



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**EFFECTO DEL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN
DE Sintaxina 4 SOBRE EL TRÁNSITO
INTRACELULAR DE *Brucella melitensis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

JULIA AIDE HERNÁNDEZ PINEDA

ASESORES: Dr. Alfredo Castañeda Ramírez
MVZ. Laura Patricia Noé Martínez



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.

DEDICATORIA

A Ezequiel por ser el motor de inicio y término de mi tesis, por enseñarme la importancia de que el éxito es compañero íntimo de la humildad, se que le hubiera encantado compartir esto conmigo hasta el final.

A Carmen por estar siempre en todos y cada uno de mis pasos, con paciencia y dedicación, por ser mi maestra, mi compañera, mi madre.

A mis hermanitas Sonia y Araceli, con mucho cariño para las mejores hermanas del mundo, por ser mi ejemplo a seguir, por su confianza, su apoyo y paciencia.

A Randy, por darme la confianza que me faltaba, por levantarme cada vez que me caí, por no juzgar jamás, por ser incondicional. No hubiera podido sin ti. Je t'aime.

A mi familia, por tener confianza en mí, esto también es por ustedes.

A todas las personas importantes en mi vida que de alguna manera siempre estuvieron ahí cuando más lo necesité.

AGRADECIMIENTOS

A Benjas, por tenerme tanta paciencia, escucharme, darme ánimos, por creer en mí, no podría haber sido igual sin ti.

A Masha, Alan, Eric, Andrés, Vane, Mike y Edgar, por hacerme reír tanto como alguien pueda imaginarse, contar con ustedes lo hizo más sencillo.

A Ana, Silvana, Melba, Gustavo y Martín por estar ahí desde hace mil años, porque siempre al término de una plática con ustedes regresaban mis ganas de seguir.

A mis compañeros y amigos Diana, Luis, Julia, Zulema, Julio, Xanthia, Lázaro y Francis por haber vivido esta experiencia conmigo, no pude haber encontrado un mejor equipo de trabajo.

A todos los integrantes del LMM, a los que tuve la oportunidad de conocer y a los que no tanto, por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Antonio Verdugo, por invitarme a trabajar en su laboratorio y haberme brindado la oportunidad de conocer un mundo tan maravilloso.

Al Dr. Alfredo Castañeda por haberme guiado en el curso del trabajo y sobre todo por su paciencia y sinceridad.

A la Dra. Patricia Noé, por sus correcciones y siempre atinados consejos, por enseñarme que lo importante es estar feliz con el resultado.

Al Dr. Daniel Martínez, por apoyarme con las correcciones de mi trabajo, por su paciencia, su tiempo y sus valiosos comentarios.

A mis sinodales, por su tiempo y correcciones para mejorar mi escrito.

A la Dra. Xochil Vega por su apoyo para poder concluir los ensayos de PCR-q, así mismo a la Dra. Elena Larrieta, por permitirme hacer uso del equipo de PCR-q en su laboratorio.

A las chicas de vacunología Claus, Nina y Moni por sus buenos deseos para la culminación de mi trabajo.

A las personas que por nervios o estrés no haya mencionado, gracias.

AGRADECIMIENTO POR EL APOYO FINANCIERO:

PAPIIT IN222907-3 . "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"

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 BRUCELOSIS	2
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA	3
1.3 PATOGENIA	4
1.4 FACTORES DE PATOGENICIDAD	6
1.5 TRÁNSITO INTRACELULAR	11
Proteínas receptoras asociadas al factor soluble sensible a la N-etilmaleimida	16
(<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>).....	16
1.7 ARN DE INTERFERENCIA.....	18
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 CEPAS BACTERIANAS Y LÍNEA CELULAR	27
5.2 DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A MACRÓFAGOS	28
5.3 BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4	29
5.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN	31
5.3.2 TRANSCRIPTASA REVERSA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	32
5.3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR. PUNTO FINAL	33
5.3.4 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ARNm de Sintaxina 4 Y G3PDH.....	35
5.3.5 RT-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA PCR-Q.....	36

5.3.6 OPTIMIZACIÓN DE INICIADORES DE Sintaxina 4 y G3PDH. CURVAS DE EFICIENCIA PARA Sintaxina 4 Y PARA G3PDH.....	37
5.4 DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4 MEDIANTE RT-PCRQ EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON <i>siRNA</i> DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4.....	38
5.5 DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4 MEDIANTE WESTERN BLOT EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON <i>siRNA</i> DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4.....	39
5.5.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	41
5.5.2 TRANSFERENCIA EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA.....	41
5.5.3 INMUNODETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-Sintaxina 4.....	42
5.5.4 INMUNODETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI <i>BETA-ACTINA</i>	42
5.6 ENSAYO DE INFECCIÓN EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON <i>siRNA</i> DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4 CON <i>Brucella melitensis</i> Bm133 Y <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis.....	43
5.7 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA A GENTAMICINA EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON <i>siRNA</i> DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4 E INFECTADAS CON <i>Brucella melitensis</i> cepa 133 Y CON <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis.....	44
6. RESULTADOS	45
6.1 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ARNm PARA Sintaxina 4 Y G3PDH.....	45
6.2 ENSAYO DE EFICIENCIA DE CDNA CON LOS PRIMERS DE Sintaxina 4 Y G3PDH PARA PCRQ.....	46
6.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4.....	48
6.3.1 ENSAYO PARA DETERMINAR EL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.....	51

6.3.2 ENSAYO PARA DETERMINAR EL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN MEDIANTE WESTERNBLOT PARA SINTAXINA 4.....	53
6.3.3 ENSAYO DE WESTERN BLOT PARA <i>BETA</i> ACTINA UTILIZADO COMO CONTROL DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS SILENCIADAS	55
6.4 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA De <i>Brucella melitensis</i> EN MACRÓFAGOS THP-1 TRATADOS CON <i>siRNA</i> PARA Sintaxina 4	56
6.5 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA De <i>Salmonella enterica</i> serovariedad Enteritidis EN MACRÓFAGOS THP-1 TRATADOS CON <i>siRNA</i> PARA Sintaxina 4	58
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
7. DISCUSIÓN.....	63
8. CONCLUSIONES	69
9. PROSPECTIVAS	70
10. LITERATURA CITADA	71

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	<u>PÁGINA</u>
FIGURA 1.....	12
FIGURA 2.....	21
FIGURA 3.....	26
FIGURA 4.....	26
FIGURA 5.....	27
FIGURA 6.....	29
FIGURA 7.....	34
FIGURA 8.....	35
FIGURA 9.....	36
FIGURA 10.....	39
FIGURA 11.....	45
FIGURA 12.....	47
FIGURA 13.....	48
FIGURA 14.....	49
FIGURA 15.....	50
FIGURA 16.....	52
FIGURA 17.....	53
FIGURA 18.....	54
FIGURA 19.....	55
FIGURA 20.....	57
FIGURA 21.....	59
FIGURA 22.....	61
CUADRO 1.....	32
CUADRO 2.....	33
CUADRO 3.....	38
CUADRO 4.....	41

RESUMEN

Hernández Pineda Julia Aide. “**Efecto del bloqueo de la expresión de Sintaxina 4 sobre el tránsito intracelular de *Brucella melitensis***”. Bajo la supervisión del Dr. Alfredo Castañeda Ramírez y de la MVZ. Laura Patricia Noé Martínez.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, Sintaxina 4, *siRNA*, sobrevivencia.

La brucelosis es una importante zoonosis causada por varias especies del género *Brucella*. En los humanos, la especie más frecuentemente involucrada es *Brucella melitensis*, cuyo tránsito intracelular aún tiene varias interrogantes con relación a su sobrevivencia y a sus interacciones intracelulares. El complejo de proteínas SNARE formado por Sintaxina4-VAMP3-SNAP25 necesita encontrarse en concentraciones y conformaciones adecuadas para cumplir su función en la membrana del macrófago, de tal forma si se interfiere con alguna de estas características pueden verse afectados los eventos de tránsito.

En este trabajo se inhibió en 82 % la expresión del mRNA de Sintaxina 4, mediante *siRNA*, en macrófagos THP-1 diferenciados con vitamina D3. Los resultados obtenidos en la cinética de silenciamiento, indican que el momento de máxima inhibición de la proteína Sintaxina 4 se encuentra alrededor de las 20 h, lo cual fue corroborado mediante PCR-Q y Western blot.

Las células silenciadas fueron infectadas con *B. melitensis* cepa Bm133 y sometidas a ensayos de sobrevivencia con protección a gentamicina. A partir del conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se determinó que el bloqueo de la expresión de Sintaxina 4 en células THP-1, reduce significativamente la invasión de *B. melitensis* dentro del macrófago, sugiriendo la participación de Sintaxina 4 en el proceso de invasión de la bacteria.

Nuestros resultados permiten profundizar en el conocimiento de los complejos mecanismos promovidos por la bacteria para su internación, sin embargo aún no podemos descartar la participación de otras proteínas del complejo Sintaxina4-SNAP25-VAMP3 actuando de forma individual o en conjunto.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 BRUCELOSIS

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos, incluido el hombre, y es una de las principales zoonosis a nivel mundial¹. Estudios recientes también han demostrado la infección natural en peces².

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella* spp., las cuales se encuentran clasificadas como parte de la subdivisión Alfa-2 de las Proteobacterias, junto con otras bacterias que se comportan como simbiosis o parásitos intracelulares³.

El género se conforma por las especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*, en mamíferos terrestres, y dos especies aisladas de mamíferos marinos *B. pinnipedialis* y *B. ceti*^{4 5}. Además de la especie *B. microti*⁶, aislada de roedores de campo y del zorro rojo de la pradera. En 2009 se propuso una nueva especie, *B. inopinata* a partir de un implante mamario⁷

Brucella melitensis es la especie que origina los cuadros clínicos más severos en humanos, caracterizados por bacteremia, mialgias y fiebre aguda, razón por la cual se le adjudica la sinonimia de Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo o Fiebre ondulante¹. En México, 93% de casos de brucelosis humana, son causados por *B. melitensis* proveniente de cabras y alrededor del 5 % son de origen bovino.⁸

Los hospederos preferenciales de *B. melitensis* son caprinos y ovinos, y aunque la enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo, es particularmente común en países

del litoral del mar Mediterráneo, de la Península Arábiga, Asia central y de algunas regiones de América Latina ^{11,9}.

La principal ruta de infecciones humanas es a través del consumo de leche y derivados lácteos contaminados, así como el contacto directo con rumiantes infectados.

Para varios países, México entre ellos, la brucelosis representa un factor importante en pérdidas económicas, debido a que produce infertilidad en machos, así como aborto y baja en la producción en especies productivas del sector pecuario.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA

Las bacterias del género *Brucella* spp. presentan morfología de bacilos cortos, Gram negativos, no móviles, no esporulados y sin cápsula. Son microorganismos aerobios, aunque algunas especies se desarrollan mejor con bajas tensiones de CO₂; su metabolismo es de tipo oxidativo, poseen oxidasa, catalasa, ureasa y reducen nitratos a nitritos¹¹.

La membrana externa de estos microorganismos se compone de fosfolípidos, proteínas y el lipopolisacárido (LPS), actuando en conjunto como barrera reguladora de nutrientes hacia el interior del microorganismo; la membrana externa así como el LPS son estructuras altamente inmunogénicas¹⁰. La membrana de *Brucella* spp. presenta algunas diferencias con la membrana externa de las enterobacterias, ya que es relativamente permeable a agentes hidrofóbicos como colorantes, detergentes y sales biliares, estas características también son diferentes entre especies y biotipos del mismo género. En la membrana externa puede encontrarse fosfatidil-colina no presente en otras enterobacterias¹¹.

El LPS consta de una parte glucolipídica (lípidio A), insertada en la membrana externa y otra parte polisacáridica en el exterior, ésta a su vez se divide en un núcleo y la cadena O. La cadena O determina si las cepas son lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*) donde la cadena O se encuentra presente, o rugosas (*B. ovis*, *B. canis*), las cuales no poseen la cadena, o la presentan en menor proporción ¹¹.

El lípidio A de *Brucella* sp. es químicamente distinto al de otras enterobacterias y está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con b-hidroxiácidos y otros ácidos de cadena larga, dichas características le confieren una actividad menos endotóxica que el LPS de las enterobacterias¹¹.

1.3 PATOGENIA

La brucelosis humana ocasionada por *B. melitensis* se transmite por contacto directo con el microorganismo, al ingerir productos contaminados, principalmente lácteos, o por el manejo de tejidos y líquidos de animales infectados, también se han descrito a las soluciones de continuidad, a la inhalación y a los insectos a manera de vector, como un mecanismo de transmisión¹².

En caprinos la enfermedad se transmite principalmente por contacto directo, a través de secreciones vaginales, fetos, leche, orina y heces. Generalmente la cabra se infecta vía digestiva mediante la ingestión de algún producto contaminado, sin embargo existe también la vía de contagio genital. Después de la exposición inicial, los microorganismos son fagocitados primordialmente por macrófagos, y transportados vía linfática hacia bazo, hígado, articulaciones y útero en cabras gestantes.¹³.

Los microorganismos del género *Brucella* poseen un alto tropismo por los órganos reproductivos, en las vacas lo anterior se encuentra asociado a la gestación y a la producción de eritritol, un compuesto natural de útero y al cual la bacteria muestra afinidad, de ahí que el cuadro clínico se asocia con aborto, retención placentaria, metritis e infertilidad¹⁴.

La principal signología en hembras es el aborto tardío, cuando éste se presenta con retención placentaria puede ocasionar infertilidad. En los machos la patogénesis es muy parecida a la de las hembras, pero los órganos afines son las vesículas seminales y los testículos, provocando orquitis.^{12,13}.

En casos de brucelosis crónica pueden observarse, debido a la bacteremia persistente, lesiones osteoarticulares, higromas y granulomas^{12,13}.

En humanos los síntomas suelen ser inespecíficos y consisten en malestar general, escalofríos, sudoración, astenia, mialgias y como un denominador común se manifiesta fiebre, la cual puede ser intermitente¹³.

El ingreso de la bacteria al organismo se inicia con una respuesta inmune innata. *Brucella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de los neutrófilos para así ser transportada a los tejidos linfoides, a través de mecanismos que promueven la resistencia a la degranulación de los mismos. El ingreso de la bacteria a los macrófagos se suscita a través de la unión con la molécula CD14 y el LPS, dicha interacción induce la producción de IL-2, la cual estimula a células NK y linfocitos T colaboradores CD4+, predominando una respuesta mediada por LTH1 de tipo celular la cual tiene una participación fundamental en el control de microorganismos intracelulares, a través de la activación de IL2, 3, 6, 12, TNF *alpha* (TNF- α) e INF *gamma*,

este último esencial para la activación de macrófagos. Los macrófagos tienen la capacidad de destruir a la bacteria, sin embargo *Brucella* es capaz de inhibir los mecanismos de destrucción promovidos por el macrófago¹⁵.

1.4 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Un importante factor de virulencia es el LPS antes mencionado, el cual tiene un papel relevante en la sobrevivencia intracelular de la bacteria¹⁶. *Brucella* expresa un LPS no convencional y que en adición a su baja endotoxicidad, protege a la bacteria de péptidos catiónicos antimicrobianos, así como de la fijación de complemento¹⁷. Se ha propuesto que la cadena O del LPS de *B. melitensis* es determinante en su patogenicidad y que, junto con algunas proteínas de la membrana externa, es responsable del bloqueo de la actividad bactericida del suero y participa en la evasión de su destrucción por las células fagocitarias, esto le permite a la bacteria sobrevivir dentro de fagocitos mononucleares y polimorfonucleares¹⁸. En estudios realizados con el LPS de *B. suis*, en los cuales se alteró la cadena O, se demostró que la bacteria es capaz de invadir a los macrófagos vía balsas lipídicas o *lipid rafts* y se fusiona rápidamente con los lisosomas¹⁹.

El mecanismo por el cual la cadena O del LPS asegura la evasión de la fusión con los lisosomas podría determinar un modo de supervivencia permisiva de entrada de la bacteria a través de interacciones con receptores localizados en las balsas lipídicas y modificar las propiedades fusogénicas de la membrana de las vesículas que contienen *Brucella* a través de un mecanismo de entrada y salida de la misma²⁰.

El LPS de *Brucella*, se ha descrito como una forma no clásica o no convencional de LPS, considerando que en una forma convencional, el lípido A del lipopolisacárido posee en su estructura glucosamina, éster y aminas C14:0(3-OH) y C12 a C16 grupos de acilociacil; en tanto, el LPS de *Brucella* presenta diaminoglucosa, éster, ácidos grasos 3-OH y C28:0(27-OH) y C23:0(29-OH) en los grupos acilociacil. Se ha descrito que la secreción de TNF α en *B. abortus* es menor en comparación con bacterias con LPS clásico, como *E. coli*, lo anterior es consistente con la reducida endotoxicidad promovida por las bacterias del género *Brucella*.²¹

La evasión de la fusión fagolisosomal dependiente de LPS es transitoria e insuficiente para asegurar la supervivencia a largo plazo de *Brucella*, por lo cual la bacteria requiere de otros factores de patogenicidad para completar su ciclo intracelular²⁰.

Además del LPS, se han descrito otros mecanismos de virulencia tales como la producción de glucanos cíclicos, moléculas que son secretadas al espacio periplásmico en condiciones de baja osmolaridad, actuando como osmoreguladores, lo que hace suponer que este componente no es necesariamente un factor de virulencia, sin embargo, estudios de Arellano-Reynoso et al. indican que mutaciones en los genes *cgs* y *cgt* involucrados en la síntesis y secreción de los β -glucanos cíclicos, presentan una reducción de la virulencia en ratones, así mismo la sobrevivencia intracelular de *B. abortus* se vio disminuida, ya que las mutantes fueron incapaces de evadir la fusión fagolisosomal, lo que indica que este compuesto es necesario para que se lleve a cabo el tránsito intracelular de la bacteria^{22,23}

Al parecer, la función de este componente en la sobrevivencia intracelular de la bacteria reside en la habilidad de los glucanos de extraer el colesterol de las membranas de células eucarióticas, esto supone que los β -glucanos cíclicos son secretados intracelularmente por

Brucella y extraen el colesterol de las balsas lipídicas presentes en la membrana del fagosoma. Así mismo, también interfieren con la maduración de la Vacuola que Contiene *Brucella* (VCB), lo que trae como consecuencia la evasión de la fusión con el lisosoma²⁰.

