genes del operón <i>virB</i> de <i>B. ovis</i> .	33
4. Amplificación del gen <i>virB4</i> .	34
5. Amplificación de las mutantes de <i>B. ovis</i> .	37
6. Representación esquemática de las mutaciones inducidas dentro del operón <i>virB</i> .	37
7. Curva de desarrollo exponencial de las cepas de <i>B. ovis</i> .	39
8. Sobrevivencia intracelular de <i>B. ovis</i> en macrófagos ovinos.	42
9: Promedios de las densidades ópticas del ELISA Indirecto para la evaluación de la respuesta inmune a <i>B. ovis</i> .	44
10. Respuesta de citocinas inducida en ratones inoculados con <i>B. ovis</i> .	46
11. Recuperación de bacterias viables de bazos a los diferentes tiempos post-infección en ratones inoculados intraperitonealmente con las cepas de <i>B. ovis</i> .	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro	PÁGINA
1.- Plásmidos y cepas bacterianas utilizadas en este estudio.	20
2. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar los genes del operón <i>virB</i> .	22
3. Condiciones utilizadas para cada juego de iniciadores	23
4. Porcentaje de homología de los fragmentos amplificados del operón <i>virB</i> de <i>B. ovis</i> , con el de brucelas lisas.	35
5. Cuantificación de las UFC/ml durante la cinética de desarrollo de las cepas de <i>B. ovis</i> .	38
6. Resultados del conteo de los cultivos semilla de las cepas utilizadas para realizar las infecciones en células y ratones.	40
7. Promedios de UFC/ ml recuperadas a los diferentes tiempos post-infección, de bazos en ratones inoculados intraperitonealmente con <i>B. ovis</i> .	48

RESUMEN

El operón *virB* es esencial para la sobrevivencia y multiplicación intracelular de las brucelas lisas, ya que al realizar mutaciones de este sistema se ha observado una menor habilidad de sobrevivir y multiplicarse en ratones, macrófagos, células epiteliales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inmune, sobrevivencia y replicación intracelular de las mutantes *virB* de *Brucella ovis*. Mediante PCR se realizó la identificación de los genes: *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* y *orf13-orf12* del operón *virB* de *B. ovis*, en los cuales se observó una identidad de 96 al 100% con las secuencias reportadas de brucelas lisas. Se generaron dos mutantes no polares con resistencia a gentamicina, una por inserción en el gen *virB10*, (*virB10::Gm*) y una mutante por delección del gen *virB11* (Δ *virB11*). La virulencia residual de las mutantes se determinó mediante los conteos de UFC de la semana 1 a la 5 post-inoculación, en bazo de ratones Balb/c inoculados con 2×10^{12} UFC. Las cepas Reo 198 y la silvestre sólo se recuperaron durante la primera semana y las mutantes se recuperaron de la primera a la cuarta semana. Para evaluar la respuesta inmune humoral y celular inducida en ratones inoculados con las cepas Reo 198 y las mutantes *virB*, se midieron los niveles de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM en suero y la producción de citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ , en cultivos de linfocitos. Los anticuerpos predominantes fueron IgG2b e IgM en las cepas utilizadas. La producción de citocinas con la cepa silvestre fue indicativo de una respuesta Th2 y una baja respuesta Th1. La cepa Reo 198 mostró una leve respuesta Th1. La producción de las diferentes citocinas estimuladas por las mutantes fue baja. Para evaluar la sobrevivencia y replicación de las cepas Reo 198, mutantes y la silvestre, se infectaron cultivos de macrófagos ovinos con 1×10^3 bacterias por célula. Al comparar entre cepas a los diferentes tiempos post infección, se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el número de UFC/ml recuperadas. La cepa Reo 198 y las mutantes entran y sobreviven en el cultivo celular, a las 2 y 3 h respectivamente se observa una ligera replicación la cual disminuye hacia las 48 h en las tres cepas. Los resultados obtenidos indican que es necesario que los genes *virB10* y *virB11* estén completos para inducir una respuesta inmune adecuada. Las cepas estudiadas sobrevivieron pero no se replicaron en las células. A diferencia de lo reportado con otras especies de brucelas lisas y rugosas, el modelo murino no fue el adecuado para evaluar la respuesta inmune celular frente a *B. ovis*.

Palabras clave: *Brucella ovis*, *virB*, citocinas, anticuerpos, macrófagos ovinos.

ABSTRACT

The *virB* operon is essential for smooth brucella intracellular survival and multiplication. Mutations in this system, have shown to decrease survival and multiplication ability in macrophages, epithelial cells and mice. The aim of this study was to evaluate the immune response, survival and intracellular replication of *Brucella ovis virB* mutants. *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* and *orf13-orf12 virB* operon genes of *B. ovis* were identified by PCR. Amplified products showed 96 to 100% of identity with smooth brucellas. Two nonpolar and gentamicin resistant mutants were generated, the former by insertion in the gene *virB10* (*virB10::Gm*) and another by *virB11* gene deletion (Δ *virB11*). Mutants residual virulence was determined by quantifying CFU in spleen of BALB/c mice experimentally inoculated with 2×10^{12} CFU of brucellae, from the 1st to the 5th week post inoculation. Reo 198 and wild type strains only were recovered in the first week and mutants were isolated from the first to the third week. IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM serum levels were quantified and IL-2, IL-4 e IFN- γ production were measured in lymphocyte culture, in order to evaluate immune response induced by the studied strains. IgG2b and IgM were the main antibodies of the humoral response for all the strains. Cytokine production in mice inoculated with the wild type was mainly Th2 type, low IFN- γ and IL-2 from Th1 type, characteristic of intracellular bacteria, were detected. Reo 198 strain induced Th1 type response while cytokine production in mice inoculated with the mutants was low. In order to evaluate Reo 198, mutants, and wild type survival and replication, ovine macrophages cultures were infected with 1×10^3 bacteria/cell. At different times post infection, significant differences ($P < 0.05$) in the number of CFU/ml recovered between strains were detected; Reo 198 and both mutants strains enter, survive in cellular culture and slight replication was observed at 2 and 3 h post infection, replication of the three strains decrease in the later 48 h. Results indicate that integral *virB10* and *virB11* genes of *B. ovis* are necessary to induce a suitable immune response. The studied strains were able to survive but don't replicate in the cells. Murine model was not recommended to evaluate cellular immune response induced by *B. ovis* in contrast with previous reports from smooth and rough brucella.

Key words: *Brucella ovis*, cytokines, antibodies, *virB*, ovine macrophages.

1. INTRODUCCIÓN

La oficina Internacional de Epizootias (OIE) incluye a la brucelosis en su lista B, que la define como: “enfermedad transmisible considerada importante desde el punto de vista económico y sanitario, y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables”. En México se considera una enfermedad endémica ¹.

Brucella es un patógeno intracelular facultativo, con morfología cocobacilar, son Gram negativas ², pertenece a la subdivisión α 2 del grupo de proteobacterias. La clasificación tradicional de las 8 especies de brucela es basada en la preferencia de sus hospedadores, *Brucella melitensis* (ovinos y caprinos), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (perros), *B. ovis* (ovinos), y *B. neotomae* (roedores) y las especies de mamíferos marinos *B. pinnipedialis* (pinipedos) y *B. ceti* (cetáceos). La presencia de LPS-liso o rugoso se correlaciona con la virulencia del microorganismo para humanos ^{3, 4, 5, 6}.

En el 2007 se describió una especie nueva de brucela, *B. microti* la cual fue aislada en el topillo de campo (*Microtus arvalis*) y en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) ^{7, 8, 9}.

Recientemente se identificaron mediante pruebas bioquímicas, PCR y secuenciación unos aislamientos de primates no humanos (*Papio spp*), los cuales tienen semejanza morfológica con brucela; dichos aislamientos fueron asociados a retención de placenta, aborto y nacimiento de crías muertas. Al realizar el análisis de las secuencias, estos aislamientos representan un linaje nuevo dentro del género, con los alelos únicos en 5 de los 9 locus examinados que representan la diversidad del género. Sin embargo, aun no se ha llegado a confirmar características de alguna especie de las ya conocidas, por lo que seguramente será una especie nueva ⁶.

Brucella es una bacteria que ocasiona enfermedad en una amplia variedad de especies animales y “fiebre ondulante” en humanos ¹⁰. En humanos la

brucelosis es una enfermedad crónica debilitante caracterizada por diferentes manifestaciones patológicas como: fiebre ondulante, complicaciones osteoarticulares, endocarditis y cefalea. Cuya transmisión ocurre por contacto con material contaminado o animales infectados y sus productos o exposición en el laboratorio ¹¹. Los animales domésticos y silvestres adquieren la brucelosis por ingestión de alimentos, tejidos o fluidos contaminados asociados con el nacimiento de animales infectados o aborto. En animales domésticos como bovinos, caprinos y ovinos las manifestaciones patológicas se caracterizan por aborto como resultado de la colonización de placenta, tejidos fetales y órganos sexuales así como esterilidad en machos ^{12, 13, 14}. En animales silvestres también causa enfermedades reproductivas los cuales sirven potencialmente como ruta de reintroducción de brucelosis en animales domésticos, razones por las que brucela es de gran preocupación para la comunidad pecuaria en el mundo. En muchos países industrializados, la brucelosis en animales de consumo la han controlado efectivamente con programas de vacunación. Sin embargo, el elevado costo de esos programas puede tener un impacto significativo para la economía del sector pecuario ^{5,11}. Una característica esencial de la enfermedad es la cronicidad, dada por la sobrevivencia y replicación dentro de macrófagos al evadir la fusión de los lisosomas, tanto en los macrófagos como en células epiteliales ^{11, 15}.

1.1 *Brucella ovis*

Brucella ovis es el principal agente etiológico de la epididimitis contagiosa del carnero, *B. ovis* afecta ovinos pero no caprinos. La infección al igual que el resto de las brucelas, es a través de las membranas mucosas, colonizando a partir de allí hacia el aparato genital. La transmisión directa entre machos también es común en periodos de estabulación prolongada. La vía venérea indirecta parecería ser la forma más común de infección, ya que en condiciones naturales una misma oveja suele ser montada por varios machos, facilitando la diseminación de la infección ^{16, 17}. Esta enfermedad es caracterizada inicialmente por la baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del

epidídimo. La epididimitis puede ser palpable y ser unilateral y ocasionalmente bilateral con la consiguiente disminución de fertilidad. Los testículos pueden atrofiarse y el curso de la enfermedad va de agudo a crónico. En algunos casos los machos infectados pueden permanecer por largos periodos sin presentar lesiones clínicas eliminando la bacteria en el semen, incluso por más de cuatro años posterior a la infección dándose el contagio a las hembras ¹⁸. Las hembras infectadas con frecuencia suelen estar seronegativas; sin embargo, la presencia de *B. ovis* puede manifestarse como una reducción en el número de nacimientos, aumento de los intervalos interpartos, pobre viabilidad neonatal, placentitis localizada en la región intercotiledonaria (de menor intensidad que la producida por *B. melitensis*) y sólo una pequeña proporción de hembras desarrolla infección activa que provoca el aborto o nacimiento de crías poco viables ^{16, 19, 20}. Las lesiones están referidas básicamente a cambios inflamatorios locales, generalmente irreversibles. En el feto las lesiones que se pueden observar son bronconeumonía catarral o fibrinopurulenta. El diagnóstico se puede realizar a través de la detección y/o aislamiento del agente, la detección de lesiones, cambios en el semen y a través de análisis serológicos ^{16, 17}.

1.2 Tránsito intracelular

La brucelosis es caracterizada por la persistencia del microorganismo en el sistema reticuloendotelial en el hospedero secundario y en el sistema reproductivo en el huésped primario. Estos organismos tienen la habilidad de sobrevivir y replicarse dentro de compartimentos unidos a la membrana dentro de fagocitos no profesionales y profesionales como macrófagos siendo esto la base de la enfermedad ².

Usualmente los fagosomas maduran gradualmente hacia fagolisosomas los cuales son capaces de degradar proteínas por sus enzimas lisosomales. En el caso de *Brucella* la inhibición del fagolisosoma se ha propuesto como un mecanismo de sobrevivencia intracelular de la bacteria en ambos tipos de células fagocíticas y no fagocíticas. Las brucelas virulentas al ser ingeridas, dirige el

transito intracelular a través de la vía endocítica hasta llegar a su sitio de replicación. Pero el tránsito no es homogéneo en todas las células; en fagocitos no profesionales se ha encontrado que *B. abortus* escapa de la fusión lisosomal mediante la invasión de estructuras parecidas a retículo endoplásmico (RE). En los fagocitos profesionales las brucelas son destruidas dentro de los fagolisosomas. En fagocitos como los neutrófilos *Brucella* simplemente parece resistir a las acciones microbicidas intracelulares durante cierto periodo sin replicación bacteriana. En monocitos y macrófagos este fenómeno no es observado, la mayoría de las bacterias ingeridas parecen ser destruidas dentro de los fagolisosomas, después de resistir a los mecanismos de muerte bactericida por periodos relativamente cortos. Sólo unas pocas bacterias internalizadas son capaces de evadir la fusión con el lisosoma y dirigir el tránsito hacia el sitio de replicación, en los compartimentos parecidos a RE ^{2,10, 12, 13, 21}.

Brucella al tener la capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células incluyendo las del sistema inmune puede inhibir la apoptosis de células infectadas y aparentemente evadir la respuesta inmune de sus hospedadores causando una infección larga y duradera. *Brucella* entra a los macrófagos vía “lipids rafts” (transportadores lipídicos) y esta ruta de entrada determina el destino intracelular de la bacteria, brucela queda contenida en una vacuola (VCB) y no se fusiona con los lisosomas sugiriendo que la inhibición de la fusión es restringida por la estructura de la membrana fagosomal, evadiendo la rápida destrucción celular. La VCB sigue una nueva vía de tránsito intracelular, la cual interactúa con el RE. Llevando a la creación de una vacuola especializada en la cual se multiplica la bacteria ^{21, 22}.

Posterior al proceso de fagocitosis *B. abortus* se localiza en los fagosomas (brucelas virulentas) y fagolisosomas (brucelas avirulentas) de los macrófagos. La bacteria generalmente se enfrenta a diferentes medio ambientes, en el fagosoma con un pH entre 5 y 6 y en el fagolisosoma con un pH de 4.5 a 5, radicales libres oxidativos y enzimas lisosomales. ²³.

Las brucelas que entran mediante transportadores lipídicos y que no son opsonizadas se alojan en las VCB, vacuolas que fueron segregadas por la vía endocítica degradativa, las cuales subsecuentemente interactúan con el RE de manera sostenida, guiando a la fusión entre esos dos organelos generándose una vacuola permisiva de RE ²⁴.

