



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE
CON EL GEN INACTIVADO *wboA* DE *Brucella melitensis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

CLOÉ QUEIJEIRO BARROSO

Asesores:

Dr. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

M en C. LÁZARO FELIPE VERDIGUEL FERNÁNDEZ



Ciudad de México

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

-Marie Skłodowska-Curie

DEDICATORIAS

A mi familia.

Especialmente les dedico este trabajo a mis padres; infinitas gracias por todo lo que hacen por mí. Son el mejor ejemplo a seguir que podría existir. Me hacen falta palabras para decirles lo feliz que me hace tenerlos a mi lado.

Y a mis hermanos que admiro tanto por siempre lograr los objetivos que se proponen. Gracias por cuidarme siempre y por el cariño que me dan.

Gracias por el apoyo que me dieron durante la realización de este trabajo. Sin ustedes jamás lo hubiera logrado. Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

“Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221513 e IN222516. Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida”

A mi familia por siempre apoyarme y alentarme a continuar en este proyecto. Todos han sido clave fundamental en mi formación. Les agradezco por el amor y apoyo que me han dado.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular (Chava, Julión, Lili, Rodri, Nath, Lax, Fer, Beto, Cres, Dalia, Andy y Sra. Francias) sin ustedes... hubiera acabado antes... Jajaja not. Gracias por el apoyo, la amistad, las enseñanzas, los regaños, las discusiones y las risas infinitas que tuvimos mientras realizaba mi tesis. Especialmente a Julión por esos regaños/enseñanzas que hicieron que me superara a mí misma, a Chava por siempre enseñarme y explicarme una y otra vez todo lo de bacteriología, a Rodri por el compartirme tanto conocimiento, a Lili por enseñarme todo lo de proteínas, qPCR y a Nath por cuidarme y preocuparse por mí. Los quiero tanto, gracias por esta amistad tan bonita que hizo que disfrutara estar 24/7 en el lab, que hizo que no me rindiera, ni frustrara cuando nada salía, que me hizo querer aprender más y que me superara todos los días.

A mis amigos de la FMVZ por el cariño que me han dado. Por siempre estar cuando más los necesito, por apoyarme en cada paso de este proyecto y por alentarme cuando creía que ya no podía más; y por todos los momentos de diversión que pasamos juntos.

A Julio Barrón por estar a mi lado y apoyarme durante este tiempo. Gracias por no dejar que me rindiera y por hacerme mejor persona cada día.

Al Dr. Verdugo, por confiar tanto en mí. Muchas gracias por todas las oportunidades que me ha dado, desde abrirme las puertas al LMM, recomendarme para ser ayudante de profesor, mandarme al programa Smith-Kilborne y más... Gracias por asesorarme y por siempre exigirme más. Espero nunca decepcionarlo.

A Lázaro Verdiguél, gracias por asesorarme y por siempre estar al pendiente de mí y de este trabajo. Te agradezco por ser mi asesor, por las enseñanzas que me has dado, por confiar en mí; además, te agradezco por ser mi amigo.

Al Dr. Basurto, gracias por el apoyo, las pláticas que tuvimos y por siempre sacarme una sonrisa,

A la Dra. Marce por apoyarme siempre durante este trabajo y en lo que viene.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología, por proporcionarme las facilidades para realizar este proyecto y las oportunidades que me otorgó. Y a cada uno de los integrantes de este departamento, que me apoyaron con su amistad y su conocimiento.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Situación Epidemiológica en México	4
1.2. Medidas Preventivas y Control de la enfermedad de acuerdo a la NOM-041-ZOO-1996.....	5
1.3. Diagnóstico	6
1.4. Características del género <i>Brucella</i>	7
1.5. Factores de Virulencia	9
1.5.1. Sistema de Secreción Tipo 4 (SST4)	9
1.5.2. Glucanos β -1,2 Cíclicos (C β G).....	11
1.5.3. Lipopolisacárido (LPS)	13
1.6. Mutantes Rugosas como candidatos vacunales de <i>Brucella</i> spp	21
1.6.1. El gen <i>wboA</i>	23
2. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVO GENERAL	27
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6. Material y Métodos.....	28
6.1. Cepas Bacterianas y condiciones de cultivo	28
6.2. Vectores de clonación y plásmidos	29
6.3. Iniciadores.....	33
6.4. Extracción de ADN total de <i>B. melitensis</i> 133 biovariedad 1	33
6.5. Extracción de ADN plasmídico.....	34
6.6. Células Electrocompetentes	34
6.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen <i>wboA</i>	34
6.8. Ensayo de restricción para el gen <i>wboA</i>	36

6.9.	Clonación del gen <i>wboA</i> en el vector pJET1.2/Blunt	36
6.10.	Subclonación del gen <i>wboA</i> en el pCR2.1	38
6.11.	Subclonación del gen <i>wboA</i> en pUC18.....	40
6.12.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del casete de resistencia a la kanamicina.	42
6.13.	Ensayo de restricción para el casete de kanamicina	44
6.14.	Clonación del casete de kanamicina en el vector pTZ57R/T	44
6.15.	Inactivación del gen <i>wboA</i> con el casete de kanamicina	46
7.	Resultados	48
7.1.	Extracción de ADN total de <i>Brucella melitensis</i> 133	48
7.2.	Alineamiento in silico del gen <i>wboA</i>	48
7.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen <i>wboA</i> de <i>Brucella melitensis</i>	49
7.4.	Ensayo de restricción del gen <i>wboA</i>	50
7.5.	Clonación del gen <i>wboA</i> en el vector pJET1.2/Blunt	51
7.6.	Subclonación del gen <i>wboA</i> en el pCR2.1	53
7.7.	Subclonación del gen <i>wboA</i> en pUC18.....	55
7.8.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del casete de resistencia a la kanamicina.	57
7.9.	Clonación del casete de kanamicina en el vector pTZ57R/T	59
7.10.	Inactivación del gen <i>wboA</i>	59
8.	DISCUSIÓN	65
9.	CONCLUSIONES	72
10.	PROSPECTIVAS	73
11.	REFERENCIAS.....	74
12.	ANEXOS	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de los Estados Unidos Mexicanos donde se muestran las fases de control para la brucelosis en los animales domésticos.	4
Figura 2. El operon <i>virB</i> y el sistema de secreción tipo IV que codifica.	10
Figura 3. Representación de la envoltura celular de <i>Brucella</i>	13
Figura 4. Organización de genes encargados de la biosíntesis del Antígeno O y del núcleo.	15
Figura 5. Vías de la biosíntesis del antígeno O y del núcleo del LPS. <i>Brucella</i> deriva todos sus azúcares de glucosa.	17
Figura 6. Tráfico intracelular del LPS de <i>B. abortus</i> en macrófagos y la inhibición de la presentación de antígenos.	20
Figura 7. Diagrama de flujo con la metodología utilizada para el trabajo experimental.....	28
Figura 8. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt.	30
Figura 9. Mapa del plásmido pCR2.1.....	31
Figura 10. Mapa del plásmido pUC18.....	31
Figura 11. Mapa del plásmido pKD4.....	32
Figura 12. Mapa del plásmido pTZ5R/T.....	32
Figura 13. Secuencia del gen <i>wboA</i>	35
Figura 14. Condiciones de la PCR <i>wboA</i>	35
Figura 15. Mapa del plásmido pCJW.	38
Figura 16. Mapa del plásmido pCTW.....	40
Figura 17. Mapa del plásmido pCQB.	42
Figura 18. Condiciones de la PCR casete de kanamicina.	43
Figura 19. Secuencia del Casete de kanamicina..	44
Figura 20. Mapa del plásmido pTZKAN.	45
Figura 21. Mapa del plásmido pCQBK.....	47
Figura 22. ADN total de <i>Brucella melitensis</i>	48
Figura 23. Alineamiento del gen <i>wboA</i> con el cromosoma I de <i>B. melitensis</i>	49
Figura 24. Producto de la amplificación de la PCR <i>wboA</i>	49

Figura 25. Ensayo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de los perfiles de restricción del gen <i>wboA</i> digerido con <i>Clal</i>	50
Figura 26. Ensayo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de los perfiles de restricción del gen <i>wboA</i> digerido con <i>EcoRV</i>	51
Figura 27. PCR <i>wboA</i> para las clonas pCJW.....	52
Figura 28. Ensayo de restricción de pCJW	53
Figura 29. Digestión de pCJW y pCR2.1.....	54
Figura 30. PCR para el gen <i>wboA</i> de pCTW.	54
Figura 31. Ensayo de restricción del pCTW.....	55
Figura 32. Ensayo de restricción de pCTW y pUC18.....	56
Figura 33. PCR <i>wboA</i> para las clonas pCQB.....	56
Figura 34. Ensayo de restricción de pCQB.....	57
Figura 35. Extracción de plásmido pKD4.....	58
Figura 36. PCR para el casete de kanamicina del pKD4 y digestión del amplificado con <i>PstI</i>	58
Figura 37. Plásmido pTZKAN y PCR Kan.....	59
Figura 38. Digestión con <i>Clal</i> de pCQB y pTZKAN.....	60
Figura 39. Extracción plásmido pCQBK.	61
Figura 40. PCR <i>wboA</i> y Kan de pCQBK.....	61
Figura 41. Ensayo de restricción del amplificado de la PCR <i>wboA</i> de pCQBK.....	62
Figura 42. PCR con combinación de iniciadores del pCQBK.....	63
Figura 43. Alineación de los fragmentos secuenciados.	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mutantes rugosas de <i>B. melitensis</i> en el gen <i>wboA</i>	23
Cuadro 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR del gen <i>wboA</i> ..	35
Cuadro 3. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR del casete de kanamicina.....	43

RESUMEN

QUEIJEIRO BARROSO CLOÉ. Construcción de un plásmido recombinante con el gen inactivado *wboA* de *Brucella melitensis*. (Bajo la dirección de: Antonio Verdugo Rodríguez y Lázaro Felipe Verdiguél Fernández).

La brucelosis es una zoonosis, causada por el género *Brucella* spp. La especie considerada la más patógena para el humano es *B. melitensis*, especie causante de la brucelosis en pequeños rumiantes. La vacunación contra *B. melitensis* se lleva cabo con la cepa Rev1; la respuesta inmune generada, provoca interferencia con el diagnóstico serológico debido al fenotipo S-LPS que presenta. Por lo tanto, se busca desarrollar potenciales inmunógenos rugosos. El objetivo del trabajo es la construcción de un plásmido recombinante con el gen *wboA* interrumpido con un casete de resistencia a kanamicina; con la finalidad de realizar en trabajos futuros la transformación en *B. melitensis* con el plásmido, reemplazando el gen silvestre *wboA* con el gen *wboA::kan* y así, evitar la polimerización del antígeno O, generando una cepa rugosa. El gen *wboA* fue amplificado mediante la técnica de PCR y clonado en el vector pJET1.2/Blunt, obteniendo el pCJW. Posteriormente se realizó la subclonación del gen en el pCR2.1TOPO, por medio de doble digestión en los sitios de restricción *XbaI* y *XhoI*, obteniendo el pCTW. La subclonación en el pUC18, se llevó a cabo por doble digestión con *BamHI* y *XbaI*, obteniendo el pCQB. Se clonó un casete de resistencia a kanamicina en el pTZ57R/T, obteniendo el pTZKAN. Por último, se subclonó el casete de kanamicina en el pCQB, mediante digestión en *Clal*; obteniendo el pCQBK, plásmido que contiene el gen *wboA::kan*.

CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE CON EL GEN INACTIVADO *wboA* DE *Brucella melitensis*.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis, también conocida como “fiebre del Mediterráneo” o “fiebre de Malta” es una zoonosis de origen bacteriano causada por miembros del genero *Brucella* (Corbel MJ. 2006). Es considerada una de las zoonosis más comunes, con más de 500 000 casos nuevos al año en el humano (Pappas, 2006; Figueiredo *et al.*, 2015).

Por lo que la Organización mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) incluye a la brucelosis en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria a la OIE para animales terrestres y acuáticos, en la sección de “Enfermedades, infecciones e infestaciones comunes a varias especies” debido al impacto negativo económico y sanitario (OIE 2015). Especies de *Brucella* se encuentran listadas como potenciales armas biológicas por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) en Estados Unidos (Goodwin *et al.*, 2016).

El Subcomité para la taxonomía de *Brucella* acepta a la fecha 10 especies en el género: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti* y *B. inopinata* (Whatmore, 2009).

A pesar de que la mayoría de las especies de *Brucella* pueden afectar al humano, *Brucella melitensis* es la especie más frecuentemente reportada y aislada en casos humanos. Es considerada como la especie más virulenta y asociada a un cuadro agudo. Infecta generalmente ovejas y cabras, pero puede infectar otras especies

como camellos, bovinos y perros. También se ha reportado un aislamiento de esta especie en el pez gato (*Ameiurus melas*) (Corbel, 2006).

Las fuentes comunes de infección en las personas incluyen el contacto con productos de abortos de animales; ingestión de productos lácteos no pasteurizados; ingestión de productos cárnicos contaminados con poca cocción; contacto con cultivos de laboratorio y muestras de tejido, y la inyección accidental de vacunas atenuadas de brucelosis (Corbel, 2006). La presentación clínica incluye sintomatología variable como un cuadro febril agudo, dolores generalizados y sudoración extrema; se puede observar esplenomegalia, hepatomegalia, tos y signos gastrointestinales como diarrea, vómitos y náuseas. En ocasiones se observan complicaciones como artritis, espondilitis, meningitis, endocarditis (Figueiredo *et al.*, 2015; CFSPH 2010).

La transmisión en animales ocurre usualmente por contacto con placenta, fetos, fluidos fetales y descargas vaginales de animales infectados. (Corbel, 2006; Díaz, 2013; CFSPH 2010). En hembras no gestantes la enfermedad suele ser asintomática, mientras que las hembras gestantes desarrollan una placentitis, que por lo general provoca el aborto en el último tercio de gestación. La glándula mamaria y los nódulos linfáticos regionales también pueden resultar infectados, por lo que se secreta el microorganismo en leche. También existe la transmisión vertical, los becerros se pueden infectar durante el nacimiento o al mamar calostro contaminado. En el macho puede aparecer orquitis y epididimitis, aunque no es frecuente (Díaz, 2013; Martirosyan *et al.*, 2011).

El impacto económico de la enfermedad es severo y está relacionado a las pérdidas en la producción animal, por ejemplo: disminución en la producción láctea, disminución del porcentaje de fertilidad y restricciones de venta; así como, altos costos en salud pública relacionados al diagnóstico, tratamientos y disminución en la productividad de las personas afectadas. En Latinoamérica se estima una pérdida anual aproximada de \$600 millones de dólares (Goodwin *et al.*, 2016).

1.1. Situación Epidemiológica en México

La Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales (NOM-041-ZOO-1995) marca los lineamientos para el control, prevención y diagnóstico de esta enfermedad en animales domésticos (NOM-041 1996). De acuerdo con los datos reportados hasta abril del 2016, el 69.62% del territorio nacional se encuentra en fase de control, el 21.21% en fase de erradicación y el 9.16% libre (Sonora) solamente de brucelosis bovina por *B. abortus* (Figura 1) (SENASICA 2016)



Figura 1. Mapa de los Estados Unidos Mexicanos donde se muestran las fases de control para la brucelosis en los animales domésticos (SENASICA 2016).

En el periodo de enero-diciembre 2015 se reportó una frecuencia de animales seropositivos a especies lisas de 0.01% en caprinos, 0.02% en ovinos y 0.01% en bovinos; aunque, solo se aplicaron el 2.36% de pruebas en caprinos, 2.2% en ovinos y 9.8% en bovinos. La frecuencia de vacunación fue de 2% en caprinos, 0.67% en ovinos y 1.19% en bovinos (SENASICA 2016).

En humanos, de acuerdo a la NOM-017-SSA2-2012 la brucelosis es un padecimiento de vigilancia epidemiológica y de periodicidad de notificación semanal. El Boletín Epidemiológico reporta un acumulado hasta la semana 52 del 2015 de 1,004 casos en hombres y 1,648 en mujeres; con un total de 2,652 casos reportados de brucelosis humana. Los estados con mayor número de reportes son Michoacán, Coahuila, Sinaloa y Puebla (SSA 2016).

La NOM-022-SSA2-1994, para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano; indica los lineamientos que comprenden las medidas de prevención, medidas de control en el humano y de vigilancia epidemiológica.

1.2. Medidas Preventivas y Control de la enfermedad de acuerdo a la NOM-041-ZOO-1996

Las fases de la campaña contra la brucelosis en las cuales se divide al país, se basan en el cumplimiento de requisitos; la fase en control se reconoce si se: inicia un padrón estatal de productores, control de la movilización del ganado, vacunación obligatoria, contar con el Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVE), eliminación de reactivos mediante sacrificio y tener una prevalencia de hatos mayor al 3% o desconocida. La fase en erradicación se reconoce si se cumplen los puntos de la

fase de control y se cuenta con el 100% de los hatos inscritos en la campaña como hatos libres o control-erradicación, además de tener una prevalencia menor al 3% con distribución conocida. La fase libre únicamente será reconocida si cumple los puntos previamente descritos, además se debe mantener en fase de erradicación por 36 meses, sin presentar ninguna evidencia de brucelosis y la vacunación se puede suspender (NOM-041 1996).

Las vacunas utilizadas en la campaña deberán ser constatadas y autorizadas por la Secretaría, las vacunas deben de ser vivas, atenuadas, liofilizadas y aplicadas vía subcutánea. Para la vacunación contra la brucelosis bovina se debe usar la cepa *B. abortus* 19, en dosis clásica (5×10^{10} UFC) para becerras de 3 a 6 meses de edad y en dosis reducida (3×10^8 a 3×10^9 UFC) para hembras mayores a 6 meses. La cepa *B. melitensis* REV 1 se debe de usar para la vacunación contra la brucelosis en ovejas y cabras; en dosis clásica (1 a 2×10^9 UFC) de 3 a 4 meses de edad y la dosis reducida (1×10^5 UFC) para hembras mayores de 4 meses. Ninguna de estas vacunas se debe de usar en machos (NOM-041 1996).

1.3. Diagnóstico

En humanos la NOM-022-SSA2-1994 indica las pruebas de diagnóstico que se deben de realizar y los posibles resultados. Se debe realizar primero Aglutinación con antígeno Rosa de Bengala, que demuestre anticuerpos específicos en el suero del paciente. La confirmación se debe realizar a través de titulación de anticuerpos específicos y aislamiento y tipificación de la bacteria. La titulación se lleva a cabo con las pruebas de Aglutinación Estándar (SAT) y 2-Mercaptoetanol (2-ME) (NOM-022 1994)

En animales el diagnóstico serológico de cepas lisas se realiza por las pruebas de anillo en leche, tarjeta al 8% y rivanol solo para bovinos, tarjeta al 3% para ovinos y caprinos, y fijación de complemento para todas las especies. Para el diagnóstico de *B. ovis* (Cepa rugosa) se realiza la prueba de Inmunodifusión doble en gel. El estudio bacteriológico se debe realizar a partir de muestras de leche, sangre y fragmentos de tejidos (NOM-041 1996).

Algunos autores proponen pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), PCR tiempo real y PCR multiplex para el diagnóstico directo en tejidos y secreciones. Se utilizan iniciadores que amplifiquen regiones conservadas por ejemplo el gen *bcsp31*, la subunidad 16S del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal y genes que codifican para proteínas de membrana externa (Bricker 2002, Leary *et al.*,2006).

1.4. Características del género *Brucella*

El género *Brucella*, se encuentra clasificado en la clase de las α -Proteobacteria (Moreno *et al.*, 2002). Las especies del género *Brucella* son bacilos cortos gram negativos de 0.6-1.5 μm de largo por 0.5-0.7 μm de ancho, agrupados en pares o pequeños grupos (European Commission 2001; von Bargen *et al.*, 2012). No poseen cápsula, no esporulan y son inmóviles, aunque poseen genes para codificar flagelo y estos se expresan bajo ciertas condiciones *in vitro* (European Commission 2001; Fretin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013).

Son aerobios, pero algunas especies requieren una atmósfera con 5-10% de dióxido de carbono (CO_2), la temperatura óptima de crecimiento es de 36-38° Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

y el pH óptimo es de 6.8. Producen catalasa, oxidasa y ureasa, reduce nitratos a nitritos, excepto *B. ovis* y algunas cepas de *B. canis*, y produce H₂S, excepto *B. melitensis*. No fermentan los azúcares empleados normalmente en las pruebas de identificación bioquímica por lo que no se utilizan para su identificación (European Commission 2001).

Con relación al genoma, casi todas las especies de *Brucella* poseen 2 cromosomas de aproximadamente 2.1 Mb y 1.2 Mb, excepto *B. suis* biovar 3 que presenta un solo cromosoma de 3.1 Mb; además de que presentan más del 90% de homología (Jumas-Bilak *et al.*, 1998). El contenido de guanina-citosina (GC) en el ácido desoxirribonucleico (ADN) es de 56-58% (Haag *et al.*, 2010).

La membrana externa (ME) está compuesta de una bicapa lipídica donde se encuentra el Lipopolisacárido (LPS) orientado hacia la superficie, el LPS se encuentra constituido por tres estructuras: el lípido A, el núcleo y la cadena O; también se encuentran proteínas de membrana externa (Haag *et al.*, 2010; Goolab *et al.*, 2015; Ducrotoy *et al.*, 2016). Las especies de *Brucella* se presentan naturalmente como lisas (S-LPS por sus siglas en inglés), presentando un LPS con una cadena O completa y cepas rugosas (R-LPS) con un LPS ausente o mínimo de cadena O (Haag *et al.*, 2010; Ducrotoy *et al.*, 2016). Las especies naturalmente rugosas son *B. canis* y *B. ovis* (Ii *et al.*, 2013; Martirosyan *et al.*, 2011)

Son bacterias intracelulares- extracelulares facultativas, se ha descrito la invasión y replicación en células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas y en no profesionales como células epiteliales y trofoblastos. La entrada de *Brucella* a las células sigue sin describirse en su totalidad. Está claro que puede

entrar a las células en ausencia de opsoninas u opsonizada (von Bargen *et al.*, 2012; Case *et al.*, 2016; Martirosyan *et al.*, 2011).