Es sabido que el hierro es un nutrimento esencial para la sobrevivencia de los organismos; una de la estrategias desarrolladas por *Brucella* sp. es la capacidad de adquirir hierro bajo condiciones limitantes a través de la síntesis de sideróforos, esto contribuye al establecimiento y a la infección exitosa por parte de la bacteria. Bajo condiciones de ausencia de hierro, *B. abortus* secreta dos sideróforos, el ácido 2,3-dihydroxybenzoico (2,3-DHBA) y la brucebactina, los cuales son regulados por el gen *irr*, implicado en la resistencia al estrés oxidativo.²⁴

Dentro de los genes involucrados en la adaptación de *Brucella* a condiciones de estrés dentro de la célula hospedadora, se encuentran los operones *ure1* y *ure2*, el primero codifica los genes *ureDABCEFG* y el segundo *ureABCEFGDT*. Las ureasas bacterianas permiten neutralizar condiciones ácidas y proveer una fuente asimilable de nitrógeno. El operón *ure2* codifica genes para el transporte de urea y níquel relacionados tanto con actividad de ureasa como en la resistencia de las condiciones ácidas presentes en la ruta oral de infección.²⁵

Dentro de los mecanismos de dos componentes, en *Brucella* sp. se han descrito alrededor de doce, de éstos, cinco ya han sido bien caracterizados. El primero FeuP/FeuQ, similar al de *Rhizobium leguminosarum*, involucrado en la regulación de hierro; NtrB/NtrC, involucrado en la regulación del metabolismo del nitrógeno; un sistema llamado LOV-HK, el cual interviene en la maduración de la vacuola que contiene a *Brucella* y el tránsito intracelular, actuando en respuesta a estímulos luminosos para regular genes relacionados con la virulencia de la

bacteria. Estudios recientes demuestran que mutantes de *B. abortus* carentes de LOV-HK, redujeron su virulencia en macrófagos murinos J774^{26,27}.

El sistema codificado por el operón *BMEI0066*, *cenR* y *BMEI0067*, que codifican a su vez una subunidad reguladora de proteína cinasa dependiente de cAMP, se encuentra relacionado a resistencia de estrés, como un pH bajo, condiciones hipertónicas y altas temperaturas (42°C)²⁶ y el cual ha sido relacionado con la internalización de *Brucella melitensis* dentro de células HeLa²⁸.

Finalmente, el más estudiado de los sistemas de dos componentes, es el llamado *BvrS/BvrR*: Proteínas relacionadas a virulencia de *Brucella*: Sensora/Reguladora (*Brucella virulence related proteins: Sensory/Regulatory*). Este sistema está compuesto por una proteína Sensora y otra Reguladora que se han relacionado con la virulencia de *Brucella*. Al parecer este sistema le permite a la bacteria regular la expresión de sus genes de virulencia durante la invasión. El sistema es similar al descrito en otras bacterias tales como *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*, necesario para la endosimbiosis y la patogenicidad en plantas. Mutaciones en los genes *BvrS* o *BvrR* impiden la invasión de *Brucella abortus* en células no fagocíticas, afectando el tráfico intracelular y la virulencia. También le permite a *Brucella* mantener la integridad de la membrana externa y de la interfase para la invasión celular, así como adquirir la estructura necesaria para el parasitismo intracelular²⁹.

Estadios iniciales de la maduración de BCV involucran la acidificación de la vesícula³⁰, seguido de la adquisición de marcadores tardíos en el tránsito como LAMP-1: Glicoproteína de membrana 1 asociada a lisosomas (*lysosomal.associated membrane glycoprotein-1*) en la membrana de la vacuola^{31,32}. La acidificación es esencial para la sobrevivencia intracelular de

Brucella y es requerida para la expresión intracelular de *virB*¹⁸, que codifica un sistema de secreción tipo IV (T4SS)²³, del cual recientemente se describieron en *B. abortus* algunas de las moléculas efectoras relacionadas en la translocación de proteínas hacia el citoplasma de la célula hospedadora; estudios de Machesini y col., demostraron que al menos cuatro proteínas, BPE043, BPE005, BPE275 y BPE123 requieren de un T4SS íntegro en *B. abortus*, lo que indica que la secreción es regulada por el sistema *virB*. Ensayos de infección en ratones demostraron que la proteína BPE123 no es requerida para la colonización de la bacteria en bazo, por otra parte en ensayos con macrófagos murinos J774 se observó que la proteína tampoco juega un papel esencial en el establecimiento y mantenimiento de la vacuola que soporta la multiplicación de la bacteria³³.

El sistema de secreción tipo IV (*virB*), no es requerido en los estadios tempranos de la sobrevivencia, como sucede con el LPS o los β -glucanos cíclicos, pero resulta indispensable en los eventos de maduración y fusión de las vesículas con el retículo endoplásmico (RE)³¹.

Algunas bacterias patógenas como *A. tumefaciens*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* y *Bartonella* spp., utilizan el sistema de secreción tipo IV para secretar moléculas efectoras, las cuales pueden ser proteínas o complejos nucleoproteicos²⁹. En *Brucella* posiblemente se involucra en el control de la dinámica y fusión de las vesículas hacia el RE²⁰.

Los mecanismos anteriores se han asociado a la habilidad de la bacteria para invadir, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas profesionales y no profesionales.

1.5 TRÁNSITO INTRACELULAR

En una célula procariótica toda la alimentación y comunicación tiene lugar a través de la membrana plasmática. Las células eucarióticas han desarrollado un complejo sistema de membranas internas que les permite captar las macromoléculas mediante la endocitosis y ponerlas en contacto con enzimas digestivas que se almacenan directamente en los lisosomas³⁴.

La vía endocítica le proporciona a las células eucariotas un sistema de regulación de la digestión de macromoléculas. La vía biosintética secretora permite a las células modificar las moléculas que produce en una serie de etapas, almacenarlas hasta que son necesarias y liberarlas en el exterior a través de dominios específicos en la superficie celular mediante el proceso de exocitosis³⁵. La vía biosintética secretora se dirige hacia el exterior desde el RE hacia el complejo de Golgi, con una desviación hacia los lisosomas, mientras que la ruta endocítica se dirige hacia el interior desde la membrana plasmática³⁵.

Las especies del género *Brucella* se comportan como patógenos intracelulares-extracelulares facultativos, utilizando a los macrófagos como las células que les proporcionan un nicho ecológico apto para sobrevivir, sin embargo, son capaces de infectar células no fagocitarias³⁶. El hecho de comportarse como patógenos intracelulares es esencial en el desarrollo de la enfermedad, ya que la capacidad de la bacteria de evadir su destrucción por la célula fagocitaria y establecerse en compartimientos asociados al RE, en el cual sitúa sus nichos de multiplicación, le permite a ésta diseminarse y permanecer por largos periodos en sus hospederos.

Se han descrito varios modelos de tránsito intracelular para *Brucella*, el primero de ellos es descrito por Gorvel y col. realizado con *B. abortus* en fagocitos no profesionales, mismo que señala que el ingreso de la bacteria tiene lugar a través de balsas lipídicas, mediante receptores tipo Toll 4 para LPS en la membrana celular; posteriormente la vacuola que contiene *Brucella* (VCB) establece interacciones con endosomas tempranos lo que le permite adquirir marcadores tempranos de fagocitosis tales como Rab5, EEA-1 y transferrina,³⁷ durante la etapa temprana de la infección la cual no sobrepasa los 30 minutos posteriores a la entrada del microorganismo. Alrededor de la primera hora posterior a la infección se pueden detectar marcadores secundarios como LAMP-1, pero no se adquieren Rab 7 ni manosa 6-fosfato, permitiendo a la VCB desviar su ruta para evadir la fusión con los lisosomas. En la última etapa la VCB adquiere proteínas características de RE a través de la interacción con éste, caracterizándose por la presencia de calnexina y calreticulina, y convirtiéndose en un nicho de replicación para la bacteria.^{38,39}

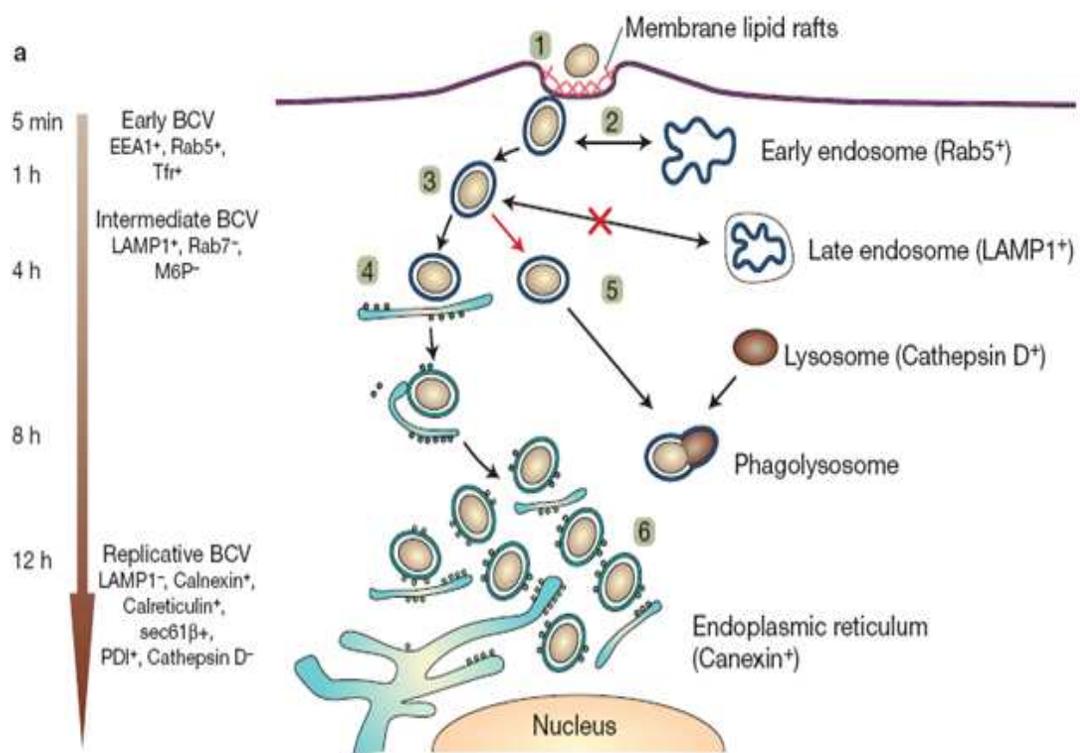


Figura 1. Modelo del tránsito intracelular de *Brucella* spp. Fugier E. y col 2007.

Otro modelo de tránsito intracelular de *Brucella* spp es propuesto por Starr T y col en macrófagos, el cual propone la presencia de marcadores endosomales tardíos en las primeras etapas de la infección. En este modelo se describe que la VCB interactúan tanto con endosomas tempranos como con endosomas tardíos, formando VCB tempranas y tardías respectivamente, estas últimas podrían seguir una de dos rutas, fusionar con los lisosomas destruyendo a la bacteria o fusionar con vesículas provenientes del retículo endoplásmico adquiriendo marcadores de este organelo, para que posteriormente las vacuolas fusionen con éste y se establezca el nicho de replicación para *Brucella* sp. En este estudio con *B. abortus* en células HeLA se demostró que mutaciones en el sistema *virB* no permitieron a las vacuolas limitar su interacción con lisosomas, formando así vesículas con características bactericidas⁴⁰.

La fusión de cada vesícula de transporte que emerge de un compartimento se realiza de manera específica. La naturaleza de la membrana delimita la especificidad; marcadores moleculares expuestos en la superficie citosólica de la membrana actúan como guía para el tráfico de entrada y aseguran que las vesículas de transporte sólo se fusionen con el compartimento adecuado, dictando por lo tanto el patrón de tráfico entre un compartimento y otro^{35,41}.

La mayoría de las vesículas de transporte se forman a partir de regiones especializadas de las membranas y emergen como vesículas revestidas. La cubierta tiene dos funciones principales, la primera es concentrar determinadas proteínas en la membrana en una región específica de la misma a partir de la cual se formará la membrana de la vesícula y le permita seleccionar las proteínas adecuadas para el transporte; la segunda, es el ensamblaje de las proteínas de cubierta³⁴.

Existen tres tipos de vesículas revestidas: de clatrina, COP I y COP II. Las vesículas revestidas de COPI y COPII transportan material en las etapas iniciales de las vías de secreción, las de COPII se forman en el RE y las revestidas de COPI se forman a partir de los compartimientos anteriores al complejo de Golgi y desde las propias cisternas del mismo ^{20,41}.

El mecanismo central de revestimiento y exportación de moléculas en las vesículas desde el RE, se lleva a cabo a través de una GTPasa monomérica llamada Sar-1, la cual es activa mientras se encuentra unida a GTP, mientras que unida a GDP es inactiva y la cual recluta a COPII⁴¹ para revestir la membrana de la vesícula. Por otro lado, el tránsito de vesículas de regreso del RE es controlado por otra GTPasa Arf, la cual se relaciona con el complejo de proteínas de revestimiento COPI ⁴².

Hallazgos de Celli et al.,⁴³ sugieren que *Brucella* toma una ruta directa hacia el RE y esto muestra una interferencia con el complejo Arf/COPI, mismo que no tiene efecto sobre la habilidad de la bacteria para ganar acceso al RE.

Las vesículas revestidas de COPII en RE son importantes para la fusión de las VCB. Dicha fusión con las membrana blanco involucra procesos de interacción proteína-proteína entre diferentes *SNARE* (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Estudios recientes señalan que las cubiertas COPII pueden interactuar con las proteínas SNARE dentro de vesículas revestidas derivadas del RE ^{44,45}.

La fagocitosis, proceso de captura y remoción de partículas relativamente grandes que se lleva dentro de vacuolas³⁷, es uno de los principales mecanismos de defensa del organismo, pero puede ser utilizada como vía de entrada de microorganismos patógenos⁴⁶. Murray y col. demostraron que las proteínas VAMP3 y Syntaxina 4, participan activamente en la secreción

del factor de necrosis TNF- α , que ocurre en las balsas lipídicas donde también se llevan a cabo eventos de fagocitosis⁴⁷. Estas son dos proteínas de tipo SNARE que participan en el tráfico intracelular de vesículas de secreción⁴⁸.

Experimentos de Caron et al, demostraron que la vía que involucra la síntesis de TNF α es bloqueada en etapas tempranas del proceso de activación inducido, durante la interacción de la bacteria con la célula hospedadora, debido de una proteína con actividad de proteasa de 45 kDa codificada por un factor supresor específico para la expresión de TNF- α en macrófagos, la cual participa en la resistencia de *Brucella* spp. frente a los mecanismos de defensa del hospedador.⁴⁹

Esta fusión de vacuolas de secreción con fagosomas nacientes, que va acompañada de la liberación de citocinas, permite que haya una conexión entre una ruta fagocítica con una secretoria. Este aspecto resulta importante en la patogénesis intracelular de la brucelosis, pues se ha visto que la alteración del tránsito de vacuolas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi afecta la sobrevivencia intracelular de *Brucella*⁵⁰, lo cual sugiere que la modificación de la actividad de las proteínas mediadoras de la secreción o de la fagocitosis se encuentra relacionada al establecimiento de este microorganismo. Murray y col.⁴⁸, encontraron que la secreción del TNF- α es un evento que está asociado con la fagocitosis de microorganismos donde se acopla la endocitosis con la exocitosis, dos eventos cruciales para la defensa del hospedero. En este proceso de secreción, acoplado a la fagocitosis, VAMP3 (v-SNARE) está presente en las vesículas de secreción, mientras que Sintaxina 4 y SNAP25 (t-SNARE) se encuentran en la membrana celular^{48,51}. Los eventos de reconocimiento y fusión en los que participan estas proteínas son fundamentales para que los dos procesos acoplados se realicen con éxito^{52,53}.

1.6 SNARE

Proteínas receptoras asociadas al factor soluble sensible a la N-etilmaleimida

(Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)

Los eventos de fusión de vesículas involucran pasos perfectamente coordinados. Antes de la fusión, la vesícula es transportada hacia su blanco específico en la membrana y unida o anclada a su receptor⁵⁴.

Las proteínas *SNARE* se encuentran implicadas en los eventos de tráfico donde se ve involucrada la fusión de membranas. Se han descubierto alrededor de 30 proteínas pertenecientes a esta familia en células de mamífero y cada una ha sido encontrada en distintos compartimentos subcelulares⁵⁴.

Inicialmente las *SNARE*s se clasificaban como v-*SNARE* (*vesicle-SNARE*) y t-*SNARE* (*target-SNARE*), de acuerdo a la localización de la proteína, sin embargo, han sido reclasificadas como R-*SNARE* (*arginine-containing SNARE*) y Q-*SNARE* (*glutamine-containing SNARE*), de acuerdo a la identidad del residuo más conservado de aminoácidos que posean⁵⁴. Dentro de las v-*SNARE* se encuentran las *synaptobrevinas* VAMP (*vesicle-associated protein*) y para las t-*SNARE* se conocen las *Sintaxinas* (*synaptic proteins syntaxin*) y SNAP (*synaptosome-associated protein*)^{54,55}.

Anteriormente se postulaba que interacciones específicas entre v-*SNARE* y t-*SNARE* conferían especificidad sobre el tráfico intracelular de membranas, actualmente se conoce que GTPasas de la familia Rab juegan un papel importante para determinar la especificidad en el transporte vesicular ⁵⁴.

