



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Construcción de dos mutantes en los genes *rpsL* y *omp 31* de
*Brucella melitensis***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M.V.Z. LÁZARO FELIPE VERDIGUEL FERNÁNDEZ

TUTOR:
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ.
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, DF, 16 de JUNIO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

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”

PAPIIT IN221513. “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”. Segunda parte.

CONACYT: Por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

RESUMEN

Verdiguél Fernández Lázaro Felipe. “**Construcción de dos mutantes en los genes *rpsL* y *omp 31* de *Brucella melitensis***”. Bajo la supervisión del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Ricardo Oropeza Navarro y Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma.

Palabras clave. *Brucella melitensis*, Omp31, *rpsL*, sobrevivencia

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos, incluyendo al hombre, y es una de las principales zoonosis a nivel mundial. Las bacterias del género *Brucella* son bacilos cortos, Gram negativos, no móviles, no esporulados y sin cápsula. Se consideran patógenos intracelulares facultativos, utilizando a los macrófagos como las células que les proporcionan un nicho para su sobrevivencia. También son capaces de infectar células fagocíticas no profesionales tales como células trofoblásticas y células HeLa. Entre las especies reconocidas del género *Brucella*, *Brucella melitensis* es el principal agente etiológico implicado en la brucelosis caprina y es también la especie más patógena para el humano. Ocasiona pérdidas significativas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. El control de la brucelosis se apoya en la identificación de los animales infectados y en la eliminación de los mismos. Asimismo, la vacunación de los animales constituye un importante pilar en un plan de control para que en una etapa posterior la enfermedad pueda ser erradicada. En México, para controlar la enfermedad de acuerdo a la NOM-041-ZOO-1995, se utiliza la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev1, la cual es considerada la mejor vacuna contra la enfermedad en pequeños rumiantes, sin embargo las dosis estándar utilizadas en animales con una preñez tardía pueden ocasionar abortos y no necesariamente proteger contra la enfermedad, asimismo se ha reportado que inyecciones accidentales pueden infectar al humano, ya que esta cepa es viva y virulenta. Con la finalidad de construir una mutante con potencial vacunal y que al mismo tiempo sea una cepa control apatógena y lisa para ser evaluada en nuestra línea de investigación en tránsito intravesicular en macrófagos. El objetivo del trabajo fue la construcción de dos mutante en los genes *omp31* y *rpsL* de la cepa *B. melitensis* Bm 133. La construcción de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo mediante la amplificación y clonación de los genes *omp31* y *rpsL* en el plásmido pCR2.1 TOPO mediante el sistema TOPO TA *Cloning Kit* con metodología que marca el fabricante. Con el inserto ligado al plásmido se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, las clonas seleccionadas se sembraron en caldo LB con Kanamicina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37° C toda la noche en agitación orbital a 150rpm. Posteriormente se realizó la extracción de plásmido para verificar la presencia del plásmido en las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas. Los plásmidos obtenidos de esta clonación fueron nombrados **pLV** y **pLF** para el gen *omp31* y *rpsL* respectivamente. Los plásmidos **pLV** y **pLF** fueron digeridos con las enzimas *Hind* III y *Xba* I y subclonados en el plásmido pUC18 previamente digerido con ambas enzimas, obteniendo los plásmidos **pLVM** y **pLFV** que contienen los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente. Los plásmidos **pLVM** y **pLFV** fueron digeridos con las enzimas *Sal* I y *Pst* I para su previa inactivación. La inactivación de los plásmidos **pLVM** y **pLFV** fue mediante la inserción de un casete con resistencia a la Kanamicina obtenido del plásmido pUC4k mediante la digestión con la enzima *Sal* I y *Pst* I, obteniendo los plásmidos **pLVM84** y **pLFV26** que contienen los genes *omp31* y *rpsL* inactivados respectivamente. El plásmido **pLVM84** fue transformado por electroporación en la cepa *B. melitensis*, obteniendo la cepa mutante *B. melitensis* **pLVM84**. La cepa mutante fue evaluada in vitro en ensayos de sobrevivencia en macrófagos murinos J774.1 y células hela. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, se demostró que la mutación en la PME Omp31 de *B. melitensis* 133 provocó una disminución en la internación a las 0 h (1 h post infección) y una disminución significativa en la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante *B. melitensis* **pLVM84** en comparación con la cepa de referencia *B. melitensis* 133 en ambas líneas celulares. Dichos resultados nos permiten concluir que la presencia de la PME Omp31 es necesaria para que lleve a cabo la internación de la bacteria y está involucrada en el establecimiento y desarrollo de un nicho de replicación óptimo esencial para su sobrevivencia y multiplicación intracelular. Por tanto, en vista de los resultados obtenidos, la PME Omp31 no solamente estarían implicadas en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa de la bacteria, sino que también, sería relevante para la virulencia de *B. melitensis* 133 al ejercer papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular del patógeno.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease that affects practically all species of mammals, including man, and is a major zoonosis worldwide. Bacteria of the genus *Brucella* are short bacillus, Gram-negative, non-motile, non-spore without capsule. *Brucella* is considered a facultative intracellular pathogen, using macrophage-like cells that provide a niche for their survival. They are also capable of infecting non-professional phagocytic cells such as trophoblast cells and HeLa cells. Among the six recognized species of the genus *Brucella*, *Brucella melitensis* is the main etiological agent involved in goat brucellosis and is also the most pathogenic for human kind. It causes significant losses in livestock production because it causes abortions, metritis, infertility and birth of weak animals. Brucellosis control relies on the identification of infected animals and in the disposal thereof. Furthermore, vaccination of animals is an important pillar in a control plan for a later stage in the disease can be eradicated. In Mexico, for controlling the disease according to NOM-041-ZOO-1995, the live attenuated vaccine strain *B. melitensis* Rev1 is used, which is considered the best vaccine against the disease in small ruminants, however doses standard used in animals with a late pregnancy can cause abortions and do not necessarily protect against disease also has been reported to accidental injections may infect humans, since this strain is alive and virulent. In order to construct a mutant with vaccine potential and at the same time is a non-pathogenic and smooth strain control to our research on traffic intravesicular macrophages. The objective of this work is the construction of two mutants in *omp31* and *rpsL* genes of *B. melitensis* Bm 133 strain. The construction of recombinant plasmids were carried out using the amplification and cloning of the *omp31* and *rpsL* genes in plasmid pCR2.1-TOPO using the TOPO TA Cloning Kit with methodology marking system manufacturer. With the insert ligated with plasmid, electrocompetent *E. coli* DH5 α cells were transformed by electroporation, selected clones were grown in LB broth with Kanamicina (100 ug / ml) and incubated at 37 ° C overnight under orbital shaking at 150rpm. Subsequently plasmid extraction was performed to verify the presence of the plasmid in *E. coli* DH5 α bacteria transformed. The plasmids cloning thus obtained were named pLV and pLF for *omp31* and *rpsL* gene respectively. pLV and pLF plasmids were digested with Hind III and Xba I enzymes and subcloned into the plasmid pUC18 previously digested with both enzymes, obtaining pLFV pLVM plasmids and containing respectively *omp31* and *rpsL* genes. The pLFV and pLVM plasmids were digested with the enzymes *Sal* I and *Pst* I prior to inactivation. Inactivation of plasmids pLFV and pLVM was by inserting a cassette with kanamycin resistance obtained from pUC4K plasmid by digestion with the enzyme *Pst* I and *Sal* I, and obtaining the pLVM84 and pLFV26 plasmids containing the *omp31* and *rpsL* gene inactivated respectively. The pLVM84 plasmid was transformed by electroporation into the *B. melitensis* strain, obtaining the mutant strain *B. melitensis* pLVM84. The mutant strain was assessed in vitro survival assays in murine macrophages J774.1 and HeLa cells. The results obtained in this study, it was shown that mutation in *Omp31* of *B. melitensis* 133 caused a decrease in internalization at 0 h and a significant decrease in the intracellular survival of mutant strain *B. melitensis* pLVM84 compared reference strain *B. melitensis* 133 in both cell lines. These results allow us to conclude that the presence of *Omp31* is necessary to carry out the internalization of the bacteria and be involved in the establishment and development of an optimal replication niche essential for their survival and intracellular multiplication. Therefore, in view of the results, not only the *Omp31* would be involved in maintaining the integrity of the outer membrane of the bacterium, but also, would be important for the virulence of *B. melitensis* 133 to exert important roles in invasion capability and intracellular replication of the pathogen.

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Situación actual de la brucelosis animal en México	2
FIGURA 2 Estructura del Lipopolisacárido en fase lisa de <i>Brucella spp</i>	8
FIGURA 3 Estrategia experimental	42
FIGURA 4 Representación gráfica de los vectores de clonación	45
FIGURA 5 Representación gráfica de los plásmidos	50
FIGURA 6 Extracción de ADN de <i>B. melitensis</i> 133	54
FIGURA 7 Extracción del ADN plasmídico del plásmido pUC18	55
FIGURA 8 Extracción del ADN plasmídico del plásmido pUC4K	55
FIGURA 9 Digestión enzimática y purificación de pUC18	56
FIGURA 10 Digestión enzimática y purificación de pUC4K	56
FIGURA 11 Amplificación y purificación de los genes <i>omp31</i> Y <i>rpsL</i>	57
FIGURA 12 Clonación del gen <i>omp31</i> en el vector comercial pCR2.1 TOPO	58
FIGURA 13 Clonación del gen <i>rpsL31</i> en el vector comercial pCR2.1 TOPO	58
FIGURA 14 Subclonación del gen <i>omp31</i> en el plásmido pUC18	59
FIGURA 15 Subclonación del gen <i>rpsL31</i> en el plásmido pUC18	59
FIGURA 16 Inactivación del gen <i>omp31</i> de <i>B. melitensis</i>	60
FIGURA 17 Inactivación del gen <i>omp31</i> de <i>B. melitensis</i>	61
FIGURA 18 Mutación del gen <i>omp31</i> de <i>B. melitensis</i>	62
FIGURA 19 Supervivencia intracelular de <i>B. melitensis</i> 133 y <i>B. melitensis</i> pLVM84 en macrófagos murinos	65
FIGURA 20 Supervivencia intracelular de <i>B. melitensis</i> 133 y <i>B. melitensis</i> pLVM84 en células HeLa	66
CUADRO 1 Casos de brucelosis de humanos 2013	3
CUADRO 2 Estandarización de la PCR	46
CUADRO 3 Condiciones de la PCR	47
CUADRO 4 Condiciones de la Reacción de Ligazón	48
CUADRO 5 Plásmidos construidos para la generación de la Cepa Mutante	49
CUADRO 6 Condiciones de electroporación de <i>Brucella melitensis</i> 133 biotipo 1	51
CUADRO 7 Datos de la cinética de la internación, supervivencia y replicación intracelular de <i>B. melitensis</i> 133 y de la cepa mutante <i>B. melitensis</i> pLVM84 en macrófagos murinos J774.1	64
CUADRO 8 Datos de la cinética de la internación, supervivencia y replicación intracelular de <i>B. melitensis</i> 133 y de la cepa mutante <i>B. melitensis</i> pLVM84 en células HeLa	64

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Abreviatura	Significado
AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FMN	Cofactor Flavina Mononucleótido
H ₂ S	Ácido sulfídrico
IL	Interleucina
INF	Interferón
Kan	Kanamicina
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
ME	Membrana externa
MHC	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
µg	Microgramos
Mm	Milímetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMPs	Outer Membrane Proteins
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p.i.	Post infección
Ram	Mutaciones ribosomales ambiguas
R-LPS	Lipopolisacárido Rugoso
SDS	Dodecil sulfato de sodio
S-LPS	Lipopolisacárido Liso
T4SS	Sistema de secreción tipo IV
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción	1
1.1 Situación actual de la brucelosis animal y humana en México	1
1.2 Antecedentes históricos	4
1.3 Estructura y características del microorganismo	5
2. Factores de virulencia	6
2.1 El lipopolisacárido del género <i>Brucella</i>	6
2.2 Proteínas de la membrana externa mayoritarias del género <i>Brucella</i> .	12
2.3 Sistema de secreción tipo IV	21
2.4 Sistemas reguladores de dos componentes	23
3. Gen <i>rpsL</i> (Proteína ribosomal S12)	25
4. Respuesta inmune	28
5. Vacunación	33
6. Justificación	38
7. Hipótesis	39
8. Objetivo General	40
8.1 Objetivos Específicos	41
9. Material y métodos	42
10. Resultados	54
11. Discusión	69
12. Conclusiones	74
13. Prospectivas	75
14. Referencias bibliográficas	76

1. INTRODUCCIÓN

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos, incluida el hombre, y es una de las principales zoonosis a nivel mundial.(1) 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.(2) El género se conforma por las especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*, en mamíferos terrestres, así como, dos especies aisladas de mamíferos marinos *B. pinnipedialis* y *B. ceti*.(3, 4) Más recientemente, se han descrito otras dos nuevas especies: *B. microti*, aislada inicialmente del topillo común *Microtus arvalis* y *B. inopinata*, aislada de un implante de mama en una paciente de 71 años de edad con signos clínicos de brucelosis.(5, 6)

Brucella melitensis es la especie que origina los cuadros más severos en humanos, caracterizados por fiebre aguda, razón por la cual se le adjudica la sinonimia de Fiebre de Malta o Fiebre ondulante.(1)

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción, además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias del género son patógenas para el hombre, quien adquiere la infección por el consumo leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso.(7)

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.(1, 8)

1.1 Situación actual de la brucelosis animal y humana en México

La brucelosis es una enfermedad que a nivel mundial produce severas pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias. *Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, que entre animales presentan transmisión vertical y horizontal, provocan aborto e infertilidad en sus hospedadores naturales, las cabras, las ovejas, las vacas y las cerdas. Además de afectar a sus hospedadores preferenciales, *Brucella sp.* afecta a otras especies domésticas y a animales silvestres que, a su vez, pueden ser reservorios de la enfermedad para otras especies animales y para el ser humano. Por lo tanto, la

brucelosis se considera una importante zoonosis, que se transmite por contacto directo con los animales y con sus secreciones o por el consumo de leche y subproductos lácteos contaminados.(9)

- **Vigilancia epidemiológica en los animales.**

La brucelosis tiene un gran impacto económico en el sector agropecuario debido a los problemas de baja fertilidad, disminución de la producción láctea, abortos en el último tercio de la gestación y el nacimiento de crías débiles, por lo que es importante llevar a cabo un plan de control de la enfermedad.(10, 11)

En México existe una Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, la cual marca los lineamientos para el control, prevención y diagnóstico de la enfermedad en bovinos, caprinos y ovinos (NOM-041-ZOO-1995).(12)

Hasta junio de 2013, se reportaron 1676 casos totales de caprinos positivos, con una frecuencia de 0.01%, 834 casos totales de bovinos positivos, con una Frecuencia de 0.09%, 232 casos totales de ovinos positivos, con una Frecuencia de 0.04% a nivel nacional.(13) Por lo que SAGARPA reportó que solo el 8.02% del territorio nacional esta libre de la enfermedad. (Fig. 1)(13)



Fig. 1 Situación actual de la brucelosis animal en México. 2014

- **Vigilancia epidemiológica en humanos**

La epidemiología de la brucelosis es compleja y ha tenido variaciones con el tiempo. Se estima que anualmente existen en el mundo más de 500,000 casos nuevos, representando una de las zoonosis más frecuentes. La enfermedad es endémica en países del Mediterráneo como Portugal, España, el sur de Francia, Italia, Grecia, Turquía y África del Norte, así como en Centro y Sudamérica, México, Asia y el medio Oriente. A nivel mundial se calcula una incidencia en zonas endémicas que llega

hasta más de 200 casos por cada 100,000 habitantes, países como Mongolia, Kirguizistan, Iraq, Arabia Saudita, Tadzhiqistan y Kazajstán presentan la incidencia más alta a nivel mundial, sin embargo el país con mayor número de nuevos casos anuales es Siria con una tasa de incidencia de 1,603 casos por millón de habitantes.(14, 15)

En México la brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de periodicidad de notificación semanal. Entre los años 2007 y 2012 se han registrado 15,303 casos de Brucelosis con un promedio anual de 2,550 casos anuales en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1.7 por 100 000 habitantes y en el año 2012 se registraron 3,089 casos, con una incidencia de 3.1, lo anterior representa un incremento en la incidencia del 77% para el 2012 con respecto a 2007. En el 2013 se reportaron 2802 casos (1047 hombres, 1755 mujeres) de los cuales los estados de Guanajuato, Nuevo León, Puebla y Sinaloa reportaron el mayor número de casos (Cuadro 1).(16)

ENTIDAD FEDERATIVA	Brucelosis CIE-10 ^a REV. A23			
	Sem.	2013		2012
		Acum.		Acum.
		M	F	
Aguascalientes	-	5	1	11
Baja California	1	13	66	50
Baja California Sur	-	5	6	7
Campeche	-	8	22	22
Coahuila	-	41	50	86
Colima	-	6	8	63
Chiapas	1	12	39	40
Chihuahua	-	31	28	75
Distrito Federal	-	6	11	40
Durango	-	30	29	60
Guanajuato	-	166	251	714
Guerrero	-	11	27	36
Hidalgo	-	6	4	12
Jalisco	2	49	117	139
México	-	23	64	67
Michoacán	1	169	232	225
Morelos	-	29	33	72
Nayarit	-	1	3	24
Nuevo León	-	23	27	195
Oaxaca	-	45	15	68
Puebla	-	75	120	285
Querétaro	-	6	11	11
Quintana Roo	-	6	13	32
San Luis Potosí	1	17	32	64
Sinaloa	1	118	230	129
Sonora	-	33	106	127
Tabasco	-	2	7	12
Tamaulipas	1	26	82	115
Tlaxcala	-	22	30	97
Veracruz	-	9	31	55
Yucatán	-	10	7	10
Zacatecas	-	44	53	146
TOTAL	8	1 047	1 755	3 089

Cuadro1. Casos de brucelosis de humanos 2013(SINAVE/DGE/SALUD 2014.)

1.2 Antecedentes históricos

El origen de la brucelosis humana se pierde en la historia, aunque el primer informe clínico se le atribuye a Marston en 1859. El agente etiológico fue descubierto a finales del siglo XIX por Sir David Bruce, quien fue enviado a investigar a la Isla de Malta (Mediterranean Fever Commission) la causa de un padecimiento febril que había producido la muerte de un número considerable de soldados. El germen se identificó en 1887 en el bazo de cuatros soldados fallecidos y fue denominado *Micrococcus melitensis*.(17, 18) En 1896 Bang, un veterinario danés descubrió el agente causal del aborto bovino, que en un futuro se denominó *B. abortus* y en 1905 Themistokles Zammit documentó el papel que tenían las cabras y el consumo de sus productos, como fuente de contagio para adquirir la enfermedad.(17, 18) En 1914 Traum aisló un microorganismo en los fetos abortados de cerdos que denominó *B. suis*. En 1920 la bacterióloga norteamericana Alice Evans comprobó la semejanza de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Traum y sugirió designar el agente causal con el nombre de *Brucella*, en honor a Sir David Bruce. Posteriormente se siguieron describiendo diferentes especies de *Brucella* y en 1956 Buddle y Boyce identifican *B. ovis* en carneros, en 1957 Stoenner y Lackman aíslan *B. neotomae* y en 1968 Carmicheal y Bruner describen *B. canis* en perros. Recientemente se han descrito dos nuevas especies de *Brucella* denominadas *B. pinnipediae*, *B. ceti*, *B. microti* y *B. inopinata*.(17, 19)

En nuestro país la primera descripción de la enfermedad se realizó en 1905 y 1906 por los doctores Valenzuela y Carvajal. En 1921 el Dr. Manuel Vergara describe casos de brucelosis en la ciudad de Puebla y en 1938 la infección alcanzó tal importancia que se organizó en el estado de Coahuila el Primer Congreso Nacional de la Brucelosis. El doctor Maximiliano Ruiz Castañeda realizó importantes aportaciones en el diagnóstico de la brucelosis, generando uno de los medios de cultivo que por muchos años fue el mejor método para aislar a la bacteria.(17)

1.3 Estructura y características del microorganismo

El género *Brucella* spp está conformado por bacterias con morfología de coco-bacilos, Gram negativos, no móviles, no esporulados y sin cápsula. Son microorganismos aerobios, aunque algunas especies crecen mejor con bajas tensiones de CO₂. Su metabolismo es de tipo oxidativo, poseen oxidasa, catalasa, ureasa y reducen nitratos a nitritos. Debido a que no fermentan azúcares las pruebas de identificación bioquímica tradicionales no son útiles en su caracterización. Las pruebas empleadas en la identificación de microorganismos de este género son; fagotipificación, crecimiento en medios con diferentes concentraciones de tionina y fucsina, producción de la enzima ureasa y producción de H₂S.(20) Cabe aclarar en este punto que la clasificación de *Brucella* spp como microorganismos aerobios, se debe primordialmente a las características descritas en los primeros ensayos desarrollados para conocer la biología del agente. Actualmente, se sabe que la bacteria es capaz de utilizar nitratos y oxígeno como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria, una característica que le permite a estos microorganismos sobrevivir dentro de células eucariontes o en medios carentes de oxígeno.(20, 21) Poseen una envoltura celular peculiar: la membrana externa (ME), la membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria.

La membrana externa de estos microorganismos se compone de fosfolípidos, proteínas y el lipopolisacárido (LPS), actuando en conjunto como barrera reguladora del transporte y de la difusión de nutrientes hacia el interior del microorganismo; la membrana externa así como el LPS son estructuras altamente inmunogénicas.(22) Los antígenos de la ME de *Brucella* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprofilaxis; este interés es resaltado considerando que representan el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador.(23) Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMPs: "outer membrane proteins").

2. Factores de virulencia

Brucella es un parásito intracelular facultativo que ha evolucionado para poder sobrevivir dentro de las células fagocíticas profesionales y no profesionales, (24, 25) pudiendo permanecer sin ser detectada por el sistema inmune, es capaz de inhibir la acción bactericida del suero, (26) así como la fusión fagosoma-lisosoma, evita la desgranulación primaria y resiste a la actividad de la mayoría de los antibióticos. Su resistencia a acciones bactericidas parece radicar en su habilidad de manipular en cierto grado la respuesta del hospedador a su propio beneficio. La resistencia de *Brucella* en el organismo puede deberse en parte a una circulación intracelular alterada para evitar la fusión fagolisosomal cuando la bacteria está contenida en vacuolas especializadas en el retículo endoplásmico.(24, 26) A continuación se describirán los principales factores de virulencia del género *Brucella*.

