



UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Construcción y caracterización de mutantes en los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL*
de *Brucella melitensis***

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

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

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

COMITÉ TUTOR:
DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. KAREN MANOUTCHARIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

“Por mi raza hablará el espíritu”

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTO POR EL APOYO FINANCIERO

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

Proyecto PAPIIT IN222516. “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”

CONACYT: Por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado

RESUMEN

Verdiquel Fernández Lázaro Felipe. “**Construcción y caracterización de mutantes en los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* de *Brucella melitensis***”. Bajo la supervisión del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Ricardo Oropeza Navarro y Dr. Karen Manoutcharian

Palabras clave. *Brucella melitensis*, Omp31, Omp22, rpsL, sobrevivencia, virulencia

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos, incluyendo al hombre, y es una de las principales zoonosis a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella* que son patógenos intracelulares facultativos que tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas y no fagocíticas tales como trofoblastos y células epiteliales. Entre las diez especies reconocidas, *Brucella melitensis* es el principal agente etiológico implicado en la brucelosis caprina y es también la especie más patógena para el humano. Ocasiona pérdidas significativas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. El control de la brucelosis se lleva a cabo mediante la utilización de la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev1, la cual es considerada la mejor vacuna contra la enfermedad en pequeños rumiantes, sin embargo pueden ocasionar abortos y no necesariamente proteger contra la enfermedad además de que es virulenta para el humano. Las proteínas de membrana externa se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y entran en contacto directo con las células y los efectores de la respuesta inmune del huésped, por lo cual, varios estudios sugieren que podrían ser factores de virulencia de la bacteria. Con la finalidad de generar una mutante con potencial vacunal y que al mismo tiempo sea una cepa control apatógena y lisa para ser evaluada en nuestra línea de investigación en tránsito intravesicular en macrófagos. El objetivo del trabajo fue la construcción de mutante en los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* de la cepa *B. melitensis* Bm 133 y evaluar la participación de dichas proteínas sobre las propiedades de la membrana externa, su rol en la internación y la sobrevivencia intracelular en macrófagos y células epiteliales, además de evaluar la importancia de dichas proteínas en la virulencia de la bacteria mediante la determinación de la virulencia residual y detección de lesiones en bazo y testículos de ratones inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 así como evaluar la protección conferida en ratones inmunizados con la cepa mutante frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133. En una primera etapa, nuestros resultados demostraron que la proteína Omp31 juega un papel importante sobre las propiedades de la membrana externa y en la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos murinos y células HeLa. Por otra parte se demostró que la mutación de *omp31* provocó una disminución en la colonización esplénica sin generar lesiones o cambios histopatológicos aparentes en ambos órganos en comparación con las cepas control y que la cepa mutante confirió una protección similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133. Estos resultados nos permiten concluir que Omp31 juega un rol importante en la integridad de la membrana externa, pero también es relevante para la virulencia de *B. melitensis* al ejercer roles importantes en la sobrevivencia intracelular y en la colonización esplénica de la bacteria. Por último a pesar de la atenuación de la bacteria, la cepa mutante confirió una respuesta inmune protectora contra la infección de la enfermedad por lo que podría ser un potencial candidato vacunal contra brucelosis caprina.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease that affects practically all species of mammals, including man, and is a major zoonosis worldwide. *Brucella* is considered a facultative intracellular pathogen, using macrophage-like cells that provide a niche for their survival. They are also capable of infecting non-professional phagocytic cells such as trophoblast cells and HeLa cells. Among the ten recognized species of the genus *Brucella*, *Brucella melitensis* is the main etiological agent involved in goat brucellosis and is also the most pathogenic for human kind. It causes significant losses in livestock production because it causes abortions, metritis, infertility and birth of weak animals. Brucellosis control is carried out through the use of the live attenuated vaccine strain *B. melitensis* Rev1, which is considered the best vaccine against the disease in small ruminants, however it can cause abortions and do not necessarily protect against disease besides that it is virulent for the human. Outer membrane proteins (OMPs) are exposed on the bacterial surface and are in contact with cells and effectors of the host immune response, whereby they could be important virulence factors of *Brucella* species. In order to construct a mutant with vaccine potential and at the same time is a non-pathogenic and smooth strain control to our research on traffic intravesicular macrophages. The objective of this work was to construct mutants in *omp31*, *omp22* and *rpsL* genes of *B. melitensis* Bm 133 strain and to evaluate the participation of these proteins on the properties of the outer membrane, its role in the internalization and the intracellular survival in macrophages and epithelial cells, in addition to evaluating the importance of these proteins in the virulence of the bacteria by determining the residual virulence and detecting lesions in spleen and testis of mice inoculated with the *B. melitensis* LVM31 mutant strain as well as evaluating the protection conferred in mice immunized with the mutant strain against challenge with the virulent *B. melitensis* Bm133 strain. In a first stage, our results demonstrated that the Omp31 protein plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *B. melitensis* in murine macrophages and HeLa cells. On the other hand it was demonstrated that the mutation of *omp31* caused a decrease in splenic colonization without generating lesions or histopathological changes apparent in both organs in comparison with the control strains and that the mutant strain conferred a similar protection to the *B. melitensis* Rev1 vaccine strain against with the challenge with *B. melitensis* Bm133 virulent strain. These results allow us to conclude that Omp31 plays an important role in the integrity of the outer membrane, but it is also relevant for the virulence of *B. melitensis* by exerting important roles in the intracellular survival and splenic colonization of the bacteria. Finally, despite the attenuation of the bacteria, the mutant strain conferred a protective immune response against the infection of the disease, so it could be a potential vaccine candidate against goat brucellosis.