Después de la internación, *Brucella* desarrolla diferentes estrategias para evadir los mecanismos de resistencia del huésped. *Brucella* modula el tráfico intracelular de la vacuola contenedora de *Brucella* (BCV por sus siglas en inglés) para evadir la fusión y degradación en el lisosoma; para llegar al retículo endoplásmico (ER) que es su nicho de replicación (Gorvel J., 2008; Ahmed *et al.*, 2016)

1.5. Factores de Virulencia

Factores de virulencia como el LPS, los glucanos cíclicos, el sistema de secreción tipo 4 y sus efectores, son clave fundamental para que *Brucella* llegue a su nicho de replicación y se logre establecer la infección.

1.5.1. Sistema de Secreción Tipo 4 (SST4)

El SST4 está codificado por el operon *virB*, que consiste de 12 genes (*virB1-virB12*) localizados en el segundo cromosoma que codifican para 12 subunidades proteicas, regulados por el promotor corriente arriba de *virB1* (Ke *et al.*, 2015; de Jong *et al.*, 2012; Lacerda *et al.*, 2013). Este complejo proteico puede ser dividido en 5: el complejo de aguja (VirB2), el núcleo o el complejo de la membrana externa (VirB7, VirB9 y VirB10), el complejo de membrana interna (VirB3, VirB4, VirB6, VirB8 y la porción N-terminal de VirB10), complejo de enlace (VirB5 o VirB10) y las ATPasas (VirB4 y Virb11) (Ke *et al.*, 2015) (**Figura 2**). Realizando mutaciones en cada gen, se determinó que VirB1, VirB7 y VirB12 no juegan un papel esencial en la función de este sistema. (de Jong *et al.*, 2012).

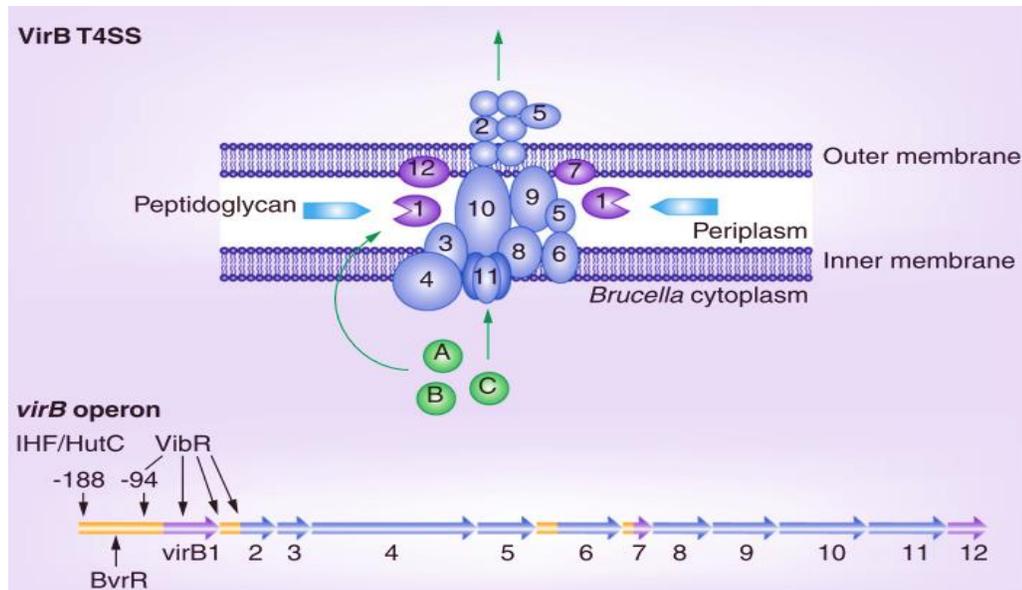


Figura 2. El operon *virB* y el sistema de secreción tipo IV que codifica. Los genes en azul son requeridos para la virulencia de *Brucella* in vitro en macrófagos e in vivo en ratones. Genes en morado no son esenciales para la virulencia en ratones. En naranja se muestran los promotores y las regiones intergénicas que contienen promotores hipotéticos (de Jong et al., 2012).

El operon *virB* es activado rápidamente después de la internación. Por lo menos se han identificado dos señales que afectan la expresión de este: el pH y la falta de nutrimentos (Gorvel J et al., 2002; Ke et al., 2015) La acidificación de la BCV en la vía endocítica se considera la señal clave para inducir la activación de *virB*. Mutantes deficientes de SST4 invaden a la célula huésped e interactúan con los endosomas tempranos y tardíos, adquiriendo marcadores tempranos como EEA1 (*early endosome antigen 1*) y tardíos como LAMP1 (*Lysosomal associated membrane protein 1*). Sin embargo, estas mutantes no perdían LAMP1, por lo que las vacuolas contenedoras de estas mutantes eran degradadas por los lisosomas (Ke et al., 2015; de Jong et al., 2012; Lacerda et al., 2013).

Se han identificado aproximadamente 15 efectores del SST4, de la mayoría de estos se desconoce su función biológica. Se ha demostrado que el efector VceC

interactúa con Bip/Grp78 y activa la respuesta a proteínas mal plegadas, induce estrés en el ER e induce respuesta pro inflamatoria; RicA interactúa con Rab2, mutantes en *ricA* mostraron pérdida de LAMP1 rápidamente, demostrando que RicA juega un papel en el tráfico intracelular; BtpA (también conocida como Btp1/TcpB) interactúa con el adaptador parecido a MyD88 (MAL)/TIRAP, inhibiendo la señalización de la activación de los TLRs (*Toll Like Receptor*), e inhibiendo la activación del NF- κ B (Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas); BspA, BspB y BspF inhiben la vía secretoria de proteínas en la célula huésped, pero se desconoce la proteína con la que interactúan; SepA se ha asociado a la inhibición de la fusión de la BCV con el lisosoma (Lacerda *et al.*, 2013; Gorvel J., 2014; Ke *et al.*, 2015; Byndloss *et al.*, 2015).

Por lo que se sugiere que los efectores traslocados por el SST4, tienen funciones en los eventos moleculares como: pérdida de marcadores de endosoma tardío o lisosomales; adquisición de marcadores de ER; interacción con vías secretorias; adquisición de marcadores de autofagosoma y regulación de la activación de algunas vías del sistema inmune (Ke *et al.*, 2015).

1.5.2. Glucanos β -1,2 Cíclicos (C β G)

Los C β G de *Brucella*, pertenecen a la familia II de los glucanos periplásmicos de osmoregulación, están compuestos por 17-25 residuos de glucosa. Se han comparado con las ciclodextrinas, debido a la apariencia similar de anillo con una cavidad lipofílica y una superficie externa hidrofílica. Son sintetizados en el citoplasma por una glucano cíclico sintetasa (Cgs), transportados al espacio

periplásmico por una proteína Cgt que actúa como un transportador-ABC y modificados por una glucano cíclico modificadora (Cgm) (**Figura 3**) (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005, Haag *et al.*, 2010).

Los C β G interactúan extrayendo el colesterol de las balsas lipídicas en la membrana celular del huésped, estos dominios ricos en colesterol tienen función en el transporte de moléculas, señalización intracelular y también representan el sitio de entrada de algunas toxinas y patógenos, incluyendo *Brucella*. Las balsas lipídicas además de localizarse en la membrana celular, están presentes en los fagosomas. Se ha demostrado que la liberación de colesterol de las balsas lipídicas está asociado a la activación de la transducción de señales, involucrando proteínas como proteína quinasa A (PKA) y segundos mensajeros de la tirosina quinasa, resultando en la fosforilación de tirosina; se cree que la perturbación de las balsas lipídicas causada por los C β G modifica la señalización de las vías cAMP-PKA. (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Martirosyan *et al.*, 2011).

También se ha observado que los C β G quedan adsorbidos en las balsas lipídicas del lumen de los fagosomas; por lo que se piensa que actúan estabilizando las membranas e impidiendo interacciones proteicas (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005, Haag *et al.*, 2010, von Bargen *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que mutantes en *cgs* son atenuadas en ratones y en la multiplicación intracelular de células HeLa, donde la mutante fue incapaz de evadir la fusión fagosoma-lisosoma (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005, Haag *et al.*, 2010, Roset *et al.*, 2014).

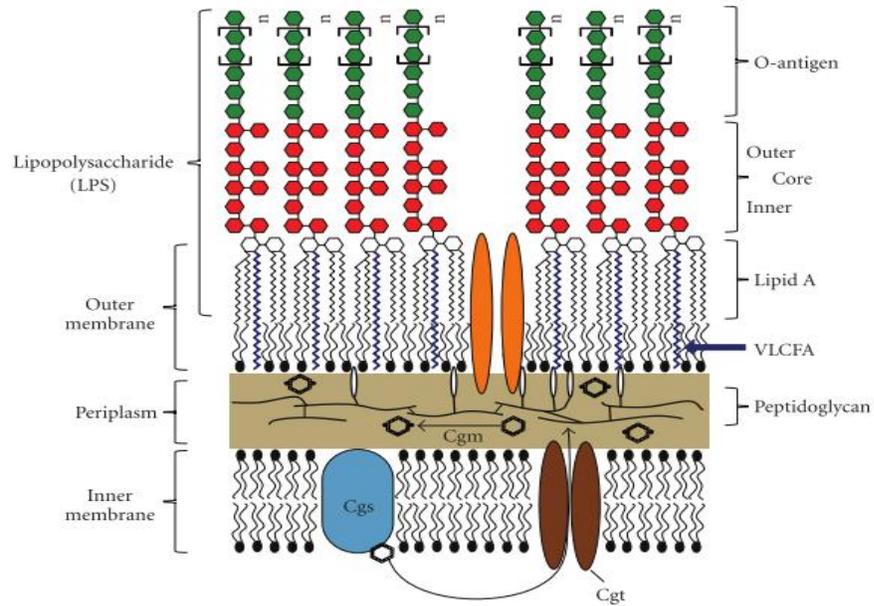


Figura 3. Representación de la envoltura celular de *Brucella*. La envoltura celular está compuesta de una membrana interna, constituida de una bicapa fosfolipídica, y una membrana externa, compuesta en su porción interna de fosfolípidos y en la porción externa de un lipopolisacárido (LPS). El LPS consiste de 3 componentes. El antígeno-O se encuentra orientado al espacio extracelular y es el componente que es reconocido por la respuesta inmune adaptativa. El antígeno-O se encuentra conectado al núcleo, molécula compuesta de diferentes azúcares que no se han identificado en su totalidad. El lípido A forma un ancla hidrofóbica, contiene ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA). Los Glucanos β -1,2 Cíclicos son sintetizados por la Cgs en la membrana interna y transportados al periplasma por el transportador-ABC Cgt, donde son modificados con dos residuos succinilos por Cgm (Haag et al., 2010).

1.5.3. Lipopolisacárido (LPS)

Como ya se mencionó el LPS se encuentra conformado por tres dominios: el Lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O o cadena O (**Figura 3**).

Los componentes de la membrana externa son el primer contacto entre la célula eucarionte y la bacteria, debido a la co-evolución que existe entre el huésped y el

patógeno, los compuestos del LPS se han convertido en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) que son reconocidos por el sistema inmune innato (Gorvel J., 2008; von Bargen *et al.*, 2012). Sin embargo, *Brucella* posee un LPS no clásico comparado con el LPS de enterobacterias como *Escherichia coli* (Cardoso *et al.*, 2006); debido a que ha evolucionado modificando su estructura para evadir los mecanismos de la respuesta inmune (von Bargen *et al.*, 2012).

El antígeno O está compuesto de homopolímeros lineales de 96-100 subunidades de α -1,2 enlace 4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosil o N- formil-perosamina. (Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006; Ducrotoy *et al.*, 2016). El antígeno O en *Brucella*, se puede dividir con base en su reactividad con anticuerpos monoclonales: A, M y C. Esta diferencia depende de los enlaces que presenten las subunidades que lo conforman, la reactividad con A corresponde a enlaces α -1,2 en su mayoría, por ejemplo, *B. abortus* biotipo 1 presenta exclusivamente este tipo de enlace; en M se encuentran enlaces α -1,2 y α -1,3, por ejemplo *B. melitensis* biotipo 1; y C que reacciona con cualquier tipo de enlace (Siadat S., 2012; Ducrotoy *et al.*, 2016). La mayoría de la biosíntesis del antígeno O se localiza en la región *wbk* y dos genes en la región *wbo* en el cromosoma I. La región *wbk* tiene un porcentaje menor (44-49%) de G + C que el del resto del genoma de *B. melitensis* (56-58%), además se encuentra flanqueada por secuencias de inserción, indicando que posiblemente esta región se adquirió por transferencia lateral (**Figura 4**). Las subunidades de este antígeno son sintetizadas vía Wzy-independiente, posterior a su ensamblaje en la cara citoplasmática de la membrana interna es transportado al periplasma por un

sistema transportador ABC (ATP-binding cassette), formado por Wzm y Wzt (**Figura 5**). La delección de los genes *wzm/wzt* resulta en la acumulación intracelular del antígeno O. Mutaciones en genes que se encuentran en la región *wbo* y *wbk* en el cromosoma I, involucrados en la provisión de perosamina o bactoprenol; dan como resultado cepas rugosas (**Figura 5**) (Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006).

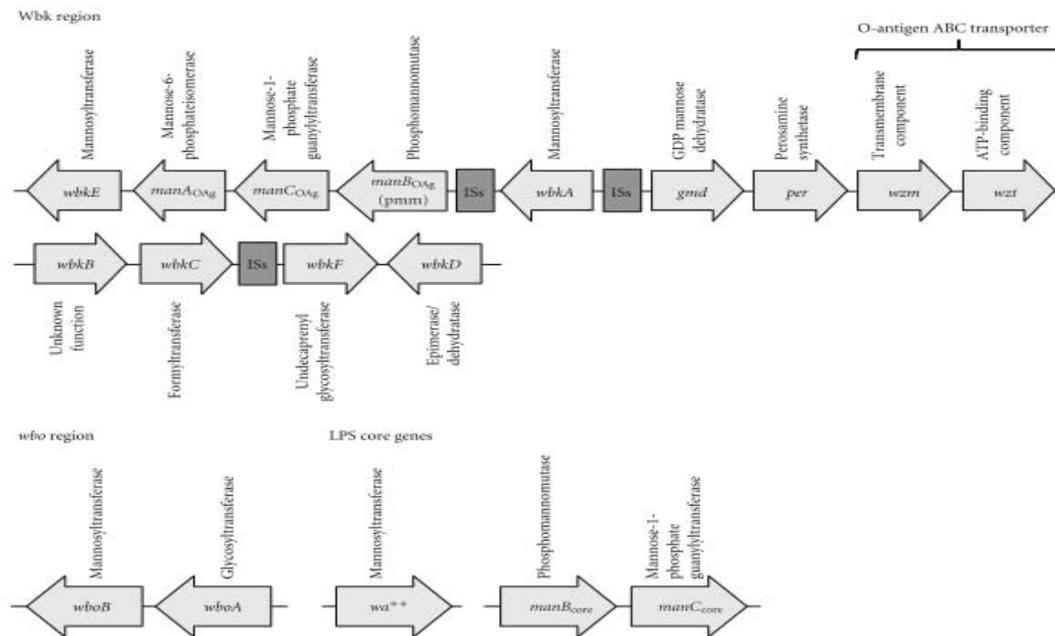


Figura 4. Organización de los genes encargados de la biosíntesis del Antígeno O y del núcleo. Los genes involucrados en la biosíntesis del antígeno O y del núcleo de *B. melitensis* se encuentran distribuidos en cuatro diferentes locis. La mayoría de los genes se localizan en la región *wbk* y *wbo* del cromosoma I. Los genes de la biosíntesis del núcleo se encuentran en el cromosoma I (*wa***) y en el cromosoma II (*manB_{core}* y *manC_{core}*). La región *wbk* contiene múltiples secuencias de inserción (ISs) sugiriendo que esta región fue adquirida por transferencia horizontal genética (Haag *et al.*, 2010).

B. ovis y *B. canis* son cepas naturalmente rugosas, *B. ovis* carece de la región *wbo* y del gen *manA*; y *B. canis* presenta delección de los genes *wbkD* y *wbkF* (Haag *et al.*, 2010; Mancilla *et al.*, 2010).

El núcleo oligosacárido se encuentra compuesto de glucosa, manosa, quinovosamina, glucosamina, ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (KDO) y otros azúcares que no han sido identificados. No ha sido posible identificar las vías de biosíntesis, pero se han identificado algunos genes involucrados en esta vía (Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006).

El gen *pgm* codifica a una fosfoglucomutasa que convierte a fosfato-6-glucosa en fosfato-1-glucosa, molécula involucrada en la síntesis de los azúcares del núcleo. Mutantes en este gen, tienen un fenotipo rugoso y son susceptibles a la lisis mediada por el complemento, además de ser atenuadas en el modelo murino (Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006).

manB y *manB_{core}* codifican para fosfomanomutasas, enzima encargada de la conversión de fosfato-6-manosa en fosfato-1-manosa. La mutación de *manB* no tiene efecto sobre el fenotipo de la cepa, pero la mutación en *manB_{core}* si afecta la síntesis del núcleo y de la cadena O. Lo mismo se ve con los genes *manC* y *manC_{core}*, que codifican para guaninatransferasas, encargados de proveer manosa (**Figura 5**). El gen *wa^{**}* codifica a una glucosiltransferasa putativa. Mutantes con inserción de transposon en este gen, son sensibles a péptidos catiónicos (Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006).

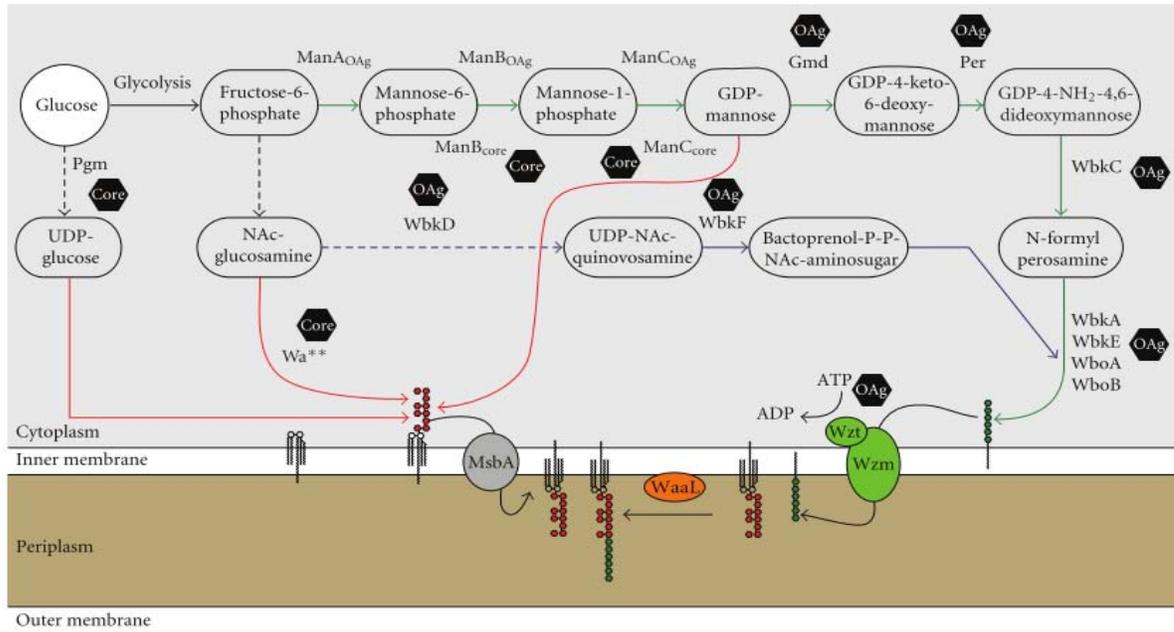


Figura 5. Vías de la biosíntesis del antígeno O y del núcleo del LPS. *Brucella* deriva todos sus azúcares de glucosa. Las flechas verdes indican las reacciones en la síntesis de las subunidades monoméricas del antígeno O, que son polimerizados en bactoprenol (vía en azul). El antígeno O completo es transportado a la cara periplásmica de la membrana interna por el transportador ABC Wzm/Wzt y ligado al lípido A por la ligasa WaaL. Las vías de la biosíntesis del núcleo se encuentran en rojo. Los hexágonos indican si la mutación de este gen afecta la biosíntesis del Antígeno O (OAg) o del núcleo (Core). La línea punteada indica abreviación en diferentes vías (Haag et al., 2010).

El lípido A se encuentra compuesto de un esqueleto de 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa, modificado con cadenas de ácidos grasos saturados de cadena muy larga (VLCFA, *Very Long Chains of Fatty Acids*). Mutantes del gen *bacA* muestran una reducción en el contenido de VLCFA (von Bargen et al., 2012; Haag et al., 2010; Cardoso et al., 2006).

Se encuentra anclado a la membrana externa y es el responsable de la endotoxicidad que se le atribuye al LPS, ya que es liberado durante la muerte y crecimiento de las bacterias Gram-negativas, causando choque endotóxico

(Cardoso *et al.*, 2006; Haag *et al.*, 2010). En enterobacterias el grado de heterogeneidad depende de las diferentes combinaciones de enlaces amidas y éster de los ácidos grasos, fosfatos, azúcares, y diferentes tipos de azúcares que constituyen el esqueleto. En *Brucella* el lípido A carece de enlaces éster y de residuos de acil-oxiacil, además posee mayor cantidad de moléculas heptaaciladas, en comparación con el lípido A de *E. coli*, que presenta en su mayoría residuos hexaaxilados (Cardoso *et al.*, 2006). Los lípidos A hexaaxilados son potentes inmunoestimuladores, ya que las cadenas acilo se intercalan en el núcleo hidrofóbico del MD2, componente del heterodímero TLR4/MD2 (*myeloid differentiation 2*), las moléculas heptaaciladas actúan como un agonista parcial, ya que se unen al receptor e inducen una activación incompleta de este (Erridge *et al.*, 2002; Dueñas *et al.*, 2004; Bryant *et al.*, 2010; Haag *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2006).