De manera general entre los 5 y los 10 min después de ser internalizadas por la célula mediante transportadores lipídicos, la brucela es encontrada en la VCB temprana, después es incorporada dentro del fagosoma y permanece en los compartimentos hasta que la célula hospedera muere. Después de su internalización la VCB adquiere transitoriamente marcadores de compartimentos precoces de la endocitosis (como pequeñas proteínas de unión a GTP rab5, antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) y receptores de transferrina). Esta asociación en el sistema endocítico temprano es pasajera, hasta 10 minutos después de la internalización el número de compartimentos marcados disminuye a los 30 minutos post-inoculación. La VCB madura dentro de vacuolas acídicas intermedias que acumulan proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP1) hasta por 4 h post-infección (p.i.) pero no rab7 evadiendo interacciones con los endosomas tardíos y la fusión con el lisosoma por la vía LPS y los mecanismos dependientes del glucano β 1-2 cíclico. La vacuola intermedia interactúa con los sitios del RE (2 a 8 h p.i.), tales interacciones requieren del Sistema de Secreción Tipo IV *virB* (SSTIV) y guían a la fusión entre la VCB y el RE (8 - 12 h p.i.) generando un organelo permisivo derivado de RE para la replicación bacteriana (12 h p.i.). La VCB replicativa excluye la LAMP1 y adquiere varios marcadores de RE, como son la calnexina, la calreticulina, el Sec61 β como resultado del intercambio con RE (figura 1a y 1b). En los fagocitos no profesionales, brucela se localiza en estructuras parecidas al RE, retardando la fusión con los lisosomas preformados y previniendo la interacción con los nuevos endosomas formados ^{5, 24, 25, 26}.

a

5 min

1 h

4 h

8 h

12 h

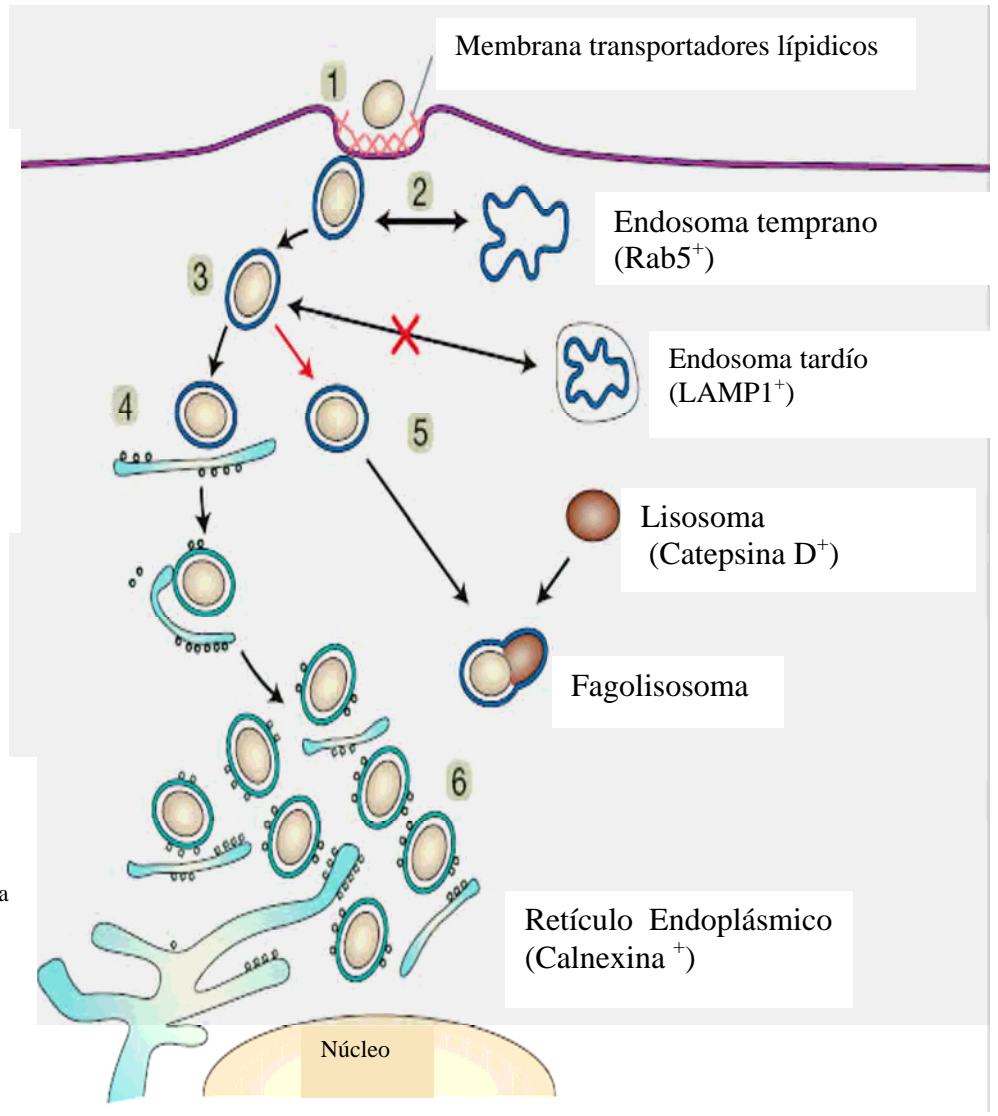
VCB temprana
EEA1⁺, Rab5⁺, Rec
transferrina⁺VCB intermedia
LAMP1⁺,
Rab7⁻,
Manosa 6 P⁻VCB replicativa
LAMP1⁻,
calnexina⁺,
calreticulina⁺,
sec61β⁺, catepsina
D⁻, PDI⁺

Figura 1a. Modelo del tráfico en *Brucella*. La brucela patógena invade las células fagocíticas y las no fagocíticas a través de los transportadores lipídicos (1), después de que brucela entra permanece dentro de una vacuola temprana que la contiene (VCB) la cual interactúa con el endosoma temprano (2) marcados por el EEA1, la Rab5 y los receptores de transferrina. La brucela patógena evade la interacción con la vía endocítica y un intermediario no replicativo VCB (3). La bacteria es capaz de interactuar y fusionarse con el RE (4) para generar el organelo de replicación ó la bacteria falla en el mantenimiento de la interacción con el RE y es degradada por la fusión con el fagolisosoma (5). Una vez segura en el RE dentro de la vacuola replicativa (6) brucela se reproduce rápidamente.

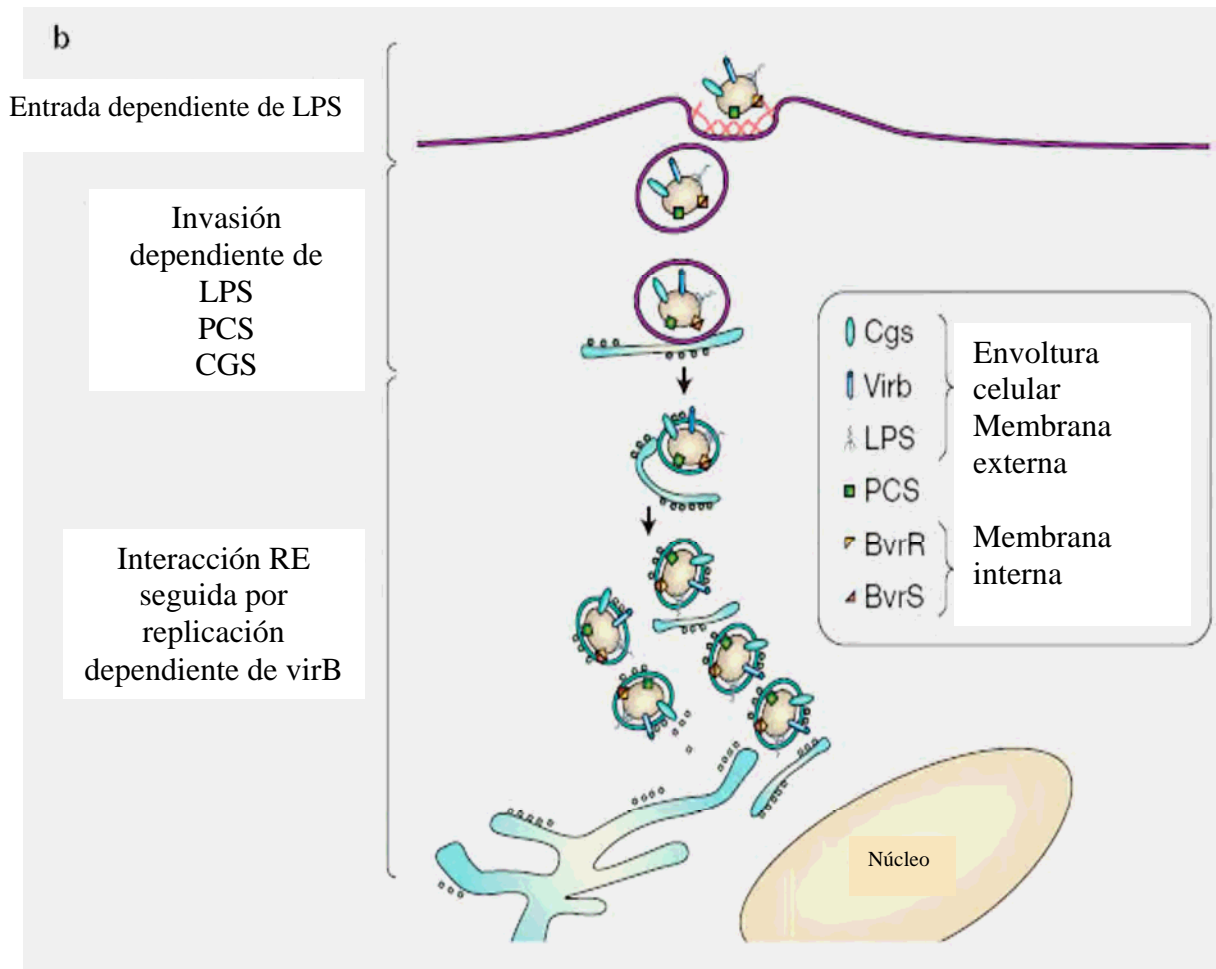


Figura 1. b. Modelo de la evasión de la muerte lisosomal a través de la expresión de factores de virulencia. La entrada de brucela es dependiente de lipopolisacárido (LPS) o del sistema de regulación BvrR/BvrS. El LPS y otros factores de virulencia, tales como la fosfatidil colina sintetasa y el glucano β 1-2 cíclico (CGS) juegan un papel importante en las horas tempranas del tránsito intracelular. La interacción y fusión con los elementos de RE conducen hacia la replicación bacteriana dependiente de SSTIV *virB*⁵.

1.3 Factores de virulencia

La característica principal del género brucela es su habilidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas; sin embargo, esta habilidad está representada por una gran variedad de factores, hasta el momento no se ha demostrado que un factor único sea el responsable de la virulencia del género brucela. En contraste con otras bacterias patógenas no posee factores de virulencia clásicos como exotoxinas, citolisinas, cápsula, fimbrias, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, formas resistentes, variación antigénica, LPS endotóxico o inductores apoptóticos que hayan sido descritos en brucela².

1.3.1 LPS

El LPS en bacterias Gram negativas está compuesto por un lípido A hidrofóbico unido al núcleo el cual es asociado con la cadena O polisacárida del LPS- Liso o del LPS-Rugoso. En contraste con las enterobacterias, las bacterias del género *Brucella* no poseen LPS clásico por lo que se ha propuesto que esta estructura le confiere a *B. abortus* una característica particular de factor de virulencia⁵. El LPS tiene actividad inmunomoduladora que beneficia a la bacteria en el largo esfuerzo de permanencia dentro del macrófago¹¹.

La interacción del LPS-L con los transportadores lípidicos en la superficie de los macrófagos permite que *Brucella* entre a la vía fagocítica, camino que evade la fusión del VCB con los lisosomas. El LPS juega un papel importante en la iniciación y mantenimiento de los estadios tempranos del desarrollo de los VCB.¹¹. La disrupción de los transportadores lípidicos, reduce significativamente la sobrevivencia temprana de *Brucella* dentro de los macrófagos sugiriendo que la entrada mediante estos transportadores es requerida para la sobrevivencia inicial de la bacteria. Las mutantes rugosas de *B. suis* carecen de la cadena O del LPS y entran a los macrófagos de manera independiente de los transportadores lípidicos y sus vacuolas se fusionan rápidamente con los lisosomas²⁴.

1.3.2 Glucano Cíclico β -1,2

Recientemente se ha descrito al glucano cíclico β -1,2 como una molécula que evita la fusión de brucela con los lisosomas. Este componente periplásmico es producido por proteobacterias de la subdivisión α -2, donde se ha descrito que esta molécula está involucrada en la osmoregulación o bien como supresor de la respuesta de defensa de plantas a bacterias endosimbióticas, como *Bradyrhizobium japonicum*. En el caso de brucela el gen que codifica para este componente es llamado *cgs* y las mutantes en este gen no evitan la fusión con los lisosomas, indicando que el glucano cíclico β -1,2 es necesario para el tránsito intracelular apropiado. En experimentos donde a cultivos de mutantes *cgs* se les adiciona glucano cíclico β -1,2 exógeno previo a ensayos de infección, mostraron que se restauraba el tránsito intracelular y una replicación eficiente, esto sugiere que este componente puede ser internado por brucela o bien unirse a la superficie celular y complementar a la mutante. La función de este componente en la vida intracelular de brucela está relacionada con la habilidad de extraer colesterol de las membranas de células eucariotas, lo cual implicaría que el glucano cíclico β -1,2 es secretado intracelularmente y así modifica los dominios lípidos ricos en colesterol presentes en la membrana fagolisosomal ^{27, 28}.

1.3.3 Sistema de Secreción Tipo IV *virB*

Se han descrito mecanismos especializados en la transferencia de una variedad de complejos multimoleculares para cruzar la membrana bacteriana al espacio intra o extracelular de otras células, codificado por operones. Estos complejos son llamados sistemas de secreción tipo IV (SSTIV) ²⁹. El SSTIV es una familia de complejos multiproteicos, la cual sirve para la secreción de macromoléculas a través de la envoltura bacteriana hacia la célula eucariótica ^{22, 30}.

El SSTIV es un factor de virulencia importante utilizado por bacterias Gram negativas para la transferencia de toxinas y otros efectores dentro de diversos

hospederos eucarióticos. A través de este sistema diversos patógenos acarrear o translocan una variedad de moléculas efectoras en diferentes medios ambientes intra y extracelular ocasionando diversas enfermedades. Ejemplos de patógenos medicamente importantes que hacen uso de este sistema, para liberar factores de virulencia son: la producción de la toxina *ptl* de *Bordetella pertussis*, las islas de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*, el sistema *Dot/Icm* de *Legionella pneumophila*, los genes *virB* de *Agrobacterium tumefaciens*, los genes *tra* de *E. coli* y más recientemente el sistema *virB* de *Brucella spp.* ^{29, 31, 32, 33}.

El SSTIV es homólogo a los sistemas de conjugación y al sistema *virB* de *A. tumefaciens*, que facilitan la translocación de DNA tumoral. Este modelo de sistema se basa en el transporte oncogénico y proteínas efectoras (nucleoproteínas), hacia el núcleo de las células de la planta por el fitopatógeno *Agrobacterium*. Los componentes de esta maquinaria de transporte son codificados por el operón *virB* también encontrados en el plásmido Ti de *A. tumefaciens* ³⁰. En *A. tumefaciens* el operón *virB* está conformado por 12 genes que codifica proteínas de VirB1 a VirB11 y VirD4 las cuales transfieren el complejo de DNA-proteína en un sólo paso del citoplasma hasta la célula eucarionte a través del pilus-T por lo que utiliza una vía de secreción Sec-independiente; este operón tiene similitud con otros sistemas de secreción tipo IV ³⁴, en el caso de *Brucella* se sugiere que usa este mecanismo como conducto para translocar sus factores de virulencia dentro de las células ²².

En los estudios sobre la estructura del sistema *virB* de *A. tumefaciens* se han observado tres grupos funcionales de proteínas:

1. **Componentes asociados a la MI** como *virB4*, *virB11* y *virD4* son ATPasas que pudieran formar canales para la translocación del sustrato o proveer energía para el ensamble del SSTIV.
2. **Elementos del núcleo o maquinaria de translocación** Componentes como *virB8*, *virB9* y *virB10* forman un núcleo periplásmico que pudiera contribuir a la formación del canal de translocación; *virB6* atraviesa la

membrana interna (MI) por lo que se sugiere que forme una asociación con las ATPasas del canal citoplásmico.

3. **Componentes del pilus expuestas a la superficie** bacteriana *virB2* es la principal proteína estructural, *virB5*, *virB3* y *virB7* también están asociados a esta estructura.

La proteína *VirB8* estructural tiene una función y facilita la unión entre citoplasma y las proteínas asociadas a membrana interna y otros elementos del núcleo y otros localizados en membrana externa ensamblados al complejo pilus. La *virB1* está presente en las transglicosilasas líticas y se piensa que puede lisar la capa de peptidoglicano durante el ensamblaje del transportador (**Figura 2**) ^{32, 33, 34, 35, 36, 37}.

En *Brucella* se ha identificado el operón *virB* está formado por 12 genes (*virB1* a *virB12*), los cuales están relacionados con el tránsito intracelular de patógenos como el caso de los genes *dot/icm* de *Legionella pneumophila*. La acidificación dentro del fagosoma (pH 4) es un estímulo requerido para la expresión de *virB* dentro de las células del hospedero. El sistema *virB* es esencial para la supervivencia y multiplicación intracelular de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. ^{14, 31,32}.

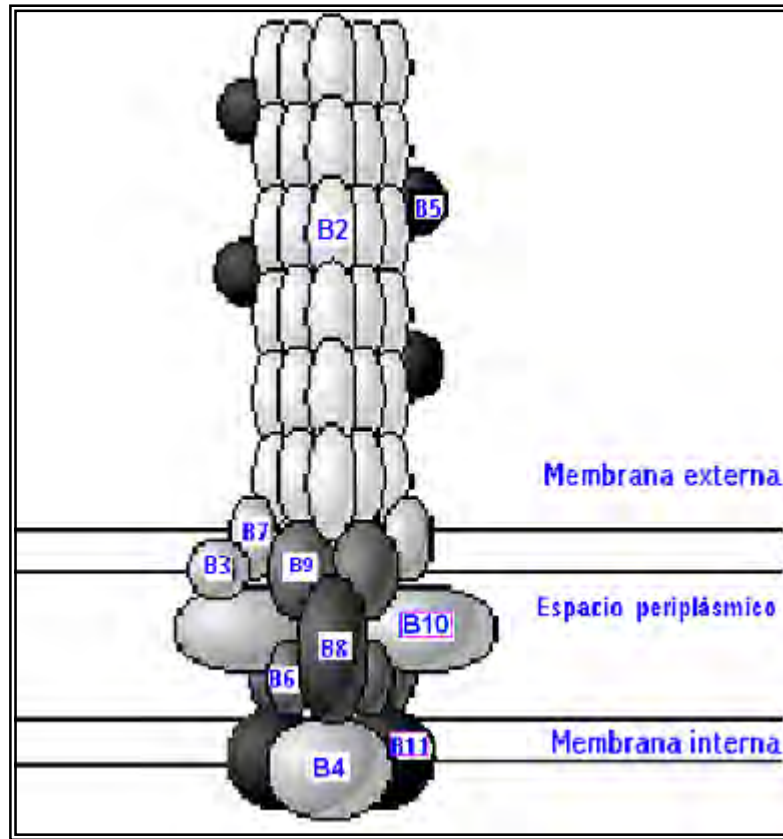


Figura 2. Esquema del sistema *virB* de *Agrobacterium tumefaciens*.