Estas proteínas tienden a formar complejos altamente estables, resistentes a la desnaturalización con SDS, digestión con proteasas y al corte con neurotoxina clostridial, así como a temperaturas mayores a 90°C⁵⁶.

El complejo se compone a partir de una cola proporcionada por Syntaxina, una de VAMP y dos más de SNAP, unidas en una estructura de 4 colas a manera de hélice^{54,57}.

Una vez que se da la unión de las *v-SNARE* con las *t-SNARE* en su blanco, se da la subsecuente disociación del complejo SNARE por medio de la activación de una ATPasa de NSF (*N-ethyl-maleimide*) durante la fusión de membranas, permitiendo que las proteínas puedan ser reutilizadas⁵⁷.

El complejo que forman las proteínas VAMP3-Syntaxina4–SNAP25 se encuentra bajo la influencia de la concentración de estas proteínas en las membranas que se van a fusionar, así como en la adquisición de las conformaciones necesarias para cumplir esa función, de tal forma que si se interfiere en alguna de esas características se pueden ver afectados los eventos de tránsito. En estudios recientes se encontró que al bloquear la expresión de la GTPasa Sar 1, la cual se involucra en el movimiento de vesículas del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi, se inhibe la multiplicación de *B. abortus*⁴³.

1.7 ARN DE INTERFERENCIA

Durante las últimas décadas se ha incrementado el conocimiento del papel del ARN en la expresión de la regulación genética. Un evento recientemente descrito es el ARN de interferencia (*RNAi*), la comprensión de los procesos que lo involucran, incluye discernir la función de la expresión en gran cantidad de genes⁵⁸.

El ARN de interferencia ha sido considerado como uno de los mecanismos post-transcripcionales más representativos del silenciamiento de genes, inicialmente descrito en el gusano *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila*, así como en algunas plantas⁵⁹.

Se han descrito tres principales categorías de moléculas de ARN de interferencia en células eucariotas: interferencia corta de ARN (*short interfering RNA (siRNA)*), micro ARN (*microRNA (miRNA)*), y ARN en interacción con Piwi (*piwi-interacting RNA (piRNA)*). De estas moléculas, *siRNA* y *miRNA* son las mejor caracterizadas filogénica y fisiológicamente, utilizando como motor principal de su maquinaria a proteínas de la familia Argonauta, mientras que los *piRNA* utilizan proteínas de la familia Piwi.^{59, 60}

Las moléculas de *miRNA* con una longitud aproximada de 70 nucleótidos (nt), han sido descritas como reguladoras de genes endógenos, mientras que los *siRNA*, moléculas más cortas de entre 23 y 25 nt, se han estudiado como un mecanismo de defensa para la integridad del genoma en respuesta a ácidos nucleicos exógenos como virus y transposones, sin embargo ambos ARN de interferencia convergen en un mecanismo común denominado RISC Complejo de Silenciamiento inducido por ARN (del inglés *RNA Induced Silencing Complex*)^{59,61}

Short interfering RNA (siRNA)

El fenómeno de interferencia por siRNA está basado en ARN de doble cadena (*double-stranded* ARN o *dsARN*), el cual es procesado por la enzima Dicer en el citoplasma para generar moléculas cortas de ARN de interferencia (*short interfering ARN* o *siRNA*), cuyo tamaño de la cadena varía de 21 a 25 nt, dependiendo de la especie^{62,63}.

Las moléculas de *siRNA* son transportadas hacia *RISC* por medio de enzimas de la familia de las Argonautas, principalmente Ago2, donde se selecciona únicamente la cadena antisentido de ARN con dirección 5' a 3', misma que es reconocida mediante la hibridación del segmento específico de ARN mensajero y se inicia la degradación del mismo por medio de endonucleasas y exonucleasas, lo cual tendrá por resultado la interferencia en la traducción del segmento de ARN hacia proteínas^{59, 62, 63}.

Las tres moléculas esenciales para el proceso de silenciamiento por ARN incluyen a las proteínas Dicer, las cuales son RNAasas tipo III que tienen la función de fragmentar dobles cadenas de ARN largas en moléculas de 23 nt; a las proteínas de la familia de las Argonautas (*Ago*) encargadas de direccionar las dobles cadenas hacia su procesamiento y por último se incluyen las secuencias derivadas de ARN de 21-a 23 nt las cuales pueden ser originalmente *miRNA* fragmentado o directamente *siRNA*^{60, 61}.

La enzima Dicer quien se encarga de realizar los cortes de las moléculas de ARN para poder continuar el proceso de interferencia, presenta varios dominios específicos, uno para la ATPasa DEXD/H, uno para DUF283, uno para PAZ, dos para ARNasa tipo III y uno más para ARN de doble cadena (dsRNA-binding domain (dsRBD)). De los dominios mencionados, son

los dominios PAZ y los de ARNasa III, quienes tienen un papel central en el corte de las moléculas de ARN. El dominio PAZ está presente tanto en Dicer como en las proteínas de la familia Argonauta, especializadas en reconocer ARN de doble cadena con 3 nucleótidos libres al final de la cadena (característica de *siRNA*). La doble cadena de ARN, producto del corte de Dicer, ingresa a *RISC* para formar una asociación estable con sólo una de las cadenas de ARN la cual se encuentra anclada con proteínas efectoras de Ago⁶¹.

Las proteínas Argonauta se encuentran definidas por la presencia de cuatro dominios: PAZ (el cual comparte con Dicer), PIWI únicos para estas proteínas, N y Mid. Se ha demostrado que los dominios PIWI adoptan una forma parecida a una ARNasa H la cual selecciona la cadena de ARN que será llevada a hibridar con el ARN mensajero de interés para su degradación, esta selección representa un paso crítico en los eventos de silenciamiento de ARN^{59,60}.

El complejo *RISC* es activado previamente para continuar con el fenómeno de interferencia. Tres proteínas asociadas, Dicer, TRBP y Ago 2 han sido referidas como precursoras de la activación del complejo *RISC*, esta asociación permite la unión a cadenas dobles de ARN. Una vez identificadas las moléculas de *siRNA* se presenta la unión con una de las cadenas de *siRNA* unidas a Ago 2, en este mismo proceso se descarta una de las cadenas, lo que genera un complejo *RISC* funcional. La selección de la cadena se encuentra bajo un proceso de estabilidad de la cadena de ARN de doble cadena, en tanto, será la cadena con el extremo 5' terminal la seleccionada por el complejo⁶¹.

Se sabe que Dicer no es requerida para que el complejo *RISC* sea funcional en mamíferos, por lo cual las moléculas de *siRNA* pueden ser introducidas directamente al citoplasma de la célula a través de oligos diseñados sintéticamente contra una proteína de interés^{59, 60}.

La cadena seleccionada en *RISC* hibrida con el ARNm blanco, quien será degradado mediante la actividad del dominio PIWI presente en Ago, generando un corte preciso en el ARN de interés, así como de exonucleasas celulares dirigidas contra los fragmentos que se generen para completar la degradación del ARN. En algunas especies los *siRNA* unidos al ARN blanco pueden amplificar su acción mediante ARN polimerasas dependientes de ARN (*RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)*) para prolongar el efecto del silenciamiento. En la **Figura 2** se muestra un modelo de la vía de interferencia de ARN mediada por *siRNA*⁶¹

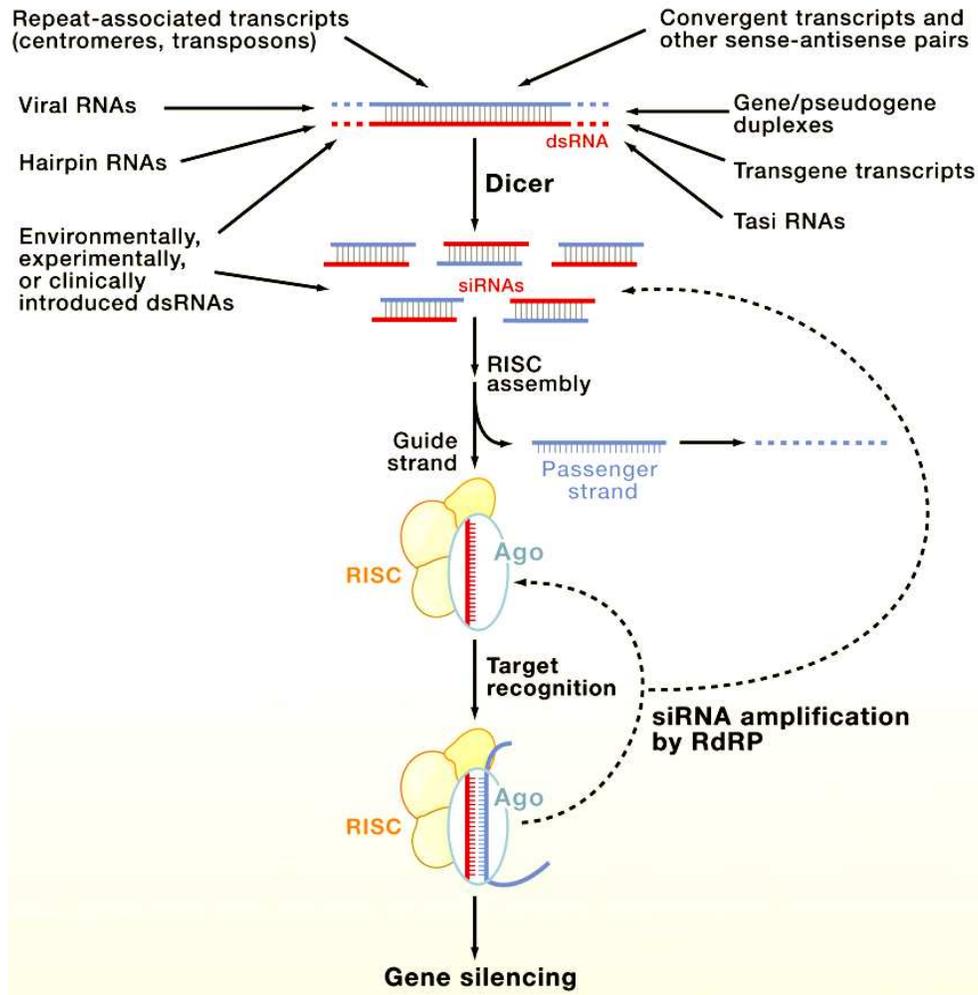


Figura 2. Cartew, R.W, Sontheimer E.J, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 vol 136, 642–655,

La interferencia mediada por *siRNA* no es total, ya que en esta vía de interferencia no existe una hibridación completa con el ARNm blanco, este mecanismo también es transitorio, puesto que después de la división celular se volverá a traducir ARN. Aunque las moléculas de *siRNA* son altamente específicas, se ha reportado en menor medida la presencia de hibridaciones fuera del sitio blanco, también denominados efectos fuera de blanco (*off-target*), los cuales pueden verse disminuidos con un diseño adecuado de los oligos de *siRNA*, así como dirigiendo un mayor número de moléculas de *siRNA* contra el ARN de interés^{64, 65}

El uso de técnicas de ARN de interferencia ha permitido conocer el papel que desempeñan algunas proteínas involucradas en diferentes funciones celulares⁵⁸, además de ser una herramienta novedosa, permite suplir la falta de modelos animales con mutaciones en algunas proteínas y así ampliar el conocimiento de éstas en diferentes eventos celulares.

2. JUSTIFICACIÓN

Estudios Murray y col. demostraron que las proteínas VAMP3 y Sintaxina 4, participan activamente en la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que ocurre en las balsas lipídicas donde también se llevan a cabo eventos de fagocitosis ^{47,48}, debido a esto es posible que la alteración en la expresión o en la función de Sintaxina 4 influya en la internalización de *B. melitensis* y de eventos de tránsito vesicular que le permiten a la bacteria evadir la fusión fagolisosomal para posteriormente establecerse en las vacuolas con características de retículo endoplásmico que requiere *B. melitensis* para multiplicarse ⁴⁰.

Actualmente no existen líneas celulares *knock out* para Sintaxina 4 ni modelos animales que tengan mutaciones dirigidas contra esta proteína. El ARN de interferencia a través de moléculas de *siRNA* dirigidas contra el ARN mensajero de la proteína es una herramienta novedosa para el silenciamiento, la cual puede ser utilizada en líneas celulares a través de la transfección con lípidos catiónicos y el efecto de la inhibición puede ser evidenciado mediante diferentes técnicas moleculares tales como PCR cuantitativa y Western blot.

3. HIPÓTESIS

Los mecanismos de invasión que promueve *Brucella melitensis* se verán afectados al bloquear la expresión de la proteína Sintaxina 4 en células fagocitarias, reduciendo así la sobrevivencia de la bacteria en estas células.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar en el papel que desempeña la proteína Sintaxina 4 en la infección de macrófagos por *Brucella melitensis*, inhibiendo su expresión, para determinar el efecto que esto tiene sobre la sobrevivencia de la bacteria.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Bloquear la expresión de Sintaxina 4 en la línea THP-1 de monocitos humanos, valiéndose de técnicas de inhibición con *siRNAs*, para inhibir la participación de la proteína en el tránsito intracelular.
- II. Determinar la expresión de Sintaxina 4 en las células tratadas con *siRNA* e infectadas con *Brucella melitensis* Bm133, por medio de Western blot y PCR de tiempo real, para determinar el efecto de la inhibición sobre la expresión de la proteína.
- III. Evaluar la sobrevivencia de *Brucella melitensis* en células THP-1 tratadas con *siRNA* e infectadas con la cepa Bm133, por medio de ensayos de protección a la gentamicina para determinar el papel que desempeña la proteína durante la infección.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

Figura 3. Bloqueo de la expresión de Sintaxina 4

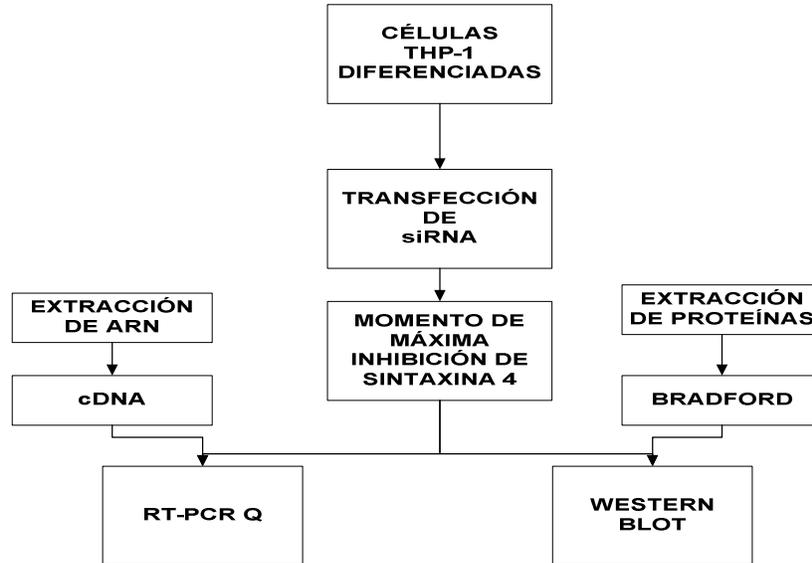


Figura 4. Supervivencia en células tratadas con *siRNA*



5.1 CEPAS BACTERIANAS Y LÍNEA CELULAR

Cepas. Se utilizó la cepa silvestre mexicana *Brucella melitensis* 133 biotipo 1 (aislada en México y referida en varios artículos)²⁸ y como cepa testigo se utilizó una cepa de *Salmonella* enterica serovar Enteritidis ATCC™ Número 49214.

Línea celular. Se utilizaron monocitos de origen humano de la línea THP-1 ATCC™ Número 9184 (**Figura 5**), mismos que fueron cultivados en el medio RPMI 1640 (Gibco®) con un suplemento de 10% de suero fetal bovino y 5 mM de glutamina, incubados a 37° C con 5 % de CO₂.

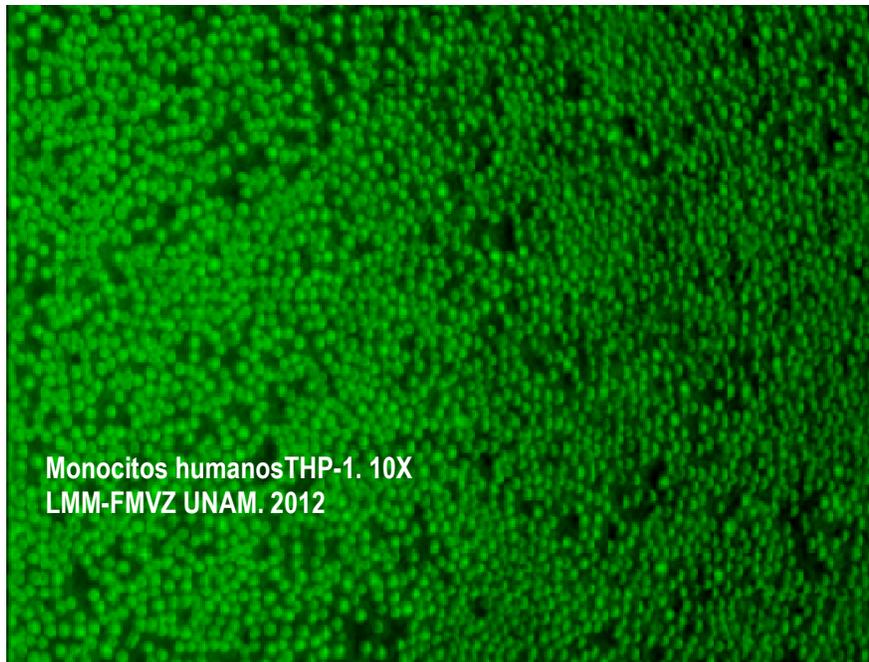


Figura 5. Monocitos humanos de la línea celular THP-1. Monocitos THP-1, células en suspensión, cultivadas con medio RPMI 1640, 10% SFB y 5% de CO₂. Se aprecia la morfología circular de las células observadas a un aumento de 10X.