La estructura bioquímica del LPS de *Brucella*, le permite ser resistente a los efectores anti microbianos del sistema inmune innato, ya que es menos endotóxico que el de las enterobacterias, además es pobre inductor del estallido respiratorio, de especies reactivas de nitrógeno y de secreción de lisozima, además de tener poca influencia en la producción de citocinas proinflamatorias, como Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Interferón (IFN) I y II, así como proteínas anti microbianas como GTPasas de la familia p-47 y péptidos antimicrobianos; entre otras (Haag *et al.*, 2010; Lapaque *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013). El LPS de *Brucella* protege de péptidos catiónicos antimicrobianos, como defensina NP-2, lactoferrina, polimixina B y extractos lisosomales de polimorfonucleares; esta habilidad esta

correlacionada al bajo número de péptidos aniónicos en el núcleo (Lapaque *et al.*, 2005; Byndloss *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que es capaz de inhibir la activación del complemento; es bien conocido que el LPS clásico de algunas enterobacterias activa la vía clásica y alterna del complemento, pero el LPS de *Brucella* activa débilmente la vía alterna del complemento. Las mutantes rugosas son más sensibles a la actividad del complemento que las cepas lisas, confirmando que la cadena O previene la deposición del complemento en la superficie bacteriana, por lo tanto, evita la muerte mediada por complemento (Lapaque *et al.*, 2005; Martirosyan *et al.*, 2011; Byndloss *et al.*, 2015).

La cadena O de *B. melitensis* activa débilmente la secreción de citocinas en macrófagos de origen humano y murino, lo contrario se observa en las cepas rugosas que inducen la expresión de citocinas inflamatorias y de sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en niveles similares a los del LPS de *E. coli* (Lapaque *et al.*, 2005).

Se ha observado que la cadena O y el lípido A están implicados en la internación y en etapas tempranas del tráfico vesicular durante la infección por *Brucella*. La entrada por balsas lipídicas es dependiente de la cadena O en cepas naturalmente lisas, además de la interacción de proteínas como HSP60 (*Heat Shock Protein 60*) con la proteína del huésped PrPC (Proteína Priónica Celular) y la del lípido A con SR-A (*Scavenger Receptor A*) (Gorvel J., 2014; Lapaque *et al.*, 2005; Case *et al.*, 2016). Las cepas mutantes rugosas no entran por balsas lipídicas y se fusionan

rápidamente con los lisosomas, lo contrario a las cepas lisas vivas o muertas (Lapaque *et al.*, 2005; Gorvel J., 2014).

Se ha encontrado que el LPS de *Brucella* se llega a localizar en macrodominios en la superficie celular con el Complejo Principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés), donde interfiere con la presentación a células T CD4⁺, ya que en estos macrodominios se conglomeran los MHC-II y se produce una efecto estérico, que impide un reconocimiento suficiente entre el receptor de células T (TCR) y el complejo péptido- MHC-II (**Figura 6**); aunque no se ha observado este efecto en la presentación de antígenos por el MHC-I (Lapaque *et al.*, 2005; li *et al.*, 2013).

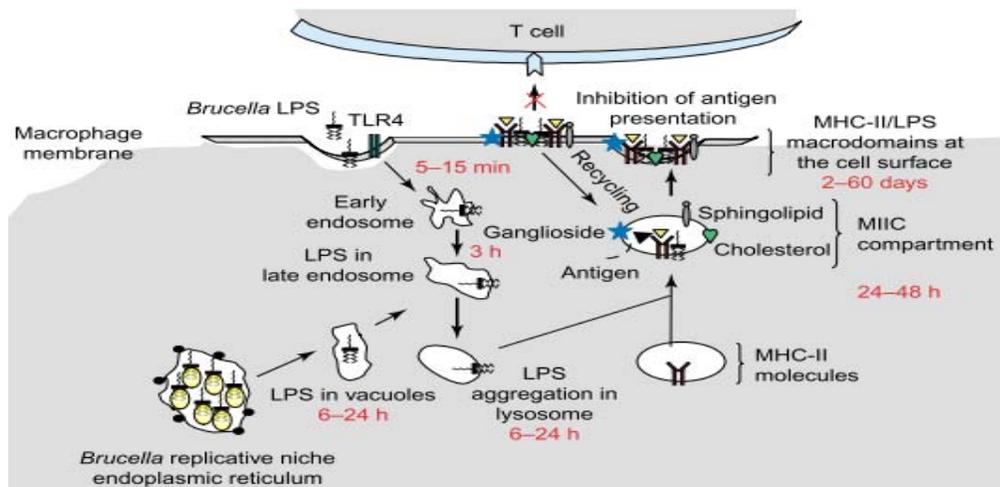


Figura 6. Tráfico intracelular del LPS de *B. abortus* en macrófagos y la inhibición de la presentación de antígenos. El LPS de *B. abortus* es internado en macrófagos y sigue la vía endocítica clásica utilizada por los antígenos proteicos, pero con una cinética más lenta. El LPS de *Brucella* se encuentra en un compartimento rico en el MHC-II y es reciclado a la superficie, donde forma un conjunto denso resistente con el MHC-II, denominados macrodominios. El LPS de *B. abortus* interfiere en la presentación del MHC-II de péptidos a células T CD4⁺ (Lapaque *et al.*, 2005).

1.6. Mutantes Rugosas como candidatos vacunales de *Brucella* spp

Debido a que los humanos son el huésped secundario para *Brucella*, las estrategias de control y erradicación prometedoras, son la vacunación del huésped principal y métodos eficientes de diagnóstico que puedan diferenciar entre animales vacunados e infectados (Haag *et al.*, 2010).

De acuerdo a Dorneles y col. la vacuna ideal contra la brucelosis debe de tener las siguientes características: ser una cepa viva y capaz de inducir una respuesta inmune tipo Th1 (*T helper 1*); no inducir anticuerpos que interfieran con las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de animales infectados; que sea una cepa atenuada y que no cause enfermedad, además de ser apatógena para el humano; ser capaz de inducir una protección de larga duración, prevenir abortos e incluso no causar abortos si se administra en animales gestantes; que solo se necesite una dosis; que la cepa sea estable y no revierta a la virulencia *in vitro* e *in vivo*; y que sea fácil de producir y de administrar (Dorneles *et al.*, 2015).

Las vacunas que se utilizan para la prevención de la brucelosis presentan algunas desventajas, por ejemplo: son virulentas en animales gestantes, provocando aborto; excreción de la cepa vacunal en leche; virulentas en humanos; y la respuesta inmunológica que inducen causa interferencia con el diagnóstico serológico de animales infectados. Por lo tanto, se busca desarrollar nuevos inmunógenos que sean avirulentos en animales y humanos, que induzcan una inmunidad protectora y que sea posible diferenciar animales vacunados de infectados; por lo que, las cepas R-LPS son candidatos vacunales adecuados (Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

La vacunación con cepas rugosas no induce anticuerpos anti-OPS (*O-side chains*), superando los problemas en el diagnóstico serológico (Yang *et al.*, 2012; Dorneles *et al.*, 2015).

Mutantes en el gen *wbkC* de *B. abortus* mostraron un fenotipo rugoso, atenuación *in vitro* en macrófagos e *in vivo* en el modelo murino y una respuesta protectora similar a la vacuna RB51, pero menor que la conferida por la cepa S19 (Lacerda *et al.*, 2010).

Mutante rugosa en el gen *wzt* de *B. melitensis* mostro una mayor susceptibilidad a la lisis por polimixina B y por complemento, comparándola con la cepa parental. Confirió niveles de protección similares al de la vacuna *B. melitensis* M5 (cepa lisa) en ratones y en ovejas gestantes no indujo aborto (Wang *et al.*, 2014).

Wang y col. generaron mutantes en *wbkD*, *wbkF*, *per*, *wboA*, *wboB*, *wbkE*, *wbkA*, *gmd*, *pgm*, *manB_{core}*, *wa^{**}* y *wzm* que mostraron un fenotipo rugoso, aunque con diferencias en sus propiedades de superficie, además, mostraron diferentes grados de atenuación y de respuesta inmune en el modelo murino. Incluso se observó que mutantes en el gen *per* de diferentes cepas de *B. melitensis* (16M y H38) mostraron diferentes grados de atenuación. Confirmando que las diferencias en el genotipo entre cepas afectan las propiedades de las mutantes (Gonzales *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013).

1.6.1. El gen *wboA*

El gen *wboA* codifica a una glicosiltransferasa, enzima esencial en la biosíntesis del antígeno O del LPS de *Brucella* (McQuiston *et al.*, 1999). El gen se encuentra localizado en la región *wbo* del cromosoma I (**Figura 4**). La glicosiltransferasa se encarga de realizar los enlaces α -1,2 entre subunidades de perosamina, en la polimerización de la cadena O (**Figura 5**) (Haag *et al.*, 2010). La mutación o delección de este gen afecta el fenotipo de la bacteria, resultando un fenotipo rugoso (McQuiston *et al.*, 1999).

La secuencia del gen *wboA* fue reportada en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) bajo el número de acceso de GenBank: AY065979.1; con 2698 pares de bases (pb) (Nikolich *et al.*, 2010).

La cepa vacunal rugosa de *B. abortus* RB51 presenta una secuencia de inserción IS711 en el gen *wboA*, que inactiva al gen (Vemulapalli *et al.*, 1999).

Se han realizado diferentes mutantes en el gen *wboA* de *B. melitensis* que generan cepas rugosas, en el Cuadro 1 se presentan algunas de las publicaciones de estas:

Cuadro 1. Mutantes rugosas de *B. melitensis* en el gen *wboA*

Cepa parental	Resultados	Referencia
<i>B. melitensis</i> 16M	Confirió protección cruzada al desafío con <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> y <i>B. ovis</i> .	Winter <i>et al.</i> , 1996.
<i>B. melitensis</i> 16M	Mayor activación de la vía de la lectina del complemento y mayor unión de C1q que la cepa parental lisa.	Fernández-Prada <i>et al.</i> , 2001.

<i>B. melitensis</i> 16M	No se replicó intracelularmente en macrófagos humanos y en ratones mostró ser avirulenta.	Nikolich <i>et al.</i> , 2010.
<i>B. abortus</i> S19, <i>B. abortus</i> 2308, <i>B. melitensis</i> 16M, <i>B. melitensis</i> NI	Diferencias en el grado de atenuación de la virulencia entre las cepas y diferencia en la respuesta inmune. No provocaron aborto al ser administradas durante la gestación.	Wang <i>et al.</i> , 2013.
<i>B. melitensis</i> M5-90	Disminución en la virulencia y en la respuesta inflamatoria. Protección en el 95% de los ratones desafiados. Respuesta humoral sin anticuerpos anti-OPS. Mayor producción de IFN- γ , que la cepa parental.	Li <i>et al.</i> , 2015.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a las desventajas antes mencionadas de la vacunación con la cepa *Brucella melitensis* REV-1 es importante construir una cepa rugosa inactivando el gen *wboA* de *Brucella melitensis* 133.

3. HIPÓTESIS

La utilización de vectores comerciales permitirán la interrupción en fase del gen *wboA* con un casete de resistencia a kanamicina, para que en trabajos futuros se genere una cepa rugosa de *Brucella melitensis*.

4. OBJETIVO GENERAL

Construcción de un plásmido recombinante con el gen inactivado *wboA* de *Brucella melitensis*, mediante el uso de vectores comerciales para su posterior recombinación en *Brucella melitensis*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la amplificación del gen *wboA* de *Brucella melitensis*.
- Inactivación del gen *wboA* en *Brucella melitensis* mediante la inserción de un casete de resistencia a kanamicina.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Diagrama de flujo de la estrategia experimental

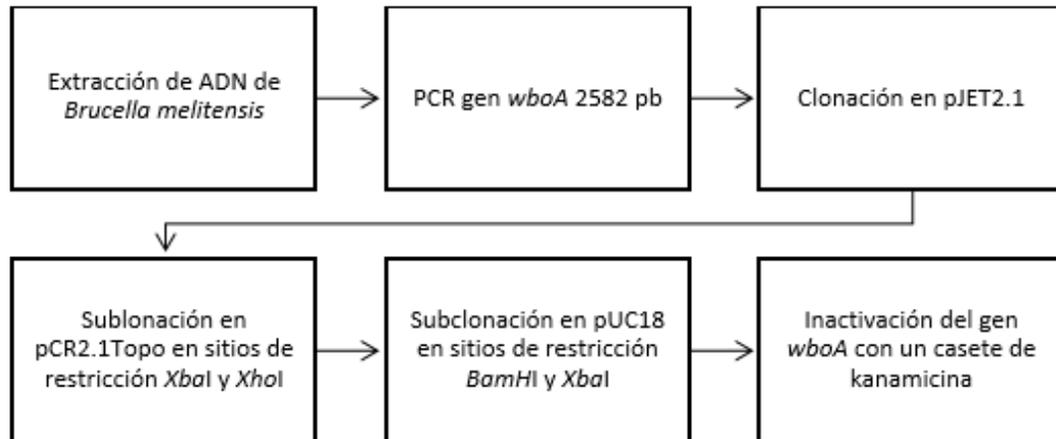


Figura 7. Diagrama de flujo con la metodología utilizada para el trabajo experimental.

6.1. Cepas Bacterianas y condiciones de cultivo

- *Brucella melitensis* 133 biovariedad 1 (Hernández-Castro *et al.*, 2008): Esta cepa silvestre se empleó para la extracción de ADN total. El manejo de esta cepa se realizó en la Unidad de Bioseguridad Nivel 3 del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

La cepa fue identificada y caracterizada por pruebas bioquímicas básicas y tinción de Gram. Fue sembrada en Agar *Brucella* sin antibiótico y cultivada a 37°C por 72 h (**Anexo 1**).

- *Escherichia coli* cepa DH5α: Se empleó para la clonación y transformación de las construcciones generadas en este trabajo. Se cultivó en Agar Luria

Bertani (**Anexo 1**) y se incubó 37°C por 18 h¹. La adición de antibiótico Ampicilina (Amp) (50 µg/ml) o Kanamicina (Kan) (50 µg/ml) se utilizó para la selección de clonas mutantes.

6.2. Vectores de clonación y plásmidos

- pJET1.2/Blunt²: Plásmido lineal de 2974 pb con extremos romos. Contiene el promotor T7 y un gen de resistencia a la Amp. Este vector se utilizó para la clonación del producto a partir de la PCR del gen *wboA* (**Figura 8**).
- pCR2.1TOPO³: Plásmido lineal de 3931 pb con extremos cohesivos de timina. Contiene un gen de resistencia a la Amp, otro a la Kan y un promotor del gen *LacZ*. Este plásmido una vez cerrado se utilizó para realizar la subclonación del gen *wboA* y flanquearlo con sitios de restricción *XbaI*⁴ y *BamHI*⁴ (**Figura 9**).
- pUC18: Plásmido cerrado de 2686 pb, contiene un gen de resistencia a la Amp, un sitio múltiple de clonación y un promotor del gen *LacZ*. Se utilizó como para subclonar el gen *wboA*, interrumpir el gen y posteriormente usarlo como vector de recombinación (**Figura 10**).
- pKD4: Plásmido cerrado de 3267 pb, contiene un gen de resistencia a la Penicilina, otro a la Kan y contiene sitios FRT (objetivos flip-recombinasa) donde actúan las flipasas. Fue utilizado como templete para la amplificación

¹ Incubadora, MRC®, LE-5009

² CloneJet PCR Cloning Kit, Thermo Scientific®.

³ TOPO® TA Cloning® Kit, Thermo Scientific®.

⁴ ThermoScientific®

de un casete de resistencia a la Kan flanqueado con sitios de restricción *ClaI*⁵ (Figura 11).

- pTZ57R/T⁶: Plásmido lineal de 2886 pb, contiene un casete de resistencia a la Amp y un sitio múltiple de clonación con extremos cohesivos de timinas. Fue utilizado para la clonación del casete de Kan obtenido del pKD4 (Figura 12).

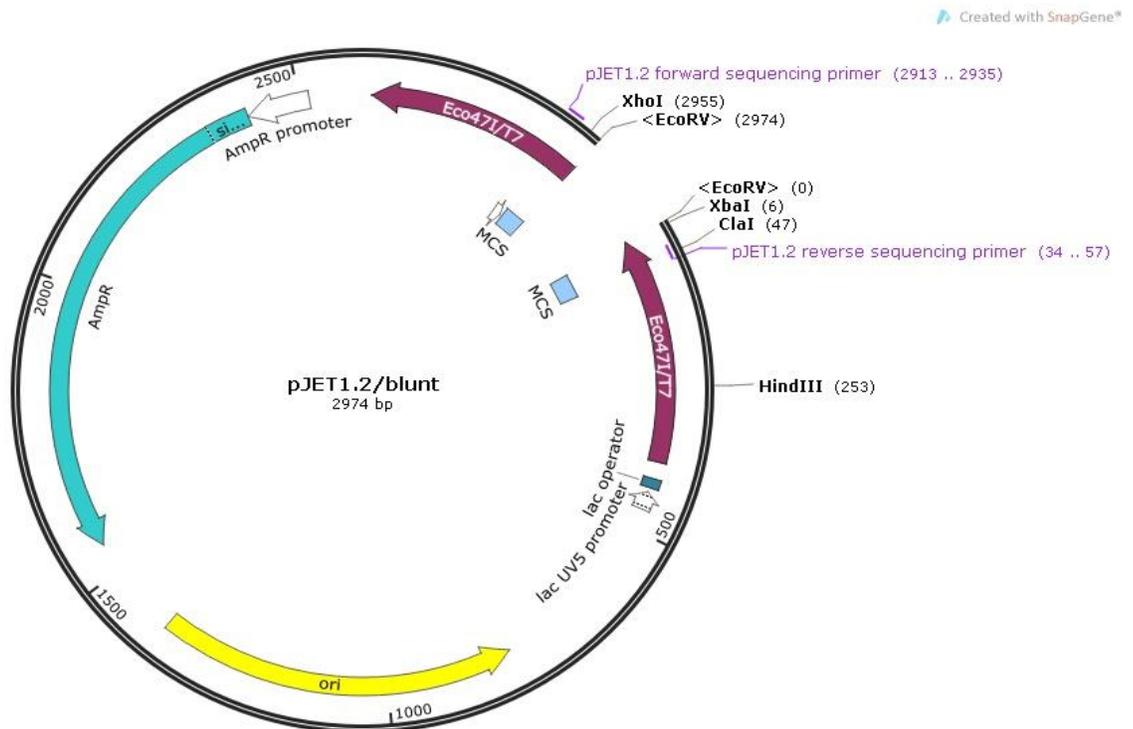


Figura 8. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt. Se muestra el sitio de clonación con extremos romos y el casete de resistencia a Amp. Imagen creada en *Snappene*.

⁵ Invitrogen®

⁶ InsTAclone PCR Cloning Kit, Thermo Scientific®.

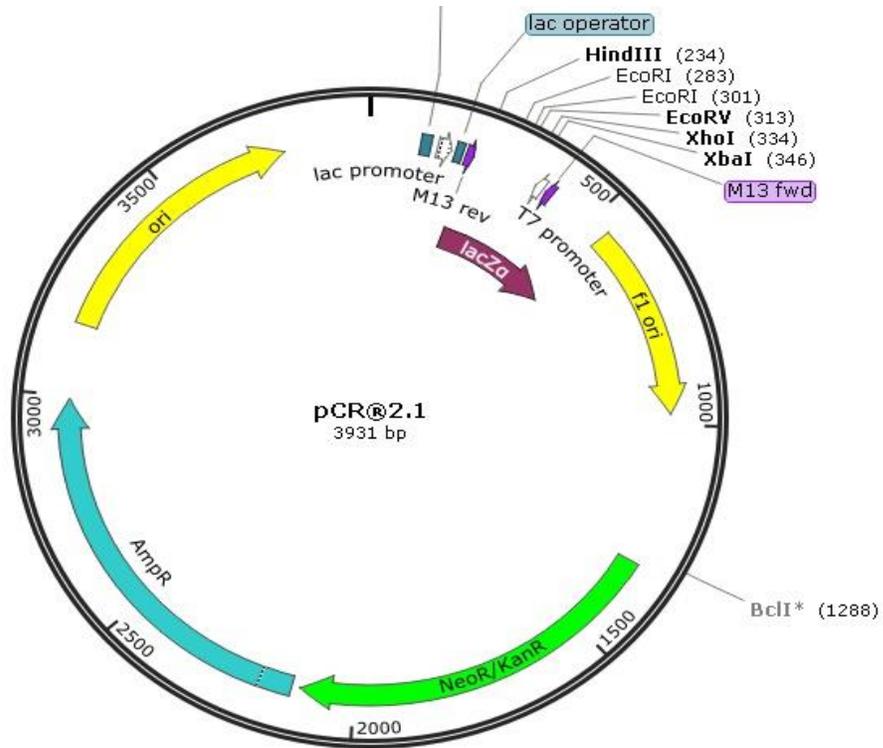


Figura 9. Mapa del plásmido pCR2.1. Se muestra el sitio múltiple de clonación y los casetes de resistencia a Amp y Kan. Imagen creada en *Snappgene*.

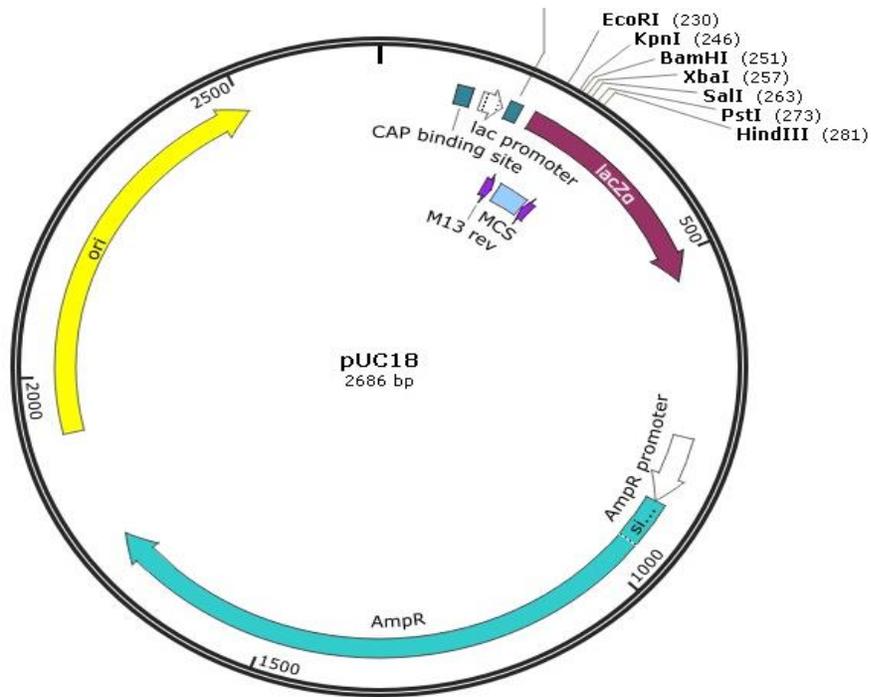


Figura 10. Mapa del plásmido pUC18. Se muestra el sitio múltiple de clonación y el casete de resistencia a Amp. Imagen creada en *Snappgene*.