2.1 El lipopolisacárido del género *Brucella*

El LPS del género *Brucella* posee una estructura química peculiar distinto al LPS presentado por otras bacterias Gram negativas. Por ello, confiere unas propiedades especiales a la bacteria que le proporcionan protección frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador. Entre estas propiedades se encuentran: una baja endotoxicidad, una alta resistencia a la degradación por macrófagos y una baja inmunogenicidad. Además, el LPS de *Brucella* spp. puede hallarse en fase lisa (S-LPS) o en fase rugosa (R-LPS) según la presencia o ausencia de cadenas polisacarídicas O en su estructura. Así, las especies que componen este género se dividen en lisas o rugosas.(27-30) Dentro de las seis especies clásicas de *Brucella*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* poseen un S-LPS, mientras que *B. ovis* y *B. canis* son especies naturalmente rugosas. Se ha observado que el LPS en fase lisa es muy importante para la virulencia de la bacteria ya que mutantes rugosos obtenidos a partir de estirpes lisas se encuentran atenuados. Por ello, el S-LPS ha sido ampliamente estudiado y está considerado como un factor de virulencia en este género. Sin embargo, cabe destacar, que tanto *B. ovis* como *B. canis*, sin presentar un LPS en fase lisa, son virulentas en sus respectivos hospedadores y que en la actualidad, poco es lo que se conoce sobre los posibles factores y mecanismos que se hallan implicados en el establecimiento del proceso infeccioso de ambas especies.(31-37)

- **Lípido A**

Se ha observado que el lípido A de *B. abortus*, aunque es químicamente diferente al de bacterias Gram negativas clásicas, posee una estructura que está presente también en algunos géneros de

las α -2 Proteobacterias relacionados filogenéticamente con *Brucella* spp., como por ejemplo, *Ochrobactrum* y *Mesorhizobium*.(38) El lípido A del género *Brucella* está constituido por un esqueleto disacárido de diaminoglucosa [2,3-diamino-2,3-didesoxi-D-glucosa unidos mediante enlace β (1-6)] que puede estar en algunas ocasiones mono o bifosforilado en las posiciones 1' ó 1' + 4', respectivamente.(39, 40) Por otra parte, a este esqueleto se encuentran unidos, mediante enlaces éster y amida, β - hidroxiacidos [3-OH-C12:0 hasta VLCFAs (“Very long chain fatty acids”) como 27-OH-C28:0 ó 29-OH-C30:0] y otros ácidos grasos de cadena larga (C16:0 a C18:0).(38, 41) Hasta el momento, no se ha detectado ni etanolamina ni otros azúcares neutros formando parte de la composición del lípido A de *Brucella*, a diferencia de lo que sucede en otras bacterias Gram negativas.(42) Además, se ha observado que existe una fuerte asociación entre proteínas de la membrana externa y el lípido A, ya que cuando se obtienen extractos de LPS, éstos contienen fragmentos de proteínas que no se eliminan mediante el empleo de los procedimientos convencionales usados para enterobacterias.(27, 39) (Fig. 2)

En enterobacterias, el grado de heterogeneidad que presenta el lípido A es mayor debido a las diferentes combinaciones en las que se pueden vincular los ácidos grasos, los grupos fosfato, los azúcares neutros, la etanolamina y los diferentes tipos de azúcares amino que conforman la molécula. En cambio, en el género *Brucella*, existen menos variantes de lípido A ya que la heterogeneidad que presenta deriva del número de ácidos grasos unidos y de las posibles diferencias que puedan existir entre ellos debidas prácticamente a la presencia de 1 ó 2 grupos fosfato en las posiciones 1' y 4'.(8, 40) Además, se ha comprobado que el lípido A de *Brucella* es poco endotóxico y que contribuye a la resistencia que muestra la membrana externa de este género a la acción de antibióticos y péptidos catiónicos.(43-46)

- **Núcleo del LPS**

Diferentes análisis cualitativos han demostrado que el núcleo oligosacárido del LPS de *B. abortus* está constituido por ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), 2- amino-2-desoxiglucosa (glucosamina), 2-amino-2,6-didesoxi-D-glucosa (quinovosamina), glucosa y manosa. Sin embargo, no se han observado en su estructura otros componentes comunes del núcleo de otras α -Proteobacterias, como heptosa, fosfatos o ácido galacturónico.(40)

- **Cadenas polisacáridicas O**

Estas cadenas polisacáridicas, ligadas al núcleo y proyectadas hacia el exterior de la bacteria, se encuentran presentes solamente en el LPS de especies lisas de *Brucella*. Son homopolímeros sin ramificaciones de N-formilperosamina, con una longitud de cadena normalmente de entre 96 – 100 subunidades glicosídicas. Estos residuos están unidos en algunas cepas exclusivamente por enlaces α (1-2) (por ejemplo, en *B. suis* 1330 y *B. abortus* 544) y en otras sin embargo, mediante enlaces α (1-2) y α (1-3) en diferentes proporciones (4:1 en *B. melitensis* 16M).(40, 47) Estas uniones generan tres tipos básicos de epítomos en *Brucella* (el A, el M y el C o común) confirmados todos ellos mediante estudios con anticuerpos monoclonales.(39, 48-51) Aparte de éstos, se ha demostrado la existencia de otros epítomos que muestran reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* 0:9 (denominados C/Y).(52, 53)

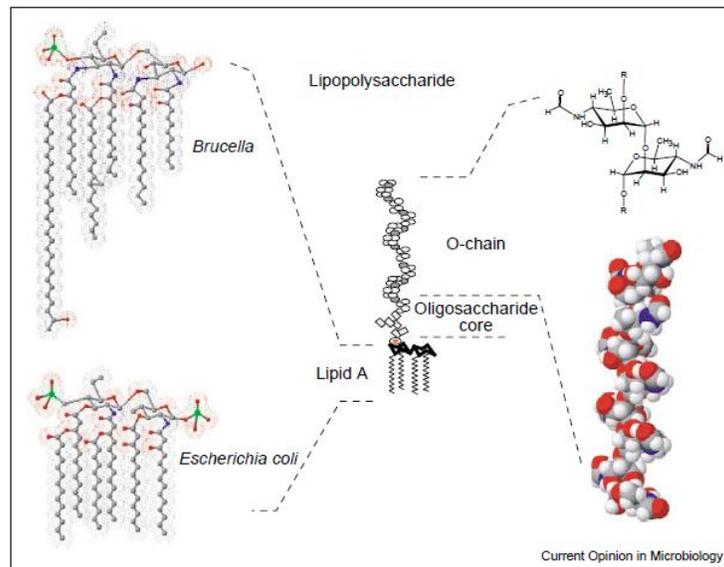


Fig. 2. Estructura del lipopolisacárido en fase lisa de *Brucella* spp.

2.1.2 Papel del lipopolisacárido de *Brucella* spp. en la modulación de la respuesta inmune innata del hospedador.

La peculiar estructura química que presenta el LPS de *Brucella* le confiere a la bacteria unas propiedades que le permiten modular la respuesta inmune innata del organismo hospedador. Fundamentalmente, se ha observado que el LPS se encuentra implicado en la resistencia de la bacteria a la acción bactericida de péptidos catiónicos y del complemento, y en la inhibición de la

síntesis de diferentes mediadores inmunitarios necesarios para la activación de distintos mecanismos de defensa antimicrobianos.(30)

- **Resistencia a péptidos catiónicos bactericidas.**

Es bien conocido en la actualidad que el LPS de *Brucella* constituye una eficiente barrera protectora frente a mecanismos bactericidas extracelulares y frente a la actividad antimicrobiana de células fagocíticas. Se ha demostrado que este género posee una elevada resistencia a una gran variedad de péptidos catiónicos bactericidas tales como, defensinas NP-2, lactoferrina, cecropina, lisozima, péptidos derivados de bacteriocina y polimixina B, así como también a extractos lisosomales de leucocitos polimorfonucleares.(44-46, 54, 55) Se ha postulado que la responsable de esta marcada resistencia es la estructura química que posee el LPS. Así, el hecho de que el núcleo oligosacárido y el lípido A no presenten muchos constituyentes cargados negativamente, como por ejemplo, azúcares ácidos o grupos fosfatos, facilita la agregación de moléculas de LPS a través de sus ácidos grasos, evitando la unión y penetración de los péptidos catiónicos.(30, 56) Resulta por ejemplo sorprendente, la ausencia del azúcar básico 4-amino-arabinosa (arabinosamina) en el lípido A de *Brucella*, ya que en otras bacterias Gram negativas, este azúcar actúa neutralizando la carga negativa neta de la estructura, lo que aumenta la resistencia de la membrana externa a la acción de estos péptidos antimicrobianos.(40) Por otra parte, se ha indicado que la estructura del núcleo oligosacárido de *Brucella* crea por sí misma un bloque estérico que dificulta el acceso de policationes tanto al KDO como a otros grupos aniónicos del lípido A, contribuyendo así a incrementar la resistencia a estos agentes bactericidas.(40, 54) Además del papel relevante que presenta el complejo núcleo-lípido A en la protección frente a los péptidos catiónicos, se ha propuesto también una posible implicación de las cadenas polisacáridicas O, ya que podrían disminuir la exposición de grupos aniónicos del LPS.(54) Sin embargo, *B. ovis* PA, una especie naturalmente rugosa carente de cadenas O, muestra una mayor resistencia a la acción del polication bactericida polimixina B que algunas cepas lisas de *Brucella*, lo que revela que esta cepa presenta propiedades particulares en su membrana externa.(46, 55)

- **Inhibición del sistema del complemento.**

Se ha demostrado que el LPS de *Brucella* también se encuentra involucrado en la inhibición de la cascada del complemento, lo que favorece la supervivencia extracelular de este patógeno.(26, 31, 57, 58) Según varias evidencias experimentales obtenidas en diversos estudios, parece ser que las

especies de *Brucella* inducen una débil activación de la ruta alternativa del complemento, estando solamente implicadas en la eliminación del patógeno, la ruta clásica y la mediada por las lectinas.(59) Se ha observado que *B. abortus* posee una particular resistencia a sueros no inmunes, la cual es debida en parte, a que las cadenas polisacáridicas O de su LPS bloquean el acceso de C1q (subunidad proteica del primer componente del complemento en la ruta clásica) a las proteínas de la membrana externa de *Brucella* spp.(26, 57) Este hecho ha llevado a formular la hipótesis de que las cadenas O, por su longitud y densidad, podrían enmascarar posibles receptores para el complemento, actuando además como un escudo protector frente a este mecanismo defensivo.(27, 57) Sin embargo, la resistencia que presenta el género *Brucella* a la lisis por el complemento no depende exclusivamente de la presencia de estas cadenas polisacáridicas en la molécula de LPS, ya que se ha observado que especies naturalmente rugosas muestran una menor o igual sensibilidad que cepas lisas a la actividad de suero no inmune de cordero.(46, 60) Por tanto, deben existir otras diferencias en la superficie de las especies de *Brucella* que expliquen este distinto comportamiento.(55) Recientemente, se ha indicado que la fosfatidilcolina, un fosfolípido típicamente relacionado con células eucariotas y que se encuentra en abundancia en la membrana externa de *Brucella*, podría estar involucrada en la resistencia mostrada por este género tanto al complemento como a los péptidos antimicrobianos.(61)

- **Interferencia con la respuesta inmunitaria del organismo hospedador.**

El LPS, uno de los principales componentes de la superficie de *Brucella* spp., aparte de constituir una eficiente barrera protectora para la bacteria, también interfiere con la respuesta inmunitaria que pone en marcha el organismo hospedador en defensa a la infección. Así, impide el acceso de moléculas efectoras del sistema inmune, tales como los anticuerpos, a otros componentes de la membrana externa que se encuentran enmascarados por él. Por ejemplo, se ha observado mediante ensayos realizados por citometría de flujo, ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y microscopía electrónica, que en cepas rugosas de *Brucella*, la unión de anticuerpos monoclonales específicos frente a proteínas de membrana externa (PMEs) es mayor que en cepas lisas, en las cuales, la presencia de cadenas O hace que la accesibilidad de las PMEs sea menor.(62)

Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que la actividad endotóxica que presenta el LPS del género *Brucella* es muy baja en comparación con otras moléculas de LPS de bacterias patógenas Gram negativas.(27, 43, 63) Esta peculiar propiedad se considera que pueda ser una

adaptación evolutiva a una vida intracelular ya que esta característica se ha observado también en otros patógenos intracelulares, tales como *Bartonella* y *Legionella*. Debido a esa baja endotoxicidad que posee, el LPS de *Brucella* es un débil inductor de la respuesta inflamatoria del organismo hospedador.(27, 64, 65) Se ha indicado que las cadenas polisacáridicas O podrían tener un papel relevante en la prevención de la inducción de la síntesis de citocinas en macrófagos, ya que podrían impedir el reconocimiento de posibles patrones moleculares asociados con el patógeno (“Pathogen associated molecular patterns”, PAMPs) por parte de receptores de células inmunes, tales como, los receptores tipo Toll (“Toll-like receptors”, TLRs).(66, 67) El hecho de que *Brucella* spp. interfiera en el desarrollo de un correcto patrón de citocinas durante los primeros estadios del proceso infeccioso desencadena por un lado, que la respuesta inmune innata no sea lo suficientemente eficiente y por otro lado, que la respuesta inmune adaptativa no se establezca adecuadamente ya que ésta depende de las primeras señales emitidas tras detectar al microorganismo patógeno. Dentro de las citocinas que ejercen un papel importante en la organización de la respuesta inmune frente a *Brucella* spp. se encuentran la interleucina 12 (IL12), el interferón gamma (INF γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF α). (68)

El TNF α , secretado por las células T $\gamma\delta$ del sistema inmune al activarse por mecanismos que todavía se desconocen y por los macrófagos tras ser infectados, actúa activando a los propios macrófagos y a las células NK (“natural killer”) de la respuesta innata.(69) Se ha observado que *B. suis* inhibe la síntesis de TNF α por macrófagos humanos, acción que favorece al establecimiento de la infección en el hospedador debido a que también repercute en la maduración de las células presentadoras de antígeno profesionales: las células dendríticas.(70, 71) Por otra parte, al no producirse la activación del macrófago, éste no sintetiza IL12, una citocina clave ya que es la responsable de que los linfocitos T CD4+ se diferencien hacia el subtipo celular Th1, conduciendo al sistema inmune a una respuesta adaptativa fundamentalmente celular.(72) Un componente crucial en esta respuesta celular es el INF γ producido por los linfocitos Th1 y CD8+ y por las células NK y T $\gamma\delta$, el cual actúa como un potente inductor de la actividad bactericida de los macrófagos y de los linfocitos CD8+ .(68, 69, 73, 74)

2.2 Proteínas de la membrana externa mayoritarias del género *Brucella*.

Las proteínas de membrana externa (PMEs) del género *Brucella* fueron inicialmente estudiadas debido al fuerte potencial que presentaban como antígenos inmunogénicos y protectores. Así, a principios de los años 80, se identificaron las primeras PMEs a partir de fracciones insolubles de dodecil sulfato de sodio (SDS-I) de la pared celular de *B. abortus* 99.(75, 76) En ellas se observó la presencia de dos PMEs mayoritarias, las cuales se encontraban estrechamente asociadas al péptidoglicano, siendo necesaria una digestión con lisozima para separarlas de él.(75) Estas dos proteínas, con una masa molecular aparente de 25 - 27 y 36 - 38 kDa, fueron posteriormente de nuevo identificadas por Verstrete *et al.* en 1982 mediante extracciones con otros detergentes. Se designaron entonces dos grupos de proteínas mayoritarias: el grupo 2 constituido por las proteínas de 36 - 38 kDa y el grupo 3, constituido por las de 25 - 27 kDa. Adicionalmente, se propuso también el grupo 1, en el cual se incluyeron proteínas que presentaban una abundancia minoritaria en la composición de la membrana externa, con una masa molecular aparente de 89 – 94 kDa.(77)

Los genes *omp2a* y *omp2b*, que codifican las PMEs del grupo 2, fueron los primeros en ser clonados y secuenciados. Se ha visto que estos dos genes, orientados en direcciones opuestas, se encuentran ubicados muy cercanos en el genoma de *Brucella* (separados únicamente por 900 pb), presentando además un alto grado de identidad entre ellos (>85 %).(78, 79) Ambos genes han sido muy útiles en la tipificación molecular por PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) de diferentes especies y biovariedades de *Brucella*, ya que poseen un cierto grado de polimorfismo debido, al menos en parte, a un fenómeno de conversión génica entre los dos genes homólogos.(80-86) Hasta el momento, y a pesar de que se ha conseguido la expresión de los dos genes en *E. coli*, en *Brucella* spp. solamente se ha podido detectar el producto de *omp2b*: una proteína con actividad porina de 36 kDa, siendo la única constituyente del grupo 2 de las PMEs.(79, 87, 88) En lo que se refiere al grupo 3 de PMEs, aparte de la inicialmente descubierta en *B. abortus* y hoy conocida como Omp25, se incluyó en él, otro miembro identificado a partir de fracciones SDS-I de *B. melitensis* B115.(75) Esta PME, mayoritaria y con una masa molecular aparente de 31 – 34 kDa, se encuentra también fuertemente asociada al péptidoglucano.(88-90) Además se ha observado que posee la capacidad de formar oligómeros resistentes a la desnaturalización por dodecil sulfato de sodio (SDS) a bajas temperaturas, por lo que se ha sugerido que podía tratarse de una porina, ya que esta característica se ha descrito en varias proteínas bacterianas de este tipo. Actualmente, esta PME se conoce como Omp31.(91)

Se ha observado que estas proteínas mayoritarias, cuando son separadas por electroforesis en geles de acrilamida y detectadas mediante Western Blot, presentan una variación en la masa molecular aparente y muestran un perfil de bandas múltiples. La causa de este fenómeno todavía no ha podido ser clarificada, aunque se ha relacionado con la unión de las proteínas a subunidades de péptidoglucano de diferentes tamaños, con la formación de oligómeros que puedan modificar su punto isoeléctrico y con la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria. (90-93) En el caso de la proteína Omp25, se han encontrado indicios de que podría tratarse de una glicoproteína, por lo que el perfil múltiple de bandas podría deberse a una heterogeneidad en la parte oligosacárida.

Por otra parte, tanto Omp25 como Omp31, poseen un cierto grado de homología con otras proteínas de microorganismos incluidos también en las α -Proteobacterias. Así, Omp25 y Omp31 presentan un porcentaje de identidad cercano al 40 % con la proteína RopB, un miembro de la familia de PMEs RopB, recientemente caracterizada en *Rhizobium leguminosarum*.(91, 94, 95) Además, también se ha observado que la proteína Omp31 muestra alrededor de un 32 % de identidad con HbpA, la cual pertenece a la familia de proteínas fijadoras de hemina Hbp de *Bartonella quintana*.(96) Debido a esto, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha comprobado que la proteína Omp31 de *B. suis* posee una cierta capacidad para unir hemina, y que la expresión del gen que la codifica, se induce cuando la bacteria se cultiva en condiciones con limitación de hierro.(97)

En la última década, tras la publicación de la secuenciación de los genomas de varias cepas de *Brucella*, tales como *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330 o *B. abortus* 9-941, se descubrió la existencia de cinco genes que codificaban proteínas homólogas a las dos PMEs del grupo 3 previamente mencionadas.(98-101) En la actualidad, estas cinco proteínas denominadas Omp31b, Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp22, junto con Omp25 y Omp31, constituyen la familia de PMEs Omp25/Omp31. Tanto las proteínas que componen dicha familia, como los genes que las codifican, han sido objeto de numerosos estudios que, como se expone en el siguiente apartado, han demostrado su relevancia en distintos aspectos.(99, 101)

2.2.1 Características de las proteínas de membrana externa que componen la familia Omp25/Omp31.

El análisis de la secuencia de aminoácidos que poseía cada componente, reveló el porcentaje de identidad existente entre las siete proteínas que conforman esta familia. Así, Omp25 y Omp31 presentan un 34 %; Omp25b, Omp25c y Omp25d, un 56 - 58 % entre ellas y aproximadamente un 40 % con Omp25; Omp31 y Omp31b, un 67 % entre sí y un 30 % respecto a Omp25 y finalmente, Omp22 (también conocida como Omp3b) muestra alrededor de un 25 % de identidad con las proteínas Omp25 y Omp31, siendo la menos relacionada con los otros miembros. Se ha comprobado además que todas ellas presentan características típicas de proteínas que son transportadas hasta la membrana externa de bacterias Gram negativas, como un residuo fenilalanina en su extremo C-terminal y un motivo común en el extremo N-terminal (AXAAD), correspondiente al punto de corte del péptido señal.(99, 101)

2.2.2 Utilidad como antígenos de diagnóstico y vacunas subcelulares.

Como ya se ha indicado previamente, uno de los principales inconvenientes que presentan las cepas lisas vacunales atenuadas de *Brucella* que se emplean actualmente para la profilaxis de la enfermedad, es que inducen la producción de anticuerpos frente al S-LPS en el animal vacunado. Este hecho imposibilita la diferenciación entre los animales vacunados y los infectados por cepas lisas de *Brucella* mediante el diagnóstico serológico tradicional, ya que éste se basa en la detección de anticuerpos anti-LPS generados durante el proceso de infección. Por ello, una posible alternativa para evitar dicho problema, sería el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que se fundamenten en antígenos que no desencadenen una respuesta inmune en el animal vacunado. Por la localización que presentan, las PME's mayoritarias de *Brucella* spp. son unas buenas candidatas para suplir este papel, y para además, constituir posibles antígenos protectores que permitan la obtención de nuevas vacunas subcelulares recombinantes más específicas y sin los inconvenientes que presentan las vacunas actuales.

En las últimas décadas, se han realizados diversos estudios que han puesto de manifiesto la escasa relevancia que presentan las PME's como antígenos protectores y de diagnóstico frente a infecciones producidas por cepas lisas de *Brucella*. Se ha sugerido que probablemente, esto se deba a que las cadenas polisacáridicas O del S-LPS enmascaran las PME's, dificultando tanto la generación de una respuesta inmune específica frente a ellas como su accesibilidad a los anticuerpos.(62, 102) Por el

contrario, en las cepas rugosas de *Brucella*, tales como *B. ovis* y *B. canis*, este problema no se presenta ya que su LPS carece de cadenas O, por lo que las PMEs, al estar expuestas en la superficie bacteriana, pueden tener un papel más importante como antígenos para el diagnóstico serológico y desarrollo de vacunas más específicas.(103, 104)

Dentro de las proteínas mayoritarias del género *Brucella*, la más estudiada en este campo ha sido la proteína Omp31, perteneciente a la familia de PMEs Omp25/Omp31. Así, investigaciones realizadas mediante el empleo de la técnica de Western Blot y proteínas recombinantes, han revelado que la proteína Omp31 de *B. ovis* podría constituir un buen antígeno de diagnóstico frente a las infecciones causadas por esta especie rugosa en carneros. En contraste, la proteína Omp31 recombinante de *B. melitensis* no ofreció tan buenos resultados, probablemente debido a las diferencias antigénicas que existen entre ambas proteínas, puestas de manifiesto mediante reactividad con anticuerpos.(103, 104)) Por otra parte, el interés que ofrecía la proteína Omp31 como un antígeno protector frente a *B. ovis*, fue inicialmente estudiado mediante inmunización pasiva de ratones con un AcM frente a esta proteína.(105) Posteriormente, se demostró que la proteína recombinante Omp31 de *B. melitensis*, sola o asociada con R-LPS, inducía protección frente a la infección causada por *B. ovis* en ratón.(106)

Además se ha observado que dicha proteína genera una respuesta inmune específica humoral y celular en carneros, aunque todavía no se ha demostrado que sea capaz de proteger frente a la infección por *B. ovis*, tal y como sucede en ratón.(60) También se ha probado una vacuna de ADN basada en el gen *omp31* en ratón, y se ha observado que a pesar de que induce una respuesta inmune humoral baja, genera una importante respuesta T-citotóxica específica que protege frente a la infección por *B. ovis* e incluso, por la cepa lisa *B. melitensis* H38S.(107, 108) En los últimos años, se han llevado a cabo diversas investigaciones enfocadas a mejorar la capacidad protectora de dicha vacuna de ADN. Así, se ha comprobado que la utilización como vacuna de una quimera compuesta por la enzima lumazina sintasa de *Brucella* (una proteína altamente inmunogénica) y por el epítipo de reconocimiento de 36 aminoácidos presente en la parte más hidrofílica de la proteína Omp31, es más eficaz frente a la infección por *B. melitensis* y *B. ovis* en ratón, e incluso, por ésta última en carneros.(91, 103, 109, 110) También mediante el empleo de una vacuna de ADN, se han obtenido datos que señalan una posible actividad protectora de la proteína Omp25 frente a la infección por *B. melitensis* 16M en ratón.(111)

2.2.3 Polimorfismo de ADN.

Tras la descripción del género *Brucella* como monoespecífico mediante los análisis de hibridación ADN –ADN llevados a cabo, se han realizado numerosos estudios encaminados a encontrar marcadores moleculares estables capaces de diferenciar las seis especies clásicas del género y sus biovariedades.(90) Esta diferenciación molecular resulta muy importante para la caracterización de aislados de *Brucella* y descripción de nuevas especies ya que es más sensible, reproducible, rápida y específica que las pruebas fenotípicas realizadas tradicionalmente. En este aspecto, los genes de la familia *omp25/omp31*, al igual que los genes *omp2a* y *omp2b*, han sido de gran utilidad debido al polimorfismo que presentan. (83, 85, 99)

Diversos estudios de polimorfismo de ADN han demostrado que, a pesar de que los genes de la familia *omp25/omp31* se encuentran bastante conservados dentro del género *Brucella*, existen pequeñas variaciones entre las especies que repercuten de manera importante en las proteínas que codifican.(99, 101) Así, se ha descubierto que la proteína Omp31 no se sintetiza en ninguna de las cepas de referencia de las distintas biovariedades de *B. abortus* debido a una delección en su genoma de 25 kb que involucra al gen *omp31* y también, a otros 22 genes hipotéticos, homólogos a genes implicados en la síntesis de un polisacárido en otras bacterias.(85) Además se ha comprobado que *B. ovis* posee 9 sustituciones nucleotídicas con respecto al gen *omp31* de *B. melitensis*, que hacen que la proteína que codifica se diferencie en 7 aminoácidos de la Omp31 de *B. melitensis*.(103) Este hecho conduce a la existencia de diferencias antigénicas entre las dos proteínas, las cuales podrían implicar también, una distinta inmunogenicidad de ambas en el transcurso de la infección. Algo similar se ha descrito para la proteína Omp25; se ha demostrado que el gen *omp25* de *B. ovis* porta una delección de 36 pb en la región terminal 3', la cual, también modifica las propiedades antigénicas que presenta la proteína Omp25 con respecto a la perteneciente a *B. melitensis*.(112) Además, se ha observado mediante Western Blot, que dicha delección causa una disminución de cerca de 1 kDa en la masa aparente de la proteína Omp25 de *B. ovis*, reflejada en la aparición de una banda de 24 kDa en lugar de la de 25 kDa correspondiente a la misma proteína de *B. melitensis*.(112)