5.2 DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A MACRÓFAGOS

La diferenciación celular se llevó a cabo utilizando vitamina 1, 25-dihidroxi vitamina D3 (Sigma Aldrich ®) a una concentración final en el medio de cultivo de 10^{-3} mM⁶⁶, utilizando el siguiente esquema:

Para una placa de 24 pozos (Corning® Costar®): se utilizó una densidad de 2.5×10^6 células por pozo, utilizando 1 μ l de vit D3 (**Fiura 6**) por cada 400 μ l de medio RPMI 1640 con suero y con antibiótico totales en cada pozo. Se dejó actuar al mitógeno durante tres horas en condiciones de incubación a 37°C con 5% de CO₂, transcurrido ese tiempo, se agregaron 100 μ l más de medio, a las 24 h se agregó nuevamente 1 ml adicional de medio. La diferenciación requiere de 72 h, después de las cuales las células permanecieron adheridas a la placa. Morfológicamente las células no mostraron cambios evidentes de diferenciación en comparación a los observados en una diferenciación con phorbol 12-myristate 13-acetate a una concentración de 100 μ g/ml (PMA de SIGMA ALDRICH®)⁶⁶.

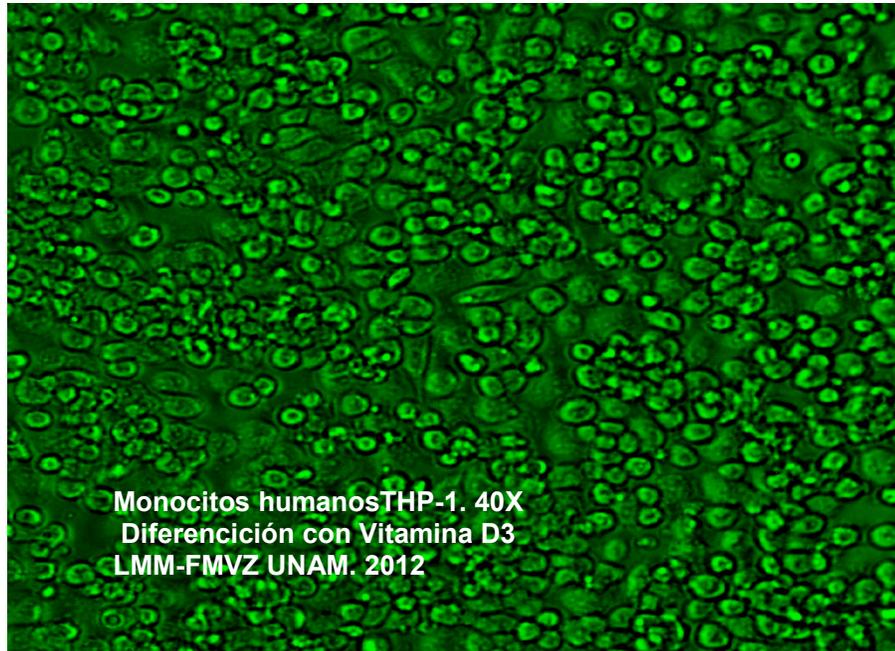


Figura 6. Monocitos humanos de la línea celular THP-1 diferenciados con vitamina D₃. Células THP-1 después de 72h de diferenciación con vitamina D₃, cultivadas con medio RPMI 1640, 10% SFB y 5% de CO₂. Se observa un cambio en la morfología celular en comparación con células sin diferenciar (**Figura 6**), se aprecia alargamiento de la célula, así como la adherencia de la misma a la placa de cultivo.

5.3 BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4

Para inhibir la expresión de Sintaxina 4, las células THP-1, diferenciadas, fueron transfectadas con el *siRNA* Flexitube (Qiagen ®), el cual contiene cuatro sitios blanco en el ARNm de Sintaxina 4, con una longitud de 21 nucleótidos por cada secuencia; como control negativo del silenciamiento se utilizó el *siRNA* control Negativo #1 de Ambion cat. AM4611®.

Se estandarizaron las condiciones tanto de las concentraciones de oligos de *siRNA* como de reactivo de transfección.

Se realizó una cinética de inhibición con *siRNA*, para determinar el momento de máxima inhibición de la proteína, inicialmente la cinética se realizó a intervalos de 4 horas, desde la hora 4 a las 36 h, sin embargo los resultados indicaban que el momento de máxima inhibición se encontraba entre las 16 y las 20 h lo que nos permitió reducir la cinética de las 12 a las 24 h. Todo el ensayo se realizó siguiendo las especificaciones del detergente de transfección, HiPerfect Reagent (Qiagen®).

Se diferenciaron 4 placas de 24 pozos. Después del tiempo de la diferenciación, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por las mezclas para transfección (*siRNA* específico más detergente de transfección). Antes de colocar las mezclas, éstas se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos detergente-oligonucleótido.

Las mezclas utilizadas se prepararon de la siguiente manera:

Placa 1. Células tratadas con los *siRNA* para Sintaxina 4 de origen humano. Para cada pozo se utilizaron 375ng de *siRNA*, 6 µl de HiPerfect en 200 µl de medio RPMI 1640 sin suero y sin antibiótico.

Placa 2. Células tratadas con un control Negativo #1 de *siRNA* (Ambion®). Para cada pozo se utilizaron 375ng de *siRNA*, 6 µl de HiPerfect en 200 µl de medio RPMI 1640 sin suero y sin antibiótico.

Placa 3. Para cada pozo se utilizaron Control mock. 6 µl de de HiPerfect en 100 µl de medio RPMI 1640 sin suero y sin antibiótico.

Placa 4. Células sin tratamiento. No se agregó ninguna mezcla.

Las mezclas se dejaron incubando sobre las células a 37° C con 5% de CO₂, durante 6 h, para que se lleve a cabo la transfección. Transcurridas las 6 h, se agregaron 400 µl de medio RPMI 1640 con suero y antibiótico a cada pozo, en ese momento se inició la cinética, cosechando las muestras cada 4 h, desde la hora 12 hasta la hora 24. Cada placa contenía tres pozos por cada tiempo, y se cosecharon los pozos de los 4 tratamientos diferentes en cada tiempo, para lo cual se retiró el medio del pozo y se agregaron 500 µl de Trizol para realizar la extracción de ARN.

5.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Para obtener el ARN total, se utilizó el protocolo de Trizol reagent (Invitrogen®). Se recuperó el trizol y se colocó en microtubos, se agregaron 100 µl de cloroformo (Mallinckodt Specialty Chemicals Co., USA), y se agitó 15 seg manualmente se incubó 2 min a 4 °C. Se centrifugaron 12 000 xg por 15 min 4 °C (Eppendorf, USA). Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente, se agregaron 100 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 (J.T.Baker), y se mezclaron suavemente e incubaron 2 min a 4 °C. Se centrifugaron 12 000 xg por 15 min 4 °C y se recuperó nuevamente la fase acuosa la cual fue transferida a un tubo nuevo. Se agregaron 250 µl de isopropanol (Merck KGaA, Germany), para precipitar el ácido nucleico y se mezclaron suavemente, se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó a 12 000 xg por 20 min 4 °C. Se removió el sobrenadante de un tubo a otro y se agregó 500 µl de etanol al 75% (Merck KGaA, Germany) a la pastilla para lavarla y se centrifugó a 7 500 xg durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, aproximadamente 20 min. Se suspendió la pastilla con 10-15 µl en agua con Dietilpirocarbonato al 0.1% (DEPC Sigma-Aldrich Inc., USA). Se conservó a -20°C / -70°C. Posteriormente fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo

Scientific, USA), también se realizó una electroforesis en agarosa (Invitrogen, USA) al 1.0% en solución de TAE (2 mM de EDTA pH 8, 40 mM de TRIS, 19 mM de ácido acético), se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb y el gel se sometió a tinción con bromuro de Etidio (Sigma Chemicals Co., USA) al 0.001%.

5.3.2 TRANSCRIPTASA REVERSA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

ADN COMPLEMENTARIO (cDNA).

Para la síntesis de la cadena de ADN complementario se utilizó el ARN obtenido por el método de Trizol a una concentración de 1 µg.

Se utilizó el protocolo descrito en el **cuadro 1**.

Cuadro 1. Reactivos y condiciones para cDNA

REACTIVO	CANTIDAD EN MICROLITROS
H2O con DEPC	c.b.p 20 µl
Buffer 5x	4
dNTP's	2
DTT	1
Oligo DT	2
SSRT	0.5
RNA	1 µg
Total	20 µl
CONDICIONES	
1 ciclo	
Desnaturalización	25°C 10 min.
Alineamiento	50°C 30 min
Extensión	85°C 5 min
Temperatura final	4°C

Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización. Una vez obtenido el cDNA, se realizó el segundo paso de la RT-PCR.

5.3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR. PUNTO FINAL

Con la finalidad de comprobar la eficacia de los iniciadores diseñados, se realizó la PCR punto final para ambos juegos de iniciadores, la mezcla se colocó en un termociclador TC-512 (Techne, UK). Los reactivos y condiciones utilizadas fueron las siguientes (**Cuadro 2, Figura 7**)

Cuadro 2. Reactivos y condiciones para PCR punto final

Reactivo	Sintaxina 4 y G3PDH Microlitros
H2O	Cbp 50
Amortiguador 10x	5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTP's 10mM	1
Iniciador de ida 2.5mM	1
Iniciador de reversa 2,5 mM	1
cDNA	1 µg
Taq DNA polimerasa (2.5 U/ µl)	0.5
Vol final	50
Condiciones	
Desnaturalización inicial	105°C 2 min
Desnaturalización	96°C 30 seg
Alineamiento	60°C 30 seg
Extensión	74°C 1m
Extensión final	74°C 10 min
Número de ciclos	30
Temperatura final	4°C

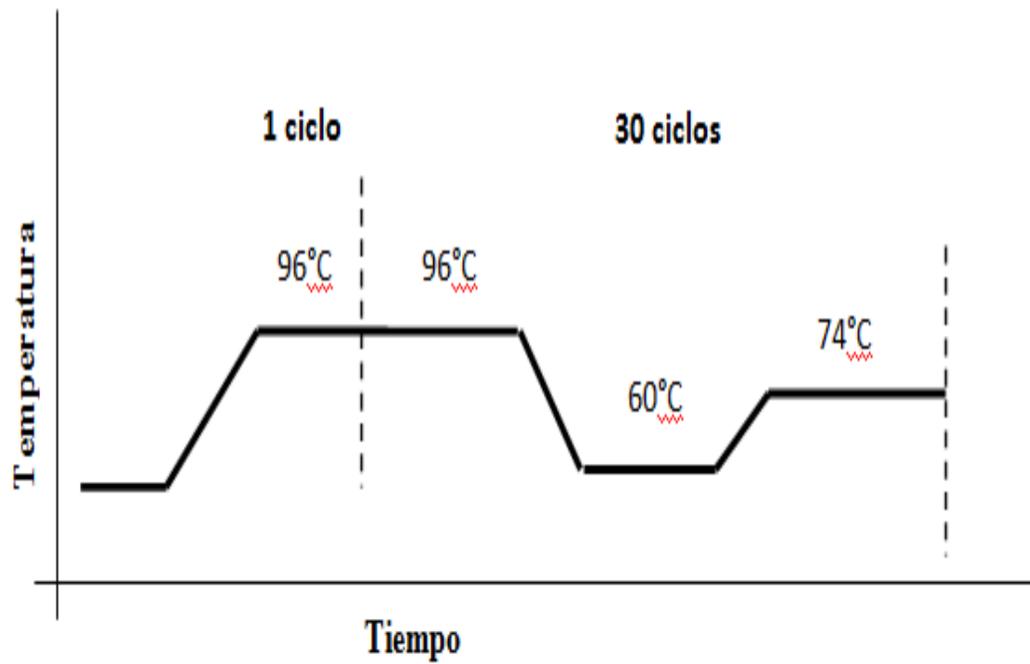


Figura 7. Condiciones para PCR punto final de Sintaxina 4 y G3PDH. Desnaturalización 96°C 30s, alineación 60°C 30s, extensión 74°C 1m. 30 ciclos.

5.3.4 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ARNm de Sintaxina 4 Y G3PDH

Se diseñó un juego de iniciadores a partir de la secuencia del ARN mensajero de la proteína de origen humano la cual fue obtenida de la base de datos de *Genebank* del *Nacional Center of Biotechnology Information* (NCBI) (**figura 8**), los cuales fueron diseñados para un producto de 200 pb y una temperatura de alineación (Tm) de 60°C.

Homo sapiens NM_004604.3.

Forward primer: GAACCTGCGCGATGAGATCAAACA

Reverse primer: TCCCGGTATTCCGACTGCATTGAA.

```
421  AGGTCACCAT CCTGGCCACG CCCCTTCCCG AGGAGAGCAT GAAGCAGGAG
CTGCAGAACC
    TCCAGTGGTA GGACCGGTGC GGGGAAGGGC TCCTCTCGTA CTTTCGTCCTC
GACGTCTTGG
481  TGCGCGATGA GATCAAACAG CTGGGGAGGG AGATCCGCCT GCAGCTGAAG
GCCATAGAGC
    ACGCGCTACT CTAGTTTGTG GACCCCTCCC TCTAGGCGGA CGTCGACTTC
CGGTATCTCG
541  CCCAGAAGGA GGAAGCTGAT GAGAACTATA ACTCCGTCAA CACAAGAATG
AGAAAAACCC
    GGGTCTTCCT CCTTCGACTA CTCTTGATAT TGAGGCAGTT GTGTTCTTAC
TCTTTTTGGG
601  AGCATGGGGT CCTGTCCCAG CAATTCGTGG AGCTCATCAA CAAGTGCAAT
TCAATGCAGT
    TCGTACCCCA GGACAGGGTC GTTAAGCACC TCGAGTAGTT GTTCACGTTA
AGTTACGTCA
661  CCGAATACCG GGAGAAGAAC GTGGAGCGGA TTCGGAGGCA GCTGAAGATC
ACCAATGCTG
    GGCTTATGGC CCTCTTCTTG CACCTCGCCT AAGCCTCCGT CGACTTCTAG
TGGTTACGAC
```

Figura 8. Sitios de alineación de los iniciadores para Sintaxina 4

Se diseñó también un juego de iniciadores para G3PDH, los cuales fueron utilizados como control normalizador para la PCR-Q.

El diseño se realizó a partir de la secuencia del ARN mensajero de la proteína de origen humano la cual fue obtenida de la base de datos de *Genebank* (**Figura 9**), los cuales fueron diseñados para un producto de 189 pares de bases y una temperatura de alineación (T_m) de 60°C.

Homo sapiens NM_004604.3

Forward primer: AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT

Reverse primer: AAGCTTCCCGTTCTCAGCCTTGA

```
61   ATGGGGAAGG TGAAGGTCGG AGTCAACGGA TTTGGTCGTA TTGGGCGCCT
GGTCACCAGG
      TACCCCTTCC ACTTCCAGCC TCAGTTGCCT AAACCAGCAT AACCCGCGGA
CCAGTGGTCC
121   GCTGCTTTA ACTCTGGTAA AGTGGATATT GTTGCCATCA ATGACCCCTT
CATTGACCTC
      CGACGAAAAT TGAGACCATT TCACCTATAA CAACGGTAGT TACTGGGGAA
GTA ACTGGAG
181   AACTACATGG TTTACATGTT CCAATATGAT TCCACCCATG GCAAATTCCA
TGGCACCGTC
      TTGATGTACC AAATGTACAA GGTTATACTA AGGTGGGTAC CGTTTAAGGT
ACCGTGGCAG
241   AAGGCTGAGA ACGGGAAGCT TGTCATCAAT GGAAATCCCA TCACCATCTT
CCAGGAGCGA
      TTCCGACTCT TGCCCTTCGA ACAGTAGTTA CCTTTAGGGT AGTGGTAGAA
GGTCCTCGCT
```

Figura 9. Sitios de alineación de los iniciadores para G3PDH

5.3.5 RT-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA PCR-Q

Para la PCR cuantitativa se utilizó como molécula fluorescente SYBR® GreenER™ utilizada bajo las condiciones del fabricante descritas en el Two-Step qRT-PCR Kit Universal, para lo cual se realizaron optimizaciones de los iniciadores, así como eficiencia del cDNA para los ensayos de expresión.

5.3.6 OPTIMIZACIÓN DE INICIADORES DE Sintaxina 4 y G3PDH. CURVAS DE EFICIENCIA PARA Sintaxina 4 Y PARA G3PDH

Para el ensayo de optimización se probaron tres concentraciones diferentes para cada juego de iniciadores, 300nM, 600nM y 900nM, tanto para el *forward* como para el *reverse*. Se llevaron a la reacción de PCRQ y las concentraciones donde no se observan dímeros fueron las siguientes para ambos iniciadores. El análisis que se realizó fue a partir de cuantificación absoluta.

Forward: 900nM

Reverse: 300Nm

Para determinar la concentración del cDNA que no generara inespecificidades con las concentraciones obtenidas de los iniciadores, se realizaron curvas de eficiencia en PCR-Q obtenidas a partir de una cuantificación absoluta.

Se evaluaron las diferentes concentraciones de cDNA: 0.1µg, 0.01 µg, 0.001 µg y 0.05 µg, 0.005 µg, 0.0005 µg.

A través del cálculo de eficiencia, se eligieron las diluciones que obtuvieron un valor cercano a eficiencia 2.00, el cual fue 0.05 µg, tanto para Sintaxina 4 como para G3PDH.