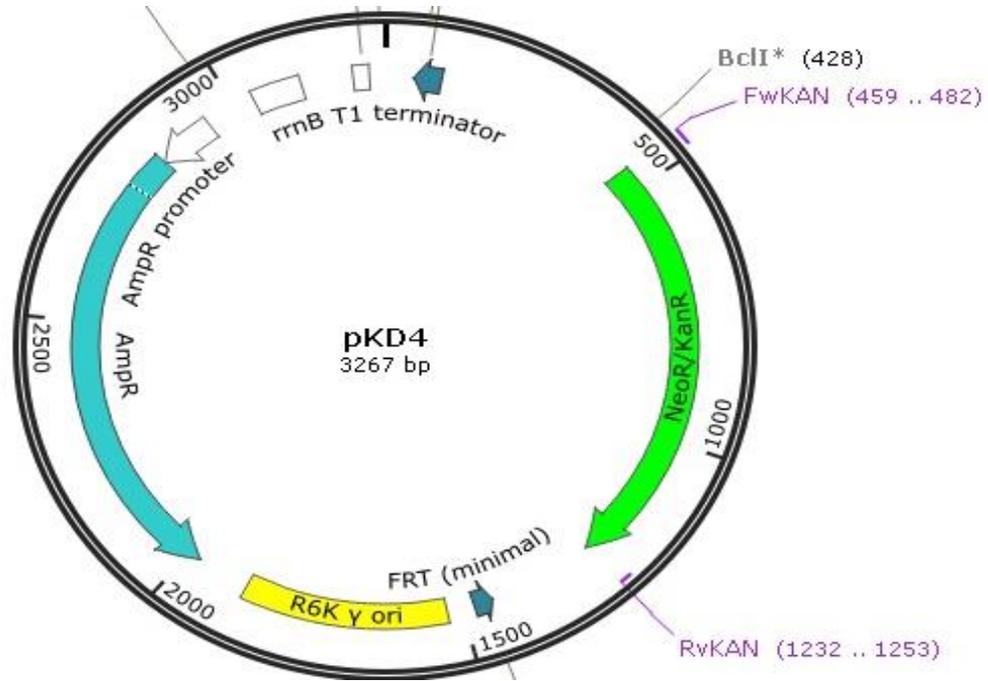


Figura 11. Mapa del plásmido pKD4. Se muestra el casete de resistencia a Kan y el de Amp. Imagen creada en *Snappgene*.

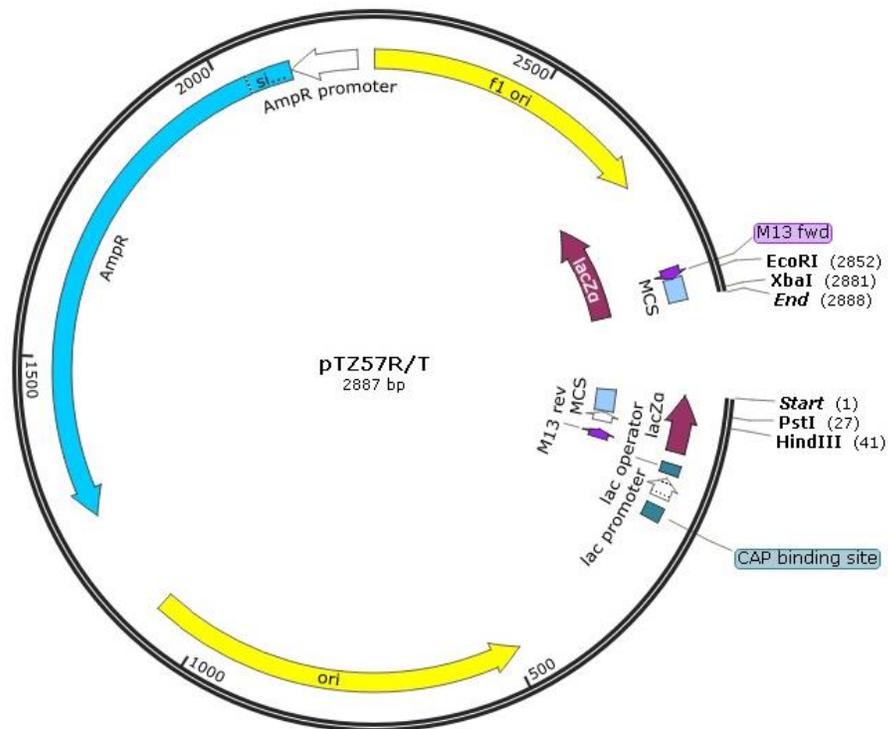


Figura 12. Mapa del plásmido pTZ5R/T. Se muestra el sitio múltiple de clonación y el casete de resistencia a Amp. Imagen creada en *Snappgene*.

6.3. Iniciadores

Los iniciadores fueron diseñados con el programa *Snappgene*[™] y en el sistema Primer-BLAST. Las secuencias de ADN utilizadas fueron las reportadas en el *GenBank* del NCBI provenientes del gen *wboA* (AY065979.1) del genoma de *Brucella melitensis* (AE008917.1) y del plásmido pKD4 (AY048743) respectivamente. Para el gen *wboA* se realizó un alineamiento *in silico* con la secuencia reportada del cromosoma I de *B. melitensis* biovariedad 1 16M.

- Iniciadores para el gen *wboA* de *Brucella melitensis*:

Sentido (Fw *wboA*): 5'-CACCTTATGTTTGGGACATT-3'

Antisentido (Rv *wboA*): 5'-AATAAGCCGACGAGCAAATA-3'

- Iniciadores para el casete de resistencia a la Kanamicina del pKD4 con sitios de restricción *Clal*:

Sentido (Fw Kan):

5'-GTTGGT**ATCG**ATATGATTGAACAAGATGGATTGCAC-3'

Antisentido (Rv Kan):

5'-GTTGGT**ATCG**ATTCAGAAGAAGTTCGTCGAAGAAGG-3'

6.4. Extracción de ADN total de *B. melitensis* 133 biovariedad 1

Se colectó la biomasa de los cultivos bacterianos y se suspendió en 5 ml de agua destilada estéril, se incubó en baño María a 80°C durante 1 h para su inactivación. Posteriormente se utilizó el protocolo de lisis por Tiocianato de Guanidina (Wang *et al.*, 2011). La extracción de ADN total fue evaluada en un

gel de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV (**Anexo 2**).

6.5. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN de los plásmidos y construcciones se empleó el protocolo de lisis alcalina mini prep y midi prep (Sambrook *et al.*, 2000)

Las extracciones de los plásmidos fueron evaluadas en un gel de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV (**Anexo 2**).

6.6. Células Electrocompetentes

Se realizaron células electrocompetentes de *E. coli* para su posterior transformación con los plásmidos, se almacenaron en un ultracongelador¹⁰ a -80°C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 2000).

6.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen *wboA*

Se estandarizó la técnica de la PCR punto final para la amplificación de un fragmento del gen *wboA* de 2582 pb de *Brucella melitensis* (**Figura 13**).

⁷ Agarosa Ultrapura, Invitrogen®

⁸ Sigma-Aldrich®

⁹ Mini Lumi, Bio-Imaging Systems.

¹⁰ Asheville, ULT1786-4-A47, Thermo Scientific®

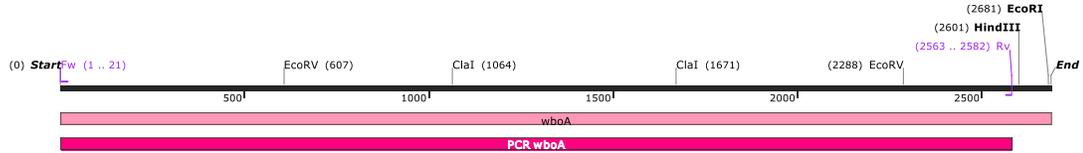


Figura 13. Secuencia del gen *wboA*. Secuencia completa del gen *wboA* de 2686 pb y el amplificado de la PCR de 2582 pb, mostrando los sitios de restricción. Imagen creada en *Snagene*.

Se utilizaron las condiciones del Cuadro 2 para una reacción de 50 μ l:

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR del gen *wboA*.

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua	-	29.5 μ l
Buffer 10X ⁵	50 mM	5 μ l
MgCl ₂ ⁵	50 mM	2.5 μ l
DNTPs ⁵	10 mM	2.5 μ l
Iniciador Fw <i>wboA</i>	10 μ M	2.5 μ l
Iniciador Rv <i>wboA</i>	10 μ M	2.5 μ l
ADN	200 ng	3 μ l
Taq polimerasa ⁵	1 U	1.5 μ l

Las condiciones establecidas en el termociclador¹¹ se muestran en la **Figura 14**.

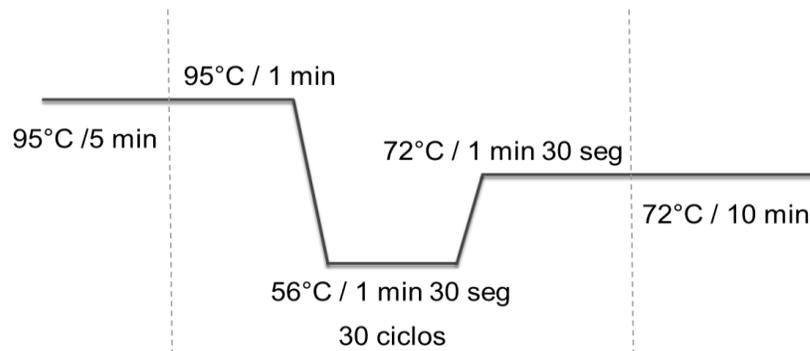


Figura 14. Condiciones de la PCR *wboA*. Diagrama con las constantes de temperatura, tiempo y ciclos utilizados para la PCR del gen *wboA*.

¹¹ Techne, TC-512.

El amplificado fue evaluado en un gel de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

6.8. Ensayo de restricción para el gen *wboA*

Para corroborar que se trabajara con el gen *wboA* se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro*, utilizando la enzima *ClaI*⁵ y *EcoRV*⁵.

En la **Figura 13** se encuentra el gen amplificado con los sitios de restricción.

La digestión fue evaluada en un gel de agarosa⁷ al 1% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

6.9. Clonación del gen *wboA* en el vector pJET1.2/Blunt

Previamente a la reacción de ligación el producto de la PCR fue digerido con una enzima que elimina los extremos de poli-adeninas, a 70°C en baño María¹² por 5 min. La reacción de ligación se realizó a una proporción inserto: vector de 3:1 con 1 unidad de enzima T4 DNA Ligasa⁴ y se utilizó la metodología que recomienda el fabricante.

Posteriormente esta reacción se utilizó para transformar *E. coli* DH5α electrocompetentes. Se agregaron 4 µl de reacción de ligación a 200 µl de células electrocompetentes y se electroporó utilizando un electroporador¹³ con las siguientes condiciones 2.5 Volts, 400 ohms y 25 µF. Se agregaron 800 µl de

¹² Precision GP10, Thermo Scientific®

¹³ Bio-Rad Gene Pulser®

medio SOC (**Anexo 1**) y se incubó a 37°C, 175 rpm por 1 h¹⁴. Posteriormente se centrifugó¹⁵ a 4000 rpm, se tomaron 200 µl y se decantó el sobrenadante. Se suspendió el pellet bacteriano en los 200 µl y se plaqueó en Agar LB con Amp (50µg/ml) con perlas de vidrio. Se incubó a 37°C por 18 h¹. Posterior al tiempo de incubación se realizó la selección de las colonias resistentes a Amp, se sembraron en Agar LB con Amp (50µg/ml) y en caldo LB (**Anexo 1**) con Amp (50µg/ml), se incubaron a 37°C por 18 h¹ y 37°C, 175 rpm por 18 h¹⁴ respectivamente.

Se verificó la presencia de plásmido mediante extracción y posteriormente se utilizó la PCR para comprobar la presencia del gen *wboA*. Finalmente se realizó un ensayo de restricción *in silico* e *in vitro* con las enzimas *Xba*⁴, *Xho*⁵, *Clal*⁵ y una digestión doble con *Xba*⁴ y *Xho*⁵. El producto de la PCR y los productos de la digestión fueron evaluados en geles de agarosa⁷ al 1.5% y 1% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

A la construcción obtenida se le denominó pCJW, con un peso de 5556 pb (**Figura 15**).

¹⁴ Incubator-Shaker, Lab-Line®

¹⁵ PrismR, Labnet International, Inc.®

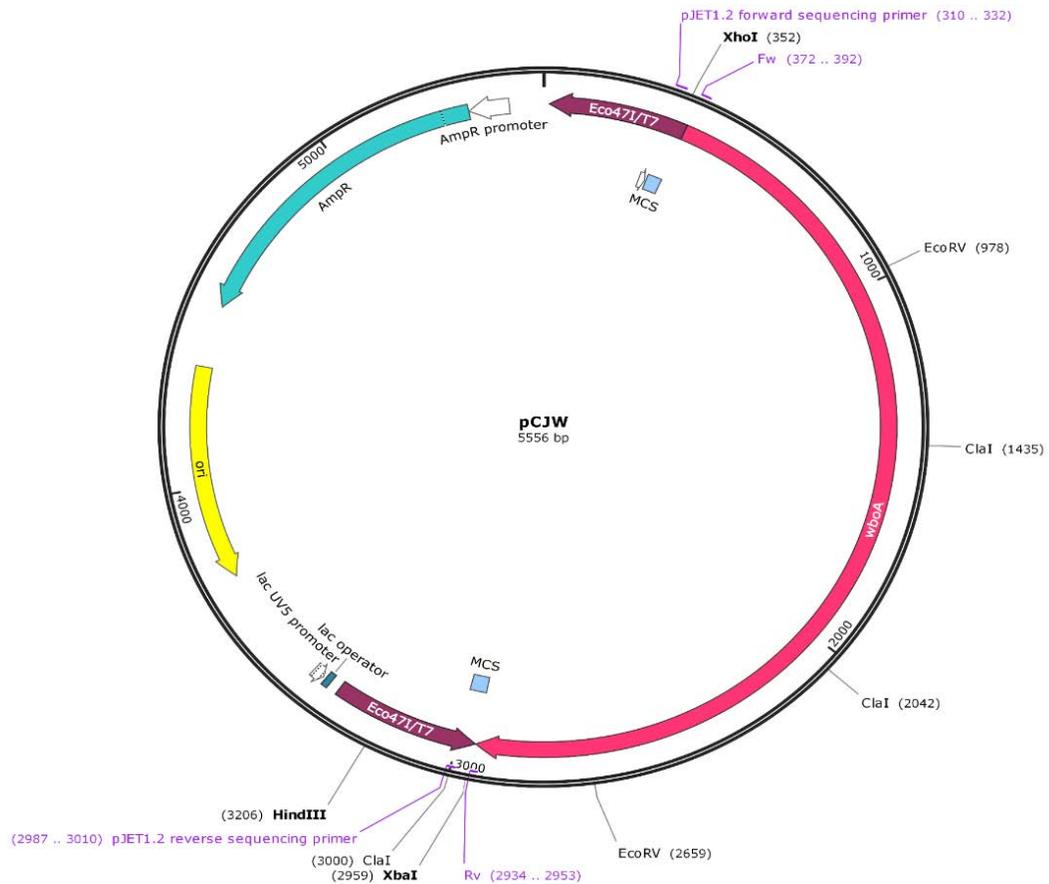


Figura 15. Mapa del plásmido pCJW. Se muestra la inserción del gen *wboA*. Foto obtenida del programa *Snappgene*.

6.10. Subclonación del gen *wboA* en el pCR2.1

Se realizó una doble digestión con las enzimas *Xba*I⁴ y *Xho*I⁵ en el pCJW y en el pCR2.1, con la finalidad de utilizar los mismos sitios de restricción para poder realizar la subclonación del gen. Con la doble digestión del pCJW se libera el gen de interés de 2607 pb y el plásmido pJET1.2 de 2949 pb, y en el pCR2.1 genera un fragmento de 3919 pb y 12 pb.

Posteriormente los fragmentos de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa 1% con el *kit* comercial Zymoclean Gel DNA Recovery¹⁶, usando la metodología que recomienda el fabricante. Los fragmentos purificados se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa⁴ como marca el fabricante de esta enzima. Esta reacción se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5α por medio de electroporación, se utilizó la misma metodología descrita en el punto 1.9. Se plaquearon en agar LB con Kan (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C por 18 h. Se seleccionaron las colonias resistentes a Kan y se sembraron en agar LB con Amp (50 µg/ml). Las colonias resistentes a Kan y Amp fueron sembradas en caldo LB con alguno de estos antibióticos a 37°C, 175 rpm por 18 h¹⁴. Se realizó la extracción de plásmido, con este plásmido se llevó a cabo la PCR para el gen *wboA*, descartando los plásmidos sin el gen de interés.

Finalmente se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro* con las enzimas *Xba*I⁴, *Hind*III⁴, *Eco*RV⁵ y una doble digestión con *Xba*I⁴ y *Hind*III⁴. El amplificado y la digestión fueron evaluadas en geles de agarosa⁷ al 1.5% y 1% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

La construcción se denominó pCTW, con un peso de 6526 pb (**Figura 16**).

¹⁶ Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, ZYMO RESEARCH

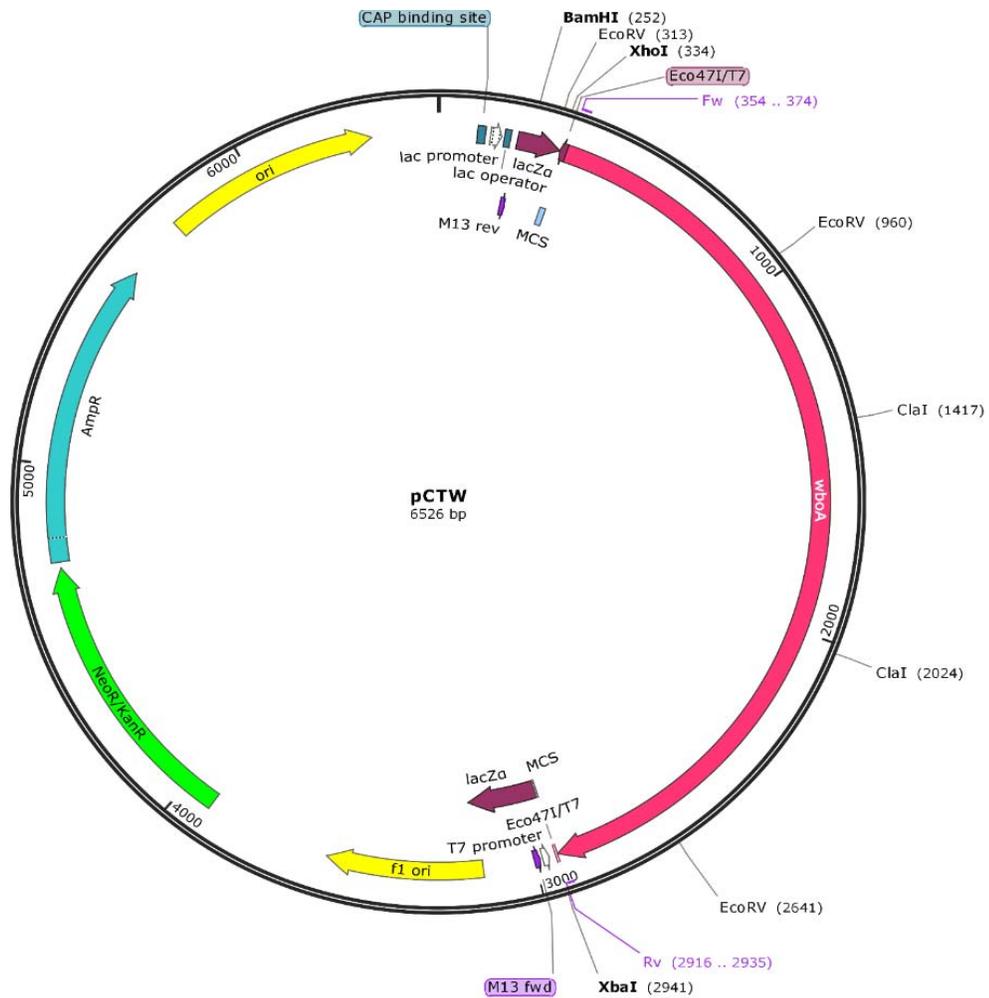


Figura 16. Mapa del plásmido pCTW. Se muestra la inserción del gen *wboA*, flanqueado con sitios *XbaI* y *XhoI*. Foto obtenida del programa *Snappgene*.

6.11. Subclonación del gen *wboA* en pUC18

Se realizó una doble digestión con las enzimas *XbaI*⁴ y *BamHI*⁴ en el pCTW y en el pUC18, con la finalidad de utilizar los mismos sitios de restricción para poder realizar la subclonación del gen. La doble digestión en el pCTW libera el gen de interés de 2689 pb y el plásmido de 3837 pb y en pUC18 genera un fragmento de 2680 pb y 6 pb.

Posteriormente los fragmentos de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa 1% con el *kit* comercial Zymoclean Gel DNA Recovery¹⁶, usando la metodología que marca el fabricante. Los fragmentos purificados se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa⁴ como marca el fabricante de esta enzima. Esta reacción se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α por medio de electroporación, se utilizó la metodología descrita en el punto 1.9. Se sembraron en agar LB con Amp (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 18 h¹. Se seleccionaron las colonias resistentes a Amp y se sembraron en caldo LB con Amp (50 μ g/ml) a 37°C, 175 rpm por 18 h¹⁴. Posteriormente se realizó la extracción de plásmido y se realizó PCR para el gen *wboA*. Se realizó un ensayo de restricción *in silico* e *in vitro* del plásmido obtenido con las enzimas *ClaI*⁵, *BamHI*⁴ y doble digestión *XbaI*⁴ y *BamHI*⁴. La extracción, el amplificado y la digestión fueron evaluadas en geles de agarosa⁷ al 1% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

La construcción se denominó pCQB, con un peso de 5369 pb (**Figura 17**).