Localización de los componentes del sistema *virB* de *A. tumefaciens*. Se muestran 3 grupos funcionales: las proteínas de localización extracelular que forman el pilus y otras estructuras adhesivas (B1, B2 y B5), los componentes del núcleo periplásmico que forman el canal de translocación (B3, B6, B7, B8, B9 y B10) y las ATPasas asociadas a la MI (membrana interna) (B4 y B11). Se postula que se lleva a cabo una asociación entre los componentes generadores de energía en la MI (membrana interna) y la maquinaria de secreción (núcleo periplásmico). Las estructuras en la superficie celular pueden iniciar el contacto con la célula hospedera, sin embargo, la vía de translocación del sustrato es aún desconocida ³².

O'Callaghan *et al*; en 1999 realizan un BLASTP buscando identidad y similitud en sistemas homólogos de *virB*, obteniendo que los componentes *virB* de *B. abortus* son similares a un amplio rango sistemas de conjugación de bacterias Gram-negativas. A continuación se muestran la probable localización y función

entre las proteínas VirB de *B. abortus* con las presentes en los sistemas de secreción tipo IV de *Bordetella pertussis*, *E. coli* y *A. tumefaciens*.

<i>Brucella abortus virB</i> ORF	Probable localización y función
1	Periplasma ME transglicosilasa
2	ME, Pilina de contacto celular
3	MI, desconocida
4	Citoplasma, ATPasa de transporte
5	ME, componente del pilus
6	Transmembrana, formación del poro
7	ME, lipoproteína, complejo con VirB9
8	MI periférica, desconocida
9	ME, complejo con VirB7 ?
10	Integral de MI, desconocida
11	Citoplasma, ATPasa de transporte
13	Citoplasma ?, desconocida
12	Lipoproteína, desconocida

Se ha demostrado que las mutantes de este sistema tienen una menor habilidad de sobrevivir y multiplicarse en macrófagos, células epiteliales, así como en modelo de ratones; por ejemplo una mutación polar inducida en el *virB1* primer gen del operón, evadió la habilidad de brucela de replicarse intracelularmente. En ratones infectados con mutantes polares y no polares de *virB10* se demostró que este es el mayor determinante de virulencia de brucela, lo que es un indicativo que este sistema es esencial para la supervivencia intracelular de este patógeno ^{14, 31}. Otros estudios han indicado que la ausencia de algunas proteínas VirB conducen a alteraciones en los pasos tempranos de la infección a la entrada celular o durante el tránsito intracelular. En células no fagocíticas como las HeLa, la ausencia de algunas proteínas funcionales como VirB2, VirB4 y VirB9 no afectan

la entrada bacteriana o la prevención de la fusión fagolisosomal. Sin embargo, la integridad del operón *virB* fue requerida por brucela para llegar al sitio adecuado y replicarse en las células HeLa ³⁸.

En un trabajo realizado por Sola-Landa et al 1998, han demostrado que el sistema de dos componentes *bvrS-bvrR* es esencial en brucela para invadir las células huésped, reaccionando en el autofagosoma y escapando de la fusión con el lisosoma, lo que sugiere que los genes bajo el control de ese sistema pudieran ser importantes para el establecimiento del nicho de replicación intracelular ¹⁴.

1.4 Inmunidad

La resistencia a patógenos bacterianos intracelulares facultativos como brucela, depende de la inmunidad adquirida mediada por células, caracterizada por la activación de linfocitos T (LT) y la subsecuente activación de los macrófagos para incrementar la muerte de tales organismos ^{40, 41}.

El género *Brucella* es un microorganismo que se reproduce dentro de las células pero tiende a localizarse extracelularmente cuando las células infectadas se lisan, lo cual favorece el desarrollo tanto de una respuesta inmune celular, mediada principalmente por LT (CD4⁺ y CD8⁺) y de una respuesta humoral mediada por linfocitos B. Sin embargo, ambos tipos de respuesta se producen invariablemente y sin necesidad de que se desarrollen al mismo tiempo ^{42, 43, 44}.

Las citocinas producidas durante la fagocitosis de brucelas son de gran importancia, ya que determinan el tipo de respuesta inmune que se despliega hacia la bacteria. Dentro de las citocinas que están involucradas en la regulación de la actividad de los macrófagos, se incluyen: el Interferón gamma (IFN- γ), Interleucina-12 (IL-12) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Durante la infección aparecen INF- γ , TNF- α , IL2, IL10 e IL12, para controlar el crecimiento de cepas tanto virulentas como avirulentas de *B. abortus* en macrófagos de murinos, en tanto que IL1- α , IL4, IL6, y Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) no tienen efectos consistentes ^{12, 13}. Mientras que el TNF- α

e IFN- γ parecen ser las citocinas más críticas en la resistencia específica y natural, la IL-12 tiene una participación destacada en el control oportuno de la infección en bacterias intracelulares.^{41, 45}

Estudios en ratones han demostrado que la vacunación induce una respuesta significativa celular caracterizada por la producción de ambos tipos de citocinas IFN- γ e IL-2^{46, 47}, que permiten la diferenciación y activación de las diversas poblaciones celulares incluyendo linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Esas poblaciones de células trabajan de manera coordinada para controlar o eliminar la infección intracelular⁴⁴.

La inmunidad mediada por células juega un papel importante en la protección contra la infección de brucelas virulentas, aunque los anticuerpos específicos hacia la cadena O polisacárida del lipopolisacárido y ciertas proteínas de membrana externa pueden conferir protección contra algunas especies⁴⁸. Consecuentemente, ambos linfocitos, CD4+ y CD8+, juegan un papel importante en la inmunidad de brucela, en parte por que secreta IFN- γ por la activación de las funciones bactericidas en los macrófagos. Adicionalmente, la lisis de células infectadas y la subsecuente muerte de brucela por los linfocitos T citotóxicos, puede ser importante en el mantenimiento continuo de la inmunidad⁴⁸.

El IFN- γ es crucial durante las fases tempranas de la infección, debido a que su actividad se dirige fundamentalmente a los fagocitos mononucleares, en los cuales se incrementa la actividad fagocítica y bactericida; favoreciendo el procesamiento y presentación antigénica, con el propósito de promover el aumento en la producción de citocinas que estimulan la inflamación, la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II⁴⁵.

Las células Th1 producen la citocina IFN- γ , que es una, de las que mejor activa a los macrófagos, afortunadamente para el hospedero, la respuesta inmune celular del tipo 1, es apropiada para el control de la infección y la eliminación de la

bacteria. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, han mostrado que macrófagos activados con IFN- γ , controlan la infección. Se ha sugerido, que el mecanismo sería un incremento en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno en los macrófagos activados por el IFN- γ : Incrementando la resistencia del huésped a la infección ⁴⁹.

La respuesta humoral es mediada por linfocitos B (LB), los que al ser estimulados por el antígeno se diferencian en células plasmáticas, que son las que se encargan de la producción de anticuerpos. Así mismo, los LB se diferencian en células de memoria para la protección del hospedero a reinfecciones por el mismo agente ⁵⁰.

El LPS es el primer antígeno frente al cual aparecen anticuerpos y por lo tanto es capaz de activar a los linfocitos B, generando anticuerpos de tipo IgM, IgG e IgA (dependiendo de la especie animal y el sitio de infección), después de la infección natural o de la vacunación con la cepa S19 de *B. abortus*. Ya que los anticuerpos pueden opsonizar las cepas patógenas, nuevas células fagocíticas podrían ser invadidas, potenciando la infección y promoviendo el establecimiento de la brucelosis en bovinos. También se ha demostrado la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana externa, como las OMPII. Si bien es cierto que la respuesta humoral ante estas proteínas no es tan fuerte como la observada contra el LPS, estos anticuerpos son importantes para el diagnóstico, cuando se utilizan cepas vacunales rugosas. De esta manera, otros antígenos, probablemente proteicos, podrían estar involucrados en la protección contra cepas lisas virulentas, ya que bovinos vacunados con cepas rugosas (RB51), aunque no producen anticuerpos contra el LPS de cepas lisas (2308), sí producen anticuerpos que reaccionan contra proteínas de estas cepas virulentas ^{51, 52}.

En ratones Balb/c infectados con la cepa 2308 de *B. abortus* los anticuerpos predominantes en las primeras dos semanas después de la infección son los IgM, mientras que el isotipo IgG se incrementa lentamente en la sangre sobre las primeras tres semanas de infección. Después de la tercera semana de infección,

el isotipo IgG3 es el más abundante en suero, mientras que IgG1, IgG2a e IgG2b están presentes en cantidad moderada después de 2 semanas post-infección ⁵³.

2. ANTECEDENTES

Rouot *et al.* (2003), lograron identificar de manera indirecta la presencia de las proteínas VirB5 y VirB8 de *Brucella ovis*, con el uso de antisueros específicos; lo que es una evidencia indirecta de la presencia del operón.

Paulsen *et al.* (2007), publica la secuencia del operón *virB* de *B. ovis* en el *Genebank*, pero aún se desconoce si este es funcional.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente diferentes investigadores se encuentran trabajando para conocer más acerca de la patogénesis molecular de *Brucella* y han conseguido el análisis de los genomas de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*, permitiendo con ello evidenciar la importancia de los genes del operón *virB* en la invasión, supervivencia y tránsito intracelular de las brucelas lisas. Sin embargo, se desconoce el papel que tienen los genes del operón *virB* en las brucelas rugosas.

4. HIPÓTESIS

Si se realiza una mutación en los genes *virB10* y *virB11*, entonces disminuirá su habilidad para sobrevivir y replicarse intracelularmente, aunque seguirán teniendo la capacidad de inducir una respuesta inmune en el modelo murino.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudio en modelos celular y murino, de la respuesta inmune, la sobrevivencia y la replicación intracelular de las mutantes *virB* de *B. ovis*.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.1.1 Realizar la identificación del operón *virB*, mediante la amplificación de los genes por PCR.
- 5.1.2 Realizar la construcción de mutantes no polares en los genes *virB10* y *virB11*.
- 5.1.3 Realizar la complementación de las mutantes.
- 5.1.4 Evaluar la virulencia residual de las mutantes *virB10::Gm*, Δ *virB11* en el modelo murino.
- 5.1.5 Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral inducida por las mutantes no polares *virB10::Gm*, Δ *virB11* en el modelo murino.
- 5.1.6 Evaluación de la sobrevivencia y la replicación intracelular de las mutantes *virB10::Gm*, Δ *virB11* en macrófagos ovinos, a diferentes tiempos post-infección.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en el **Cuadro 1**. Las cepas de *E. coli* DH5 α y *E. coli* S17.1 fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen, Carlsbad CA) con agitación orbital 100 rpm o en agar LB a 37 C. Las cepas de *Brucella* (Silvestre, Reo 198, *virB10::Gm* y Δ *virB11* de *B. ovis* y 16M de *B. melitensis*) fueron desarrolladas a 37 C en caldo tripticasa soya (TSB Difco Laboratories, Detroit, MI) o agar tripticasa soya (TSA Difco Laboratories, Detroit, MI) suplementado con 10 % de sangre y ambos suplementados con 5% de suero bovino (Invitrogen, Carlsbad CA) descomplementado. Cuando fue necesario, se agregaron antibióticos: ampicilina (Amp 200 μ g/ml) (Sigma Aldrich St Louis Missouri), gentamicina (Gm 2.5 μ g/ml) (Sigma Aldrich St Louis Missouri) y kanamicina (Kan 100 μ g/ml) (Sigma Aldrich St Louis Missouri).

Cuadro 1. Plásmidos y cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Plásmidos	Características	Referencia
pCR2.1 Topo	Vector de clonación, 3.9 kb; Kan ^r ; Amp ^r	Invitrogen, Carlsbad CA
pGEM-T-easy	Vector de clonación	Promega, Madison, WI. USA
pSPG1	Casete no-polar <i>accl</i> (Gmr) en pSport1	55
pB2A3::Gm	<i>virB10::Gm B. abortus</i> 2308 Nal ^r , Gm ^r , inserción de casete no polar en <i>virB10</i>	29
pB2A3::Km	<i>virB10::Km B. abortus</i> 2308 Nal ^r , Km ^r , inserción de casete polar en <i>virB10</i>	29
pBlue- <i>virB10::Gm-orf13-orf12</i> (Δ <i>virB11</i>)	Δ <i>virB11 B. abortus</i> 2308 Nal ^r Gm ^r , deleción de <i>virB11</i> y reemplazo por casete no-polar	14
pBBR4MCS	Plásmido de moderado número de copias Am ^r	56
pBBR4- <i>virB10</i>	Fragmento <i>EcoRI</i> de 1.2 kb conteniendo	Este trabajo

	El gen <i>virB10</i> clonado en pBBR1MCS-4	
pML10	Derivado de pCR2.1 contiene fragmento de 1069 pb que incluye al gen <i>virB10</i>	Este trabajo
pML11	Derivado de pCR2.1 contiene fragmento de 2013 pb que incluye al gen <i>virB11</i>	Este trabajo
pML10c	Fragmento <i>EcoRI</i> de 1,4 kb conteniendo el gen <i>virB10</i> clonado en pBBRMCS.4	Este trabajo
pML11c	Fragmento <i>EcoRI</i> de 1,4 kb conteniendo el gen <i>virB11</i> clonado en pBBRMCS.4	Este trabajo
Cepas		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1Δ (argF-lacZYA) U169 80d/lacZΔ</i>	Gibco-BRL, Rockville MD),
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA thi pro his hsdR -M+ Tpr Sm^r RP4-2-Tc::Mu Km Tn7</i>	57
<i>B. melitensis</i> 16 M	Cepa de referencia Biotipo 1; ATCC 23456; NaI ^r	Stock del laboratorio
<i>B. ovis</i> Reo 198	Cepa de referencia, rugosa virulenta	Stock del laboratorio
<i>B. ovis</i> Silvestre	Rugosa, aislamiento de ovino infectado	CENID-Microbiología
<i>B. ovis virB10::Gm</i>	<i>virB10::Gm B. ovis Reo198, Gm</i> , inserción de casete no polar en <i>virB10</i>	Este trabajo
<i>B. ovis $\Delta virB11$</i>	$\Delta virB11::Gm$, <i>B. ovis Reo 198, Gm</i> , delección de <i>virB11</i> y reemplazo por casete de gentamicina no-polar	Este trabajo
<i>B. ovis virB10::Gmc</i>	<i>B. ovis virB10::Gm</i> con el plásmido pBBR4- <i>virB10</i>	Este trabajo
<i>B. ovis $\Delta virB11c$</i>	<i>B. ovis $\Delta virB11::Gm$</i> con el plásmido pBBR4- <i>virB11</i>	Este trabajo

c : cepas mutantes complementadas

6.2 Extracción de ADN

Se realizó a partir de las cepas *Reo 198*, cepa *Silvestre* y de las mutantes no polares *virB10::Gm* y $\Delta virB11$ de *Brucella ovis* y de las cepas *S19* y *Silvestre* de *B. abortus*, usando la técnica de fenol cloroformo ⁵⁸.

6.3 Diseño de iniciadores

Se realizó la búsqueda de las secuencias en el *GeneBank*, de los operones *virB* en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. Con estos datos, se realizaron juegos de iniciadores para la identificación de los genes del operón *virB* y para la complementación de las mutantes. Los iniciadores se diseñaron a partir de la homología de las tres secuencias en el programa Vector NTI 5.1. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar los genes del operón *virB*.

