



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SINTAXINA 4,
DURANTE LA INVASIÓN DE MACRÓFAGOS
HUMANOS DE LA LÍNEA THP-1 POR *Brucella
melitensis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA
DIANA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ



ASESOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
ASESOR TÉCNICO: DR. ALFREDO CASTAÑEDA RAMÍREZ

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.

Bertolt Brecht

Memoria selectiva para recordar lo bueno, prudencia lógica para no arruinar el presente, y optimismo desafiante para encarar el futuro.

Isabel Allende

El genio se compone del dos por ciento de talento y del noventa y ocho por ciento de perseverancia.

Ludwing Van Beethoven

DEDICATORIAS:

A mi mamá Marisela Rodríguez García, por su apoyo a lo largo de esta larga carrera llamada vida, por enseñarme a ser fuerte, a luchar y buscar soluciones en los momentos más difíciles. Por la confianza, paciencia y libertad que me ha otorgado para lograr todo lo quiero.

A mi hemanito David González Rodríguez, una de las personas que más amo y que me da inspiración de continuar pese a las adversidades.

A mi padre Raúl González Piña, esos nueve años a tu lado ayudaron a ser la persona que soy con sus colores policromáticos, gracias por todo tu apoyo brindado y por buscar siempre lo mejor para nosotros. Estoy segura de lo orgulloso que estarías de nosotros.

A Andrés García Ballesteros, por tu amor incondicional, por tu apoyo y tus palabras de aliento, por ser y estar en mi vida, por las risas que me regalas, por esos momentos tan lindos y los que nos faltan. Gracias por todo, Te amo.

Quiero dedicar este trabajo, fruto de muchos esfuerzos y perseverancia a toda mi familia (Rodríguez García y González Piña) por que han sido parte de todo este proceso y me han ayudado a que todo esto sea posible de alguna u otra manera.

También este trabajo está dedicado a mis hermanitos por elección, aquellos que han estado y estarán siempre en mi vida. Los amo!!!

AGRADECIMIENTOS:

A la vida, por todas las experiencias y aprendizajes que me ha dejado vivir y saborear, y lo que falta.

A todas las personas que han sido parte de mi historia porque tantas enseñanzas me han dejado en su paso por mi vida y han contribuido a que sea una mejor persona.

Al Dr. Alfredo Castañeda, por todo su apoyo, amistad y conocimiento compartido. Gracias por sus palabras acertadas en el momento indicado. Gracias por no dejarme claudicar cuando estuve a punto de hacerlo y ayudar a terminar este ciclo tan importante de mi vida.

Al Dr. Antonio Verdugo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y aprender muchísimo. Por confiar en mí y en mis habilidades. Por aprender a defenderme ante la vida y encontrar otra perspectiva de la misma. Gracias por abrirme las puertas a su laboratorio, marcó una historia muy importante de mi vida.

A mis amigos y compañeros del LMM: Zule, July, Aide, Wicho, Julio, Rodri, Ilane, Xan, Chava, Lázaro, Sra. Francis, Jonathan, Gaby, Edith, Mau, por todos los momentos y risas compartidas, nadie sabe todo lo que implica estar en el LMM, sólo si ha estado dentro; esos sabores agrícolos al final te dejan un agradable sabor de boca.

A Adolfo Ortiz Rico, por todo tu apoyo y conocimientos que me diste. Sin tu ayuda, otra cosa hubiera sido mi estancia en el laboratorio. Gracias por todo amigo.

A la Dra. Xochitl Vega Manriquez por el apoyo brindado para poder llevar a cabo los ensayos en el equipo de tiempo real.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, en especial a la Dra. Elena Larrieta y al CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), en especial al Dr. Efrén Díaz Aparicio, por permitirme el uso del equipo de tiempo real necesarios para culminar mis experimentos.

A todos los integrantes del Departamento de Microbiología e Inmunología, por todo su apoyo. Sin duda, el trabajo obtenido es el resultado de un trabajo en equipo, el equipo de Microbiología e Inmunología.

A Arely, por tener más que un parentesco, eres mi confidente, mi amiga, mi hermana. Te amo mucho linda. Gracias por todo el tiempo compartido y lo que falta.

A los yeyunos: Vir, Álvaro, Rey, Omar, Moy; por esos momentos compartidos, consejos, risas y apoyo incondicional. Los quiero mucho.

A mis queridas amigas Dam, Miri y Joyce, gracias por ser parte importante de mi vida. Por su apoyo incondicional y porque sé que siempre estarán ahí, en los momentos más importantes de mi vida como este y en los no tan importantes también.

A la familia García Ballesteros y Ballesteros Camacho, por aceptarme en su familia y hacerme parte de ella, por todo su apoyo incondicional, los quiero mucho.

A la familia Flores Vázquez por todo lo vivido a su lado, por esas enseñanzas y todo su apoyo, se los agradeceré eternamente.

Este trabajo fue financiado por los proyectos:

PAPIIT IN222907. "Patogénesis molecular de la brucelosis: dinámica de VAMP3 y caveolina durante la infección por *Brucella melitensis*".

PAPIIT IN212610. "Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos"

Responsable: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
1.0 Introducción.....	2
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 El género <i>Brucella</i>	2
1.3 Epidemiología.....	7
1.4 Diagnóstico.....	10
1.5 Mecanismos de Patogenicidad de <i>Brucella</i> spp.	12
1.6 Tránsito intracelular de <i>Brucella</i> spp. dentro de la célula huésped...	17
1.7 Proteínas de fusión involucradas en la vía secretora del tránsito intracelular.....	21
1.8 Alteración de las proteínas involucradas en el tránsito intracelular por efecto de microorganismos patógenos.....	22
2.0 Justificación.....	24
3.0 Hipótesis.....	25
4.0 Objetivo General.....	25
4.1 Objetivos Específicos.....	25
5.0 Materiales y Métodos.....	26
6.0 Resultados.....	40
7.0 Discusión.....	55
8.0 Conclusiones.....	62
8.0 Prospectivas.....	63
9.0 Bibliografía.....	64

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Figura 1.....	13
Figura 2	20
Figura 3.....	26
Figura 4.....	31
Figura 5.....	32
Figura 6.....	33
Figura 7.....	34

Figura 8.....	35
Figura 9.....	36
Figura 10.....	36
Figura 11.....	40
Figura 12.....	41
Figura 13.....	42
Figura 14.....	44
Figura 15.....	45
Figura 16.....	45
Figura 17.....	46
Figura 18.....	47
Figura 19.....	47
Figura 20.....	49
Figura 21.....	51
Figura 22.....	51
Figura 23.....	52
Figura 24.....	52
Figura 25.....	53
Figura 26.....	53
Figura 27.....	54
Cuadro 1.....	4
Cuadro 2.....	5
Cuadro 3.....	30
Cuadro 4.....	33
Cuadro 5.....	34

ABREVIATURAS

ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Amp	Ampere
ANOVA	Análisis de Varianza
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
C.b.p.	Cuanto baste para
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CR3	Receptor 3 del Complemento
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEA1	Antígeno de los Endosomas Tempranos 1
ERES	<i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
g	Gravedades
G3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
HeLa	Línea Celular de células epiteliales de origen humano, Henrietta Lacks
Kb	Kilobase
KDO	Ácido 2-ceto 3-deoxioctulosónico
LAMP1	Proteínas de Membrana Asociadas a Lisosomas 1
LB	Luria Bertani
LFA-1	Antígeno 1 Asociado a la Función Leucocitaria
LPS	Lipopolisacárido
mg	Miligramo
MHC II	Moléculas de Histocompatibilidad de Clase II
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NSF	Factor Soluble a N-etilmaleimida
NTC	<i>No Template Control</i>
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCRq	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
PDI	Fosfatidilinositol
PMA	Acetato de Forbol Miristato

RT-PCR	Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS-PAGE	Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundo
SNARE	Proteínas Solubles de Unión al Factor Sensible a la N-Etilmaleimida
TCA	Ácido tricloroacético
THP-1	Línea Celular de monocitos de origen humano
TLR-4	Receptor Tipo Toll 4
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UI	Unidades Internacionales
URE	Unidades Relativas de Expresión
VAMP3	Proteína de Membrana Asociada a Vesículas o Sinaptobrevina
VCB	Vacuolas que Contienen a <i>Brucella</i> spp
VD₃	1 α ,25-dihidroxitamina D ₃
μg	Microgramo
μl	Microlitros

Resumen

González Rodríguez Diana. “**Expresión de la Proteína Sintaxina 4 durante la Invasión de Macrófagos Humanos de la Línea THP-1 por *Brucella melitensis***”. Bajo la supervisión del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y el Dr. Alfredo Castañeda Ramírez.

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por diversas especies del género *Brucella* spp. La virulencia de la bacteria está fuertemente relacionada a su capacidad de modificar el tránsito intracelular del fagosoma para evitar ser destruida. Por otro lado, la fagocitosis de estas bacterias ocurre principalmente en las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Existe una familia de proteínas denominadas SNARE presentes en estos sitios, que promueven la secreción de citocinas por medio de la fusión de membranas de manera simultánea a la fagocitosis. Algunos patógenos intracelulares modifican la función de las proteínas SNARE, favoreciendo su establecimiento intracelular. Se conoce que *Brucella* spp. es capaz de modificar la expresión de proteínas involucradas en el tránsito intracelular, pero no existen reportes sobre la modificación de alguna proteína de la familia SNARE, como Sintaxina 4, por parte de esta bacteria. El objetivo de este trabajo fue determinar si la expresión de la proteína Sintaxina 4 es modificada durante la infección por *Brucella melitensis* en macrófagos humanos de la línea celular THP-1, por medio de ensayos de PCRq y *Western Blot* durante los primeros 15, 30, 45, 60 min post-infección, utilizando a *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis como control. Se observaron fluctuaciones en la expresión de la proteína en las infecciones con ambas bacterias en los diferentes tiempos postinfección, pero la expresión en células infectadas con *B. melitensis* fue menor comparada con las células infectadas con *S. Enteritidis*. Se concluye que *B. melitensis* es capaz de disminuir la expresión de Sintaxina 4 en etapas tempranas de la fagocitosis, lo cual podría influir en el proceso de internación y sobrevivencia de la bacteria.

1.0 Introducción

1.1 Antecedentes

La brucelosis, también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante, fiebre del Mediterráneo o septicemia de Bruce, es una enfermedad infectocontagiosa ocasionada por diversas especies del género *Brucella* spp. Estas bacterias Gram negativas tienen la capacidad de infectar a una amplia variedad de mamíferos, incluyendo al humano, aunque se considera a los artiodáctilos sus principales hospederos. Según datos de la *Food and Agriculture Organization* (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la *Office International des Epizooties* (OIE) es una de las principales zoonosis a nivel mundial.^{1, 2, 3}

1.2 El género *Brucella* spp.

El género *Brucella* spp. se clasifica taxonómicamente en el grupo alfa, subgrupo 2 de las Proteobacterias dentro del orden de los *Rhizobiales*. En este grupo filogenético, se encuentran especies bacterianas que actúan como microorganismos intracelulares obligados o facultativos como *Bartonella* spp. y *Rickettsia* spp.; patógenos extracelulares de las plantas como *Agrobacterium* spp.; simbioses de animales y plantas como *Wolbachia* spp. y *Sinorhizobium meliloti*, así como bacterias que habitan en el suelo como *Caulobacter* spp. y *Ochrobactrum* spp., esta última puede ocasionar infecciones oportunistas en el hombre.^{2,4,5,6}

La clasificación tradicional de las distintas especies del género *Brucella* spp. se basa en la preferencia por el hospedador, determinada por la especie animal a partir de la cual fue aislada la bacteria por primera vez. De esta manera, el género *Brucella* spp. está formado por seis especies que afectan a mamíferos

terrestres: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* y a su vez, las tres primeras se subdividen en biovariedades o biotipos. Todas ellas pueden ser diferenciadas por pruebas basadas en la fagotipificación (utilizando los bacteriófagos Tibilisi, Weybridge y Berkeley), por serotipificación, también por su sensibilidad a los medios con los colorantes fuscina básica y tionina, por sus requerimientos de CO₂, así como por sus propiedades metabólicas **(Cuadro 1)**.⁴

Actualmente, se han añadido cuatro especies al género, también nombradas con base en las especies animales de las cuales fueron aisladas. En el caso de cepas aisladas a partir de mamíferos marinos, se agregaron dos especies, *B. pinnipedialis*, encontrada en pinípedos, y *B. cetí*, aislada de cetáceos. Además, en el 2008, se describió una nueva especie aislada de un roedor del desierto conocido como topillo campesino (*Microtus arvalis*) y del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) a la cual se le denominó *B. microti*. Finalmente, en el 2010, se propuso otra especie denominada *B. inopinata*, la cual fue aislada a partir de un implante mamario de una mujer de 75 años y de un paciente con una infección crónica de pulmón.^{7,8,9,10,11,12} Recientemente, se aisló de la rana toro de África (*Pyxicephalus edulis*) una cepa que presentó 100% de similitud con *B. inopinata* al realizar el análisis del gen ARN ribosomal 16S; sin embargo, no se ha establecido claramente la relación con la especie propuesta aislada de humanos.¹³ Cabe señalar que algunas especies pueden infectar a más de un hospedador lo cual favorece la propagación de la enfermedad **(Cuadro 2)**.^{1,6,14,15,16,17}

Cuadro 1. Diferenciación de las especies y biovariedades del género *Brucella* spp.^a

Características	<i>B. melitensis</i>			<i>B. abortus</i>							<i>B. suis</i>					<i>B. ovís</i>	<i>B. neotomae</i>	<i>B. canis</i>	
	biovariedades			Biovariedades							biovariedades								
	1	2	3 ^b	1	2	3	4	5	6 ^b	7	9	1	2	3	4	5			
Requerimiento CO ₂	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Producción H ₂ S	-	-	-	+	+	+	+	-	(-)	(+)	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Sensibilidad a los colorantes^c:																			
Tionina	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	- ^d	+
Fuscina básica	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	(-)	-	+	(-)	-	(-)	-	(-)
Aglutinación con antisueros monoespecíficos:																			
A	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
M	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

- a) Símbolos: +, positivos para todas las cepas. (+), positivo para la mayoría de las cepas. -, negativo para todas las cepas. (-), negativo para la mayoría de las cepas
- b) Para mayor certeza en la diferenciación de las biovariedades 3 y 6, se utiliza la sensibilidad a la tionina, a una concentración de 1:25 000 (w/v); la biovariedad 3 puede tener una respuesta positiva al crecimiento, la biovariedad 6 es negativa.
- c) Concentración del colorante: 1:50 000 (w/v)
- d) El crecimiento puede ocurrir en presencia de tionina a una concentración de 1:150 000 (w/v)

Tomado de: Brenner DJ, Krieg NR, George MG, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Parte 3*. 2da. Edición. USA: Springer, 2005. ^{iError! Marcador no definido.}

Cuadro 2. Especies y biovariedades de *Brucella* spp., hospederos y patogenicidad en humanos

Especies	Biovariedad	Morfología de la Colonia	Hospedador Prefencial	Otros Hospedadores	Patogenicidad en Humanos
<i>B. melitensis</i>	1, 2 y 3	Lisa	Ovinos, caprinos	Bovinos, perros, peces de agua dulce, camellos y dromedarios.	Alta
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Lisa	Bovinos	Bisontes, caribús, ovinos, caprinos, perros y equinos.	Alta
<i>B. suis</i>	1, 3	Lisa	Cerdos	Perros	Alta
	2	Lisa	Jabalí, liebre		Baja
	4	Lisa	Renos y caribúes		Alta
	5	Lisa	Roedores		No
<i>B. neotomae</i>	-	Lisa	Rata del desierto		Moderada
<i>B. ovis</i>	-	Rugosa	Carneros		No
<i>B. canis</i>	-	Rugosa	Perros		Moderada
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Lisa	Pinípedos		?*
<i>B. ceti</i>	-	Lisa	Cetáceos		?*
<i>B. microti</i>	-	Lisa	Topillo campesino, zorro rojo y tierra		?
<i>B. innopinata</i>	-	Lisa	Humanos		?

*Aunque algunos casos en humanos han sido descritos, la patogenicidad del género es aún controversial.^{18, 19}

Por otro lado, mediante estudios genéticos comparativos (hibridaciones ADN-ADN y el análisis del gen del ARN ribosomal 16S) se ha demostrado que las diferentes especies del género *Brucella* spp. tienen más del 90% de homología en su genoma y por ende, se ha propuesto a *B. melitensis* como única especie y las restantes como subespecies de acuerdo a la preferencia en el hospedador.^{6,16} Aunque de acuerdo al Subcomité sobre la taxonomía de *Brucella* spp. se pueden utilizar cualquiera de las dos clasificaciones citadas anteriormente, la primera sigue siendo la más utilizada.²⁰

Las bacterias del género *Brucella* spp. son cocobacilos Gram negativos con un tamaño aproximado de 0.5-0.7 μm x 0.6-1.5 μm . Son aerobios aunque varias cepas requieren de suplementar con CO_2 para su crecimiento en el primoaislamiento. No son móviles, no tienen cápsula, no son esporulados ni tampoco poseen flagelo. No obstante, estudios recientes en *B. melitensis*, han demostrado la presencia de genes flagelares. Algunos autores refieren que en etapas tempranas del crecimiento de la bacteria *in vitro* el flagelo puede ser expresado.^{4,21,22}

Este tipo de bacterias son de lento crecimiento, es muy raro encontrar colonias antes de las 48 h. Requieren de medios enriquecidos y crecen de manera óptima a 37°C aunque puede observarse crecimiento en un intervalo de 20 a 40°C. El pH óptimo de crecimiento es de 6.6 a 7.4. Las colonias son de aproximadamente 0.5-1 mm de diámetro, son elevadas, convexas, circulares y con bordes redondeados. Las cepas lisas son brillosas y de un color amarillo pálido a gris azulado. Las cepas rugosas son similares en tamaño y forma, pero

varían en color. Pueden presentar colores blanco mate, blanco amarillento, amarillo y café. Su textura es granulosa.⁴

Tiene un metabolismo de tipo oxidativo y es capaz de utilizar a los nitratos y al oxígeno como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria. Gracias a esta propiedad, la bacteria puede sobrevivir en ambientes desprovistos de oxígeno o dentro de las células eucariontes. Es catalasa, oxidasa y ureasa positiva; además es capaz de reducir los nitratos a nitritos. Las bacterias del género *Brucella* spp. no fermentan los azúcares empleados normalmente en las pruebas de identificación, por tanto, es una herramienta poco útil en la identificación del microorganismo.⁴

1.3 Epidemiología

A pesar de que diversas especies del género pueden infectar al hombre, *B. melitensis* es la más patógena para el humano, por tanto, es el agente etiológico responsable del mayor número de casos de brucelosis humana. Más de 500,000 nuevos casos son reportados cada año a nivel mundial.^{1,19} Existe una relación directamente proporcional entre animales y humanos afectados por la enfermedad. La transmisión de la bacteria a los humanos ocurre principalmente por el consumo de productos lácteos no pasteurizados o a través de abrasiones en la piel de personas que están en contacto con animales infectados.^{2,12,14}

La brucelosis representa un riesgo ocupacional para los trabajadores de los rastros, para los veterinarios y para los trabajadores de laboratorio involucrados en el diagnóstico, investigación o preparación de vacunas.¹⁴ Además, las personas pueden ser infectadas por inhalación de polvo o aerosoles

contaminados, por ende, esta bacteria está clasificada en la categoría B por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de los Estados Unidos de América, donde se cataloga a los patógenos que pueden ser utilizados como armas biológicas potenciales. La cantidad de inóculo necesario para producir la enfermedad es muy pequeño, 10 a 100 bacterias son suficientes para ocasionar la infección.^{2,12,23} Aunque la transmisión de la enfermedad de un humano a otro es muy rara, se han documentado algunos casos donde se transmite por vía sexual.²⁴