En cuanto al resto de los componentes de la familia de proteínas de membrana externa Omp25/Omp31, poco es lo que se conoce de ellas, aunque las cinco PME's han sido detectadas experimentalmente en al menos, una especie de *Brucella*. Así, Omp31b ha sido identificada en *B.*

abortus y en *B. suis*;(93) Omp25b en *B. melitensis* y *B. suis*, Omp25c en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* y Omp22 en *B. abortus* (141).(93, 101) En el caso de la proteína Omp25d, su detección ha resultado ser más complicada, teniéndose solamente indicios de su expresión en *B. suis*.(101) Sin embargo, hasta el momento, todavía no existe ningún trabajo enfocado específicamente al análisis de la presencia de cada una de las PMEs que componen esta familia en las diferentes especies de *Brucella*.(113)

La realización de un trabajo dirigido a estudiar el polimorfismo de ADN de la familia de genes *omp25/omp31*, ha generado información adicional sobre la distribución de estas otras cinco PMEs en el género *Brucella*. Este estudio reveló que los genes que las codifican se encuentran bastante conservados en este género, aunque presentan algunas diferencias importantes entre especies con implicaciones en la proteína codificada.(99) Entre éstas, destacan:

- La existencia de una delección de 232 pb en el extremo 5' terminal del gen *omp31b* de *B. melitensis*, que elimina tanto el sitio de unión al ribosoma como el codón de inicio de la traducción de la proteína, impidiendo probablemente que se sintetice la proteína Omp31b en esta especie. Además, tanto en *B. ovis* como en *B. canis*, debido a una sustitución nucleotídica, el gen *omp31b* presenta un codón prematuro de terminación de la traducción que acorta la proteína y por lo tanto, probablemente, la proteína Omp31b no se localice en la membrana externa de estas dos especies al perderse el residuo fenilalanina terminal presente en las PMEs y que es esencial para una correcta translocación de la proteína.(114)
- El hallazgo de una delección de 15 kb en *B. ovis* que incluye a *omp25b*, por lo que esta proteína no se hallaría presente en la membrana externa de esta especie rugosa.(99) Además, en este estudio se pudo observar que esta delección afectaba también a otra serie de genes, entre los cuales se encontraron *wboA* y *wboB*, implicados en la síntesis de las cadenas polisacáridicas O del lipopolisacárido.(33, 36) Esto explicaría el fenotipo rugoso que presenta *B. ovis*, sin embargo, la presencia de estos dos genes en la bacteria mediante complementación, no confirió el fenotipo liso a esta especie.(99) Por tanto, otros genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido en fase lisa se hallan defectuosos o ausentes en *B. ovis*, tal y como se ha demostrado recientemente.(115) Adicionalmente, se ha señalado que este fragmento de ADN que se encuentra delecionado en *B. ovis*, podría tratarse de una isla genómica, ya que cumple con las características descritas para las mismas. Así, se ha sugerido que esta isla genómica podría haber sido adquirida por el

ancestro común de *Brucella* mediante transferencia horizontal, y posteriormente, haberse escindido en *B. ovis*.(116)

- Por otro lado, en *B. abortus*, *B. canis* y en algunas cepas aisladas de mamíferos marinos, se detectó la presencia de una inserción o una delección de un nucleótido en el gen *omp25b*, la cual hace que la proteína sintetizada sea significativamente más corta y además, pierda el residuo fenilalanina C- terminal necesario para ser exportada a la membrana externa. Por ello, no se espera la presencia de la proteína Omp25b en la membrana de dichas cepas. En algunas cepas aisladas de cetáceos, se observó incluso, una inversión de un fragmento de ADN de 1747 pb en la zona donde se ubica el gen *omp25b* y que también provocaría en estas cepas, la síntesis de una Omp25b truncada y posiblemente no funcional.(114)
- En cuanto a los genes *omp25c*, *omp25d* y *omp22*, se vio que estaban bastante conservados en este género, por lo que se espera que las PME's que codifican se encuentren formando parte de la membrana externa de las seis especies clásicas de *Brucella* y de cepas procedentes de mamíferos marinos, con la excepción quizás, de la ausencia de Omp22 en algunas cepas aisladas de cetáceos.(99)

Por último, cabe señalar, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios sobre polimorfismo que incluyen los genes que componen la familia *omp25/omp31*, y han permitido el hallazgo de marcadores específicos permitiendo identificar mediante PCR múltiple, las seis especies clásicas del género *Brucella*, e incluso también, las nuevas especies descritas recientemente.(117-119)

2.2.4 Implicación en la virulencia.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las PME's se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y entran en contacto directo con las células y los efectores de la respuesta inmune del organismo hospedador, por lo cual también son unas buenas candidatas a ser importantes factores de virulencia de las especies de *Brucella*. Por tanto, su estudio dentro de este campo es de gran interés, ya que puede proporcionar un conocimiento más amplio sobre los mecanismos de virulencia empleados por este género y podría además, permitir el desarrollo de nuevas vacunas atenuadas mejores a las existentes actualmente.

En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PMEs de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella*. Así, por ejemplo, se ha observado que cepas mutantes de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis* que no sintetizan la proteína Omp25, se encuentran atenuadas en ovejas (*B. melitensis*), en cabras (*B. abortus*) y en ratón (todas ellas).(120, 121) Hasta el momento no se conoce con exactitud la razón de esta atenuación, pero podría estar relacionada con el hecho de que se ha demostrado que la proteína Omp25 de *B. suis* se encuentra involucrada en la inhibición de la producción de TNF α por parte de macrófagos humanos.(122) De acuerdo con esto, en infecciones causadas por cepas mutantes Δ omp25, las células inmunes llevarían a cabo una completa síntesis de esta citocina proinflamatoria y se activarían correctamente los mecanismos antibacterianos de defensa del organismo hospedador, los cuales podrían ser responsables de la atenuación mostrada por estas mutantes de *Brucella*. Asimismo, también se ha comprobado que la proteína Omp25 está implicada en la permeabilidad de *B. suis* en medio ácido, el cual, es necesario para que esta bacteria inicie con éxito el parasitismo intracelular.(123) Por otra parte, se ha observado que en cepas mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador de dos componentes *bvrB/bvrS* que se hallan atenuadas, se expresa menos el gen *omp25* y la proteína Omp25 prácticamente no se sintetiza.(124-126) Por ello, se ha sugerido que la reducción de la virulencia de estos mutantes podría ser debida, al menos en parte, a la ausencia de esta proteína en la bacteria. Sin embargo, resultados obtenidos en otros estudios han demostrado que cepas de *B. abortus* 2308 y *B. ovis* PA que portan el gen *omp25* inactivado, no se encuentran atenuadas en ratón, lo que descarta la implicación de la proteína Omp25 en la virulencia de estas cepas.(46, 127)

En cuanto a la otra proteína mayoritaria que compone esta familia de PMEs, Omp31, se sabe que no es necesaria para la virulencia de *B. abortus*, ya que en esta especie no está presente el gen que la codifica debido a una delección en su genoma.(103, 128) Asimismo, se ha demostrado que tampoco afecta a la virulencia de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 en ratón, aunque cabe destacar que dicha cepa presenta niveles de la proteína Omp31 inferiores a los observados en la cepa parental de la que procede, por lo que no puede descartarse que este hecho esté relacionado con la atenuación de esta cepa.(112, 124) Por otro lado, también se ha comprobado, que la ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, a pesar de que reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón, no disminuye su persistencia en bazo.(46)

En contraste, se ha demostrado que la inactivación de los genes *omp25d* y *omp22* en *B. ovis* PA provoca una fuerte atenuación de la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa en ratón. Así, la cepa mutante $\Delta omp22$ presentó unos niveles muy bajos de colonización esplénica en la primera semana post-infección (p.i.), siendo completamente eliminada del bazo en la segunda semana p.i., mientras que el mutante $\Delta omp25d$ no se detectó a partir de la tercera semana p.i.. El hecho de que ambos mutantes mostraran defectos en su membrana externa menores o iguales a los observados en otras cepas mutantes en genes de la misma familia que no se estaban atenuadas sugiere que las proteínas Omp25d y Omp22 podrían estar directamente involucradas en la virulencia de *B. ovis* PA, pudiendo tener un papel importante en la penetración y/o en la multiplicación de este microorganismo en las células hospedadoras.(46) Por el contrario, en el caso de los mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador de dos componentes *bvrR/bvrS* (129) mencionados anteriormente, a pesar de que se ha observado que tampoco sintetizan la proteína Omp22 y que se ha llegado a pensar que su ausencia podría estar relacionada con la atenuación que muestran dichas cepas en ratón, no se ha podido demostrar su implicación en la virulencia de esta cepa lisa.(101, 125)

2.3 Sistema de secreción Tipo IV

El Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) es un complejo multiproteico situado en la envoltura de los microorganismos, cuya función principal es la de secretar macromoléculas al exterior. Se ha observado que este sistema se encuentra presente en patógenos Gram negativos, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* o *Legionella pneumophila*, en los cuales interviene transfiriendo moléculas de ADN, toxinas o proteínas efectoras desde el patógeno bacteriano a las correspondientes células hospedadoras.(130, 131) El T4SS mejor estudiado hasta el momento es el perteneciente a *A. tumefaciens*. Está formado por 11 proteínas que se disponen de la siguiente manera: VirB6-VirB10 forman un núcleo poroso en el espacio periplásmico que atraviesa las dos membranas de la envuelta celular; por encima de él, mayoritariamente subunidades de VirB2 y VirB5, conforman una estructura en la superficie de la bacteria mediante la cual ésta se pone en contacto con la célula hospedadora;(132) las proteínas VirB4 y VirB11, junto con VirD4 localizada en el citoplasma, son las que proporcionan la energía suficiente al sistema para que ejerza su función biológica, ya que son NTPasas; VirB3 parece ser una proteína de membrana interna cuyo extremo C- terminal reside en el citoplasma y que participa en la unión de las subunidades VirB2 y VirB5; y finalmente, VirB1 es una proteína que presenta actividad lítica transglicosilasa que probablemente sea utilizada para facilitar el ensamblaje de los componentes del sistema T4SS mediante degradación del péptidoglucano.(133)

En el género *Brucella*, la presencia del T4SS se detectó inicialmente en *B. suis* al identificarse en un mutante atenuado de esta cepa, las secuencias cromosómicas que se habían visto interrumpidas por inserción de un transposón. Así, se vio que éstas contenían genes homólogos a *virB9* y *virB10* de *Agrobacterium tumefaciens*.(134) Actualmente se sabe que el T4SS de *Brucella* spp. se encuentra codificado por el operón *virB*, el cual está formado por 12 genes (*virB1* a *virB12*) que se transcriben a partir de un único promotor localizado delante de *virB1*. En el caso de *Brucella* spp., se ha observado que la NTPasa VirD4 no se encuentra formando parte de su T4SS. Sin embargo, a cambio de la pérdida de un homólogo de esta proteína, este género presenta un gen extra en el operón: *virB12*. Se ha observado que éste codifica una proteína que presenta un motivo consenso de lipoproteínas y la secuencia señal para ser exportada a la membrana externa del microorganismo.(135)

Hasta el momento, existen evidencias genéticas y bioquímicas que indican que el T4SS del género *Brucella* realiza una función similar a la que lleva a cabo el de *Legionella pneumophila*; secretar proteínas efectoras a la célula hospedadora que alteran el tráfico intracelular de la bacteria. Recientemente se han identificado posibles proteínas efectoras secretadas por el T4SS de *B. abortus* 2308, como una chaperona (Dnak), una peptidil-prolil isomerasa (PPIasa), una coloil-glicina hidrolasa (CGH) y dos proteínas designadas como VceA y VceC (ésta última secretada también por *B. suis* 1330).(136) Aunque se desconoce la función biológica que poseen estas moléculas efectoras transportadas por esta maquinaria, se ha demostrado que la expresión del operón *virB* es necesaria para que se lleven a cabo las asociaciones entre las BCVs y el retículo endoplasmático, esenciales para el desarrollo del fagosoma replicativo.(137) Así, se ha comprobado que las vacuolas que transportan cepas mutantes en este operón de estirpes lisas de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) no interactúan con el retículo endoplasmático y se fusionan con los lisosomas, degradándose la bacteria en los fagolisosomas resultantes.(137, 138) De acuerdo con estos resultados, se ha observado una marcada atenuación de estas cepas mutantes en comparación con las cepas parentales correspondientes, tanto en cultivos celulares de macrófagos, de células Hela y de células dendríticas como en los modelos animales, (ratón).(134) Estos estudios parecen indicar además, que *virB1*, *virB7* y *virB12* son los genes menos esenciales para la virulencia del género *Brucella*.(139)

Por otra parte, se ha identificado en *B. suis* una proteína periplásmica denominada BvfA que aparte de ser necesaria para la virulencia de la bacteria, se ha observado que el gen que la codifica muestra un patrón de regulación similar al de los genes *virB*, expresándose cuando se produce la acidificación dentro de la vacuola. Aunque se desconoce en la actualidad la función la cual lleva a cabo, este hecho hace pensar que se encuentra involucrada en el establecimiento del nicho de replicación intracelular de *Brucella*.(139)

Finalmente, algunos trabajos han señalado que el operón *virB* podría estar también involucrado en la entrada de las estirpes lisas de *Brucella* en los macrófagos a través de la vía mediada por las “balsas lipídicas”.(140, 141) Sin embargo, la obtención de otras evidencias experimentales contradictorias, ponen en duda la implicación del T4SS en este proceso.(142) Por el contrario, sí está totalmente aceptado que este sistema desempeña un papel importante en la citotoxicidad que muestran mutantes rugosos derivados de especies lisas de *Brucella* en cultivos de macrófagos murinos.(141)

2.4 Sistemas reguladores de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son el mecanismo predominante para la transducción de señales en bacterias y están típicamente compuestos por una proteína histidina quinasa sensora y un factor de regulación de la expresión génica. Mediante la utilización de estos sistemas, la bacteria es capaz de ajustar individualmente la transcripción de ciertos genes en respuesta a un estímulo ambiental. En el género *Brucella* se ha detectado la presencia potencial de más de 20 sistemas de dos componentes mediante el análisis de su genoma, sin embargo pocos son los que han sido confirmados y descritos hasta el momento.(143)

El análisis de diversas cepas mutantes de *B. abortus* 2308 que mostraban una reducida resistencia al péptido catiónico polimixina B, condujo al descubrimiento en este género del denominado sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS.(129) Un estudio filogenético reveló además, que éste presentaba homología con los sistemas de dos componentes ChvI/ChvG y ChvI/ExoS de *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti* respectivamente, los cuales están involucrados en las relaciones de patogenicidad y de simbiosis que establecen estas bacterias con las células eucariotas vegetales.(144)

El estudio de las cepas mutantes en el sistema regulador de dos componentes *bvrR/bvrS* de *B. abortus* 2308 que se hallaban atenuadas en cultivos celulares y en ratón, revelaron que este sistema se encuentra implicado en el control de la expresión de genes responsables de mantener la integridad de la envoltura celular de esta bacteria.(129, 145) Así, se ha observado que la disrupción del sistema BvrR/BvrS en *B. abortus* 2308 altera la expresión de genes que codifican proteínas de membrana externa, como Omp25 y Omp22, y de genes que se hallan involucrados en la acilación del lípido A.(126, 146) Debido a esto último, estas cepas mutantes poseen un lípido A compuesto por ácidos grasos con cadenas más cortas que las observadas en las cepas parentales correspondientes. Esta diferente composición altera la permeabilidad de la membrana de los mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$, provocando un aumento de su sensibilidad a la acción bactericida de los péptidos catiónicos y que podría explicar en parte, la atenuación que muestran.(45) En cambio, se ha demostrado que la ausencia de Omp25 y Omp22 en la membrana externa de *B. abortus* 2308 no está relacionada con la atenuación que presentan estas cepas mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$ en virulencia. Cabe destacar que Salhi *et al.* en 2003 también obtuvieron un mutante atenuado de *B. suis* en este

sistema de dos componentes en el cual, sin embargo, no observaron que la expresión del gen *omp25* se hallara alterada en comparación con la de la cepa parental.(101, 119)

Por otra parte, se ha demostrado que mutantes en este sistema regulador de dos componentes de *B. abortus* 2308 no incorporan ni activan pequeñas GTPasas de la subfamilia Rho (como *cdc2*) requeridas para la polimerización de actina, por lo que se muestran incapaces de penetrar en células HeLa en cultivo, permaneciendo unidos a la superficie celular.(125) Además, a pesar de que todavía se desconoce el estímulo ambiental al que responde este sistema regulador, se cree que podría ser a un pH ácido tal y como sucede con el perteneciente a *Agrobacterium*. De ser verdad, aparte de ser crucial este sistema en *B. abortus* 2308 para el mantenimiento de su homeostasis celular y la invasión de células hospedadoras, constituiría también un importante factor en su adaptación y desarrollo de un nicho replicativo intracelular.(147)

En los últimos años se han descrito otros sistemas reguladores de dos componentes en *Brucella* spp.. Uno de ellos, formado por la histidina quinasa PdhS y el regulador de respuesta DivK, muestra homología con el sistema PleC-DivJ de *Caulobacter crescentus* implicado en la formación de células hijas asimétricas. Esta división asimétrica también se ha observado en *B. abortus* 544, la cual se ha demostrado que se encuentra controlada por el mencionado sistema PdhS-DivK.(148) Por otro lado, se ha descubierto la presencia en *B. melitensis* y en *B. abortus* de un sistema fotosensor constituido por un complejo proteico denominado LOV-HK. Éste está compuesto por un dominio LOV (sensor de Luz, Oxígeno y Voltaje) y un dominio histidina quinasa en los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente. Cuando el complejo LOV-HK detecta luz, absorbe fotones y emplea esa energía para crear un enlace entre sí misma y con una molécula del cofactor flavina mononucleótido (FMN). Esto da como resultado, un incremento de la actividad enzimática quinasa del fotosensor que termina repercutiendo en cambios en la expresión génica de la bacteria. Se ha observado que cepas mutantes de *B. abortus* que portan defectos en este fotosensor se encuentran atenuadas en cultivos de macrófagos y en ratón. Estos resultados se repiten cuando la cepa silvestre se cultiva en condiciones de oscuridad, por lo que parece claro la existencia de un estrecho vínculo entre el papel realizado por el fotosensor LOV-HK y un aumento en la virulencia de la bacteria inducido por exposición a luz visible.(143, 149)

3. Gen *rpsL* (Proteína ribosomal S12)

El operón *str* es uno de los más conservados en la evolución de los organismos procariotas. Está compuesto por cuatro genes: *rpsL* (que codifica la proteína ribosómica S12), *rpsG* (proteína ribosómica S7), *fusA* (factor de elongación G, EF-G) y *tufA* (factor de elongación Tu, EF-Tu).(150) El operón se transcribe desde su propio promotor y está sometido a control traduccional por parte de uno de los componentes que codifica (S7).(151)

La proteína ribosomal S12 es una proteína altamente conservada localizada en el centro funcional de la subunidad 30S del ribosoma. A partir de cristales de alta resolución de la subunidad 30S de *T. thermophilus* se ha visto que la proteína S12 juega un papel importante en el proceso de selección del tRNA.(152, 153) Durante el proceso de selección del tRNA se producen contactos sucesivos entre la proteína S12 con algunos elementos estructurales importantes del rRNA 16S y con la subunidad 50S.(154, 155) Hay pruebas de que la proteína ribosomal S12 modula un cambio conformacional en la hélice 27 (H27) del rRNA 16S y puede influir en un equilibrio dinámico entre dos estados conformacionales alternos del ribosoma durante el ciclo de elongación. Se ha visto que algunas mutaciones en S12 estimulan la translocación no enzimática (independiente de EF-G). Se piensa que las mutaciones conocidas en S12 afectan la precisión de la lectura y lo hacen porque afectan la estabilidad de dichas interacciones.(156, 157)

Las mutaciones en el gen *rpsL*, que codifica la proteína S12, a menudo afectan la respuesta de la célula a estreptomicina, que causa errores de lectura del código genético. Se conocen distintos fenotipos según la respuesta de la célula a la estreptomicina, incluyendo sensibilidad, resistencia, pseudo-dependencia, dependencia e independencia.(158, 159) Estas mutaciones se encuentran agrupadas en dos zonas de la proteína S12 que están muy próximas a H18, H27 y H44, que son elementos clave del rRNA 16S. Las mutaciones en H18 y H27 también confieren resistencia a estreptomicina en varios organismos y la conformación de H27 y H44 se ve perturbada por algunas mutaciones en S12 que confieren dependencia a estreptomicina.(156, 160) La severidad del fenotipo puede ser entendida en el contexto de la transición abierta-cerrada que se produce durante la selección del tRNA. Estas mutaciones pueden perturbar el equilibrio conformacional hacia el estado abierto en diversos grados, con las mutaciones que causan dependencia como las más severas. En este caso la estreptomicina puede actuar restableciendo el equilibrio. Los fenotipos de pseudo-dependencia y algunos de resistencia pueden alterar también este equilibrio aunque en un grado

menor. Poco se conoce acerca de la base estructural de la dependencia a estreptomycinina o acerca de la naturaleza de las alteraciones de la cadena lateral que pueden influenciar este fenotipo; se ha visto que una mutación en un aminoácido concreto de la proteína S12 confiere dependencia o resistencia a estreptomycinina de acuerdo al tamaño de la cadena lateral del aminoácido cambiado.(153, 159, 161)

Por ejemplo, los ribosomas mutantes de *E. coli* que portan en la proteína S12 las mutaciones P90R, P90L, P90E, P90M y P90W confieren un fenotipo de dependencia a estreptomycinina; por otro lado, los mutantes con cadenas laterales más pequeñas, como P90A, P90G y P90C, confieren un fenotipo de resistencia a estreptomycinina.

No todas las mutaciones que confieren un fenotipo respecto a estreptomycinina se reducen a un único cambio de aminoácido. Se ha descrito un proceso en *E. coli* por el cual se genera una segunda mutación en el gen *rpsL* de bacterias con una mutación previa que les confería dependencia a estreptomycinina. Estas mutaciones auxiliares parece que se producen pocas generaciones después de la primera mutación en alguna clase de proceso de hipermutación.(162)

Aunque las mutaciones espontáneas en las que se genera una sustitución de una base varían según el tipo de secuencia, se considera que se trata de un evento inusual ($10^{-9} - 10^{-10}$ por par de bases y generación, $10^{-6} - 10^{-7}$ por gen) que se produce al azar entre los diferentes genes, excepto en colonias viejas en placa, donde se han encontrado tasas de mutación anormalmente superiores tras varios días.(163) El hecho de que se acumulen mutaciones auxiliares en S12 es por tanto muy improbable y solo puede ser debido a algún proceso de hipermutación y selección.