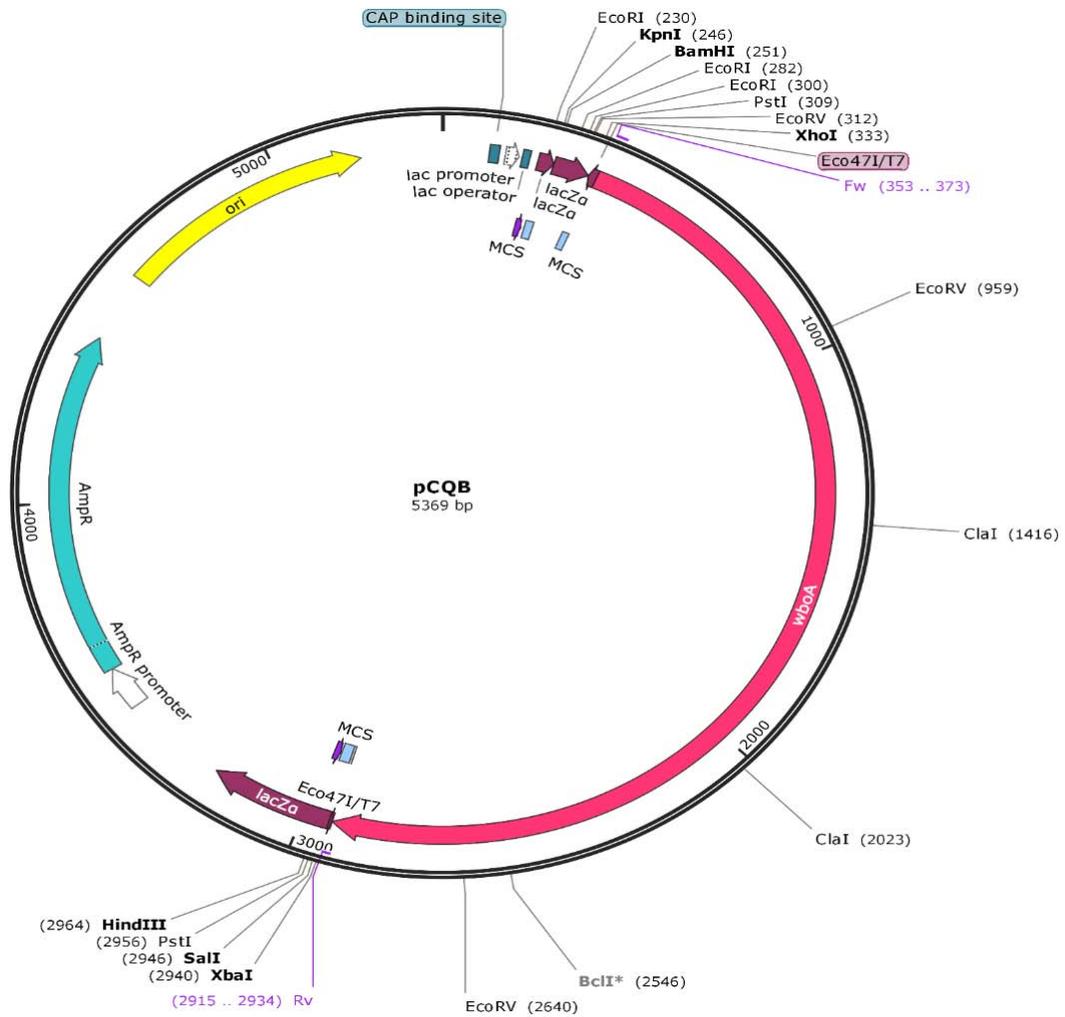


Figura 17. Mapa del plásmido pCQB. Se muestra la inserción del gen *wboA*. Foto obtenida del programa *Snappgene*.

6.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del casete de resistencia a la Kanamicina.

Se realizó la extracción de plásmido del pKD4 con el método de lisis alcalina y se estandarizó la técnica de la PCR punto final para amplificar el casete de resistencia a la Kan (819 pb) del pKD4 con sitios de restricción *ClaI*⁵.

Se utilizaron las condiciones del Cuadro 3 para una reacción de 50 μ l:

Cuadro 3. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR del casete de Kan.

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua	-	32.5 μ l
Buffer 10X ⁵	50 mM	5 μ l
MgCl ₂ ⁵	50 mM	2.5 μ l
dNTPs ⁵	10 mM	2 μ l
Iniciador Fwkan	10 μ M	2 μ l
Iniciador Rvkan	10 μ M	2 μ l
ADN	200 ng	3 μ l
Taq polimerasa ⁵	1 U	1 μ l

Las condiciones establecidas en el termociclador¹¹ se muestran en la **Figura 18**.

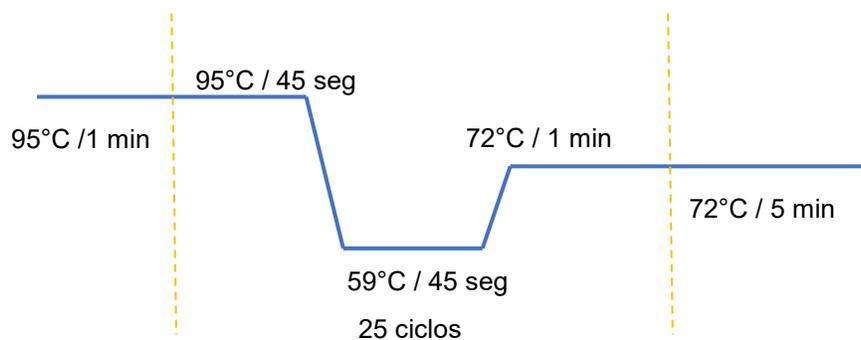


Figura 18. Condiciones de la PCR casete de Kan. Diagrama con las constantes de temperatura, tiempo y ciclos utilizados para la PCR del casete de Kan.

El amplificado fue evaluado en un gel de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

6.13. Ensayo de restricción para el casete de kanamicina

Para corroborar que se trabajara con el casete de Kan se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro*, utilizando la enzima de restricción *Pst*I⁴. El amplificado fue evaluado en un gel de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

En la Figura 19 se encuentra el gen amplificado con el sitio de restricción.

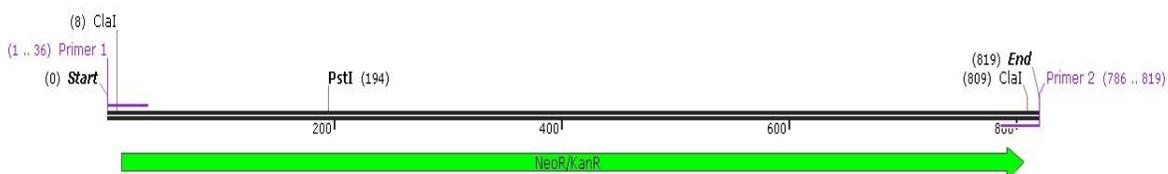


Figura 19. Secuencia del Casete de kanamicina. Se muestra el casete de Kan, flanqueado con los sitios de restricción *Cla*I.

6.14. Clonación del casete de kanamicina en el vector pTZ57R/T

Se utilizó la metodología que recomienda el fabricante del InsTAclone PCR Cloning Kit⁴, la reacción de ligación se realizó a una proporción inserto: vector de 3:1.

Posteriormente esta reacción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α electrocompetentes, se utilizó la misma metodología descrita en el punto 1.9. Se sembró en Agar LB con Amp (50 μ g/ml) con perlas de vidrio. Se incubó a 37°C por 18 h¹. Posterior al tiempo de incubación se realizó la selección de las colonias resistentes a Amp, se sembraron en Agar LB con Amp (50 μ g/ml) y en

caldo LB con Amp (50µg/ml), se incubaron a 37°C por 18 h¹ y 37°C, 175 rpm por 18 h¹⁴ respectivamente.

Se realizó la extracción de plásmido de las colonias sembradas en caldo LB con Amp para verificar la presencia de plásmido. Posteriormente se realizó PCR para comprobar la presencia del casete de Kan. A la construcción obtenida se le denominó pTZKAN con un peso de 3707 pb (**Figura 20**).

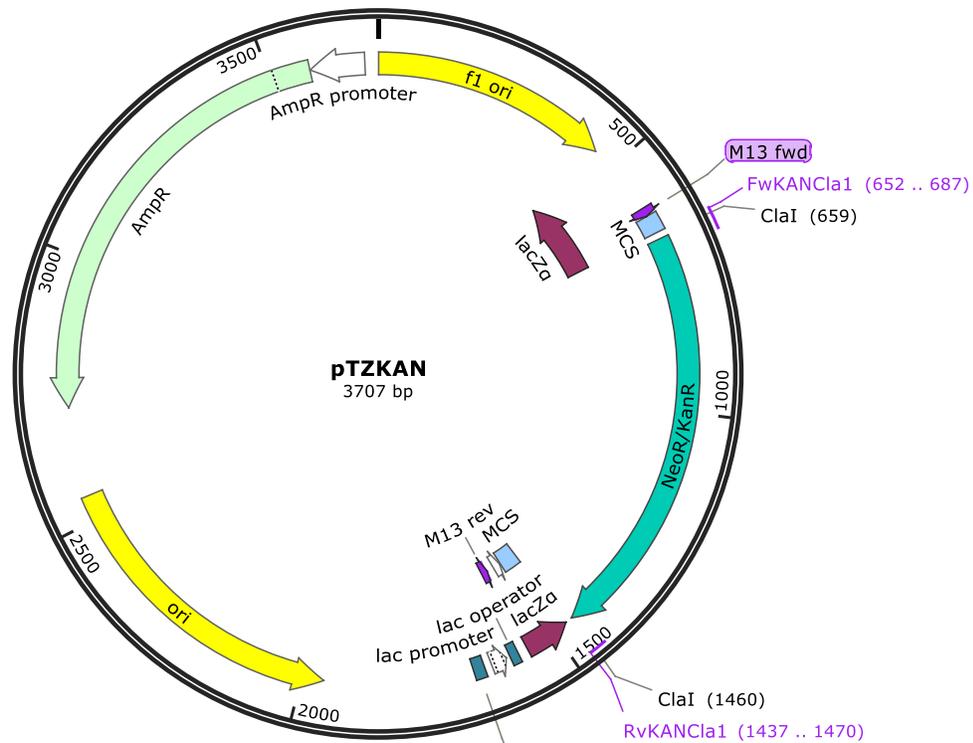


Figura 20. Mapa del plásmido pTZKAN. Se muestra la inserción del casete de Kan. Foto obtenida del programa *Snapgene*.

El plásmido y el amplificado fueron evaluados en geles de agarosa⁷ al 1.5% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

6.15. Inactivación del gen *wboA* con el casete de kanamicina

Se realizó una digestión con la enzima *Cla*⁵ en el pCQB y en el pTZKAN. La digestión en el pCQB libera un fragmento de 607 pb y el plásmido con el gen de interés de 4762 pb y en pTZKAN libera el casete de Kan de 801 pb y el plásmido de 2906 pb.

Posteriormente los fragmentos de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa 1% con el *kit* comercial Zymoclean Gel DNA Recovery¹⁶, usando la metodología que marca el fabricante. Los fragmentos purificados se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa⁴ como marca el fabricante de esta enzima. Esta reacción se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α por medio de electroporación, se utilizó la metodología descrita en el punto 1.9. Se plaquearon en agar LB con Kan (50 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 18 h¹. Se seleccionaron las colonias resistentes a Kan y se cultivaron en caldo LB con Amp (50 μ g/ml) a 37°C, 175 rpm por 18 h¹⁴. Posteriormente se realizó la extracción de plásmido y se realizó la PCR para el gen *wboA* y para el casete de Kan. También se realizó un ensayo de restricción *in silico* e *in vitro* del amplificado de la PCR para el gen *wboA* obtenido con la enzima *Cla*⁵. El plásmido, los amplificados y las digestiones fueron evaluados en geles de agarosa⁷ al 1.5% y 1% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

Se realizó una PCR *in silico* e *in vitro* con combinaciones de los iniciadores de la PCR *wboA* y con iniciadores de la PCR para el casete de Kan, para conocer la dirección del inserto. Los amplificados fueron evaluados en un gel de agarosa⁷

al 1.2% en amortiguador TAE teñido con bromuro de etidio⁸ y visualizado en un transiluminador⁹ de luz UV.

La construcción se denominó pCQBK con un peso de 5563 pb (**Figura 21**) y el gen interrumpido se denominó *wboA::kan*.

Para confirmar la dirección del inserto el plásmido se envió al Instituto de Biotecnología (IBT) para su secuenciación con los iniciadores para el gen *wboA*. Se editó y analizó la secuencia en el programa *Snapgene*, comparándola con el pCQBK.

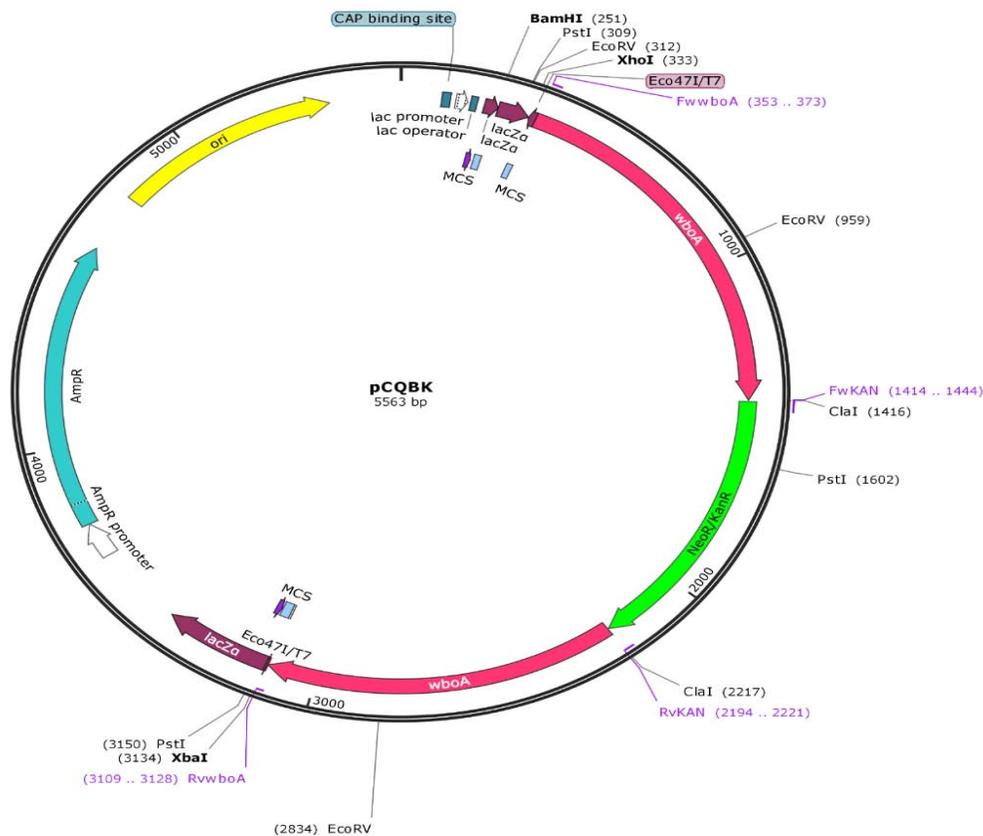


Figura 21. Mapa del plásmido pCQBK. Se muestra la inserción del casete de Kan en el gen *wboA*. Foto obtenida del programa *Snapgene*.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de ADN total de *Brucella melitensis* 133

Se realizó la extracción de ADN total de *Brucella melitensis* 133 para utilizarlo como ADN blanco en la PCR. Se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE (**Figura 22**).

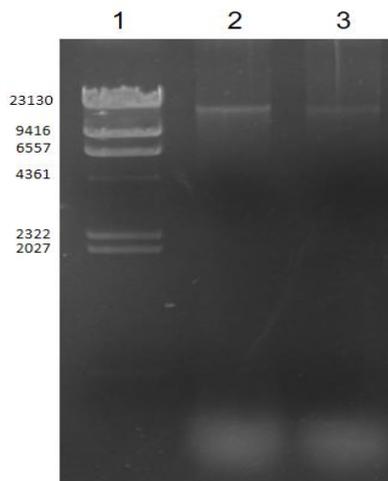


Figura 22. ADN total de *Brucella melitensis*. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de peso molecular MPM *Lambda DNA-HindIII Digest*. Carril 2 y 3: ADN de *B. melitensis*.

7.2. Alineamiento *in silico* del gen *wboA*

Al alinear la secuencia reportada del gen *wboA* con la secuencia completa del cromosoma I de *B. melitensis* 16M, se reconocen solamente 2674 pb con un 100% de identidad (**Figura 23**). Por lo que se tomaron como template estas 2674 pb para realizar el diseño de iniciadores.

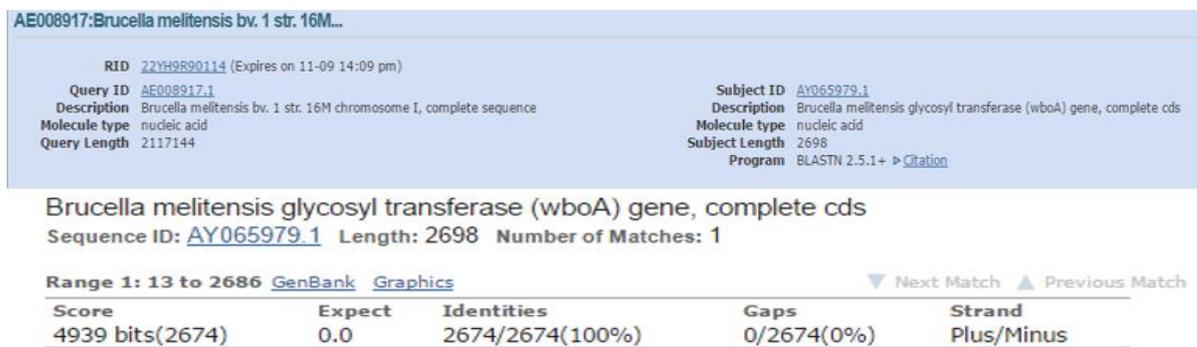


Figura 23. Alineamiento del gen *wboA* con el cromosoma I de *B. melitensis*. Resultados obtenidos en el programa BLAST del NCBI, al alinear el cromosoma I de *B. melitensis* biovariedad 1 cepa 16M con número de acceso: AE008917.1 y el gen *wboA* de *B. melitensis* con número de acceso: AY065979.1

7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen *wboA* de *Brucella melitensis*

Mediante la técnica de la PCR se amplificó el gen *wboA* de un peso de 2582 pb usando ADN de *Brucella melitensis* 133. Se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE (**Figura 24**).

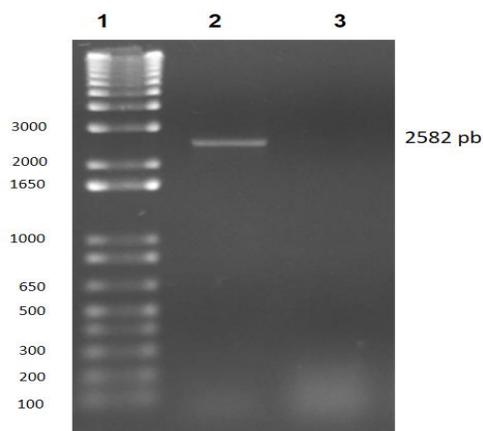


Figura 24. Producto de la amplificación de la PCR *wboA*. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*, Carril 2: Producto de la PCR para *wboA* con un peso esperado de 2582 pb y Carril 3: Control negativo de la PCR.

7.4. Ensayo de restricción del gen *wboA*

Se realizó un ensayo de restricción *in silico*, así como *in vitro* con las enzimas *Clal* y *EcoRV* por separado. El gen *wboA* cuenta con dos sitios de restricción para cada enzima. El ensayo *in silico* se realizó en el programa *Snapgene* y se obtuvo el patrón electroforético. La digestión con la enzima *Clal* produjo 3 fragmentos con los pesos 1064 pb, 911 pb y 607 pb (**Figura 25**), y con *EcoRV* 3 fragmentos de 1681 pb, 607 pb y 294 pb (**Figura 26**). Posteriormente se realizó el ensayo *in vitro* y se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE. (**Figura 25**) (**Figura 26**).

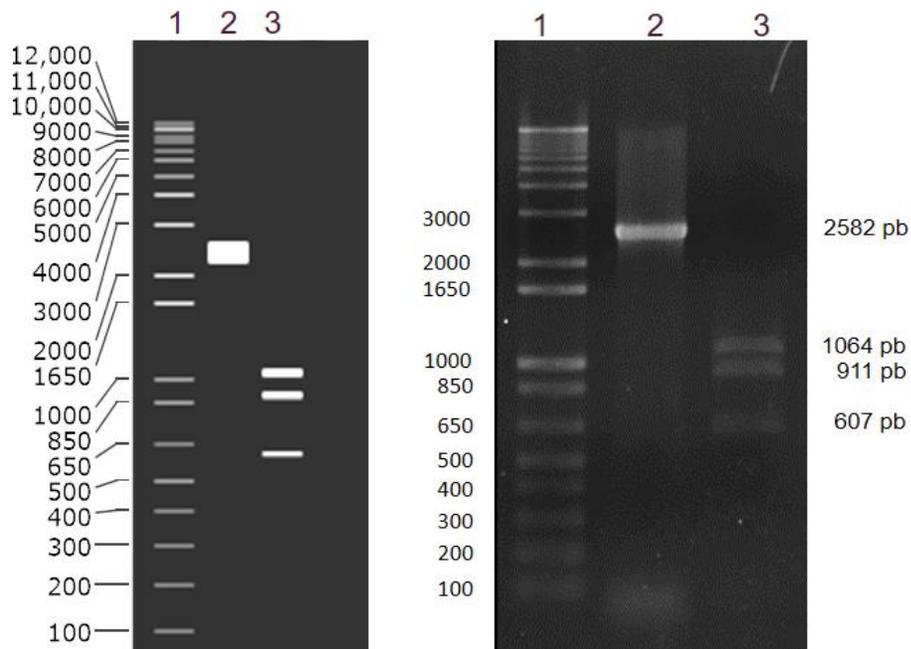


Figura 25. Ensayo *in silico* e *in vitro* de los perfiles de restricción del gen *wboA* digerido con *Clal*. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. En ambas figuras; Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*, Carril 2: Producto de la PCR para *wboA* con un peso esperado de 2582 pb, Carril 3: Amplificado de la PCR digerido con *Clal* (1064 pb, 911 pb y 607 pb).