La brucelosis generalmente no es letal en los humanos, a excepción de niños, ancianos y personas inmunodeprimidas; sin embargo, ocasiona una enfermedad crónica debilitante con episodios clínicos recurrentes. Se presentan signos y síntomas variables, pero uno de los más característicos es la fiebre aguda, aunque también se reporta anorexia, escalofríos, dolor muscular y articular, linfadenopatía, fatiga y malestar en general. Cuando la enfermedad progresa, se describen signos más severos como hepatoesplenomegalia, endocarditis, problemas osteoarticulares. También puede presentarse epididimitis y orquitis, en el caso de los hombres o alto riesgo de aborto y transmisión intrauterina de la bacteria al producto en mujeres embarazadas. Si se complica la enfermedad, se puede encontrar espondilitis, neurobrucelosis, abscesos en hígado, bronconeumonía, uveitis, miositis piriformis y endocarditis. La brucelosis también se puede manifestar con signología digestiva (vómito, diarrea, dolor abdominal) o algunas lesiones en la piel (erupciones, nódulos, pápulas, eritema, petequias).^{1,2,14, 25}

Brucella melitensis está ampliamente distribuida en todo el mundo, pero es particularmente común en países del litoral del Mar Mediterráneo, de la Península Arábiga, Asia central y de algunas regiones de América Latina.^{19,26} En México, se reportaron 3,531 casos nuevos de brucelosis humana en el 2011, la mayoría atribuida a *B. melitensis*. La mayor incidencia se reportó en los estados de Sinaloa, Guanajuato, San Luis Potosí, y Michoacán en este mismo año.²⁷ Existe una tendencia hacia las personas del sexo femenino (64.7%) y la población entre 25 a 44 años (38.1%) de ser afectados por la enfermedad de los casos reportados en el 2010.²⁸ En cuanto a la brucelosis animal, en este mismo año se reportaron 1,987 casos de cabras infectadas, así como 72 casos de ovinos infectados con *B. melitensis* y 43,854 bovinos infectados con *B. abortus*.²⁹ En el 2011, se reportó a nivel nacional 176 focos de brucelosis caprina ocasionada por *B. melitensis* y 3,165 focos de brucelosis bovina ocasionada por *B. abortus*.³⁰

En cuanto al impacto económico nacional, se considera que la brucelosis disminuye hasta un 30 % la producción láctea, retrasa el crecimiento de los becerros afectando la ganancia diaria de peso en un 17% y provoca aborto al 15% de las hembras de primer o segundo parto. En un estudio realizado en el 2010, en las explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, se evaluaron las pérdidas económicas por fallas reproductivas asociadas a la brucelosis bovina. En las explotaciones donde se eliminaron a los animales positivos, el promedio de la pérdida anual por animal fue de 33.58 USD; en donde se segregaban a los animales positivos, la pérdida fue de 34.60 USD y por último, en las explotaciones donde los animales positivos permanecieron en el hato, el promedio de la pérdida por animal al año fue de 70 USD.³¹ Además,

puesto que se trata de una enfermedad crónica, sus efectos no se perciben inmediatamente, sólo en los hatos donde se tienen registros de la producción. Por otro lado, la brucelosis representa una restricción para la exportación de animales hacia los países libres de la enfermedad. El impacto de la brucelosis humana es principalmente social debido a que se trata de una enfermedad incapacitante y en algunas ocasiones mortal; sin embargo, también se puede considerar un impacto en términos económicos analizando años de vida perdidos (por muerte o invalidez), pago de incapacidades, costo de diagnósticos, tratamientos y hospitalización.³²

1.4 Diagnóstico

El aislamiento de la bacteria es la única prueba fehaciente de que el microorganismo es el causante de la enfermedad, aunque hay que tomar en cuenta que no en todos los animales infectados es posible el aislamiento. Se utiliza principalmente el hemocultivo en medios bifásicos para llevar a cabo el aislamiento, pero también se realiza a partir de muestras de fetos abortados, de algunos tejidos como glándula mamaria, vesículas seminales, epidídimo, médula ósea y linfonodos o de secreciones como leche, semen y calostro.^{1,4}

El diagnóstico serológico es un método indirecto en el cual se detectan anticuerpos principalmente contra el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria. Uno de los mayores inconvenientes del uso de las pruebas serológicas es la antigenicidad cruzada que se presenta por la similitud del antígeno O del LPS de *Brucella* spp. con el de otros microorganismos como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30 y

Vibrio cholerae.¹ Además, puede haber la presencia de animales falsos positivos debido a la vacunación.³³

En México, según la NOM-041-ZOO-1995, el diagnóstico serológico de cepas lisas de *Brucella* spp. se hace por medio de las siguientes pruebas:

- Prueba de anillo en leche, sólo para bovinos.
- Prueba de tarjeta al 3 % para ovinos y caprinos.
- Prueba de tarjeta al 8 % para bovinos
- Rivanol, sólo para bovinos.
- Fijación de Complemento

Para la detección de *B. ovis* (cepa rugosa) se utiliza la técnica de inmunodifusión doble.^{34,35}

Algunos autores han propuesto ensayos basados en pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR cuantitativa o en tiempo real (PCRq) y PCR multiplex para la detección de bacterias del género *Brucella* spp. en sangre y tejidos. Estas técnicas son una herramienta muy útil para la identificación tanto de especies como biovariedades.¹ Se utiliza uno o varios pares de iniciadores que amplifican una secuencia de nucleótidos a partir del ADN bacteriano que codifica para una región génica específica. Por ejemplo, los genes que codifican para las proteínas de superficie celular (*bcs31*), la subunidad 16S del ARN ribosomal y los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (*omp2a*, *omp2b*, *omp25* y *omp31*) han sido utilizadas para este fin. La prueba aún no ha sido validada para sustituir a los métodos serológicos tradicionales en el diagnóstico de rutina debido

principalmente al costo, al equipo especializado y personal capacitado que se requiere.^{36, 37}

1.5 Mecanismos de Patogenicidad de *Brucella* spp.

La patogenicidad de la bacteria se debe principalmente a su capacidad para sobrevivir dentro de las células y establecer el nicho adecuado para su replicación. Se han descrito diversos factores relacionados con dicha patogenicidad, estos están involucrados en el tránsito y establecimiento intracelular de *Brucella* spp. A continuación se describirán brevemente:

El lipopolisacárido (LPS) de las bacterias intracelulares pertenecientes a la familia de las Proteobacterias, como *Brucella* spp., tiene una estructura y propiedades distintas al LPS de las enterobacterias. El LPS de *Brucella* spp. es menos activo y tóxico, lo que le permite a la bacteria pasar desapercibida ante los diferentes mecanismos bactericidas del macrófago. El LPS de *B. abortus*, por ejemplo, está conformado por un lípido A, compuesto de un esqueleto de diaminoglucosa unido por una cadena de aminoácidos con grupos acilo (C18-C19, C28); y del lipopolisacárido, formado por un núcleo constituido por el ácido 2-ceto 3-deoxioctulosónico (KDO), manosa y perosamina; y por la cadena O compuesta por un homopolímero de N-formil-perosamina (**Figura 1**). Estas características estructurales están relacionadas con su baja toxicidad.^{2,12}

El LPS de *Brucella* spp., le da a la bacteria la capacidad de evadir los mecanismos antimicrobianos del hospedero, entre ellos se conoce la resistencia contra péptidos como la defensina, la lactoferrina y la lisozima. Además, tiene la capacidad para bloquear el acceso de C1q a las proteínas de

membrana externa, inhibiendo así la activación de la vía clásica del complemento.³⁸

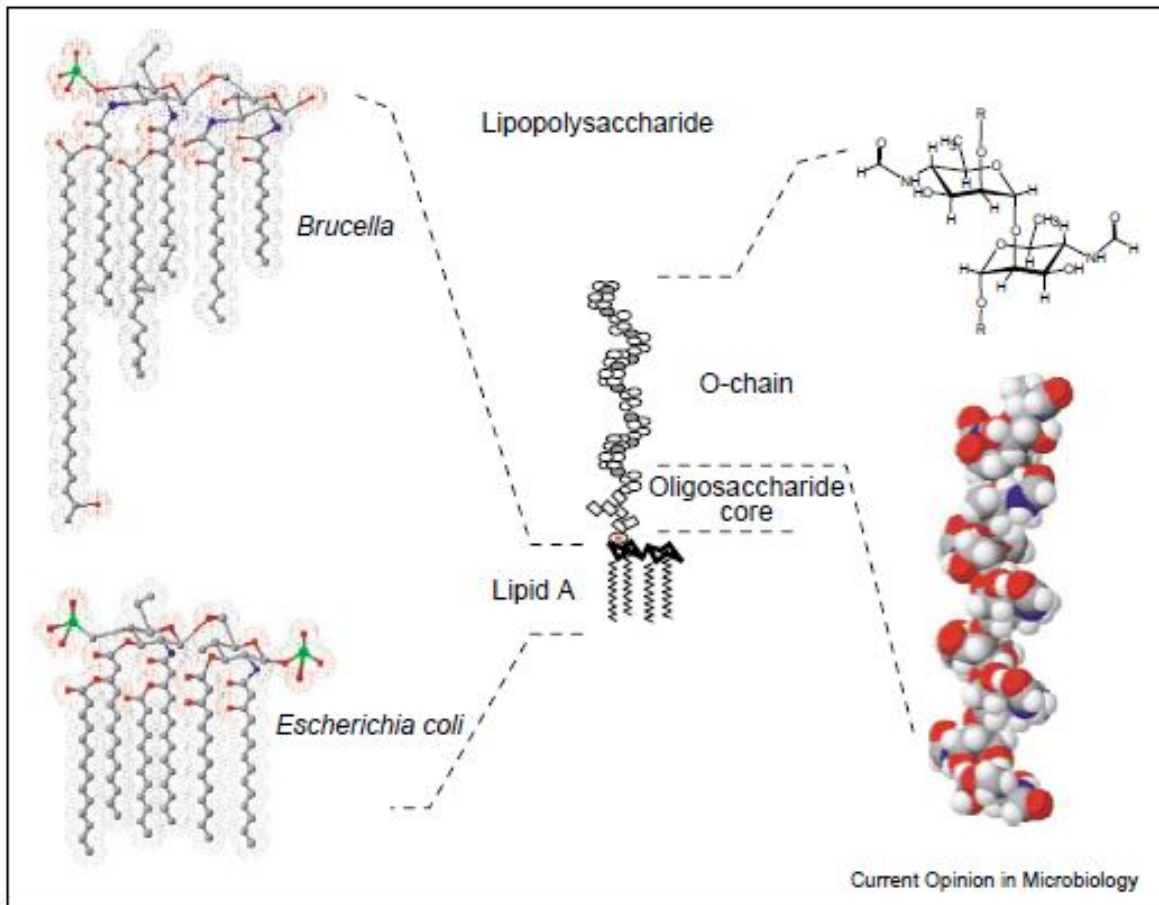


Figura 1. Estructura del LPS de *Brucella* spp. Tomado de Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts a virulence factor. Current Opinion in Microbiology. 2005; 8:60-66.³⁸

En *B. abortus* se ha encontrado que el LPS interfiere en la presentación de antígenos por parte de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Otra de las características importantes del LPS, encontradas en *B. suis* y *B. melitensis*, es la capacidad que tiene para impedir la expresión de algunas citocinas proinflamatorias en macrófagos humanos y murinos. A diferencia del lípido A de las enterobacterias, el lípido A de *Brucella* spp. al interactuar con el receptor TLR-4 [*Toll-like receptor 4* (receptor tipo Toll 4)], no induce adecuadamente la producción de estas citocinas. Se ha visto también que otra

de las funciones del LPS es favorecer la entrada de la bacteria en el macrófago, asimismo, está involucrado en el tránsito intracelular en etapas tempranas de la fagocitosis.^{38, 39}

Por otro lado, uno de los factores requeridos para modular el tránsito intracelular de *Brucella* spp. es el sistema de secreción tipo IV codificado por el operón *virB*. Este operón está compuesto por 12 marcos abiertos de lectura (*virB1* a *virB12*) en el cromosoma II de la bacteria. Este sistema es activado por la acidificación del fagosoma después de la internación de la bacteria, aunque se han descrito condiciones especiales para la regulación de su expresión en algunas especies de *Brucella* spp. Por ejemplo, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* son capaces de expresar VirB5 y VirB8 *in vitro*, al ser sembradas en un medio enriquecido a un pH neutro.⁴⁰ El sistema de secreción tipo IV de *Brucella* spp., es semejante al descrito en *Agrobacterium tumefaciens*, un patógeno de plantas capaz de translocar moléculas de ADN en las células hospedadoras que activan oncogenes en las plantas.⁴¹ En el caso de *Brucella abortus*, se han identificado proteínas efectoras de función aún desconocida como VceA, VceC, RicA, BPE123, BPE043, BPE005 y BPE275,⁴² las cuales se translocan a través del sistema de secreción tipo IV hacia el citosol de la célula hospedadora. No obstante, aún se busca identificar aquellas proteínas que podrían permitir a la bacteria evadir su destrucción dentro de la célula hospedadora. De acuerdo con la información existente, se piensa que este sistema de secreción está involucrado en las etapas tardías del tránsito intracelular y está relacionado con la sobrevivencia y la replicación de la bacteria.¹² También, se cree que está implicado en la alteración de la ruta

autofagosomal así como en la interacción y la fusión de las vesículas que contienen a la bacteria con proteínas del retículo endoplásmico.^{2, 43}

Otro factor implicado en la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* es la producción de β -1,2 glucanos cíclicos. Estos han sido referidos únicamente en la familia α -2 de las Proteobacterias.⁴³ Los glucanos cíclicos son sintetizados hacia el espacio periplásmico por medio de la enzima β -1,2 glucano cíclico sintetasa que se encuentra en la membrana interna de la bacteria. Los β -1,2 glucanos cíclicos son liberados durante la infección a través de vesículas, posteriormente, interactúan con sitios de la membrana plasmática de las células hospedadoras ricos en colesterol y esfingolípidos, denominados “balsas lipídicas”, donde tienen la capacidad de remover el colesterol.⁴⁴ Aparentemente, también están involucrados en la alteración de la maduración del fagosoma en la vía endocítica, previniendo la fusión fagolisosomal.^{2,12}

Por último, se han descrito los sistemas de regulación de dos componentes, los cuales representan un mecanismo común entre las bacterias para poder adaptarse al ambiente intracelular. En el caso de *Brucella abortus*, por medio de la secuenciación de su genoma, se han reportado 21 posibles sistemas de dos componentes, pero sólo se han caracterizado cinco: FeuQ, NtrY, VsrB, OmpR y BvrR/BvrS; este último ha sido el más estudiado.¹² El sistema de dos componentes BvrR/BvrS, referido en *B. abortus*, es similar a las proteínas reguladoras y sensoras de *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* necesarias para la simbiosis y patogenicidad en las plantas, respectivamente.² Este sistema, podría permitir a la bacteria regular la expresión de sus genes de virulencia durante la invasión.⁴⁵ Los genes *bvrR* y *bvrS* codifican para una

proteína de 237 aminoácidos y otra de 601 aminoácidos, respectivamente. Estos son capaces de modificar la composición de la membrana externa por medio de la regulación de la expresión de diferentes proteínas presentes en ella, como por ejemplo, Omp25 y Omp22.² También está involucrada en la resistencia a los péptidos catiónicos. Este sistema de dos componentes responde a estímulos externos del medio como variaciones de pH y osmolaridad para poder llevar a cabo la regulación de la expresión de las proteínas presentes en la membrana externa.²

Cepas que presentan mutaciones en alguno de los factores mencionados anteriormente, disminuyen su virulencia y algunas llegan a ser avirulentas. No obstante, en la actualidad, existen algunas discrepancias al considerar a los glucanos cíclicos y al sistema de dos componentes BvrS/BvrR como factores de virulencia. Esto se debe a que este concepto se refiere específicamente a factores bacterianos que cumplen funciones específicas que permiten la multiplicación de la bacteria dentro de la célula, tales como la alteración del tránsito intracelular.¹² En este contexto, se ha observado que tanto los glucanos cíclicos como el sistema de dos componentes BvrS/BvrR pueden no ser indispensables para permitir el establecimiento intracelular de *Brucella* spp.¹² Finalmente, a pesar del gran avance que se ha logrado en el estudio de los factores de virulencia de *Brucella* spp., los mecanismos de interacción molecular de las bacterias con las células que invaden no se conocen en su totalidad.^{2,12,46,47}

1.6 Tránsito intracelular de *Brucella* spp. dentro de la célula huésped

Todas las especies del género *Brucella* spp. se comportan como patógenos intracelulares facultativos, los cuales utilizan principalmente a los macrófagos como células hospedadoras donde establecen el nicho ecológico apto para su sobrevivencia. No obstante, también son capaces de infectar células fagocíticas no profesionales como las células epiteliales, trofoblastos y fibroblastos.^{2,12,46,47,48,49,50} Se postula que la entrada de las bacterias no opsonizadas a las células se lleva a cabo principalmente en las “balsas lipídicas”.⁴⁴ En estos sitios, ocurren eventos relacionados con la endocitosis y la exocitosis celular de manera simultánea, debido a la presencia de múltiples receptores y proteínas de diversa índole.⁵¹

Aunque el mecanismo preciso de adherencia de *Brucella* spp. en la célula hospedadora no está del todo esclarecido, existe evidencia que sugiere que los receptores LFA-1 [*Lymphocyte function-associated antigen 1* (antígeno 1 asociado a la función leucocitaria)], CR3 (receptor 3 del complemento), las integrinas α -5, β -1 y α -V, β -3, los receptores de manosa-6-fosfato y los receptores para Fc, contribuyen al reconocimiento de motivos moleculares asociados a patógenos involucrados en la adherencia e internación de *B. abortus* en macrófagos.⁵² Por otro lado, Castañeda-Roldán *et al.*, identificaron un conjunto de proteínas de superficie de diferentes pesos moleculares en la membrana externa expresadas por la bacteria, las cuales se unen selectivamente al ácido siálico presente en la membrana plasmática de las células HeLa. De las proteínas identificadas sólo una con peso de 41 kDa, denominada SP41, al ser bloqueada por anticuerpos específicos redujo la

adherencia y la invasión de la bacteria. Esta proteína es codificada por el gen *ugpB* (*Uptake glicerol phosphate*) presente en el cromosoma II de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*. La mutación de este gen disminuye la adherencia y la invasión por la bacteria.^{53,54,55}

Recientemente, también se identificó la isla de patogenicidad Bab1_2009-2012 que codifica para una adhesina involucrada en la adhesión e internación de *Brucella* spp. en las células hospedadoras y que además, tiene un papel importante en la infección a través de la vía oral. Al hacer infecciones en células HeLa y macrófagos J774 con bacterias mutantes que no contienen esta región, se observó una disminución en la adherencia e internación del microorganismo. En este mismo estudio, se identificó la primera adhesina que tienen una función en la virulencia en infecciones *in vivo*.⁵⁶

En el caso de las células fagocíticas no profesionales, una vez que la bacteria es endocitada, se ha visto que tanto *B. abortus* como *B. melitensis* interactúan con los endosomas tempranos. Esto pudo comprobarse por la detección de proteínas características de los endosomas tempranos (receptor de transferrina, GTPasas monoméricas como Rab5 y EEA1 [*Early Endosome Antigen 1* (antígeno de los endosomas tempranos)]) en la membrana de las vacuolas que contienen a *Brucella* spp. (VCB). Estos marcadores son encontrados hasta 30 minutos después de la infección. Después de este tiempo, las VCB van adquiriendo progresivamente marcadores de etapas intermedias de la vía endocítica como LAMP1 [*Lysosomal Associated Membrane Protein 1* (proteínas de membrana asociadas a lisosomas 1)]; sin embargo, algunas VCB nunca adquieren proteínas presentes en los

endosomas tardíos como Rab7, ni de los lisosomas como catepsina o manosa-6-fosfato.² La bacteria tiene la capacidad de alterar la ruta endocítica mediante algunos de los mecanismos de patogenicidad anteriormente citados. Con ello, es capaz de evadir la fusión con los lisosomas y por ende, evita su destrucción. También, se ha demostrado que las VCB, pueden adquirir marcadores del retículo endoplásmico como calreticulina y calnexina, una vez que ocurre este fenómeno, la bacteria establece el nicho adecuado para su replicación.^{12,48,49}