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 Mapa del plásmido pTZ22	14
FIGURA 2 Mapa del plásmido pLFV26	15
FIGURA 3 Mapa del plásmido pLFV Δ	16
FIGURA 4 Amplificación y purificación del gen <i>omp22</i>	17
FIGURA 5 Clonación del gen <i>omp31</i> en el vector comercial pTZ5R/T	18
FIGURA 6 Inactivación del gen <i>omp22</i> de <i>B. melitensis</i>	18
FIGURA 7 Inactivación del gen <i>rpsL</i> de <i>B. melitensis</i>	19
FIGURA 8 Deleción del gen <i>rpsL</i> de <i>B. melitensis</i>	20
CUADRO 1 Estandarización de la PCR	13
CUADRO 2 Condiciones de la PCR	13

ABREVIATURAS UTILIZADAS

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

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. Introducción.....	1
1.1 Proteínas de membrana externa.....	4
1.2 Gen <i>rpsL</i>	7
2. Justificación.....	8
3. Hipótesis.....	9
4. Objetivo general.....	10
5. Objetivos específicos.....	10
6. Material y métodos.....	11
7. Resultados.....	18
8. Discusión.....	22
9. Conclusiones.....	31
10. Anexo 1: Artículo publicado.....	32

Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells

Abstract.....	33
10.1 Introduction.....	33
10.2 Materials and methods.....	34
10.2.1 Bacterial strains, growth conditions, and cloning vectors.....	34
10.2.2 Primers and DNA techniques.....	35
10.2.3 Inactivation of <i>omp31</i> gene in <i>B. melitensis</i> Bm 133 by homologous recombination.....	35
10.2.4 Growth kinetics of bacterial strains.....	35
10.2.5 Susceptibility assays.....	36
10.2.6 Cell culture and infection of HeLa and J774.A1 cells.....	36
10.2.7 Statistical analysis.....	36
10.3 Results.....	36
10.3.1 Amplification and inactivation of the gene encoding Omp31 in <i>B. melitensis</i> Bm 133 by homologous recombination.....	36
10.3.2 Growth rate of <i>Brucella</i> strains.....	36
10.3.3 Role of the Omp31 on the OM properties of <i>Brucella melitensis</i>	37
10.3.4 Role of the Omp31 protein in intracellular survival of <i>Brucella melitensis</i>	37
10.4 Discussion.....	38
10.5 References.....	39
11. Anexo 2: Manuscrito en preparación.....	41

Evaluación de la virulencia y de la protección conferida de ratones Balb/c inoculados con la cepa mutante LVM31 de *Brucella melitensis*

Resumen.....	41
Abstract.....	42
11.1 Introducción.....	43
11.2 Material y métodos.....	45
11.3 Resultados.....	49
11.4 Discusión.....	55
11.5 Referencias.....	60

1. INTRODUCCIÓN

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos y es una de las principales zoonosis a nivel mundial (1). La epidemiología de la brucelosis en humanos es compleja y ha tenido variaciones con el tiempo. Se estima que anualmente existen en el mundo más de 500,000 casos nuevos, representando una de las zoonosis más frecuentes. La enfermedad es endémica en países del Mediterráneo como Portugal, España, el sur de Francia, Italia, Grecia, Turquía y África del Norte, así como en Centro y Sudamérica, México, Asia y el medio Oriente. A nivel mundial se calcula una incidencia en zonas endémicas que llega hasta más de 200 casos por cada 100,000 habitantes, países como Mongolia, Iraq, Arabia Saudita, Tadjikistan y Kazajstán presentan la incidencia más alta a nivel mundial, sin embargo el país con mayor número de nuevos casos anuales es Siria con una tasa de incidencia de 1,603 casos por millón de habitantes (2, 3). En México la Brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de periodicidad de notificación semanal. Entre los años 2007 y 2012 se han registrado 15,303 casos de Brucelosis con un promedio anual de 2,550 casos anuales en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1.7 por 100 000 habitantes y en el año 2012 se registraron 3,089 casos, con una incidencia de 3.1, lo anterior representó un incremento en la incidencia del 77% para el 2012 con respecto a 2007. En el 2016 se reportaron 2396 casos (825 hombres, 1622 mujeres) y en el 2017 se reportaron 1855 casos de los cuales los estados de Puebla, Michoacán, Sinaloa, Guanajuato y Nuevo León reportaron el mayor número de casos (4, 5).