En cuanto la implicación en la virulencia de mutaciones restrictivas y no restrictivas en el gen *rpsL*, en un reporte realizado por Björkman en 1998, mostraron un efecto en la disminución en la virulencia y en la tasa de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium, en este estudio se evaluaron otras mutantes con resistencia a otros antibióticos como rifampicina y ácido nalidíxico que también fueron avirulentas en un modelo de ratón. En este trabajo evaluaron mutaciones compensatorias las cuales en la mayoría de las mutantes recobraron su efecto virulento y aumento en la tasa de crecimiento sin afectar la resistencia a los antibióticos, a excepción de la mutante en el gen *rpsL*.(164)

En 1999 Björkman y colaboradores demostraron que la dependencia a la estreptomycinina puede ser revertida fenotípicamente por mutaciones en los genes *rpsD* y *rpsE*. Tales mutaciones

compensatorias han demostrado tener un fenotipo ram (mutaciones ribosomales ambiguas) incrementando los niveles de errores traduccionales. En el trabajo previo se demostró que alelos restrictivos del gen *rpsL* están asociados con la pérdida de virulencia en *Salmonella* Typhimurium. Por lo tanto para probar si mutantes ram podrían revertir esta pérdida en la virulencia, se aislaron un conjunto de alelos del gen *rpsD* de *Salmonella* Typhimurium. En este estudio se encontró que alelos del gen *rpsD* restauraron la virulencia de las cepas portadoras de alelos restrictivos del gen *rpsL* a un nivel próximo de la cepa de campo. Inesperadamente tres de los siete alelos del gen *rpsD*, mostraron tener un fenotipo típico de los alelos restrictivos del gen *rpsL*, siendo resistentes a la estreptomicina y restrictivos en la traducción. Por lo que solo los dos alelos restrictivos del gen *rpsL* están asociados con una pérdida en la virulencia.(164)

En otro trabajo se aislaron mutantes resistentes a estreptomicina de *Erwinia carotovora*. La secuenciación del locus *rpsL* mostró que cada mutante era de cambio de sentido, con un solo cambio de base, lo que resultaba en la sustitución del aminoácido lisina, treonina o asparagina en el codón 43 en comparación con la cepa de campo. El análisis fenotípico mostró que las mutantes podrían ser separadas en dos grupos: las mutantes K43R que mostraron una disminución en la producción del antibiótico carbapenem (Car) y poco efecto en la producción de las exoenzimas y en la virulencia en ensayos de virulencia en tubérculos (papa), por otro las mutantes K43N y K43T que mostraron un efecto pleiotrópico provocando una reducción en la virulencia y en la producción de las exoenzimas y del antibiótico carbapenem (Car). El efecto sobre la producción del antibiótico carbapenem fue debido a una disminución de la transcripción de los genes encargados de la biosíntesis de Car. Por último, un análisis proteómico de la mutante K43T indicó que la abundancia de un subconjunto de proteínas intracelulares se vio afectado por la mutación del gen *rpsL*.(165)

4. Respuesta Inmune.

Como ya se ha mencionado antes *Brucella* es una bacteria intracelular facultativa que infecta en forma persistente a animales domésticos, salvajes y al humano. Este género de bacterias se replican en los fagocitos mononucleares del hospedero, evadiendo los mecanismos solubles extracelulares de la respuesta inmune. La patogénesis de la infección por *Brucella* es bastante compleja, depende del patógeno y de los mecanismos de defensa que se activan, donde la inmunidad celular, macrófagos, citocinas tipo TH1 y células citotóxicas participan activamente en la resolución de la enfermedad.(166)

La resistencia depende del desarrollo de una inmunidad mediada por células, con la participación de células T CD4+ de tipo Th1, que secreten interferón gama (INF- γ), citocina que estimula la actividad bactericida por macrófagos y la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+, que son capaces de matar células infectadas con *Brucella*. *Brucella* posee como componentes antigénicos importantes el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas, entre las que se destaca por su demostrada capacidad inmune la superóxido dismutasa (SOD). (167)

A continuación se describen los mecanismos inmunológicos frente a la infección por el género *Brucella*.

4.1 Respuesta Inmune Innata

En estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el huésped.(68) Los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y el complemento juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo.(168)

Uno de los primeros eventos que ocurren después de la entrada de la *Brucella* al organismo es la activación del complemento por la vía alterna; sin embargo, se ha demostrado que esta vía es incapaz de eliminar la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308.(57) Por lo tanto, la lisis de *Brucella* estaría mediada principalmente por la vía clásica del complemento, la cual es dependiente de anticuerpos.(26)

Los neutrófilos están implicados en el desarrollo de una defensa temprana frente a una infección por *Brucella* mediante la fagocitosis y posterior destrucción del microorganismo. En primer lugar, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados o derivados del

microorganismo,(169) para posteriormente fagocitar la bacteria, preferentemente opsonizada.(170) Sin embargo, la bacteria ingerida puede sobrevivir al mecanismo destructivo de los fagocitos, gracias a moléculas de bajo peso molecular que inhiben el sistema antibacteriano mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-haluro.(171)

Los macrófagos juegan un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa.(29) En este sentido, se ha encontrado que el LPS de *Brucella* interfiere con la vía de presentación de antígenos por MHC clase II.(172) Las funciones bactericidas de los macrófagos frente a *Brucella* se encuentran centradas en la actividad de las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno, las cuales son inducidas por IFN- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). (68, 173) Los receptores Toll-like (TLR) juegan un rol importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores presentes en células fagocíticas profesionales reconocen productos microbianos uniéndose directamente a ellos e inducen señales intracelulares que activan factores de transcripción (como NF- κ B) que modulan la producción de citocinas. Estos receptores pueden ser activados por diversos productos microbianos; el receptor Toll-like 4 (TLR4) es activado por LPS, el TLR9 por ADN bacteriano, el TLR2 por productos de la pared celular de bacterias Gram positivas y TLR5 por flagelina.(174)

Las células NK forman parte de la primera línea de defensa contra *Brucella* y una vez que son activadas pueden eliminar células infectadas. *B. abortus* puede activar la actividad lítica de las células NK, estimulando la producción de interleucina- 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígenos. IL-12 además estimula a las células NK a secretar IFN- γ .(168, 175)

4.2 Respuesta Inmune Adaptativa

Está ampliamente aceptado que la inmunidad mediada por células es el mecanismo efector más relevante en la protección frente a *Brucella* debido a que es un parásito intracelular. Las citocinas son moléculas clave para una adecuada respuesta inmune mediada por células.(176) La exposición prolongada de un animal a *Brucella* cambiaría la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral (caracterizada por la producción de

IgM e IgG1), respuesta que se relaciona con una disminución en la actividad de las células T ayudadoras tipo 1, con una baja en la producción de IFN- γ , favoreciéndose de esta forma un incremento de la actividad de las células T ayudadoras de tipo 2, disminuyendo la respuesta inmune celular, lo que favorecería de esta forma el establecimiento de la enfermedad crónica.(177) Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basan principalmente en tres mecanismos. Primero, la producción de IFN- γ por células T CD4+, CD8+, y células T $\gamma\delta$, que activa la función bactericida en macrófagos. Segundo, la citotoxicidad de células T CD8+ y células T $\gamma\delta$ que eliminan macrófagos infectados. Y tercero, isotipos de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar su fagocitosis.(68)

Después de la activación de los macrófagos, las células T inmaduras (Th0) se diferencian de células efectoras y de memoria, que están programadas para secretar distintos patrones de citocinas.(168) Las células Th1 secretan interleucina-12 (IL-2) e IFN- γ , mientras que los linfocitos Th2 producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10).(72) La generación de células Th1 de memoria sólo puede realizarse si la respuesta inicial al estímulo se asocia a la producción de IL-12 e IFN- γ .(178) El rol principal de la secreción de IFN- γ por las células Th1 en la inmunidad contra *Brucella* es activar la función bactericida de los macrófagos y linfocitos T CD8+ citotóxicos, así como la estimulación de la secreción de IgG2a.(68, 178) En términos numéricos, la población celular predominante es la de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ , responsables de la activación de macrófagos y la atracción de células inflamatorias efectoras, de ahí su importancia en promover la respuesta celular adquirida contra *Brucella*. Además, el IFN- γ inhibe la acción de IL-4 sobre las células T.(178, 179)

Las células citotóxicas T CD8+ pueden actuar como células efectoras y eliminar macrófagos infectados con *Brucella* directamente.(173, 179) Las células blanco son reconocidas por las células citotóxicas en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y son eliminadas por la acción de perforinas y granzimas.(168)

Las células T $\gamma\delta$ representan una pequeña población de linfocitos, con un patrón único de reconocimiento de antígenos. En humanos, las células T $\gamma\delta$ controlan el aumento en el número de microorganismos ya que secretan TNF- α e IFN- γ , después de ser activadas por antígenos no peptídicos, en su mayoría fosfoantígenos, los cuales no son presentados en el contexto del MHC.(68, 166, 180) Mediante la secreción de estas citocinas, activan la función bactericida de los

macrófagos y, además, son capaces de lisar células infectadas por citotoxicidad directa *in vitro*. El rol de estas células *in vivo* aún no ha sido determinado, aunque se cree que son parte de la inmunidad innata.(68, 179) En bovinos menores de un año, la población celular predominante es la de células T $\gamma\delta$ y no la de células T $\alpha\beta$, lo que sugiere que el rol de este tipo celular es más significativo en la infección del ganado con brucelosis.(68) De todas maneras, en bovinos, la producción de IFN- γ por estas células es menor que la producida por las células CD4+.(166)

Las citocinas son moléculas clave en el control de la brucelosis, ya que permiten dirigir las respuestas hacia una respuesta inmune celular o humoral. *B. abortus* estimularía a las células presentadoras de antígenos para que secreten IL-12, la que induce a los linfocitos Th0 a diferenciarse en linfocitos Th1, secretores de IFN- γ .(68, 173, 181) Sin embargo, otros autores señalan que *Brucella* no es un inductor potente de la secreción de IL-12.(182)

IFN- γ participa en la regulación de los mecanismos defensivos de los macrófagos y es considerado un factor crucial para el desarrollo de la protección contra la infección por *Brucella*.(176)

Interleucina-18 (IL-18) citocina sintetizada por macrófagos activados, también estimula la producción de IFN- γ , por lo que actúa sinérgicamente con IL-12 sobre las células T en la estimulación de la respuesta mediada por células contra *Brucella*.(183, 184)

TNF- α contribuye a la resistencia frente a *Brucella* por una vía independiente de IFN- γ , estimula el influjo de fagocitos al sitio de infección y participa en la activación de los macrófagos.(185)

IL-10, producida por linfocitos CD4+ Th2, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, inhibe la respuesta Th1, ya que disminuye la capacidad de presentar antígenos de los macrófagos e inhibe la secreción de IFN- γ , por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a la infección por *Brucella*.(175, 180)

Las células B son estimuladas directamente por las células T a través de la interacción de moléculas coestimuladoras como CD40 y su ligando CD40L presente en la célula T, lo cual, junto a las citocinas liberadas, son importantes en promover el cambio de isotipo de IgM a IgG.(168) Con respecto al rol que cumplirían los anticuerpos durante la infección por *Brucella*, se ha visto que tanto IgM como IgG, en bajas concentraciones, son capaces de promover la lisis de *Brucella* a través de la vía clásica del complemento.(58) También se han encontrado títulos elevados de IgG anti-SOD Cu/Zn en animales infectados, pero aún no se determina si estos anticuerpos juegan un rol importante en la inmunidad contra *Brucella*.(186) La opsonización acoplada al aumento de muerte de

Brucella intracelular podría ser considerada como el principal rol de los anticuerpos contra la infección con *Brucella*. Aunque paradójicamente en brucelosis bovina la alta concentración de IgG durante la infección activa previene la lisis extracelular de la bacteria mediada por complemento y promueve la fagocitosis bacteriana, aumentando la localización intracelular de la bacteria y la extensión de la enfermedad.(68)

5. Vacunación

La vacunación es considerada como una herramienta importante para limitar la diseminación de la brucelosis entre los animales. En nuestro país y de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) la vacunación de ovinos y caprinos, se realiza con *B. melitensis* Rev1.

La cepa vacunal Rev1 fue elaborada a mediados de la década de los 50 por Elberg y Herzberg. La cepa dependiente a estreptomycinina se desarrolló de una sola colonia de la cepa *B. melitensis* 6056, seleccionado para el crecimiento en presencia de altas concentraciones de estreptomycinina.(187-190)

La vacuna Rev1 es considerada la mejor cepa para el control y prevención de la brucelosis caprina. Con el uso intensivo de estas vacunas se ha demostrado que disminuye la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, también se sabe que existen efectos adversos: aunque la vacuna previene abortos no necesariamente protege de la enfermedad, también se ha observado que la vacuna Rev1 persiste en los animales en los que se puede diseminar la enfermedad horizontalmente en el hato, además de que llega a infectar a los humanos, demostrando los riesgos biológicos que esta cepa puede ocasionar.(10, 24) La vacunación de las hembras preñadas en el último tercio de la gestación puede ocasionar abortos y hembras que están en lactación pueden secretar la cepa vacunal por la leche, infectando a las crías.(11, 191-193)

Debido a que la vacuna tiene un fenotipo liso, los anticuerpos generados pueden confundir en las pruebas serológicas de diagnóstico evitando la diferenciación de animales infectados de animales vacunados, eso dependerá de la ruta de vacunación.(10, 112, 192) Para evitar estos problemas se ha sugerido aplicar una dosis reducida de 5×10^4 UFC. Algunos países han utilizado este método y han reportado resultados eficientes para el control de *B. melitensis* pudiéndose utilizar en la vacunación intensiva, sin embargo, se corre el riesgo de inducir una pobre respuesta inmune por lo que no se recomienda ampliamente. Así mismo se han propuesto diferentes vías de vacunación: la vacunación intradérmica se considera la ruta menos efectiva, la vacunación conjuntival es menos invasiva e igual de eficiente que la vacunación subcutánea en animales adultos pero tiene el mismo problema, no es lo suficientemente segura como para aplicarse sin saber la etapa de la gestación, por lo que se ha aplicado por esta vía dosis reducidas de Rev1, pero no confiere la inmunidad adecuada aún después de la revacunación.(10, 194)

Los animales se deben de vacunar de tres a siete meses de edad, empleando las dosis estándar, solo en animales adultos se utiliza la dosis reducida.(193)

El uso de bacterinas se han recomendado para animales jóvenes y adultos, pero estas vacunas confieren una menor inmunidad que la cepa Rev1, de igual manera han tenido inconvenientes prácticos tales como: reacciones locales intensivas, reacción positiva prolongada y la necesidad de revacunación, por lo que se ha demostrado que las vacunas vivas estimulan de forma constante al sistema inmune, logrando una mejor protección.(191, 192)

Para sustituir la cepa vacunal Rev1, se han evaluado vacunas vivas como una alternativa, tales como: *B. suis* cepa 2, *B. abortus* RB51, *B. abortus* S19 o *B. melitensis* (H38), entre otras; sin embargo estas no han sido útiles para la profilaxis de la brucelosis en pequeños rumiantes ya que inducen una pobre respuesta inmune, reacciones locales o reacciones serológicas falsas positivas, confirmando que la cepa Rev1 es la vacuna mas viable y efectiva para los pequeños rumiantes.(191-193, 195)

Utilizando el gen *wboA* se han construido mutantes de *B. melitensis* 16M y *B. suis*, generando cepas rugosas, VTRM1 y VTRS1 respectivamente, estas cepas se probaron en ratones para evaluar la virulencia residual, así como la protección conferida desafiando los animales vacunados. Se encontró que la virulencia de estas cepas es menor que la de sus progenitoras pero su atenuación no es tan marcada como la cepa vacunal para *B. abortus* RB51, sugiriendo que hay mas genes que juegan un papel importante en la atenuación. Debido a que ninguna de estas cepas indujo la producción de anticuerpos contra la cadena "O" se continúan probando en cabras y cerdos.(10, 195)

Al ser la cepa vacunal Rev1 biotipo1, resulta difícil diferenciarla de cepas de campo a partir de casos clínicos, para diferenciarla e identificarla se hace de forma fenotípica utilizando los métodos de diagnóstico convencionales, los cuales se basan en tres características: Rev1 crece muy lentamente, resistencia a estreptomycin y sensible a penicilina.(82) Con fines de obtener un diagnóstico mas certero y mas rápido se han empezado a usar técnicas moleculares, (10, 191) una de ellas se basa en la identificación del gen *omp2* donde se identifica el sitio *Pst* I, este método permite la diferenciación de cepas atípicas de *B. melitensis* y la cepa vacunal Rev1.(196) (24)

Otra técnica molecular es identificar una mutación del gen *rpsL*, este gen codifica para la proteína ribosomal S12, la cual esta asociada a la resistencia a estreptomycin. Ésta consiste en identificar una mutación en el codón 91, donde en el caso de la cepa vacunal Rev1 existe una mutación (Pro-

Leu), y su vez bloquea el sitio de reconocimiento de *Nci* I. Esta característica permite la diferenciación de la cepa vacunal Rev1 de las cepas de *B. melitensis* de forma rápida y específica. (82)

Debido a la similitud fenotípica que existe entre las cepas de campo de *B. melitensis* biotipo 1 y la cepa vacunal de *B. melitensis* Rev1, resulta difícil diferenciarlas a partir de muestras clínicas, por lo que el uso de secuencias especie-específicas podría ser útil en estos casos. (82, 196)

5.1. Otras investigaciones

Debido a los problemas ya mencionados se evaluaron dos aspectos importantes con el fin de aclarar las contradicciones reportadas por diferentes autores.

El primer aspecto y el más importante fue escoger la vacuna más adecuada y segura. Vacunas no vivas (*B. melitensis* 53H38 o similar a una bacterina) han sido recomendadas para la vacunación en hembras jóvenes y adultas, pero estas vacunas confirieron menos inmunidad que la cepa vacunal Rev1, además provocaron una intensa reacción local, una respuesta larga serológica y había la necesidad de la revacunación. (197)

Otras bacterinas tales como *B. abortus* 45/20, fue descartada por que los datos disponibles mostraron un bajo nivel de inmunidad conferida en pequeños rumiantes. Por lo tanto solo las vacunas vivas fueron consideradas como la mejor opción para campañas de vacunación masiva. Entre las dos vacunas vivas (*B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev1), la cepa vacunal Rev1 parece ser la mejor opción para la vacunación en pequeños rumiantes. (10)

Sin embargo es sabido que la dosis estándar (1×10^9) de Rev1 administrada subcutáneamente indujo abortos en hembras gestantes. La dosis reducida (1×10^4) de Rev1 aplicada subcutáneamente ha sido considerada para resolver este problema en cabras a expensas de disminuir el nivel de inmunidad conferida por la dosis estándar. (198) Sin embargo, evidencias de estudios de campo han sido limitados y contradictorios. Falade no reportó abortos después de vacunar a 35 ovejas subcutáneamente entre el segundo y cuarto mes de gestación con la dosis estándar de Rev1. (199) Sin embargo, otros reportaron que la dosis reducida de Rev1 (dosis de 1×10^5 - 10^7) indujo abortos cuando fue administrada subcutáneamente en ovejas durante el segundo y en el último tercio de la gestación. (200)

También fue punto de partida el determinar si la vacunación vía conjuntival era más segura que la vía subcutánea en ovejas gestantes. En un experimento comparativo, la vacunación vía conjuntival redujo los abortos en comparación a los inducidos por vía subcutánea aunque todavía hubo una proporción significativa de ovejas vacunadas vía conjuntival que excretaron la cepa vacunal y abortaron.(201) La mayoría de las vacunas que indujeron abortos fueron entre los días 40 y 60 post vacunación, sobre todo en el riesgo en función del mes de gestación que eran vacunadas. El porcentaje de abortos obtenidos fue menor cuando las ovejas fueron vacunadas en el último mes de gestación en comparación a cuando fueron vacunadas en el segundo mes de gestación.(201)

En otro experimento similar, cuando se aplicó la dosis estándar vía conjuntival durante la mitad de la gestación indujo un 70% de abortos en ovejas y cabras vacunadas. Estos autores reportaron que cuando se administró la dosis reducida de 1×10^8 de Rev1 vía conjuntival, indujo menos abortos que la administración de la dosis estándar en ovejas pero en cabras no.(202) Esto sugiere que dosis menores a 1×10^8 vía conjuntival podría ser un método más seguro en vacunación de ovejas gestantes, aunque la vacunación con la dosis reducida (1×10^6) por esta vía no confirió una adecuada inmunidad, aún después de la revacunación.(203) Por otra parte, se ha reportado que la vacunación vía conjuntival en ovejas gestantes con un rango de dosis de 1×10^6 y 1×10^7 puede inducir abortos en un número significativo de ovejas vacunadas. Por lo cuál, tanto la vacunación subcutánea y conjuntival con la dosis reducida no evita el riesgo de aborto, además de que el nivel de inmunidad conferida no es adecuado.(193)

5.2 Implementación de otras estrategias de vacunación para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes.

Los resultados de campo y experimentales obtenidos por los diferentes autores apoyan el concepto de que las diferencias en la virulencia residual y la inmunogenicidad de las distintas vacunas de Rev1 producidas en todo el mundo, podría explicar los resultados contradictorios obtenidos en las pruebas de campos realizadas en diferentes países. Además a falta de seguridad del protocolo y el riesgo de conferir una pobre inmunidad, el método de la dosis reducida no se debe recomendar como una alternativa del método con la dosis estándar. Finalmente, aunque la vacunación vía conjuntival es una estrategia más segura que la vía subcutánea para la administración de la cepa vacunal Rev1 en animales adultos, no es lo suficientemente seguro para ser aplicado sin tener en cuenta el estado de gestación de las hembras.

5.3 Uso de otras vacunas

- *B. suis* S2: es una cepa lisa atenuada de *Brucella*, fue aparentemente exitosa en el control de la brucelosis, mediante la administración vía oral en pequeños rumiantes, en China y Libia. Sin embargo se demostró que esta vacuna no es capaz de proteger frente al desafío contra *Brucella melitensis* en ovejas bajo condiciones experimentales.(204)
- *B. abortus*: es una cepa rugosa atenuada de *Brucella*, esta cepa ha sido reportada ser igual de eficiente que la cepa vacunal *B. abortus* S19 en el control de la brucelosis bovina, además de no inducir una respuesta serológica contra la cadena del antígeno O. Experimentos preliminares sugirieron que esta vacuna podría ser efectiva en la profilaxis contra la infección de *B. melitensis* en cabras. En contraste se ha demostrado que esta vacuna no confiere protección contra la infección de *B. ovis* en carneros bajo condiciones experimentales.(205)
- VTRM1: es una cepa viva rugosa, obtenida por mutagénesis de un transposón de la cepa virulenta *B. melitensis* 16M. la mutagénesis resultó en el truncamiento de un gen que codifica para la monosyltransferasa, una enzima necesaria para síntesis del LPS liso, por lo que esta cepa no interfiere con las pruebas serológicas. Sin embargo la vacuna VTRM1 no confirió una adecuada protección contra el desafío de *B. melitensis* en cabras.(11)

Por lo tanto, la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 sigue siendo la mejor opción para profilaxis para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes.

6. JUSTIFICACIÓN

En México, para controlar la enfermedad de acuerdo a la NOM-041-ZOO-1995, se utiliza la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev1, la cual es considerada la mejor vacuna contra la enfermedad en pequeños rumiantes, sin embargo las dosis estándar utilizadas en animales con una preñez tardía pueden ocasionar abortos y no necesariamente proteger contra la enfermedad, asimismo se ha reportado que inyecciones accidentales pueden infectar al humano, ya que esta cepa es viva y virulenta.

Por lo tanto es de suma importancia determinar si la mutación en los genes *omp31* y *rpsL* de *B. melitensis* disminuirá su virulencia generando así una potencial vacuna contra la brucelosis.

7. HIPÓTESIS

La construcción de dos mutantes en los genes *omp31* y *rpsL* de *Brucella melitensis* 133 disminuirán la virulencia de la cepa en ensayos in vitro en macrófagos murinos y células HeLa, generando un posible candidato vacunal.