5.4 DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4 MEDIANTE RT-PCRQ EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON *siRNA* DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4

Una vez estandarizadas las condiciones para la PCRQ se realizó el ensayo de inhibición por medio de PCRQ. El cDNA obtenido de las extracciones de ARN de células tratadas con RNA de silenciamiento fue utilizado para este ensayo, a una concentración de 0.05 µg.

Para el ensayo se utilizó una placa para PCRQ de Roche®, a la cual se le agregaron las mezclas para las muestras y las mezclas para los controles negativos (*No Template Control* NTC). Las muestras de cDNA por triplicado de cada intervalo de tiempo de la cinética, fueron utilizadas por triplicado nuevamente en reacción de PCRQ, en la reacción se incluyeron los intervalos de tiempos de las células tratadas con *siRNA* y las células con el control mock. Todas las muestras fueron enfrentadas tanto con los iniciadores de Sintaxina 4 como con los de G3PDH.

Las mezclas se realizaron conforme a lo descrito en el **cuadro 3**.

Cuadro 3. Reactivos para PCRQ

Reactivo	Sintaxina 4 y G3PDH	NTC
SYBR Green	12.5µl	12.5µl
Primer Forward	0.5 µl	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl	0.5 µl
H2O con DEPC	6.5 µl	11.5 µl
cDNA 1 µg	5 µl	0

El fluorocromo utilizado fue SYBR Green® de Invitrogen® y el equipo utilizado fue LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche® Applied Science, USA) versión 1.5. Las condiciones para la reacción se describen en la **figura 10**.

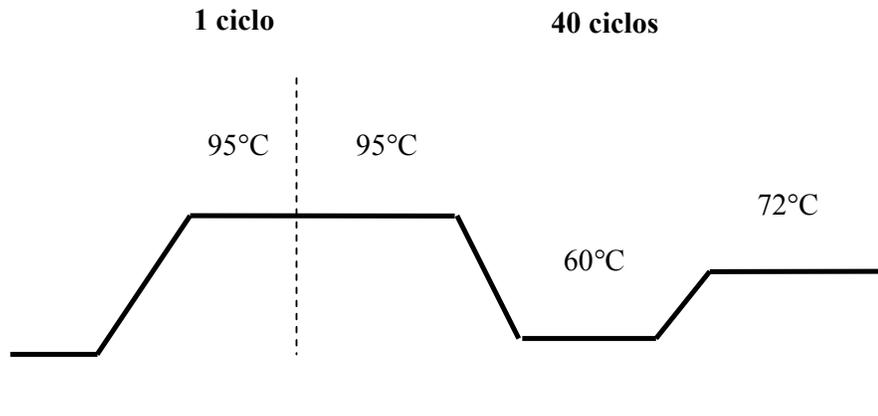


Fig. 10. Diagrama de constantes para la reacción de transcripción reversa PCR Q

Los resultados fueron ponderados en Excel y analizados por la ecuación de Pfaffl⁶⁷ misma que señala los cambios en la expresión de los genes blanco.

5.5 DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4 MEDIANTE WESTERN BLOT EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON *siRNA* DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4

Se realizó la extracción de proteínas de los ensayos de infección la cinética, la cosechas se obtuvieron a intervalos de 4 horas, durante 12 horas, desde la hora 12 a las 24 horas, siguiendo las especificaciones del detergente de transfección, HiPerfect Reagent (Qiagen®).

Las cuales fueron utilizadas para detectar a la proteína Sintaxina 4, por medio de la técnica de Western blot, para su análisis cualitativo.

Las cosechas se realizaron con la siguiente solución de lisis: Tritón 0.1%, Deoxicolato 0.2% y SDS 0.1%. Se agregó 100 µl de la solución de lisis a cada pozo y se conservó a -70°C. Las proteínas se precipitaron con 300 µl de 10% ácido tricloro acético TCA y se centrifugaron a 12 000 xg por 10 minutos a 4°C. Se lavó la pastilla con 500 µl de etanol absoluto frío, sin resuspender y se centrifugó a 13 000xg por 10 minutos a 4°C. Se retiró el etanol y se suspendió la pastilla en 40 µl de Tris pH 8.3 16 µM. Se conservó a -70°C.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford, realizando una curva de albúmina sérica bovina BSA con concentraciones de 2 a 12 µg/ml.

Una vez que la linealidad de la prueba, se encontró por arriba del 98%, se cuantificaron las muestras utilizando 20µl de muestra más 980 µl del reactivo de Bradford (ácido fosfórico, metanol, azul de Coomassie G-250)⁶⁸.

5.5.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para visualizar las proteínas se preparó gel de poliacrilamida al 12% de acuerdo al protocolo de Sambrook y col.1989 descrito en el **cuadro 4**.

Cuadro 4. Reactivos para gel de poliacrilamida al 12%

Reactivo	Gel separador (10mL)	Gel concentrador (4mL)
H2O destilada	3.3 mL	2.7 mL
1.5M Tris-HCl	2.5 mL pH8.8	0.5 mL pH6.8
SDS 10%	0.1 mL	0.04 mL
Acilamida-bis acilamida	4 mL	0.67 mL
Persulfato de amonio	0.3 mL	0.05 mL
Temed®	0.004 mL	0.005 mL

En cada carril se cargaron 12 µl de muestra con 12 µl de amortiguador para proteínas Laemmli 2X en una relación 1:1, el cual previamente se dejó hervir durante 5 min. La electroforesis se corrió a 60 volts hasta que las proteínas pasaron el gel concentrador y posteriormente se aumentó a 70 volts hasta el término de la corrida.

5.5.2 TRANSFERENCIA EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Posterior al gel de la electroforesis se colocó en un casete para transferencia y se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa, una vez armado se introdujo en la cámara con amortiguador de transferencia (SDS 0.1%, Tris base 25mM, Glicina 192M, Metanol 20%) y se transfirió a 100 mAmp durante 16 h.

5.5.3 INMUNODETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI-Sintaxina 4

Para corroborar que la transferencia de proteínas se llevó a cabo, se utilizó una tinción rápida con rojo de Ponceau durante 5 min, posteriormente fue desteñido con agua destilada. La membrana transferida se dejó bloqueando durante 6 h con leche descremada al 5%, posterior al bloqueo se realizaron 2 lavados con TBS de 5 min y dos lavados más con TBS-Tween 20 durante 5 min. Se incubó con anticuerpo primario anti Sintaxina 4 de origen humano producido en ratón a una concentración de 2µg/µl y se dejó 18 h en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron nuevamente los lavados con TBS y TBS Tween 20 y se colocó el anticuerpo secundario anti IgG de ratón a una dilución de 1/1000, durante 1 h 30 min.

Se realizó el revelado de la membrana con 4-cloro-1-naftol: Agregando solución A (20mL de metanol más 60mg de 4-cloro-1-naftol) y solución B (100 µl de peróxido de hidrógeno), y deteniendo la reacción con H₂O destilada fría.

5.5.4 INMUNODETECCIÓN CON ANTICUERPOS ANTI *BETA*-ACTINA

La membrana transferida se dejó bloqueando durante 6 h con leche descremada al 5%, posterior al bloqueo se realizaron 2 lavados con TBS de 5 min y dos lavados más con TBS-Tween 20 durante 5 min. Se incubó con anticuerpo primario anti *beta* actina (Sigma A5060) 42kDa producido en ratón a una dilución de 1/100 y se dejó 18 h en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron nuevamente los lavados con TBS y TBS Tween 20 y se colocó el anticuerpo secundario anti IgG de ratón a una dilución de 1/1000, durante 1 h 30 min. El revelado de la membrana se realizó con 4-cloro-1-naftol agregando solución A (20mL

de metanol más 60mg de 4-cloro-1-naftol) y solución B (100 µl de peróxido de hidrógeno), la reacción fue detenida con H₂O destilada fría.

5.6 ENSAYO DE INFECCIÓN EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON *siRNA* DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4 CON *Brucella melitensis* Bm133 Y *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis

Las células tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4, fueron infectadas con *B. melitensis* a las 20 h del silenciamiento. Además se sembró una placa como control. Todo el ensayo de infección con *B. melitensis* se realizó en la Unidad de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM. La bacteria fue sembrada previo a la infección durante 18 h en caldo Brucella, para *B. melitensis* y 15 h en caldo Luria Bertani (LB) para *S. enterica* serovariedad Enteritidis, e incubadas a 37°C en agitación. Se realizaron diluciones dobles seriadas 1/2 a 1/10 de la bacteria en caldo Brucella para alcanzar una densidad óptica medida en 625nm de 0.8 a 1.0 (1×10^8 a 2×10^9) bacterias/mL, necesarias para calcular una Multiplicidad de Infección (MOI) de 100:1.

La dilución obtenida para *B. melitensis* fue de 1/4 y de 1/9 para *S. enterica* serovariedad Enteritidis (1×10^8 bacterias/mL), posteriormente se efectuaron los cálculos para que esa dilución se inoculara a 1mL por pozo, el inóculo se realizó en medio RPMI 1640 sin antibiótico y sin suero fetal bovino. Las células infectadas fueron centrifugadas a 1000 revoluciones por minuto (rpm) para poner en contacto la bacteria con las células y se incubó a 37°C.

5.7 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA A GENTAMICINA EN CÉLULAS THP-1 TRATADAS CON *siRNA* DE SILENCIAMIENTO PARA Sintaxina 4 E INFECTADAS CON *Brucella melitensis* cepa 133 Y CON *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis

Las células infectadas tratadas con *siRNA* se mantuvieron en incubación a 37°C con 5 % de CO₂ durante 1 h para permitir la fagocitosis de la bacteria en macrófagos, transcurrido ese tiempo, las células fueron utilizadas en ensayos de sobrevivencia, para lo cual se adicionaron 100 µg/ml de gentamicina por pozo para eliminar a las bacterias que no fueron fagocitadas, después de 120 min la concentración del antibiótico se modificó a 10 µg/ml para evaluar la sobrevivencia de la bacteria a intervalos de 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 h post infección. A partir de estas infecciones se realizó el conteo de UFC en los distintos tiempos post infección, produciendo la lisis celular con 0.2% de tritón 100X y plaqueando en agar Brucella las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ de los lisados, estas placas fueron incubadas por 72 h a 37°C previos al conteo. El mismo protocolo fue utilizado tanto para las infecciones con *B. melitensis* como con *S. enterica* serovar Enteritidis.

6. RESULTADOS

6.1 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ARNm PARA Sintaxina 4 Y G3PDH

Con la finalidad de verificar que los iniciadores alineaban con el ARN mensajero de las proteínas de interés, tal como se predijo previamente utilizando el simulador *in silico* DNA MAN®, se realizó una PCR en punto final (**Figura 11**). La PCR se realizó a partir del cDNA proveniente del ARN de células THP-1 diferenciadas con vitamina D3. En la **figura 11** se observan las bandas correspondientes a la amplificación de Sintaxina 4 en 200 pares de bases y de G3PDH en 189 pares de bases (pb).

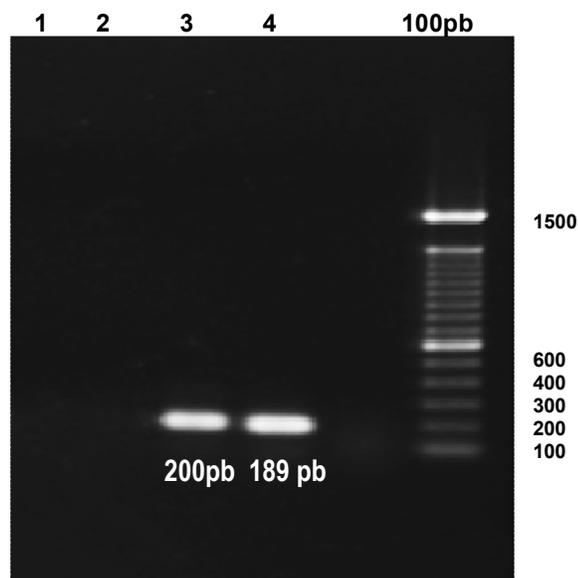


Figura 11. PCR punto final para los iniciadores de Sintaxina 4 y G3PDH. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE donde se aprecian las bandas de amplificación de los productos tanto para Sintaxina 4 200pb (carril 3), como para G3PDH 189pb (carril 4), así como dos controles negativos (carril 1 para Sintaxina 4 y carril 2 para G3PDH). La imagen fue capturada en el fotodocumentador Gelcapture® V. 0.8.

6.2 ENSAYO DE EFICIENCIA DE CDNA CON LOS PRIMERS DE Sintaxina 4 Y G3PDH PARA PCRQ

Después de haber obtenido las concentraciones de los iniciadores de Sintaxina 4 y G3PDH, por medio de PCRQ, se probaron diferentes concentraciones de cDNA (0.1 µg, 0.01 µg, 0.001 µg y 0.05 µg, 0.005 µg, 0.0005 µg) con la finalidad de determinar la dilución de cDNA óptima para ser utilizada con los iniciadores (**Figuras 12 y 13**). El ensayo se realizó en el equipo Light Cycler 480® de Roche®, utilizando SYBR Green® como fluorocromo. En la **figura 12** se aprecia la eficiencia obtenida en el ensayo, misma que valida el uso de la dilución de cDNA 1/20 para los ensayos posteriores de expresión. La eficiencia se obtuvo a través del cálculo relativo de las concentraciones de las muestras usando como referencia una eficiencia estándar de 2.0. La **figura 12** muestra la eficiencia de 1.78, con la concentración de 0.05 µg de cDNA obtenida para Sintaxina 4, por otro lado, en la **figura 13**, se observa una eficiencia de 2.1, con la dilución 1/20 obtenida para G3PDH.

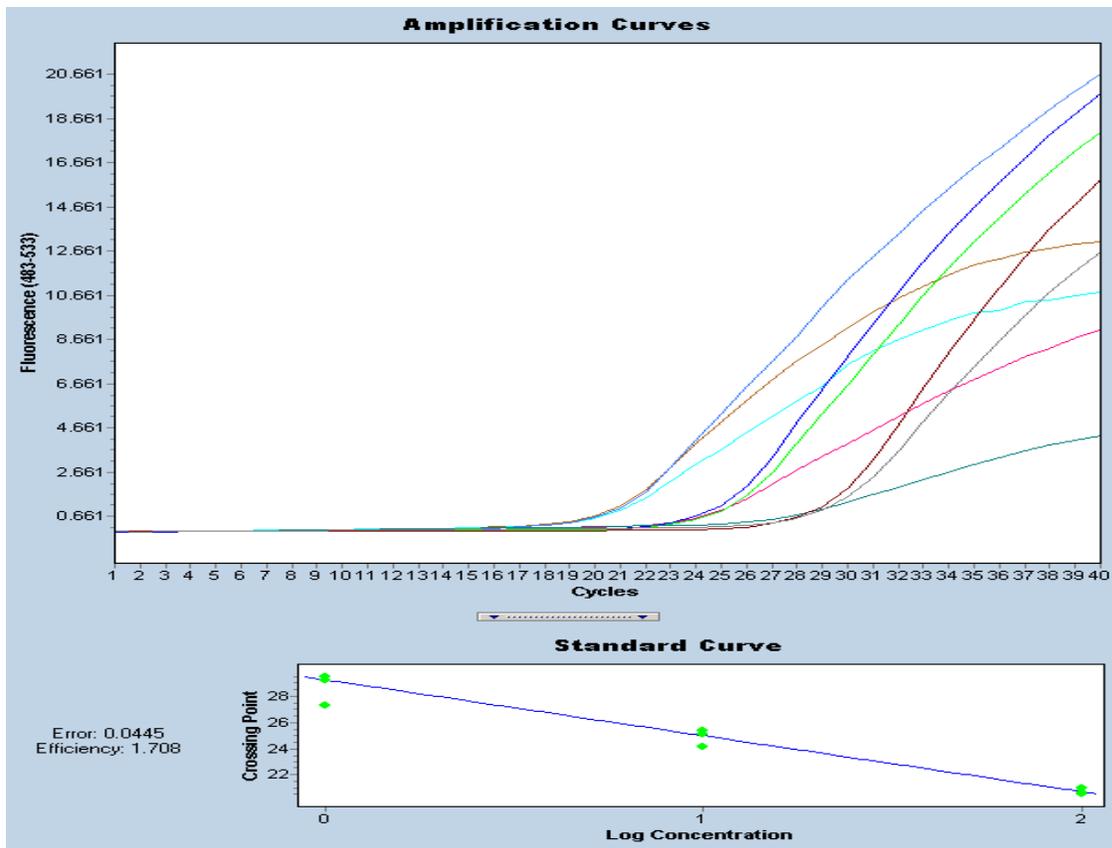


Figura 12. Eficiencia de cDNA con iniciadores para Syntaxina 4. PCRQ del ensayo de eficiencia de cDNA para los iniciadores de Syntaxina 4. Resultados obtenidos en el equipo Light Cycler 480® de Roche®.