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción y además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias del género son patógenas para el hombre quien adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada o sus derivados, o por el contacto con material infeccioso (6). Por lo anterior la vacunación tiene que ser considerada la herramienta fundamental para controlar la diseminación de la brucelosis entre los animales. En México existe una Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, la cual marca los lineamientos para el control, prevención y diagnóstico de la enfermedad en bovinos, caprinos y ovinos (NOM-041-ZOO-1995) (7). En septiembre de 2018, se reportaron 15,336 casos totales de caprinos positivos, con una frecuencia de 0.05%, 97,787 casos totales de bovinos positivos, con una frecuencia de 0.22%,

2,060 casos totales de ovinos positivos, con una frecuencia de 0.03% a nivel nacional (8). Por lo que SAGARPA reporta que el estado de Sonora se encuentra libre de Brucelosis causada por especies lisas y el 31 % del territorio nacional está reconocido en fase de Erradicación, mientras que el 60% del territorio nacional está reconocido en fase de Control (9).

En nuestro país y de acuerdo a lo establecido a las Norma Oficial Mexicana (NOM-041-ZOO-1995) la vacunación de ovinos y caprinos, se realiza con *B. melitensis* Rev1 (7). La vacuna Rev1 es considerada la mejor cepa para el control y prevención de la brucelosis caprina. Con el uso intensivo de esta vacuna se ha demostrado la disminución de la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, también se ha demostrado que existen efectos adversos: se ha observado que la vacuna Rev1 persiste en los animales en los que se puede diseminar la enfermedad horizontalmente en el hato, además de que llega a infectar a los humanos, demostrando los riesgos biológicos que esta cepa puede ocasionar (10-12). La vacunación de las hembras preñadas en el último tercio de la gestación puede ocasionar abortos y hembras que están en lactación pueden secretar la cepa vacunal por la leche, infectando a las crías. Además, debido a que la vacuna tiene un fenotipo liso, los anticuerpos generados pueden confundir en las pruebas serológicas de diagnóstico evitando la diferenciación entre animales infectados y animales vacunados (13, 14).

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella* spp., las cuales se encuentran clasificadas como parte de la subdivisión Alfa-2 de las Proteobacterias (15). El género se conforma por las especies: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*, en mamíferos terrestres, así como, dos especies aisladas de mamíferos marinos *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (16, 17). Más recientemente, se han descrito otras dos nuevas especies: *B. microti*, aislada inicialmente del ratón de campo (*Microtus arvalis*) y *B. inopinata*, aislada de un implante de mama en una paciente de 71 años de edad con signos clínicos de brucelosis (18, 19). *Brucella melitensis* es la especie que origina los cuadros más severos en humanos, caracterizados por fiebre aguda, razón por la cual se le adjudica la sinonimia de Fiebre de Malta o Fiebre ondulante.(1)

El género *Brucella* spp está conformado por bacterias con morfología de bacilos cortos, Gram negativos, no móviles, no esporulados y sin cápsula. Actualmente, se sabe que la bacteria es capaz de utilizar nitratos y oxígeno como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria, una característica que le permite a estos microorganismos sobrevivir dentro de células eucariontes o en medios carentes de oxígeno (20, 21).

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

Brucella es un parásito intracelular facultativo que ha evolucionado para poder sobrevivir dentro de las células fagocíticas profesionales y no profesionales, pudiendo permanecer sin ser detectada por el sistema inmune, es capaz de inhibir la acción bactericida del suero, así como la fusión fagosoma-lisosoma, evita la desgranulación primaria y resiste a la actividad de la mayoría de los antibióticos (10). La resistencia de *Brucella* en el organismo puede deberse en parte a una circulación intracelular alterada para evitar la fusión fagolisosomal cuando la bacteria está contenida en vacuolas especializadas en el retículo endoplásmico (23, 24).

El lipopolisacárido (LPS) del género *Brucella* confiere unas propiedades especiales a la bacteria que le proporcionan protección frente a los mecanismos de defensa del organismo hospedador. Entre estas propiedades se encuentran: una baja endotoxicidad, una alta resistencia a la degradación por macrófagos y una baja inmunogenicidad.

Fundamentalmente, se ha observado que el LPS se encuentra implicado en la resistencia de la bacteria a la acción bactericida de péptidos catiónicos y del complemento, y en la inhibición de la síntesis de diferentes mediadores inmunitarios necesarios para la activación de distintos mecanismos de defensa antimicrobianos (25).