Fragmento	Secuencia de iniciador	Referencia
<i>virB1</i>	Inicio 5' TATGGTGCCATCCTTGTCTCGCG 3' Reverso 5' TATGCGTGCCTGATCGGA 3'	Este trabajo
<i>virB2</i>	Inicio 5' ATGAAAACCGCTTCCCCAGCAAGA 3' Reverso 5' TTACCTAAGCAGGTAAGAGGCAATT 3'	Este trabajo
<i>virB4</i>	Inicio 5' ATGGGCGCTCAATCCAAAT 3' Reverso 5' AGTGGAAGTTCAGGTAGGCGG 3' Inicio 5' CCGCCTACCTGAACTTCCACT 3' Reverso 5' CCTTCCTGTTGATTTGGACGACGCA 3'	Este trabajo
<i>virB5</i>	Inicio 5' CAGGGTACCCGCGCACGCGCAGCTCC 3' Reverso 5' GAGCTGCAGCTAATAGGCGGCTTCCAGTGC 3'	38
<i>virB8</i>	Inicio 5' CAGGGTACCCGCGTCAACGCACAGAC 3' Reverso 5' GAGCTGCAGCTATTGCACCACTCCCATTCTGG 3'	38
<i>virB9</i>	Inicio 5' ATGAAAAGATTCTGCTTGCCTGCA 3' Reverso 5' TCATTGCAGGTTCTCCCCGGGCGAT 3'	Este trabajo

virB10	Inicio 5' TCCTTCAATCCTGATGGCGT 3' Reverso 5' ATCTGCGGATCGTCCAACC 3'	Este trabajo
virB11	Inicio 5' CATTCCGCCGACACTGTACAA 3' Reverso 5' GGAAATCGGCCACAGAACT 3'	Este trabajo

6.4 Identificación de la región *virB* de *Brucella ovis*

La identificación se realizó usando la técnica de PCR, amplificando los genes *virB* con la enzima Pfx Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad CA). En base a las características de cada fragmento amplificar se estandarizaron los diferentes ensayos de la PCR, determinándose cuales eran las condiciones ideales para cada juego de iniciadores (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Condiciones utilizadas para cada juego de iniciadores

Fragmento	Tm primer inicio	Tm primer reverso	Tamaño pb	Programa por ciclo para el termociclador
<i>virB1</i>	63 °	73 °	717	1'94°, 1'66°, 1.30' 72°
<i>virB2</i>	73	61	317	1'94°, 1'60°, 1' 72°
<i>virB4</i>	63	72	2500	1'94°, 1'66°, 2.40' 72°
<i>virB4 1^o</i>	63	63	1250	1'94°, 1'58°, 1.30' 72°
<i>virB4 2^o</i>	63	72	1250	1'94°, 1'66°, 1.30' 72°
<i>virB5</i>	75	72.2	710	1'94°, 1'66°, 1' 72°
<i>virB8</i>	72.6	72	684	1'94°, 1'60°, 1' 72°
<i>virB9</i>	70	77	869	1'94°, 1'70°, 1' 72°
<i>virB10</i>	64.7	66.3	1369	1'94°, 1'61.5°, 2' 72°
<i>virB11</i>	66.5	66.5	2013	1'94°, 1'62°, 2' 72°

6.5 Secuenciación y análisis de los genes de *B. ovis*

Los productos de PCR conteniendo los genes del operón *virB* de *B. ovis* fueron purificados por columnas usando QIAquick PCR purificación kit (QIAGEN) y QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) según fuera el caso.

A partir de los productos de PCR de los genes y *virB1*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, *virB8*, *virB9*, *virB10* y *virB11* *orf13* /*orf12*, se realizó la secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.6 Construcción de las cepas mutantes *virB* de *B. ovis*

Dentro de los tipos de mutaciones que existen se encuentran: las polares las que además de afectar la transcripción del gen mutado, también alteran la expresión de los genes localizados que están corriente arriba modificando la unidad transcripcional. Mientras que las mutaciones no polares: son aquellas que solo afectan la transcripción del gen mutado, no alterando los genes localizados corriente arriba. En ambos tipos de mutaciones se puede involucrar la delección (identificada por el símbolo Δ), y/o la inserción de un gen con algún marcador (identificado por el símbolo $::$), que nos permita realizar la selección de la mutante de manera correcta.

Para la construcción de las mutantes se utilizó la metodología descrita por Sieira *et al.* (2000) y Comerci *et al.* (2001). Las mutaciones se llevaron a cabo en el gen *virB10* mediante la inserción de un gen que codifica para la resistencia a gentamicina y una delección del gen *virB11* mediante la inserción de un gen que codifica para la resistencia a gentamicina.

6.6.1 Mutantes del gen *virB10*

Se construyeron usando los plásmidos pB2A3::Kan y pB2A3::Gm (Cuadro 1), los cuales se introdujeron por electroporación en la cepa Reo 198 de *B. ovis*. Se plaquearon en medio TSA adicionado con antibióticos Amp/Kan o Amp/Gm, se incubaron a 37° C durante 5 a 7 días. Posteriormente, se realizó la selección de colonias que fueron Kan^r/Amp^s y Gm^r/Amp^s que fueron consideradas como posibles dobles recombinantes. La interrupción del gen *virB10* con los casetes de resistencia al antibiótico se confirmó por PCR con los iniciadores específicos para el gen (Cuadro 2) verificando la mutación. De esta forma se generaron las mutantes *virB10*::Kan polar y *virB10*::Gm no-polar de *B. ovis*.

6.6.2 Mutantes por delección del gen *virB11*

El plásmido pBlue-*virB10*::Gm-ORF13-ORF12 (Δ *virB11*) (Cuadro1), fue introducido por electroporación en Reo 198 de *B. ovis* para generar la delección del gen *virB11* y su reemplazo por el marcador *accl* que confiere resistencia a gentamicina. Se plaquearon en medio TSA adicionado con antibióticos Gm/Amp, se incubaron a 37° C durante 5 a 7 días. Se realizó selección de las colonias dobles recombinantes homólogas que resultaron Gm^r/Amp^s que fueron consideradas como posibles dobles recombinantes. La interrupción del gen *virB11* con el casete de resistencia a gentamicina se confirmó por PCR con los iniciadores específicos para el gen *virB11* (Cuadro 2) que el reemplazo de *virB11* por *accl* había ocurrido, generando la mutante Δ *virB11* no-polar de *B. ovis*.

6.7 Complementación de mutantes *virB10*::Gm y Δ *virB11* de *B. ovis*.

Se realizó la complementación de las mutantes para restaurar la función de *virB10* y *virB11*. Utilizando el plásmido de moderado número de copias pBBRMCS.4. Mediante PCR se amplificaron los genes *virB10* y *virB11*, con los iniciadores (Cuadro 2) los cuales generaron un producto 1369 pb y un producto de 2013 pb, que contenían los genes *virB10* y el gen *virB11* completos respectivamente. Los productos de amplificación se clonaron directamente en el

plásmido pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad CA), generando los plásmidos pML10 y pML11. Posteriormente, los plásmidos fueron digeridos con *EcoRI* para liberar los fragmentos clonados y ligarlos al plásmido pBBRMCS.4 y generar los plásmidos pML10c y pML11c. Cada uno de los plásmidos pML10c y pML11c fueron electroporados dentro de las mutantes *virB10::Gm* y $\Delta virB11$ de *B. ovis* y las bacterias fueron cultivadas a 37° C en medio LB, adicionando 100 µg/ml de ampicilina. Se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina a las cuales se les realizó la extracción del plásmido, el cual fue digerido con *EcoRI* para liberar el inserto de *virB10* o *virB11* según fuese el caso. Para comprobar la restauración de la función de los genes mutados se utilizaron los modelos celulares y murino que son descritos posteriormente.

6.8 Curva de desarrollo de la cepa Reo 198 de *B. ovis*

Para determinar los tiempos óptimos de infección, se realizó la curva de crecimiento de las cepas Reo 198, $\Delta virB11$ y $\Delta virB11c$ de *B. ovis*, inoculando matraces con 50 ml de caldo *Brucella* con la cepa e incubando a 37° C, con agitación orbital a 200 rpm realizando un seguimiento durante 48 h, midiendo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm y realizando conteo de UFC.

6.9 Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica de ovino

Se colectaron muestras de sangre venosa con anticoagulante ACD (citrato trisódico 22 g, ácido cítrico 8 g y dextrosa 24.5 g cbp 1L) 13 ml de anticoagulante por cada 100 ml de sangre. La sangre se transfirió asépticamente a tubos de centrífuga.

Los tubos se centrifugaron a 1,000 x g durante 30 min, para obtener la capa de leucocitos. Una vez obtenidos los leucocitos se agregó medio volumen de PBS-citratos (PBS, ácido cítrico trisódico 3.72 g / L) y se mezclaron suavemente.

Se preparó medio volumen de Percoll (GE Healthcare, Bioscience AB) de trabajo con una densidad de 1.080 g/l (medio volumen considerando la capa de leucocitos más PBS-citrato como un volumen).

Se adicionó la capa de leucocitos más PBS-citrato al Percoll de trabajo sin romper el gradiente y se utilizó una centrífuga de columpio refrigerada a 1,000 x g durante 20 min.

Se obtuvo la capa de células mononucleares que se localizaba por encima de la capa del Percoll. Se lavaron las células mononucleares con PBS-citrato y plasma (autólogo) a 500 x g por 10 min 3 veces con el fin de eliminar los residuos de Percoll.

Se resuspendieron las células en medio de cultivo celular RPMI 1640 completo atemperado (Invitrogen, Carlsbad CA) (CRPMI 500 ml adicionado con 5.5 ml de L-glutamina 200 mM (In vitro, México) y 5.5 ml aminoácidos no esenciales para Medio Mínimo esencial 0.1 mM (In vitro, México), 5.5 ml piruvato de sodio (Sigma Aldrich, St Louis Missouri), y 12 ml bicarbonato de sodio 7.5% (Sigma Aldrich, St Louis Missouri)), más 4 % de suero autólogo (suero obtenido del mismo animal). Se realizaron conteos de células y se colocaron a una densidad inicial de 3×10^6 células por pozo, en placas de 24 pozos (NUNC Brand, En). Se realizó cambio de medio a las 24 h después de la obtención de las células agregando el 10% de suero autólogo, posteriormente se efectuaron cambios de medio cada tercer día durante una semana y después cada 4 días hasta los 14 días, hasta la maduración de los macrófagos, durante este tiempo en cada ocasión que fue retirado el medio se realizó el conteo de las células no adherentes (leucocitos diferentes a macrófagos), para así obtener por diferencia el valor más cercano al número de células que se adhirieron al pozo (macrófagos), ya que debido a sus características de los macrófagos no se pudieron despegar una vez que se encontraban en los pozos que fueron sembrados ⁵⁹.

6.10 Ensayos de supervivencia intracelular

Los ensayos de infección en cultivos se evaluaron a través de la determinación de la supervivencia intracelular y se realizó con macrófagos ovinos obtenidos a partir de sangre periférica.

Para los ensayos de infección se prepararon cultivos semilla de las diferentes cepas de brucela (Cuadro 1), inoculándose en matraces con 25 ml de caldo tripticasa soya (TSB) suplementado con 5% de suero bovino, se incubaron durante 20 h a 37° C en agitación (200 rpm). Después de este tiempo se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Cuadro 6).

Para cada ensayo, los inóculos de *Brucella* empleados se prepararon en 10 ml de TSB y fueron incubados durante 20 h hasta el inicio de su fase logarítmica a 37°C en agitación (200 rpm).

Los macrófagos fueron mantenidos en placas de 24 pozos, a 37°C con 5% de CO₂ durante 14 días hasta su maduración (descrito arriba). Posteriormente, las células fueron inoculadas con una suspensión bacteriana de brucela para conseguir una multiplicidad de infección (MOI) de 1000 bacterias por célula. Las placas de cultivo celular fueron incubadas a 37° C, con una atmósfera con 5% de CO₂. Después de 2 h (considerada hora 0), los pozos fueron lavados cinco veces con PBS estéril, para remover las bacterias que no se adhirieron e incubados 1 h con medio CRPMI suplementado con 200 µg/ml de Kanamicina (SIGMA Aldrich, St Louis Missouri), cambiándose la concentración una hora después a 20 µg/ml de Kanamicina. Mediante este procedimiento se inactivaron las bacterias que no entraron en las células. A partir de este punto cada hora (0, 2, 4, 24 y 48 h) fue lavada una placa y se lisaron las células durante 10 min con una solución de Tritón X100 (SIGMA Aldrich, St Louis Missouri) al 0.2%, este sobrenadante se utilizó para realizar los conteos de UFC a diferentes tiempos pos-infección, en placas de TSA adicionadas con 10% sangre y 10% de suero bovino.

6.11 Prueba de virulencia residual de las mutantes *virB* de *B. ovis* en el modelo murino

Con la finalidad de conocer si las mutaciones fueron estables y las cepas se replicaron ó se eliminaron; se inocularon seis grupos de 15 ratones Balb/c de 6 semanas de edad, por vía intraperitoneal (IP) con las diferentes cepas de *B. ovis* (**Cuadro 1**) a una dosis de 2×10^{12} UFC en 0.5 ml en PBS. Fueron sacrificados tres ratones por tiempo, a las 1, 2, 3, 4 y 5 semanas post-inoculación (PI), se obtuvo el bazo, se pesó, se maceró en 1 ml de PBS. Los tejidos homogeneizados fueron diluidos serialmente con PBS. Se inocularon por duplicado en placas de TSA y se incubaron a 37° C, durante una semana para realizar conteos de UFC de cada bazo.

6.12 Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral inducidas por las mutantes *virB* en el modelo murino

6.12.1 Respuesta inmune humoral

Se midió utilizando un *kit* comercial de **ELISA** indirecta, Mouse monoclonal antibody isotyping reagents (Sigma Aldrich St Louis Missouri) conteniendo los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM. Para lo cual, se inocularon cuatro grupos de 15 ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 semanas de edad, por vía intraperitoneal (IP) con cada cepa de *B. ovis* y sus mutantes (**Cuadro 1**) a una dosis de 2×10^{12} UFC en 0.5 ml en PBS, obteniendo sueros a las semanas 1, 2, 4 y 6 PI. La prueba fue realizada siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron placas de poliestireno con fondo plano de 96 pozos (NUNC Maxisorp). Se utilizó como antígeno un extracto total de *B. ovis* (sonicado 10 ciclos), la concentración de proteínas fue cuantificada mediante la técnica de Bradford y la dilución de trabajo fue de 23.3 µg/ 100 µl por pozo, las placas se incubaron durante 24 h a 37° C. El antígeno que no se adhirió a los pozos, se eliminó mediante tres lavados con una solución amortiguadora de fosfatos con 0.05% *Tween 20*, (PBS -T 10 mM pH 7.2). Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% y se incubaron 1 h a 37° C. Se realizaron 3 lavados con PBS-T.

Los sueros fueron utilizados a una dilución 1:200 en 100 μ l PBS, después se incubaron las placas durante 1 h a 37° C y se efectuaron 3 lavados con PBS-T. Posteriormente se adicionaron 100 μ l del isotipo específico (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b y anti-IgM que fueron diluidos 1:1,000 en PBS). Las placas se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y fueron lavadas tres veces con PBS-T. Se agregaron 100 μ l a cada pozo de anti-IgG de conejo producida en cabra conjugada con peroxidasa a una dilución 1:5,000 en PBS-T. Se incubaron las placas durante 15 min a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con PBS-T. Se adicionaron 100 μ l del substrato ácido 5 - aminosalicílico (H₂O₂) a una concentración de 1mg/ml y las placas se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y la reacción se paró con 50 μ l de NaOH 3N. Las placas fueron leídas a una densidad de 490 nm en un lector de ELISA (Perkin Elmer VICTOR 3 1420 multilabel counter). Los resultados fueron expresados en densidades ópticas (DO).

6.12.2 Respuesta inmune celular

Se evaluó realizando la medición de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ) *in vitro*, a partir de cultivo de células presentadoras de antígenos (CPA) de bazo de ratón. Se inmunizaron cuatro grupos de 15 ratones hembras Balb/c de 6 semanas de edad, por vía intraperitoneal (IP) con cada cepa de *B. ovis* y sus mutantes (Cuadro 1) a una dosis de 2×10^{12} UFC en 0.5 ml en PBS. Los ratones fueron sacrificados a las 2 semanas PI, se obtuvieron los bazos bajo condiciones de esterilidad, los cuales se lavaron por tres veces con solución balanceada de Hanks. Posteriormente, se colocaron en una caja de Petri conteniendo 10 ml de medio de RPMI 1640 con 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, y con el émbolo de una jeringa estéril sobre una gasa se maceraron cuidadosamente con la finalidad de disgregarlos. La suspensión celular se colocó en un tubo cónico estéril de 50 ml y se adicionaron 10 ml de medio RPMI con antibióticos; se dejó en reposo 5 min para sedimentar los restos de tejidos, posteriormente se pasó a otro tubo cónico teniendo cuidado de no tomar el

sedimento y se decantó la suspensión de células por las paredes del tubo. Se centrifugó 10 min a 10,000 x g a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 1 ml de Cloruro de amonio 0.17M (NH₄Cl). Se centrifugó y el botón celular se resuspendió con 10 ml de medio RPMI con antibióticos y suero fetal bovino (SFB) al 20%, L-glutamina 200 mM y aminoácidos no esenciales 0.1 mM. Se adicionó 1 ml de la suspensión celular a una concentración de 5.8 x 10⁶ linfocitos/ ml a cada pozo. Cada pozo de la placa de cultivo celular fue estimulado con 10 µl de la suspensión celular a una concentración 2x10⁸ UFC/ml, la placa se incubó a 37° C con 5% de CO₂. Un control positivo de proliferación fue estimulado con Concanavalina A (Con A). Se colectaron los sobrenadantes a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h p.i. y fueron congelados hasta su uso a -20° C.