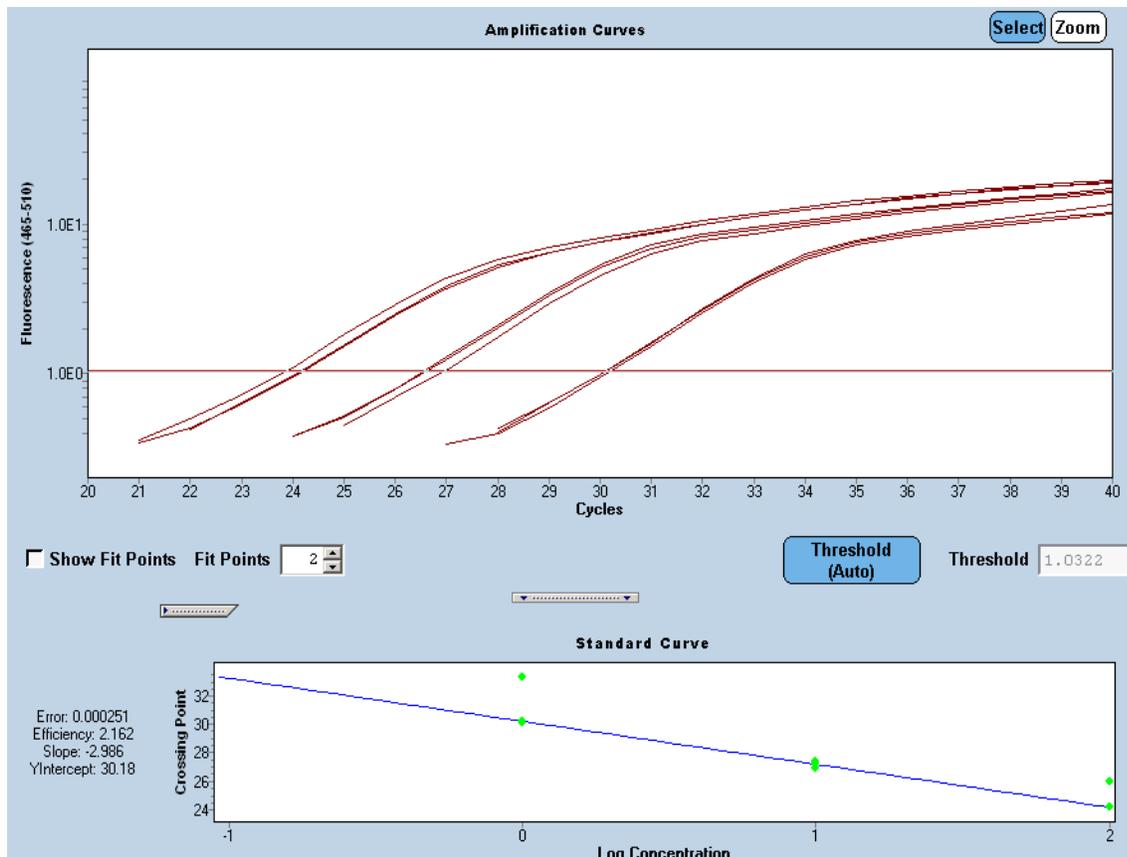


Figura 13. Eficiencia de cDNA con iniciadores para G3PDH. PCRQ del ensayo de eficiencia de cDNA para los iniciadores G3PDH. Resultados obtenidos en el equipo Light Cycler 480® de Roche®.

6.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Sintaxina 4

Con la finalidad de obtener el momento de máxima inhibición de la proteína Sintaxina 4, se realizó una cinética de silenciamiento utilizando moléculas *siRNA* para Sintaxina 4, la cinética se realizó de la hora 12 hasta la hora 24 (**Figura 16**), realizando cosechas en intervalos de 4 h (12, 16, 20, 24). Se incluyeron tres repeticiones por tiempo en cada tratamiento (*siRNA* para Sintaxina 4 y control mock) De las cosechas se realizaron las extracciones de ARN por el

método de Trizol® (**Figura 14**) y posteriormente se realizó el cDNA de las muestras (**Figura 15**) para ser utilizado en el ensayo de PCRQ a una dilución 1/20. En la **figura 16** se observa el comportamiento de Sintaxina 4 durante la cinética, donde se aprecia una disminución de la expresión alrededor de la hora 20.

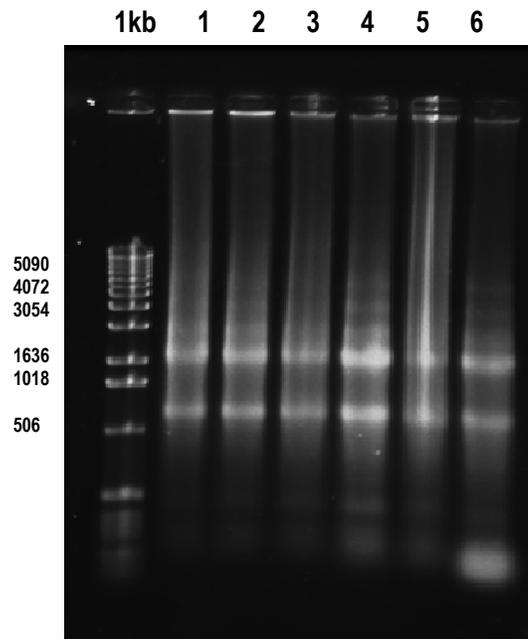


Figura 14. ARN de células tratadas con *siRNA*. Fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE, donde se muestra el ARN extraído de células THP-1 tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4 y de células utilizadas para control mock, a las 12 horas de tratamiento (carriles 1 a 6). Imagen capturada con el fotodocumentador Gelcapture® V. 0.8.

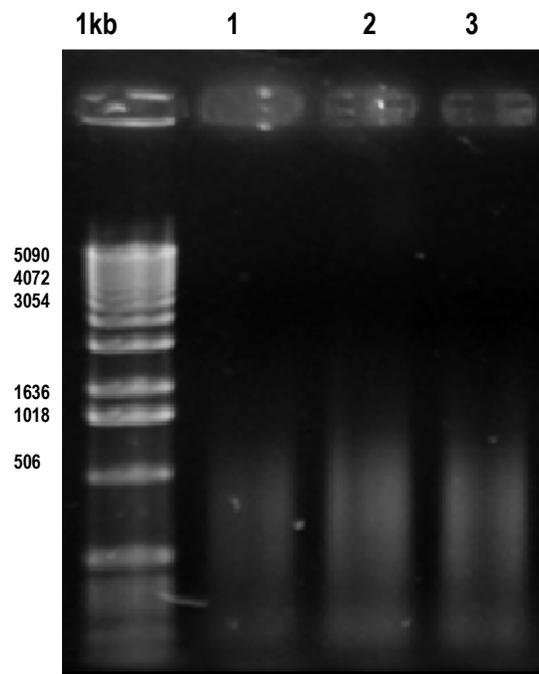


Figura 15. cDNA de células tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4. Fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE del cDNA realizado a partir del ARNm de células tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4 (Carriles 1, 2, 3). Imagen capturada con el fotodocumentador Gelcapture® V. 0.8.

6.3.1 ENSAYO PARA DETERMINAR EL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Cinética de silenciamiento, en monocitos humanos THP-1 diferenciados con 10^{-3} nM de 1, 25-dihidroxi vitamina D3 (Sigma Aldrich ®) con 375ng *siRNA* Flexitube (Qiagen ®), utilizando el reactivo de transfección HiPerfect Reagent (Qiagen®).

Resultados obtenidos en el equipo Light Cycler 480® de Roche® con iniciadores para Sintaxina 4 y para G3PDH, utilizando SYBER GREEN®. Los datos generados fueron analizados mediante la ecuación de Pfaffl, mismos que fueron graficados en el programa GraphPad Prism V5.0. En la **figura 16** se presentan, dos repeticiones de ensayos independientes.

Momento de máxima inhibición de Sintaxina 4

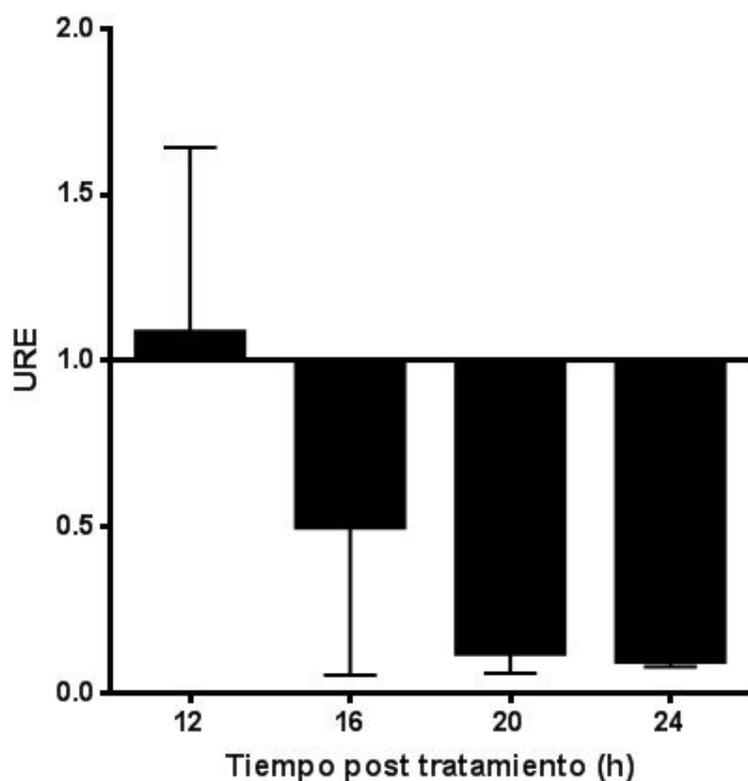


Figura 16. Cinética de silenciamiento para determinar el momento de máxima inhibición de Sintaxina 4. PCRQ de células tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4. Se observa una reducción del 82% a la hora 20 de la cinética. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la ecuación de Pfaffl y graficados en el programa GraPhad Prism V 5.0.

6.3.2 ENSAYO PARA DETERMINAR EL MOMENTO DE MÁXIMA INHIBICIÓN MEDIANTE WESTERNBLOT PARA SINTAXINA 4

Para realizar los ensayos de Westernblot, con el objeto de obtener una evidencia cualitativa de la expresión de la proteína, se realizó la extracción de proteínas totales (**Figura 17**), y se transfirió en membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar la inmuno detección con anticuerpos monoclonales anti-Sintaxina 4 (**Figura 18**). En la **figura 17** se aprecia una extracción de proteínas totales en gel de poliacrilamida al 12% en Tris Glicina, a partir de una placa de 24 pozos de células THP-1 diferenciadas con vitamina D3, mismo que fue utilizado para la transferencia en una membrana de nitrocelulosa transferida y teñida con Rojo de Ponceau (dato no mostrado) y detectada con anticuerpos monoclonales anti Sintaxina 4 (**Figura 18**).

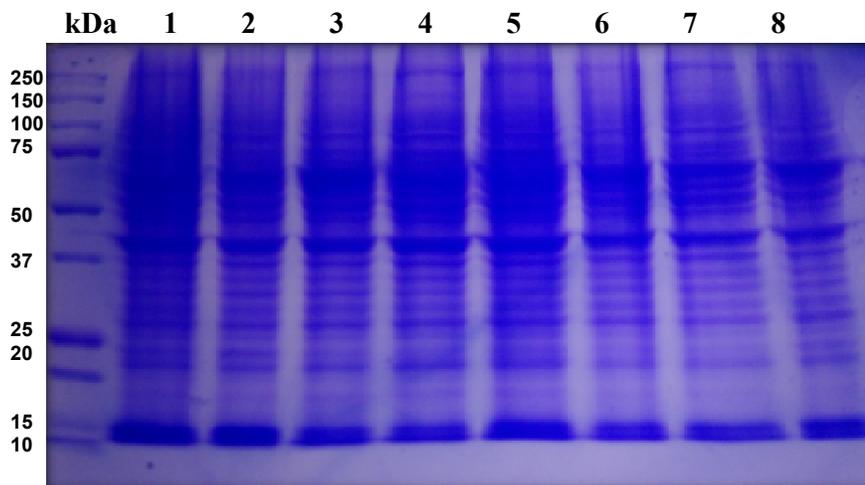


Figura 17. Extracción de proteínas totales de células THP-1 diferenciadas con vitamina D3. Fotografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en Tris Glicina de una extracción de proteínas de células THP-1 diferenciadas con vitamina D3, teñida con Azul de Coomassie. Amortiguador Laemmli para proteínas. En los carriles 1, 2, 3 y 4 se observa la

extracción de proteínas de células del control mock, y en los carriles 5, 6, 7 y 8 se aprecia la extracción de proteínas a partir de células tratadas con *siRNA* para syntaxina 4.

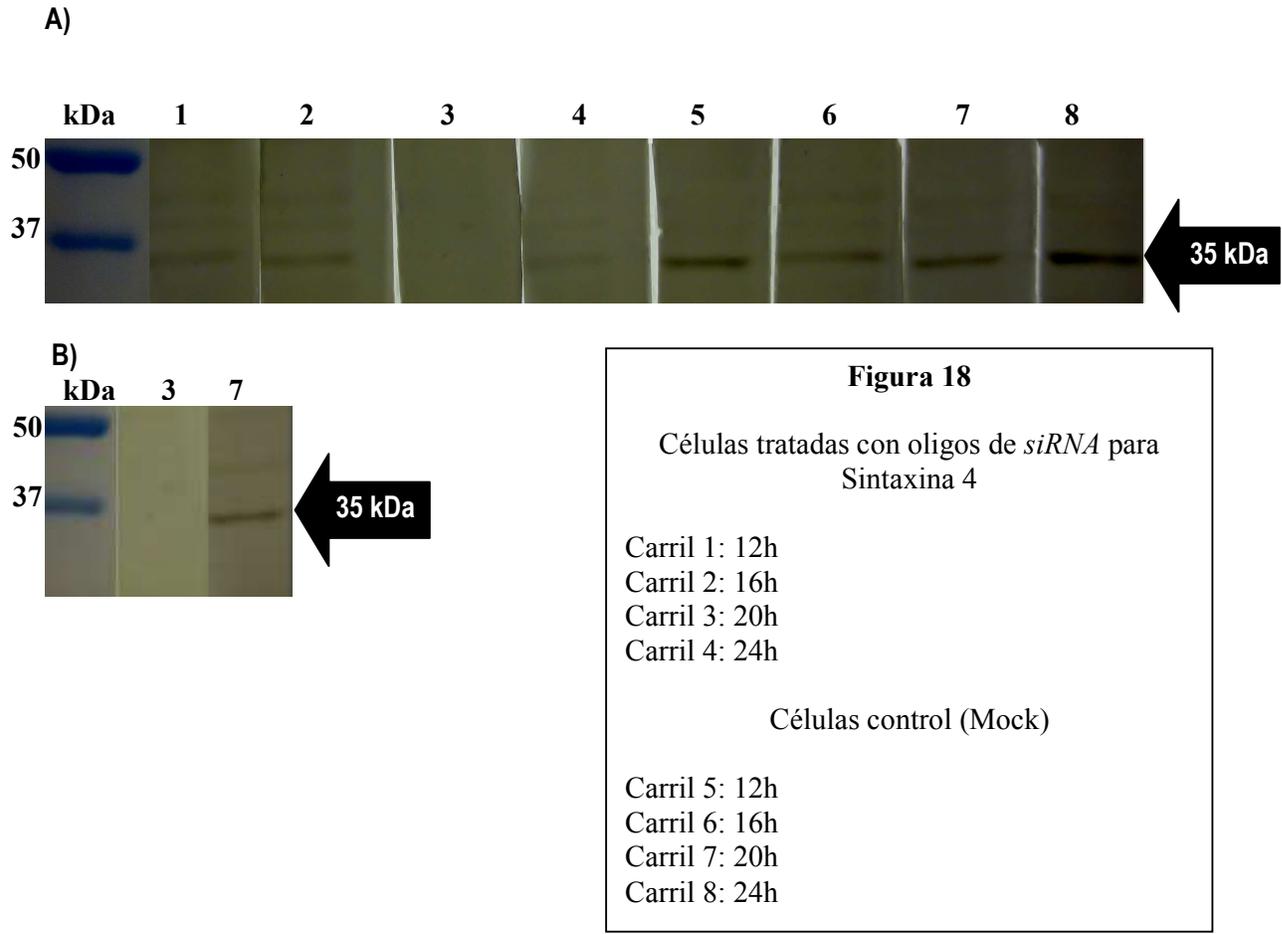


Figura 18. A) Western blot en membrana de Nitrocelulosa. Syntaxina 4 (35 kDa)
 Fotografía de la inmunodetección con anticuerpo primario anti Syntaxina 4 de origen murino. En la figura **18 A** se muestra la fotografía del Western blot para Syntaxina 4, se observa de izquierda a derecha, la señal de la proteína Syntaxina 4 en células tratadas con *siRNA* (carriles 1, 2, 3, 4), y en células control (control mock, carriles 5, 6, 7, 8). En la figura **18 B** se observa una comparación de la señal a la hora 20 de silenciamiento, en células con *siRNA* (carril 3) respecto a un control a la misma hora de tratamiento (carril 7). El revelado se realizó con 1-4 cloronaftol. Cosecha para proteínas a intervalos de 4h (12, 16, 20, 24) a partir de monocitos humanos THP-1 diferenciados con 10^{-3} nM de 1, 25-dihidroxi vitamina D3 (Sigma

Aldrich ®) con 375ng *siRNA* Flexitube (Qiagen ®), utilizando el reactivo de transfección HiPerfect Reagent (Qiagen®).

6.3.3 ENSAYO DE WESTERN BLOT PARA *BETA* ACTINA UTILIZADO COMO CONTROL DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS SILENCIADAS

Como control de expresión de las células silenciadas se realizó un ensayo tipo Western blot para detectar a *beta*-actina, una proteína constitutiva, de 42 kD. En la **figura 19** se aprecia la foto del Western blot para *beta* actina, mismo que fue realizado a partir de la extracción de proteínas totales de la cinética de silenciamiento en células THP-1 tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4. Se puede apreciar que la proteína se encuentra presente durante todos los tiempos evaluados posteriores al tratamiento, indicando que no se modificó la integridad celular, al transfectar las células con los oligos de *siRNA* para Sintaxina 4.