El Sistema de Secreción de Tipo IV (T4SS) es un complejo multiproteico codificado por el operón *virB*, el cual está formado por 12 genes (*virB1* a *virB12*) que se transcriben a partir de un único promotor localizado delante de *virB1*. Aunque se desconoce la función biológica que poseen la mayoría de estas moléculas efectoras transportadas por esta maquinaria, se ha demostrado que la expresión del operón *virB* es necesaria para que se lleven a cabo las asociaciones entre las BCVs y el retículo endoplasmático, esenciales para el desarrollo del fagosoma replicativo. Así, se ha comprobado que las vacuolas que transportan cepas mutantes en este operón de estirpes lisas de *Brucella* (*B.*

melitensis, *B. abortus* y *B. suis*) no interactúan con el retículo endoplasmático y se fusionan con los lisosomas, degradándose la bacteria en los fagolisosomas resultantes (26-29).

Los β -(1,2) glucanos cíclicos (C β G) constituyen otro factor de virulencia descrito en el género *Brucella*. Un estudio realizado utilizando un mutante Δcgs de *B. abortus* 2308 ha establecido una posible relación entre la capacidad que poseen los C β G para extraer moléculas de colesterol y el papel que pueden llevar a cabo en la virulencia de esta cepa. Así, parece ser que los C β G alteran los dominios lipídicos ricos en colesterol que están presentes en las membranas de las BCVs y previenen que éstas se fusionen con los lisosomas. De este modo, contribuyen a que la bacteria alcance el fagosoma replicativo, favoreciendo en definitiva, su supervivencia intracelular (30, 31).

1.1 PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (PME)

Las PME del género *Brucella* fueron inicialmente estudiadas debido al fuerte potencial que presentaban como antígenos inmunogénicos y protectores. Se clasificaron de acuerdo a su peso molecular en tres grupos: grupo 1 (80 a 94 kDa), grupo 2 (34 a 40 kDa) y grupo 3 (25 a 30 kDa) (32). Las PME del grupo 3 Omp25 y Omp31 han sido muy estudiadas y su importancia radica en su alta especificidad, ya que no presentan reacciones cruzadas con otras especies de bacterias, siendo de gran utilidad para el diagnóstico serológico y para la eventual fabricación de vacunas. Se ha observado que estas proteínas mayoritarias, cuando son separadas por electroforesis en geles de acrilamida y detectadas mediante *Western Blot*, presentan una variación en la masa molecular aparente y muestran un perfil de bandas múltiples. La causa de este fenómeno todavía no ha podido ser clarificada, aunque se ha relacionado con la unión de las proteínas a subunidades de péptidoglucano de diferentes tamaños, con la formación de oligómeros que puedan modificar su punto isoeléctrico y con la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria (33). En el caso de la proteína Omp25, se han encontrado indicios de que podría tratarse de una glicoproteína, por lo que el perfil múltiple de bandas podría deberse a una heterogeneidad en la parte oligosacáridica.

Por otra parte, tanto Omp25 como Omp31, poseen un cierto grado de homología con otras proteínas de microorganismos incluidos también en las α -Proteobacterias.

Así, Omp25 y Omp31 presentan un porcentaje de identidad cercano al 40 % con la proteína RopB, un miembro de la familia de PMEs RopB, recientemente caracterizada en *Rhizobium leguminosarum* (34). Además, también se ha observado que la proteína Omp31 muestra alrededor de un 32 % de identidad con HbpA, la cual pertenece a la familia de proteínas fijadoras de hemina Hbp de *Bartonella quintana*

(35). Debido a esto, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha comprobado que la proteína Omp31 de *B. suis* posee una cierta capacidad para unir hemina, y que la expresión del gen que la codifica, se induce cuando la bacteria se cultiva en condiciones con limitación de hierro (36).

En la última década, tras la publicación de la secuenciación de los genomas de varias cepas de *Brucella*, tales como *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330 o *B. abortus* 9-941, se descubrió la existencia de cinco genes que codificaban proteínas homólogas a las dos PMEs del grupo 3 previamente mencionadas (32). En la actualidad, estas cinco proteínas denominadas Omp31b, Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp22, junto con Omp25 y Omp31, constituyen la familia de PMEs Omp25/Omp31. Tanto las proteínas que componen dicha familia, como los genes que las codifican, han sido objeto de numerosos estudios que, como se expone en el siguiente apartado, han demostrado su relevancia en distintos aspectos (33, 37).

Como ya se mencionó anteriormente, las PME se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y entran en contacto directo con las células y los efectores de la respuesta inmune del organismo hospedador. Por tanto, su estudio dentro de este campo es de gran interés, ya que puede proporcionar un conocimiento más amplio sobre los mecanismos de interacción huésped-parásito empleados por este género, que podría, además permitir el desarrollo de nuevas vacunas atenuadas mejores a las existentes (38).

En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PMEs de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella*. Por ejemplo, en varios estudios se ha demostrado que cepas de *B. abortus* 2308 y *B. ovis* PA (cepa parental) que con el gen *omp25* inactivado, no se encuentran atenuadas en ratón, lo que descarta la implicación de la proteína Omp25 en la virulencia de estas cepas (39).