Por otro lado, los mecanismos que determinan el tránsito intracelular de *Brucella* spp. en las células fagocíticas profesionales, como los macrófagos, no han sido completamente caracterizados. Existen dos vertientes para explicar cómo se lleva a cabo el tránsito intracelular de la bacteria en este tipo de células. La primera hipótesis menciona que durante los primeros minutos de la infección, *Brucella* spp. es capaz de interactuar con los endosomas tempranos, para posteriormente desviar la vía endocítica y llevar a cabo su replicación en vacuolas modificadas que contienen marcadores del retículo endoplásmico, de una manera similar a la ruta que sigue en los fagocitos no profesionales.⁴³ En contraparte, el grupo de Arenas *et al.*,⁵⁷ menciona que en macrófagos de la línea J774, un porcentaje muy bajo de las VCB (<10 %) siguieron la ruta autofagosomal y tampoco utilizaron como nicho de replicación las vacuolas con características del retículo endoplásmico.^{50,57}

Es importante recalcar que las células fagocíticas profesionales son mucho más eficientes para la eliminación de bacterias durante la infección, a diferencia de los fagocitos no profesionales.^{12,14} Aproximadamente entre el 80 y 90% de los microorganismos que ingresan, son eliminados a las pocas horas de haber

infectado a los macrófagos; sin embargo, algunas bacterias evitan su destrucción en los fagocitos profesionales siendo capaces de replicarse dentro de la célula. En la **figura 2** se muestra el modelo del tránsito intracelular que lleva a cabo la bacteria propuesto por Celli *et al.*, identificando los factores de virulencia utilizados en las diferentes etapas de la infección.⁴³

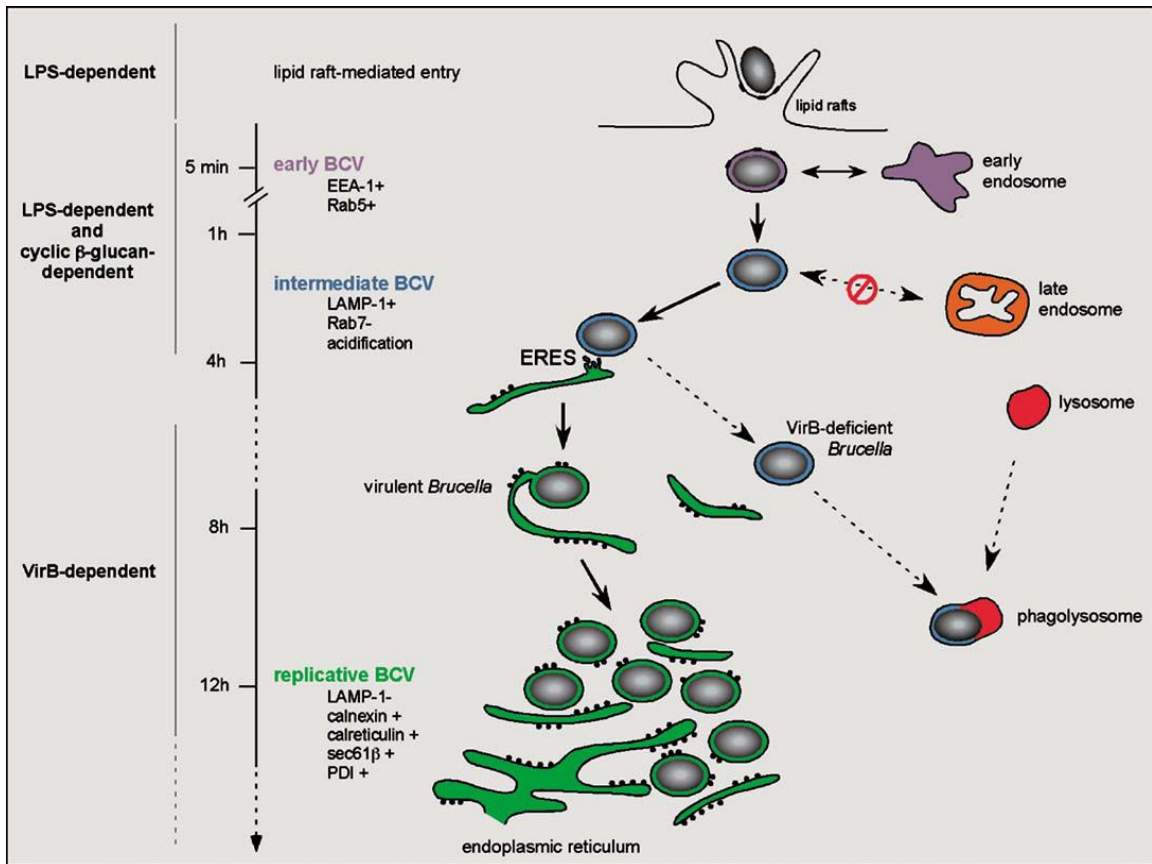


Figura 2. Modelo del tránsito intracelular de *Brucella* spp. La bacteria invade células fagocíticas y no fagocíticas a través de las balsas lipídicas con ayuda del LPS, después de atravesar las balsas lipídicas, el microorganismo se localiza en una vacuola que contiene a *Brucella* (VCB) que interacciona con endosomas tempranos. Esta VCB, es marcada por EEA-1 y Rab5. Posteriormente, las VCB maduran a vacuolas intermedias al adquirir marcadores como LAMP-1, pero no adquieren Rab 7 evitando así la futura interacción con las endosomas tardíos y su posterior fusión con los lisosomas. Esto lo hace mediante mecanismos dependientes del LPS y los β -glucanos cíclicos. Las VCB interactúan con los ERES [Endoplasmic Reticulum Exit Sites (sitios de salida del retículo endoplásmico)] para adquirir marcadores del retículo endoplásmico como calnexina, calreticula, sec61 β y Fosfatidilinositol (PDI) y generar así un nicho de replicación. Esta capacidad está relacionada con el sistema de secreción tipo IV. En el caso de fallar esta interacción con el ER, la bacteria es degradada por fusión con lisosomas y la consecuente formación de un fagolisosoma. Tomado de: Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. Research in Microbiology. 2006; 157: 93-98.⁴³

1.7 Proteínas de fusión involucradas en la vía secretora del tránsito intracelular

Se ha postulado que durante la fagocitosis, se requiere la restitución de la superficie celular para compensar la pérdida de membrana por la formación del fagosoma. Para ello, los macrófagos utilizan la membrana celular proveniente de organelos como los lisosomas, los endosomas de reciclamiento o el retículo endoplásmico.⁵⁸ Este fenómeno ocurre a través de eventos de fusión mediados por proteínas que se conocen como SNARE [*Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Receptor* (Proteínas receptoras de unión solubles a N-etilmaleimida)].^{59,60}

Las proteínas SNARE son las responsables de promover la fusión con la membrana blanco, además aportan la especificidad del reconocimiento para la asociación de las vesículas. Existen más de 30 diferentes proteínas SNARE en las células de los mamíferos y cada una está asociada a diferentes organelos membranosos. Por su localización, las proteínas SNARE se dividen en t-SNARE y en v-SNARE. Las primeras se localizan en la membrana blanco y las segundas en vesículas de transporte. Estas proteínas están involucradas en diversas vías del tránsito intracelular y participan en la exocitosis de neurotransmisores, hormonas y algunas citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).^{61, 62}

Las t-SNARE que participan en la fusión de la membrana plasmática con la membrana de los endosomas de reciclamiento, necesaria para la secreción del TNF α , son dos: Sintaxina 4, una proteína integral de la membrana plasmática que aporta una hélice alfa y SNAP25, una proteína periférica que aporta dos hélices alfa al complejo de fusión. Por otro lado, la proteína v-SNARE que se

localiza en la membrana de los endosomas de reciclamiento, se conoce como VAMP3 [*Vesicle-associated membrane protein 3* (proteína de membrana 3 asociada a vesículas)] o celubrevina. Esta proteína integral aporta una hélice alfa al complejo de fusión. Al llevarse a cabo la unión de las v-SNARE con las t-SNARE, se forma un complejo de cuatro hélices extremadamente estable que solamente es soluble a la proteína NSF [(*N-ethylmaleimide-sensitive factor* (factor soluble a N-etilmaleimida)] por un proceso de hidrólisis. Por otro lado, una vez que se lleva a cabo la fusión de las membranas por acción de estas proteínas SNARE, es posible la secreción del TNF α . Este es un evento asociado con la fagocitosis de microorganismos en un fenómeno en el que se acopla la endocitosis con la exocitosis, dos sucesos cruciales para la defensa del hospedero.^{63, 64}

1.8 Alteración de las proteínas involucradas en el tránsito intracelular por efecto de microorganismos patógenos.

Si existe alguna intervención por parte de algún microorganismo patógeno que altere la expresión de las proteínas de fusión asociadas a la exocitosis, es probable que se vean modificados algunos eventos de tránsito intracelular, lo que le podría permitir al agente etiológico establecerse en las células que infecta. Este fenómeno se ha podido observar *in vitro* en macrófagos estimulados con el LPS de *Salmonella* Minnesota o con el de *Escherichia coli*.^{65,66} Cuando las células están en contacto con el LPS, éste activa a los macrófagos y genera una sobre expresión de Sintaxina 4 y de VAMP3. Esta sobre expresión está asociada al incremento en la secreción de citocinas, como el TNF α , que funcionan como señales de alerta hacia células cercanas.^{64,65,66}

Otro ejemplo es el efecto de las toxinas tetánica y botulínica en las células nerviosas. En este caso, las proteínas SNARE son degradadas y por ende, la liberación de neurotransmisores se ve alterada.⁶³ En el caso de *Mycobacterium tuberculosis* se ha reportado que el fagosoma que contiene a la bacteria es capaz de promover la degradación de VAMP3, lo que contribuye a alterar el tránsito intracelular del mismo.⁶⁷ Por otro lado, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis* son capaces de expresar proteínas parecidas a las proteínas SNARE, las cuales pueden ser utilizadas para modificar el tránsito intracelular de los fagosomas que las contiene.⁶⁸ En células infectadas con *B. abortus*, se ha encontrado que al interferir con la expresión de proteínas de tránsito vesicular como la GTPasa Sar1, la bacteria no puede establecerse en las células, lo cual nos indica que esta GTPasa monomérica es esencial para la biogénesis de las vacuolas de replicación de *B. abortus*.⁶⁹ Un efecto similar se encontró con la GTPasa monomérica Rab2, la cual regula el tránsito entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.⁷⁰

2.0 Justificación

Se ha demostrado que algunos patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *Legionella pneumophila* son capaces de cambiar la expresión de las proteínas SNARE, lo que les permite modificar la fusión de las membranas y modular el tránsito intracelular del fagosoma que contiene a estas bacterias.^{67,68} Se conoce que *Brucella* spp. también es capaz de modificar la expresión de algunas proteínas implicadas en el tránsito intracelular como las GTPasas monoméricas Sar1 y Rab2,^{69,70} pero no hay reportes sobre la alteración de la expresión de alguna proteína de fusión asociada a la exocitosis de la familia SNARE. La proteína Sintaxina 4, perteneciente a esta familia, es un factor determinante para que ocurra la exocitosis de algunas citocinas como el TNF α .⁶⁵ Esta proteína se encuentra en el mismo lugar donde se lleva a cabo la ingestión de *Brucella* spp. de manera más frecuente. Además, se sabe que este microorganismo es capaz de disminuir la secreción del TNF α .¹² Con estos antecedentes, se propone la posibilidad de que al infectar macrófagos humanos con *Brucella melitensis*, también se modifique la expresión de las proteínas que participan en la secreción del TNF α , como lo es Sintaxina 4. El estudio de este fenómeno permitirá conocer si se ven alterados los eventos de tránsito intracelular en etapas tempranas de la fagocitosis, así como su implicación biológica, aportando al conocimiento de la patogénesis molecular de *Brucella melitensis*.

3.0 Hipótesis

La infección de los macrófagos humanos de la línea THP-1 con *Brucella melitensis*, modificará la expresión de la proteína Sintaxina 4.

4.0 Objetivo General

Conocer la expresión de la proteína Sintaxina 4 durante la infección por *Brucella melitensis*, en macrófagos de la línea celular THP-1 a través de ensayos de *PCR en tiempo real* y *Western Blot* para determinar si existen cambios en la expresión durante la infección.

4.1 Objetivos Específicos

1. Determinar cuantitativamente, mediante *PCR en tiempo real*, la expresión de la proteína Sintaxina 4 en macrófagos de la línea celular THP-1 infectados con *Brucella melitensis* y sin infectar.
2. Determinar cualitativamente, por medio de *Western Blot*, la expresión de la proteína Sintaxina 4 en macrófagos de la línea celular THP-1 infectados con *Brucella melitensis* y sin infectar.

5.0 Materiales y Métodos

Diagrama de flujo del procedimiento experimental (**Figura 3**):

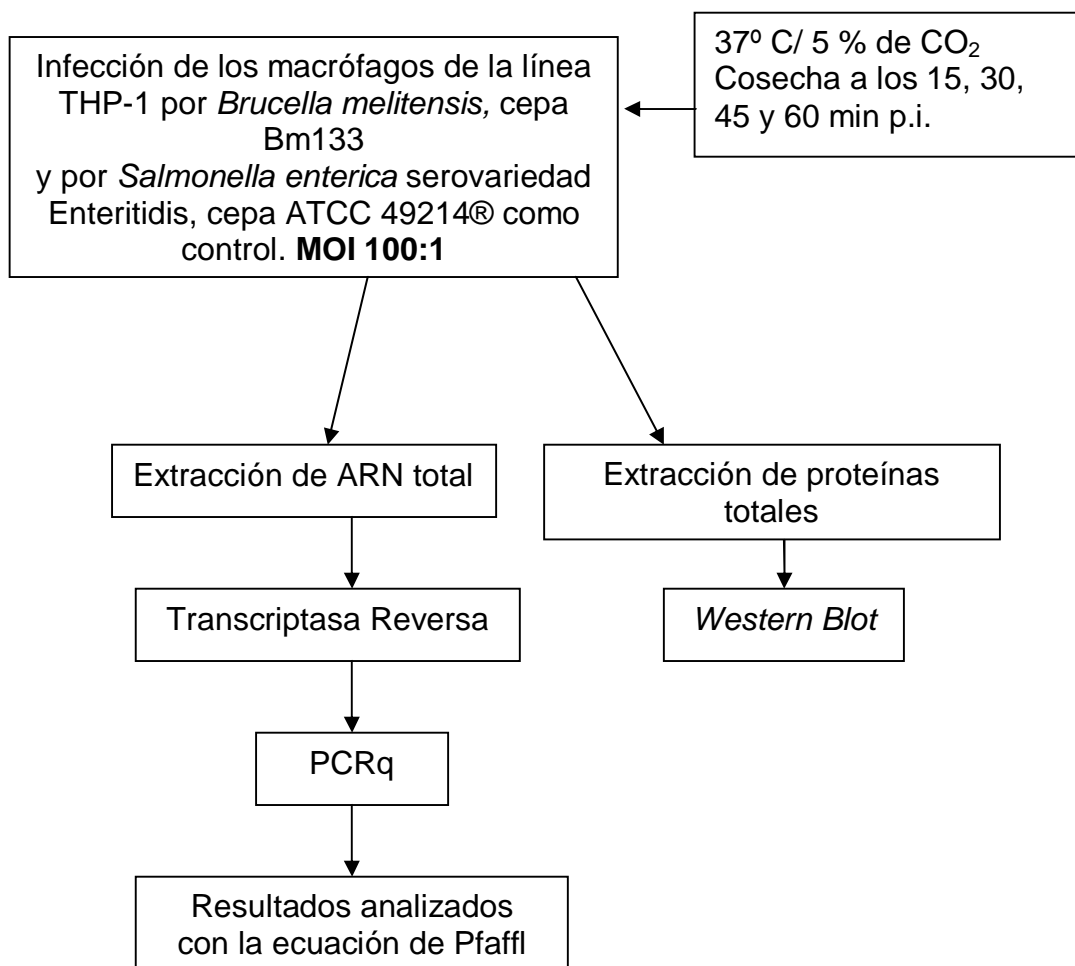


Figura 3. Diagrama de flujo en donde se muestra la metodología utilizada para el trabajo experimental.

Cepas Bacterianas. Para los ensayos de infección se utilizó *B. melitensis* cepa Bm133 biotipo 1,⁷¹ previamente cultivada en agar *Brucella* (BD DIBCO®) durante 72 h a 37°C. A las colonias sembradas se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación (triple azúcar hierro, citrato, urea y ácido sulfhídrico-indol-motilidad) así como tinción de Gram.⁴ Una vez identificada la bacteria, se sembraron seis colonias en caldo *Brucella* (BD DIBCO®) y se incubaron a 37°C por 18-20 h en agitación continua para alcanzar una densidad óptica de 0.08 – 0.1 a una $\lambda=625$ nm y obtener una concentración

bacteriana de 1 a 2×10^8 UFC/ml al momento de la infección.⁷² El manejo de la bacteria se realizó en la Unidad de Bioseguridad 2 del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, se utilizó como control a la cepa ATCC 49214® de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis. Se sembró una colonia de la misma en caldo Luria Bertani, también denominado LB (10 g Bacto tristona, 5 g extracto de levadura y 10 g NaCl, c.b.p. 1 L; pH 7), y se incubó a 37°C por 15 h en agitación continua para alcanzar una densidad óptica de 0.08 – 0.1 a una $\lambda=625\text{nm}$ y así obtener una concentración bacteriana de 1 a 2×10^8 UFC/ml al momento de la infección.

Cultivos celulares e Infecciones. Se utilizaron monocitos de origen humano de la línea THP-1 ATCC 9184® incubados a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 0.45% de glucosa, 25 mM de HEPES, 2 mM de glutamina (*Gibco-Invitrogen*®), 1 mM de piruvato de sodio (*Gibco-Invitrogen*®), 0.05mM de 2 mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH®), 10% de suero fetal bovino (*Gibco-Invitrogen*®) y una mezcla de 100 UI de penicilina – 100 µg de estreptomina por ml (*Gibco-Invitrogen*®). El medio RPMI-1640 utilizado en el momento de la infección no contenía 2 mercaptoetanol ni antibiótico. Para llevar a cabo la infección, 3.5×10^6 células THP-1/ pozo se cultivaron en placas de 24 pozos. Posteriormente, fueron diferenciadas a macrófagos estimulándolas con el inductor de la diferenciación $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D₃ (SIGMA-ALDRICH®) por 72 h a una concentración de 10^{-7} M.

Los macrófagos fueron infectados con *B. melitensis* cepa Bm133 ó con *S. Enteritidis* a una MOI de 100:1. Por último, las placas con las células infectadas fueron centrifugadas a 2,000 g por 10 min a 4°C para llevar a cabo la sincronización. Posteriormente, se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ por 15, 30, 45 y 60 min postinfección. Cada tiempo se evaluó por triplicado con sus respectivos controles, teniendo un total de 24 muestras. Se llevaron a cabo dos ensayos independientes.