6.12.2.1 Determinación de citocinas *in vitro*

Para la evaluación de la respuesta de citocinas inducida de los ratones inoculados con *B. ovis* y sus mutantes; se realizó la medición de las interleucinas empleando kits comerciales (DUOSET Mouse IFN-γ, DUOSET Mouse IL-2 y DUOSET Mouse IL-4) de ELISA Development System (R&D System). La prueba fue realizada siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, la concentración usada para capturar y detectar los anticuerpos fue de 2000 y 300 ng/ml para IL-2; 4000 y 400 ng/ml para IFN-γ; 720 y 36 µg/ml para IL-4. La curva estándar fue preparada por diluciones seriales de la solución stock 1000 pg/ ml para IL-2 e IL-4, y 2000 pg/ml para IFN-γ. Se adicionaron 100 µl por pozo de la reacción de la curva o de la muestra y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados, se adicionaron 100 µl por pozo del anticuerpo de detección, y se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Se efectuaron 3 lavados y posteriormente se adicionaron 100 µl por pozo de la solución de estreptoavidina conjugada con peroxidasa, se incubaron las placas durante 20 min a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz directa. Se efectuaron 3 lavados y se adicionaron 100 µl por pozo de la solución de substrato y se

incubaron por 20 min a temperatura ambiente protegiéndose de la luz directa. Se adicionaron 50 μ l de la solución de paro y se efectuó la lectura a una densidad de 490 nm en un lector de ELISA (Perkin Elmer VICTOR 3 1420 multilabel counter). Los resultados fueron expresados en densidades ópticas (DO).

7. RESULTADOS

7.1 Amplificación de los genes *virB* de *B. ovis*

Se amplificaron los genes *virB1*, *virB2*, *virB2* a *virB5*, *virB4*, *virB5*, *virB8*, *virB9*, *virB10* y de *virB11* a el *orf12* a partir del DNA de *B. ovis*. (Figura 3).

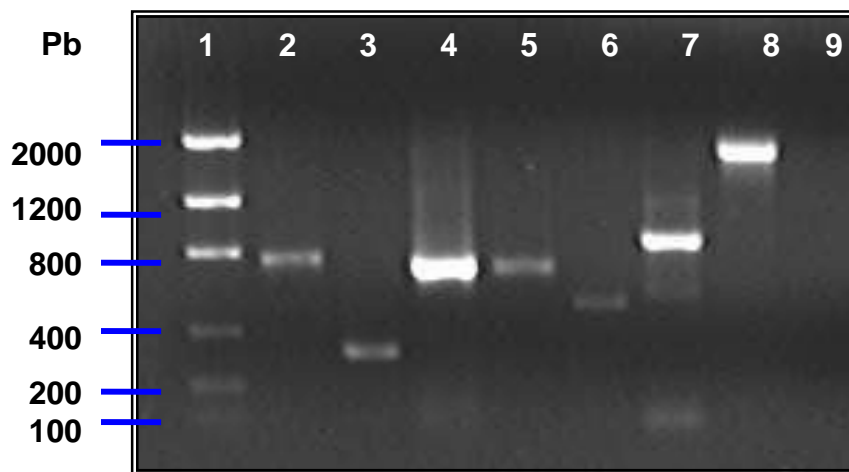


Figura 3. Amplificación de los genes del operón *virB* de *B. ovis*. Gel de agarosa al 1%, carril 1 marcador de tamaño Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA); carril 2 producto de la amplificación del gen *virB1* (716 pb); carril 3 amplificación de *virB2* (317 pb); carril 4 y 5 amplificación de *virB5* (710 pb); carril 6 amplificación de *virB8* (684 pb); carril 7 amplificación del gen *virB9* (869); carril 8 amplificación de *virB8*, 9,10 (1768 pb); carril 9 control sin DNA.

Para la amplificación del gen *virB4* se utilizaron cuatro combinaciones diferentes de iniciadores, los dos juegos obtenidos para el gen *virB4* y la combinación de iniciadores del gen *virB2* (forward) y del gen *virB5* (reverse) (Figura 4A y B).

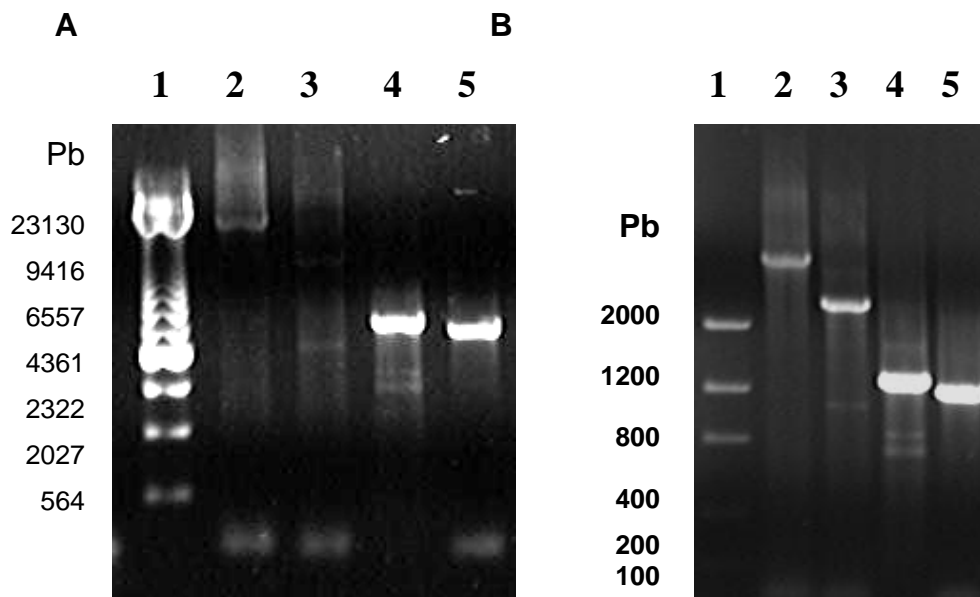


Figura 4. Amplificación del gen *virB4*. Gel de agarosa al 1%. **A.** Carril 1 marcador de tamaño λ HindIII (Invitrogen, Carlsbad CA); carril 2 producto de la amplificación del gen *virB2* a *virB5*, (4200 pb), carril 3 amplificación de *virB4* (2500 pb), carril 4 amplificación de *virB4* (1250 pb) primer fragmento, carril 5 amplificación de *virB4* (1250 pb) segundo fragmento. **B.** carril 1 marcador de tamaño Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad CA); carril 2 producto de la amplificación del gen *virB2* a *virB5*, carril 3 amplificación de *virB4*, carril 4 amplificación de *virB4* primer fragmento, carril 5 amplificación de *virB4* segundo fragmento, carril 6 control sin DNA.

7.2 Secuenciación de los genes de *B. ovis*

Se efectuó la secuenciación y el porcentaje de homología (**Cuadro 4**) se determinó mediante la alineación de los fragmentos amplificados del genoma de *B. ovis*, con el de *B. suis*, (acceso NC_004311) *B. abortus* (acceso AF226278) y *B. melitensis* (acceso AE008918) de las cuales ya se conoce su genoma.

Cuadro 4. Porcentaje de homología de los fragmentos amplificados del operón *virB* de *B. ovis*, con el de brucelas lisas.

GEN	ESPECIE	% HOMOLOGIA
<i>virB2</i>	<i>B. melitensis</i>	99.4
	<i>B. abortus</i>	100
	<i>B. suis</i>	100
<i>virB5</i>	<i>B. melitensis</i>	99.8
	<i>B. abortus</i>	99.6
	<i>B. suis</i>	100
<i>virB8</i>	<i>B. melitensis</i>	99.7
	<i>B. abortus</i>	100
	<i>B. suis</i>	100
<i>virB9</i>	<i>B. melitensis</i>	99.9
	<i>B. abortus</i>	100
	<i>B. suis</i>	100
<i>virB10</i>	<i>B. melitensis</i>	97.1
	<i>B. abortus</i>	97.4
	<i>B. suis</i>	96.5
<i>virB11,orf 13/orf12</i>	<i>B. melitensis</i>	98
	<i>B. abortus</i>	
	<i>B. suis</i>	

7.3 Obtención de las cepas mutantes

Las colonias seleccionadas Gm^r/Am^s como posibles dobles recombinantes homólogas, para la obtención de la mutante *virB10::Gm*, fueron confirmadas por PCR, resultando que en una cepa, el gen *virB10* se encontraba interrumpido y esta cepa fue la que se utilizó para los diferentes experimentos (Figuras 5A y 6A).

De la selección de colonias Gm^r/Am^s ($\Delta virB11$) como posibles dobles recombinantes homólogas, mediante el análisis de PCR se obtuvo la confirmación de cuatro cepas, en las cuales el gen *virB11* había sido reemplazado por el gen de resistencia a gentamicina, una de las cuales fue utilizado para los diferentes experimentos (Figuras 5B y 6B).

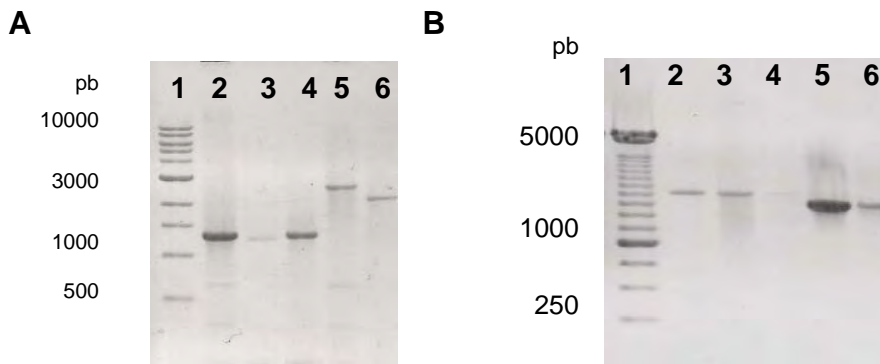
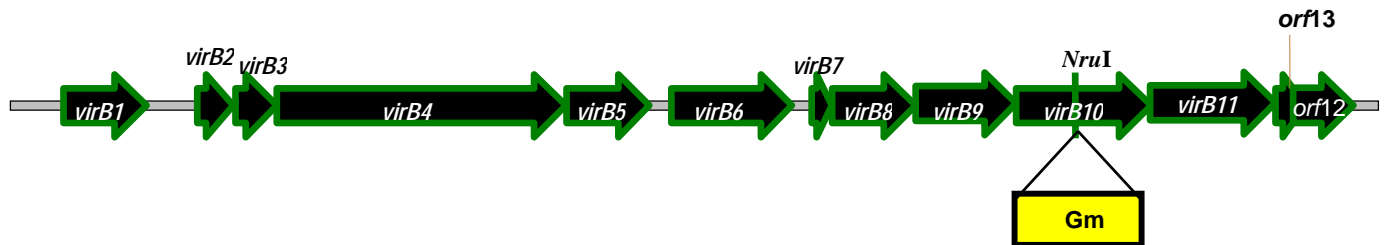
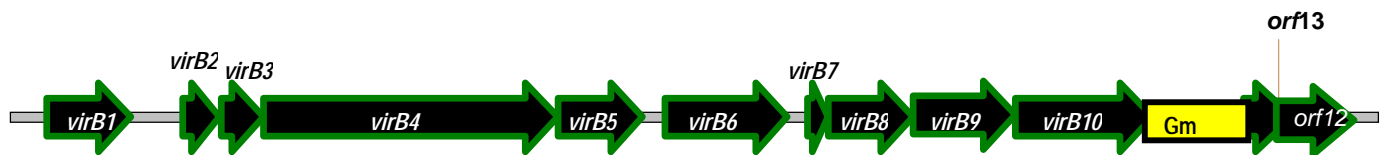


Figura 5. Amplificación de las mutantes de *B. ovis*. Gel de agarosa 1%. **A:** Carril 1 marcador de tamaño 1Kb (BioLabs); carril 2, 3 y 4 producto de la amplificación del fragmento *virB10* de *B. ovis* (1369 pb); carril 5 *mutante virB10::Km* (K2) (2669 pb), carril 6 *mutante virB10::Gm* (G5) (2069 pb).
B: carril 1 marcador de tamaño 250 pb (Invitrogen, Carlsbad CA), carril 2, 3, 4 producto de la amplificación del fragmento *virB11* de *B. ovis* (2013 pb); carril 5 y 6 *mutante $\Delta virB11::Gm$* (G3)(1619 pb).



A: *Brucella ovis* Reo 198 *virB10::Gm*



B: *Brucella ovis* Reo 198 $\Delta virB11$

Figura 6. Representación esquemática de las mutaciones inducidas dentro del operón *virB*. Los sitios de restricción indican el lugar en donde fueron introducidos los casetes resistencia a gentamicina.

7.4 Complementación de las mutantes

El primer paso para demostrar la complementación fue evidenciando la presencia del inserto en el plásmido mediante PCR con la liberación del inserto *virB10* o *virB11* según fuese el caso con la digestión del plásmido con *EcoRI*.

7.5 Curva de desarrollo de *B. ovis*

Al realizar la curva de desarrollo de las cepas Reo 198, $\Delta virB11$, $\Delta virB11c$ de *B. ovis*, durante 48 h (**Figura 7**) y los conteos de UFC (**Cuadro 5**). Se obtuvo que los cultivos inician su fase *log* entre las 18 a 20 h (D.O. = 0.283) y que la fase *log* tardía está entre las 20 a 26 h (D.O. = 0.534) post-inoculación.

Cuadro 5. Cuantificación de las UFC/ml durante la cinética de desarrollo de las cepas de *B. ovis*.

Tiempo (h)	Reo	$\Delta virB11$	$\Delta virB11c$
0	1.5×10^7	5×10^6	4×10^6
18	3.4×10^8	3×10^7	4×10^7
20	3×10^8	1×10^8	1×10^8
22	3×10^{11}	2×10^8	3×10^8
24	2×10^{11}	2×10^9	2×10^9
26	2×10^{10}	2×10^9	2×10^9
28	2×10^{12}	2×10^{12}	2×10^{13}

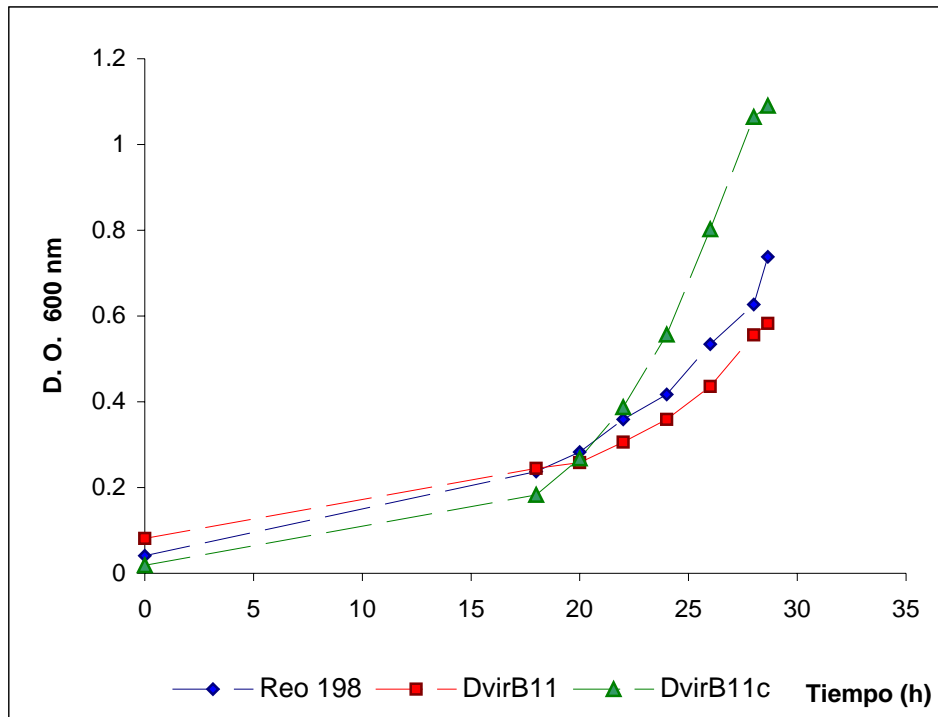


Figura 7. Curva de desarrollo exponencial de las cepas de *B. ovis*. Resultados obtenidos de las lecturas de la absorvancia expresado en densidades ópticas a diferentes tiempos.

7.6 Evaluación *in vivo* de las mutantes en macrófagos ovinos

Para evaluar la sobrevivencia intracelular de las mutantes, se realizaron ensayos de infección en cultivos de macrófagos ovinos derivados de sangre periférica.

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), de los cultivos semilla de las diferentes cepas de *Brucella* se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados expresados en ufc/ml del conteo de los cultivos semilla de las cepas utilizadas para realizar las infecciones en células y ratones.

Cepa/ mutante	UFC/ml
$\Delta virB11::Gm$	2.3×10^6
<i>virB10::Gm</i>	4.3×10^6
Reo 198	9.7×10^8
Silvestre <i>B. ovis</i>	5.6×10^6
16M <i>B. melitensis</i>	6×10^6

Los resultados obtenidos de los ensayos de infección celular fueron representativos de tres infecciones independientes realizadas por duplicado bajo condiciones similares.

Al comparar entre cepas a los diferentes tiempos p.i., se observó una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en el número de UFC/ml recuperadas.