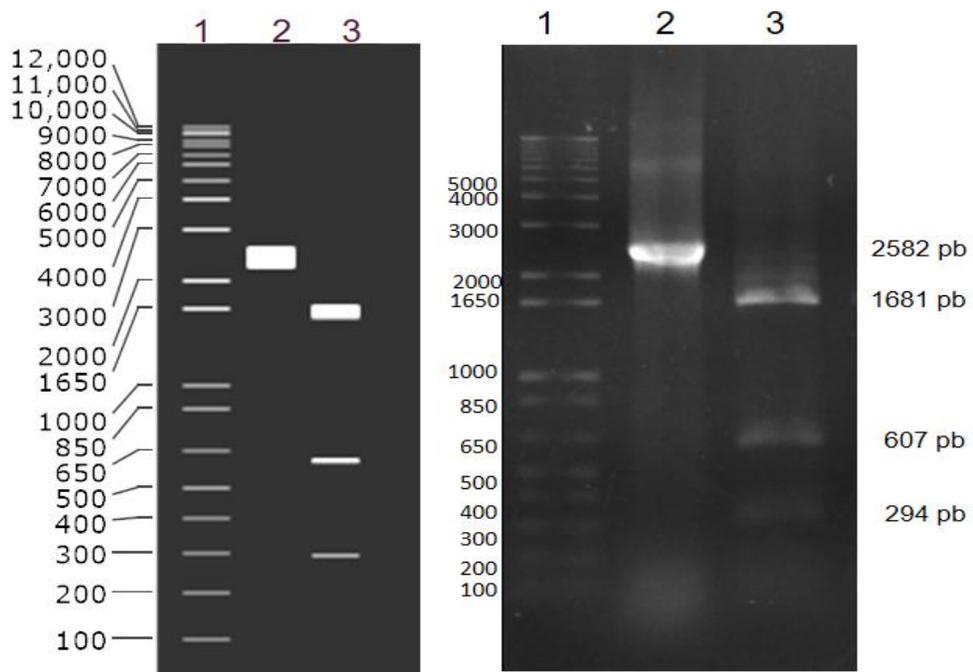


Figura 26. Ensayo *in silico* e *in vitro* de los perfiles de restricción del gen *wboA* digerido con *EcoRV*. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. En ambas figuras; Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*, Carril 2: Producto de la PCR para *wboA* con un peso esperado de 2582 pb, Carril 3: Amplificado de la PCR digerido con *EcoRV* (1681 pb, 607 pb y 294 pb)

7.5. Clonación del gen *wboA* en el vector pJET1.2/Blunt

El producto de la PCR para el gen *wboA* fue purificado y clonado en el vector pJET1.2/Blunt, generando la construcción pCJW. Se seleccionaron las colonias resistentes a Amp, posteriormente se realizó extracción de plásmido y se verificó la clonación mediante PCR para el gen *wboA* (**Figura 27**).

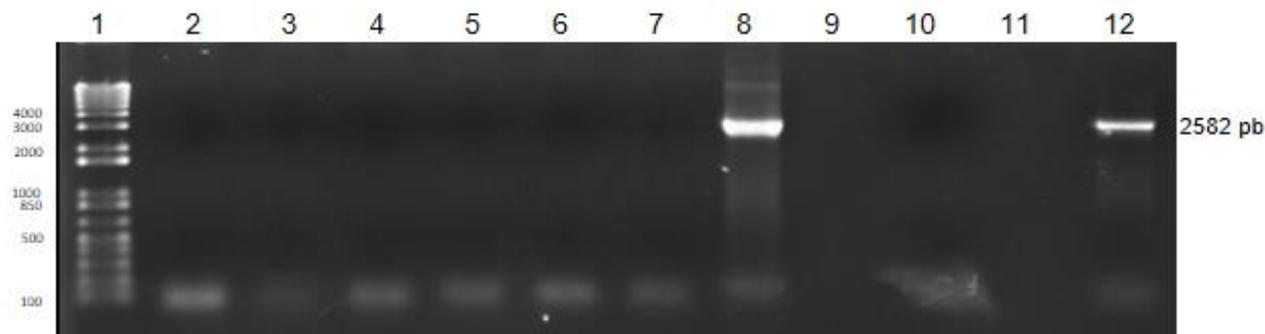


Figura 27. PCR *wboA* para las clonas pCJW. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-8: Producto de la PCR para *wboA* de las colonias. Carril 10: Control negativo. Carril 12: Control positivo con ADN de *B. melitensis*.

Se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro* al plásmido de la clona positiva a la PCR, con las enzimas *XbaI*, *XhoI*, *Clal* y una doble con *XbaI* y *XhoI*. La digestión con *XbaI* genera un fragmento de 5556 pb, *XhoI* genera un fragmento de 5556 pb, *Clal* genera tres fragmentos de 3836 pb, 1113 pb y 607 pb y la doble digestión con *XbaI* y *XhoI*, libera el gen con un peso de 2607 pb y el resto del plásmido de 2949 pb (**Figura 28**).

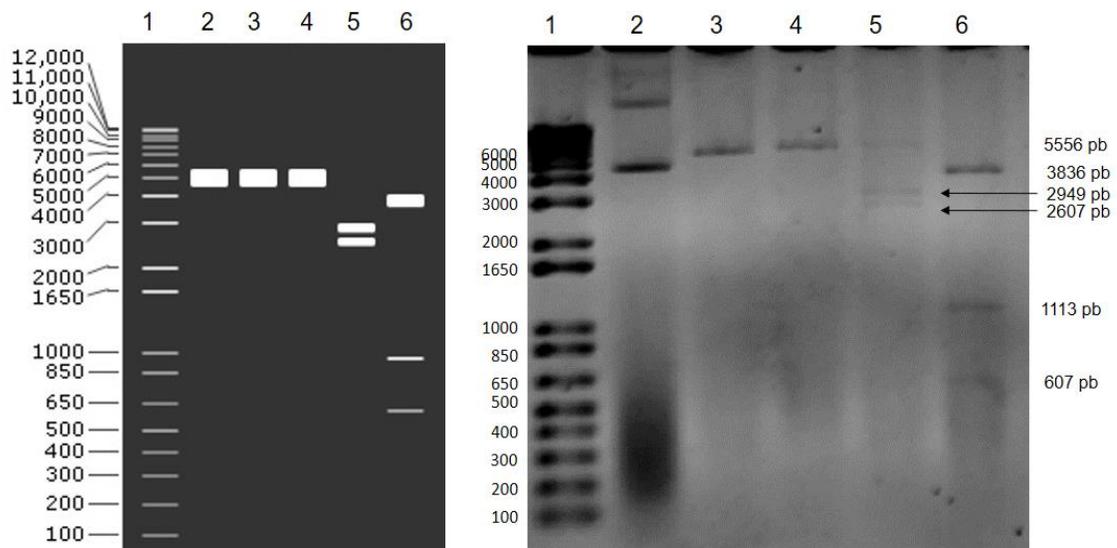


Figura 28. Ensayo de restricción de pCJW. (Izq.) Ensayo de restricción *in silico*. (Der) Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Ensayo *in vitro*. Para ambas figuras, Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCJW. Carril 3: pCJW digerido con *Xba*I (5556 pb). Carril 4: pCJW digerido con *Xho*I (5556 pb). Carril 5: pCJW digerido con *Xba*I y *Xho*I (2949 pb y 2607). Carril 6: pCJW digerido con *Cla*I (3836 pb, 1113 pb y 607 pb).

7.6. Subclonación del gen *wboA* en el pCR2.1

El plásmido pCJW fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xho*I, liberando el gen *wboA* con un peso de 2607 pb (**Figura 29**). El fragmento liberado fue purificado y subclonado en el pCR2.1 previamente digerido con las mismas enzimas con un peso de 3919 pb, obteniendo el plásmido pCTW con un peso de 6526 pb (**Figura 16**).

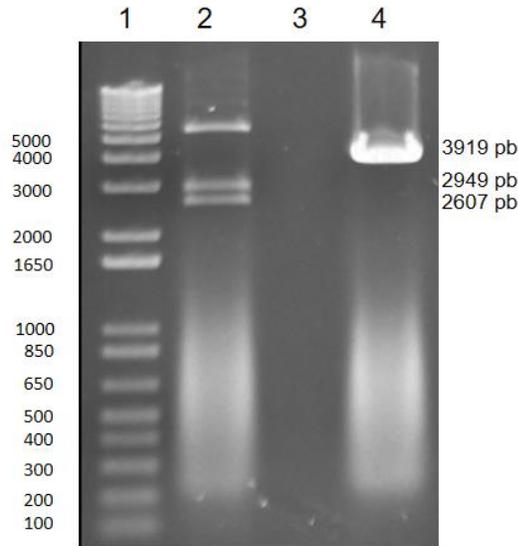


Figura 29. Digestión de pCJW y pCR2.1. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCJW digerido con *XbaI* y *XhoI* (2949 pb y 2607). Carril 4: pCR2.1 digerido con *XbaI* y *XhoI* (3919 pb y 12 pb).

Se seleccionaron las clonas resistentes a Amp y Kan, se les realizó la PCR para el gen *wboA* para corroborar el inserto (**Figura 30**).

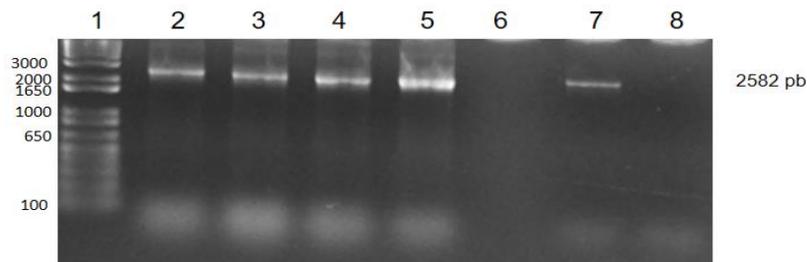


Figura 30. PCR para el gen *wboA* de pCTW. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-5: Producto de la PCR para el gen *wboA* del pCTW. Carril 7: Control positivo con ADN de *B. melitensis*. Carril 8: Control negativo.

Se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro* al plásmido positivo a la PCR, con las enzimas *XbaI* y *HindIII*, obteniendo un fragmento con un peso de 6526 pb, una doble digestión con *XbaI* y *HindIII* que libera el gen con un

peso de 2707 pb y el resto del plásmido de 3819 pb y con *EcoRV* que digiere en dos fragmentos de 4845 pb y 1681 pb (**Figura 31**).

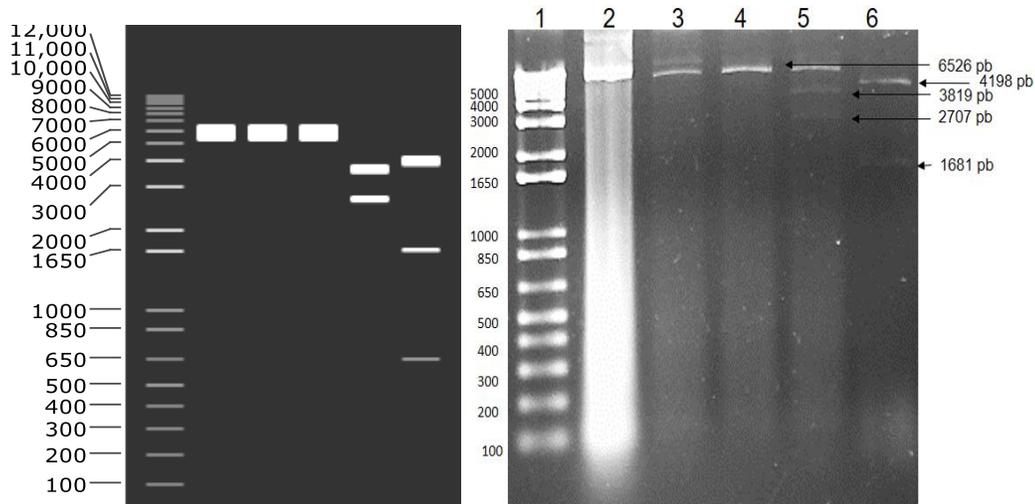


Figura 31. Ensayo de restricción del pCTW. (Izq.) Ensayo de restricción *in silico*. (Der) Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Ensayo de restricción *in vitro*. Para ambas, Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCTW. Carril 3: pCTW digerido con *XbaI* (6526 pb). Carril 4: pCTW digerido con *HindIII* (6526 pb). Carril 5: pCTW digerido con *XbaI* y *HindIII* (3819 pb y 2707 pb). Carril 6: pCTW digerido con *EcoRV* (4198 pb, 1681 pb y 647 pb no visibles).

7.7. Subclonación del gen *wboA* en pUC18.

El plásmido pCTW fue digerido con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*, liberando el gen *wboA* de un peso de 2689 pb, así mismo el plásmido pUC18 fue digerido con las mismas enzimas (**Figura 32**). El fragmento liberado fue purificado y subclonado en el pUC18 previamente digerido, obteniendo el plásmido pCQB, con un tamaño de 5369 pb (**Figura 17**).

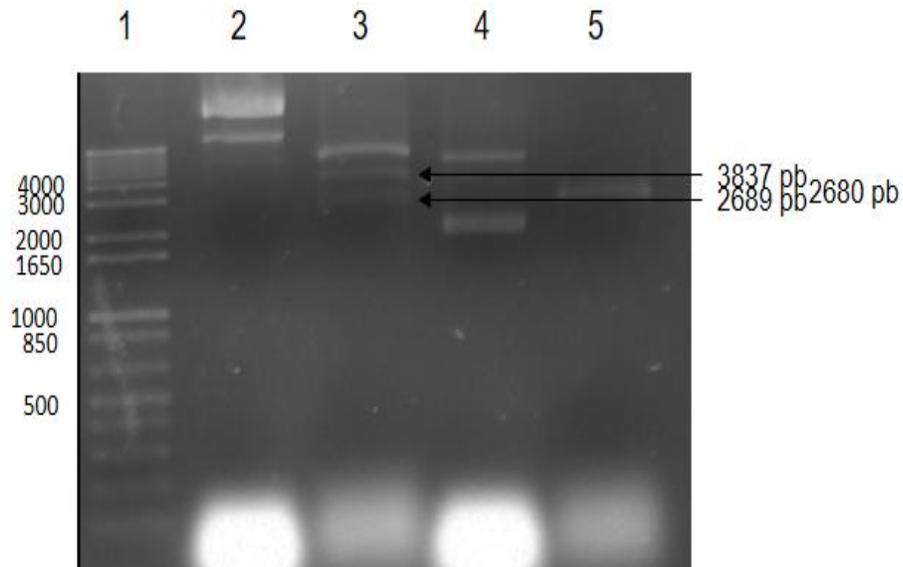


Figura 32. Ensayo de restricción de pCTW y pUC18. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCTW. Carril 3: pCTW digerido con *XbaI* y *BamHI* (3837 pb y 2689). Carril 4: pUC18. Carril 5: pUC18 digerido con *XbaI* y *BamHI* (2680 pb y 6 pb).

Se seleccionaron las colonias resistentes a Amp y sensibles a Kan. Y para comprobar el inserto se les realizó la PCR para el gen *wboA* (**Figura 33**).

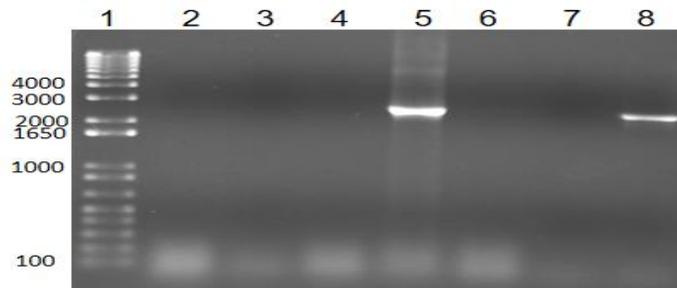


Figura 33. PCR *wboA* para las clonas pCQB. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-6: Producto de la PCR para *wboA* de las colonias seleccionadas. Carril 7: Control negativo. Carril 8: Control positivo con ADN de *B. melitensis*.

Se realizó un ensayo de restricción *in silico* y posteriormente *in vitro* al plásmido de la colonia positiva a la PCR del gen *wboA*, con diferentes enzimas. *ClaI* que digiere

el plásmido en dos fragmentos de 4762 pb y 607 pb, *Bam*HI que digiere en un solo sitio el plásmido dando un fragmento de 5369 pb y una doble digestión con *Bam*HI y *Xba*I con dos fragmentos de 2689 pb y 2680 pb (**Figura 34**).

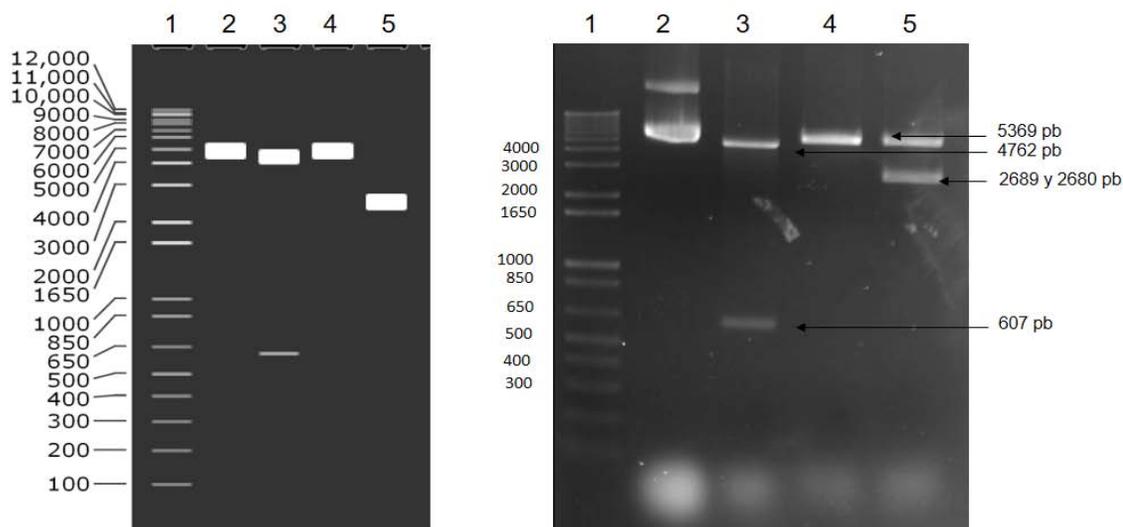


Figura 34. Ensayo de restricción de pCQB. (Izq.) Ensayo de restricción *in silico*. (Der) Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCQB. Carril 3: pCQB digerido con *Clal* (4762 pb y 607 pb). Carril 4: pCQB digerido con *Bam*HI (5369 pb). Carril 5: pCQB digerido con *Bam*HI y *Xba*I (2689 pb y 2680 pb).

7.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del casete de resistencia a la Kanamicina.

Se realizó la extracción de plásmido para posteriormente realizar la PCR (**Figura 35**). Mediante la técnica de PCR se amplificó un casete de resistencia a la Kan del pKD4, con un peso de 819 pb (**Figura 36**). Se realizó un ensayo de restricción con la enzima *Pst*I que digiere el amplificado en dos fragmentos de 625 pb y 194 pb (**Figura 36**).

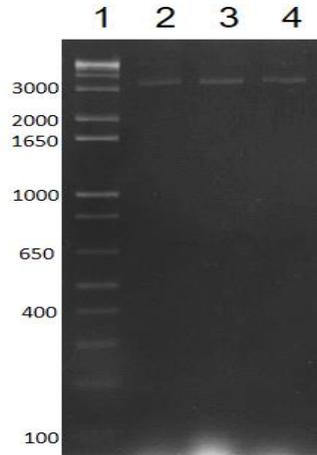


Figura 35. Extracción de plásmido pKD4. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2,3 y 4: producto de la extracción de plásmido pKD4.

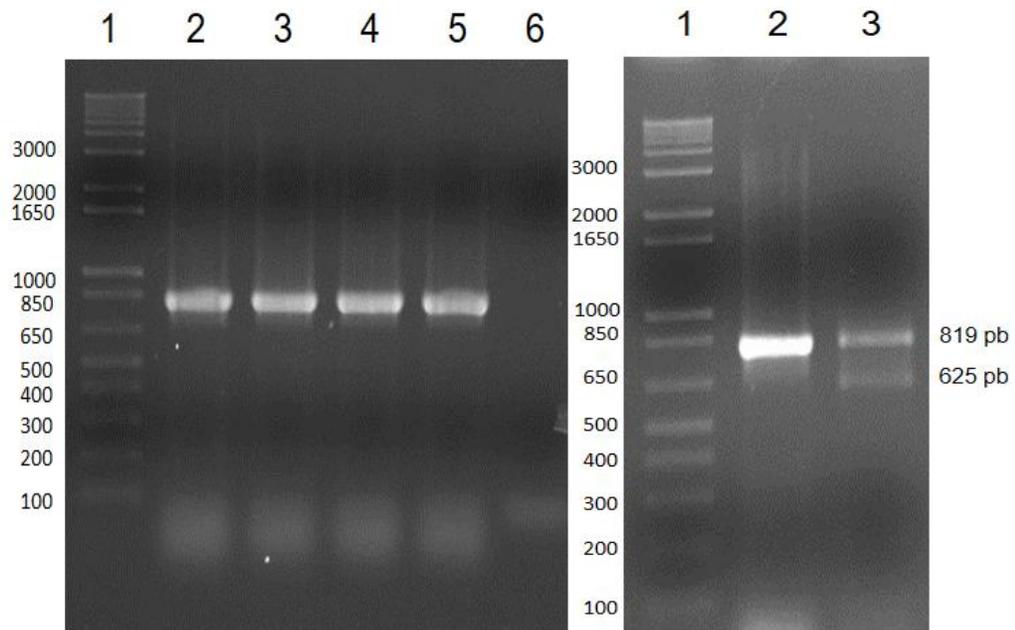


Figura 36. PCR para el casete de kanamicina del pKD4 y digestión del amplificado con *Pst*I. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. (Izq) PCR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-5: Producto de la PCR para el casete de Kan (819 pb). Carril 6: Control negativo. (Der.) Ensayo de restricción. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: Producto de la PCR para casete de Kan (819 pb). Carril 3: Producto de la PCR para casete de Kan digerido con *Pst*I (625 pb y 194 pb (no visible)).

7.9. Clonación del casete de kanamicina en el vector pTZ57R/T

El producto de la PCR para el casete de Kan fue clonado en el vector pTZ57R/T, obteniendo la construcción pTZKAN. Se seleccionaron las colonias resistentes a Amp y Kan. A las colonias seleccionadas se les realizó extracción de plásmido y PCR para el casete de Kan (**Figura 37**).