8. OBJETIVO GENERAL

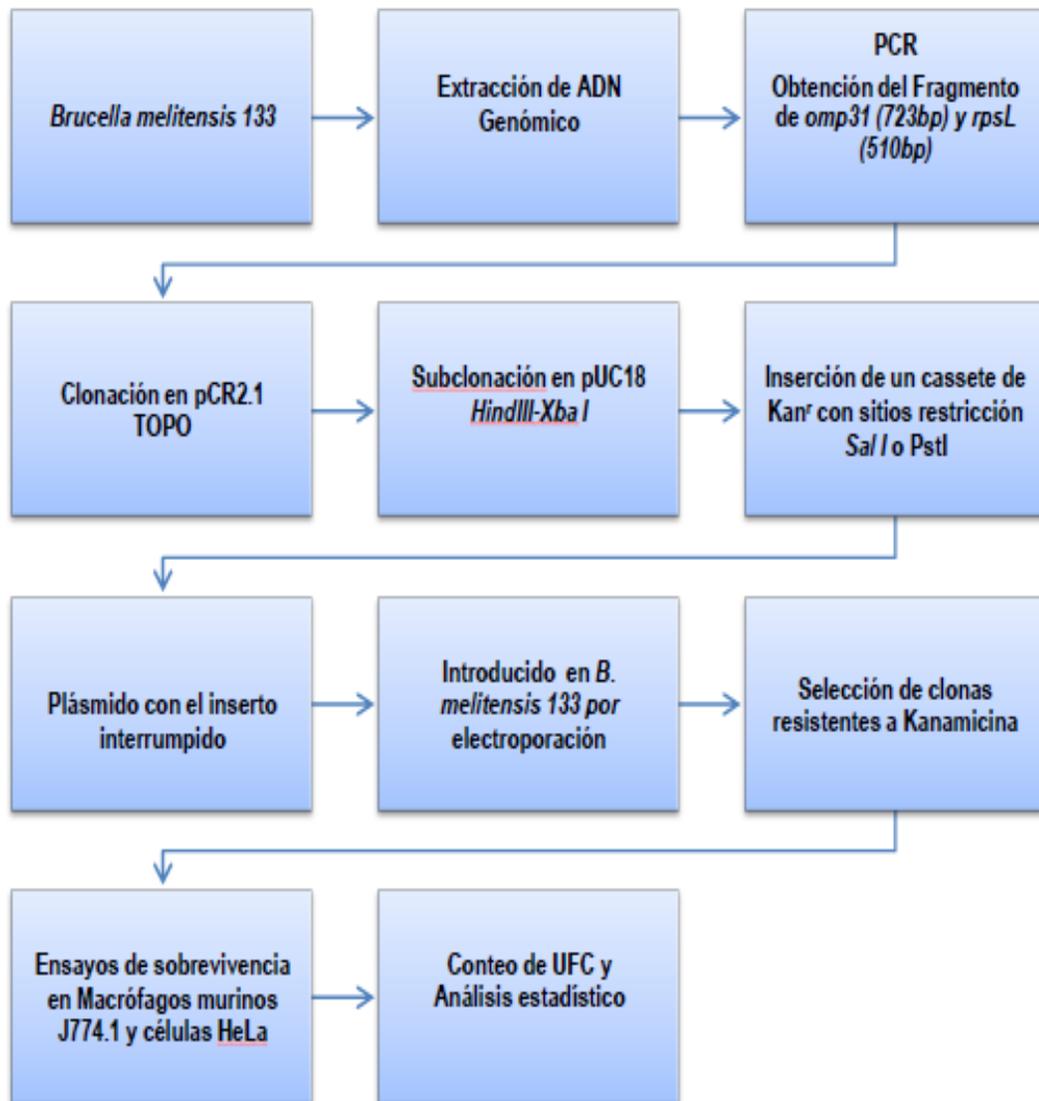
Elaborar un inmunógeno experimental contra *Brucella melitensis* mediante la construcción de dos mutantes, con la finalidad de disminuir la virulencia de la cepa.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mutar el gen *omp31* de *Brucella melitensis*.
- Mutar el gen *rspL* de *Brucella melitensis*.
- Evaluar las dos mutantes in vitro en ensayos de sobrevivencia en macrófagos murinos J774.1 y células HeLa.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

FIGURA 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

- Las cepa silvestre de *Brucella* empleada en la realización del presente trabajo tanto para la obtención de ADN cromosómico, amplificación de los genes *omp31* y *rpsL* y para los ensayos de infección es *Brucella melitensis* cepa Bm 133 biotipo 1 (cepa de referencia mexicana); la cuál fue cultivada en agar Brucella suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 3% (p/v) de extracto de levadura (EL) durante 72 h. a 37° C. Para la selección de las colonias mutantes de *Brucella* los medios de cultivo fueron suplementados con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Previo a su empleo, esta cepa fue caracterizada a través de pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos del género *Brucella* (Triple azúcar hierro (TSI), citrato, urea, ácido sulfídrico-indol-motilidad (SIM)), así como tinción de Gram. El manejo de la bacteria se realizó en la Unidad de Bioseguridad 2 del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- En el proceso de clonación molecular se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5α, la cual fue cultivada en agar y caldo Luria-Bertani (LB) durante 18 h a 37° C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) para el caso del plásmido pUC18 y pUC4K respectivamente.

9.2 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

- Línea celular HeLa: células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical.
- Línea celular de macrófagos J774.1: macrófagos derivados de un sarcoma reticular murino.

Ambas líneas celulares se cultivan de forma rutinaria en placas de 100 x 20 mm (Falcon®), a 37 °C y bajo una atmósfera controlada con elevada humedad y 5 % de CO₂. El medio de cultivo empleado es el medio basal de Eagle modificado por Dulbecco [Dulbecco's modified Tagle Medium (DMEM)] (Gibco-BRL), suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Gibco-BRL); un 5 % (v/v) para células HeLa y un 10 % (v/v) para los macrófagos, y con 4 mM de L-glutamina (Gibco-BRL) (medio DMEM completo). Cuando las líneas celulares alcanzaron un 75 % de confluencia en la placa de cultivo, se procedió a realizar subcultivos. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un lavado con PBS de las células HeLa y de los macrófagos J774.1 y a continuación, se desprendieron de la placa mediante la

utilización de una solución de tripsina-EDTA al 25% (Gibco-BRL) para las primeras, y mediante levantamiento mecánico por raspado, para las segundas. Posteriormente, tras ser resuspendidas y diluidas (1:10 para cultivos de HeLa y 1:4 para macrófagos J774.A1) en medio DMEM-completo, las células se depositaron en nuevas placas de cultivo.

9.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli* DH5 α

Para la extracción de ADN plasmídico procedente de *E. coli* DH5 α se empleó el protocolo de lisis alcalina (midi prep), siguiendo las instrucciones del protocolo descrito por Sambrook and Russell en 2001.

9.4 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO DE *Brucella melitensis* 133 biotipo 1

La obtención del ADN cromosómico de *Brucella melitensis* 133 biotipo 1, se realizó mediante el método de Tiocianato de guanidina, siguiendo las instrucciones del protocolo descrito por Sambrook and Russell en 2001. Previo a la extracción de ADN, la biomasa de los cultivos de la bacteria fue suspendida en 5 ml de agua destilada estéril e incubada en baño maría a 80° C durante 45 minutos para su inactivación.

9.5 VECTORES DE CLONACIÓN

- **pCR2.1 TOPO:** Plásmido abierto con extremos cohesivos con una timidina. Posee la enzima topoisomerasa I unida covalentemente al vector ("vector activado"). Tiene los promotores T7 y el gen LacZ. Confiere resistencia a kanamicina y ampicilina. (Figura 4 (A))
- **pUC18:** Es un plásmido artificial derivado del plásmido pBR322. El plásmido pUC18 tiene un tamaño 2686 pb y en su secuencia destacan dos genes que actúan como marcadores de selección. En primer lugar, un gen de resistencia al antibiótico Ampicilina (gen Amp^R) que confiere a las bacterias que incorporan este plásmido resistencia a dicho antibiótico. También contiene el gen lacZ. Este gen codifica para la enzima β -galactosidasa que degrada la lactosa y otros β -galactósidos. (Figura 4 (B))
- **pUC4K:** Vector circular de 3914 pb, que además de contener en su secuencia un origen de replicación y el marcador de selección *bla* (Amp^r), porta el gen aminoglicósido 3-fosfotransferasa que confiere resistencia a la Kanamicina (Kan^R). Éste se encuentra

9.6 INICIADORES

- Gen *omp31*

Primer 1: *omp31*Fw **ATGAAATCCGTAATTTTGGCG**

Primer 2: *omp31*Rv **TTAGAACTTGTAGTTCAGACC**

- Gen *rpsL*

Primer 1: *rpsL*Fw **GAGGGCTGACTCCGAATTTG**

Primer 2: *rpsL*Rv **ACGCTTCTCTGCCTTATGGC**

9.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El gen *omp31* (723 pb) y el gen *rpsL* (500 pb) se amplificaron mediante el uso de la PCR. Se utilizaron los iniciadores mencionados en el punto 5.3 de la metodología. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo general descrito por Sambrook and Russell en 2001.

Se estandarizó la PCR para una reacción de 50 μ L

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua		30 μ L
Buffer	10 x	5 μ L
MgCl ₂	50 mM	2.5 μ L
dNTPs	0.4 mM	2.5 μ L
Iniciador Sentido	0.5 μ M	2.5 μ L
Iniciador antisentido	0.5 μ M	2.5 μ L
DNA	100 ng/ μ L	4 μ L
Taq polimerasa	0.05 U/ μ L	2.5 μ L

Cuadro 2. Estandarización de la PCR

La PCR se realizó en un termociclador (Select Cyclor, Select Bio Products, USA) con las siguientes condiciones.

Gen <i>omp31</i>	Gen <i>rpsL</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial 5 min 94 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturalización inicial 5 min 94 °C
<ul style="list-style-type: none"> • 30 ciclos 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 ciclos
<ul style="list-style-type: none"> a) Desnaturalización 1 min 94 °C b) Alineamiento 1 min 56°C c) Extensión 1 min 72°C 	<ul style="list-style-type: none"> a) Desnaturalización 45 seg 94 °C b) Alineamiento 45 seg 56°C c) Extensión 45 seg 70°C
<ul style="list-style-type: none"> • Extensión final 5 min 72°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Extensión final 10 min 72°C

Cuadro 3. Condiciones de la PCR

9.8 CLONACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y DEL GEN *rpsL*

Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pCR2.1 TOPO mediante el sistema TOPO TA *Cloning Kit* con metodología que marca el fabricante. Con el inserto ligado al plásmido se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, las clonas seleccionadas se sembraron en placas de agar LB con Kanamicina (50 μ g/ml), se dejaron incubando a 37°C 18 horas o toda la noche, al día siguiente se realizó selección de la colonias resistentes a la kanamicina. Las clonas seleccionadas se sembraron en caldo LB con Kananmicina (50 μ g/ml) y se incubaron a 37° C toda la noche en agitación orbital a 150rpm. Posteriormente se realizó la extracción de plásmido para verificar la presencia del plásmido en las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas. Finalmente los plásmidos fueron sometidos a una digestión con las enzimas *Hind* III y *Xba* I para la liberación del fragmento de 820 bp y 610 bp aproximadamente del gen *omp31* y *rpsL* respectivamente. Los plásmidos obtenidos de esta clonación fueron nombrados **pLV** y **pLF** para el gen *omp31* y *rpsL* respectivamente.

9.8.1 SUBCLONACIÓN DE LOS DE LOS GENES *omp31* Y DEL GEN *rpsL*

Los plásmidos **pLV** y **pLF** como se mencionó en el punto 9.8 fueron digeridos con las enzimas *Hind* III y *Xba* I para la liberación de ambos fragmentos, así mismo la digestión con ambas enzimas fue con el objetivo de liberar el fragmento de PCR con esos sitios específicos de restricción para la subclonación de ambos genes en el plásmido pUC18 previamente digerido con dichas enzimas. Los fragmentos obtenidos mediante la digestión enzimática de los plásmidos **pLV** y **pLF** fueron purificados a partir de geles de agarosa al 1.5% en columnas con fibra de vidrio elaboradas en nuestro laboratorio. El plásmido pUC18 que fue digerido previamente con las enzimas ya mencionadas, se purificó con el mismo método previamente mencionado. La reacción de ligazón se realizó con el protocolo T4 DNA Ligasa con las instrucciones del fabricante, con una proporción 3:1 (inserto:vector) como se muestra en el cuadro 4; con el inserto ligado al plásmido se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, las clonas seleccionadas se sembraron en placas de agar LB con Ampicilina (100 μ g/ml), se dejaron incubando a 37°C 18 horas o toda la noche y se les realizó extracción de plásmido por lisis alcalina, obteniendo los plásmidos recombinantes **pLVM** y **pLFV** que contienen los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente en el plásmido pUC18. (Cuadro 5)

Cuadro 4. Condiciones de la Reacción de Ligazón

Reactivo	Concentración/ μ l	Volumen (μ l)	Reactivo	Concentración/ μ l	Volumen (μ l)
pLV	<i>omp31</i> 600ng/ μ l	20 μ l	pLF	<i>rpsL</i> 500ng/ μ l	20 μ l
pUC18	200ng/ μ l	5 μ l	pUC18	180ng/ μ l	5 μ l
T4 DNA Ligasa	5U/ μ l	1 μ l	T4 DNA Ligasa	5U/ μ l	1 μ l

9.8.2 INACTIVACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y *rpsL*.

La estrategia a seguir para obtener la cepa mutante fue la de interrumpir o truncar, a través de procesos de recombinación homóloga, los genes *omp31* y *rpsL*, mediante la inserción de un gen que confiere resistencia a Kanamicina. La inactivación del gen *omp31* se realizó mediante la digestión con la enzima de restricción *Sal* I del plásmido pLVM donde se inserto un casete de Kanamicina obtenido del plásmido pUC4k digerido con la enzima *Sal* I, obteniendo el plásmido **pLVM84** (Cuadro 5), el cual fue transformado en bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, las clonas seleccionadas se sembraron en placas de agar LB con Kanamicina (100 μ g/ml), para realizar la extracción de plásmido por lisis alcalina. El plásmido fue digerido con la enzima *Sal* I para verificar la inserción del casete de kanamicina, liberando un fragmento de 1264 pb que es el tamaño de la secuencia de ADN con resistencia a dicho antibiótico. En el caso de la inactivación del gen *rpsL*, se realizará mediante la digestión con la enzima *Pst* I del plásmido pLFV donde se insertará un casete de Kanamicina obtenido del plásmido pUC4k digerido con la enzima *Pst* I, obteniendo el plásmido **pLFV26** (Cuadro 5) que fue transformado en bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación, las clonas seleccionadas se sembraron en placas de agar LB con Kanamicina(50 μ g/ml), para realizar la extracción de plásmido por lisis alcalina. El plásmido fue digerido con la enzima *Pst* I para verificar la inserción del casete de Kanamicina, liberando un fragmento de 1240 pb que es el tamaño de la secuencia de ADN con resistencia a dicho antibiótico.

Cuadro 5. Plásmidos contruidos para la generación de la Cepa Mutante	
Nombre	Breve Descripción
pLV	Gen <i>omp31</i> amplificado y clonado en el vector comercial pCR2.1 TOPO
pLVM	Inserto de <i>omp31</i> digerido con <i>Hind</i> III y <i>Xba</i> I subclonado en el plásmido pUC18
pLVM84	pLVM digerido (<i>omp31</i>) con <i>Sal</i> I más inserto de una casete de kanamicina digerido con <i>Sal</i> I obtenido del plásmido pUC4K.
pLF	Gen <i>rpsL</i> amplificado y clonado en el vector comercial pCR2.1 TOPO
pLFV	Inserto de <i>rpsL</i> digerido con <i>Hind</i> III y <i>Xba</i> I subclonado en el plásmido pUC18
pLFV26	pLFV digerido (<i>rpsL</i>) con <i>Pst</i> I más inserto de una casete de kanamicina digerido con <i>Pst</i> I obtenido del plásmido pUC4K.

PLÁSMIDOS CONTRUIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO

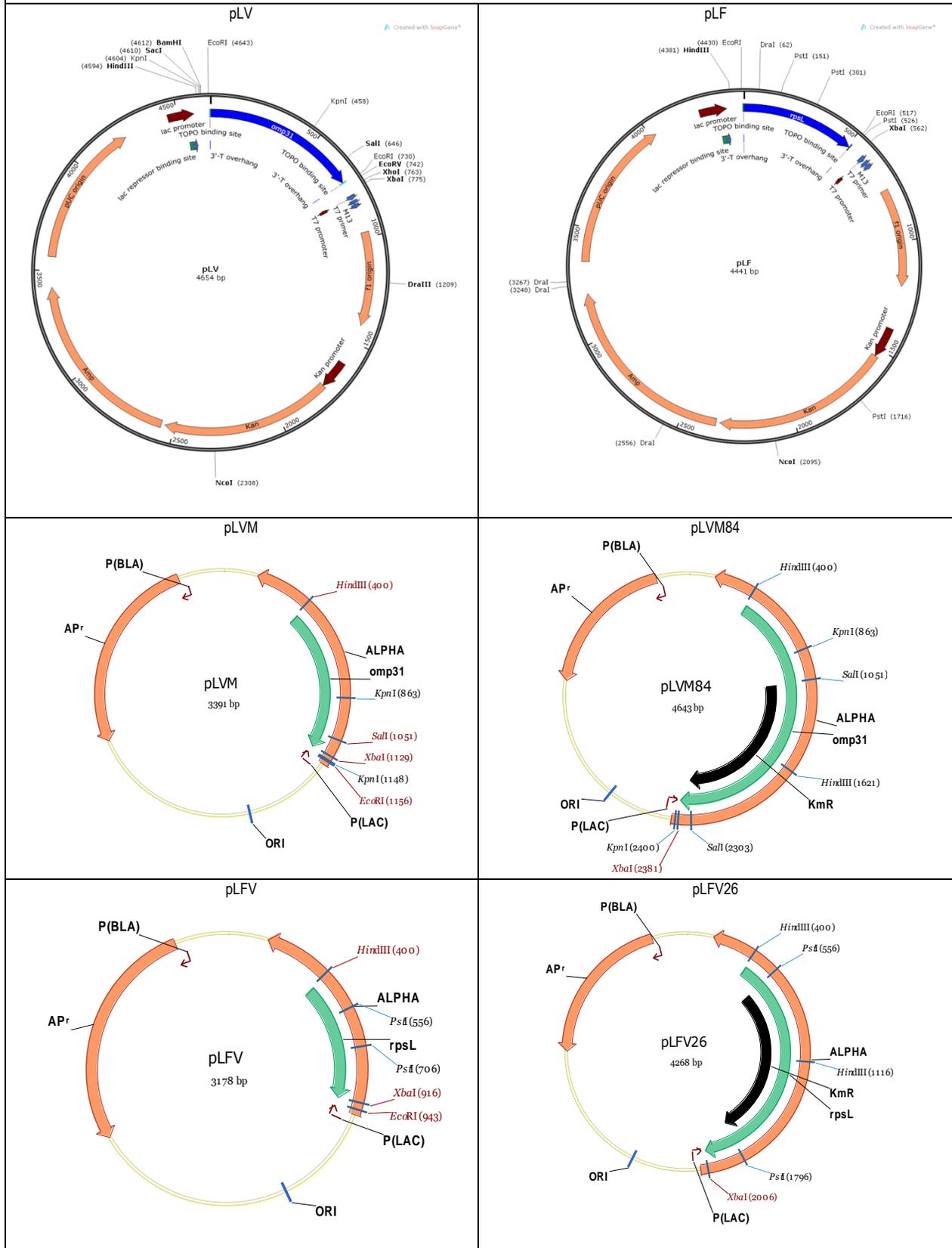


Fig. 5 Representación gráfica de los plásmidos

9.8.3 GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE

Una vez obtenido los plásmidos recombinantes que contienen los genes $\Delta omp31$ y $\Delta rpsL$, fueron transformados por electroporación en *Brucella melitensis* 133 biotipo 1 electrocompetentes (Cuadro 6), para que, por un mecanismo de doble recombinación homóloga entre el cromosoma de la bacteria y el ADN de cada plásmido recombinante, se produzca la sustitución de *omp31* y/o *rpsL* por los correspondientes genes inactivados.

Son distintos los procesos de recombinación homóloga que pueden tener lugar dentro de la bacteria una vez introducido el plásmido recombinante. Lo más común es que suceda un entrecruzamiento simple entre la secuencia cromosómica y el plásmido a través de una de las dos regiones de ADN flanqueantes al gen, dando como resultado, la integración del gen en el cromosoma. De esta forma, las células que se obtienen poseen una copia del gen silvestre y una copia del gen inactivado a la vez, siendo resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina. La integración de los genes inactivados se verificará mediante reacciones de PCR.

Cuadro 6. Condiciones de electroporación de <i>Brucella melitensis</i> 133 biotipo 1	
Voltios (Kilovoltios)	2.5 KV
Capacitancia (Faradios / F)	25 μ F
Resistencia (Ohmios / Ω)	200 Ω
Tiempo (milisegundos / ms)	9 ms

9.9 ENSAYOS DE INFECCIÓN

Previamente a la infección, se prepararon suspensiones celulares en el medio basal de Eagle modificado por Dulbecco [Dulbecco's modified Tagle Medium (DMEM)] (Gibco-BRL), suplementado con suero bovino fetal (SBF); un 5 % (v/v) para células HeLa y un 10 % (v/v) para los macrófagos murinos, y con 4 mM de L-glutamina (medio DMEM completo), a una concentración de 1×10^5 células/ml, utilizando para el recuento, una cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos (1 ml/pocillo) y se incubaron durante 18 horas, en el caso de células HeLa, y 24 horas, para macrófagos J774.1.

Para llevar a cabo los ensayos de infección se utilizó la cepa de campo *Brucella melitensis* 133 biotipo 1 y la cepa mutante *Brucella melitensis* pLVM84, las cuales fueron cultivadas en placas de agar *Brucella* (suplementadas o no con el antibiótico necesario) durante 48 horas, se tomaron 5 colonias de los cultivos frescos y se sembraron en un tubo con 5ml de caldo *Brucella*, los cuales fueron incubados a 37°C a 150rpm durante 22 horas. Al día siguiente se realizó una dilución 1/50 de cada cultivo en 200ml de caldo *Brucella*, los cultivos fueron incubados a 37°C a 150rpm durante 26 horas. Se realizaron diluciones dobles seriadas 1/2 a 1/10 de la bacteria en caldo *Brucella* para alcanzar una densidad óptica medida 600nm de $1 (1 \times 10^9)$ bacterias/ml necesarias para calcular una Multiplicidad de Infección (MOI) de 100:1 para los macrófagos murinos y de 300:1 para las células HeLa.

La dilución obtenida para *Brucella melitensis* 133 biotipo 1 fue de 1/8 y 1/4 para la cepa mutante *Brucella melitensis* pLVM84 (1×10^9), posteriormente se realizaron los cálculos para preparar las suspensiones bacterianas diluidas en medio DMEM sin antibiótico y sin suero fetal bovino para ser empleadas en las infecciones a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 UFC para los macrófagos murinos J774.A1 y 300 UFC para la línea celular HeLa. Una vez depositada la cantidad de bacterias deseada (en 1 ml/pozo), las células fueron centrifugadas a 700rpm durante cinco minutos, para poner en contacto a las bacterias con las células y las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 1 hora, para permitir la fagocitosis de la bacteria por los macrófagos y la internación de la bacteria en las células HeLa.

Transcurrido el periodo de incubación, las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS estéril y se inoculó 1ml/pozo de medio DMEM suplementado con 100 µg/ml de gentamicina, con el fin de eliminar las bacterias extracelulares, después de 2 horas de incubación, la concentración del

antibiótico se modificó a 10 µg/ml para evaluar la sobrevivencia de la bacteria a distintos tiempos de 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 horas pos infección (p.i.) , considerando como punto inicial de análisis (tiempo=0 horas) el transcurrido tras dos horas de incubación con 100 µg/ml de gentamicina, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar posibles restos del antibiótico. Con el fin de cuantificar el número de bacterias intracelulares viables, las células se incubaron durante 5 minutos en 1 ml de una solución 0,2 % de Tritón X 100 en PBS y con los lisados obtenidos, se realizaron diluciones decuples seriadas y se sembraron en placas de agar *Brucella* (suplementadas o no con el antibiótico necesario según la cepa empleada), para realizar el conteo de UFC.

10. RESULTADOS

10.1 EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO DE *Brucella melitensis* 133 biotipo 1

Se realizó la extracción de ADN cromosómico de la bacteria, obteniendo una concentración promedio de 1 µg/µl.

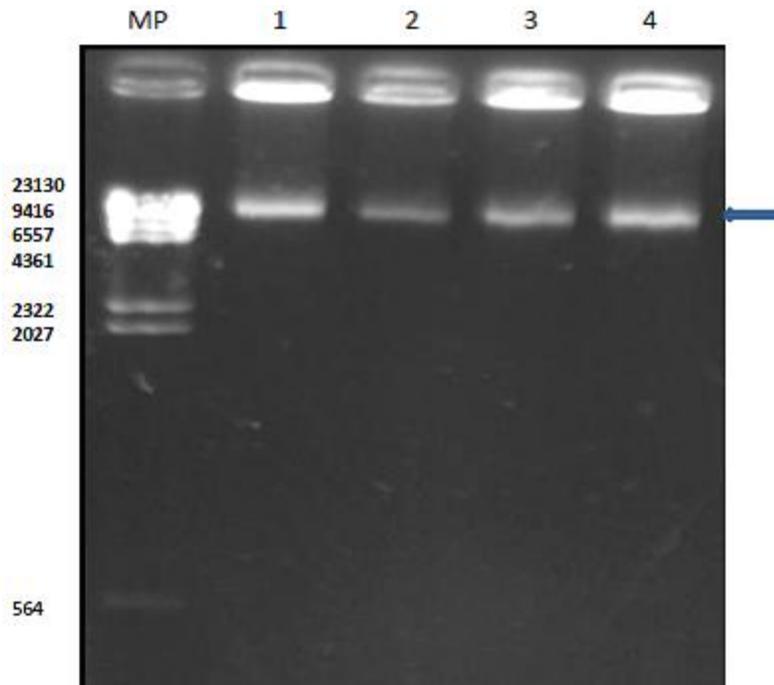


FIG.6 Gel de agarosa al 1% en Tris-Ácido acético-EDTA (TAE1X) teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular λ Hind III. Carril 2-6. ADN cromosómico de *Brucella melitensis* 133 biotipo 1.