Extracción de ARN. El ARN total fue extraído a partir de los macrófagos de la línea celular THP-1 sin infectar e infectados con *B. melitensis* cepa Bm133 ó con *S. Enteritidis*, en cada uno de los diferentes tiempos de incubación (15, 30, 45 y 60 minutos) por medio de la extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies) descrita anteriormente por Chomczynski.⁷³ Brevemente, se eliminó el medio de cada uno de los pozos y se realizó un lavado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría. Se retiró el excedente de PBS y se agregaron 500 µl de TRIZOL® a cada pozo. Las muestras fueron incubadas por 5 min a 4°C y conservadas en congelación a -70°C hasta su uso. Posteriormente, se agregaron 100 µl de cloroformo (Mallinckodt SpecttAR®), se homogenizaron suavemente con la mano por 15 seg para después incubarse por 2 min a 4°C. A continuación se centrifugaron (Centrifuge 5415R, Eppendorf®) 12,000 g por 15 min a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se les hizo un nuevo lavado con la mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, J.T.Baker®). Nuevamente, se homogenizó suavemente durante 15 seg para después incubarse por 2 min a 4°C. En seguida, se centrifugaron 12,000 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y después se agregaron 250 µl de

isopropanol (Merck KGaA®) para llevar a cabo la precipitación del ARN. Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a 4°C por 10 min; posteriormente, fueron centrifugadas a 13,200 g por 20 min a 4°C. Después, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 75% (Merck KGaA®) diluido con DEPC al 0.1% (Dietilpirocarbonato. Inhibidor de RNAsas, SIGMA ALDRICH®) a cada muestra y a continuación, se centrifugó a 13,200 g por 10 min a 4°C. Se decantaron las muestras y se dejaron secar las pastillas aproximadamente 10 min. Por último, se suspendieron con 10 µl de agua con DEPC al 0.1 %, homogenizando varias veces. Todas las extracciones de ARN se llevaron a cabo en campana de flujo laminar.

Cuantificación y visualización del ARN. Las muestras fueron cuantificadas por medio de espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific®) para realizar posteriores ensayos a partir de una concentración de 1 µg de ARN por cada muestra. Para observar la calidad del ARN extraído y hacer evidentes las bandas 28S, 18S y 5S del ARN ribosomal, se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución de TAE (2mM de EDTA pH 8, 40 mM de TRIS, 19 mM de ácido acético) y como referencia se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen®). El gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.001% (SIGMA ALDRICH®), para posteriormente ser fotodocumentado (MiniLumi, Bio-Imaging Systems®).

Diseño de Iniciadores. Para el diseño de iniciadores se utilizaron las secuencias de ARNm reportadas en el *GenBank* del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) provenientes de los genes de *Homo sapiens* que codifican para las proteínas Sintaxina 4 y G3PDH (Gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa), este último se utilizó como control normalizador. Una vez obtenida la secuencia, se recurrió al sistema de Primer-BLAST para generar los iniciadores. Posteriormente, se utilizó el software DNAMAN® para comprobar la alineación de los iniciadores en la secuencia del ARN respectivo, así como la posición de los mismos. En el **Cuadro 3** se presentan las características de las secuencias utilizadas y de los iniciadores diseñados en este trabajo.

Gen	N° de acceso	Tamaño de la secuencia de ARNm (pb)	Iniciador	Tm (°C)	Tamaño del producto (pb)
<i>Homo sapiens</i> STX4	NM_004604.3	1403	F- GAACCTGCGCGATGAGATCAAACA	60	200
			R- TCCCGGTATTCGGACTGCATTGAA		
<i>Homo sapiens</i> G3PDH	M33197.1	1268	F- AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	60	189
			R- AAGCTTCCCGTTCTCAGCCTTGA		

Cuadro 3. Información del NCBI sobre las secuencias del ARNm del gen que codifica para la proteína Sintaxina 4 y G3PDH de origen humano, así como de los iniciadores diseñados en este trabajo.

Las alineaciones de los iniciadores en la secuencia del ARNm que codifica para la proteína Sintaxina 4 y G3PDH se muestran en la **figuras 4 y 5**.

```

1   GGAAGAAAA GGAATTCCA ACCTGTGGAA CTTGGGGGG TCCCCGGGGT CGGCGCCTTC
   CCCTTCTTTT CCCTTAAGGT TGGACACCTT GGAACCCCC AGGGGCCCA GCCGCGGAAG
61  CCATTGACTG TGGGCGGTGC AAGGGACGGA GCCTCTGGCG GCTCGTGGGG GTGTTGGGGT
   GGTAAGTAC ACCCGCCAG TTCCCTGCCT CGGAGACCGC CGAGACCCC CACAACCCCA
121 CCGCAGGGGG AGGGAGGGGA GTGTCAGAGT GTGAGCGGGG TACGGGAATT CCAAATTTGA
   GGCGTCCCCC TCCCTCCCCT CACAGTCTCA CACTCGCCCC ATGCCCTTAA GGTTTAAACT
181 GGGCCTCCCG GCTCTGGCGC CGGGGAGGGA GAGCTCAGGC CGCCATGCGG GACAGGACCC
   CCCGAGGGG CGAGACCGCG GCCCTCCCT CTGAGTCCG GCGGTACGCC CTGCTCTGGG
241 ACGAGCTGAG ACAGGGGGAT GACAGCTCGG ACGAAGAGGA CAAGGAGCGG GTCGCGCTGG
   TGCTCGACTC TGTCCCCTA CTGTCGAGCC TGCTTCTCCT GTTCCTCGCC CAGCGCGACC
301 TGGTGCACCC GGGCACGGCA CGGCTGGGGA GCCCGGACGA GGAGTTCTTC CACAAGGTCC
   ACCACGTGGG CCCGTGCCGT GCCGACCCCT CGGGCCTGCT CCTCAAGAAG GTGTTCCAGG
361 GGACAATTCG GCAGACTATT GCAAACTGG GGAATAAAGT CCAGGAGTTG GAGAAACAGC
   CCTGTTAAGC CGTCTGATAA CAGTTTGACC CTTATTTCA GTCCTCAAC CTCTTTGTG
421 AGTCAACCAT CTGGCCAGC CCCCTCCCG AGGAGAGCAT GAAGCAGGAG CTGCAGAACC
   TCCAGTGGTA GGACCGGTGC GGGGAAGGGC TCCTCTCGTA CTTCGTCCTC GACGTCTGG
481 TGCGCGATGA GATCAAACAG CTGGGAGGG AGATCCGCCT GCAGCTGAAG GCCATAGAGC
   ACGCGCTACT CTAGTTTGTG GACCCCTCCC TCTAGGCGGA CGTCGACTTC C GGTATCTCG
541 CCCAGAAGGA GGAAGCTGAT GAGAACTATA ACTCCGTC AACAAGAATG AGAAAAACCC
   GGGCTTCCCT CCTTCGACTA CTCTTGATAT TGAGGCAGTT GTGTTCTTAC TCTTTTTGG
601 AGCATGGGGT CCTGTCCCAG CAATTCGTGG AGCTCATCAA CAAGTGCAAT TCAATGCAGT
   TCGTACCCCA GGACAGGGT GTTAAGCACC TCGAGTAGTT GTTCACGTTA AGTTACGTCA
661 CCGAATACCG GGAGAAGAAC GTGGAGCGGA TTCGGAGGCA GCTGAAGATC ACCAATGCTG
   GGCTTATGGC CCTCTTCTTG CACCTCGCCT AAGCCTCCGT CGACTTCTAG TGTTACGAC
721 GGATGGTGTG TGATGAGGAG TTGGAGCAGA TGCTGGACAG TGGGCAAAGC GAGGTGTTTTG
   CCTACCACAG ACTACTCCTC AACCTCGTCT ACGACCTGTC ACCCGTTTCC CTCCACAAAC
781 TGTCCAATAT CCTGAAGGAC ACGCAGGTGA CTCGACAGGC CTTAAATGAG ATCTCGGCCC
   ACAGGTTATA GGAATTCCTG TGCGTCCACT GAGCTGTCCG GAATTTACTC TAGAGCCGGG
841 GGCACAGTGA GATCCAGCAG CTTGAACGCA GTATTGCTGA GCTGCACGAC ATATTCACTT
   CCGTGTCACT TAGGTGCTC GAACTTGGT CATAAGCACT CGACGTGCTG TATAAGTGAA
901 TTCTGGCTAC CGAAGTGGAG ATGCAGGGGG AGATGATCAA TCGGATTGAG AAGAACATCC
   AAGACCGATG GCTTCACCTC TACGTCCCC TCTACTAGTT AGCCTAACTC TTCTTGTAGG
961 TGAGCTCAGC GGAATACGTG GAACGTGGGC AGGAGCACGT CAAGACGGCC CTGGAGAACC
   ACTCGAGTCG CCTGATGCAC CTTGCACCCG TCCTCGTGCA GTTCTGCCGG GACCTCTTGG
1021 AGAAGAAGGC GAGGAAGAAG AAAGTCTTGA TTGCCATCTG TGTGTCCATC ACCGTGCTCC
   TCTTCTTCCG CTCCTTCTTC TTTCAGAACT AACGGTAGAC ACACAGGTAG TGGCAGCAGG
1081 TCCTAGCAGT CATCATTGGC GTCACAGTGG TTGGATAATG TCGCACATTG TTGGCACTAG
   AGGATCGTCA GTAGTAACCG CAGTGTCAAC AACCTATTAC AGCGTGAAC AACCGTGATC
1141 GAGCACCAGG AACCCAGGGC CTGGCCTTCT CTCCAGCAG CCTGGGGGGC AGGGCAGAGC
   CTCGTGGTCC TTGGGTCCCG GACCGGAAGA GAGGGTCTGTC GGACCCCCCG TCCCGTCTCG
1201 CTCCAGTCGG ACCCCTTCT CACTGACC CCTATGCAGA AGGGCAGACA GTTCTTCTGG
   GAGGTCAGCC TGGGGAAGGA GTGTGACCGG GGATACGTCT TCCCGTCTGT CAAGAAGACC
1261 GGTTGGCAGC TGCTCATTCA TGATGGCCTC CTCCTTCAGG CCTCAATGCC TGGGGGAGGC
   CCAACCGTCG ACGAGTAAGT ACTACCGGAG GAGGAAGTCC GGAGTTACGG ACCCCCTCCG
1321 CTGCACTGTC CTGATTGGCC GGGACACACG GTTTTGTA AAATTA AAAA AAAAAAAG
   GACGTGACAG GACTAACCGG CCCTGTGTGC CAAAACATTT TTTAATTTTT TGTTTTTTTC
1381 AGCATAAAAA AAAAAAAAAA AAA
   TCGTATTTTT TTTTTTTTTT TTT

```

Figura 4. Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína Sintaxina 4 de origen humano reportada en el banco de genes del NCBI (**NM_004604.3**). En gris se muestra la alineación de los iniciadores designados produciendo un amplicón de 200 pb.

```

1   GTTCGACAGT CAGCCGCATC TTCTTTTGGC TCGCCAGCCG AGCCACATCG CTCAGACACC
   CAAGCTGTCA GTCGGCGTAG AAGAAAACGC AGCGGTCCGC TCGGTGTAGC GAGTCTGTGG
61  ATGGGGAAGG TGAAGGTCGG AGTCAACGGA TTTGGTCGTA TTGGGCGCCT GGTCACCAGG
   TACCCCTTCC ACTTCCAGCC TCAGTTGCCT AAACCAGCAT AACCCGCGGA CCAGTGGTCC
121 GCTGCTTTTA ACTCTGGTAA AGTGGATATT GTTGCCATCA ATGACCCCTT CATTGACCTC
   CGACGAAAAT TGAGACCATT TCACCTATAA CAACGGTAGT TACTGGGGAA GTAACCTGGAG
181 AACTACATGG TTTACATGTT CCAATATGAT TCCACCCATG GCAAATTCCA TGGCACCCTC
   TTGATGTACC AAATGTACAA GGTATACTA AGGTGGGTAC CGTTTAAGGT ACCGTGGCAG
241 AAGGCTGAGA ACGGGAAGCT TGTCATCAAT GGAAATCCCA TCACCATCTT CCAGGAGCGA
   TTCCGACTCT TGCCCTTCGA ACAGTAGTTA CCTTTAGGGT AGTGGTAGAA GGTCCTCGCT
301 GATCCCTCCA AAATCAAGTG GGGCGATGCT GGCCTGAGT ACGTCGTGGA GTCCACTGGC
   CTAGGAGGT TTTAGTTTAC CCCGCTACGA CCGCGACTCA TGCAGCACCT CAGGTGACCG
361 GTCTTCACCA CCATGGAGAA GGCTGGGGCT CATTTCAGG GGGGAGCCAA AAGGGTCATC
   CAGAAGTGGT GGTACCTCTT CCGACCCCGA GTAAACGTCC CCCCTCGGTT TTCCAGTAG
421 ATCTCTGCC CCTCTGCTGA TGCCCCATG TCGTTCATGG GTGTGAACCA TGAGAAGTAT
   TAGAGACGGG GGAGACGACT ACGGGGTAC AAGCAGTACC CACACTTGGT ACTCTTCATA
481 GACAACAGCC TCAAGATCAT CAGCAATGCC TCCTGCACCA CCAACTGCTT AGCACCCCTG
   CTGTTGTGCG AGTTCTAGTA GTCGTTACGG AGGACGTGGT GGTTGACGAA TCGTGGGGAC
541 GCCAAGGTCA TCCATGACAA CTTTGGTATC GTGGAAGGAC TCATGACCAC AGTCCATGCC
   CGGTTCCAGT AGGTACTGTT GAAACCATAG CACCTTCCTG AGTACTGGTG TCAGGTACGG
601 ATCACTGCCA CCCAGAAGAC TGTGGATGGC CCCTCCGGGA AACTGTGGCG TGATGGCCCG
   TAGTGACGGT GGGTCTTCTG ACACCTACCG GGGAGGCCCT TTGACACCGC ACTACCGGCG
661 GGGGCTCTCC AGAACATCAT CCCTGCCTCT ACTGGCGCTG CCAAGGCTGT GGGCAAGGTC
   CCCCAGAGAG TCTTGATGTA GGGACGGAGA TGACCGCGAC GGTTCCGACA CCCGTTCCAG
721 ATCCCTGAGC TGAACGGGAA GCTCACTGGC ATGGCCTTCC GTGTCCCCAC TGCCAACGTG
   TAGGGACTCG ACTTGCCCTT CGAGTGACCG TACCGGAAGG CACAGGGGTG ACGGTTGCAC
781 TCAGTGGTG ACCTGACCTG CCGTCTAGAA AAACCTGCCA AATATGATGA CATCAAGAAG
   AGTCACCACC TGGACTGGAC GGCAGATCTT TTTGGACGGT TTATACTACT GTAGTTCTTC
841 GTGGTGAAGC AGGCGTCGGA GGGCCCCCTC AAGGGCATCC TGGGCTACAC TGAGCACCAG
   CACCACTTCG TCCGCAGCCT CCCGGGGGAG TTCCCGTAGG ACCCGATGTG ACTCGTGGTC
901 GTGGTCTCCT CTGACTTCAA CAGCGACACC CACTCCTCCA CCTTTGACGC TGGGGCTGGC
   CACCAGAGGA GACTGAAGTT GTCGCTGTGG GTGAGGAGGT GGAAACTGCG ACCCCGACCG
961 ATTGCCCTCA ACGACCACTT TGTCAGCTC ATTTCTGGT ATGACAACGA ATTTGGCTAC
   TAACGGGAGT TGCTGGTGAA ACAGTTCGAG TAAAGGACCA TACTGTTGCT TAAACCGATG
1021 AGCAACAGGG TGGTGGACCT CATGGCCAC ATGGCCTCCA AGGAGTAAGA CCCCTGGACC
   TCGTTGTCCC ACCACCTGGA GTACCGGGTG TACCGGAGGT TCCTCATTCT GGGGACCTGG
1081 ACCAGCCCCA GCAAGAGCAC AAGAGGAAGA GAGAGACCCT CACTGCTGGG GAGTCCCTCG
   TGGTCGGGGT CGTTCTCGTG TTCTCCTTCT CTCTCTGGGA GTGACGACCC CTCAGGGACG
1141 CACACTCAGT CCCCCACCAC ACTGAATCTC CCCTCCTCAC AGTTGCCATG TAGACCCCTT
   GTGTGAGTCA GGGGGTGGTG TGACTTAGAG GGGAGGAGTG TCAACGGTAC ATCTGGGGAA
1201 GAAGAGGGGA GGGGCCTAGG GAGCCGCACC TTGTCATGTA CCATCAATAA AGTACCCTGT
   CTTCTCCCT CCCCGGATCC CTCGGCGTGG AACAGTACAT GGTAGTTATT TCATGGGACA
1261 GCTCAACC
      CGAGTTGG

```

Figura 5. Secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína G3PDH de origen humano reportada en el banco de genes del NCBI (**M33197.1**). En amarillo se muestra la alineación de los iniciadores designados produciendo un amplicón de 189 pb.

Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Una vez cuantificado el ARN, el siguiente paso fue realizar la transcripción reversa para obtener el ADN complementario (ADNc). Las reacciones (**Cuadro 4**) fueron realizadas en la campana de flujo laminar.

Reactivo	Laboratorio	Concentración inicial	µl
Amortiguador de síntesis de primera cadena	Invitrogen®	5 x	4.0
dNTP's	Invitrogen®	10 mM	1.0
DTT	Invitrogen®	0.1 M	1.0
Oligo(dT)	Invitrogen®	2.5 µM	2.0
Transcriptasa reversa	SuperScript II Invitrogen®	100 U	0.5
ARN		1 µg/ µl	1.0-5.0
Agua con DEPC			C.b.p. 20 µl

Cuadro 4. Mezcla de reactivos para la Transcripción Reversa.

La reacción se colocó en el termociclador TC-512 (Techne®) utilizando las condiciones de incubación mostradas en la **figura 6**.

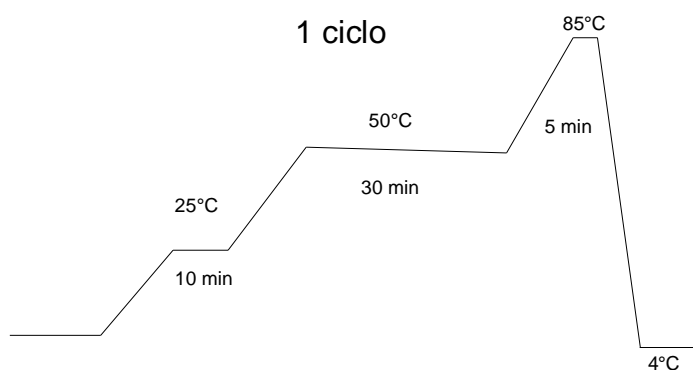


Figura 6. Diagrama con las constantes de temperatura y número de ciclos utilizados en la reacción de transcripción reversa para generar ADNc.

Para comprobar que los iniciadores generaran un producto de 200 pb y de 189 pb a partir de la secuencia que codifica a la proteína Sintaxina 4 y G3PDH, respectivamente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa a una TM de 60°C. Se utilizó el producto comercial *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen®). Las reacciones (**Cuadro 5**) fueron realizadas en una campana de flujo laminar.

Reactivo	Laboratorio	Concentración inicial	µl
PCR Buffer sin Mg	Invitrogen®	10 x	5.0
MgCl ₂	Invitrogen®	50 mM	1.5
dNTP's	Invitrogen®	10 mM	1.0
Iniciador F		10 nM	1.0
Iniciador R		10 nM	1.0
TaqDNAPolymerase	Invitrogen®	1.5 U	1.5
ADNc		1 µg/ µl	1.0-5.0
Agua inyectable			Cbp. 50 µl

Cuadro 5. Mezcla de reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La reacción se colocó en el termociclador TC-512, utilizando las condiciones de incubación mostradas en la **figura 7**.