La Reo 198 parental, la silvestre y ambas cepas mutantes sobrevivieron en el cultivo celular, a las 2 y 3 h se observó una ligera replicación, la cual disminuye durante los siguientes tiempos, los números de UFC que se recuperan a las 48 h fueron las siguientes: la Reo 198 2×10^2 , la silvestre 1.2×10^2 y 1×10^2 para la *virB10::Gm*. Mientras que la mutante $\Delta virB11$ se recuperó hasta las 24 h con un valor de 5×10^1 UFC/ml (Figura 8 A y 7 B).

En las mutantes complementadas *virB10::Gmc* y Δ *virB11c* a las 2 y 4 h p.i. respectivamente, hubo un incremento en la recuperación de UFC/ml con respecto a su valor basal (2×10^5 y 5.8×10^6 respectivamente), los cuales decrecen hacia las 48 h en la *virB10::Gmc* (2×10^3 UFC) y la Δ *virB11c* a las 24 h (de 1×10^5 y 1.8×10^3 a las 48 h). La cepa 16M de *B. melitensis* que fue utilizada como control positivo del ensayo, sobrevivió y presentó replicación a las 24 y 48 h (**Figura 8 C**).

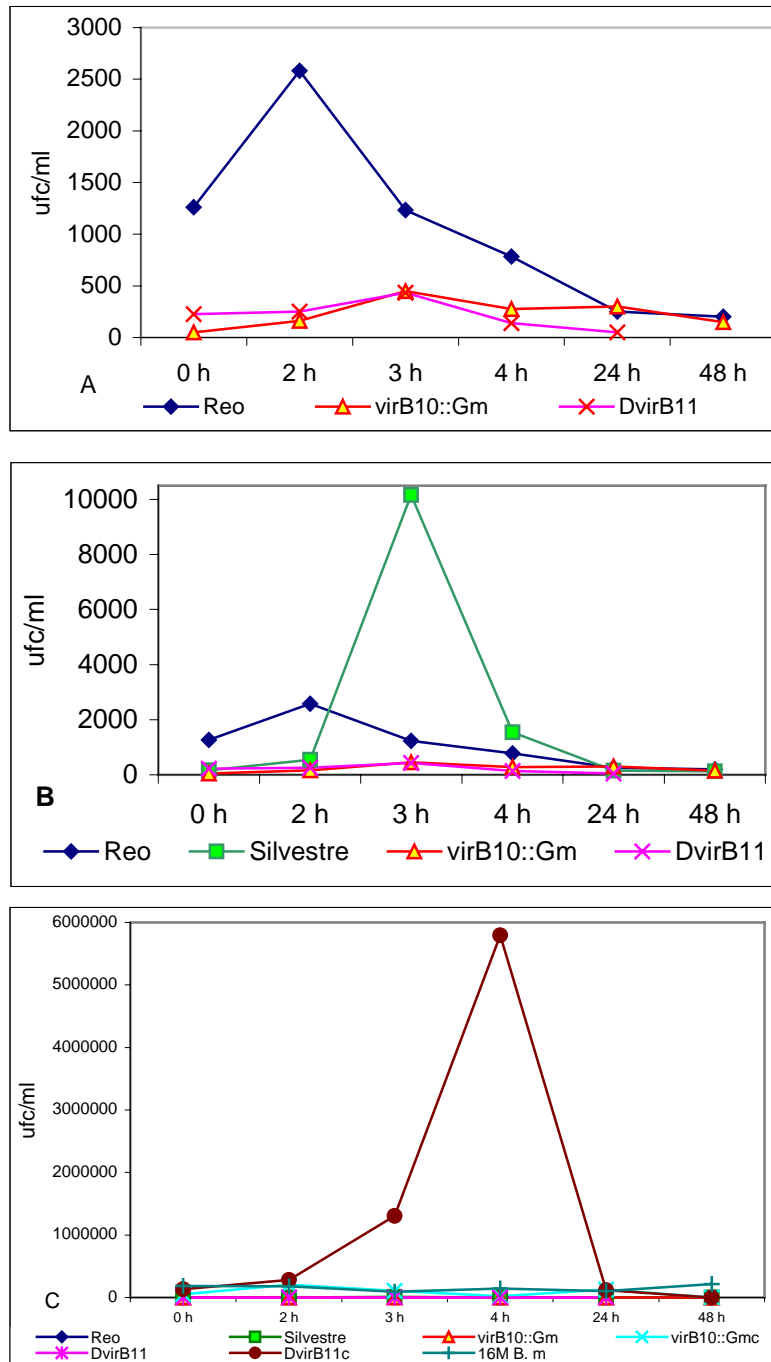


Figura 8. Sobrevivencia intracelular de *B. ovis* en macrófagos ovinos: **A.** Reo 198, mutantes *virB10::Gm* y $\Delta virB11$. **B.** Reo 198, silvestre, mutantes. **C.** Reo 198, silvestre, mutantes, sus complementadas y la 16M de *B. melitensis*. Las UFC fueron determinadas a las 0, 2, 4, 24 y 48 h p.i.

7.7 Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral inducida por las mutantes *virB* de *B. ovis* en el modelo murino

En la evaluación de la respuesta inmune humoral a *B. ovis* mediante la técnica de ELISA indirecta (Figura 9), se obtuvo que los niveles de IgG1 fueron bajos en los diferentes muestreos. Para la IgG2a el comportamiento entre ellos fue muy similar. Sólo a las 4 semanas después de la inoculación se incrementaron los niveles de IgG2b. En el caso de IgM los niveles más altos fueron en la primera semana y después decrecieron gradualmente. Entre las diferentes IgG's, el comportamiento de los niveles fue similar.

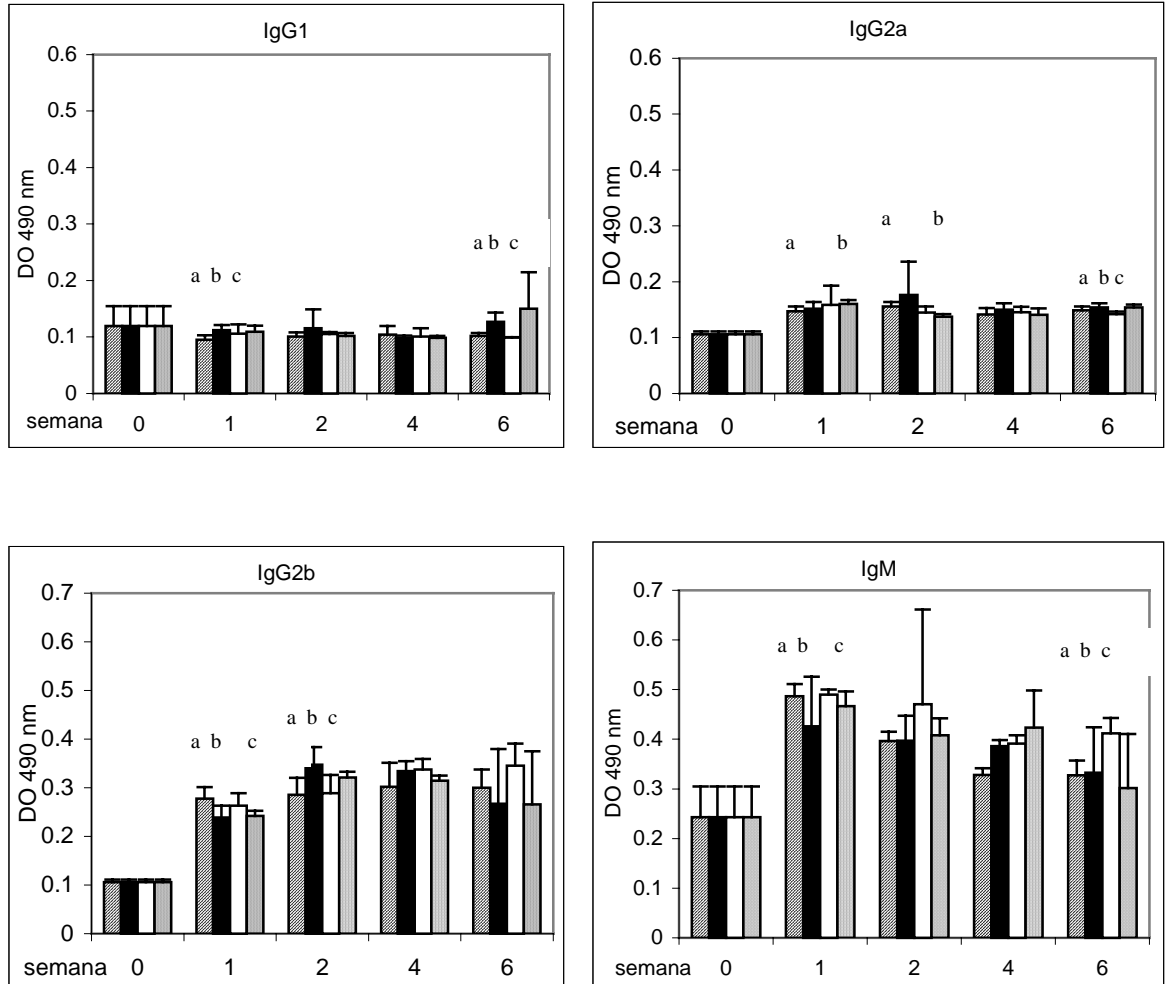


Figura 9: Promedios de las densidades ópticas del ELISA Indirecto para la evaluación de la respuesta inmune a las cepas: Reo 198, Silvestre, mutantes *virB10::Gm* y $\Delta virB11$ de *B. ovis* en ratones durante 6 semanas posteriores a la inmunización.

Reo 198
 Silvestre
 virB10::Gm
 $\Delta virB11$

Las letras a, b, c. Indican que hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

Respuesta celular a *B. ovis* y mutantes *virB*

Los resultados obtenidos al evaluar la producción de citocinas (Figura 10), fueron los siguientes: en la infección con la cepa Reo 198 presentó los niveles más altos de IFN- γ a las 24 y 120 h. Una baja respuesta a la IL-2 fue observada a las 24 h (D. O. 0.01325), manteniéndose con niveles bajos a lo largo de los siguientes muestreos. La IL-4 mostró un decremento de las 24 hasta las 72 h (D. O. 0.008 a 0.003), presentando un incremento entre las 96 h y las 120 h (D. O. 0.013 a 0.0145). En la infección con la cepa Silvestre la citocina de mayor producción fue la IL-4 con un pico más alto a las 72 h (D. O. 0.085) y posteriormente decreció su nivel. Los valores de IFN- γ se mostraron incrementados de 24 h hasta 96 h (D. O. 0.019 a 0.035) regresando a niveles basales a las 120 h (D. O. 0.020). En el caso de la mutante $\Delta virB11$, está indujo una rápida respuesta de IFN- γ a las 24 h (D. O. 0.053) con una marcada reducción a las 48 h (D. O. 0.017). Mientras que en la infección con la mutante *virB10::Gm* los niveles de citocinas fueron los más bajos de los presentados comparados con todas las cepas.

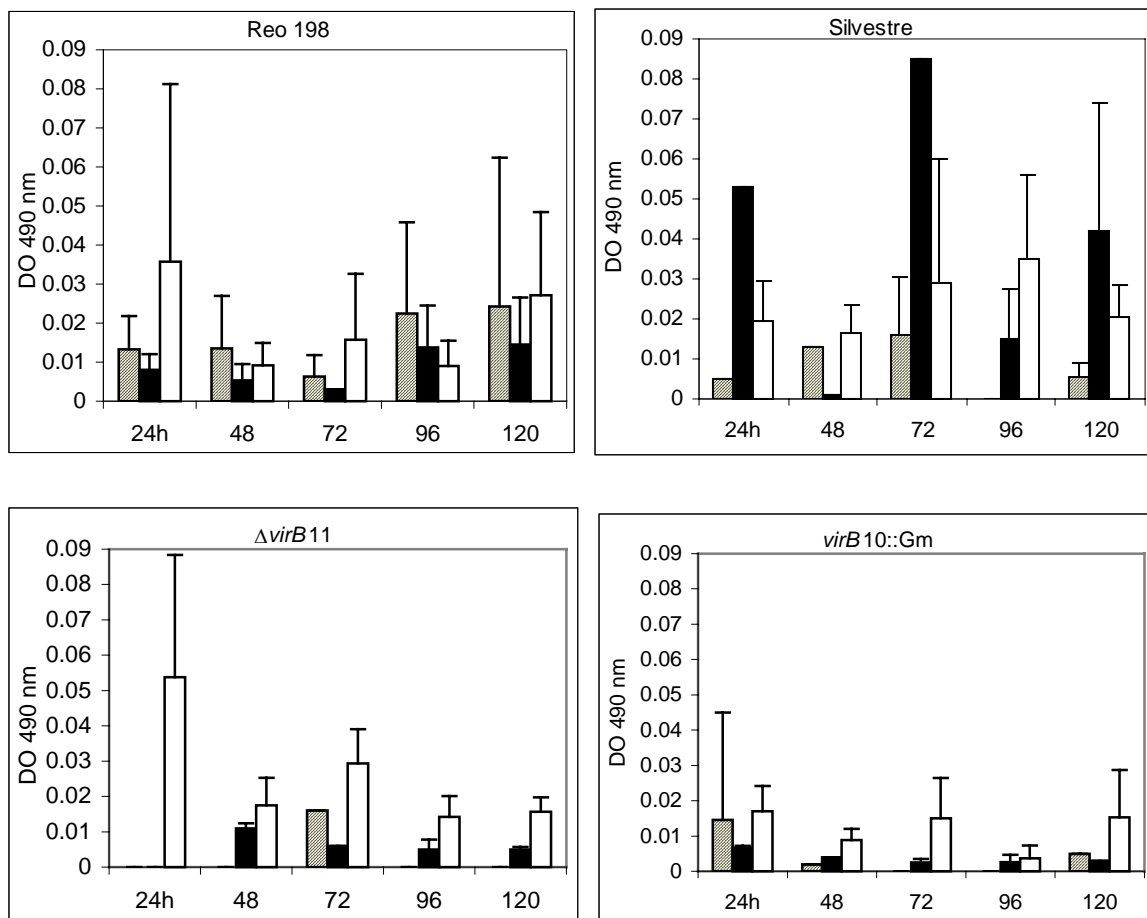


Figura 10. Respuesta de citocinas inducida en ratones inoculados con *B. ovis* y mutantes *virB*, usando ELISA-Duaset, con sobrenadantes de cultivos primarios de bazo de ratones estimulados con las cepas de *B. ovis*: Reo 198, Silvestre, mutantes *virB10::Gm* y $\Delta virB11$. Los valores están expresados en densidades ópticas.

▨ IL2 ■ IL4 □ IFN-γ

7.8 Prueba virulencia residual de las cepas Reo 198, Silvestre y mutantes *virB* en el modelo murino

Las cepas recuperadas a una semana post-inoculación (Figura 11 y cuadro 7), fueron la Reo 198 (1.2×10^4 UFC/ bazo) y la Silvestre (9×10^2 UFC/bazo). Las cepas Reo 198 y la Silvestre sólo fueron indetectables en el bazo la primera semana. Mientras que ambas mutantes $\Delta virB11$ y *virB10::Gm* fueron recuperadas hasta las 3^a y 4^a semanas en valores de 2×10^2 UFC y 1×10^2 UFC por bazo respectivamente. Las cepas complementadas de *virB10::Gmc* y $\Delta virB11c$ fueron recuperadas la 1^a y la 4^a semana. En cuanto a el peso de los bazos, en promedio los de mayor peso por semana fueron los del grupo de los ratones inmunizados con la cepa Silvestre.

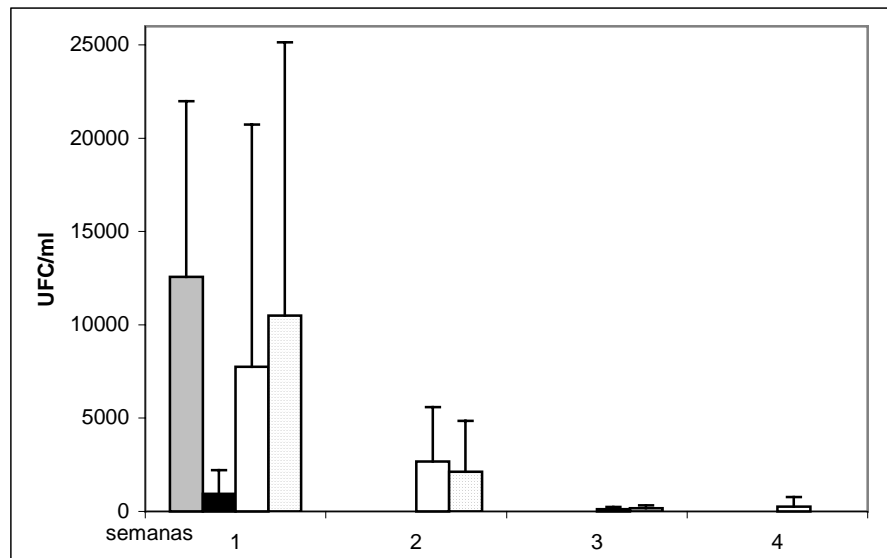


Figura 11. Recuperación de bacterias viables de bazos a los diferentes tiempos post-infección en ratones inoculados intraperitonealmente con las cepas Reo 198, Silvestre y las mutantes *virB10::Gm* y $\Delta virB11$ de *B. ovis*.