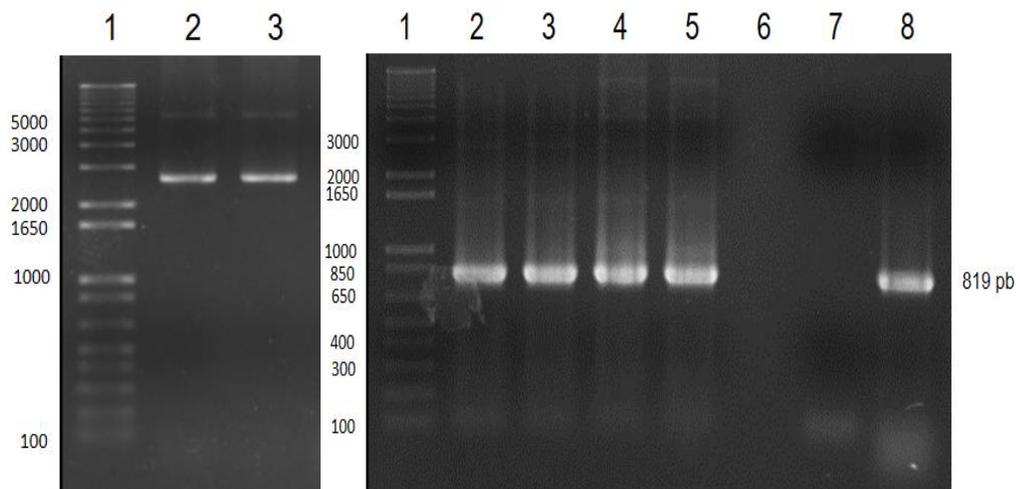


Figura 37. Plásmido pTZKAN y PCR Kan. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. (Izq.) Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2 y 3: pTZKAN. (Der) Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-5: Producto de la PCR para el casete de Kan del pTZKAN. Carril 7: Control negativo. Carril 8: Control positivo de pKD4.

7.10. Inactivación del gen *wboA*

Se realizó una digestión con la enzima *ClaI* a los plásmidos pCQB y pTZKAN. En el plásmido pCQB se libera un fragmento de 607 pb y el fragmento de interés de 4762 pb; en el pTZKAN se libera un fragmento de 2906 pb y el fragmento de interés de 801 pb (**Figura 38**). Se purificaron los fragmentos de interés y se ligaron para realizar la interrupción.

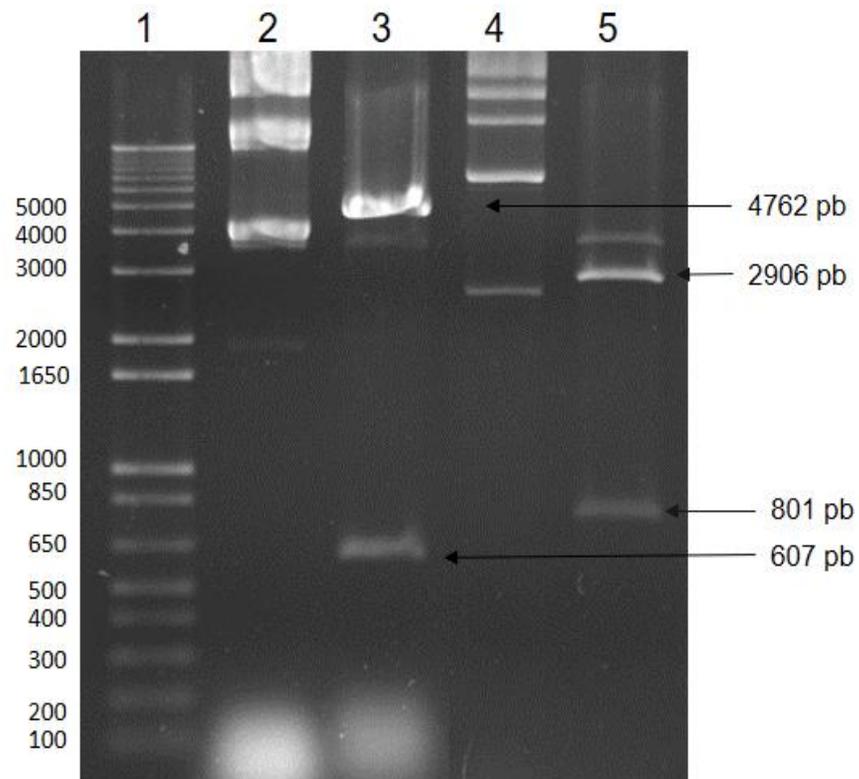


Figura 38. Digestión con *Clal* de pCQB y pTZKAN. Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: pCQB sin digerir. Carril 3: pCQB digerido con *Clal* (4762 pb y 607 pb). Carril 4: pTZKAN sin digerir. Carril 5: pTZKAN digerido con *Clal* (2906 pb y 801 pb).

Se seleccionaron las clonas resistentes a Amp y Kan. A las clonas seleccionadas se les realizó extracción de plásmido (**Figura 39**) y PCR para el gen *wboA* y para el casete de Kan (**Figura 40**).

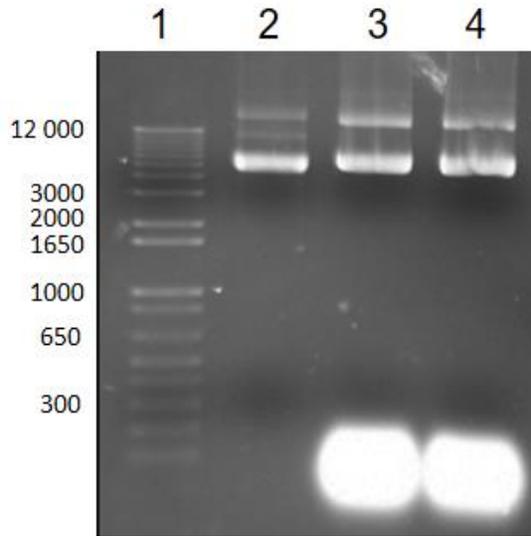


Figura 39. Extracción plásmido pCQBK. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-4: Extracción de plásmido pCQBK.

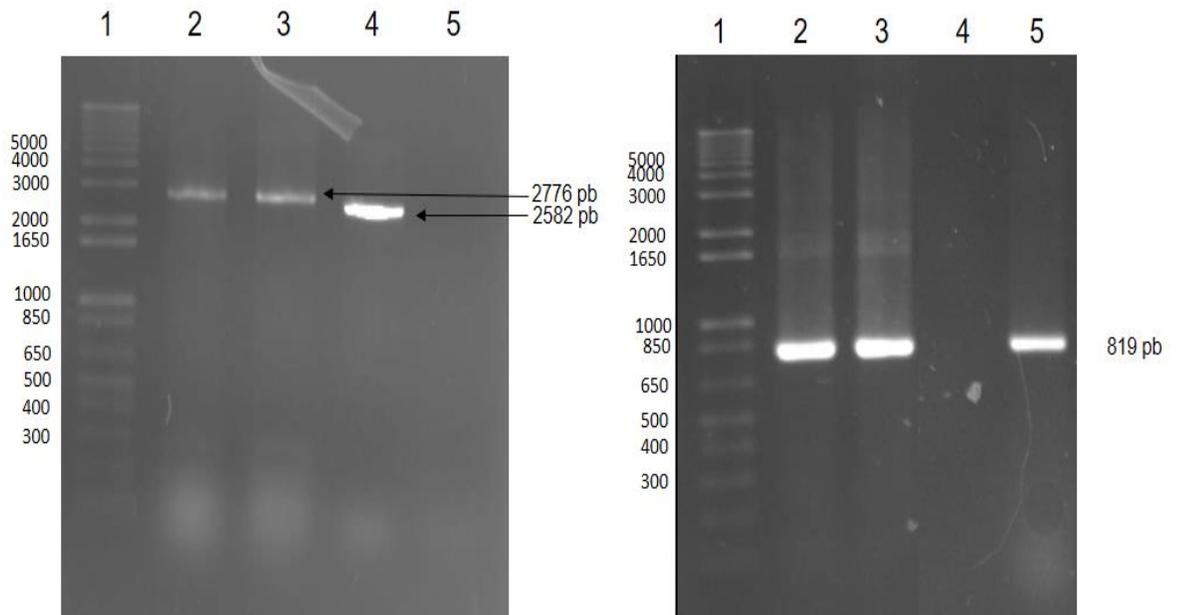


Figura 40. PCR *wboA* y Kan de pCQBK. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% en TAE, teñido con bromuro de etidio. (Izq.) Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-3: Productos de la PCR *wboA* del pCQBK (2776 pb). Carril 4: Control positivo con ADN de *B. melitensis* (2582 pb). Carril 5: Control negativo. (Der) Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2-3: Productos de la PCR para el casete de Kan (819 pb). Carril 4: Control negativo. Carril 5: Control positivo de pKD4 (819 pb).

Posteriormente se realizó un ensayo de restricción *in silico* e *in vitro* con la enzima *Clal* del amplificado de la PCR para el gen *wboA*. Al digerir el amplificado del plásmido pCQBK con un peso de 2776 pb, se obtienen tres fragmentos con los pesos de 1064 pb, 911 pb y 801 pb, este último corresponde al casete de Kan; comparándolo con el amplificado del ADN de *B. melitensis* que tiene un peso de 2582 pb, se obtienen tres fragmentos con los pesos de 1064 pb, 911 pb y 607 pb (Figura 41).

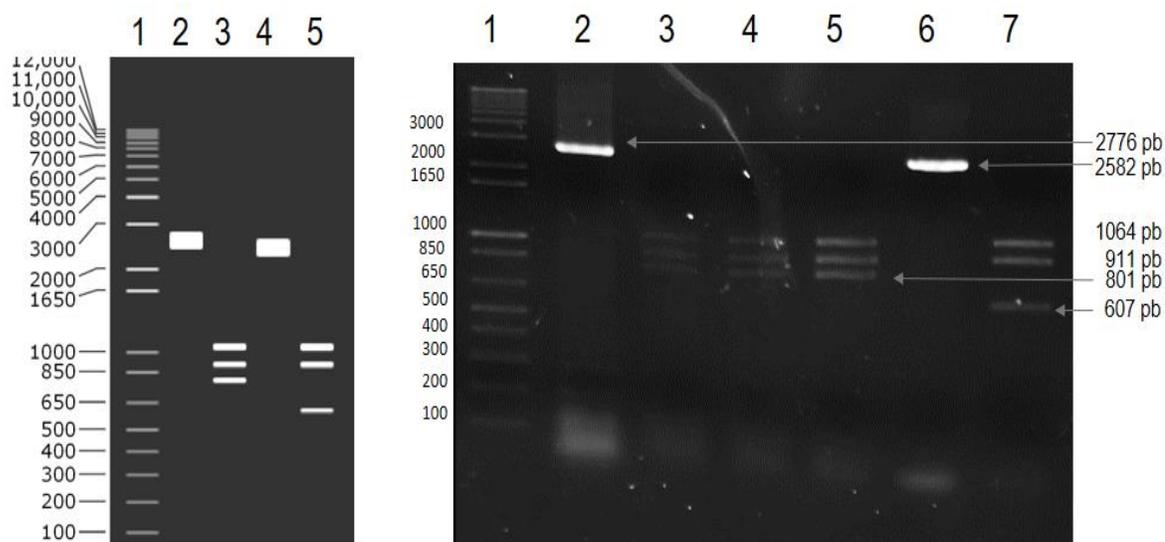


Figura 41. Ensayo de restricción del amplificado de la PCR *wboA* de pCQBK. (Izq) Ensayo de restricción *in silico*. (Der) Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: Producto de la PCR *wboA* del pCQBK (2776 pb). Carril 3-5: Amplificado digerido con *Clal* (1064 pb, 911 pb y 801 pb). Carril 6: Control positivo de la PCR con ADN de *B. melitensis* (2582 pb). Carril 7: Control positivo digerido con *Clal* (1064 pb, 911 pb y 607 pb).

Para conocer la dirección del inserto se realizaron combinaciones con los iniciadores para la PCR del gen *wboA* y para el casete de Kan. La primera combinación fue el iniciador Fw *wboA* y el Rv KAN, dando un amplificado de 1875 pb; la segunda combinación fue el iniciador Fw *wboA* y el Fw KAN, dando un

amplificado de 1092 pb (**Figura 42**) Este tamaño de amplificado nos indica que el inserto del casete de Kan se encuentra en la misma dirección que el gen *wboA*; si el casete se encontrara en dirección opuesta, el amplificado de la primera combinación de iniciadores (Fw *wboA* y Rv KAN) tendría un peso de 1092 pb y la segunda combinación (Fw *wboA* y Rv KAN) un peso de 1875 pb.

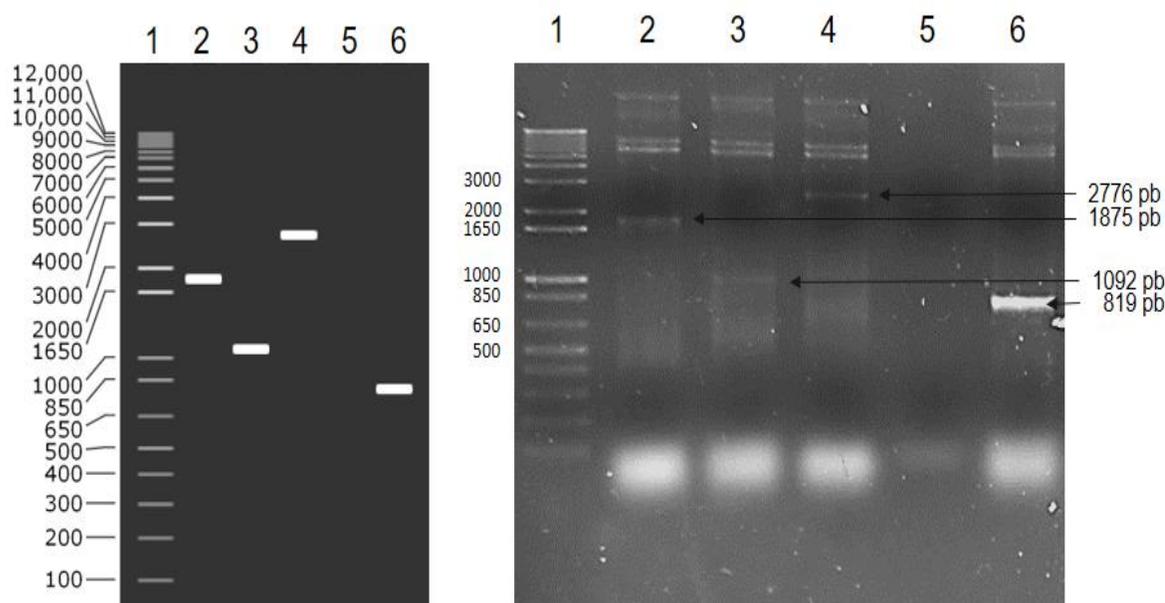


Figura 42. PCR con combinación de iniciadores del pCQBK. (Izq.) Ensayo de restricción *in silico*. (Der) Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% en TAE, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*. Carril 2: Producto de la PCR usando la combinación Fw*wboA* y RvKAN (1875 pb). Carril 3: Producto de la PCR usando la combinación Fw*wboA* y FwKAN (1092 pb). Carril 4: Producto de la PCR *wboA* del pCQBK (2776 pb). Carril 5: Control Negativo. Carril 6: Control positivo de la PCR KAN del pCQBK (819 pb).

El plásmido fue secuenciado en el IBT, los resultados fueron editados y alineados en el programa *Snappene*, se comparó con la secuencia de la construcción pCQBK *in silico* y se comprobó que el casete de Kan se encontraba en fase con el gen *wboA*. (**Figura 43**).

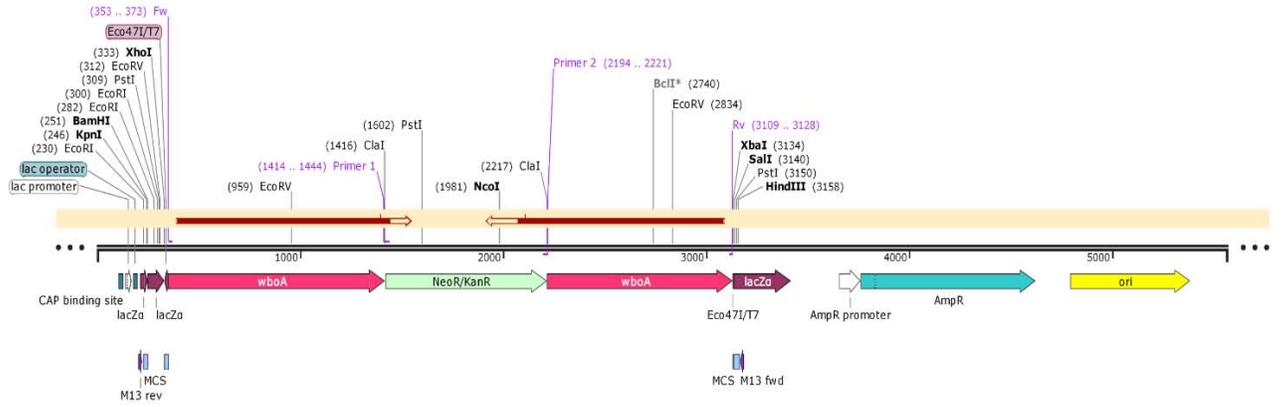


Figura 43. Alineación de los fragmentos secuenciados El amplificado secuenciado se encuentra en rojo, alineado con el pCQBK. Se demostró una identidad en el gen *wboA* y en el casete de Kan. Imagen obtenida de *Snappgene*.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la clonación e inactivación del gen *wboA* de *Brucella melitensis* 133 en el plásmido pUC18, con la finalidad de realizar en trabajos futuros la transformación en *B. melitensis* con el plásmido, reemplazando el gen silvestre *wboA* con el gen *wboA::kan* y así, evitar que la enzima glicosiltransferasa se traduzca y se realicen los enlaces entre las perosaminas del antígeno O; por lo tanto no se polimerice el antígeno O y genere un fenotipo rugoso (McQuiston *et al.*, 1999, Haag *et al.*, 2010).

Se ha reportado la evaluación de diferentes mutantes en el gen *wboA* de *B. melitensis* y han observado que mutaciones en el mismo gen en diferentes cepas de la misma especie, muestran diferentes grados de atenuación y diferencias en la respuesta inmune que generan, debido a las diferencias genéticas de estas (Wang *et al.*, 2013). Además, se han observado diferencias al evaluar diferentes dosis de vacunación, dosis de inoculación de desafío, tiempo post vacunación al desafío e incluso la vía de inoculación (Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012)

Como ya se mencionó la vacunación con la cepa Rev1 presenta desventajas, principalmente la respuesta humoral que genera, ya que provoca interferencia con el diagnóstico serológico debido al fenotipo S-LPS que presenta; por lo que el desarrollo de vacunas DIVA (*Differentiating infected from vaccinated animals*) ha sido utilizada para evitar este problema (Goodwin *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

De acuerdo a Ficht y col. las vacunas más prometedoras son las vacunas vivas atenuadas. Las vacunas usadas en la actualidad son derivadas de atenuaciones y mutaciones espontaneas. En contraste, en la actualidad el desarrollo de nuevas vacunas se basa en la inactivación o delección de un gen involucrado en la sobrevivencia y/o virulencia del microorganismo, además el desarrollo de vacunas esta relacionada con la investigación de la función de los genes (Ficht *et al.*, 2009).

Por lo tanto, se busca desarrollar nuevos inmunógenos que sean avirulentos en animales y humanos, que induzcan una inmunidad protectora y que sea posible diferenciar animales vacunados de infectados; por lo que, las cepas R-LPS son un candidato vacunal adecuado (Yang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

Tradicionalmente las vacunas se obtenían de una serie de pases del agente en el hospedero o en un cultivo *in vitro*, o con la inactivación química o física. La atenuación del agente se debía a mutaciones genéticas aleatorias y no identificadas, que resulta en un riesgo de reversión o de enfermedad (Dertzbaugh 1998). Las nuevas técnicas de biología molecular han contribuido al desarrollo de nuevas vacunas DIVA. El ADN bacteriano puede ser manipulado para eliminar o inactivar un gen específico que codifique a alguna proteína involucrada en la patogénesis, así disminuyendo su patogenicidad, pero manteniendo la inmunogenicidad (Chalmers 2006; Dertzbaugh 1998; Xu *et al.*, 2016).

En la actualidad se realizan mutaciones en genes específicos, además se incluyen marcadores como genes de resistencia a antibióticos, para la selección de las mutantes. Si el antibiótico fue usado en el crecimiento de la bacteria, podría estar en cantidades suficientes en la vacuna, causando una respuesta anafiláctica en el

animal vacunado, como los betalactámicos (Dertzbaugh 1998). Por esta razón se decidió interrumpir el gen *wboA* con un casete de resistencia a Kan; un aminoglucósido que no es comúnmente usado en el tratamiento de infecciones, por lo tanto, el riesgo de inducir anafilaxis es reducido (Dertzbaugh 1998).

En el presente trabajo se utilizaron diferentes técnicas de mutagénesis dirigida o SDM (*Site-directed mutagenesis*), que se basa en mutaciones en sitios definidos de ADN vía PCR o por RER (*Restriction endonuclease reaction*) (Xu *et al.*, 2012).

Para la clonación inicial del gen *wboA* se utilizó el método de clonación de extremos romos, que se basa en la ligazón del plásmido linear (pJET1.2/Blunt) y de un producto de PCR con extremos romos, obteniendo el pCJW (Xu *et al.*, 2012; Herráez 2001). La clonación del casete de Kan se llevó a cabo por el método de clonación por TA, obteniendo el pTZKAN, que se basa en la actividad de la polimerasa Taq de agregar adenosinas en la PCR y de vectores lineales con extremos de cadena sencilla de 3'- timina (pTZ57R/T) (Zhou *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2012). Posteriormente las subclonaciones del gen *wboA* en los diferentes plásmidos (pCR2.1TOPO y pUC18) y la interrupción con el casete de Kan, se llevó a cabo por el método de RER, obteniendo el pCTW, pCQB y pCQBK (Xu *et al.*, 2012; Herráez 2001).