10.2 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *E. coli* DH5 α

Se realizó la extracción del ADN plasmídico de las células *E. coli* DH5 α transformadas mediante electropración con los plásmidos pUC18 y pUC4K.

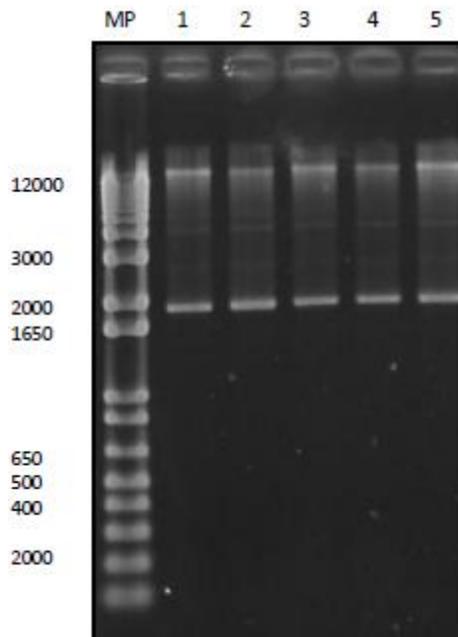


Fig. 7

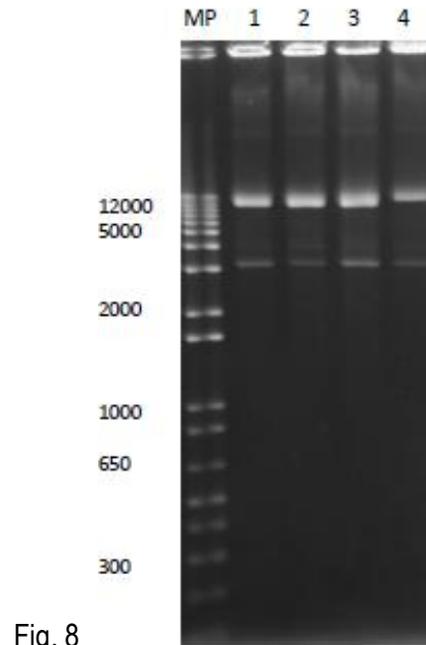


Fig. 8

FIG.7 Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1-5. Plásmido pUC18.

Fig. 8 Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular λ Hind III. Carril 1-4 Plásmido pUC4K.

10.2.1 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE pUC18 y pUC4K

El plásmido pUC18 fue digerido con las enzimas *Hind III* y *BamH I*, las muestras fueron cuantificadas obteniendo una concentración promedio de 1.5µg/µl de ADN plasmídico. Se realizó una electroforesis para verificar que el tamaño del plásmido corresponda al tamaño esperado de 2686 pb

El plásmido pUC4K fue digerido con las enzimas *Sal I* y *Pst I*, con el objetivo de liberar un fragmento aproximadamente de un tamaño de 1264 pb y 1240 pb respectivamente.

Ambos plásmidos fueron purificados a partir de fragmentos de geles de agarosa y centrifugados a 13,000 rpm durante 10 segundos en columnas con fibras de vidrio elaboradas en nuestro laboratorio.

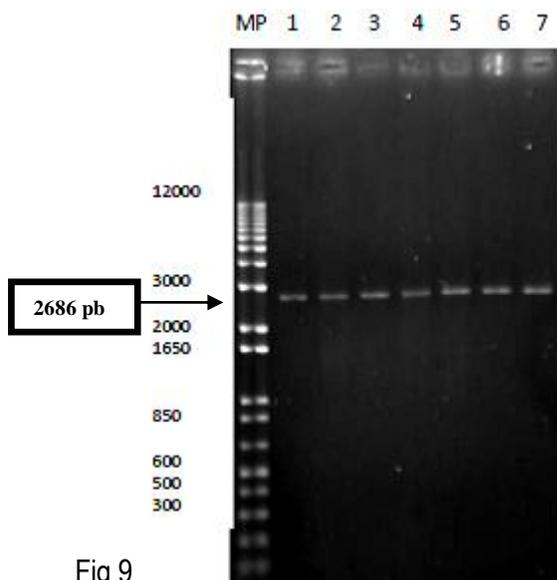


Fig 9

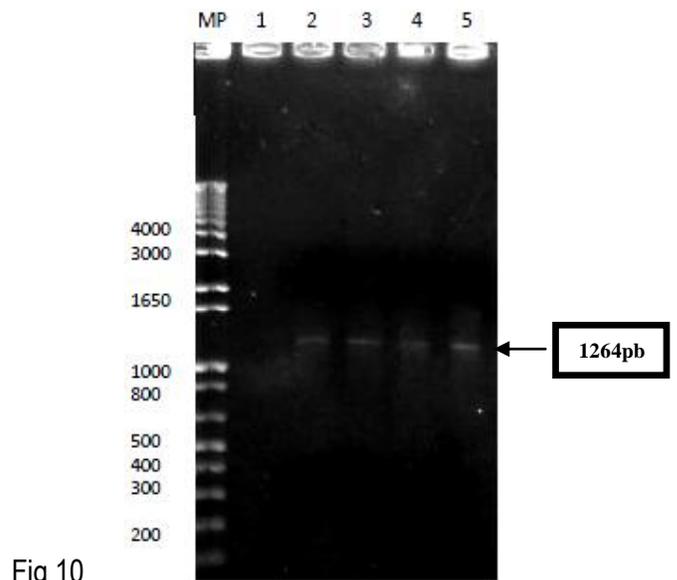


Fig 10

FIG.9 Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “ladder” plus. Carril 1-7. Plásmido pUC18 purificado y digerido con las enzimas *Hind III* y *BamH I*, la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 2686 pb.

Fig. 10. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “ladder” plus. Carril 2-3. Plásmido pUC4K.purificado y digerido con la enzima *Sal I*. Carril 4-5. Plásmido pUC4K.purificado y digerido con la enzima *Pst I* la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 1264 pb.

10.3 AMPLIFICACIÓN, Y PURIFICACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y *rpsL*.

Mediante la técnica de PCR se amplificó los productos de un tamaño de 723 pb y 510 pb de los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente. Los fragmentos de PCR obtenidos fueron cuantificados obteniendo una concentración promedio de 1 µg/µl. Se realizó una electroforesis para verificar que los tamaños de los amplificados correspondan al tamaño esperado de 723 pb y 510 pb de los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente. Los fragmentos de PCR fueron purificados a partir de fragmentos de geles de agarosa al 1.5% y centrifugados a 13,000 rpm durante 10 segundos en columnas con fibra de vidrio elaboradas en nuestro laboratorio.

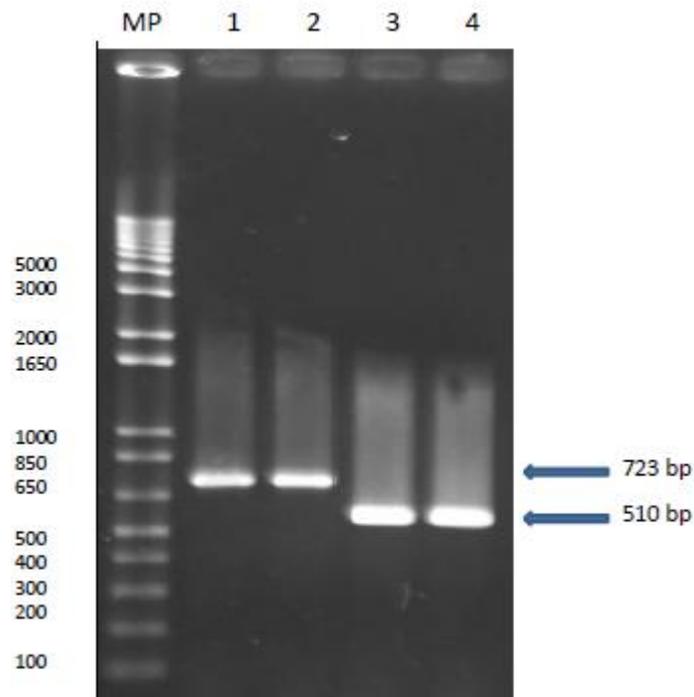


Fig. 11. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1,2. Fragmento de PCR purificado, la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 723 pb. Carril 3,4. Fragmento de PCR purificado, la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 510 pb

10.4 CLONACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y *rpsL*.

Los productos amplificados de *omp31* y *rpsL* fueron clonados en el vector comercial pCR2.1 TOPO obteniendo los plásmidos pLV (Fig 12) y pLF que contienen los fragmentos de los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente. Ambos genes fueron digeridos con las enzimas *Hind* III y *Xba* I para liberar un fragmento de 828 pb y 610 correspondientes a los genes *omp31* y *rpsL* respectivamente.

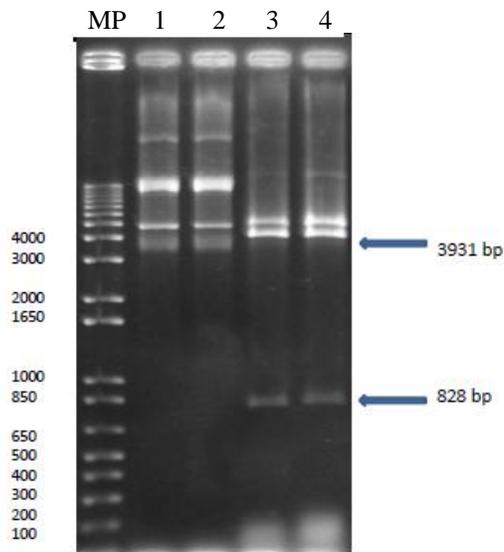


Fig 12

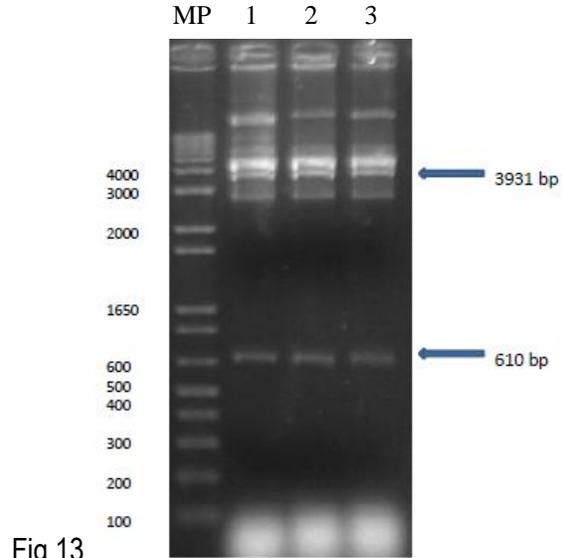


Fig 13

Fig. 12. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 1,2. Plásmido pLV sin digerir. Carril 3,4. Plásmido pLV digerido con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, la flecha indica el tamaño del tamaño del plásmido pCR2.1 TOPO con un tamaño de 3931 pb y el fragmento liberado de 828 pb, correspondiente al gen *omp31*.

Fig. 13. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 1-3. Plásmido pLV digerido con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, la flecha indica el tamaño del tamaño del plásmido pCR2.1 TOPO con un tamaño de 3931 pb y el fragmento liberado de 610 pb, correspondiente al gen *rpsL*.

10.5 SUBCLONACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y *rpsL*.

Los plásmidos pLV y pLF fueron digeridos con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, los insertos liberados de dichos plásmidos fueron purificados a partir de un gel de agarosa al 1.5%. Los fragmentos purificados fueron subclonados en el plásmido pUC18 previamente digerido con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, obteniendo los plásmidos pLVM (Fig 8) y pLFV (Fig 9) que contienen los insertos de *omp31* y *rpsL* respectivamente, ambos plásmidos fueron digeridos con la enzima *Hind* III para verificar que el tamaño correspondiera a 3388 pb (pUC18: 2668 pb + *omp31*: 720 pb) para el plásmido pLVM y 3178 pb (pUC18: 2668 pb – *rpsL*: 510 pb) para el plásmido pLFV.

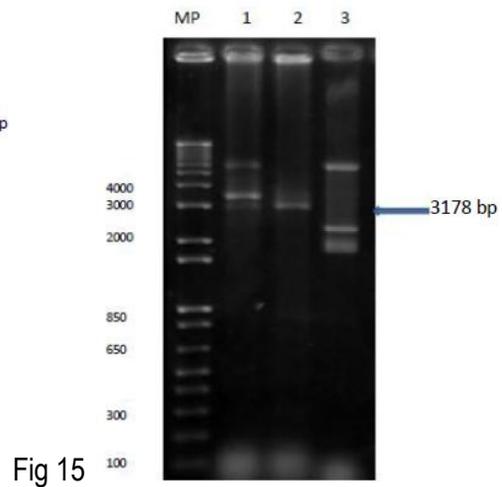
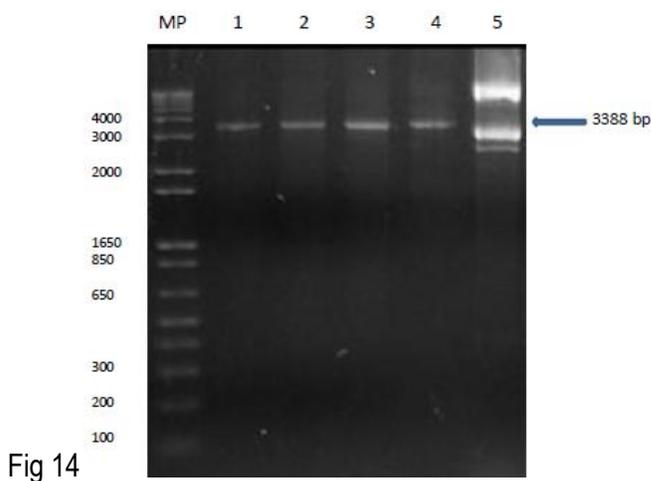


Fig 14. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 1,4. Plásmido pLVM digerido con la enzima *Hind* III, la flecha indica el tamaño del plásmido de 3388 pb. Carril 5. Plásmido pLVM sin digerir.

Fig. 15. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 1,2. Plásmido pLV digerido con la enzima *Hind* III, la flecha indica el tamaño del plásmido con un tamaño de 3178 pb Carril 3 Plásmido pLV sin digerir.

10.6 INACTIVACIÓN DE LOS GENES *omp31* Y *rpsL*.

- Inactivación de *omp31* de *B. melitensis*

Para la inactivación del *omp31*, el plásmido pLVM fue digerido con la enzima *Sal* I, una vez digerido el plásmido fue purificado con el protocolo mencionado en la metodología. Al plásmido pLVM digerido y purificado se le insertó un casete de Kanamicina con sitio de restricción *Sal* I, obtenido del plásmido de pUC4k previamente digerido con la enzima *Sal* I, obteniendo el plásmido pLVM84. Dicho plásmido contiene la secuencia del gen *omp31* interrumpida con una secuencia de ADN que confiere resistencia a la Kanamicina. El plásmido pLVM84 fue digerido con la enzima *Sal* I para liberar un fragmento de 1300 pb correspondiente al casete de Kanamicina insertado en la secuencia del gen *omp31*. Cuando el plásmido pLVM84 fue digerido con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, el plásmido libero 3 fragmentos (un fragmento con un tamaño de 2662 pb correspondiente al plásmido pUC18, y dos fragmentos más correspondientes al gen *omp31* inactivado con el casete de kanamicina), debido a que la secuencia de kanamicina insertada en el gen *omp31* contiene un sitio de restricción de *Hind* III.

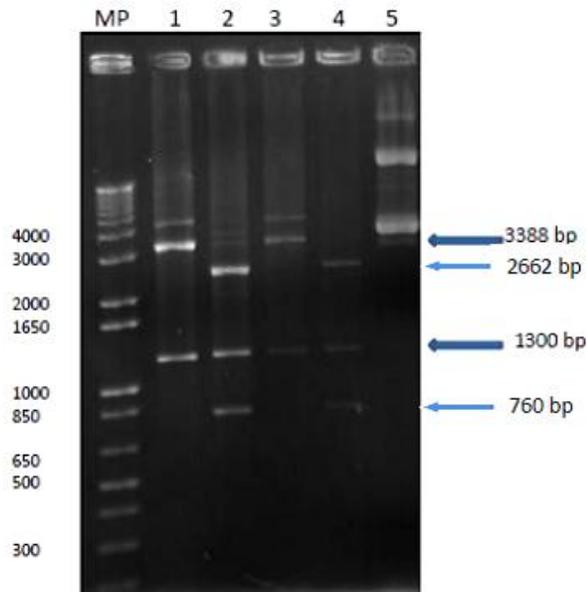


Fig 16. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “ladder” plus. Carril 1,3. Plásmido pLVM84 digerido con la enzima *Sal* I, la flecha superior indica el tamaño del plásmido pLVM de 3388 pb, la flecha inferior indica el tamaño del casete de Kanamicina de 1300pb. Carril 2,4. Plásmido pLVM84 digerido con las enzimas *Hind* III y *Xba* I, la flecha superior indica el tamaño del plásmido pLVM de 2662 pb, la flecha inferior indica el tamaño de un fragmento liberado del casete de kanamicina de 760pb. Carril 5. Plásmido pLVM84 sin digerir.

- **Inactivación de *rpsL31* de *B. melitensis***

Para la inactivación del *rpsL*, el plásmido pLFV fue digerido con la enzima *Pst* I, una vez digerido el plásmido fue purificado con el protocolo mencionado en la metodología. Al plásmido pLFV digerido y purificado se le insertó un casete de Kanamicina con sitio de restricción *Pst* I, obtenido del plásmido de pUC4k previamente digerido con la enzima *Sal* I, obteniendo el plásmido pLFV26. Dicho plásmido contiene la secuencia del gen *rpsL* interrumpida con una secuencia de ADN que confiere resistencia a la Kanamicina. El plásmido pLFV26 fue digerido con la enzima *Pst* I para liberar un fragmento de 1300 pb correspondiente al casete de Kanamicina insertado en la secuencia del gen *rpsL*.

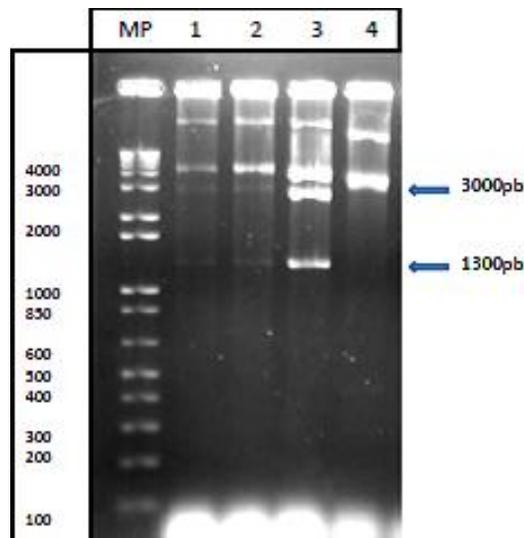


Fig 17. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1,3. Plásmido pLFV26 digerido con la enzima *Pst* I, la flecha superior indica el tamaño del plásmido pLFV de 3000 pb, la flecha inferior indica el tamaño del casete de Kanamicina de 1300pb. Carril 5. Plásmido pLFV26 sin digerir.

10.7 GENERACIÓN DE LA CEPA MUTANTE

- **Mutación del gen *omp31* de *B. melitensis***

Para obtener la mutante del *omp31* de *B. melitensis*, el plásmido pLVM84 fue transformado por electropración en bacterias electrocompetentes de *B. melitensis* con las condiciones previamente mencionadas en la metodología. Las suspensión bacterias de *B. melitensis* transformadas con el plásmido pLVM84, fueron incubadas en 1 ml de medio SOC a 37 °C en agitación a 150rpm durante 6 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sembró 200µl con asa de vidrio en placas de agar *Brucella* suplementado con 5% de SFB, 3% de EL y 50µg de kanamicina, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 48 horas. Las clonas resistentes a Kanamicina y sensibles a ampicilina, fueron seleccionadas y cultivadas en caldo *Brucella* suplementado con 5% de SFB, 3% de EL y 50µg de kanamicina. A las clonas que presentaron crecimiento en el caldo con kanamicina, se les realizó extracción de ADN para verificar mediante la técnica de PCR, la integración del plásmido pLVM84 por un mecanismo de recombinación homóloga al genoma de la cepa silvestre. Las clonas que amplificaron un inserto de 2000pb fueron seleccionadas y resembradas en caldo *Brucella* con 5% de SFB, 3% de EL y 50µg de kanamicina obteniendo la cepa mutante *Brucella melitensis* pLVM84 que porta el gen *omp31* de *B. melitensis* (con un tamaño de 723 pb), inactivado con un casete de resistencia a Kanamicina (con un tamaño de 1250 pb). (Fig. 18)

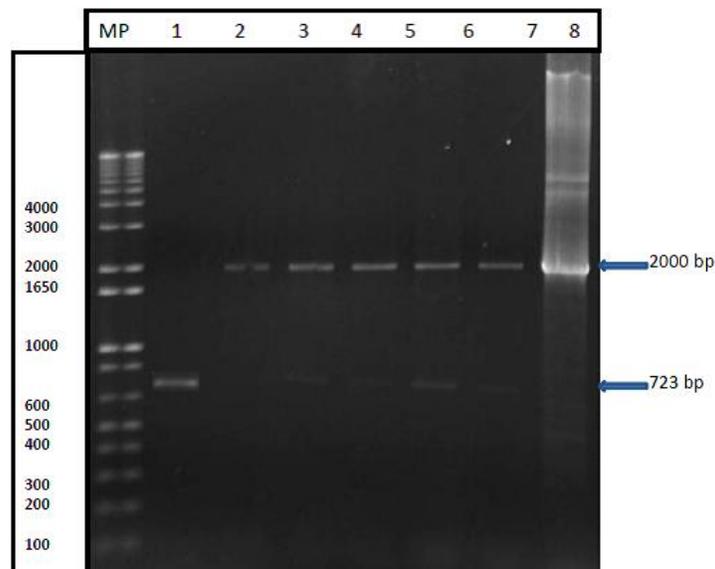


Fig. 18. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1. Inserto de 723pb del gen *omp31* amplificado de la cepa silvestre *B. melitensis*. Carril 2-7. Inserto de 2000pb del gen *omp31* inactivado amplificado de de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84. Carril 8. Inserto de 2000pb del gen *omp31* inactivado amplificado de del plásmido pLVM84.

10.8 SOBREVIVENCIA INTRACELULAR DE LA MUTANTE *B. melitensis* pLVM84 MACRÓFAGOS MURINOS J774.1 Y CÉLULAS HeLa.

Para determinar el efecto de la mutación del gen *omp31*, se evaluó la sobrevivencia intracelular de las cepas *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* pLVM84 en macrófagos murinos y células HeLa. Para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares, las células infectadas se sometieron a un ensayo de protección a gentamicina con 100µ/ml y posteriormente fueron lisadas con 0.2% de Tritón X 100 para evaluar la sobrevivencia de la bacteria mediante el conteo de UFC. El número de bacterias viables en el ensayo fue determinado a las 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h p.i.

En la figura 19 se presenta una gráfica generada a partir de los resultados por triplicado de diferentes tiempos de las cosechas de macrófagos murinos (Cuadro 7). Tanto en macrófagos infectados con la cepa de campo y la cepa mutante, se observa una disminución en la sobrevivencia de la bacteria a las 4 h post infección, la cual se recupera gradualmente a las 8 h en ambos casos. La sobrevivencia de la bacteria tiene un aumento significativo a partir de las 12 h p.i.

En la figura 20 se presenta una gráfica generada a partir de los resultados por triplicado de diferentes tiempos de las cosechas de células HeLa (Cuadro 8). Tanto en células HeLa infectadas con la cepa de campo y la cepa mutante, se observa la sobrevivencia de la bacteria muy similar a las 0 y 4 h post infección. La sobrevivencia de la bacteria tiene un aumento significativo a partir de las 12 h p.i.

El número de UFC que lograron entrar al macrófago y en células HeLa (hora cero) fue menor en ambas líneas celulares infectadas con la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 (2.1×10^4 y 2.8×10^3 UFC/ml respectivamente) en comparación con la cepa de campo *B. melitensis* 133 (3.8×10^4 y 5.4×10^3 UFC/ml respectivamente). Esto podría sugerir que la proteína Omp31 esta involucrada en eventos de invasión de la bacteria en células fagocíticas profesionales y en células fagocíticas no profesionales.