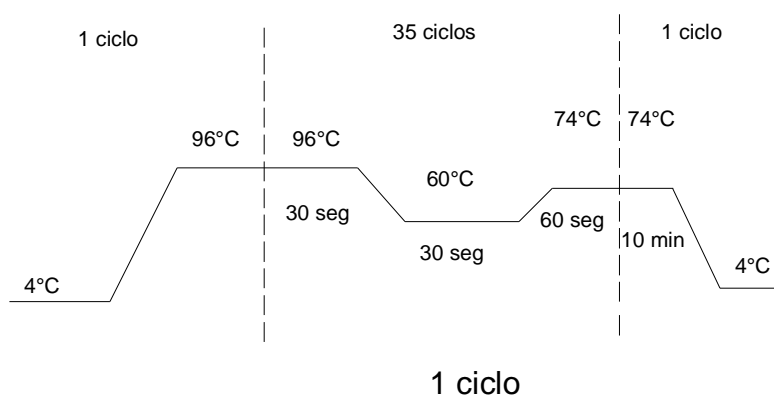


Figura 7. Diagrama con las constantes de temperatura y número de ciclos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa para Sintaxina 4 y G3PDH.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCRq). Una vez que se comprobó que los iniciadores amplificaban los fragmentos esperados y que no había amplificación de productos inespecíficos, se llevó a cabo la PCRq. Para ello, se utilizó el sistema SYBR®GreenER Two-Step qRT-PCR (Invitrogen®) de acuerdo a las instrucciones del productor. Los ensayos de PCRq se llevaron a cabo en el termociclador Light Cycler 480 (Roche®) y los resultados fueron analizados utilizando la ecuación de Pfaffl⁷⁴ que indica los cambios en la expresión de los genes blanco con respecto a un control normalizador. Tomando en cuenta la inespecificidad del fluorocromo, se realizó

la optimización de la concentración de iniciadores para Sintaxina 4 y para G3PDH con la finalidad de conocer la concentración a la cual la fluorescencia era mayor. Para ello, los iniciadores (tanto *forward* como *reverse*) se diluyeron para obtener las siguientes concentraciones finales dentro de la reacción: 900 nM, 300 nM y 50 nM. Estas fueron utilizadas en diferentes combinaciones empleando ADNc a una concentración de 0.05 µg/ µl. Además, se incluyeron controles sin ADNc identificadas como NTC (*No Template Control*) (**Figura 8**).

Sintaxina 4			G3PDH			Forward/ Reverse
900/ 900	300/ 900	50/ 900	900/ 900	300/ 900	50/ 900	ADNc
900/ 300	300/ 300	50/ 300	900/ 300	300/ 300	50/ 300	
900/ 50	300/ 50	50/ 50	900/ 50	300/ 50	50/ 50	
900/ 900	300/ 900	50/ 900	900/ 900	300/ 900	50/ 900	NTC
900/ 300	300/ 300	50/ 300	900/ 300	300/ 300	50/ 300	
900/ 50	300/ 50	50/ 50	900/ 50	300/ 50	50/ 50	

Figura 8. Combinación de las diferentes concentraciones (900, 300 y 50 nM) de los iniciadores para Sintaxina 4 y G3PDH. El numerador representa a la concentración del iniciador *Forward* y el denominador representa a la concentración del iniciador *Reverse*.

Posteriormente, se realizó una curva estándar utilizando diluciones decimales del ADNc. Con los datos obtenidos de este ensayo, se calculó la eficiencia de la prueba a partir de la pendiente de la curva de regresión obtenida, utilizando el programa LightCycler®480 Software. Este procedimiento permitió validar el sistema SYBR®GreenER Two-Step qRT-PCR y comprobar que no había formación de dímeros. Una vez estandarizado el procedimiento, se realizó la medición de la expresión relativa del ARNm de Sintaxina 4 durante la infección de los macrófagos THP-1 por *B. melitensis* y por *S. Enteritidis*. Las condiciones

utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCRq, se muestran en el diagrama de la **figura 9**. La prueba se llevó a cabo en el termociclador Light Cycler 480®.

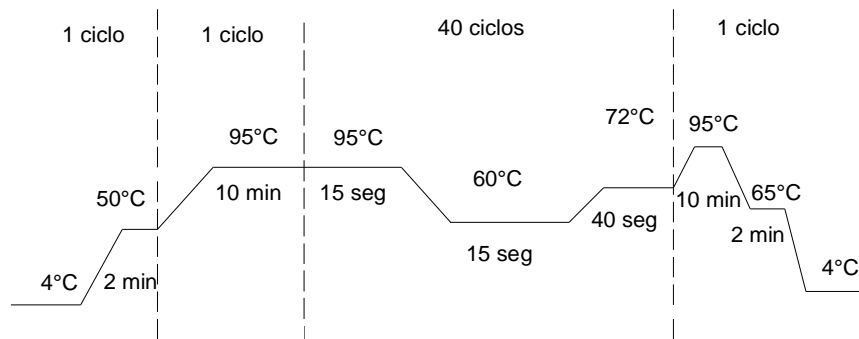


Figura 9. Diagrama de las constantes de la temperatura y número de ciclos utilizadas para la PCRq para para Sintaxina 4 y G3PDH.

Análisis de los Resultados obtenidos en la PCRq. Los análisis de resultados se llevaron a cabo por medio de la ecuación de Pfaffl (**Figura 10**).⁷⁴

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{gen blanco}})^{\Delta CP_{\text{gen blanco}}(\text{control} - \text{muestra})}}{(E_{\text{gen ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{muestra})}}$$

- E_{blanco} : Expresión del gen blanco
- $E_{\text{referencia}}$: Expresión del gen referencia o control endógeno (G3PDH)
- $\Delta CP_{\text{gen blanco}}(\text{control-muestra})$: cambio en los valores de los ciclos umbral del gen blanco en la muestra calibradora (*control*) y la muestra experimental (*muestra*)
- $\Delta CP_{\text{referencia}}(\text{control-muestra})$: cambio en los valores de los ciclos umbral del control endógeno entre la muestra calibradora (*control*) y la muestra experimental (*muestra*)

Figura 10. Ecuación de Pfaffl.

Extracción de Proteínas de las células THP-1. Se utilizó el protocolo citado por Corvera & Czech.⁷⁵ Brevemente, se trabajó con células diferenciadas con VD₃ infectadas y sin infectar en placas de 24 pozos, preparadas con la metodología descrita anteriormente. Se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS frío. Se agregaron 100 µl de buffer de lisis (Tritón 100x al 1%,

Dioxicolato 0.2%, Dodecilsulfato sódico 0.1%) por pozo, se incubó por 5 min a 4°C. A continuación, se cosechó y filtró el extracto obtenido con membranas de 0.22 µm (Millipore®) para eliminar las bacterias presentes. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después, cada una de las muestras fue centrifugada (Centrifuge 5415R, Eppendorf®) a 12,000 g por 10 min a 4°C, en seguida el sobrenadante fue decantado. Se realizó un lavado de la pastilla con etanol absoluto frío (Merck KGaA®) en proporción 1:1 sin suspender la pastilla. Se repitió la centrifugación a 13,000 g por 10 min a 4°C y se decantó cuidadosamente el etanol, dejando secar levemente la pastilla. Por último, ésta se suspendió en Tris 16 µM, pH 8.3, en un volumen de 30 a 40 µl. Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4°C.

Cuantificación de proteínas. La determinación de la concentración de proteínas en cada muestra se realizó con el método de Bradford utilizando el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech®, Ultrospec 3000) a una longitud de onda de 595 nm. Este método consiste en realizar una curva de referencia utilizando albúmina sérica bovina al 1% quedando como concentraciones finales de la albúmina 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µg/µl. Una vez obtenida la curva, se hizo la cuantificación de cada una de las muestras, para ello, se agregaron 2 µl de la muestra en 98 µl de agua MiliQ y 1 ml del reactivo de Bradford (100 mg de Azul de Coomassie G-250, 50 ml de Etanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%) en una cubeta del espectrofotómetro, se incubó por 5 min en oscuridad y se hizo la lectura. Como control se utilizó 1 ml del reactivo de Bradford.⁷⁶

Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).

Inicialmente, se preparó el gel separador al 12 % (3.3 ml de agua destilada, 4.0 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de Tris 1.5 M, pH 8.8, 0.1 ml de SDS al 10%, 0.15 ml de persulfato de amonio al 10 % y 0.006 ml de TEMED). Posteriormente, se preparó el gel concentrador (2.7 ml de agua destilada, 0.67 ml de acrilamida al 30%, 0.5 ml de Tris 1.0 M, pH 6.8, 0.03 ml de SDS al 10%, 0.03 ml de persulfato de amonio al 10 % y 0.006 ml de TEMED). La electroforesis se realizó en la cámara Mini-PROTEAN II (BIO-RAD®). Las muestras fueron previamente desnaturalizadas en ebullición por 5 min con el amortiguador de carga Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2β-mercaptoetanol, Tris HCl 0.125 M, pH 6.8, 0.004% de azul de bromofenol).⁷⁷ Posteriormente, se colocaron 30 µg de la muestra por pozo. Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 60 volts para el gel concentrador y a 70 volts para el gel separador. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular preteñido *Precision Plus Protein Standards*® de Bio Rad®. Se prepararon dos geles, uno se utilizó para la inmunotransferencia y otro para ser teñido con azul de Coomasie.

Transferencia de proteínas e Inmunodetección. Una vez separadas las proteínas por electroforesis, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore®), utilizando un buffer de transferencia (25mM Tris Base, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0.01% SDS) en la cámara de inmunotransferencia Mini-PROTEAN II®. La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó por 18 h a 0.09-0.1 Amp. Una vez terminada la transferencia, se llevó a cabo el bloqueo de la membrana por 2 h con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% (100 ml TBS 10x (24.23 g Trizma

HCl, 80.06 g NaCl c.b.p 1 L de agua MiliQ pH 7.6), 900 ml de agua Mili Q y 1 ml de Tween 20). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS-Tween 20 al 0.1% para después incubar toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal de origen murino Anti-Sintaxina 4 (CTR SCIENTIFIC®) diluido 1/250. Al terminar el tiempo de incubación, se repitieron dos lavados con TBS-Tween 20 al 0.1% por 5 min y el último lavado se dejó por 10 min. Posteriormente, se incubó por 2 h con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón acoplada a peroxidasa (SIGMA-ALDRICH®) utilizando una dilución 1/1000. En seguida, se hicieron dos últimos lavados con TBS-Tween 20 al 0.1 % de 10 min y el último lavado se realizó de 20 min, antes de llevar a cabo el revelado. Por último, se colocó la membrana en la solución de revelado (Solución A: 20 ml metanol (J.T.Baker®) + 60 mg de 4-cloro-1-naftol (SIGMA-ALDRICH®); Solución B: 100 µl peróxido de hidrógeno (J.T.Baker®) en 100 ml de TBS (10 ml de TBS 10x y 90 ml de agua MiliQ) y se mantuvo en agitación constante hasta observar la marca. Una vez que se observó la reacción, se detuvo la misma sumergiendo la membrana en agua destilada fría. Se realizó el mismo procedimiento para el control, utilizando como anticuerpo primario anti-β-actina de origen conejo (SIGMA-ALDRICH®) a una dilución 1/100 y como anticuerpo secundario anti-conejo (SIGMA-ALDRICH®) a una dilución 1/250.

Análisis Estadístico. Los datos obtenidos de la PCRq para los diferentes tratamientos de diferenciación de las células y los ensayos de infección fueron analizados con la prueba de T-student y ANOVA de dos vías para datos con distribución normal y la prueba U de Mann-Whitney para datos sin distribución normal utilizando los programas IBM SPSS Statistics 20.0.0® y GraphPad Prism 6®.

6.0 Resultados

Diferenciación de las células THP-1. Para poder llevar a cabo la infección de las células THP-1 fue necesario diferenciar previamente a los monocitos en suspensión a macrófagos adherentes. Existen diversos métodos de diferenciación donde se emplean diferentes estímulos como el acetato de forbol miristato (PMA) ó $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (VD_3). En estudios previos, se ha utilizado el PMA a una concentración de 160 nM durante tres horas para llevar a cabo la diferenciación de las células (**Figura 11**),⁷⁸ pero el uso de este inductor tiene el inconveniente de activar la síntesis del $TNF\alpha$.^{79,80} Esta citocina está asociada a la expresión de proteínas involucradas en el tránsito vesicular como VAMP3 y Sintaxina 4. Además, se conoce que un estímulo con el LPS de las enterobacterias también es capaz de generar una sobre expresión de estas proteínas.^{64,65,66}

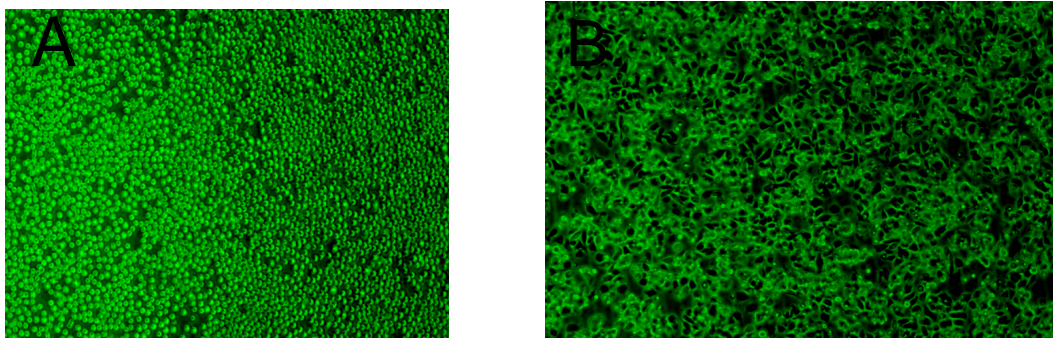


Figura 11. Fotografías de las células THP-1. **A.** Monocitos sin diferenciar. **B.** Macrófagos diferenciados con 160 nM de PMA por 3h.

Por ende, surgió la necesidad de comprobar el efecto de diferentes inductores de la diferenciación en la expresión de la proteína Sintaxina 4. Para ello, se realizó un ensayo de expresión del ARNm de Sintaxina 4 por medio de PCRq, donde se comparó el efecto del uso de PMA (SIGMA-ALDRICH ®) y el de la VD_3 (SIGMA-ALDRICH ®) a los 30, 60 y 120 min (**Figura 12**), así como en

células infectadas con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis a los 60 min postinfección (**Figura 13**).

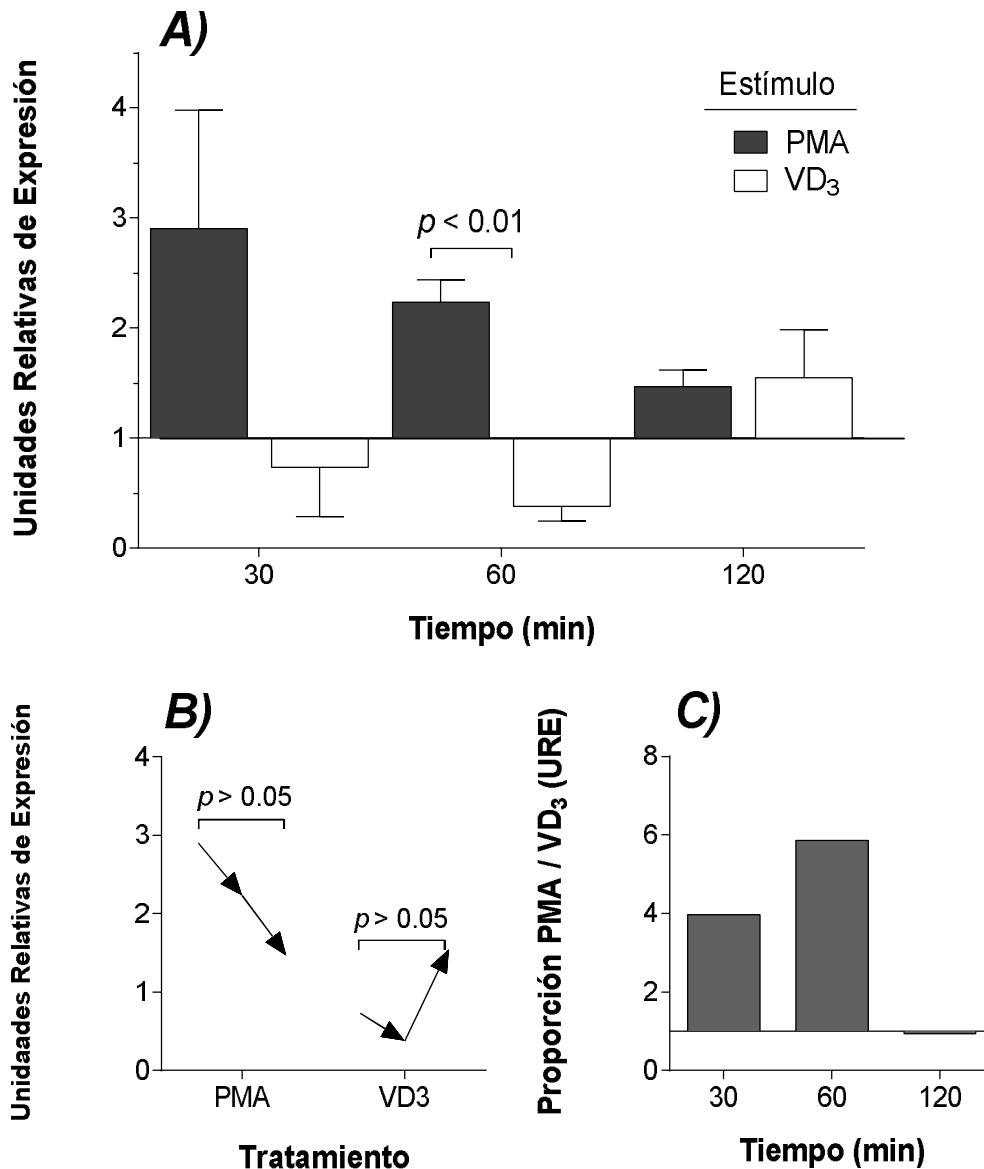


Figura 12. Expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células THP-1 diferenciadas con PMA y VD₃. A) Comparación de las Unidades Relativas de Expresión (URE) del ARNm de Sintaxina 4 a los 30, 60 y 120 min entre las células diferenciadas con PMA (Gris oscuro) y VD₃ (Blanco). Uno representa el valor de la expresión de Sintaxina 4 en las células sin diferenciar. B) Expresión del ARNm de Sintaxina 4 después del tratamiento con PMA o VD₃ a los 30, 60 y 120 min. Ambos extremos de cada una de las flechas representan a los diferentes tiempos utilizados. La longitud de las flechas indica la magnitud del cambio en la expresión entre cada uno de los tiempos. C) Expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células diferenciadas con PMA en relación con las diferenciadas con VD₃ en los diferentes tiempos utilizados.

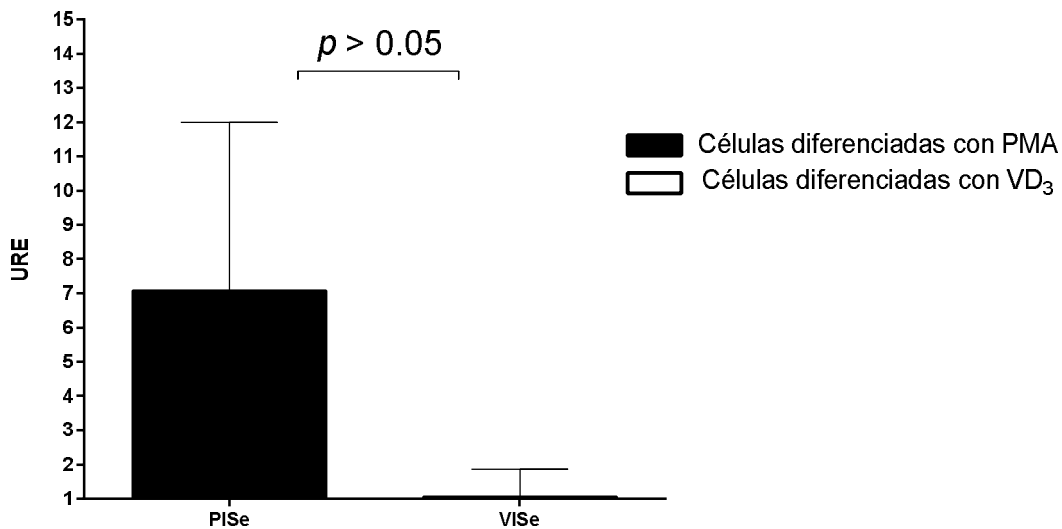


Figura 13. Expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células THP-1 diferenciadas con PMA y VD₃ e infectadas con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis para obtener el ARN total a los 60 min postinfección. PISe (barra negra) y VISe (barra blanca) indican las URE de Sintaxina 4 en células diferenciadas con VD₃ y PMA, respectivamente.

La expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células diferenciadas con PMA comparadas con la expresión de las células sin diferenciar se incrementó 2.9 veces en los primeros 30 min; posteriormente, disminuyó a 2.23 veces a los 60 min y por último, la expresión nuevamente disminuyó a 1.46 veces a los 120 min (**Figura 12, A**); sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la expresión evaluada en estos tiempos (**Figura 12, B**). Por otra parte, la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células diferenciadas con VD₃ fue menor comparada con las células sin diferenciar en los primeros dos tiempos evaluados. A los 30 min y 60 min disminuyó 0.73 veces y 0.38 veces, respectivamente. En cambio, la expresión aumentó 1.54 veces a los 120 min (**Figura 12, A**); sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre la expresión evaluada en estos tiempos (**Figura 12, B**). Por otro lado, a pesar de que se registró una expresión variable del ARNm de Sintaxina 4 entre ambos tratamientos, sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.01$) a los 60 min (**Figura 12, A**).

Finalmente, se obtuvo la proporción entre los valores obtenidos en la expresión del ARNm para conocer cuántas veces más se expresó Sintaxina 4 en células diferenciadas con PMA comparadas con las diferenciadas con VD₃. A los 30 min, el aumento en la expresión fue 3.97 veces mayor en células diferenciadas con PMA que en las diferenciadas con VD₃; a los 60 min el aumento fue 5.83 veces mayor y a los 120 min la expresión en las células diferenciadas con PMA fue 0.94 veces menor con respecto a las células diferenciadas con VD₃ (**Figura 12, C**). Estos cambios en la expresión indican que las células diferenciadas con PMA modifican la expresión *per se*, por tanto, se descartó el uso de este inductor de la diferenciación para experimentos posteriores. Por otra parte, en las células infectadas con *S. Enteritidis* la expresión del ARNm de Sintaxina 4 aumentó con ambos estímulos, aunque no en la misma proporción. En el caso de las células diferenciadas con VD₃, la expresión del ARNm de Sintaxina 4 se incrementó 1.05 veces comparada con las células sin diferenciar. En contraste, en las células diferenciadas con PMA se registró un aumento en la expresión de 7.08 veces comparado con las células sin diferenciar (**Figura 13**). A pesar de que existe una menor expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células que fueron diferenciadas con VD₃ comparadas con las estimuladas con PMA a los 60 min postinfección, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Una vez que se determinó el aumento de la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células THP-1 diferenciadas con PMA, se decidió emplear como inductor de la diferenciación a la VD₃. Para ello, se evaluaron diferentes protocolos basados en estudios previamente reportados.^{79,80,81} En estos, se utilizaron varias concentraciones y tiempos de exposición, los cuales permitieron

establecer las condiciones donde se llevaba a cabo la diferenciación de aproximadamente el 70% de las células preparadas en placas de 24 pozos (3.5×10^5 células por pozo, en una superficie de 2 cm^2). Se percibió que la diferenciación con VD_3 no induce el mismo grado de adherencia a las placas que tiene el PMA (**Figura 14**).⁸⁰ La concentración final de VD_3 utilizada en los experimentos fue de 10^{-7} M durante 72 h.

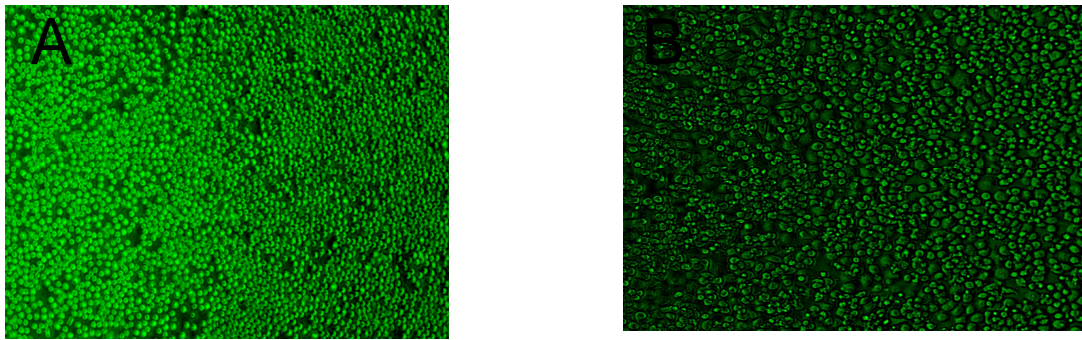


Figura 14. Fotografías de las células THP-1. **A.** Monocitos sin diferenciar. **B.** Macrófagos diferenciados con 10^{-7} M de VD_3 por 72h.

Extracción de ARN. Una vez estandarizada la diferenciación de las células THP-1, se realizó la extracción del ARN total. Posteriormente, fue visualizado en un gel de agarosa al 1.0% en TAE sometido a una electroforesis a 83 Volts por 45 min. Por último, fue teñido en bromuro de etidio al 0.001% por 10 min y digitalizado para su posterior análisis (**Figura 15**).

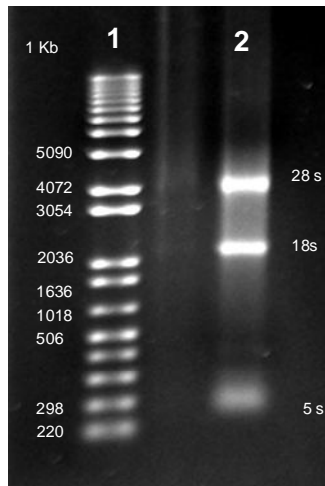


Figura 15. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb y en el carril 2 la extracción del ARN total de 3.5×10^5 células diferenciadas con VD_3 .

RT-PCR. Una vez extraído el ARN total, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) por medio de la enzima transcriptasa reversa. Se utilizó $1\mu\text{g}$ del ARN total extraído para esta reacción. En la **figura 16** se incluye la fotografía del ADNc, se puede observar un barrido debido a la generación de fragmentos de distinto tamaño.

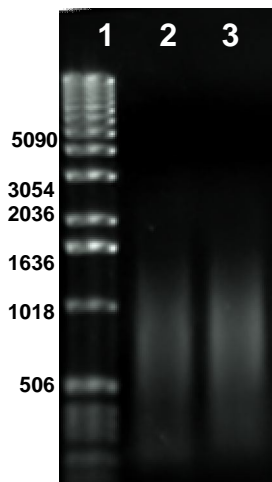


Figura 16. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb. En los carriles 2 y 3, el ADN complementario generado por la transcriptasa reversa, a partir del ARN mensajero.

Una vez obtenido el ADNc, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para observar cualitativamente si había la generación de

productos inespecíficos al utilizar los iniciadores previamente diseñados (**Figura 17**), como no se observó la formación de dímeros en ninguno de los dos iniciadores, el siguiente paso fue la estandarización de las condiciones para los ensayos de expresión en la PCRq.

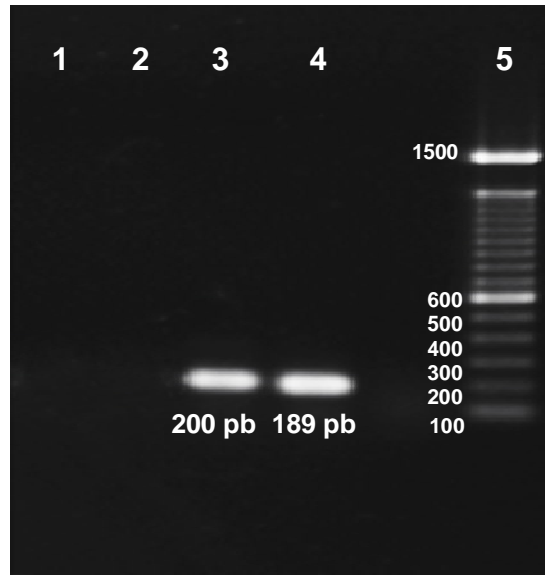


Figura 17. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio donde se muestran el producto de PCR para Sintaxina 4 y G3PDH. En los carriles 1 y 2 se encuentran el control negativo de Sintaxina 4 y de G3PDH, respectivamente. En los carriles 3 y 4 se observan los fragmentos de 200 pb y 189 pb correspondientes al producto generado por la PCR de Sintaxina 4 y G3PDH, respectivamente. En el carril 5 se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb.

PCR Cuantitativa o en Tiempo Real (PCRq). Después de estandarizar las concentraciones de los iniciadores para la PCRq, se decidió utilizar la concentración de 900 nM para el iniciador *forward* y la concentración de 300 nM para el iniciador *reverse* tanto para Sintaxina 4 como para G3PDH, ya que con estas concentraciones, la detección de la fluorescencia fue más eficiente. Posteriormente, se generó una curva estándar para conocer la eficiencia de la prueba al utilizar el sistema SYBR®GreenER Two-Step qRT-PCR (Invitrogen®) de acuerdo a los criterios sugeridos por el fabricante (**Figuras 18 y 19**).

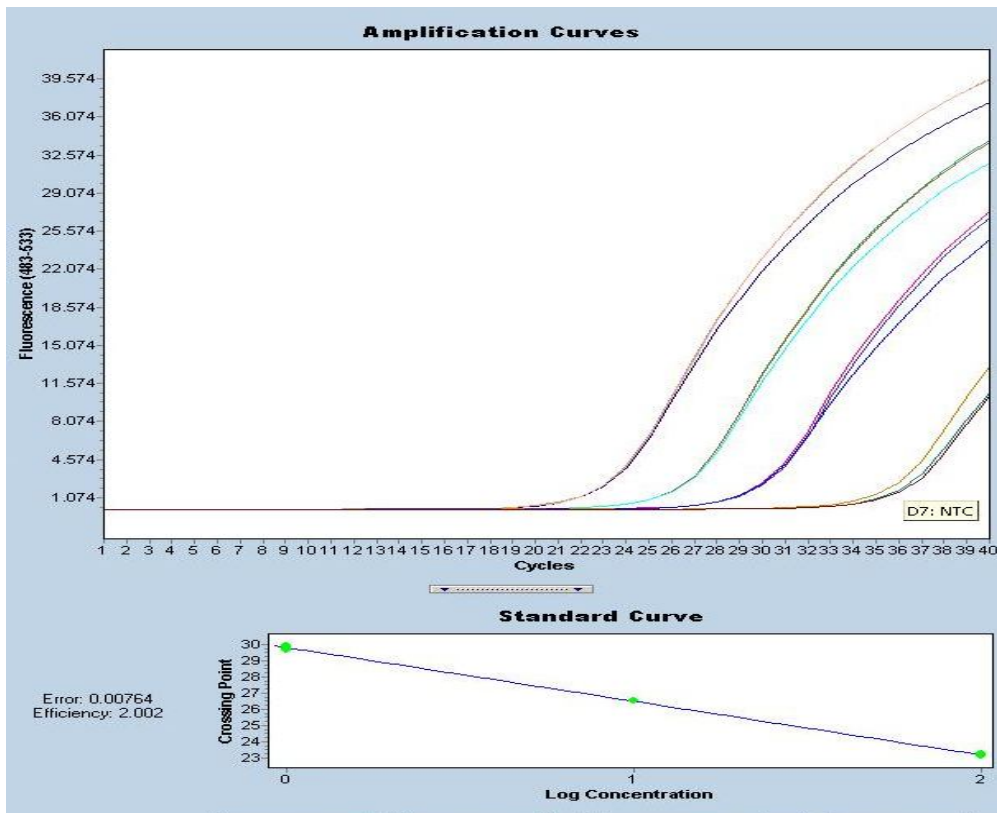


Figura 18. Curva de eficiencia obtenida con los iniciadores usados para Sintaxina 4.

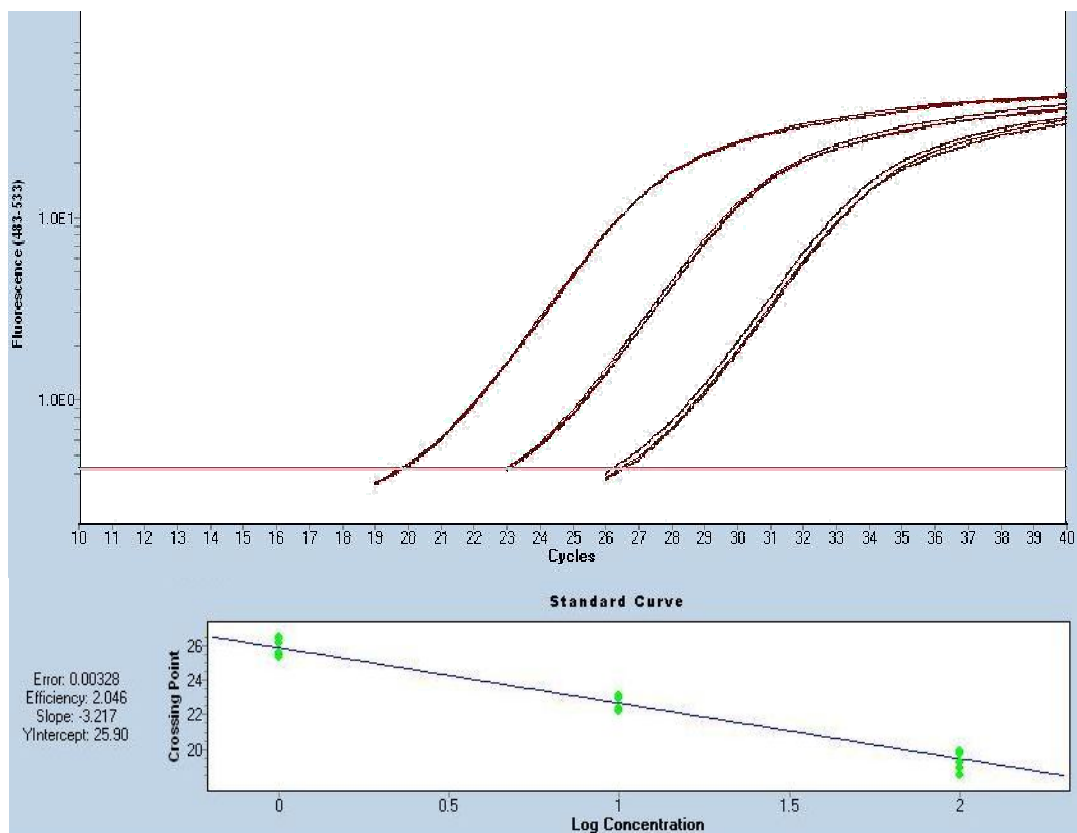


Figura 19. Curva de eficiencia obtenida con los iniciadores utilizados para G3PDH.

Una vez obtenida la curva estándar, se realizó el ensayo de expresión del ARNm de Sintaxina 4 durante la infección por *B. melitensis*. Posteriormente, se llevó a cabo el mismo ensayo, pero con células infectadas con *S. Enteritidis*. En ambos experimentos, se utilizaron iniciadores para amplificar el gen que codifica para la enzima G3PDH como gen normalizador.

Se utilizó el ARN total extraído a partir de los macrófagos THP-1 infectados durante 15, 30, 45 y 60 min; así como de las células sin infectar empleando los mismos tiempos. Posteriormente, se obtuvo el ADNc de cada muestra para poder utilizarlo en los ensayos de PCRq. Cada muestra de ADNc se trabajó por duplicado y se llevaron a cabo dos ensayos independientes. Los datos obtenidos en estos ensayos, fueron analizados por medio de la ecuación de Pffafli (**Figura 20**).

La expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células infectadas con *B. melitensis* es menor comparada con las células sin infectar en todos los tiempos evaluados. A los 15 min postinfección, se registró una disminución de la expresión del ARNm de Sintaxina 4 de 0.36 veces con respecto a las células sin infectar; a los 30 min postinfección, la expresión disminuyó a 0.17 veces; a los 45 min postinfección hubo un ligero aumento de la expresión a 0.21 veces y por último, a los 60 min postinfección, la expresión nuevamente disminuyó a 0.18 veces (**Figura 12, A**); sin embargo, estadísticamente no hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la expresión evaluada en estos tiempos (**Figura 20, B**).

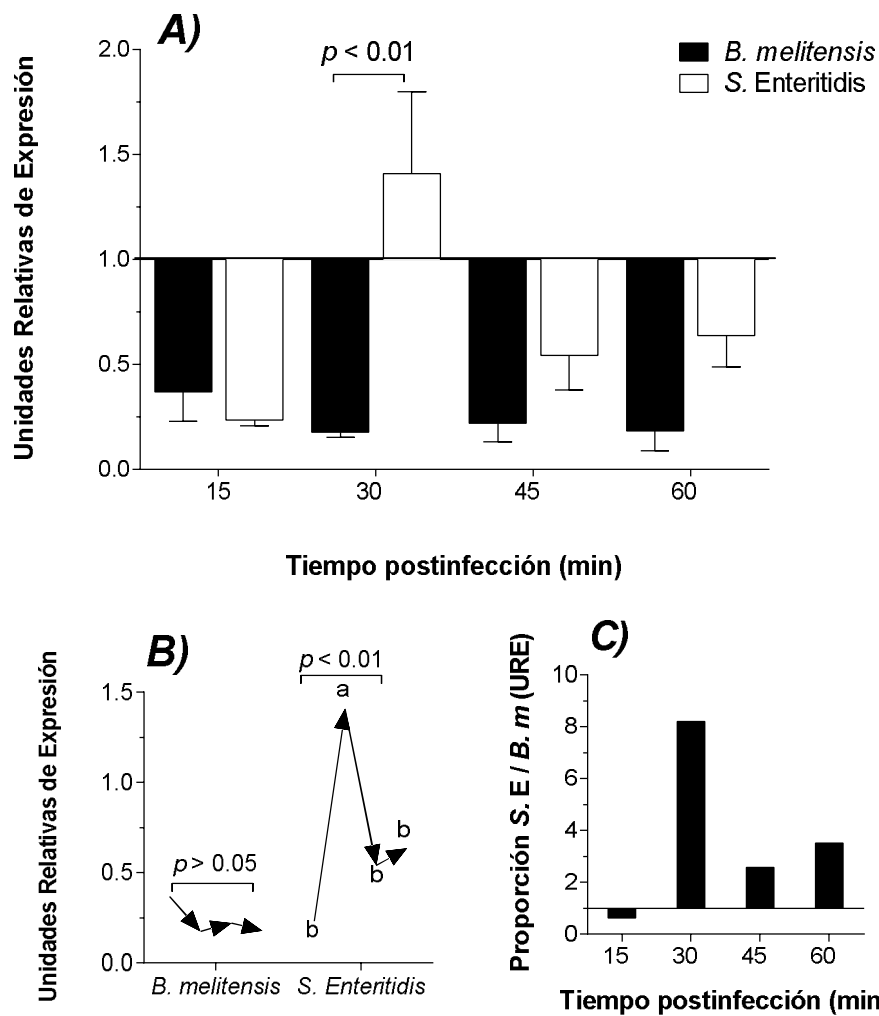


Figura 20. Expresión del ARNm de Sintaxina 4 durante la infección por *Brucella melitensis* (*B.m*) y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (*S.E*) en macrófagos humanos de la línea THP-1. A) Comparación de las Unidades Relativas de Expresión (URE) del ARNm de Sintaxina 4 a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección en células infectadas con *B. melitensis* (Negro) y *S. Enteritidis* (Blanco). Uno representa el valor de la expresión de Sintaxina 4 en las células sin diferenciar. B) Expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células infectadas con *B. melitensis* y *S. Enteritidis* a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección. Ambos extremos de cada una de las flechas representan los diferentes tiempos por separado. La longitud de las flechas indica la magnitud del cambio en la expresión entre cada uno de los tiempos. La letra a indica una diferencia significativa en las URE a los 30 min postinfección con respecto a los demás tiempos. La letra b indica que entre los 15, 45 y 60 min postinfección no hay diferencia significativa. C) Expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células infectadas con *S. Enteritidis* en relación con las células infectadas con *B. melitensis* en los diferentes tiempos postinfección.