En cuanto a Omp31 está compuesta por un barril β de ocho láminas, con cuatro bucles expuestos al exterior, los cuales son de mayor tamaño que los de la proteína Omp25 (32). Existen diferencias a nivel de la proteína Omp31 entre las especies de *Brucella*, siendo la más destacable la ausencia del gen que la codifica en la especie *B. abortus* por lo que no es necesaria para la virulencia de esta especie. Adicionalmente, se ha relacionado a la proteína Omp31 con funciones asociadas con la unión a grupos hemo y otros complejos de hierro (35), en base a la homología que muestra con la proteína HbpA del parásito de eritrocitos *Bartonella quintana* (40). En concreto, la expresión de la proteína Omp31, al menos en *B. suis*, *B. melitensis* y *B. ovis*, parece inducirse en condiciones de acceso limitado de hierro (35). También se le ha atribuido un papel inmunomodulador en *B. melitensis* 16M

relacionado con la inhibición de la apoptosis mediada por la secreción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) en macrófagos (41). Pese a la relevancia que supondrían dichas funciones para la viabilidad de *Brucella* en el entorno intracelular, la ausencia de Omp31 en *B. melitensis* Rev1 y *B. ovis* PA no tiene efectos drásticos en la virulencia de la bacteria (42-44). Sin embargo, *B. melitensis* Rev1 posee niveles inferiores de Omp31 respecto a su cepa parental, lo cual podría indicar alguna relación entre esta OMP y la atenuación de esta cepa vacunal (45). Otros estudios comprobaron, que la ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón (43). Adicionalmente en otro estudio con la cepa *B. ovis* PA que porta el gen *omp31* inactivado, hay una disminución en la invasión de la bacteria en macrófagos murinos (44).

Ke Zhang y colaboradores demostraron que la mutación de *omp31* de *B. melitensis* 16M disminuyó la sobrevivencia intracelular en macrófagos RAW264.7 y además incremento la secreción de TNF α y de marcadores de apoptosis por lo que concluyeron que la proteína Omp31 podría estar involucrada en inhibir la apoptosis y beneficiar su sobrevivencia intracelular en macrófagos RAW264.7 (41).

En nuestro grupo de trabajo demostramos que la mutación de la PME Omp31 alteró las propiedades de la membrana externa de *B. melitensis* y provocó una disminución significativa en la internación, en la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria en macrófagos murinos J774.A1 y en células HeLa (46).

En cuanto a las PMEs Omp25d y Omp22, se demostró que la inactivación de los genes *omp25d* y *omp22* en *B. ovis* PA provoca una fuerte atenuación de la virulencia de esta cepa naturalmente rugosa en ratón y además que estas PMEs ejercen un importante papel en la virulencia de *B. ovis* PA y su ausencia en la membrana externa causa una marcada atenuación en su capacidad invasiva y de multiplicación intracelular en células HeLa y macrófagos murinos (43, 44). El hecho de que ambos mutantes mostraran defectos en su membrana externa menores o iguales a los observados en otras cepas mutantes en genes de la misma familia que no estaban atenuadas sugiere que las proteínas Omp25d y Omp22 podrían estar directamente involucradas en la virulencia de *B. ovis* PA, pudiendo tener un papel importante en la penetración y en la multiplicación de este microorganismo en las células hospedadoras (44). Por el contrario, en el caso de los mutantes de *B. abortus* 2308 en el sistema regulador de dos componentes *bvrR/bvrS* (129) mencionados anteriormente, a pesar de que se ha observado que tampoco sintetizan la proteína Omp22 y que se ha llegado a pensar que su

ausencia podría estar relacionada con la atenuación que muestran dichas cepas en ratón, no se ha podido demostrar su implicación en la virulencia de esta cepa lisa (101, 125).

1.2 GEN *rpsL*

El gen *rpsL* codifica para la proteína ribosomal S12, una proteína altamente conservada localizada en el centro funcional de la subunidad 30S del ribosoma. A partir de cristales de alta resolución de la subunidad 30S de *Thermus thermophilus* se ha visto que la proteína S12 juega un papel importante en el proceso de selección del tRNA (152, 153). Durante el proceso de selección del tRNA se producen contactos sucesivos entre la proteína S12 con algunos elementos estructurales importantes del rRNA 16S y con la subunidad 50S (154-155). Se piensa que las mutaciones conocidas en S12 afectan la precisión de la lectura y lo hacen porque afectan la estabilidad de dichas interacciones.

Las mutaciones en el gen *rpsL*, a menudo afectan la respuesta de la célula a estreptomicina, que causa errores de lectura del código genético. Poco se conoce acerca de la base estructural de la dependencia a estreptomicina o acerca de la naturaleza de las alteraciones de la cadena lateral que pueden influenciar este fenotipo; se ha visto que una mutación en un aminoácido concreto de la proteína S12 confiere dependencia o resistencia a estreptomicina de acuerdo al tamaño de la cadena lateral del aminoácido cambiado (153, 159, 161). Es el caso de la cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev 1 que tiene una mutación en el codón 91, por lo que se tiene la hipótesis que a partir de esta mutación se atenuó dicha cepa (47).