■ Reo ■ Silvestre □ $\Delta virB11$ □ *virB10::Gm*

Cuadro 7. Promedios de UFC/ ml recuperadas a los diferentes tiempos post-infección, de bazos en ratones inoculados intraperitonealmente con las cepas Reo 198, Silvestre y las mutantes *virB10::Gm* y Δ *virB11* de *B. ovis*.

Las letras diferentes en la misma columna indican que hubo una diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

Cepa	PROMEDIOS DE UFC/ML POR SEMANA			
	1	2	3	4
Reo	1×10^4 ^a			
Silvestre	9×10^2 ^a			
<i>virB10::Gm</i>	7×10^3 ^b	2×10^3 ^a	1×10^2 ^a	2×10^2 ^a
Δ <i>virB11</i>	3×10^5 ^c	4×10^4 ^b	1×10^3 ^b	2×10^3 ^a
<i>virB10::Gmc</i>	8×10^6 ^a			
Δ <i>virB11c</i>	1×10^4 ^a	2×10^3 ^a	1×10^2 ^a	

8. DISCUSIÓN

La brucelosis es una enfermedad crónica ocasionada por un patógeno intracelular facultativo, que puede sobrevivir y replicarse dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas. Esta característica está asociada al sistema de secreción tipo IV, que es codificado por el operón *virB*.^{11, 24, 60, 62}

El antecedente de la presencia del operón *virB* en *B. ovis*, es un reporte del año 2003, donde de manera indirecta logran identificar con el uso de antisueros específicos la presencia de proteínas VirB5 y VirB8 en brucelas rugosas (*B. ovis* y *B. canis*)³⁸. Este indicio nos llevó a realizar este trabajo, para identificar la presencia del operón *virB* en *B. ovis*. Paulsen *et al.* (2007), publicó en el *GenBank* (Acceso CP000709) la secuencia de la cepa ATCC 25840 de *B. ovis*, en la cual se incluye la secuencia del operón *virB*; confirmando los resultados obtenidos en 2005 en donde se logró identificar y secuenciar algunos de los genes del operón *virB* de la cepa Reo 198 de *B. ovis*⁶².

Durante los últimos años se han llevado a cabo proyectos de secuenciación del genoma completo de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, y recientemente se han finalizado los del genoma de *B. ovis* y *B. canis*^{29, 63, 64, 65, 66}. En los estudios de genómica comparativa entre las primeras tres especies, se observó que más del 90% de los genes poseen entre un 98 y un 100% de identidad a nivel nucleotídico y presentan el mismo orden génico. La comparación de los genomas reveló que las brucelas han sufrido en forma especie-específica un número importante de inactivaciones genéticas debidas a mutaciones puntuales, microdeleciones o corrimientos en el marco de lectura que condujeron a la formación de pseudogenes⁶⁷.

Los resultados de homología encontrados en este trabajo al secuenciar y comparar los genes del operón *virB* de *B. abortus*, *B. melitensis* y de *B. suis* fueron del 96 al 100% de identidad, lo que presenta un valor similar a lo reportado por otros autores^{29, 63, 64, 65}, al comparar los genomas de las diferentes especies de *Brucella*.

Después de haber identificado que el operón *virB* estaba presente en *B. ovis*, se desconocía si era funcional. Se ha demostrado que las mutaciones del SSTIV en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, tienen una menor habilidad de sobrevivir y multiplicarse en células epiteliales, macrófagos murinos y líneas de macrófagos, también se ha reportado la pérdida de su virulencia en el modelo murino ^{29, 68}. Por ejemplo, una mutación polar inducida en el *virB1*, primer gen del operón evadió la habilidad de brucela de replicarse intracelularmente. En ratones infectados con mutantes polares y no polares de *virB10* se demostró que este es el mayor determinante de virulencia en *B. abortus*, lo que es un indicativo que este sistema es esencial para la sobrevivencia intracelular de este patógeno ^{14, 31}.

Otros estudios en *Brucella*, han indicado que la ausencia de algunas proteínas VirB conducen a alteraciones en los pasos tempranos de la infección, en la entrada a las células o durante el tránsito intracelular. En células no fagocíticas como las HeLa, la ausencia de algunas proteínas funcionales como VirB2, VirB4 y VirB9 no afectan la entrada bacteriana ni la fusión fagolisosomal. Sin embargo, la integridad del operón *virB* fue necesaria para que brucela llegue al sitio de replicación en las células HeLa ³⁸.

Se ha demostrado que las mutantes polares además de afectar la transcripción del gen que es mutado, por ejemplo *virB10*, también se ve afectada la secuencia de los genes corriente arriba (*virB11*, *orf13* y *orf12*) alterando el proceso por el cual brucela transita la vía endocítica de manera efectiva. Razón por la cual en este trabajo para evidenciar la funcionalidad de los genes *virB* y determinar si son esenciales para la virulencia de *B. ovis*, se decidió realizar el análisis de mutantes no polares con la interrupción del gen *virB10* y delección del gen *virB11*. El análisis se llevó a cabo mediante la evaluación de la respuesta inmune, así como con ensayos de infección empleando macrófagos ovinos derivados de sangre periférica. Dentro del proceso de estandarización para el ensayo en células se buscó el tiempo ideal de infección, evaluándose diferentes tiempos de infección reportados por otros autores para brucela, tiempos que van de 20 min a una hora ^{29, 69, 70}. Sin embargo, estos tiempos no fueron adecuados

para los ensayos con *B. ovis*. Ya que no se logró la recuperación de UFC al emplear dichos tiempos. Recientemente Martín-Martín *et al.* (2008), realizaron infecciones de células HeLa y macrófagos J744 A.1 con *B. ovis* usando un tiempo de infección de 4 h. Por lo que en este trabajo se probaron tiempos de 2 y 4 h de infección, obteniendo en ambos casos UFC viables en ambos tiempos decidiendo utilizar un tiempo de infección de 2 h.

En la mayoría de los trabajos reportados en los que realizan mutaciones en alguno de los componentes del sistema *virB*, concluyen que este sistema no es necesario en las etapas tempranas de infección, pero si lo es para que la bacteria pueda llegar a su nicho de replicación y actúe como factor de virulencia requerido para la persistencia de la infección en ratones, cultivos celulares ^{14, 29, 37, 72,}

Los resultados obtenidos en los ensayos de infección de los macrófagos ovinos, muestran que la mutante *virB10* sobrevive a las 24 y 48 h y la mutante $\Delta virB11$ sobrevivió hasta las 24 h y que hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el número de UFC recuperadas de las mutantes con respecto a la parental, la cual sobrevive en mayor cantidad hasta las 48 h (Gráfica 2 A), sin embargo, en ninguna de las cepas se observa que haya una replicación. Mientras que la cepa 16M de *B. melitensis* usada como control y de la cual se conoce que el SSTIV es funcional, se observó que su replicación comenzó a partir de las 24 h. Situación que podría indicar que el sistema *virB* presente en *B. ovis*, no es funcional, ya que aunque las mutantes invaden las células no tienen la capacidad de replicarse.

Sieira *et al.* (2000), demuestran que el gen *virB10* es esencial para la vida intracelular de *B. abortus*; trabajaron una mutante polar *virB10::Km* con resistencia a kanamicina y una mutante no polar *virB10::accl* con resistencia a gentamicina. El comportamiento intracelular de ambas mutantes fue analizado en células HeLa y macrófagos J744 A.1. En los macrófagos y en las células HeLa observaron un comportamiento similar, ya que las mutantes fueron incapaces de sobrevivir y de replicarse intracelularmente, a diferencia de lo que ocurre con la cepa parental. Cuando complementaron ambas mutantes, se restauró la multiplicación dentro de las células HeLa y el número de bacterias recuperadas fue similar a la cepa

Silvestre. Concluyeron que en *B. abortus*, el gen *virB10* es un componente esencial del *virB* para la efectiva colonización de células epiteliales y de fagocitos profesionales. Cabe mencionar que al no existir trabajos previos en los cuales se describa el uso del modelo celular para el estudio de *B. ovis*, antes de definir que el modelo más adecuado para los ensayos de infección son los macrófagos ovinos ya que fue el único tipo de células probadas en las que se logró la infección, se realizaron ensayos de infección con células HeLa, CHO y macrófagos peritoneales de ratón, con los cuales no se logró la infección de las células.

Existe una única referencia en la cual realizan infección de células HeLa y macrófagos J744.A1, con cepas mutantes de las proteínas de membrana externa (OMP) de *B. ovis*; obteniendo que la bacteria sólo es internalizada en ambos tipos de células, pero no se replica. Estos datos junto con los resultados obtenidos de este trabajo pueden ser un indicativo de la especificidad de infección de *B. ovis* hacia los ovinos (Martín-Martín *et al.* 2008).

Por otro lado, en mutantes rugosas de *B. abortus* y *B. suis* se ha demostrado que su incapacidad para prevenir la maduración del fagosoma y con esto se vuelven inhábiles para reaccionar en el sitio de replicación ^{21, 73}. Esta situación también ha sido asociada a la entrada de brucelas lisas vía dependiente de los transportadores lipídicos y que en las brucelas rugosas al carecer de la cadena O del LPS y al no entrar por esta vía, se favorezca una rápida fusión del fagosoma con el lisosoma. Indicando que la entrada bacteriana vía transportadores lipídicos es esencial para la maduración de la vacuola ²¹.

La resistencia del hospedero a los patógenos bacterianos intracelulares facultativos como brucela, depende de la adquisición de resistencia mediada por células y la activación de macrófagos por el IFN- γ producido por los linfocitos T ⁷⁴.

Se realizó la evaluación de la respuesta inmune humoral y celular en el modelo murino, utilizando como inductores la cepa Silvestre, la Reo 198 y las mutantes *virB* de *B. ovis*, ya que las evaluaciones que existen sobre la respuesta inmune en el caso de *B. ovis*, son sólo con el uso de fracciones subcelulares

como inductores y no existen antecedentes de estudios de respuesta inmune con el empleo de células completas.

En este trabajo a diferencia de lo obtenido por Jiménez de Bagües *et al.* (1994), donde vacunaron ratones con y sin adyuvante con un “extracto salino caliente” de *B. ovis* y posteriormente desafiaron a los ratones con una cepa PA de *B. ovis*. La vacunación con adyuvante resultó en un incremento significativo de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b y posteriormente cuando los ratones fueron desafiados con *B. ovis* los anticuerpos predominantes fueron IgG2a, IgG3 y con un nivel muy bajo de IgG1. En contraste, los resultados obtenidos este trabajo fueron que al vacunar ratones Balb/c con las cepas Reo 198, Silvestre y las mutantes *virB* de *B. ovis*, los niveles de anticuerpos predominantes fueron IgG2b e IgM. Las diferencias las podemos atribuir a que en el estudio de Jiménez, los resultados corresponden a una respuesta secundaria ocasionada por el desafío y en este estudio se buscaba evaluar la respuesta inmune primaria, pero no la capacidad de protección conferida por las mutantes frente al desafío experimental.

Al analizar la respuesta de citocinas en ratones inoculados con las cepas de *B. ovis*: Silvestre, la Reo 198 y sus mutantes *virB*. Encontramos que con la cepa Silvestre los resultados fueron indicativos de una respuesta de tipo Th2, lo que es determinado por el incremento observado de la IL-4 (Figura 9). Esto podría explicarse debido a que la susceptibilidad innata de los ratones Balb/c a numerosos patógenos intracelulares está asociada a la hipoproducción de IFN- γ y a una respuesta preferencial de tipo Th2⁷⁶. Sin embargo, al inmunizar con la cepa Silvestre también se observó comparando con la IL-4, una moderada respuesta de IFN- γ e IL-2 la cual es indicativa de una respuesta de tipo Th1 que es característica de las bacterias intracelulares⁷⁷.

Los resultados obtenidos con la cepa Reo 198, fueron de una pobre respuesta inmune celular, las citocinas con mayor producción fueron IFN- γ seguida por la IL-2 marcando una pobre respuesta de tipo Th1 (Figura 9). El hecho de que la respuesta de IL2 e IFN- γ fuera baja podría atribuirse a que la cepa Reo 198 al

haberse adaptado a condiciones del laboratorio, provocó que su virulencia se muestre disminuida.

Por otro lado, con la mutante $\Delta virB11$ sólo se observó una baja respuesta de IFN- γ a las 24 h que decreció después de 48 h y con la mutante *virB10::Gm* sólo se presentaron niveles bajos de IFN-g, IL2 e IL4, lo cual es indicativo de que los genes *virB10* y *virB11* de *B. ovis* son necesarios para inducir una respuesta inmune. Esto es referido por Sieira *et al.* (2000), donde usando mutantes polares y no polares de *B. abortus* encontraron que el gen *virB10* y los genes corriente arriba (*virB11- orf12-orf13*) son esenciales para la patogénesis en ratones y sugieren que la integridad del operón *virB* es requerido para la virulencia de la cepa Silvestre.

Salas *et al.* (2005), empleó diferentes fracciones subcelulares (OMP, IMP y CP) de *B. ovis*, para evaluar la respuesta de citocinas en ratones. Las OMP's produjeron elevados niveles de IL-2 e IFN- γ y causó una fuerte respuesta en la intradermorreacción (hipersensibilidad de tipo retardado DTH). Esto es consistente con una respuesta clásica de linfocitos tipo Th1, asociada con la adquisición de resistencia celular y DTH. La IL-4 sólo fue inducida por la fracción OMP, demostrando activación de linfocitos del tipo Th2 y una respuesta de tipo humoral.

La maduración de la vacuola que contiene a brucela (BCV), dentro del nicho de replicación es dependiente del T4SS *virB* y por lo tanto, este sistema constituye un importante factor de sobrevivencia intracelular de *Brucella spp* ^{78, 79}.

Fue importante determinar la virulencia residual de las mutantes *virB* de *Brucella ovis* en el modelo murino, ya que la sobrevivencia intracelular determina la capacidad de inducir una respuesta inmune.

Se han realizado mutaciones en los diferentes componentes que actúan como factores de virulencia como son el LPS, glucano cíclico β -1,2, SSTIV - *virB*, sistema *BvrR/BvrS* en los cuales pueden verse afectados desde el tráfico

intracelular, hasta mostrar una reducción significativa de su virulencia en el modelo murino ^{14, 28, 29}.

En un estudio realizado por Kim *et al.* (2003), en el cual utiliza mutantes *virB* de *B. abortus* para evaluar la virulencia en ratones, en los cuales las mutantes fueron eliminadas más rápido que la cepa Silvestre, pues de la cepa Silvestre recuperaron 5.4×10^6 UFC/bazo, mientras que en las mutantes *virB* el número de bacterias recuperadas fue de 5.5×10^1 UFC/bazo a los 10 días PI lo que indica que no hubo replicación. Mientras que Sieira *et al.* (2000), al realizar una infección con la cepa 2308 y mutantes polar y no polar *virB* de *B. abortus* en ratones, el número de bacterias recuperadas fueron un logaritmo arriba (6.4×10^5 UFC), de lo inoculado con la cepa Silvestre, pero no se obtuvieron bacterias viables de los ratones inoculados con la mutante polar. Con la mutante no polar, el número de bacterias recuperadas fue más bajo 3.5×10^2 UFC que los de la cepa Silvestre. Las cepas complementadas recuperaron su virulencia y sus cuentas viables fueron similares a la cepa Silvestre parental.

En este estudio las cepas Reo198 y la Silvestre sólo se recuperaron de los bazos de ratones inmunizados durante la primera semana PI y las mutantes fueron recuperadas hasta la 3a y 4a semana PI. Estos resultados no fue lo que se esperaba, ya que en trabajos en donde reportan el uso de cepas mutantes y realizan la virulencia residual ^{29, 69, 80, 81}, el tiempo en el cual se recuperan las cepas a partir del bazo es menor al tiempo de recuperación de las cepas parentales. Alton (1988), refiere que cuando el inóculo es una cepa vacunal de virulencia residual normal, como S-19 o Rev 1 no se recuperaran más del 12.5% y de 25-50% respectivamente, bacterias por bazo. Mientras que si el organismo inoculado ha perdido su virulencia residual normal la bacteria no se recuperara de ninguno de los bazos.