En contraste, existen fluctuaciones en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células infectadas con *S. Enteritidis* comparadas con las células sin infectar en los diferentes tiempos postinfección: a los 15 min, la expresión de Sintaxina 4 disminuyó 0.23 veces; a los 30 min, la expresión aumentó a 1.4 veces; a los

45 min, la expresión disminuyó a 0.54 veces y por último, la expresión aumentó a 0.63 veces a los 60 min (**Figura 20, A**). A los 30 min postinfección se observó una diferencia significativa ($p < 0.01$) comparada con los demás tiempos evaluados. En contraparte, no se encontró una diferencia significativa en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 ($p > 0.05$) entre los 15, 45 y 60 min (**Figura 20, B**). Finalmente, se obtuvo la proporción entre los valores obtenidos de la expresión del ARNm en las células infectadas con ambas bacterias para conocer cuántas veces más se expresó Sintaxina 4 en las células infectadas con *S. Enteritidis* comparadas con las células infectadas con *B. melitensis*. A los 15 min postinfección, la expresión del ARNm de Sintaxina 4 fue de 0.63 veces menos en las células infectadas con *S. Enteritidis* comparadas con las células infectadas con *B. melitensis*; a los 30 min postinfección, se expresó 8.2 veces más el ARNm de Sintaxina 4 en las células infectadas con *S. Enteritidis*; a los 45 min postinfección, se expresó 2.57 veces más y por último, a los 60 min postinfección, Sintaxina 4 se expresó 3.5 veces más en las células infectadas con *S. Enteritidis* comparadas con la expresión en las células infectadas con *B. melitensis* (**Figura 20, C**).

La expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células infectadas con *B. melitensis* disminuye durante la primera hora después de la fagocitosis, esta reducción permanece constante durante este tiempo. La disminución de la expresión de Sintaxina 4 es un efecto directo de la infección por *B. melitensis*, ya que al comparar la expresión del ARNm con las células infectadas con *S. Enteritidis*, es diferente; se observa una mayor expresión de Sintaxina 4.

Western Blot. Se realizó la extracción de proteínas totales de las células THP-1 diferenciadas con VD₃, infectadas y no infectadas con *B. melitensis* y con *S.*

Enteritidis. Estas proteínas fueron cosechadas en diferentes tiempos postinfección (15, 30, 45 y 60 min). Posteriormente, se llevó a cabo la separación electroforética de las proteínas en dos geles de poliacrilamida con SDS para observar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Uno de los geles se utilizó para teñirlo con azul de Coomasie (**Figuras 21 y 22**) y otro para hacer la transferencia en una membrana de nitrocelulosa (**Figuras 23 y 24**).

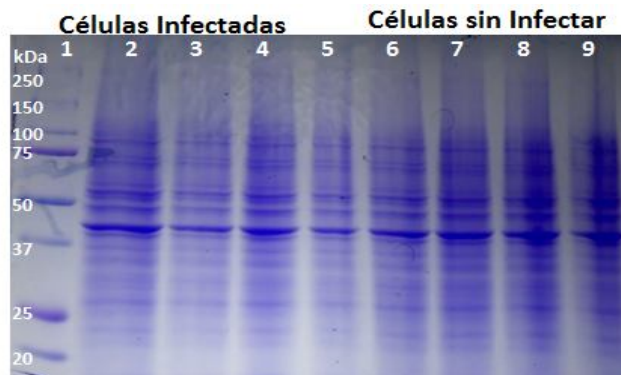


Figura 21. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie. En el carril 1 se incluyó el marcador de peso molecular preteñido. En los carriles 2 al 5, se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 infectados con *Brucella melitensis* cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección, respectivamente. En los carriles 6 al 9 se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 sin infectar, utilizadas como control de cada tiempo postinfección.

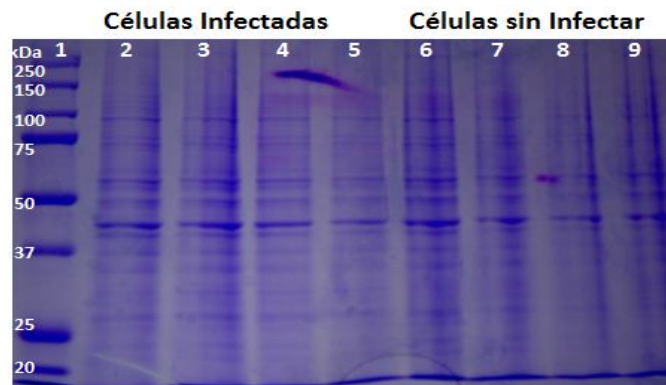


Figura 22. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie. En el carril 1 se incluyó el marcador de peso molecular preteñido. En los carriles 2 al 5, se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 infectados con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección, respectivamente. En los carriles 6 al 9 se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 sin infectar, utilizadas como control de cada tiempo postinfección.

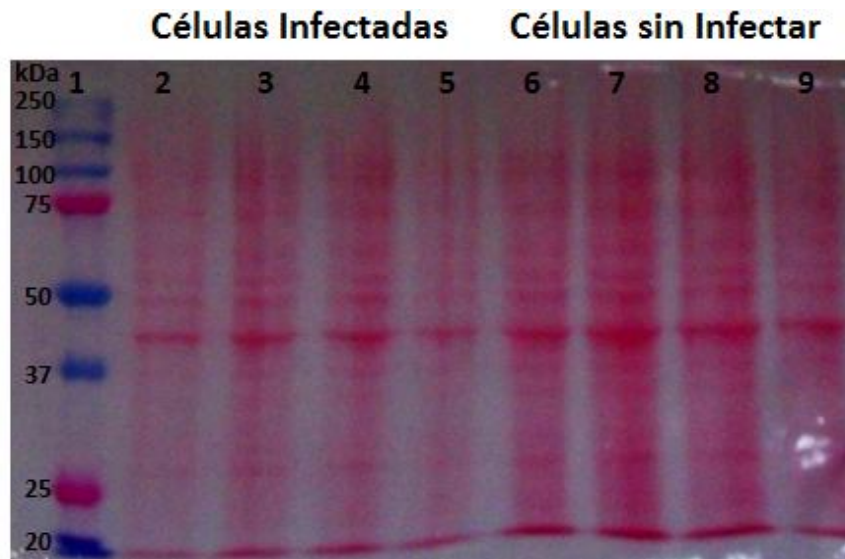


Figura 23. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. En el carril 1 se incluyó el marcador de peso molecular preteñido. En los carriles 2 al 5, se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 infectados con *Brucella melitensis* cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección, respectivamente. En los carriles 6 al 9 se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 sin infectar, utilizadas como control de cada tiempo postinfección.

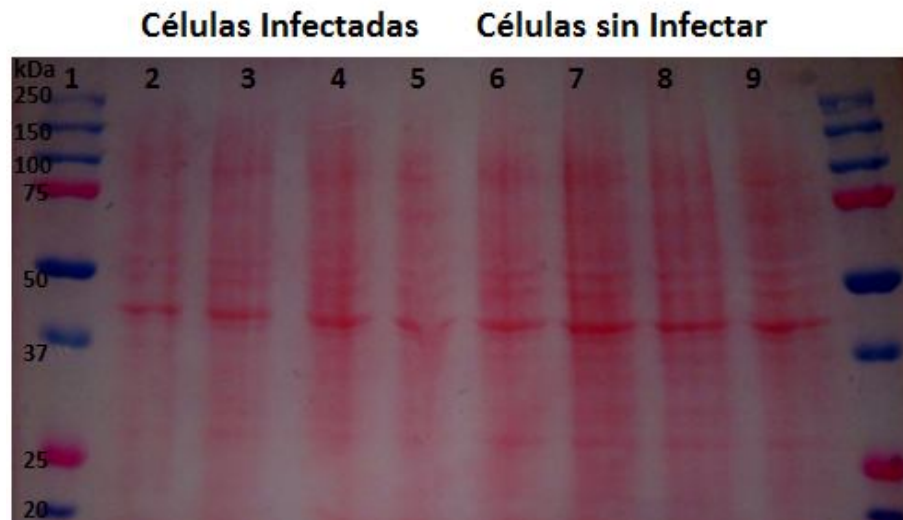


Figura 24. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. En el carril 1 se incluyó el marcador de peso molecular preteñido. En los carriles 2 al 5, se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 sin infectar, utilizadas como control de cada tiempo postinfección. En los carriles 6 al 9 se observan las proteínas extraídas de macrófagos de la línea THP-1 infectados con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min postinfección, respectivamente.

Una vez realizada la transferencia, se llevó a cabo la electroinmunodetección tanto de las proteínas extraídas de células infectadas con *B. melitensis* como con *S. Enteritidis*, así como sus controles sin infectar. (Figuras 25 y 26).

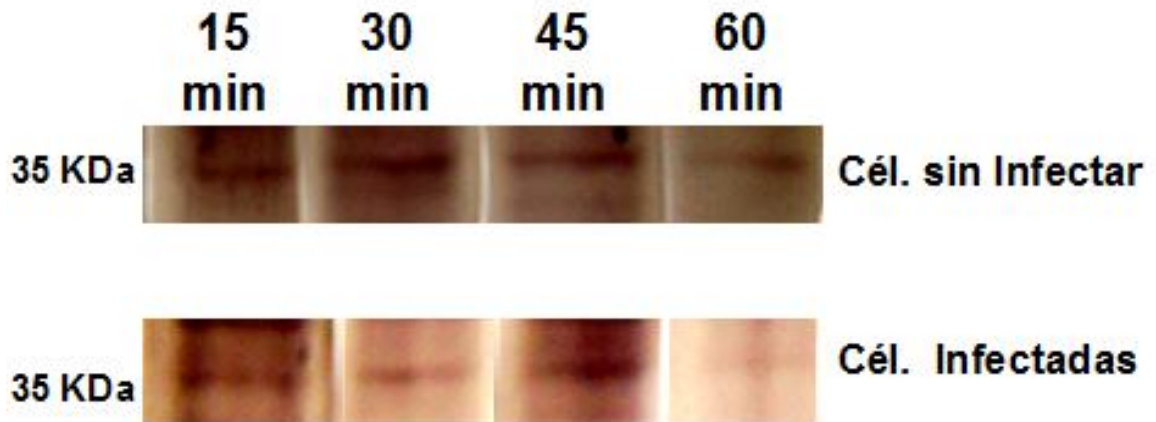


Figura 25. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa después de revelar con 4-cloro-1-naftol que muestran la electroinmunodetección de Sintaxina 4 a partir de proteínas extraídas de células infectadas y sin infectar con *Brucella melitensis* a diferentes tiempos postinfección.

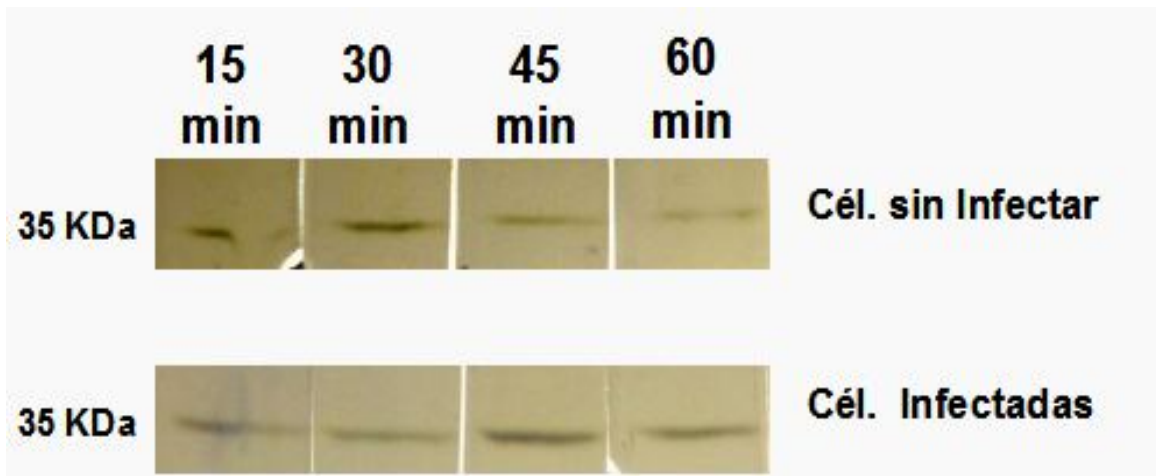


Figura 26. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa después de revelar con 4-cloro-1-naftol que muestran la electroinmunodetección de Sintaxina 4 a partir de proteínas extraídas de células infectadas y sin infectar con *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis a diferentes tiempos postinfección.

Posteriormente, se realizó la electroinmunodetección de β -actina para utilizarlo como control, ya que es una proteína cuya expresión es constante en la célula. La expresión para esta proteína se midió en los tiempos postinfección establecidos para las células infectadas: 15, 30, 45 y 60 min (**Figura 27**).

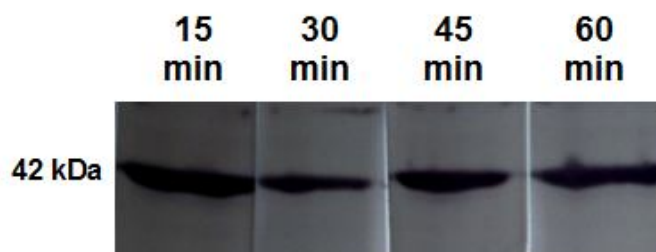


Figura 27. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa después de revelar con 4-cloro-1-naftol que muestran la electroinmunodetección de β -actina a partir de proteínas extraídas de células sin infectar durante 15, 30, 45 y 60 min.

En la **figura 25**, se observó una disminución variable de la expresión de la proteína Sintaxina 4 en las células infectadas con *B. melitensis*, comparada con las células sin infectar en los diferentes tiempos evaluados. A los 60 min postinfección, se percibió la expresión más baja de la proteína en las células infectadas con esta bacteria, a diferencia de los demás tiempos. En el caso de las células infectadas con *S. Enteritidis* (**Figura 26**), se aprecia una disminución de la expresión de la proteína Sintaxina 4 a los 15 min postinfección, comparada con las células sin infectar. En el caso de los 45 y 60 min postinfección, la expresión aumenta en las células infectadas, manteniéndose constante entre ambos tiempos. En el caso de la electroinmunodetección de β -actina, utilizada como control, se observó expresión constante de la proteína en todas las muestras (**Figura 27**).

7.0 Discusión

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la expresión de la proteína Sintaxina 4, proteína de fusión ligada a la exocitosis perteneciente a la familia SNARE, en las células THP-1 infectadas con *Brucella melitensis*. En los resultados obtenidos, se observó la disminución de la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células infectadas con *B. melitensis* comparadas con las células sin infectar, esta baja expresión se mantuvo constante en los diferentes tiempos postinfección. En contraste, se observó un aumento en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células infectadas con *S. Enteritidis*, utilizada como control, a los 30 min postinfección (**Figuras 20, A**). Estas diferencias entre la expresión de Sintaxina 4 en las células infectadas con *B. melitensis* y *S. Enteritidis*, sugieren la posibilidad de que la modulación en la expresión es dependiente de factores relacionados con la bacteria, lo cual puede estar implicado en diferentes interacciones huésped-parásito.⁸²

Una vez determinada la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en las células infectadas, se llevaron a cabo los ensayos de *Western Blot* para observar la expresión de la proteína de manera cualitativa; los resultados obtenidos fueron similares a los resultados del ensayo de PCRq. En estos, se observa una disminución en la expresión de la proteína en células infectadas con *B. melitensis* comparada con las células sin infectar y esta disminución se mantuvo constante a los 15, 30 y 45 min, pero a los 60 min la expresión se redujo aún más (**Figura 25**). No existen reportes previos de la modificación de la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en células infectadas con *B. melitensis*, sin embargo, Castañeda-Ramírez *et al.* encontraron una mayor expresión del ARNm de VAMP3, una proteína de fusión asociada a la exocitosis de la misma

familia que Sintaxina 4, al infectar macrófagos murinos de la línea J774 con *B. melitensis* en comparación con las células infectadas con *S. Enteritidis*.⁸² Por otro lado, Jubier *et al.*, determinaron que la proteína de membrana externa de 25 kDa (Omp25) en *B. suis* genera una disminución en la secreción del TNF α en la infección de macrófagos humanos de la línea THP-1.⁸³ Debido a que ahora se sabe que la secreción del TNF α se lleva a cabo por la interacción de las proteínas SNARE, como Sintaxina 4 y VAMP3, y que además la secreción de esta citocina está asociada a la expresión de estas proteínas, es probable que exista alguna relación entre lo observado en este trabajo y el trabajo de Jubier *et al.*^{64,65,66}

En el caso de las células infectadas con *S. enterica* serovariedad Enteritidis, se observó un aumento en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 en el ensayo de PCRq durante casi todos los tiempos evaluados comparado con las células infectadas con *B. melitensis* excepto a los 15 min, donde la expresión fue 0.6 veces menor. A los 30 min, se registró una diferencia significativa en la expresión del ARNm entre ambas infecciones y las células sin infectar (**Figuras 20, A y C**). Estos resultados difieren de los obtenidos mediante el *Western Blot*, particularmente a los 30 min postinfección (**Figura 26**). Esto puede deberse a alguna alteración post traduccional de la proteína por parte de la bacteria. Las alteraciones post traduccionales representan una estrategia importante de los patógenos intracelulares para modular la función, la vida media y la localización de las proteínas del huésped para poder llevar a cabo una infección. En el caso de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, se ha reportado que suprime la ubiquitinación y la degradación de I κ B α .⁸⁴ Otra posibilidad que podría explicar la diferencia entre ambos ensayos en las células infectadas con

S. Enteritidis, es algún detalle técnico, distinta cantidad de muestra en el gel o una inadecuada transferencia de proteínas, en el ensayo de *Western Blot*.