En cuanto a la implicación en la virulencia de mutaciones restrictivas y no restrictivas en el gen *rpsL*, en un estudio realizado por Björkman en 1998, mostraron un efecto en la disminución en la virulencia y en la tasa de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*. Otros estudios demostraron que mutaciones en el gen *rpsL* en *Erwinia carotovora* provocó una disminución en la producción de la exoenzima y del ácido carboxílico por lo tanto una reducción en la virulencia (48, 49).

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestra línea de investigación, que está relacionada con el estudio del tránsito vesicular de *B. melitensis* en células fagocitarias, estamos enfocados en el conocimiento de la relación que tienen algunas SNAREs, durante el tránsito vesicular de la bacteria. Por lo anterior es fundamental la construcción de cepas lisas atenuadas con diferentes grados de patogenicidad que nos permita abundar en el estudio.

Así mismo, debido a los efectos adversos del uso de la cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev 1 en la profilaxis contra la brucelosis en pequeños rumiantes, la construcción de cepas mutantes serán evaluados como inmunógenos.

3. HIPÓTESIS

La construcción de mutantes en los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* de *Brucella melitensis* disminuirá la virulencia de la cepa en ensayos de sobrevivencia en líneas celulares y conferirá protección a ratones vacunados con las cepas mutantes frente al desafío con una cepa virulenta.

4. OBJETIVO GENERAL

Construcción de inmunógenos experimentales mediante la mutación de los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* de *Brucella melitensis* para evaluar su papel en la virulencia en ensayos *in vitro* en líneas celulares e inmunogenicidad en ensayos *in vivo* contra el desafío en un modelo murino.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mutar el gen *rpsL* de *Brucella melitensis*.
- Mutar el gen *omp22* de *Brucella melitensis*.
- Evaluar el efecto de la inactivación de los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* mediante ensayos de sobrevivencia en macrófagos murinos J77 4.1 y células HeLa
- Evaluar el efecto de la inactivación de los genes *omp31*, *omp22* y *rpsL* en la membrana externa de *Brucella melitensis* mediante ensayos de susceptibilidad.
- Determinar la virulencia residual y la protección conferida de ratones vacunados con los inmunógenos experimentales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CEPAS BACTERIANAS

- Las cepas de *Brucella* empleadas en la realización del presente trabajo están enlistadas en los apartados de material y métodos del anexo 1 y anexo 2 del documento. El manejo de la bacteria se realizó en la Unidad de Bioseguridad 2 del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.
- En el proceso de clonación molecular se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α , la cual fue cultivada en agar y caldo Luria-Bertani (LB) durante 18 h a 37° C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con ampicilina (100 μ g/ml) y kanamicina (50 μ g/ml) para el caso del plásmido pUC18 y pUC4K respectivamente.
- En el proceso de inducción de expresión de la proteína Omp22 recombinante para la obtención de anticuerpos policlonales contra dicha proteína, se utilizará la cepa *Escherichia coli* BL21, la cual será cultivada en agar y caldo LB durante 18 h a 37° C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con ampicilina (100 μ g/ml).

6.2 LÍNEAS CELULARES

Para los ensayos de infección se utilizaron líneas celulares de células HeLa y macrófagos murinos J77A4.1. Las condiciones de cultivo y la metodología de los ensayos de infección están descritas en el apartado del Anexo 1.

6.3 ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

Los ensayos de virulencia residual y de protección conferida se realizaron en ratones BALB/c de 8 semanas de edad, aproximadamente. Las especificaciones de los animales está especificado en el apartado de material y métodos del anexo 2.

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

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

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

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

6.6 VECTORES DE CLONACIÓN

- Los plásmidos que se utilizaron para la construcción de la cepa mutante *B. melitensis* y para la inactivación del gen *rpsL* están enlistados en el Anexo 1.
- **pKD4:** Plásmido cerrado de 3267 pb, contiene un gen de resistencia a la Penicilina, otro a la Kanamicina y contiene sitios FRT (objetivos flip-recombinasa) donde actúan las flipasas. Fue utilizado como templado para la amplificación de un casete de resistencia a la kanamicina flanqueado con sitios de restricción *NcoI*
- **pTZ57R/T:** Plásmido lineal de 2886 pb, contiene un casete de resistencia a la Ampicilina y un sitio múltiple de clonación con extremos cohesivos de timinas. Fue utilizado para la clonación del gen *omp22* y del casete de kanamicina obtenido del pKD4.
- **pDS132:** Plásmido cerrado de 5286 pb, contiene el gen de resistencia al cloranfenicol para su selección positiva, el gen *sacB* de *B. subtilis* que es un marcador de selección negativa (sensible a sucrosa), por lo que dicho plásmido será utilizado como vector suicida para los procesos de recombinación homóloga en la obtención de las cepas mutantes en los genes *rpsL* y *omp22* de *B. melitensis*.