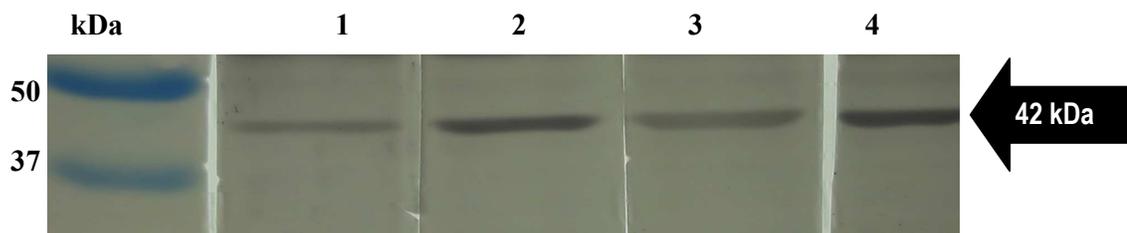


Figura 19. Western blot en membrana de Nitrocelulosa. *Beta*-actina (42 kDa) Inmunodetección con anticuerpo primario anti *beta* actina de origen conejo en células tratadas con *siRNA*. Revelado con 1-4 cloronaftol. Carriles 1 a 4, células cosechadas a los tiempos 12 h, 16 h, 20 h, 24 h post tratamiento con *siRNA*.

6.4 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA De *Brucella melitensis* EN MACRÓFAGOS THP-1 TRATADOS CON *siRNA* PARA Sintaxina 4

Las células tratadas con oligos de *siRNA* para Sintaxina 4 las cuales fueron infectadas con *B. melitensis*, se sometieron a un ensayo de protección a gentamicina con 100 µg/ml y posteriormente fueron lisadas con 0.2% de tritón X 100 para evaluar la sobrevivencia de la bacteria mediante el conteo de UFC, para lo cual se realizaron las cosechas a las 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 h post infección.

En la **figura 20** se presenta un gráfica generada a partir de resultados de dos ensayos independientes. Se observa un decremento en la sobrevivencia tanto en células tratadas con *siRNA*, como en células control (las cuales fueron infectadas pero no recibieron tratamiento con oligos de *siRNA*) alrededor de las 4 horas posteriores a la infección, el cual se recupera gradualmente alrededor de las 12 horas. La sobrevivencia de la bacteria refleja un aumento importante alrededor de las 36 horas.

El número de UFC que lograron entrar a la célula (hora cero) en células tratadas con *siRNA* es menor que en las células control, patrón que conserva durante toda la cinética, sugiriendo que la proteína SNARE Sintaxina 4 puede encontrarse involucrada en eventos de invasión en *B. melitensis*.

**Sobrevivencia de *Brucella melitensis*
en células tratadas con *siRNA* para sintaxina4**

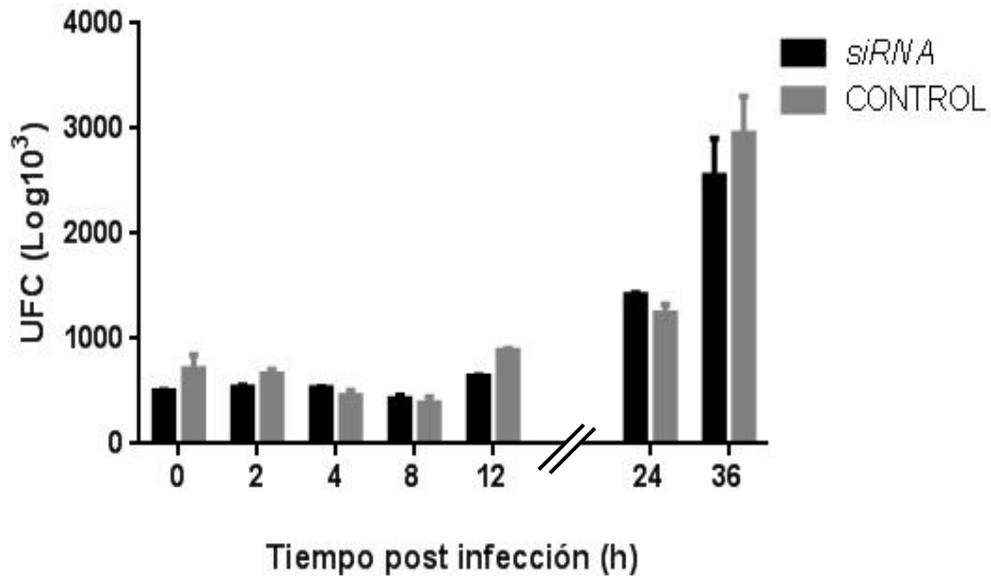


Figura 20. Cinética comparativa de sobrevivencia de *Brucella melitensis* en macrófagos THP-1 tratados con *siRNA* contra Sintaxina 4. Cinética de sobrevivencia de 36 h con protección a gentamicina.

6.5 ENSAYO DE SOBREVIVENCIA De *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis EN MACRÓFAGOS THP-1 TRATADOS CON *siRNA* PARA Sintaxina 4

Se utilizó la cepa de la ATCC (49214) de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis, para realizar ensayos de sobrevivencia en células THP-1 silenciadas con oligos de *siRNA* para Sintaxina 4, debido a que la estructura del LPS que presenta *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis, es tanto estructural como funcionalmente diferente a la de las bacterias del género *Brucella*. El ensayo fue utilizado como un control negativo para los datos obtenidos en el ensayo de sobrevivencia con *Brucella melitensis*, En la **figura 21** se aprecia la representación gráfica del ensayo de sobrevivencia, bajo las mismas condiciones del ensayo para *B. melitensis*. Se puede observar la curva de sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos, la cual comienza a descender a las dos horas posteriores a la entrada y se recupera gradualmente, la variación que se aprecia a las horas 24 y 36, donde el control se encuentra por debajo de las células con *siRNA*, puede explicarse por un elevado porcentaje de desprendimiento celular, debido al tratamiento, durante el ensayo a partir de la hora 20 de la cinética.

**Sobrevivencia de *S. enterica*
serovariedad Enteritidis
en células tratadas con *siRNA* para sintaxina4**

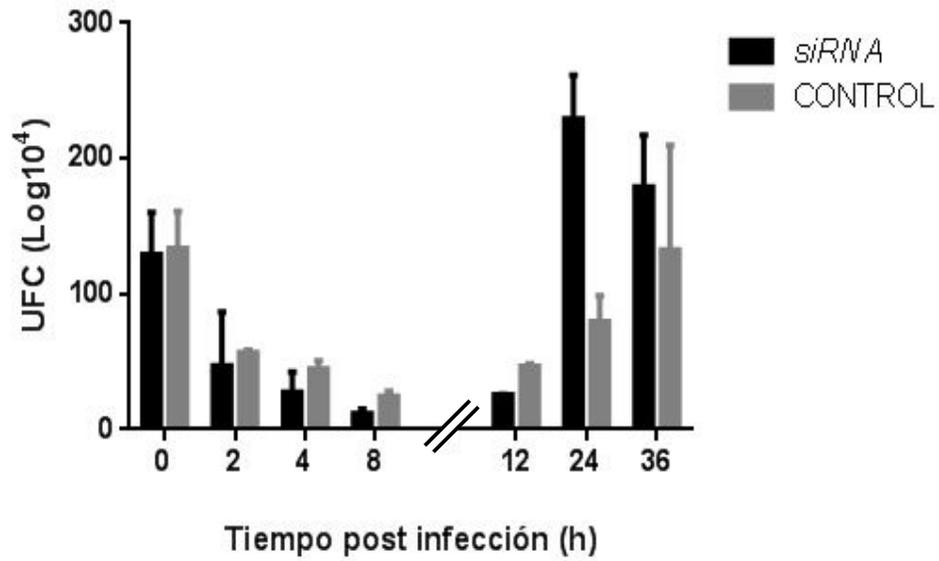


Figura 21. Cinética comparativa de sobrevivencia de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis en macrófagos THP-1 tratados con *siRNA* contra Sintaxina 4. Cinética de 36 h en ensayo con protección a gentamicina

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

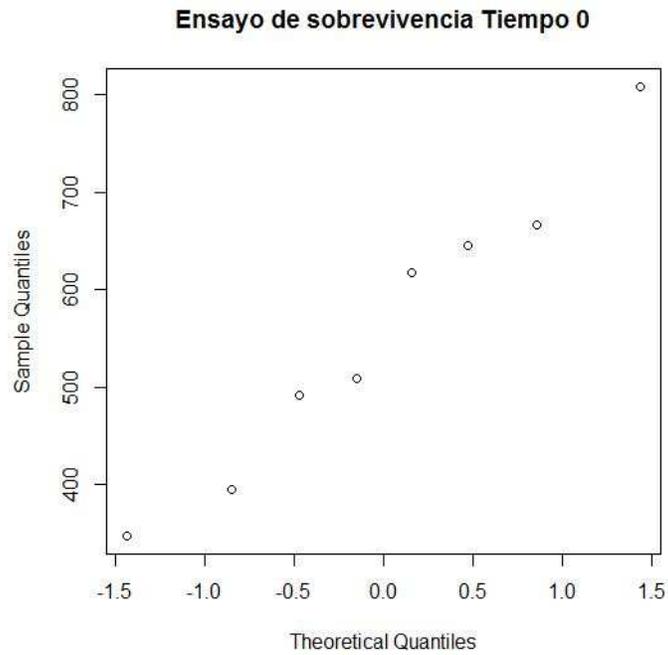
El análisis se realizó utilizando el paquete comercial para análisis estadísticos R®, mediante el método de ji cuadrada con una distribución normal de los datos por tiempo (**Figura 22A**), logrando una significancia mayor al 95% ($p < 0.05$). Así mismo se visualizaron los datos por grupo en una gráfica tipo boxplot (**Figura 22B**).

Para hacer el cálculo se tomaron en cuenta los valores absolutos de las UFC obtenidas en los ensayos de sobrevivencia, con la finalidad de determinar si la variación observada en el número de UFC se atribuye a la variable dependiente que para fines de nuestros ensayos fue el tratamiento con *siRNA* en las células THP-1. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Hipotesis 0: El número de bacterias que ingresa al macrófago es el mismo para células tratadas con *siRNA* y para células sin tratamiento, por lo tanto no existe una dependencia entre la sobrevivencia de *B. melitensis* y el tratamiento con *siRNA*.

Hipótesis 1: El número de bacterias que ingresa al macrófago es diferente para células tratadas con *siRNA* y células sin tratamiento, por lo menos en algún tiempo, existiendo dependencia entre la sobrevivencia de *Brucella melitensis* y el tratamiento con *siRNA*.

A)



B)

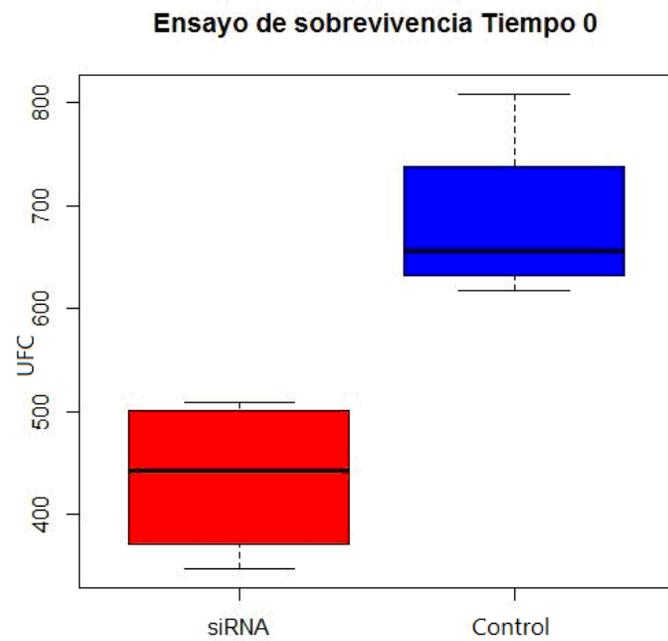


Figura 22. Análisis estadístico. Análisis de los datos de los ensayos de supervivencia de *B. melitensis* en macrófagos THP-1 tratados con *siRNA* para Sintaxina 4. 22 A) Distribución normal de los datos en el tiempo cero por el método de cuantiles. 22 B) Se muestra la distribución de los datos por grupo, indicando la media y la desviación estándar entre estos.

El valor obtenido para ji cuadrada fue de 28.67, con 3 grados de libertad y un valor de p de 0.0000026, lo que indica que existe una relación entre la sobrevivencia de *B. melitensis* y el tratamiento con *siRNA*. Los valores obtenidos en los tiempos 0h a 12h, son estadísticamente significativos, dicho decremento en el número de UFC puede relacionarse con la disminución de la invasividad por parte de *B. melitensis* observada en la hora cero. Los tiempos 24h y 36h no se consideran significativos debido a que las condiciones de la prueba no fueron las mismas durante el ensayo, observando un alto porcentaje de desprendimiento celular en esos tiempos, (alrededor del 50%) ocasionado por el manejo y el tiempo que transcurrió desde la diferenciación de los monocitos hasta el tiempo de la cosecha. En la **figura 22** se muestran únicamente las gráficas de los datos en el tiempo cero, representando la hora en la que la invasividad de *B. melitensis* tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4 disminuyó, en comparación con células infectadas sin tratamiento con *siRNA*.

7. DISCUSIÓN

La Brucelosis es una enfermedad caracterizada por su tendencia a la cronicidad, misma que se desarrolla de manera furtiva en las etapas tempranas de la infección²⁰.

Existen reportes que durante la invasión de macrófagos, algunas especies de género *Brucella* sp, son capaces de reducir considerablemente la expresión del TNF α ¹⁷, una citocina proinflamatoria cuya inhibición resultaría en que los mecanismos de resistencia innatos no se activaran adecuadamente al inicio de la infección y que la bacteria se estableciera sin oposición del hospedador²⁷. Se sabe que *Brucella* modifica los mecanismos de tránsito vesicular durante la infección para posteriormente evadir su destrucción, evitando la fusión fagosoma-lisosoma en células fagocíticas profesionales y no profesionales²⁷. Con estos antecedentes, nos preguntamos si los mecanismos de fusión vesicular en los que participan proteínas de tipos SNARE como Sintaxina 4, SNAP25 y VAMP3 involucrados en la exocitosis de esta citocina pro inflamatoria se encontraban vinculados al proceso de invasión durante la fagocitosis de la bacteria, la cual se secreta al momento que se lleva a cabo la fagocitosis⁶⁹, como dos eventos paralelos.

Trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, indican que durante la infección de *Brucella melitensis* en macrófagos THP-1 la expresión de la proteína Sintaxina 4 se ve alterada en eventos tempranos de fagocitosis⁷⁰, por lo que posteriormente se decidió determinar su papel en la infección de macrófagos.

Frente a las complicaciones de tiempo y costos que implican desarrollar u obtener un celular o animal del tipo *Knock-out* en los genes para Sintaxina 4, para estudiar el efecto que tendría la ausencia de esta proteína durante la infección de *B. melitensis*, se decidió utilizar la tecnología de interferencia de los ARNm de la proteína Sintaxina 4, ya que ésta puede generar condiciones semejantes a las de una cepa de animales *Knock-out*.

En estudios de Pagan y col.⁷¹ se evidencia que un aumento en la secreción del TNF α en células estimuladas con LPS, induce la sobre expresión de Sintaxina 4. También se sabe que la utilización de mitógenos como el PMA, incrementan la secreción del TNF α durante la diferenciación. Nuestro grupo de trabajo encontró que al realizar infecciones con *B. melitensis* en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA, la expresión de Sintaxina 4 fue mayor en comparación con células diferenciadas con Vitamina D3⁷⁰. La evidencia anterior nos condujo a utilizar vitamina D3 para la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos utilizados en nuestros ensayos, la cual no ha demostrado estar relacionada con la activación del macrófago ni el aumento en la secreción de TNF α ⁶⁶.

Como se mostró previamente en la estandarización de los ensayos con los *siRNA* en macrófagos THP-1, se determinó que el momento de máxima inhibición del ARNm de la proteína se encuentra alrededor de las 20 h post-tratamiento con los oligos de *siRNA* específicos para Sintaxina 4 (**Figura 16**) con un porcentaje de inhibición del 82% en los niveles de expresión de los ARNm de Sintaxina 4. También se comprobó, mediante ensayos tipo Western blot que la inhibición en la expresión de Sintaxina 4 se reflejara en la ausencia de la proteína en las células (**Figura 18**), en las cuales se detectó la mayor disminución de la señal de la proteína a las 20 h posteriores al tratamiento. Esto es semejante a lo observado en trabajos previos en los que se realizó la inhibición de Sintaxina 4⁷² en concordancia con lo

sugerido por el fabricante⁷³. Así mismo se evaluó la expresión de la proteína constitutiva *beta*-actina, la cual ha sido empleada previamente como control de expresión⁷⁴, misma que mostró una expresión constante a lo largo de los experimentos, como se pudo observar en la **figura 20**.

Después de lograr la inhibición de la expresión de Sintaxina 4 de forma estable, se llevó a cabo la infección de estas células con *B. melitensis*, pudiendo observar que la recuperación de las bacterias empleadas en la infección (MOI=100) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) (**Figura 20**) en comparación con las células control, infectadas con *B. melitensis* pero a las cuales no se les trató con oligos de *siRNA* para Sintaxina 4. Lo anterior fue comprobado mediante ensayos de infección en macrófagos con protección a gentamicina, con el conteo de UFC.

Estos resultados nos hacen suponer que la reducción de la invasión bacteriana en las células tratadas con *siRNA* para Sintaxina 4 está relacionada con la presencia de *B. melitensis*, ya que a través de ensayos de infección semejantes, pero realizados con *S. enterica* serovar Enteritidis en células sometidas al mismo tratamiento con *siRNA* no se observaron cambios relacionados con la sobrevivencia de esta bacteria y la interferencia en la expresión de Sintaxina 4 (**Figura 21**).

El análisis de los datos obtenidos sugiere que Sintaxina 4, de forma individual o en conjunto con otras proteínas SNARE, con las cuales interactúa durante la secreción de citocinas al momento de la fagocitosis, podrían encontrarse relacionadas con en el establecimiento intracelular de *B. melitensis* en las etapas tempranas de la infección, ya que esta proteína participa en la reorganización de la membrana durante la fagocitosis de microorganismos, lo

cual permitiría restaurar parcialmente la membrana utilizada en la fagocitosis, como se ha sugerido en trabajos previos⁷⁵. También es conocido que uno de los sitios donde ocurre la fagocitosis de *Brucella melitensis*, frecuentemente son las balsas lipídicas o *lipid rafts*⁴⁷, los cuales son microdominios donde se asocian constantemente las proteínas SNARE, lo cual puede encontrarse relacionado con etapas tempranas de la fagocitosis de la bacteria por parte del macrófago.