Previamente, se han realizado ensayos de expresión de la proteína Sintaxina 4 por medio de *Western Blot* en macrófagos de la línea celular RAW4 estimulados con el LPS de enterobacterias.^{65,66} En estos trabajos, Stow *et al.*, demostraron que si el LPS de *Salmonella* Minnesota o el de *E. coli* cepa 0.127.B8 son endocitados por medio de los receptores localizados a nivel de las balsas lipídicas en los macrófagos, se observa una sobre expresión de las proteínas Sintaxina 4 y VAMP3, esto conlleva a la incorporación de alrededor del 40% de Sintaxina 4 a las balsas lipídicas. La expresión de esta proteína se incrementó entre las cero y las 2 h, para después sufrir un descenso de las 2 hasta las 24 h. Cabe señalar que no se describe la expresión de Sintaxina 4 en etapas más tempranas post-tratamiento ni tampoco se realizaron ensayos de infección con las bacterias.^{64,65,66} Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, ya que también se observaron fluctuaciones en la expresión de la proteína, pero estos cambios se pudieron percibir en periodos más cortos, particularmente, un aumento de la expresión del ARNm a los 30 min postinfección. Se ha establecido que la fagocitosis y la exocitosis de citocinas son dos fenómenos que ocurren de manera simultánea en sitios específicos de la membrana plasmática denominados balsas lipídicas.^{51,66} En estos dominios membranales se encuentran presentes diversos receptores involucrados en la fagocitosis de distintas bacterias.^{85,86,87} En estudios realizados con *B. abortus* y *B. suis* se ha demostrado que estas bacterias son fagocitadas por los macrófagos en estos sitios.^{12,48,88,89} En las balsas lipídicas también se localizan diversas proteínas de fusión para la exocitosis, como

Sintaxina 4, Sintaxina 2 y Sintaxina 6, así como SNAP25 y SNAP23, las cuales promueven la secreción de citocinas entre las que se encuentra el TNF α .⁹⁰ Investigaciones previas demostraron que *B. suis* es capaz de disminuir la liberación de TNF α ,⁸³ por ende, es probable que también modifique la expresión de las proteínas de fusión que promuevan la secreción de esta citocina, entre ellas Sintaxina 4, al momento de que la bacteria es fagocitada.^{65,66}

Se han reportado casos en otras bacterias intracelulares que modifican la expresión y la función de las proteínas SNARE involucradas en la exocitosis. Copoolino *et al.*, reportaron que en fibroblastos de la línea celular COS 1 infectados con *S. Typhimurium*, VAMP3 se acumula en los sitios donde la bacteria invade a la célula. Cuando se impide la actividad de esta proteína, también se inhiben los procesos de fusión de las vesículas que contienen a *S. Typhimurium*, aunque el proceso de invasión no se ve alterado. Esto sugiere que VAMP3 no es necesaria para el proceso de invasión, pero probablemente esta proteína sea utilizada por la bacteria para poder modificar la fusión de vesículas y así favorecer su establecimiento dentro de la célula.⁹¹ Fratti *et al.*, demostraron que el fagosoma que contiene a *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de degradar a VAMP3 para modificar el tránsito intracelular de este fagosoma.⁶⁷ En el caso de *Chlamydia trachomatis* se ha reportado la expresión de una proteína vesicular similar a las proteínas SNARE denominada IncA, esta proteína es un tetrámero con estructura similar al complejo SNARE que es capaz de interactuar con las proteínas de la misma familia en el hospedador. Esto hace posible que la bacteria sea capaz de manipular la fusión de la membrana.^{92,93} Arasaki y Roy demostraron que las proteínas secretadas por el

sistema de secreción tipo IV Dot/Icm de *Legionella pneumophila* modulan la asociación de la proteína v-SNARE Sec22b, originaria del retículo endoplásmico, con las proteínas t-SNARE, provenientes de la membrana plasmática, como Sintaxina 2, Sintaxina 3, Sintaxina 4 y SNAP23. Este fenómeno puede proveer una reserva de membrana a partir de las vesículas de secreción durante la maduración del fagosoma.⁹⁴ Estos trabajos apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo, demostrando la posibilidad de que algunas bacterias intracelulares son capaces de modificar el tránsito intracelular alterando la expresión y función de las proteínas SNARE.

La virulencia de las bacterias del género *Brucella* spp. está asociada a su capacidad de sobrevivir dentro de las células.^{2,12,14} *Brucella* spp. tiene la capacidad de infectar tanto células fagocíticas profesionales como no profesionales, aunque el tránsito intracelular es diferente entre ambos tipos celulares.^{27,47,48,57} En el presente trabajo, como modelo experimental se utilizaron monocitos de origen humano de la línea THP-1, para estudiar el efecto de la infección por *B. melitensis* y *S. Enteritidis* sobre la expresión de la proteína Sintaxina 4, en las etapas tempranas de la fagocitosis. Se han realizado diversos trabajos con esta línea celular en ensayos de infección con diferentes especies de *Brucella* spp.^{53,78,83} estableciendo la susceptibilidad de estas células a la infección por esas bacterias. Las células THP-1 requieren ser estimuladas previamente por un inductor de la diferenciación para poder ser diferenciadas a macrófagos.^{79,80}

Los experimentos realizados en este trabajo permitieron detectar que la diferenciación con PMA modifica de manera significativa la expresión de

Sintaxina 4 *per se* (**Figura 12, A**). La expresión del ARNm es casi 4 veces mayor con este inductor de la diferenciación a los 30 min y 5.8 veces mayor a los 60 min comparado con el uso de la VD₃ (**Figura 12, C**). Estos tiempos fueron utilizados en los ensayos de infección, en consecuencia, se descartó el uso de PMA para experimentos posteriores. La VD₃ fue utilizada como inductor de la diferenciación de las células THP-1 debido a que genera menos modificaciones en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 al momento de la diferenciación (**Figura 12, A y C**). Cabe mencionar que en los ensayos de *Western Blot*, se observa la disminución en la expresión de la proteína a los 60 min en las células no infectadas (**Figura 26**). Asimismo, la expresión de β -actina, usada como control, en estas mismas células (**Figura 27**) se mantuvo constante.

Por otro lado, las células que fueron diferenciadas con ambos estímulos, mostraron un aumento en la expresión del ARNm de Sintaxina 4 al momento de ser infectadas por *S. Enteritidis* en contraste con las células sin infectar. Estos resultados son similares a los obtenidos por Daigneault *et al*; sin embargo, en estos ensayos utilizaron únicamente el LPS de otra enterobacteria para estimular a las células.⁸⁰ Por lo anterior, este es el primer reporte de ensayos de expresión de la proteína Sintaxina 4 donde se utilizan bacterias vivas para llevar a cabo la infección de las células.

Finalmente, debido a que se ha reportado que el cambio en la expresión de las proteínas de fusión de la familia SNARE, particularmente la proteína VAMP3, no es crítica para la sobrevivencia,⁸² es necesario realizar ensayos de silenciamiento de la proteína Sintaxina 4 para evaluar si la disminución de la

expresión de la misma observada en células infectadas con *B. melitensis*, afecta a la internación y sobrevivencia de la bacteria. Asimismo, se propone realizar ensayos mediante ELISA para conocer si la alteración en la expresión de la proteína también influye en la secreción de las citocinas con las cuales están relacionadas. Además, estos trabajos pueden ser complementados con ensayos de microscopia confocal para determinar la interacción de la bacteria con la proteína.

No se debe descartar la posibilidad de que existan más proteínas de fusión asociadas a la exocitosis de la familia SNARE, como SNAP25 y SNAP23, que estén relacionadas a la capacidad de que la bacteria pueda invadir a la célula. Por lo anterior, es necesario complementar este trabajo con la evaluación de las mismas.

8.0 Conclusiones

I. *Brucella melitensis* es capaz de disminuir la expresión de la proteína Sintaxina 4 en macrófagos de la línea celular THP-1 durante eventos tempranos de la fagocitosis.

II. *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis aumenta la expresión del ARNm de la proteína Sintaxina 4 en macrófagos de la línea celular THP-1 a los 30 min postinfección.

III. La expresión del ARNm de Sintaxina 4 en macrófagos de la línea THP-1 diferenciados con VitD₃ no aumenta durante los primeros 60 min, por ende, es un inductor viable de la diferenciación en esta línea celular para ser utilizado en ensayos de expresión de esta proteína.

IV. La expresión del ARNm de Sintaxina 4 aumenta en macrófagos de la línea THP-1 al ser diferenciados con PMA durante los primeros 60 min, por ende, no se recomienda la utilización de este estímulo en ensayos de expresión de esta proteína en esta línea celular.

9.0 Prospectiva

Es necesario complementar este estudio con ensayos de silenciamiento de Sintaxina 4, para comprobar si la disminución de la expresión de la proteína inducida por *B. melitensis* es crítica para los fenómenos de internación y sobrevivencia de la bacteria. Además, se puede determinar si hay una alteración en la secreción de citocinas al llevar a cabo la infección en las células silenciadas y las no silenciadas. También, es necesario conocer si la expresión de la proteína es la misma en células infectadas con bacterias mutantes rugosas de *B. melitensis*.

Probablemente, *B. melitensis* puede modificar la expresión de otras proteínas de fusión de la familia SNARE asociadas a la exocitosis, como SNAP25; por ende, es pertinente llevar a cabo un estudio de las mismas, para determinar además si son necesarias para el proceso de invasión y sobrevivencia de la bacteria.

10.0 Bibliografía

1. World Health Organization. Brucellosis in Humans and Animals. WHO, FAO, OIE. 2006;1-89.
2. Furgier E, Pappas G, Gorvel JP. Virulence Factors in Brucellosis: Implications for Aetiopathogenesis and Treatment. *Expert Rev Mol Med*, 2007; 3:1-10.
3. Ebinger M, Cross P, Wallen R, White PJ, Treanor J. Simulating sterilization, vaccination, and test-and-remove as brucellosis control measures in bison. *Ecol Appl*. 2011; 21:2944–2959.
4. Brenner DJ, Krieg NR, George MG, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, Parte 3*. 2ª ed. USA: Springer, 2005.
5. Tsolis RM. Comparative genome analysis of the proteobacteria: Relationships between plant and animal pathogens and host specificity. *PNAS*. 2002;99:12503–12505.
6. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*. 2002;90:209–227.
7. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts International. *J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:2688–2693.
8. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58: 375–382.
9. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*. 2009, 10-352.
10. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010; 60:801-808.
11. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. [subido el 7 jul 12; consultado el 22 julio 12]. Disponible en el sitio red: <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>
12. Borgen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *Microbiol Rev*. 2012; 36: 533-562.

-
13. Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, *et al.* Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. From Frogs. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(10): 3753-3755.
14. Baldiwin CL, Goenka R. Host Immune Response to the Intracellular Bacteria *Brucella*: Does the Bacteria Instruct the Host to Facilitate Chronic Infection?. *Crit Rev Immunol.* 2006; 26:407-442.
15. El-Tras WF, Tayel AA, Eltholth MM, Guitian J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol.* 2010; 141: 321-325.
16. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1985; 35:292-295.
17. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croat Med J.* 2010; 51(4): 296–305.
18. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan AP, Staunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec.* 1999; 144(17): 483.
19. Pappas G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 (suppl 1): S8-S11.
20. Osterman B, Moriyón I. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56:1173-1175.
21. Fretin D, Fauconnier A, Köhler S, Halling S, Léonard S, *et al.* The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol.* 2005; 7:687–698.
22. Ferooz J, Letesson JJ. Morphological analysis of the sheathed flagellum of *Brucella melitensis*. *BMC Res Notes.* 2010; 3:333.
23. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta: Bioterrorism Agents/Diseases [consultado el 23 julio 12]. Disponible en el sitio red: <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
24. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(2): e12-5.
25. Kraniotis P, Marango M, Lekkou A, Romanos O, Solomou E. Brucellosis presenting as piriformis myositis: a case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5:125.
26. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:91-99.

-
- 27.** Boletín de las semanas epidemiológicas de la N° 1 a la N° 52. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades; 2011. [consultado el 23 julio 12] Disponible en el sitio red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010imagen/plantilla/indice-2011.htm>
- 28.** Información del boletín de la Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud Secretaria de Salud; 2010. [consultado el 23 julio 12] Disponible en el sitio red: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2011/ANUARIO S/I EPI DE MORBI 2010 V EJECUTIVA.pdf>
- 29.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Inventario de Ganado caprino; 2010 Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Alimentaria. [consultado el 30 de septiembre 12]. Disponible en el sitio red: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=251>
- 30.** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Dirección General de Salud Animal. Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo; 2011. [consultado el 30 septiembre 12]. Disponible en el sitio red: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=24085>
- 31.** Xolalpa CVM, Pérez RM, Córdova IA. Evaluación de las pérdidas económicas por eventos de falla reproductiva asociadas a brucelosis bovina en hembras y explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. Rev Cient FCV-LUZ. 2010; 20(2): 190-195.
- 32.** Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Brucelosis. Una revisión epidemiológica [consultado el 06 agosto 12]. Disponible en el sitio red: <http://www.consamexico.org.mx/mesa9BRUCELOSIS.%20UNA%20REVISI%C3%93N%20EPIDEMIOLOGICA.pdf>
- 33.** Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis- new aspects of an old disease. J Appl Microbiol. 2005; 98: 1270-1281.
- 34.** Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales
- 35.** Díaz E, Hernández L., Valero G, Arellano B. Diagnóstico de Brucelosis Animal, México D.F, INIFAP-SAGARPA. 2001
- 36.** Imaoka K, Kimura M, Suzuki M, Kamiyama T, Yamada A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn J Infect Dis. 2007; 60(2-3):137-9.
- 37.** Ling Yu W, Nielsen K. Review of Detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. Croat Med J. 2010; 51(4): 306–313.
- 38.** Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts a virulence factor. Curr Opin Microbiol. 2005; 8:60-66.

-
- 39.** Haag AF, Myka KK, Arnold M, Caro-Hernández P, Ferguson GP. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in *Brucella* Mammalian Infections. *Int J Microbiol.* 2010; 2010 (124509): 1-12.
- 40.** Rout B, Alvarez-Martinez MT, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, *et al.* Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5 and VirB8 specific antisera. *Infect Immun.* 2003; 71(3):1075-1082.
- 41.** Sieira R, Comerci DJ, Sánchez DO, 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(17):4849-55.
- 42.** Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol.* 2011; 13(8): 1261-1274.
- 43.** Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Res Microbiol.* 2006; 157: 93-98.
- 44.** Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AN, *et al.* Cyclic β -1,2-glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 2005; 6(6): 618-625.
- 45.** López-Goñi I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyón I, *et al.* Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol.* 2002; 90(1-4):329-39.
- 46.** Celli J, Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions endoplasmic reticulum. *J Exp Med.* 2003; 198(4): 545-556.
- 47.** Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 281-297.
- 48.** Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 93-9.
- 49.** Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and Intracellular Growth of *Brucella abortus* in Nonphagocytic Cells In Vitro. *Infect Immun.* 1990; 58(7): 2320-2328.
- 50.** Arenas GA, Grilli DJ, Samartino LE, Magadán J Mayorga LS. *Brucella* alters endocytic pathway in J774 macrophages. *Virulence* 2010; 1(5): 376-385.
- 51.** Braun V, Niedergang F. Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol Cell.* 2006; 98: 195-201.

-
- 52.** Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994; 41(3-4): 295-306.
- 53.** Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, *et al.* Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol.* 2004; 6(5); 435-445.
- 54.** Castañeda-Roldán EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino-Flores F, Rendón MA, *et al.* Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2006; 8(12); 1877-1887.
- 55.** Morales L, Mena A, Castañeda-Roldán EI, Serkin V, Peña R. Estudio bioinformático de la molécula proteica UgpB de las bacterias del género *Brucella*. *Internet Electron J Nanoc Moletrón.* 2007; 5(1); 921-940.
- 56.** Czibener C, Ugalde JE. Identification of a unique gene cluster of *Brucella* spp. That mediates adhesion to host cells. *Microbes Infect.* 2012;14:79-85.
- 57.** Arenas GN, Staskevich S, Avallay A, Mayorga L. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun.* 2000;68:4255-4263.
- 58.** Becker T, Volchuk A, Rothman JE. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774. *PNAS.* 2005; 102 (11): 4022-4026.
- 59.** Hackam DJ, Rotstein OD, Sjolín C, Schreiber AD, Trimble WS, *et al.* v-SNARE- dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 11691-11696.
- 60.** Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, *et al.* Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. *Cell.* 2002; 110: 119-131.
- 61.** Chen YA, Scheller RH, SNARE- Mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:98-105.
- 62.** Harbury PA. Springs and zippers: coiled coils in SNARE-mediated membrane fusion. *Structure.* 1998; 6(2): 1487-1491.
- 63.** Chieriegatti E, Meldolesi J. Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 181-187.
- 64.** Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. A Role for the Phagosome in Cytokine Secretion. *Science.* 2005; 310: 1492-1495.
- 65.** Pagan JK, Wylie FG, Joseph S, Widberg C, Bryant NJ, James DE, Stow JL. The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion. *Curr Biol.* 2003; 13(2): 156-60.

-
- 66.** Kay JG, Murray RZ, Pagan JK, Stow JL. Cytokine Secretion via Cholesterol-rich Lipid Raft-associated SNAREs at the Phagocytic Cup. *J Biol Chem.* 2006; 28(17):11949-11954
- 67.** Fratti RA, Chua J, Deretic V. Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *J Biol Chem.* 2002; 277 (19): 17320-17326.
- 68.** Paumet F, Wesolowski J, Garcia-Diaz A, Delevoye C, Aulner N, *et al.* Intracellular bacteria encode inhibitory SNARE-like proteins. *PLoS One.* 2009; 4(10):e7375.
- 69.** Celli J, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *PNAS.* 2005;102:1673–1678.
- 70.** Fugier E, Salcedo SP, Chastellier C, Pophillat M, Muller A, *et al.* The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and the Small GTPase Rab2 Are Crucial for *Brucella* Replication. *PLoS Pathog.* 2009; 5(6): 1-13.
- 71.** Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Puente JL, Suárez-Güemes F. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microb Pathog.* 2008;44:28-33.
- 72.** Alderman DJ, Smith P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture.* 2001; 196:3-4: 211-243.
- 73.** Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- 74.** Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): 2002 - 2007.
- 75.** Corvera S, Czech M. Mechanism of insulin action on membrane protein recycling: a selective decrease in the phosphorylation state of insulin-like growth factor II receptors in the cell surface membrane. *PNAS.* 1985; 82(21): 7314-7318.
- 76.** Bradford M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 1: 248-254.
- 77.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- 78.** Ortiz AR. Evaluación de la expresión de las proteínas Rab5 y Rab7 durante el tránsito vesicular de *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos THP-1. Tesis de maestría. D.F. México: FMVZ-UNAM, 2011.

-
- 79.** Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Leukoc Biol.* 1996; 59: 555-561.
- 80.** Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte M.K, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One.* 2010; 5; e8668.
- 81.** Kuo YT, Kuo CH, Lam KP, Chu YT, Wang WL, *et al.* Effects of vitamin D3 on expression of tumor necrosis factor-alpha and chemokines by monocytes. *J Food Sci.* 2010;75(6):H200-4.
- 82.** Castañeda-Ramírez A, Puente JL, González NA, Verdugo-Rodríguez. Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages. *Virulence.* 2012; 3(5): 1–6.
- 83.** Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckert A, Gross A, Alvarez-Martinez MT, *et al.* Major Outer Membrane Protein Omp25 of *Brucella suis* Is Involved in Inhibition of Tumor Necrosis Factor Alpha Production during Infection of Human Macrophages. *Infect Immun.* 2001; 69 (8): 4823–4830.
- 84.** Ribet D, Cossart P. Pathogen-mediated posttranslational modifications: A re-emerging field. *Cell.* 2010;143 (5): 694-702.
- 85.** Mañes S, del Real G, Martínez-A C. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(7):557-68.
- 86.** Lafont F, van der Goot FG. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol.* 2005; 7(5):613-20.
- 87.** Martín-Belmonte F, Millán J. Estructura y función de las balsas lipídicas (“rafts”) dominios ricos en esfingolípidos y colesterol. *Inmunología.* 2001; 20(4): 216-224.
- 88.** Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol.* 2002; 4(6): 341-55.
- 89.** Naroeni A, Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.* 2002; 70(3):1640-1644.
- 90.** Lang T. SNARE proteins and ‘membrane rafts’. *J Physiol.* 2007; 585(3):693-698.
- 91.** Coppolino MG, Kong C, Mohtashami M, Schreiber AD, Brumell JH, *et al.* Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 4772 - 4780.

-
- 92.** Wesolowski J, Paumet F. SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. *Virulence*. 2010; 1 (4): 319-324.
- 93.** Delevoye C, Nilges M, Dehoux P, Paumet F, Perrinet S, *et al.* SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog*. 2008; 4 (3):e1000022.
- 94.** Arasaki K, Roy CR. Legionella pneumophila Promotes Functional Interactions between Plasma Membrane Syntaxins and Sec22b. *Traffic*. 2010; 11(5): 587–600