A pesar de la esplenomegalia observada en el grupo de ratones inoculados con la cepa Silvestre, está sólo fue recuperada durante la primera semana post inoculación. El peso obtenido de los bazos a los diferentes tiempos no fue

indicativo de la cantidad de UFC obtenidas, por lo que en este estudio no hubo relación en el peso con el número de las bacterias recuperadas. Mientras que en un estudio realizado por Kim *et al.* (2005), en el cual evaluó la virulencia residual a 10 días PI de cepas mutantes y la Silvestre de *B. abortus*, en el cual encuentran que la Silvestre y las complementadas indujeron esplenomegalia como consecuencia de la respuesta inflamatoria y el número de UFC/ml recuperadas fue 6.2×10^5 y 5.2×10^5 respectivamente y con las mutantes la respuesta inducida fue menor y la recuperación fue de 2×10^3 UFC/ml.

Ugalde *et al.* (2003), analizaron la protección y la producción de citocinas inducidas en ratones BALB/c inoculados con una mutante rugosa por delección del gen de la fosfoglucomutasa (*pgm*) en *B. abortus* la cual fue incapaz de ensamblar por completo la cadena O del LPS. Esta mutante rugosa fue avirulenta en el modelo murino inoculado a una dosis de 1×10^7 UFC/ml, obteniendo que la cepa fue eliminada de los ratones a las 8 semanas PI, mientras que la cepa virulenta 2308 se recuperó a las 8 semanas PI. Esta mutante es avirulenta en ratones, dado que no fue posible el aislamiento bacteriano a partir del bazo a los 15 días PI. Sin embargo, la capacidad de multiplicarse dentro de las células HeLa se observa disminuida al compararla contra la cepa parental y no fue totalmente eliminada como sucedió en los ratones. La respuesta de citocinas indicó el establecimiento de una respuesta de tipo celular ya que en la medición realizada solo hubo producción de IFN- γ en los grupos de animales vacunados y no se detectó la producción de IL-4.

Las células T de bovinos y murinos presentan un perfil de citocinas similar al ser estimulados con *B. abortus*, sugiriendo una respuesta inmune análoga entre esas dos especies animales y haciendo posible el uso de ratones como un modelo alternativo en estudio de la inmunidad de brucelosis ⁷⁷. Diversos autores han demostrado que el uso de modelo murino es adecuado para realizar evaluaciones de cepas mutantes, así como de vacunas en *B. abortus* y *B. melitensis* ^{46, 83, 84}. En este estudio el modelo murino no fue el más adecuado para evaluar la respuesta

inmune celular debido a la pobre respuesta o inhabilidad de la respuesta observada.

9. CONCLUSIONES

- Los genes del operón *virB* de *B. ovis* comparados con los de *B. abortus* y de *B. melitensis*, presentaron homología del 96 al 100% de identidad.
- En el ensayo celular empleando macrófagos ovinos, las cepas de *B. ovis* sobrevivieron pero no se observó replicación; situación que podría indicar que el sistema *virB* presente en *B. ovis*, no es funcional, pues no tienen la capacidad de replicarse.
- En la respuesta inmune humoral en ratones Balb/c inoculados con las cepas Reo 198, Silvestre, *virB10::Gm* y Δ *virB11* de *B. ovis*, los niveles de anticuerpos predominantes fueron IgG2b e IgM.
- La producción de citocinas inducidas por las mutantes *virB* y las cepas de referencia de *B. ovis* fueron indicativas de una respuesta de tipo Th1, por el incremento observado de IFN- γ .
- La cepa Silvestre provocó una elevada respuesta de IL4, correspondiente al tipo Th2.
- En el grupo de ratones inoculados con las cepas Reo198 y la Silvestre, sólo se recuperaron UFC durante la primera semana PI y las mutantes fueron recuperadas hasta las 4 y 5 semana PI. Resultados no esperados ya que lo reportado con el uso de mutantes es que el tiempo de recuperación es menor al de las cepas parentales.
- La pobre respuesta inmune celular en ratones inoculados con la cepa Reo 198, se atribuye a que esta cepa se ha adaptado a condiciones del laboratorio lo que ocasiona que su virulencia se muestre disminuida.
- A diferencia de lo reportado con otras especies de brucelas lisas y rugosas, el modelo murino no fue el adecuado para evaluar la respuesta inmune celular frente a *Brucella ovis*.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos no son suficientes para evidenciar la funcionalidad del operón *virB* de *B. ovis*; por lo que se sugiere seguir realizando más estudios como:

1. El transito intracelular de la bacteria usando como modelo celular a los macrófagos ovinos.
2. El uso de otra cepa para la realización de las mutantes no solo en los genes que se estudiaron.
3. Uso del modelo ovino para la evaluación de la respuesta inmune.

11. REFERENCIAS

1. FAO- OIE-WHO. Anuarios de Sanidad Animal. 1993–1995. Sanidad Animal Mundial. 1995.
2. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet Microbiol. 2002; 90: 281- 297.
3. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. N Engl J Med. 2005. 352:2325-36. Disponible en:
<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis.pdf>
4. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, María-Jesús DM, Martín-Martín AI, Cloeckaert A, María-Jesús G, and Vizcaíno N. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. Infect Immun. 2007; 75: 8: 4050-4061.
5. Fugier E, Pappas G and Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. Exp. Rev Mol Med. 2007. 9:1-10. DOI: 10.1017/S1462399407000543.
6. Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Dick ED, Snider CL, Cappelli D, Ebersole JL, Nathanielsz PW & Hubbard GB. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. J Med Primatol J Med Primatol. 2009; 38:70-73.
7. Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). Vector Borne Zoonotic Dis. 2007; 7: 4:679-87.
8. Scholz HC, Hubálek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P. *et al.* *Brucella microti* sp. Nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Sys Evol Microbiol. 2008; 58: 375 - 382.
9. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Pfeffer M, Krüger M, Cloeckaert A, Tomaso H. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2009; 9:2: 153-155.
10. Pei J and Ficht TA. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. Infect Immun. 2004; 72:1:440 - 450.
11. Roop II MR, Bellaire BH, Wright VM, Cardelli JA. Adaptation of *Brucella* to their intracellular niche. Mol Microbiol. 2004; 54:621-630.
12. Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, and Gorvel JP. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. Infect. Immun. 1998; 66:2387–2392.
13. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, Van Der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, and Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. 1998; 66:5711–5724.

14. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, and Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* 2001; 3: 159-168.
15. Celli J and Gorvel JP. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7:93–97.
16. Blasco JM y Barberan M. Epidemiología patogenicidad y cuadro clínico. En: Ovis, Tratado de Veterinaria Práctica. Madrid Ed. Luzans, 1989; 25-32.
17. Robles CA. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Rev Med Vet.* 1998; 79:1.
18. Salas TE, Núñez AAL, Mejía SP, Diagnóstico de Brucelosis ovina. En: Díaz AE, Hernández AL, Valero EG, Velásquez QF, Diagnóstico de Brucelosis. México. INIFAP, SAGAR. 2001:140-144.
19. Salas-Télez E, Núñez AAL, Tenorio V, Díaz-Aparicio E, De La Garza, M, and 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.
20. OIE. Brucellosis Undulant Fever, Malta Fever, Mediterranean Fever, Enzootic Abortion, Epizootic Abortion, Contagious Abortion, Bang's Disease. The center for food security & public health. IOWA STATE UNIVERSITY. July 6, 2007. 1-13.
21. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003; 71:1481-1490.
22. Carle A, Höppner C, Ahmed AK, Yuan Q, Den Dulk-RasA, Vergunst A, O'Callaghan D, and Baron C. The *Brucella suis* Type IV Secretion System assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient Competence *Infect Immun.* 2006; 4:1:108–117.
23. Jyhshiu L and Ficht T. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage. *Inf. Immun.* 1995; 63:1409-1414.
24. Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res Microbiol.* 2006; 157: 93-98.
25. Arenas GN, Staskevich S, Aballay A, Mayorga LS. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages *Infect Immun* 2000; 68:4255-4263.
26. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 281- 297.
27. Arellano RB, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Morrión I, Gorvel JP. Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immun.* 2005; 6:6:618-625.
28. Ciocchini AE, Roset MS, Briones G, Iñón de Iannino N, and Ugalde RA. Identification of active site residues of the inverting glycosyltransferase Cgs required for the synthesis of cyclic β -1, 2- glucan, a *Brucella abortus* virulence factor. *Glycobiol.* 2006; 16: 7:679- 691.

29. Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO and Ugalde RA. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol.* 2000;182, 4849-4855.
30. O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschiroli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, and Ramuz M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 1999; 33:1210-1220.
31. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, and O'Callaghan D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99:1544 - 1549.
32. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, and O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microb.* 2002; 90: 341- 348.
33. Paschos A, G. Patey D. Sivanesan, C. Gao R. Bayliss, G. Waksman, D. O'Callaghan, and C. Baron. Dimerization and interactions of *Brucella suis* VirB8 with VirB4 and VirB10 are required for its biological activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2006.103: 19: 7252-7257.
34. González-Pedrajo B, Dreyfus G. Sistemas de Secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje bioquímico. Facultad de Medicina-UNAM.* 2003; Vol: XXVII: 45-62. [citado 7 mayo de 2009] Disponible en: (<http://bg.unam.mx/mensajebioquimico>)
35. Liu Z, y Binns AN. Functional subsets of the virB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of plasmid RDF1010. *J. Bacteriol.* 2003; 185:3259-3269.
36. Burns DL. Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 1:29-34.
37. Den Hartigh AB, Rolan HG, De Jong MF, and Tsolis RM. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7, Are Essential for Mediating Persistence of *Brucella* in the Reticuloendothelial System. *J Bacteriol.* 2008; 190:13: 4427–4436.
38. Rouot B, Alvarez-Martínez MT, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, Boigegrain RA, Zumbihil R, O'Callaghan D, Domke N and Baron C. Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect. Immun.* 2003; 71:1075-1082.
39. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló M, Moreno E, Morrión I, Blasco JM, Gorvel JP, and Lopez-Goñi I. A two component regulatory system conserved in animal pathogenic *Brucella* and plant pathogenic

- Agrobacterium* is required for host cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 1998; 29:125-138.
40. Zhan Y and Cheers C. Endogenous Interleukin-12 are involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 1995; 63: 4: 1387-1390.
 41. Zhan Y, Liu Z, and Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect Immun* 1996; 64: 7: 2782-2786.
 42. Díaz R, Blasco JM. Diagnostico inmunológico. En: Bovis, Tratado de veterinaria práctica. Madrid España. Ed. Luzans, 1986:55-69.
 43. Corbel MJ. Brucelosis, En: Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. J.A. Laing, editores. México. Interamericana. 1991;190-230.
 44. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang L, Zaitseva M, Lapham C, *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microb Infect.* 2001; 3: 43-48.
 45. Aréstegui MB, Gualtier SC, Domínguez J, Scharovsky OG. El género *Brucella* y su interacción con el sistema monocuclear fagocítico. *Vet Méx.* 2001; 32:131-139.
 46. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, and Ciuchin F. Mouse cytokine profiles associate with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *Brucella abortus* 2308. *Infect Immun.* 2001; 69:10:6541-6544.
 47. He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, and Schurig GG. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun.* 2001; 69:5502-5508.
 48. Cassataro J, Velikovskiy CA., De la Barrera S, Estein SM., Bruno L, Bowden R, Pasquevich KA, Fossati CA, and Giambartolomei GH. A DNA vaccine coding for the *Brucella* Outer Membrane Protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect Immun.* 2005; 73: 10:6537- 6546.
 49. López M. 2008. *Brucella*. 2008. [citado 7 mayo de 2009]. Disponible en: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap7/capitulo.html>
 50. Bustamante SJ, Salazar HFI. Estudio bacteriológico y serológico sobre brucelosis bovina en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. (Tesis de Licenciatura) México, DF. México: FESC Univ Nal Aut Méx. 1998.
 51. Castro HA, González SR, Prat MI. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 2005; 39:2:203-216.
 52. Saldarriaga OA, Ossa JE, y Rugeles MT. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.* *Rev Col Cienc Pec.* 2002; 15: 2:180-187.
 53. Baldwin CL. Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol.* 2006; 26:5:407- 442.
 54. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, John FE, Heidelberg, Read TD, Dodson RJ, *et al.* The *Brucella ovis* genome Acceso CP000709. Centro de

secuencia TIGR. The institute for genomic research 9712 Medical center Dr Rockville MD20850 USA. 2007.

55. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, And Ugalde RA. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: Role of Lipopolysaccharide in Virulence and Intracellular Multiplication. *Infect Immun.* 2000; 68:10:5716–5723.
56. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 1995; 166:175-176.
57. Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering, transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1983; 1:784–791.
58. Sambrook, J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.
59. Alva PJ. 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. (Tesis de Maestría). México (D.F.) México. FMVZ Univ Nal Aut Méx. 2008.
60. Roux CM, Rolán HG, Santos RL, Beremand PD, Thomas TL, Adams LG, and Tsolis RM. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell Microb.* 2007. 9:7:1851-1869.
61. Rolán HG and Tsolis RM. Inactivation of the type IV secretion system reduces the TH1 polarization of the immune response to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 2008; 76: 7: 3207-3213.
62. Leal HM, Arellano RB; Tenorio GVR; Hernández CR; Suárez GF; Díaz AE. Identification and sequencing of *Brucella ovis* *virB* operon genes. *Memorias Brucellosis 2005, International Research Conference including the 58th Brucellosis research conference.* 2005 octubre 15-19; Mérida, Yucatán México. 138.
63. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, John FE, Heidelberg, Read TD, Dodson RJ, *et al.* The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99:20: 13148–13153.
64. DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, and Mujer C, Los T, *et al.* The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol.* 2002; 90:587-592.
65. Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, Sangari FJ, Lobo JM, de Jong MF, Ren Q, Myers G, Brinkac LM, Nelson WC, Deboy RT, Angiuoli S, Khouri H, Dimitrov G, Robinson JR, Mulligan S, Walker RL, Elzer PE, Hassan KA, Paulsen IT. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS ONE.* 2009; 4(5):e5519. [citado 19 de mayo de 2009]. Disponible en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0005519>.

66. Setubal JC, Bowns C, Boyle S, Crasta OR, Czar MJ, Dharmanolla C, et al. *Brucella canis* ATCC 23365 whole genome shotgun sequencing project. NCBI Reference Sequence: NC_010104.1 Submitted (04-DEC-2007) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 2008. Unpublished PATRIC <http://patric.vbi.vt.edu>.
67. Sieira R. Identificación, caracterización funcional y análisis de la regulación transcripcional del operón *virB* de *Brucella abortus*. (Tesis Doctoral). Argentina (Buenos Aires) Argentina. Univ Nal Gral S Martín. Argentina 2005.
68. Rolán HG and Tsolis RM. Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus virB* mutant colonization. *Infect Immun*. 2007; 75: 6:2965-2973.
69. Kim S, Watarai M, Kondo Y, Erdenebaatar J, Makino S, and Shirahata T. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun*. 2003; 71:3020-3027.
70. Den Hartigh AB, Yao-Hui S, Sondervan D, Heuvelmans N, Reinders MO, Ficht TA and Tsolis RM. Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*. 2004; 72:9: 5143–5149.
71. Martín-Martín AI, Caro-Hernández P, Orduña A, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect*. 2008; 10:6:706-10.
72. Delrue RM, Martínez –Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, et al. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular Microbiology*. 2001; 3:7:487-497.
73. Arellano-Reynoso B, Díaz-Aparicio E, Leal-Hernández M, Hernández L, Gorvel J-P. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. *Vet Microbiol*. 2004; 98: 307–312.
74. Zhan Y, Kelso A, and Cheers C. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T Cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect Immun* 1995; 63: 3: 969-975.
75. Jiménez De Bagüés MP, Elzer PH, JM. Blasco, Marin C, Gamazo C, and Winter AJ. Protective immunity to *Brucella ovis* in Balb/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect Immun*. 1994; 62:2:632-638.
76. Ulett GC, Ketheesan N, and Hirst RG. Cytokine Gene Expression in Innately Susceptible Balb/c Mice and Relatively Resistant C57BL/6 Mice during Infection with Virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*. 2000; 68:4: 2034-2042.
77. Splitter G, Oliveira S, Carey M, Miller C, Ko J., and Covert J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996; 54: 309-319.
78. Rajashekara G, Glover DA, Banai M, O'Callaghan D, and Splitter GA. Attenuated Bioluminescent *Brucella melitensis* Mutants GR019 (*virB4*),

- GR024 (*galE*), and GR026 (BME11090-BME11091) Confer Protection in Mice. *Infect Immun.* 2006; 74:5:2925–2936.
79. Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerci DJ, and Ugalde RA. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103:44:16514–16519.
80. Kim S, Watanabe K, Suzuki H, Watarai M. Roles of *Brucella abortus spoT* in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiol.* 2005; 151: 1607- 1617.
81. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón S, and Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun.* 2003; 71:11: 6264–6269.
82. Alton, G.G, Techniques for the brucellosis laboratory. Inst. Nal de la Reserche Agronomique, París. 1988.
83. Montaraz JA and Winter J. Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun.* 1986; 53:2:245-251.
84. González D, Grillo MJ, De Miguel MJ, Tara A, Arce-Gorvel V, Delrue R, *et al.* Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS ONE.* 2008; 23; 3(7):e2760. [citado 7 mayo de 2009]. Disponible en: www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002760