6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los genes *rpsL* (500 pb) y *omp22* (558pb) y los casetes con resistencia a kanamicina (800pb) y tetraciclina (1200pb) se amplificaron mediante el uso de la PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo general descrito por Sambrook and Russell en 2001. Se estandarizó la PCR para una reacción de 50 µL.

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

Cuadro 1. Estandarización de la PCR

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

Gen <i>rpsL</i>	Gen <i>omp22</i>	Casete de kanamicina y tetraciclina
<ul style="list-style-type: none"> Desnaturalización inicial 5 min 94 °C 	<ul style="list-style-type: none"> Desnaturalización inicial 5 min 94 °C 	<ul style="list-style-type: none"> Desnaturalización inicial 5 min 94 °C
<ul style="list-style-type: none"> 30 ciclos 	<ul style="list-style-type: none"> 30 ciclos 	<ul style="list-style-type: none"> 30 ciclos
<ul style="list-style-type: none"> a) Desnaturalización 45 seg 94 °C b) Alineamiento 45 seg 56°C c) Extensión 45 seg 70°C 	<ul style="list-style-type: none"> a) Desnaturalización 1 min 94 °C b) Alineamiento 1 min 58°C c) Extensión 1 min 30 seg 72°C 	<ul style="list-style-type: none"> a) Desnaturalización 2 min 94 °C b) Alineamiento 1 min 58°C c) Extensión a) 1 min 30 seg 72°C
<ul style="list-style-type: none"> Extensión final 10 min 72°C 	<ul style="list-style-type: none"> Extensión final 5 min 72°C 	<ul style="list-style-type: none"> Extensión final 5 min 72°C

Cuadro 2. Condiciones de la PCR

6.7 CONSTRUCCIÓN DE LOS INMUNÓGENOS EXPERIMENTALES

6.7.1 **Inactivación del gen *omp22* de *Brucella melitensis*:** El gen *omp22* fue amplificado mediante la técnica de PCR y clonado en el vector comercial pTZ5R/T siguiendo las instrucciones del fabricante, generando el plásmido pTZ22 (Fig. 7). El plásmido pTZ22 fue digerido con las

enzimas *Xba* I para la liberación del gen *omp22* el cual fue ligado al plásmido pDS132 previamente digerido con dicha enzima, generando el plásmido pTZ22V. La inactivación del gen *omp22* en el plásmido pTZ22V será mediante la inserción de un casete con resistencia a tetraciclina y/o kanamicina con sitios de restricción *Nco*I obtenido del plásmido pACYC184 y del plásmido pKD4 respectivamente, generando el plásmido pTZ22VK el cual será transformado por electroporación en la cepa *Brucella melitensis* Bm 133, generando la cepa mutante *Brucella melitensis* pTZ22VK.

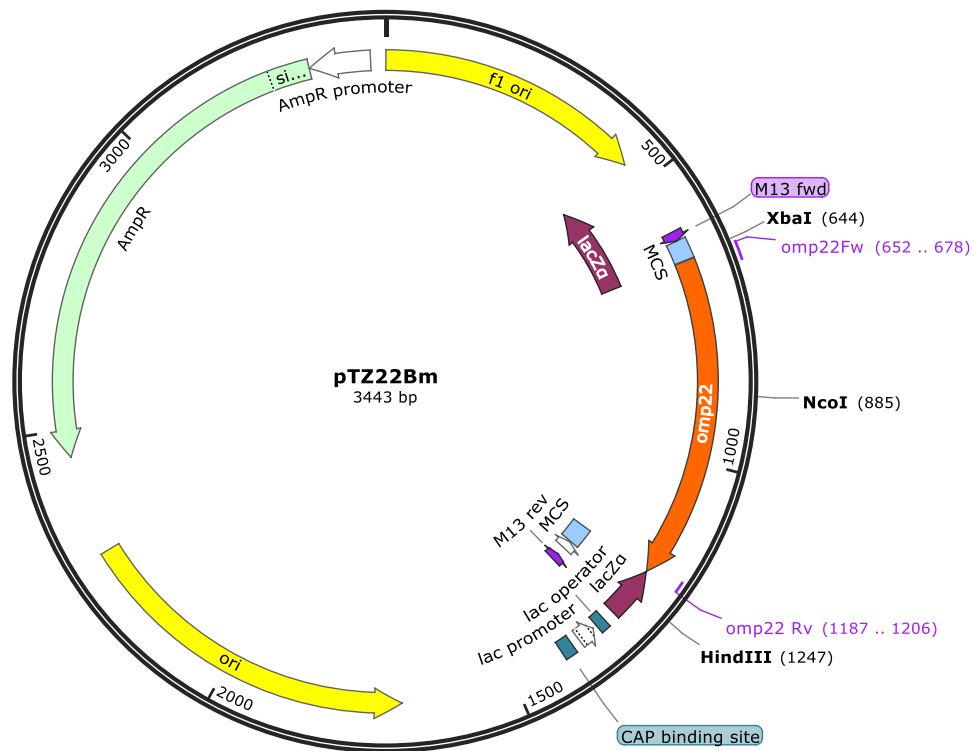


Fig. 1 Mapa del plásmido pTZ22. Plásmido pTZ57R/T que contiene el gen *omp22* de *B. melitensis*. Se muestra los sitios de restricción *Xba*I y *Hind*III y el casete de resistencia a Amp. Imagen creada en el software *Snappgene*