En cuanto a la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* pLVM84 fue menor tanto en macrófagos murinos y células HeLa en todos los tiempos de la cinética de los ensayos en comparación con la cepa de campo *B. melitensis* 133. Por lo tanto la proteína Omp31 podría estar involucrada en la integridad de la membrana externa de la bacteria y en la virulencia de la misma.

Cuadro 7. Datos de la cinética de la internación, sobrevivencia y replicación intracelular de *B. melitensis* 133 y de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 en macrófagos murinos J774.1

Tiempo p.i. (h)	<i>B. melitensis</i> 133		<i>B. melitensis</i> pLVM84	
	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar
0	3.8X10 ⁴	0.095	2.3X10 ⁴	0.05
4	3.2 X10 ⁴	0.072	2 X10 ⁴	0.086
8	7.9 X10 ⁴	0.091	3.6 X10 ⁴	0.137
12	7.4 X10 ⁵	0.136	2.1 X10 ⁵	0.074
24	2.8 X10 ⁶	0.067	5.7 X10 ⁵	0.122
48	6.8 X10 ⁶	0.096	3.5 X10 ⁶	0.08
72	2.7 X10 ⁷	0.100	8.6 X10 ⁶	0.131

Cuadro 8. Datos de la cinética de la internación, sobrevivencia y replicación intracelular de *B. melitensis* 133 y de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 en células HeLa

Tiempo p.i. (h)	<i>B. melitensis</i> 133		<i>B. melitensis</i> pLVM84	
	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar
0	5.4X10 ³	0.061	2.8X10 ³	0.114
4	7.0 X10 ³	0.148	3.5 X10 ³	0.137
8	4.3 X10 ⁴	0.046	2.4 X10 ⁴	0.074
12	2.3X10 ⁵	0.095	3.0 X10 ⁴	0.072
24	8.9 X10 ⁵	0.076	2.3 X10 ⁵	0.067
48	5.9 X10 ⁶	0.157	7.9 X10 ⁵	0.165
72	1.6 X10 ⁷	0.035	4.4 X10 ⁶	0.066

Sobrevivencia Intracelular de la Mutante pLVM84 de *B. melitensis* en Macrófagos murinos

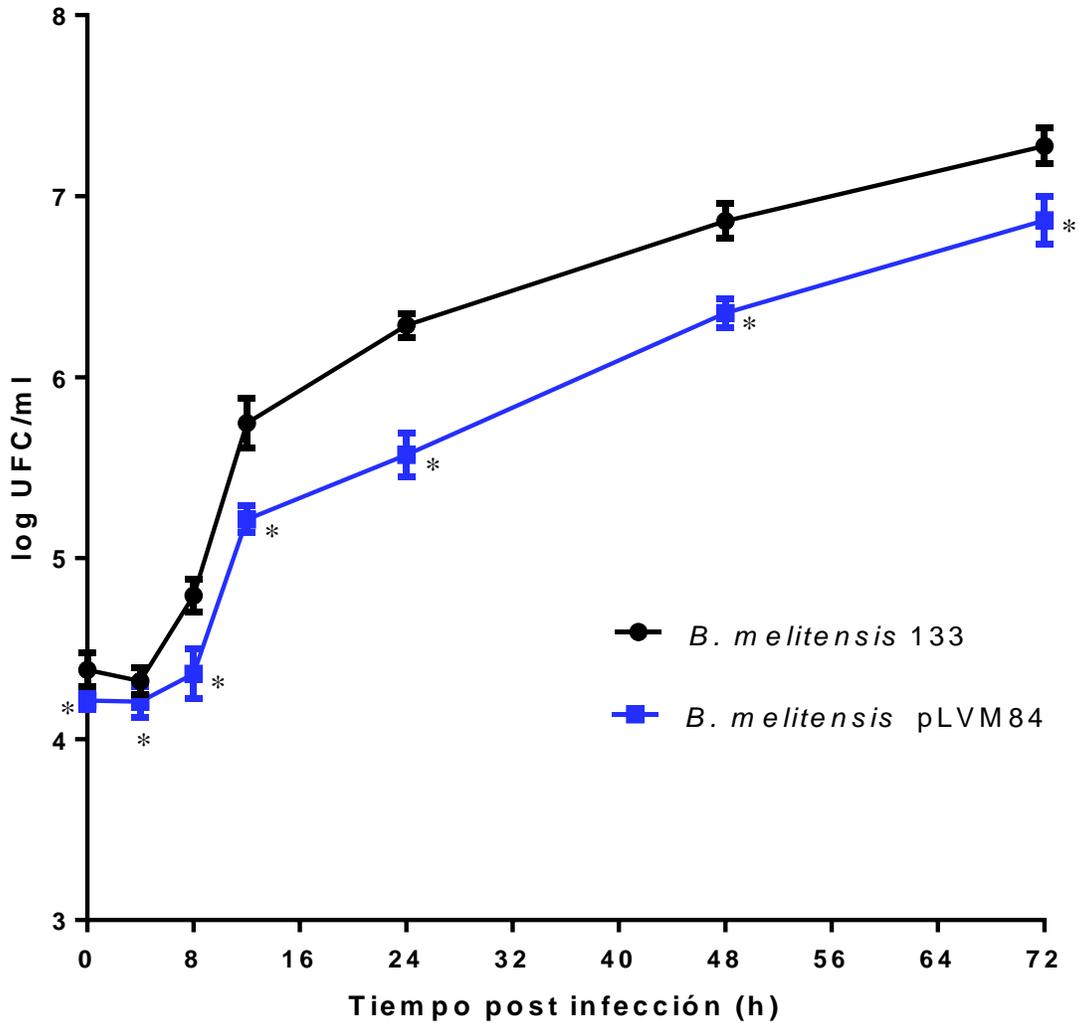


Fig 19. Sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* pLVM84 en macrófagos murinos. Cultivos de macrófagos murinos J774.1 se incubaron durante 1 hora con suspensiones de *B. melitensis* 133 y con la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 (MOI=100 UFC/célula). Tras una incubación de 1 hora con medio suplementado con gentamicina con el fin de eliminar las bacterias extracelulares, las células se lisaron a diferentes tiempos p.i. y se realizaron recuentos en placa para evaluar la capacidad invasiva y la cinética de replicación intracelular de cada cepa. Los resultados representan la media \pm desviación estándar del log UFC/ml. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar con la cepa parental se señalan mediante asterisco ($P \leq 0.000000022$).

**Sobrevivencia Intracelular de la Mutante pLVM84 de
B. melitensis en células HeLa**

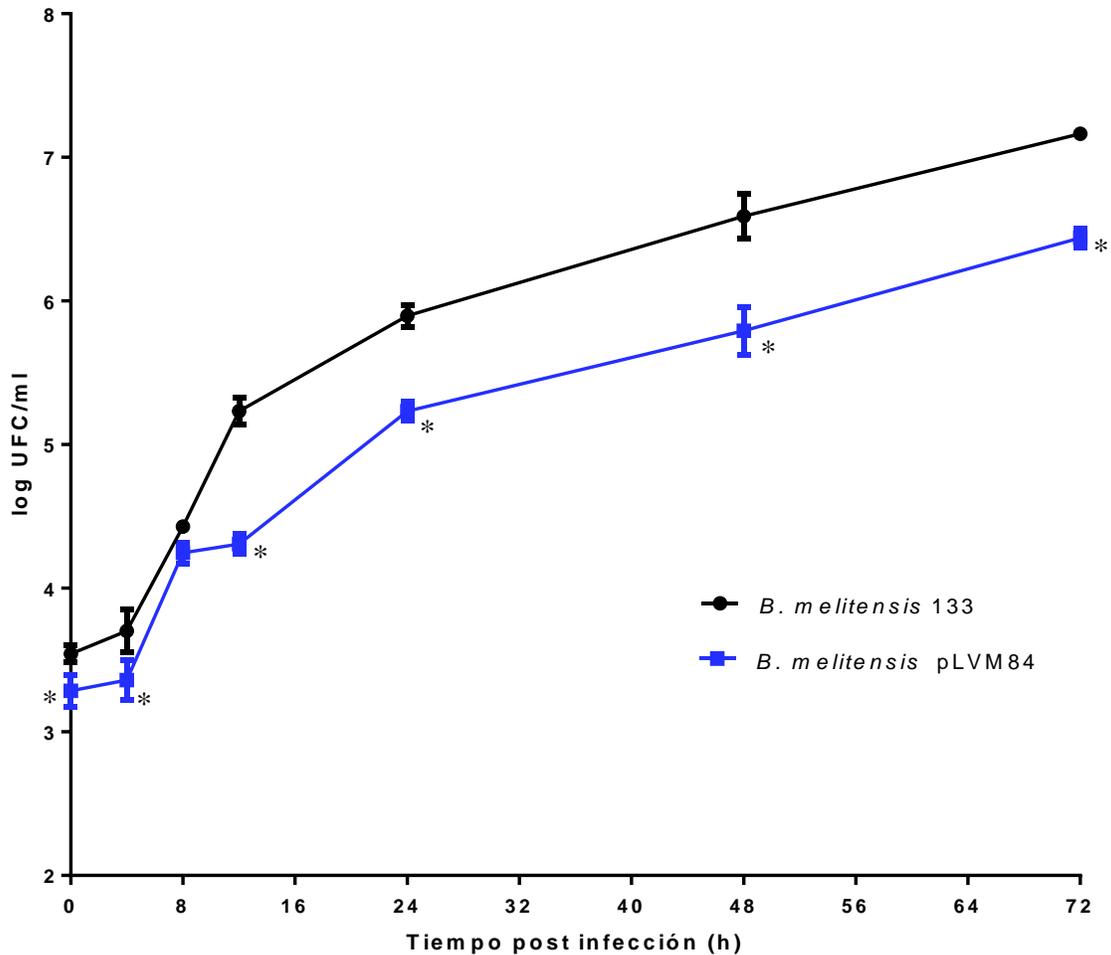


Fig 20. Sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* pLVM84 en células HeLa. Cultivos de células HeLa se incubaron durante 1 hora con suspensiones de *B. melitensis* 133 y con la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 (MOI=300 UFC/célula). Tras una incubación de 1 hora con medio suplementado con gentamicina con el fin de eliminar las bacterias extracelulares, las células se lisaron a diferentes tiempos p.i. y se realizaron recuentos en placa para evaluar la capacidad invasiva y la cinética de replicación intracelular de cada cepa. Los resultados representan la media \pm desviación estándar del log UFC/ml. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas al comparar con la cepa parental se señalan mediante asterisco ($P \leq 0.000000022$).

10.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis se realizó utilizando el paquete comercial para el análisis estadístico R®, mediante el método de ji cuadrada con una distribución normal de los datos por tiempo, logrando una significancia mayor del 99% ($p < 0.01$).

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 la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 en macrófagos murinos y células HeLa. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes.

Hipótesis 0: El número de bacterias que ingresa y se replica intracelularmente en los macrófagos y en células HeLa es el mismo para la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 y para la cepa de referencia *B. melitensis* 133, por lo menos en algún tiempo, por lo tanto no existe una dependencia entre la sobrevivencia en la ausencia de la PME Omp31 de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 y en la presencia de la PME Omp31 de la cepa de referencia *B. melitensis* 133.

Hipótesis 1: El número de bacterias que ingresa y se replica intracelularmente en los macrófagos y en células HeLa es diferente para la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 y para la cepa de referencia *B. melitensis* 133, por lo menos en algún tiempo, por lo que existe una dependencia entre la sobrevivencia en la ausencia de la PME Omp31 de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 y en la presencia de la PME Omp31 de la cepa de referencia *B. melitensis* 133.

El valor obtenido a la hora 0 para ji cuadrada fue de 1147.66 y de 977.35, con 2 grados de libertad y un valor de p de 0.000000022 y de 0.000000022 para macrófagos murinos y células HeLa respectivamente, por lo que existe una relación entre la internación de *B. melitensis* pLVM84 y la cepa de referencia *B. melitensis* 133.

En cuanto a la sobrevivencia intracelular de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 en macrófagos murinos y células HeLa, los valores obtenidos en los tiempos 0h a 72h, son estadísticamente significativos con un valor de p de 0.0000000022 para todos los tiempos, dicho decremento en la sobrevivencia intracelular puede relacionarse con la disminución significativa de la internación por parte de la bacteria, por lo que existe una relación entre la sobrevivencia intracelular en la ausencia de la PME Omp31 de *B. melitensis* pLVM84 y la presencia de la PME Omp31 de la cepa de referencia *B. melitensis* 133 en ambas líneas celulares.

11. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo, fue la construcción de dos mutantes en los genes *omp31* y *rpsL* de *Brucella melitensis* 133 y evaluar el efecto de la mutación de dichos genes en la sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos J774.1 y células HeLa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fue que la mutación en la PME Omp31 de *B. melitensis* 133 provocó una significativa ($p < 0.000000022$) disminución en la internación y en la sobrevivencia intracelular de la bacteria tanto en macrófagos murinos como en células HeLa.

Es bien sabido que *Brucella* es una bacteria intracelular facultativa y en la actualidad es bien conocida la capacidad que presentan las especies de *Brucella* en fase lisas para entrar, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas profesionales como células dendríticas y macrófagos así como también, en células fagocíticas no profesionales como trofoblastos de la placenta y células epiteliales como las células HeLa.(206, 207) De acuerdo con esto, nos propusimos determinar el efecto de la mutación de la PME Omp31 de *B. melitensis* mediante la evaluación de la internación y sobrevivencia intracelular de la cepa mutante en macrófagos murinos y células HeLa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la presencia de la PME Omp31 esta involucrada en la internación de la bacteria en macrófagos murinos. Estos resultados son parecidos a los resultados experimentales obtenidos Caro-Hernández y colaboradores, donde demostraron que la ausencia de las PMEs Omp31, Omp25d y Omp22 en la membrana externa de *B. ovis* PA causa un descenso de la capacidad invasiva de esta bacteria en macrófagos murinos J774.1. En vista de estos resultados, las tres PMEs podrían estar involucradas en la entrada de *B. ovis* PA en las células J774.A1 a través de procesos dependientes de las “balsas lipídicas”.(208)

Por otra parte, resultados obtenidos en el presente trabajo se demostró de igual forma que la presencia de la PME Omp31 es necesaria para que lleve a cabo la internación de la bacteria en células HeLa. Caso contrario con resultados de trabajos anteriores donde demostraron que esta proteína no es necesaria para la internación de la bacteria en *B. ovis* PA. En ese mismo trabajo demostraron que la presencia de las PMEs Omp25d y Omp22 en la membrana externa de *B. ovis* PA es necesaria para que lleve a cabo la internación de la bacteria en células HeLa. Este hecho

indica que la PME Omp31 de *B. melitensis* y las PMEs Omp25d y Omp22 de *B. ovis* PA pueden estar implicadas en el mecanismo de “fagocitosis por cremallera” empleado por la bacteria para penetrar en las células HeLa.(206, 209, 210)

Diversas investigaciones realizadas previamente han demostrado que *B. abortus* es capaz de penetrar y sobrevivir intracelularmente en células fagocíticas no profesionales tales como las células HeLa.(206, 211) Se ha descrito que esta entrada la lleva a cabo utilizando un mecanismo de invasión denominado “fagocitosis por cremallera” observado también durante los procesos de internación de *Listeria monocytogenes* y *Yersinia pestis*.(209) Este mecanismo se caracteriza por la reorganización de la membrana plasmática de la célula eucariota en el punto de contacto con la bacteria, que desencadena posteriormente, un recubrimiento progresivo del microorganismo gracias a la intervención del citoesqueleto de actina.(210, 212)

En cuanto a la capacidad de sobrevivencia y multiplicación intracelular en macrófagos J774.1 y células HeLa mostrada por la cepa mutante $\Delta omp31$ de *B. melitensis* disminuyó significativamente la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en otros trabajos,(208) ya que la evaluación de diferentes cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes de la familia *omp25/omp31*, observaron que solamente la ausencia de Omp25d o de Omp22 afectaba gravemente a la replicación intracelular de la bacteria. Así, mientras que la cepa mutante $\Delta omp25d$ fue capaz de sobrevivir en los macrófagos, la cepa mutante $\Delta omp22$ fue completamente eliminada a las 24 horas p.i.. Esta incapacidad para multiplicarse intracelularmente mostrada por las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA, podría justificar, al menos en parte, la fuerte reducción en la virulencia que presentan ambas cepas en ratón. (46, 208)

El hecho de que ambas mutantes presenten en su membrana externa alteraciones similares, o incluso, menos acusadas que las mostradas por las cepas mutantes no atenuadas $\Delta omp31$, $\Delta omp25$ y $\Delta omp25c$ de *B. ovis* PA obtenidas mediante el mismo procedimiento (Caro-Hernández *et al.*, 2007), hace pensar que Omp25d y especialmente Omp22, podrían estar involucradas en *B. ovis* PA en el establecimiento y desarrollo de un nicho de replicación óptimo esencial para su supervivencia y multiplicación intracelular.(46, 208)

Estos resultados contradictorios se ha sugerido que probablemente, se deba a que las cadenas polisacáridicas O del S-LPS enmascaran las PMEs, dificultando tanto la generación de una respuesta inmune específica frente a ellas como su accesibilidad a los anticuerpos.(62, 102) Por el contrario, en las cepas rugosas de *Brucella*, tales como *B. ovis* y *B. canis*, este problema no se presenta ya que su LPS carece de cadenas O, por lo que las PMEs, al estar expuestas en la superficie bacteriana.(103, 104) En base a estos resultados es necesario evaluar el rol de la familia de PMEs Omp25/Omp31 en *B. melitensis* para esclarecer tan marcadas diferencias entre las especies de *Brucella* en fase rugosa y en fase lisa.

La consecución de un nicho de replicación en los macrófagos, principales células hospedadoras de este patógeno, le va a proporcionar a este microorganismo una protección frente al complemento y a anticuerpos durante su diseminación por el hospedador, y la capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo en el organismo afectado, con la consiguiente cronicidad de la infección.(213) Esta habilidad que presentan las estirpes de *Brucella* en fase lisa implica un proceso complejo, en el cual, este patógeno interfiere con las funciones propias de la célula hospedadora, llegando incluso a controlar su propio tráfico intracelular. Así, cuando una especie lisa de *Brucella* es fagocitada por el macrófago, sigue una ruta endocítica en la cual evita degradaciones hidrolíticas por fusión con los lisosomas, favoreciendo en los estadios tempranos de la infección, su supervivencia intracelular.(214, 215) Por lo que la virulencia de *Brucella* se asocia con la supervivencia en células fagocíticas.

Esto podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo entre la relación que hubo en la disminución de la internación de la cepa mutante *B. melitensis* pLVM84 y la disminución de la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria a partir de las 4 horas hasta las 72 horas post infección tanto en los macrófagos murinos como en las células HeLa.

Por tanto, en vista de los resultados obtenidos, la PME Omp31 no solamente estaría implicada en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa de la bacteria, sino que también, serían relevantes para la virulencia de *B. melitensis* 133 al ejercer papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular del patógeno.

Por último, los resultados obtenidos en el presente trabajo del gen *rpsL*, logramos inactivar el gen mediante la inserción de una casete de resistencia a la kanamicina, obteniendo el plásmido pLFV26.

En cuanto al gen *rpsL* que codifica para la proteína S12 ribosomal, se ha demostrado que la mutación en este gen, esta directamente involucrado en la disminución de la virulencia en *Erwinia carotovora*.(165) Otros estudios en realizados en *Salmonella Typhimurium*, se demostró que hubo una disminución significativa en la tasa de crecimiento y una disminución en la virulencia de la cepa mutante en comparación de la cepa de campo.(164)

Estudios realizados sobre la identificación y caracterización de mutantes atenuadas de *Brucella melitensis* 16M, demostraron que la mutante del gen *rpsL* afecto la sobrevivencia de la bacteria en macrófagos y mostró una marcada atenuación en un modelo murino.(216) Resultados muy parecidos fueron mostrados en otro trabajo donde identificaron aproximadamente 3000 genes que son esenciales para la sobrevivencia de *E. coli* MG1655, en donde el gen *rpsL* fue unos de los genes esenciales para la sobrevivencia de la bacteria.(217)

Con respecto a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 se sabe que porta una mutación en el gen *rpsL* por lo que se ha planteado la hipótesis, que a partir de esta mutación provocó una atenuación severa en la virulencia de la cepa.(82, 112, 128)

Ya que no hay estudios del género *Brucella* sobre el efecto de la mutación de este gen, planteamos que es de gran importancia determinar el efecto de la mutación del gen *rpsL* en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos y células HeLa.

Debido a que el principal objetivo de nuestro trabajo de investigación es generar un posible candidato vacunal, nos planteamos las siguientes prospectivas. Construcción de mutantes en los genes *rpsL* y *omp22* de *B. melitensis*; Construcción de una doble mutante en los genes *omp31* y *rpsL* de *B. melitensis*. Determinar el efecto de las mutaciones mediante ensayos de sobrevivencia intracelular en macrófagos y células HeLa. Evaluar la protección conferida y virulencia residual en ratones inmunizados con las cepas mutantes. Por último evaluar la respuesta inmune celular y humoral en los ratones inmunizados con las cepas mutantes. Además en todos los ensayos

incluiremos a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 como control, para determinar las diferencias en la virulencia y en la protección conferida en comparación con las cepas mutantes.

12. CONCLUSIONES

- I. La mutación de la PME Omp31 de *B. melitensis* 133 provocó una disminución significativa en la internación, sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria en macrófagos murinos J774.1 y en células HeLa.
- II. La PME Omp31 es relevante para la virulencia de *B. melitensis* 133 al ejercer papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular del patógeno.
- III. Se inactivó el gen rpsL de *B. melitensis* para después ser transformado en *B. melitensis* 133 y evaluar el efecto de dicha mutación en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria.

13. PROSPECTIVA

- I. Realizar la mutación del gen *rpsL* de *Brucella melitensis*.
- II. Construir una doble mutante en los genes *omp31* y *rpsL* de *Brucella melitensis*.
- III. Realizar la mutación del gen *omp22* de *Brucella melitensis*.
- IV. Evaluar el efecto de las diferentes mutantes mediante ensayos de sobrevivencia en macrófagos murinos J77 4.1 y células HeLa
- V. Complementación de las mutantes en los genes *omp31*, *rpsL* y *omp22* de *Brucella melitensis*.
- VI. Evaluar el efecto de la inactivación de los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* en la membrana externa de *Brucella melitensis* mediante ensayos de susceptibilidad.
- VII. Determinar la virulencia residual y la protección conferida en ratones vacunados con las cepas mutantes obtenidas.
- VIII. Determinación de la respuesta inmune celular y humoral contra *Brucella melitensis* en el suero de ratones vacunados con los inmunógenos experimentales.

14. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2001;4(1):58-64.
2. Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, Legault BA, Andersson SGE. Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(26):9722-7.
3. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):209-27.
4. 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 Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(11):2688-93.
5. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008;58(2):375-82.
6. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(4):801-8.
7. Olsen SC, Stoffregen W. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert review of vaccines*. 2005;4(6):915-28.
8. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*. 2006;5(1):13.
9. Aparicio ED. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2013; 32 (1):43-51.
10. Garin-Bastuji B, Blasco J, Grayon M, Verger J. *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Veterinary research*. 1997;29(3-4):255-74.
11. Elzer P, Hagius S, Davis D, DeVecchio V, Enright F. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):425-31.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña contra la Brucelosis de los Animales. *Diario Oficial de la Federación, México, DF*.
13. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4415>.
14. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases*. 2006;6(2):91-9.
15. Al-Anazi K, Al-Jasser A. Brucellosis: A Global Re-emerging Zoonosis History, *Epidemiology, Microbiology, Immunology and Genetics*.
16. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-022-SSA2-2012, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN EL SER HUMANO.
17. CM R. Introducción histórica. En: Ruiz Castañeda M. *Brucelosis*. La Prensa Médica Mexicana. 1990;7 ed.:2-13.
18. Laval R E. Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile. *Revista chilena de infectología*. 2006;23(4):362-6.
19. López CAV, Andraca RA, Weber FLR. Brucelosis. Una infección vigente. *ACTA MÉDICA GRUPO ÁNGELES*. 2008;6(4):158.