Estudios relacionados con la inhibición de proteínas para el transporte de vesículas involucradas en el tránsito intracelular de *Brucella*, tales como Sar1, una GTPasa monomérica necesaria para que la VCB adquiriera marcadores de RE y se establezca una vacuola replicativa, demostraron que la replicación de *Brucella* se ve afectada cuando la proteína no se expresa⁴³. También se encontró que al utilizar dominantes negativos para GAPDH y para Rab2, igualmente se ve inhibida la replicación en algunas especies de género *Brucella*⁷⁶.

Consistente con nuestros ensayos, trabajos previos realizados en fibroblastos demostraron la reducción en la fusión de vesículas mediante la utilización de *siRNA* específico para alguno de los componentes del complejo Stx4/SNAP23/VAMP3, esta inhibición restringió la expansión del lamelipodio y alteró la migración de la bacteria dentro de los macrófagos. También demostraron que VAMP3 regula la morfología y la formación del lamelipodio, y que aunado a esto, el bloqueo de Sintaxina 4 en endosomas de reciclamiento positivos a VAMP3 fueron incapaces de llevar a cabo la exocitosis, indicando que la ausencia de Sintaxina 4 tiene efecto sobre la polaridad en esas células⁷⁷.

Recientemente, Castañeda-Ramírez y col. determinaron los niveles de expresión del ARNm de VAMP3 en células J77A estimuladas tanto con el LPS de *B. melitensis* como con la bacteria

completa, en la cual se observaron incrementos importantes a los pocos minutos después de la estimulación, sin embargo, al realizar el silenciamiento de la proteína no se encontraron cambios significativos en la sobrevivencia de la bacteria, sugiriendo que VAMP3 podría encontrarse involucrada en procesos de reorganización de membrana durante la fagocitosis y que los incrementos en los niveles de expresión podrían relacionarse con la disponibilidad de la proteína durante el proceso ⁷⁸.

Por otro lado, es conocido también que en la membrana plasmática, Sintaxina4/SNAP23 a través de la formación de complejos estables con VAMP3 son importantes reguladores de la exocitosis focal y el reciclamiento de endosomas, así como la reorganización de la copa fagocítica durante la ingestión de microorganismos⁴⁸, sugiriendo que de encontrarse Sintaxina 4 involucrada en la invasión por *Brucella melitensis* en macrófagos, la bacteria podría destinar algunos de sus mecanismos de patogenicidad a modular la expresión de esta clase de proteínas en la célula huésped para poder llevar a cabo exitosamente su ingreso y posteriormente multiplicarse dentro del macrófago, de manera semejante a lo observado en la infección por otras bacterias intracelulares como *Legionella pneumophila*⁷⁹ o *Chlamidia trachomatis*⁸⁰.

Además, se sabe que durante eventos de fagocitosis, los macrófagos reemplazan la porción de membrana que es utilizada para formar los fagosomas mediante la utilización de membrana proveniente principalmente del retículo endoplásmico, y endosomas de reciclamiento⁸¹. Esto ocurre por medio de la fusión de vesículas, como un fenómeno dinámico, necesario tanto para la endocitosis de microorganismos, como para la exocitosis de distintos productos de secreción; este proceso se encuentra regulado por la interacción de proteínas de la familia SNARE en los cuales Sintaxina 4 se halla en la membrana blanco de fusión de

vesículas⁴⁸. Los resultados obtenidos, nos permiten especular que la reducción de la invasión por de *B. melitensis* puede encontrarse relacionada a modificaciones en la expresión de Sintaxina 4, lo que podría resultar en la inadecuada remodelación de la membrana necesarias para la fagocitosis de microorganismos.

Watarai y col. reportan que el proceso de formación de vacuolas replicativas induce cambios morfológicamente distintos en cepas de *Brucella* mutantes en el sistema *virB*, al compararlos con lo descrito con cepas silvestre. Ellos sugieren que las posibles moléculas efectoras o alguno de los componentes del mismo, pueden interactuar directa o indirectamente con moléculas asociadas a las balsas lipídicas, sitios donde se localiza Sintaxina 4, posterior al contacto del macrófago con la bacteria⁸².

Los hallazgos reportados en este trabajo, nos permiten sugerir que la participación de Sintaxina 4 se encuentra relacionada con la invasión de *B. melitensis* dentro del macrófago THP-1, al menos en los primeros minutos post-infección. Sin embargo, es necesario continuar con el estudio de ésta para evaluar su participación de manera precisa durante la invasión de macrófagos por *B. melitensis*, por medio de técnicas adicionales que arrojen más información al respecto. Así mismo estudiar de manera individual y en conjunto las proteínas del complejo VAMP3/STX4/SNAP25 permitirá determinar con mayor claridad cual es el papel que desempeñan en la infección de macrófagos.

8. CONCLUSIONES

- I. El bloqueo de la expresión de Sintaxina 4 en células THP-1, reduce significativamente la invasión de *B. melitensis* dentro del macrófago, sugiriendo la participación de la proteína con la sobrevivencia de la bacteria.

- II. El momento de máxima inhibición de Sintaxina 4 en células THP-1 diferenciadas con vitamina D3, se encuentra alrededor de las 20 h después de la inducción con *siRNA*.

9. PROSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo, amplían el conocimiento sobre el tránsito intracelular de *Brucella melitensis*, mismo que permite establecer nuevos planteamientos relacionados con el tráfico vesicular, particularmente en proteínas del complejo SNARE.

Para mayor entendimiento del tráfico vesicular que promueve *Brucella melitensis* dentro del macrófago de origen humano, es necesario estudiar otros miembros de la familia SNARE, individualmente y en complejos.

Es posible que la utilización de nuevas tecnologías de la biología molecular e ingeniería genética sean aplicadas para estos fines y se generen los datos suficientes para describir los eventos de tránsito de la bacteria en modelos humanos.

La utilización de técnicas de moleculares a nivel pre transcripcional, bloqueando todo el complejo SNARE Sintaxina4/SNAP25/VAMP3, podría ayudar a entender si la bacteria necesita del complejo en su totalidad para promover la ruta que seguirá dentro del macrófago.

Es necesario complementar los resultados obtenidos con ensayos de silenciamiento de otras proteínas del complejo VAMP3/STX4/SNAP25, de manera individual y colectiva.

10. LITERATURA CITADA

- ¹ Boschioli ML, Foulongne V O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. in Microbiol.* 2001;4:58–64.
- ² Wael F. El-Tras, Ahmed A. Mahmoud M . Eltholth, Guitian J. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence from natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Vet. Microb.* 2010. 141, 321-325
- ³ Boussau B, Olof E, Frank AC, Legault BA, Andersson SG. Computational inference of scenarios for proteobacterial genome evolution. *PNAS.* 2004; 1:9722–9727.
- ⁴ Moreno E, Cloeckaert A, Moriyo'n I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 2002; 90:209–227.
- ⁵ 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.
- ⁶ Audic S., Lescot M., Claverie JM, Scholz HC. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics.* 2009. 10: 352
- ⁷ Holger C.Sholz et al., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2010. 60, 801-808.
- ⁸ Luna-Martínez E, Mejía-Terán C (2002). Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet. Microbiol.*, 90: 19-30.
- ⁹ Moyer NP, Holcomb LA. *Brucella*. En: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology.* 6th ed. USA: American Society for Microbiology. 1995.549-555.
- ¹⁰ Blasco JM. Brucellosis. *Trat. Vet. Práct.* 1994; 57:27-57.
- ¹¹ Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. México D.F.

SAGARPA. 2001

¹² Castañeda R. Brucelosis. La prensa Mexicana 3ed. México 1986

¹³ Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. Microbiología Médica. Mosby, 4ed. España 2002.

¹⁴ Rhyan J. Gidlewsky T, Roffe T, Aune K, Philo M L, Ewalt R D. Patology of Brucellosis in bison from Yellowstone National Park, Journal of Wildlife Diseases. 2001. 37, 101-109

¹⁵ Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martínez G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of Interferon- γ and Interleukin-12 during human brucellosis. Am J Trop Med Hyg 1999; 61(3): 425-7.

¹⁶ Cardoso P, Costa G, Vasco A, Oliveira S. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Fact. 2006;5:13.

¹⁷ N. Lapaque, I. Moriyon, E. Moreno, J.P. Gorvel,. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Curr. Opin. Microbiol. 2005;8, 60-65

¹⁸ Fernandez PCM, Zelazowska E B, Nikolich M, Hadfield T L, Roop II R M, Robertson G L, Hoover D L. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis bacterial killing and subsequent host cell apoptosis. Infect. Immun., 2003;71;2110-2119

¹⁹ Porte F., A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache, J.P. Liaturd.. Role of the *Brucella suis* lipopolusaccharide O antigen in phagosomal genesis and inhibicion of phagosome-lysosome fusion murine macrophages. Infect. Inmun 2003;1, 1482-1490

²⁰ Celli, J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. Res. Microb. 2006;157, 93-98

²¹ Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard CJ and Gorvel JP. Diferencial inductions off TNF- α and IGTP, IIGP by structural diverse classic and non classic lipopolysaccharides. Cell microbial 2006; 8, 401-413.

-
- ²² G. Briones, N. Innon de Iannino, M. Roset, A. Vigliocco. P.S. Paulo, R.A Ugalde. *Brucella abortus* cyclic beta-1,1-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 2001; 69, 4528-4535
- ²³ Arellano-Reynoso. N. Lapaque, S.Salcedo. G. Briones, A.E. Ciocchini, R, Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon, J.P. Gorvel, Cyclic beta-1,2-glucan is a *brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 2005; 6, 618-625
- ²⁴ Martínez M, Ugalde RA and Almirón M. Irr regulates brucebactin and 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis, and is implicated in the oxidative stress resistance and intracellular survival of *Brucella abortus*. 2006; 152, 2591-2598.
- ²⁵ Sangari F J, Cayon A M, Seoane A and Garcia-Lobo J M. *Brucella abortus* ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. Sangari et al. *BMC Microbiology* 2010, 10:107
- ²⁶ Zhang X, Ren J, Li N, Liu W and Wu Q. Disruption of the BMEI0066 gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int. J. Biol. Sci.* 2009, 5: 570-577.
- ²⁷ Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 2009; 198:221-38
- ²⁸ 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
- ²⁹ López-Goñi, I, Guzmán-Verri, C, Manterola L, Moriyón I, Moreno E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system, BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.* 2002; 90:329–339.

-
- ³⁰ Porte F., JP. Liautard, S. Kohler. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.* 1999;67, 4041-4047
- ³¹ J.Celli, C. de Chastellier, D-M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno, J.P. Gorvel. *Brucella* evades macrophage killing via virB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 2003;198, 545-556
- ³² J. Pizarro-Cerda, S. Meresse, R.G. Parton, G. van der Goot, A. Sola-Landa, I. Lopez-Goni, E. Moreno, J.P. Gorvel. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 1998;66, 5711-5724
- ³³ Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerchi 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 Aug;13(8):1261-74
- ³⁴ Peña Antonio. *Cómo funciona una célula: fisiología celular.* Fondo de cultura económica. México. 1995
- ³⁵ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4ed Garland Science. NY. 2002.
- ³⁶ Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:65-78
- ³⁷ Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999 17:593-623
- ³⁸ Gorvel JP and Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2002; 90, 281-297.

-
- ³⁹ Fugier E, Pappas G and Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9, 1-10.
- ⁴⁰ Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA Celli J. A *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. 2008;9:678–694
- ⁴¹ Barlowe C. Traffic COPs of the early secretory pathway. 2000; 1, 371-377
- ⁴² Serafini T, Orci L, Amherdt, M, Brunner, M, Kahn, R.A. y Rothman, J.E. ADP- ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein *Cell* .1991;67, 239-253.
- ⁴³ Celli J, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:1673-1678
- ⁴⁴ Mossesova. E, Bickford, L.c y Goldberg, J. SNARE selectivity of COPII coat *Cell*. 2003;114, 483-495.
- ⁴⁵ Miller, E. A. Beilharz, T, H. Malkus P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L. y Schekman, R. *Cell*. 2003; 114, 497-509.
- ⁴⁶ Gruenberg J and van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Mol. Cell Biol.* 2006;7:495-504
- ⁴⁷ Naroeni A, Porte F. Role of Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages. *Infect. Immun.*, 2002;70;1640-1644.
- ⁴⁸ Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG and Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science*. 2005;310:1492-1495
- ⁴⁹ Caron E, Gross A, Liautard JP, Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells. *J Immunol*. 1996 Apr 15;156(8):2885-93.
- ⁵⁰ Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JM and Desjardins M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism

of entry into macrophages. *Cell*. 2002;110:119-131

⁵¹ Lang T. SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol*. 2007;585.3:693–698.

⁵² Braun V and Niedergang F. Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol Cell*. 2006;98:195–201.

⁵³ Martinez-Arca S, Rudge R, Vacca M, Raposo G, Camonis J, Proux- Gillardeaux V, et al. A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. *PNAS* 2003;100:9011–9016.

⁵⁴ Chen Y.A, Scheller R.H. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. rev.* 2001;vol 2

⁵⁵ Paumet F., Le Mao J., Martin S., Galli T., David B., Blank U., Roa M.. Soluble NSF Attachment Protein Receptores (SNARE) in RBL-2H3 Mast cells: Functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-Containing Secretory Compartment. *The journal of immunology*. 2000;164, 5850-5857

⁵⁶ Fasshauer D. Eliason W.K Brünger.A.T y Jahn R. Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry*. 1998; 33, 10354-10362

⁵⁷ Harbury P. Springs and zippers:coiled coils in SNARE-mediated membrane fusion. *Curr. Biol*. 1998; 6, 1487-1491

⁵⁸ Kim H. D., Rossi J. RNAi mechanisms and applications. NIH-PA Autor manuscript. 2008; 44(5), 613-616.

⁵⁹ Cartew, R.W. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001;13, 244-248.

⁶⁰ Mesiter G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature PublishingGroup*. 2004

-
- ⁶¹ Cartew, R.W , Sontheimer E.J, Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 vol 136, 642–655.
- ⁶² Gregory Hannon. RNAi: A guide to gene silencing.. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbror. NY. 2003; Chapter 4,8, 13.
- ⁶³ Patrick J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. 2001
- ⁶⁴ Pei Y, Tuschl. On the art of identifying effective and specific siRNAs. Nature Methods.2006 VOL.3 NO.9
- ⁶⁵ Doench JG, Petersen CP, Shar PA. siRNA can function as miRNA. Genes Dev. 2003 15;17(4):438-42.
- ⁶⁶ Schwende Heike et al. Differences in th estate of differences of THP-1 cells inducen by phorbol ester and 1,25 dihydroxyvitamin D3. Journal of leukocyte Biology, 1996; vol. 59.
- ⁶⁷ Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001;29:2002-2007
- ⁶⁸ Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54
- ⁶⁹ 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; 281:11949-54
- ⁷⁰ González-Rodríguez D, Castañeda-Ramírez A, Verdugo-Rodríguez A. Expresión de la proteína Sintaxina 4 durante la invasión en macrófagos humanos de la línea celular THP-1 por *Brucella melitensis*. Memorias de las Reuniones Nacionales de Investigación en Innovación en la Investigación Pecuaria, Agrícola y Forestal. Querétaro. 2012.
- ⁷¹ 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 Jan 21;13(2):156-60.

-
- ⁷² Bethani I, Werner A, Kadian C, Geumann U, Jahn R, Rizzoli SO. Endosomal fusion upon SNARE knockdown is maintained by residual SNARE activity and enhanced docking. *Traffic*. 2009 Oct;10(10):1543-59
- ⁷³ HiPerfect transfection reagent. Handbook. Qiagen® Sample and assay technologies. 5.ed. 2010.
- ⁷⁴ Spänkuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA Silencing of Polo-Like Kinase-1 (PLK1) on Apoptosis and Spindle Formation in Human Cancer Cells. *JNCI J Natl Cancer Inst*. Vol 94 p. 1863-1877
- ⁷⁵ Coppolino MG, Kong C, Mohtashami M, Schreiber AD, Brumell JH, Finlay BB, et al. Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis
- ⁷⁶ Fugier E, Salcedo SP, de Chastellier C, Pophillat M, Muller A, et al. The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and the Small GTPase Rab 2 Are Crucial for *Brucella* Replication. *PLoS Pathog*, 2009; 5(6): e1000487.
- ⁷⁷ Veale KJ, Offenhäuser C, Murray RZ. The role of the recycling endosome in regulating lamellipodia formation and macrophage migration. *Commun Integr Biol*. 2011 Jan;4(1):44-7.
- ⁷⁸ Castañeda-Ramírez A, Puente JL, González-Noriega A, Verdugo Rodríguez A. Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages. *Landes Bioscience*. 2012. Vol 3.
- ⁷⁹ Arasaki K, Roy C. *Legionella pneumophila* Promotes Functional Interactions between Plasma Membrane Syntaxins and Sec22b. *Traffic*. 2010; 11(5): 587–600.
- ⁸⁰ Scidmore M.A, Fischer E.R, Hackstadt T. Restricted Fusion of *Chlamydia trachomatis* Vesicles with Endocytic Compartments during the Initial Stages of Infection. *Infection and immunity*. 2003. 973–984 Vol. 71, No. 2

⁸¹ Hu K, Rickman C, Carroll J, Davletov B. A common mechanism for the regulation of vesicular SNAREs on phospholipid membranes. *Biochem J* 2004; 377:781-5;

⁸² Kim S, Watarai M, Makino S, Shirahata T. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog* 2002; 33:225-37