Se decidió usar el pUC18 como futuro vector de recombinación, debido a trabajos previamente reportados donde realizan la recombinación con este vector. En el 2014, Verdiguél, realizó la clonación e inactivación del gen *omp31* de *B. melitensis* 133 en pUC18 (pLVM84), posteriormente la cepa *B. melitensis* 133 fue transformada por medio de electroporación con el pLVM84 y se obtuvo la mutante con el gen

inactivado por medio de recombinación homóloga (Verdiguel 2014). Otro grupo de trabajo realizó la recombinación homóloga del gen *pepXP* interrumpido, usando el pUC18 en *Lactococcus lactis* (Leenhouts *et al.*, 1991). Las células transformadas con pUC18 principalmente son cepas de *E. coli* con un genotipo que permita la replicación de estos plásmidos; en este trabajo se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α , que presenta un genotipo *recA*⁻ y *endA1*⁻, entre otras mutaciones (Glover *et al.*, 1995). La mutación en *recA* reduce la posibilidad de recombinación homóloga, ya que este gen codifica para una recombinasa que promueve el intercambio entre dos cadenas homólogas de ADN (Cox 2007). Si se transforman células donde el plásmido no sea estable, el ADN plasmídico tiende a recombinarse con el cromosoma, si se presenta homología (Herráez 2001; Leenhouts *et al.*, 1991). La principal desventaja con esta metodología es la falta de inducción del suicidio del plásmido y de recombinación de la secuencia homóloga. En la actualidad se han desarrollado dos tipos de plásmidos suicidas: plásmidos sensibles a la temperatura como pSC101, que contiene una mutación en *repA*, esta mutación solo le permite al plásmido replicarse a diferentes temperaturas (Cornet *et al.*, 1994; Philippe *et al.*, 2004) o como pKO3 (Philippe *et al.*, 2004) y plásmidos como pCVD442 o pDS132, que contienen el origen de replicación R6K, que solo pueden replicarse en cepas bacterianas que sinteticen la proteína π , producto del gen *pir* (Philippe *et al.*, 2004).

El grupo de Montes evaluó la transformación de *Cellulomonas flavigena* por los métodos de electroporación y conjugación; demostraron que la eficiencia de transformación y recombinación fue mayor en las células transformadas por

conjugación, en comparación con las células transformadas por electroporación (Montes *et al.*, 2004).

El método de transformación por electroporación debe ser optimizado para cada especie bacteriana, debido a las diferencias en la estructura de la pared y membrana bacteriana. La electroporación resulta en diferentes eficiencias de transformación; se ha observado que con un aumento en la concentración de ADN la eficiencia incrementa, excepto en *Chromobacterium violaceum* donde disminuye; la fase de crecimiento en la que se cosechan las bacterias influye en el nivel de competencia, para *E. coli* la fase tardía exponencial es la óptima, contrario con los resultados con *Lactococcus lactis*, donde la fase óptima es la estacionaria; la temperatura a la que se lleva a cabo el procedimiento es de 0-4 °C, pero estudios con *Clostridium perfringens* demostraron que a temperatura ambiente se incrementa la eficiencia, otros estudios demostraron que en micobacterias de lento crecimiento la temperatura óptima es de 37 °C (Aune *et al.*, 2010)

En el presente trabajo se realizó el método de electroporación en células *E. coli* obteniendo resultados favorables, ya que, para esta cepa bacteriana se conocen todos los parámetros para obtener una transformación exitosa. También se realizó en *B. melitensis*, usando las condiciones reportadas por Verdigué, Nickoloff y Walker, sin tener resultados favorables de transformación (Verdigué 2014; Walker 2010; Nickoloff 1995).

En *Brucella* spp no se han realizado estudios donde se modifiquen los factores para poder definir las condiciones de electroporación óptimas. Es por eso que diferentes grupos de trabajo han realizado la recombinación en *Brucella* spp con conjugación.

Mutantes de *Brucella abortus* $\Delta virJ$, mutantes rugosas de *B. melitensis* en los genes *wa***, *wzm*, *wbkF* y *per*; *B. melitensis* 40 (mutante en el gen BMEI0216) se obtuvieron por conjugación (Giudice *et al.*, 2016; Gonzales *et al.*, 2008; Hernandez-Castro *et al.*, 2008).

Con plásmidos suicidas se obtiene una eficiencia de recombinación mayor que con la recombinación homóloga no inducida del pUC18. Por lo que se busca en un futuro la clonación del gen *wboA* inactivado en el plásmido pDS132 y con este llevar a cabo la transformación bacteriana mediante conjugación, usando la cepa de *E. coli* Δpir , como donadora, la cepa receptora de *Brucella melitensis* al carecer del gen *pir*, no podrá llevar a cabo la replicación del plásmido (Philippe *et al.*, 2004); por lo tanto, se llevará exitosamente la recombinación homóloga del gen *wboA::kan*.

Además del uso como potencial inmunógeno, se requiere de una cepa rugosa como control en la línea de investigación PAPIIT “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”, para elucidar el papel que tiene la cadena O en el tránsito intracelular en esta especie bacteriana. Ya que se conoce el papel que juega en la entrada por balsas lipídicas y en la modulación de la respuesta inmune, pero no se han realizado trabajos con una cepa mutante rugosa en la evaluación de proteínas de la célula huésped.

Se conoce que *Brucella* y otros patógenos intracelulares, modulan el tráfico intracelular proteico, para evadir la fusión y degradación por el lisosoma; para llegar al nicho de replicación. Proteínas de la familia Rab, de la familia Sar y de la familia SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)

pueden ser afectadas por microorganismos intracelulares (Castañeda-Ramirez *et al.*, 2012; Castañeda-Ramirez *et al.*, 2015; Di *et al.*, 2016)

En el grupo de trabajo se ha trabajado con el bloqueo de la expresión de diferentes proteínas de la familia SNARE. Se ha reportado que el bloqueo de la expresión de Sintaxina 4 (STX4) interfiere en las etapas tempranas de la fagocitosis. Se reportó que la expresión de STX4 no se ve modificada durante las etapas tempranas de la fagocitosis, pero al silenciar la expresión de STX4, disminuye el porcentaje de fagocitosis de *B. melitensis* (Castañeda-Ramirez *et al.*, 2015).

También se trabajó con otra proteína de la familia SNARE, VAMP3 (*Vesicle-associated membrane protein 3*), proteína involucrada en la exocitosis del TNF. Se determinó que al estimular macrófagos con *B. melitensis* y LPS de *B. melitensis*, existe un aumento en la expresión de VAMP3. Al bloquear la expresión de esta, no se observaron cambios en la fagocitosis (Castañeda-Ramirez *et al.*, 2012).

9. CONCLUSIONES

- I. Se estandarizó la técnica de la PCR para el gen *wboA* de *B. melitensis*.
- II. Se clonó el gen *wboA* en un vector comercial.
- III. Se subclonó el gen *wboA* en el plásmido recombinante pUC18.
- IV. Se eliminaron 194 pb del gen *wboA* y se interrumpió el gen con un casete de resistencia a kanamicina
- V. Se secuenció la construcción y se determinó que el casete se encuentra en fase al gen *wboA*.

10. PROSPECTIVAS

- I. Transformar por electroporación con el pCQBK la cepa *B. melitensis* 133, para la recombinación del gen *wboA::kan*
- II. Probar diferentes condiciones de electroporación y determinar las condiciones óptimas para la electroporación en *B. melitensis*.
- III. Clonación del gen interrumpido en el plásmido pDS132
- IV. Realizar la conjugación con la cepa *E. coli* λ pir y la construcción en el pDS132
- V. Determinar si la inactivación del gen *wboA*, generará una cepa rugosa.
- VI. Evaluar la mutante rugosa, como posible inmunógeno

11. REFERENCIAS

1. [NOM-017] *Norma Oficial Mexicana* [19 feb 2013]. NOM-017-SSA2-2012. Para la vigilancia epidemiológica. México: DOF- Secretaría de Salud.
2. [NOM-022] *Norma Oficial Mexicana* [30 nov 1995]. NOM-022-SSA2-1994- Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre. México: DOF-Secretaría de Salud.
3. [NOM-041] *Norma Oficial Mexicana* [20 ago 1996]. NOM-041-ZOO-1995. Campaña contra la Brucelosis en los Animales. México: DOF-SAGARPA
4. [SENASICA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2016. *Situación actual de la brucelosis en México*. México. <http://senasica.gob.mx/?id=4414> [consulta: 01 jun 2016]
5. [SSA] Secretaria de Salud. 2016. *Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información*. México. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE01.pdf> [consulta:06 jun 2016]
6. Ahmed W, Zheng K, Liu Z-F. 2016. Establishment of Chronic Infection: Brucella's Stealth Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6:1–12. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00030.
7. Aparicio, ED, 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. *Revue scientifique et technique*, 32:43–51.
8. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini E, Ugalde R, Moreno E, Moriyo I, Gorvel J. 2005. Cyclic b -1, 2-glucan is a *Brucella* virulence

- factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*. 6:618–625. DOI: 10.1038/ni1202.
9. Aune T, Aachmann F. 2010. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1301–1313. DOI: 10.1007/s00253-009-2349-1.
 10. Bricker BJ. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*. 90:435–446. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00228-6.
 11. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. 2010. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nature Microbiology* 8:8-14. DOI:10.1038/nrmicro2266
 12. Byndloss M, Tsolis R. 2015. *Brucella* spp. Virulence factors and immunity. *Annual review of animal biosciences* 2016:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.
 13. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 5. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13.
 14. Case E, Samuel J. 2016. Contrasting lifestyles within the host cell. *Microbiology spectrum* 4:1–31. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0014-2015.
 15. Castañeda-Ramírez A, González-Rodríguez D, Hernández-Pineda J, Verdugo-Rodríguez A. 2015. Blocking the expression of syntaxin 4 interferes with initial phagocytosis of *Brucella melitensis* in macrophage. *The canadian journal of veterinary research* 52:39–45.

16. Castañeda-Ramírez A, Puente J, González-Noriega A, Verdugo-Rodríguez A. 2012. Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages. *Virulence* 3:434–9. DOI: 10.4161/viru.21251.
17. CFSPH. 2010. “Brucellosis” [En línea]. USA, disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis.pdf> [Consulta: 06 jun 2016]
18. Chalmers WK. 2006. Overview of new vaccines and technologies. *Veterinary Microbiology* 117:25–31. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.04.006.
19. Corbel MJ. 2006. Brucellosis in humans and animals. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>.
20. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM. 1994. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *Journal of Bacteriology*. 176:3188–3195.
21. Cox M. 2007. Regulation of bacterial RecA protein function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42:41–63. DOI: 10.1080/10409230701260258.
22. de Jong M, Tsolis R. 2012. Brucellosis and type IV secretion. *Future microbiology* 7:47–58. DOI: 10.2217/fmb.11.136.
23. Dertzbaugh MT. 1998. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid* 39:100–113. DOI: 10.1006/plas.1997.1329.
24. Di E, Case R, Smith JA, Ficht TA, Samuel JE, Figueiredo P De. 2016. Space: A Final Frontier for Vacuolar Pathogens. *Traffic*. DOI: 10.1111/tra.12382.

25. Dorneles E, Sriranganathan N, Lage A. 2015. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary research* 46:76-86. DOI: 10.1186/s13567-015-0199-7.
26. Ducrotoy M, Conde-Álvarez R, Blasco J, Moriyón I. 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171:81–102. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
27. Dueñas A, Orduña A, Sanchez Crespo M, Garcia-Rodriguez C. 2004. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp LPS. *The Japanese society for immunology* 16:1467–1475. DOI: 10.1093/intimm/dxh148.
28. Erridge C., Bennett-guerrero E., Poxton IR. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* 4:837–851.
29. European Commission. 2001. Brucellosis in Sheep and Goats. *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*. 20.
30. Fernández-Prada C, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig G, Hadfield T, Hoover D. 2001. Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infection and immunity* 69:4407–16. DOI: 10.1128/IAI.69.7.4407-4416.2001.
31. Ficht T, Kahl-McDonagh M, Arenas-Gamboa A, Rice-Ficht A. 2009. Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines. *Vaccine* 27:40–43. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.08.058.
32. Figueiredo P De, Ficht TA., Rice-ficht A, Rossetti C, Adams L. 2015. Pathogenesis and immunobiology of Brucellosis review of *Brucella*- host

- interactions. *The American Journal of Pathology* 185:1505–1517. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
33. Fretin D, Fauconnier A, Köhler S, Halling S, Léonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Vandenhautte J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ. 2005. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cellular Microbiology* 7:687–698. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x.
34. Giudice M, Döhmer P, Spera J, Laporte F, Marchesini M, Czibener C, Ugalde J. 2016. VirJ Is a Brucella Virulence Factor Involved in the Secretion of Type IV Secreted Substrates. *Journal of Biological Chemistry* 291:12383–12393. DOI: 10.1074/jbc.M116.730994.
35. Glover D, Hames B. DNA Cloning 1. A practical approach. 2nd. ed. Nueva York (EUA): Oxford University Press; 1995.
36. González D, Grilló M-J, De Miguel M-J, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue R-M, Conde-Álvarez R, Muñoz P, López-Goñi I, Iriarte M, Marín C-M, Weintraub A, Widmalm G, Zygmunt M, Letesson J-J, Gorvel J-P, Blasco J-M, Moriyón I. 2008. Brucellosis Vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. *PLoS ONE* 3:e2760. DOI: 0.1371/journal.pone.0002760.
37. Goodwin Z, Pascual D. 2016. Brucellosis vaccines for livestock. *Veterinary immunology and immunopathology*. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.03.011.
38. Goolab S, Roth R, van Heerden H, Crampton M. 2015. Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in *Brucella*. *Frontiers in Microbiology* 6:1–20. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01189.

39. Gorvel J. 2008. *Brucella*: a Mr 'Hide' converted into Dr Jekyll. *Microbes and Infection* 10:1010–1013. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.07.007.
40. Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* 90:281–297. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00214-6.
41. Gorvel JP. 2014. “If you bring an alarm, we will destroy it,” said *Brucella* to the host cell. *Virulence* 5:460–2. DOI: 10.4161/viru.29092.
42. Haag AF, Myka KK, Arnold MFF, Caro-Hernández P, Ferguson GP. 2010. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in *Brucella*-Mammalian Infections. *International journal of microbiology* 2010:124509. DOI: 10.1155/2010/124509.
43. Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Luis Puente J, Suárez-Güemes F. 2008. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microbial Pathogenesis* 44:28–33. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.08.008.
44. Herráez A. Biología molecular e ingeniería genética. 2a. ed. Barcelona (España): Elsevier; 2001.
45. li RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin W. 2013. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol*. 198. DOI: 10.1007/s00430-009-0123-8.
46. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Molecular Microbiology*. 27:99–106. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00661.x.

47. Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. 2015. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5:1–10. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00072.
48. Lacerda T, Cardoso P, Augusto de Almeida L, Camargo I, Afonso D, Trant C, Macedo G, Campos E, Cravero S, Salcedo S, Gorvel J, Oliveira S. 2010. Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine* 28:5627–5634. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.023.
49. Lacerda T, Salcedo S, Gorvel J-P. 2013. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Current Opinion in Microbiology* 16:45–51. DOI: 10.1016/j.mib.2012.11.005.
50. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 8:60–66. DOI: 10.1016/j.mib.2004.12.003.
51. Leary SO, Sheahan M, Sweeney T. 2006. *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science*. 81:170–176. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.12.001.
52. Leenhouts K, Kok J, Venema G. 1991. Replacement recombination in *Lactococcus lactis*. *Journal in Bacteriology*. 173:4794–4798.
53. Li Z-Q, Shi J-X, Fu W-D, Zhang Y, Zhang J, Wang Z, Li T-S, Chen C-F, Guo F, Zhang H. 2015. A *Brucella melitensis* M5-90 *wboA* deletion strain is attenuated and enhances vaccine efficacy. *Molecular Immunology* 66:276–283. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.04.004.

54. Mancilla M, López-Goñi I, Moriyón I, Zárraga A. 2010. Genomic Island 2 is an unstable genetic element contributing to *Brucella* lipopolysaccharide spontaneous smooth-to-rough dissociation. *Journal of Bacteriology* 192:6346–6351. DOI: 10.1128/JB.00838-10.
55. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J. 2011. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews* 240:211–234.
56. McQuiston J, Vemulapalli R, Inzana T, Schurig G, Sriranganathan N, Fritzinger D, Hadfield T, Warren R, Snellings N, Hoover D, Halling S, Boyle S. 1999. Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infection and Immunity* 67:3830–3835. DOI: 10.1128/IAI.68.9.5471-5471.2000.
57. Montes-Horcasitas C, Ruiz-Medrano R, Magaña-Plaza I, Silva L, Herrera-Martínez A, Hernández-Montalvo L, Xoconostle-Cázares B. 2004. Efficient transformation of *Cellulomonas flavigena* by electroporation and conjugation with *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 49: 428-432.
58. Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4):209–227.
59. Nickoloff JA. Electroporation protocols for microorganisms. Nueva Jersey (EUA): Humana Press; 1995
60. Nikolich M, Warren R, Lindler L, Izadjoo M, Hoover D. 2010. Attenuation of defined *Brucella melitensis wboA* mutants. *Vaccine* 28 Suppl 5: F12-6. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.058.
61. OIE. 2015. “Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista OIE en vigor en 2016” en *Enfermedades de la Lista de la OIE 2015, Sanidad Animal en el*

Mundo. [En línea]. París, disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/> [Consulta: 31 may 2016]

62. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos V. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases* 6:91–99. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
63. Philippe N, Alcaraz JP, Coursange E, Geiselmann J, Schneider D. 2004. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid* 51:246–255. DOI: 10.1016/j.plasmid.2004.02.003.
64. Roset M, Ibañez A, De Souza Filho J, Spera J, Minatel L, Oliveira S, Giambartolomei G, Cassataro J, Briones G. 2014. *Brucella* cyclic β -1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS ONE* 9:1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0101279.
65. Sambrook J, Russel DW. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor, Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
66. Siadat S. 2012. Brucellosis Vaccines: An Overview. En: *Zoonosis*. DOI: 10.3906/vet-1101-752.
67. Vemulapalli R., McQuiston JR., Schurig GG., Sriranganathan N., Halling SM., Boyle SM. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 6:760–764.

68. Verdiguél L. Construcción de dos mutantes en los genes *rpsL* y *omp31* de *Brucella melitensis* [Tesis de doctorado]. Ciudad de México (MEX): Universidad Autónoma de México; 2014.
69. Vieira J, Messing J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259–268.
70. von Bargen K, Gorvel J-P, Salcedo SP. 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews* 36:533–562. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x.
71. Walker J. In vitro mutagenesis protocols. 3rd. ed. Nueva York (EUA): Humana Press; 2010.
72. Wang T, Wang L, Zhang J, Dong W. 2011. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and molecular research: GMR* 10:519–525. DOI: 10.4238/vol10-1gmr1055.
73. Wang Z, Niu J, Wang S, Lv Y, Wu Q. 2013. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of *wboA* mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clinical and vaccine immunology* 20:174-180. DOI: 10.1128/CVI.00573-12.
74. Wang Z, Niu J, Wang X, Wu T, Cheng J, Lu L, Wu Q. 2014. Evaluation of a *Brucella melitensis* mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. *Microbes and Infection* 16:633–639. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.06.013.

75. Whatmore AM. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, genetics and evolution*. 9:1168–1184.
76. Winter A, Schurig G, Boyle S, Sriranganathan N, Bevins J, Enright F, Elzer P, Kopec J. 1996. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res* 5:677-683.
77. Xu J., Zhang W. 2016. Strategies used for genetically modifying bacterial genome: site-directed mutagenesis, gene inactivation, and gene over-expression. *J Zhejiang Univ Sci B* 17:83–99. DOI: 10.1631/jzus.B1500187.
78. Yang X, Skyberg J, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual D. 2012. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol (Beijing)* 100:130–134. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012.
79. Zhou M, Gomez-Sanchez C. 2000. Universal TA Cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2:1–7.

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1. Medios de Cultivo

- **Caldo Luria Bertani (LB)**

Cloruro de Sodio (JT Baker®)	10 g
Triptona (Becton Dickinson®)	10 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Agua destilada	975 mL

Disolver los componentes y esterilizar en autoclave durante 15 min, 15 lb de presión a 115 °C.

- **Agar LB**

Preparar Caldo LB, agregar 15 g de agar-agar (Difco®) para 1 L y esterilizar en autoclave.

- **Medio SOB**

Triptona (Becton Dickinson®)	20 g
Extracto de Levadura (Becton Dickinson®)	5 g
Cloruro de Sodio (JT Baker®)	0.5 g
Agua destilada	950 mL

Al disolver los componentes adicionar 10 mL de KCL 250 Mm, ajustar el pH a 7.0 y aforar a 1 L. Esterilizar durante 20 min, 15 lb de presión a 115 °C. Antes de utilizar agregar 5 mL de MgCl₂ 2M.

- **Medio SOC**

A 1 L de medio SOB agregar 20 mL de glucosa 1M, para obtener una concentración final de 20 mM.

- **Agar Brucella**

28 g de caldo Brucella (Becton Dickinson®) y 14 g de agar-agar (Difco®) en 1 L de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

12.2. ANEXO 2. Soluciones

- **Solución TAE 50X**

Tris base (Affymetrix USB®)	242 g
Ácido acético glacial (JT Baker®)	57.1 mL
Ácido Etilen Diamino Tetracético- EDTA (Affymetrix USB®)	37.2 g

Aforar a 1 L de agua destilada

- **Agarosa para geles de Electroforesis**

100 mL de TAE 1X agregar 1 g, 1.5 g o 1.2 g de Agarosa Ultrapura (Invitrogen®) calentar hasta disolver por completo.

Soluciones para extracción de plásmido (Lisis Alcalina)

- **Solución I**

50 mM Glucosa (Becton Dickinson®)

25 mM Tris- HCl pH 8 (Affymetrix USB®)

10 mM EDTA pH 8 (Affymetrix USB®)

- **Solución II**

0.2 N NaOH (JT Baker®)

1% SDS (sigma-aldich®)

- **Solución III**

5M Acetato de Potasio (JT Baker®)	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
Agua destilada	28.5 mL

Soluciones para extracción de ADN

- **Solución de Lisis por el método de Tiocianato de Guanidina**

5 M Tiocianato de Guanidina (sigma-aldich®)

N-Sarcosyl (sigma-aldich®) 0.16%

EDTA Na 0.5 M pH 8.0

- **Acetato de amonio 7.4 M**

7.4 M Acetato de amonio (JT Baker®)

12.3. Anexo 3. Historia de Clonación