20. Essenberg RC, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I. Sugar metabolism by Brucellae. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):249-61.
21. Baek SH, Rajashekara G, Splitter GA, Shapleigh JP. Denitrification genes regulate *Brucella* virulence in mice. *Journal of bacteriology*. 2004;186(18):6025-31.
22. JM B. Brucellosis. *Trat Vet Práct* 1994;57:27-57.
23. Robinson A, Melling J. Envelope structure and the development of new vaccines. *Journal of Applied Microbiology*. 1993;74(S22):43S-51S.
24. Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1475-80.
25. Adams LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):553-61.
26. Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, et al. Deletion of wboA Enhances Activation of the Lectin Pathway of Complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4407-16.
27. Moreno E, Berman D, Boettcher L. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and immunity*. 1981;31(1):362-70.
28. Forestier C, Moreno E, Pizarro-Cerda J, Gorvel J-P. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *The Journal of Immunology*. 1999;162(11):6784-91.
29. Forestier C, Deleuil F, Lapaque N, Moreno E, Gorvel J-P. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *The Journal of Immunology*. 2000;165(9):5202-10.
30. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel J-P. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*. 2005;8(1):60-6.
31. Allen CA, Adams LG, Ficht TA. Transposon-Derived *Brucella abortus* Rough Mutants Are Attenuated and Exhibit Reduced Intracellular Survival. *Infection and immunity*. 1998;66(3):1008-16.
32. Godfroid F, Taminau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, et al. Identification of the Perosamine Synthetase Gene of *Brucella melitensis* 16M and Involvement of Lipopolysaccharide O Side Chain in *Brucella* Survival in Mice and in Macrophages. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5485-93.
33. McQuiston J, Vemulapalli R, Inzana T, Schurig G, Sriranganathan N, Fritzing D, et al. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infection and immunity*. 1999;67(8):3830-5.
34. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA. Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infection and immunity*. 2000;68(10):5716-23.
35. Monreal D, Grillo M, Gonzalez D, Marin C, De Miguel M, Lopez-Goni I, et al. Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against

Brucella abortus and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infection and immunity*. 2003;71(6):3261-71.

36. González D, Grilló M-J, De Miguel M-J, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue R-M, et al. Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One*. 2008;3(7):e2760.

37. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard J-P. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and immunity*. 2003;71(3):1481-90.

38. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of bacteriology*. 1990;172(7):3569-76.

39. Rojas N, Freer E, Weintraub A, Ramirez M, Lind S, Moreno E. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1994;1(2):206-13.

40. Iriarte M, González D, Delrue RM, Monreal D, Conde R, López-Goñi I, et al. *Brucella* lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and genetics. *Brucella: molecular and cellular biology*. 2004:159-91.

41. BHAT UR, Carlson R, Busch M, Mayer H. Distribution and Phylogenetic Significance of 27-Hydroxy-Octacosanoic Acid in Lipopolysaccharides from Bacteria: Belonging to the Alpha-2 Subgroup of Proteobacteria. *International journal of systematic bacteriology*. 1991;41(2):213-7.

42. Freer E, Rojas N, Weintraub A, Lindberg A, Moreno E. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Research in microbiology*. 1995;146(7):569-78.

43. Rasool O, Freer E, Moreno E, Jarstrand C. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infection and immunity*. 1992;60(4):1699-702.

44. Freer E, Moreno E, Moriyón I, Pizarro-Cerda J, Weintraub A, Gorvel J-P. *Brucella*-*Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *Journal of bacteriology*. 1996;178(20):5867-76.

45. Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MH, et al. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *Journal of bacteriology*. 2005;187(16):5631-9.

46. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel M-J, Martín-Martín AI, Cloeckert A, Grilló M-J, et al. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infection and immunity*. 2007;75(8):4050-61.

47. Garin-Bastuji B, Bowden RA, Dubray G, Limet JN. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(10):2169-74.

48. Wilson G, Miles A. The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *British journal of experimental pathology*. 1932;13(1):1.

49. Meikle PJ, Perry M, Cherwonogrodzky J, Bundle D. Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infection and immunity*. 1989;57(9):2820-8.

50. Cloeckaert A, Zygmunt MS, Nicolle J-C, Dubray G, Limet JN. O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *Journal of general microbiology*. 1992;138(6):1211-9.
51. Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G, Limet JN. Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *Journal of general microbiology*. 1993;139(7):1551-6.
52. Weynants V, Gilson D, Cloeckaert A, Tibor A, Denoel PA, Godfroid F, et al. Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infection and immunity*. 1997;65(5):1939-43.
53. Cloeckaert A, Weynants V, Godfroid J, Verger J-M, Grayon M, Zygmunt MS. O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1998;5(6):862-70.
54. De Tejada GM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and immunity*. 1995;63(8):3054-61.
55. Martín-Martín AI, Sancho P, Tejedor C, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *The Veterinary Journal*. 2011;189(1):103-5.
56. Moriyón I, López-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International Microbiology*. 2010;1(1):19-26.
57. Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Veterinary microbiology*. 1999;68(3):235-44.
58. Corbeil L, Blau K, Inzana T, Nielsen K, Jacobson R, Corbeil R, et al. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infection and immunity*. 1988;56(12):3251-61.
59. Hoffmann E, Houle J. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1983;5(1):65-76.
60. Estein SM, Cheves PC, Fiorentino MaA, Cassataro J, Paolicchi FA, Bowden RA. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Veterinary microbiology*. 2004;102(3):203-13.
61. Aktas M, Wessel M, Hacker S, Klüsener S, Gleichenhagen J, Narberhaus F. Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *European journal of cell biology*. 2010;89(12):888-94.
62. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infection and immunity*. 1995;63(10):3945-52.
63. Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio E, Beining P, Hochstein D, et al. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infection and immunity*. 1992;60(4):1385-9.
64. Roop II RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical microbiology and immunology*. 2009;198(4):221-38.

65. Zähringer U, Lindner B, Knirel YA, van den Akker WM, Hiestand R, Heine H, et al. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(20):21046-54.
66. de Bagüés MPJ, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infection and immunity*. 2004;72(4):2429-33.
67. Billard E, Dornand J, Gross A. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infection and immunity*. 2007;75(12):5916-23.
68. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(1):65-78.
69. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard J-P. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Veterinary Microbiology*. 2002;90(1):383-94.
70. Caron E, Gross A, Liautard J-P, Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF-alpha expression, active on human macrophage-like cells. *The Journal of Immunology*. 1996;156(8):2885-93.
71. Billard E, Dornand J, Gross A. *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infection and immunity*. 2007;75(10):4980-9.
72. Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and immunity*. 1995;63(4):1387-90.
73. Fernández-Lago L, Monte M, Chordi A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1996;15(2-3):109-14.
74. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infection and immunity*. 1993;61(1):124-34.
75. Dubray G, Bezar G. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Annales de recherches vétérinaires Annals of veterinary research*. 1979;11(4):367-73.
76. Dubray G, Charriaut C. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Veterinary Research*. 1983;14(3):311-8.
77. Verstrete D, Creasy M, Caveney N, Baldwin C, Blab M, Winter A. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infection and immunity*. 1982;35(3):979-89.
78. Ficht TA, Bearden S, Sowa B, Adams L. A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infection and immunity*. 1988;56(8):2036-46.
79. Ficht TA, Bearden SW, Sowa B, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and immunity*. 1989;57(11):3281-91.
80. Ficht T, Bearden S, Sowa B, Marquis H. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Molecular microbiology*. 1990;4(7):1135-42.
81. Ficht T, Hussein H, Derr J, Bearden S. Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains. *International journal of systematic bacteriology*. 1996;46(1):329-31.

82. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*. 2002;20(19):2546-50.
83. Cloeckaert A, Verger J-M, Grayon M, Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*. 1995;141(9):2111-21.
84. Cloeckaert A, Verger J-M, Grayon M, Paquet J-Y, Garin-Bastuji B, Foster G, et al. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes and infection/Institut Pasteur*. 2001;3(9):729.
85. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaíno N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS microbiology letters*. 1996;145(1):1-8.
86. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *Journal of bacteriology*. 1988;170(10):4603-7.
87. Douglas J, Rosenberg E, Nikaido H, Verstrete D, Winter A. Porins of *Brucella* species. *Infection and immunity*. 1984;44(1):16-21.
88. Cloeckaert C, Jacques I, Limet J, Dubray G. Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice. *Journal of medical microbiology*. 1995;42(3):200-8.
89. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J-Y, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):229-47.
90. Vizcaino N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* *omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infection and immunity*. 1996;64(9):3744-51.
91. Sowa B, Kelly K, Ficht T, Frey M, Adams L. SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. *Veterinary microbiology*. 1991;27(3):351-69.
92. Connolly JP, Comerci D, Alefantis TG, Walz A, Quan M, Chafin R, et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*. 2006;6(13):3767-80.
93. Roest HP, Mulders I, Wijffelman CA, Lugtenberg B. Isolation of *ropB*, a gene encoding a 22-kDa *Rhizobium leguminosarum* outer membrane protein. *Mol Plant-Microbe Interact*. 1995;8:576-83.
94. Carroll JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6750-7.
95. Foreman DL, Vanderlinde EM, Bay DC, Yost CK. Characterization of a gene family of outer membrane proteins (*ropB*) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39SM and the role of the sensor kinase *ChvG* in their regulation. *Journal of bacteriology*. 2010;192(4):975-83.
96. Delpino M, Cassataro J, Fossati CA, Goldbaum FA, Baldi PC. *Brucella* outer membrane protein *Omp31* is a haemin-binding protein. *Microbes and infection*. 2006;8(5):1203-8.
97. DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):587-92.

98. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(20):13148-53.
99. Cloeckaert A, De Wergifosse P, Dubray G, Limet J. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and immunity*. 1990;58(12):3980-7.
100. Salhi I, Boigegrain R-A, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infection and immunity*. 2003;71(8):4326-32.
101. Vizcaíno N, Caro-Hernández P, Cloeckaert A, Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes and infection*. 2004;6(9):821-34.
102. Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N, Limet J, Bowden R, Dubray G, et al. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *Journal of medical microbiology*. 1991;34(3):175-80.
103. Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckaert A. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and infection*. 2000;2(5):481-8.
104. Vizcaíno N, Kittelberger R, Cloeckaert A, Marín CM, Fernández-Lago L. Minor Nucleotide Substitutions in the omp31 Gene of *Brucella ovis* Result in Antigenic Differences in the Major Outer Membrane Protein That It Encodes Compared to Those of the Other *Brucella* Species. *Infection and immunity*. 2001;69(11):7020-8.
105. Estein SM, Cassataro J, Vizcaíno N, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Bowden RA. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes and infection*. 2003;5(2):85-93.
106. Cassataro J, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Estein SM, Bruno L, Bowden R, et al. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infection and immunity*. 2005;73(10):6537-46.
107. Gupta V, Rout P, Vihan V. Induction of immune response in mice with a DNA vaccine encoding outer membrane protein (omp31) of *Brucella melitensis* 16M. *Research in veterinary science*. 2007;82(3):305-13.
108. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, et al. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev. 1 vaccination. *Vaccine*. 2007;25(22):4437-46.
109. Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Clausse M, Manazza J, Cassataro J, et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*. 2009;27(48):6704-11.
110. Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine*. 2007;25(1):43-54.

111. Verger J, Grimont F, Grimont P, Grayon M, editors. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*; 1987: Elsevier.
112. Eschenbrenner M, Wagner MA, Horn TA, Kraycer JA, Mujer CV, Hagiús S, et al. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *Journal of bacteriology*. 2002;184(18):4962-70.
113. Mujer CV, Hagiús S, Elzer P, DeVecchio VG. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics*. 2002;2:1047-60.
114. Zygmunt MS, Blasco JM, Letesson J-J, Cloeckaert A, Moriyón I. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. *BMC microbiology*. 2009;9(1):92.
115. Rajashekara G, Covert J, Petersen E, Eskra L, Splitter G. Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *Journal of bacteriology*. 2008;190(18):6243-52.
116. García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vizmanos JL, López-Goñi I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical chemistry*. 2006;52(4):779-81.
117. Dawson CE, Stubberfield EJ, Perrett LL, King AC, Whatmore AM, Bashiruddin JB, et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC microbiology*. 2008;8(1):224.
118. Mayer-Scholl A, Draeger A, Göllner C, Scholz HC, Nöckler K. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of microbiological methods*. 2010;80(1):112-4.
119. Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagiús SD, Walker JV, et al. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *American journal of veterinary research*. 2001;62(9):1461-6.
120. Edmonds M, Cloeckaert A, Hagiús S, Samartino L, Fulton W. Pathogenicity and 21 protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion 22 mutant. *Res Vet Sci*. 2002;72:235-9.
121. Jubier-Maurin V, Boigegrain R-A, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martinez M-T, Terraza A, et al. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infection and immunity*. 2001;69(8):4823-30.
122. Boigegrain R-A, Salhi I, Alvarez-Martinez M-T, Machold J, Fedon Y, Arpagaus M, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infection and immunity*. 2004;72(10):5693-703.
123. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckaert A, Garin J, et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(19):12375-80.
124. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular microbiology*. 1998;29(1):125-38.

125. Viadas C, Rodríguez MC, Sangari FJ, Gorvel J-P, García-Lobo JM, López-Goñi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PloS one*. 2010;5(4):e10216.
126. Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, de Miguel M-J, Moriyón I, et al. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infection and immunity*. 2007;75(10):4867-74.
127. Vizcaíno N, Verger J-M, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology*. 1997;143(9):2913-21.
128. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco J-M, et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*. 2004;22(21):2827-35.
129. Weiss AA, Johnson FD, Burns DL. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(7):2970-4.
130. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual review of microbiology*. 2005;59.
131. Backert S, Meyer TF. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current opinion in microbiology*. 2006;9(2):207-17.
132. Watarai M, Makino S-i, Shirahata T. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiology*. 2002;148(5):1439-46.
133. Mossey P, Hudacek A, Das A. *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *Journal of bacteriology*. 2010;192(11):2830-8.
134. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, et al. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(3):1544-9.
135. De Jong MF, Sun YH, Den Hartigh AB, Van Dijk JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Molecular microbiology*. 2008;70(6):1378-96.
136. Delpino MV, Comerci DJ, Wagner MA, Eschenbrenner M, Mujer CV, Ugalde RA, et al. Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic virB mutants. *Archives of microbiology*. 2009;191(7):571-81.
137. Foulongne V, Bourg G, Cazevaille C, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infection and immunity*. 2000;68(3):1297-303.
138. Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel J-P. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(4):545-56.
139. Lavigne J-P, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M, O'Callaghan D, et al. Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infection and immunity*. 2005;73(9):5524-9.

140. Watarai M, Makino Si, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T. Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular microbiology*. 2002;4(6):341-55.
141. Watarai M, Makino S-i, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to Brucella abortus infection of mice. *Infection and immunity*. 2002;70(9):4818-25.
142. Celli J, Gorvel J-P. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. *Current opinion in microbiology*. 2004;7(1):93-7.
143. Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA. Brucella regulators: self-control in a hostile environment. *Trends in microbiology*. 2009;17(8):371-7.
144. Charles T, Nester E. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *Journal of bacteriology*. 1993;175(20):6614-25.
145. Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyon I, Moreno E. Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):329-39.
146. Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter J, Schirm M, Paquet C, et al. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus. *Journal of proteome research*. 2007;6(4):1519-29.
147. Li L, Jia Y, Hou Q, Charles TC, Nester EW, Pan SQ. A global pH sensor: Agrobacterium sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(19):12369-74.
148. Hallez R, Mignolet J, Van Mullem V, Wery M, Vandenhoute J, Letesson JJ, et al. The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in Brucella abortus. *The EMBO journal*. 2007;26(5):1444-55.
149. Swartz TE, Tseng T-S, Frederickson MA, Paris G, Comerci DJ, Rajashekara G, et al. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science*. 2007;317(5841):1090-3.
150. Itoh T, Takemoto K, Mori H, Gojobori T. Evolutionary instability of operon structures disclosed by sequence comparisons of complete microbial genomes. *Molecular biology and evolution*. 1999;16(3):332-46.
151. Koonin EV, Galperin MY. Prokaryotic genomes: the emerging paradigm of genome-based microbiology. *Current opinion in genetics & development*. 1997;7(6):757-63.
152. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 2000;407(6802):340-8.
153. Ogle JM, Murphy IV FV, Tarry MJ, Ramakrishnan V. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*. 2002;111(5):721-32.
154. Vila-Sanjurjo A, Lu Y, Aragonez JL, Starkweather RE, Sasikumar M, O'Connor M. Modulation of 16S rRNA function by ribosomal protein S12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 2007;1769(7):462-71.
155. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonrhein C, et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 2000;407(6802):327-39.

156. Allen PN, Noller HF. Mutations in ribosomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16 S ribosomal RNA. *Journal of molecular biology*. 1989;208(3):457-68.
157. Lodmell JS, Dahlberg AE. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science*. 1997;277(5330):1262-7.
158. Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond M, Waring M. *The molecular basis of antibiotic action*: Wiley London; 1972.
159. Gregory ST, Cate JH, Dahlberg AE. Streptomycin-resistant and streptomycin-dependent mutants of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Journal of molecular biology*. 2001;309(2):333-8.
160. Triman KL, Peister A, Goel RA. Expanded versions of the 16S and 23S ribosomal RNA mutation databases (16SMDBexp and 23SMDBexp). *Nucleic acids research*. 1998;26(1):280-4.
161. Carr JF, Gregory ST, Dahlberg AE. Severity of the streptomycin resistance and streptomycin dependence phenotypes of ribosomal protein S12 of *Thermus thermophilus* depends on the identity of highly conserved amino acid residues. *Journal of bacteriology*. 2005;187(10):3548-50.
162. Timms AR, Bridges BA. Double, independent mutational events in the *rpsL* gene of *Escherichia coli*: an example of hypermutability? *Molecular microbiology*. 1993;9(2):335-42.
163. Cairns J, Overbaugh J, Miller S. The origin of mutants. *Nature*. 1988;335(6186):142-5.
164. Björkman J, Samuelsson P, Andersson DI, Hughes D. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*. 1999;31(1):53-8.
165. Barnard AM, Simpson NJ, Lilley KS, Salmond GP. Mutations in *rpsL* that confer streptomycin resistance show pleiotropic effects on virulence and the production of a carbapenem antibiotic in *Erwinia carotovora*. *Microbiology*. 2010;156(4):1030-9.
166. Baldwin CL, Goenka R. Host Immune Responses to the Intracellular Bacteria *Brucella*: Does the Bacteria Instruct the Host to Facilitate Chronic Infection? *Critical Reviews™ in Immunology*. 2006;26(5).
167. Bayram Y, Korkoca H, Aypak C, Parlak M, Cikman A, Kilic S, et al. Antimicrobial Susceptibilities of *Brucella* Isolates from Various Clinical Specimens. *International journal of medical sciences*. 2011;8(3):198.
168. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang L-Y, Zaitseva M, Lapham C, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection*. 2001;3(1):43-8.
169. Birmingham J, Tabatabai L, Deyoe B, Jeska E, Nuessen M. Generation of chemotactic factor for granulocytes and monocytes from serum by fractions of *Brucella abortus*. *Immunology*. 1982;46(1):17.
170. Young EJ, Borchert M, Kretzer FL, Musher DM. Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 1985;151(4):682-90.
171. Canning PC, Roth JA, Tabatabai LB, Deyoe BL. Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils. *Journal of Infectious Diseases*. 1985;152(5):913-21.
172. Murphy E, Robertson G, Parent M, Hagius S, Roop R, Elzer P, et al. Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent

- strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2002;33(3):191-200.
173. Oliveira SC, Soeurt N, Splitter G. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):417-24.
174. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1033-41.
175. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infection and immunity*. 1995;63(3):1130-3.
176. Oliveira S, Harms J, Rech E, Rodarte R, Bocca A, Goes A, et al. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31(1):77-84.
177. Oñate A, Folch H. Proteína de 18.5 kDa: un antígeno interesante en *Brucella*. *Arch Med Vet*. 1995;27:93-102.
178. Scharf O, Agranovich I, Lee K, Eller NL, Levy L, Inman J, et al. Ontogeny of Th1 memory responses against a *Brucella abortus* conjugate. *Infection and immunity*. 2001;69(9):5417-22.
179. Wyckoff III JH. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):395-415.
180. Giambartolomei GH, Delpino MV, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovsky CA, et al. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(2):252-9.
181. Splitter G, Oliveira S, Carey M, Miller C, Ko J, Covert J. T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Veterinary immunology and immunopathology*. 1996;54(1):309-19.
182. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B. abortus* 2308 Infection. *Infection and immunity*. 2001;69(10):6541-4.
183. Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. Effect of exogenous interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in the course of *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002;9(2):491-2.
184. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(2):133-46.
185. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infection and immunity*. 1996;64(7):2782-6.
186. Tabatabai LB, Hennager SG. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn superoxide dismutase. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1994;1(5):506-10.
187. Elberg SS, Faunce K. IMMUNIZATION AGAINST BRUCELLA INFECTION VI. *Brucella melitensis* Immunity Conferred on Goats by a Nondependent Mutant from a Streptomycin-Dependent Mutant Strain of. *Journal of bacteriology*. 1957;73(2):211-7.
188. Herzberg M, Elberg SS. IMMUNIZATION AGAINST BRUCELLA INFECTION: III. Response of Mice and Guinea Pigs to Injection of Viable and Nonviable Suspensions of a Streptomycin-Dependent Mutant of *Brucella melitensis*1. *Journal of bacteriology*. 1955;69(4):432.

189. Herzberg M, Elberg S. IMMUNIZATION AGAINST BRUCELLA INFECTION I.: Isolation and Characterization of a Streptomycin-Dependent Mutant1. *Journal of bacteriology*. 1953;66(5):585.
190. Herzberg M, Elberg SS, Meyer KF. IMMUNIZATION AGAINST BRUCELLA INFECTION II.: Effectiveness of a Streptomycin-Dependent Strain of *Brucella melitensis*1. *Journal of bacteriology*. 1953;66(5):600.
191. Banai M, Adams L, Dangott L, Frey M, Ficht T. *Brucella* attenuation and relevance to vaccine properties. *Small Ruminant Research*. 2002;45(2):129-37.
192. Alavi-Shoushtari S, Zeinali A. Responses of female lambs to Rev-1 (brucellosis) vaccination. *Preventive Veterinary Medicine*. 1995;21(4):289-97.
193. Blasco J. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive veterinary medicine*. 1997;31(3):275-83.
194. Blasco J, Diaz R. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *The Lancet*. 1993;342(8874):805.
195. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):479-96.
196. Nicoletti P. Brucellosis: past, present and future. *Contributions of Macedonian Academy of Sciences & Arts*. 2010;31(1).
197. Alton GG. *Brucella suis*. *Animal brucellosis*. 1990:412-22.
198. Alton G. Vaccination of goats with reduced doses of Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. *Research in veterinary science*. 1970;11(1):54-9.
199. Falade S. Serological response of sheep to *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*. 1983;30(1-10):546-51.
200. Crowther R, Orphanides A, Polydorou K. Vaccination of adult sheep with reduced doses of *Brucella Melitensis* strain rev. 1. *Tropical animal health and production*. 1977;9(2):85-91.
201. de Bagués MJ, Marín C, Barberán M, Blasco J, editors. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Annales de Recherches Vétérinaires*; 1989.
202. Zundel E, Verger J, Grayon M, Michel R, editors. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Annales de recherches vétérinaires*; 1992.
203. Fensterbank R, Pardon P, Marly J, editors. Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Rev. 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Annales de Recherches Vétérinaires*; 1982.
204. Verger J-M, Grayon M, Zundel E, Lechopier P, Olivier-Bernardin V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*. 1995;13(2):191-6.
205. Jiménez de Bagüés M, Barberan M, Marin C, Blasco J. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*. 1995;13(3):301-4.
206. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Gorvel J-P. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and infection*. 2000;2(7):829-35.
207. Billard E, Cazevieille C, Dornand J, Gross A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infection and immunity*. 2005;73(12):8418-24.

208. Martín-Martín AI, Caro-Hernández P, Orduña A, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes and Infection*. 2008;10(6):706-10.
209. Dramsi S, Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annual review of cell and developmental biology*. 1998;14(1):137-66.
210. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege J-L, Gorvel J-P. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infection and immunity*. 1998;66(5):2387-92.
211. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC. Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes and Infection*. 2009;11(4):476-83.
212. Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and immunity*. 1998;66(12):5711-24.
213. Roop RM, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Molecular microbiology*. 2004;52(3):621-30.
214. Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Research in microbiology*. 2006;157(2):93-8.
215. Comercí DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular microbiology*. 2001;3(3):159-68.
216. Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, et al. Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Molecular microbiology*. 2000;38(3):543-51.
217. Gerdes S, Scholle M, Campbell J, Balazsi G, Ravasz E, Daugherty M, et al. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of bacteriology*. 2003;185(19):5673-84.