6.7.2 **Inactivación del gen *rpsL* de *Brucella melitensis*:** El plásmido pLFV26, (construido en nuestro laboratorio), que contiene el gen *rpsL* inactivado será digerido con la enzima *Xba* I para la liberación del gen *rpsL* el cual será ligado al plásmido pDS132 previamente digerido con dicha enzima, generando el plásmido pLFV26K el cual será transformado por electroporación en la cepa *Brucella melitensis* Bm 133, generando la cepa mutante *Brucella melitensis* pLFV26K.

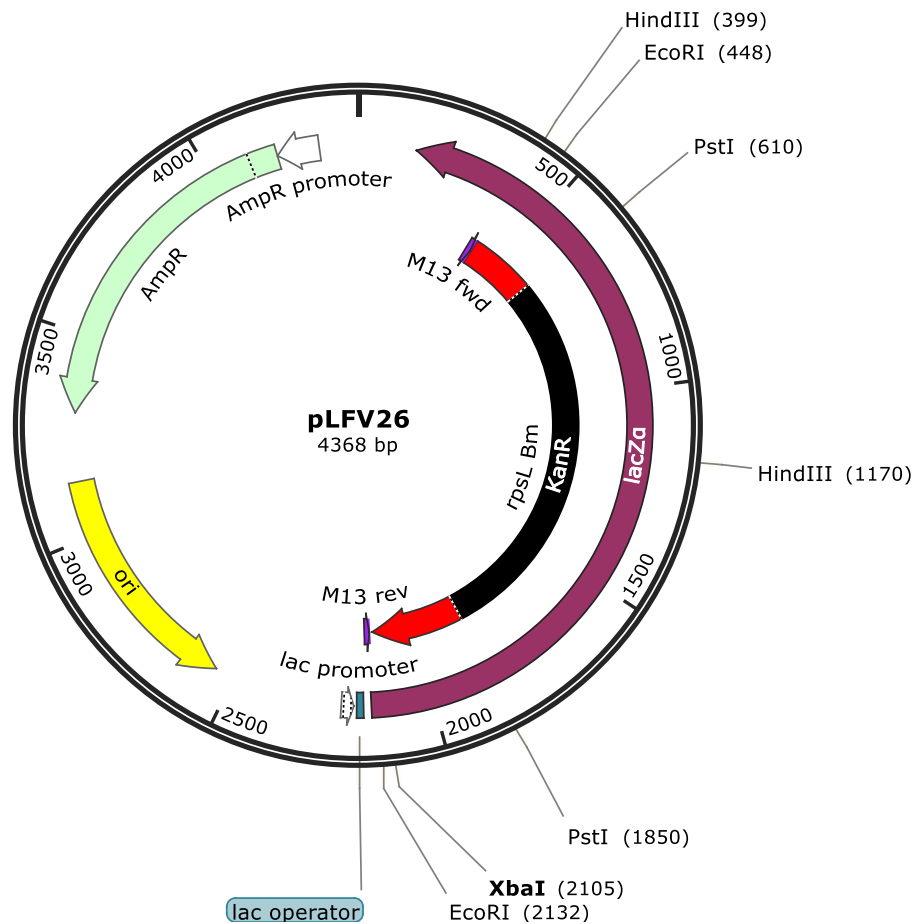


Fig. 2 Mapa del plásmido pLFV26. pUC18 que contiene el gen *rpsL* inactivado mediante la inserción de un casete de Kan con sitios de restricción PstI. Se muestra los sitios de restricción *XbaI* y *HindIII*, el casete de resistencia a Amp y Kan. Imagen creada en el software *Snappgene*

6.7.3 **Delección de un fragmento del gen *rpsL* de *Brucella melitensis*:** pLFV (plásmido recombinante con el gen *rpsL* clonado en pUC18) fue digerido con la enzima *Pst I* liberando un fragmento de 149 pb del gen, el plásmido digerido fue purificado y ligado con la enzima T4 ligasa para unir el gen *rpsL* generando el plásmido pLFVΔ (Fig. 9) (que contiene el gen *rpsL* con una región de 149 nucleótidos eliminados de su secuencia) el cual fue transformado por electroporación en la cepa *E. coli* DH5α.

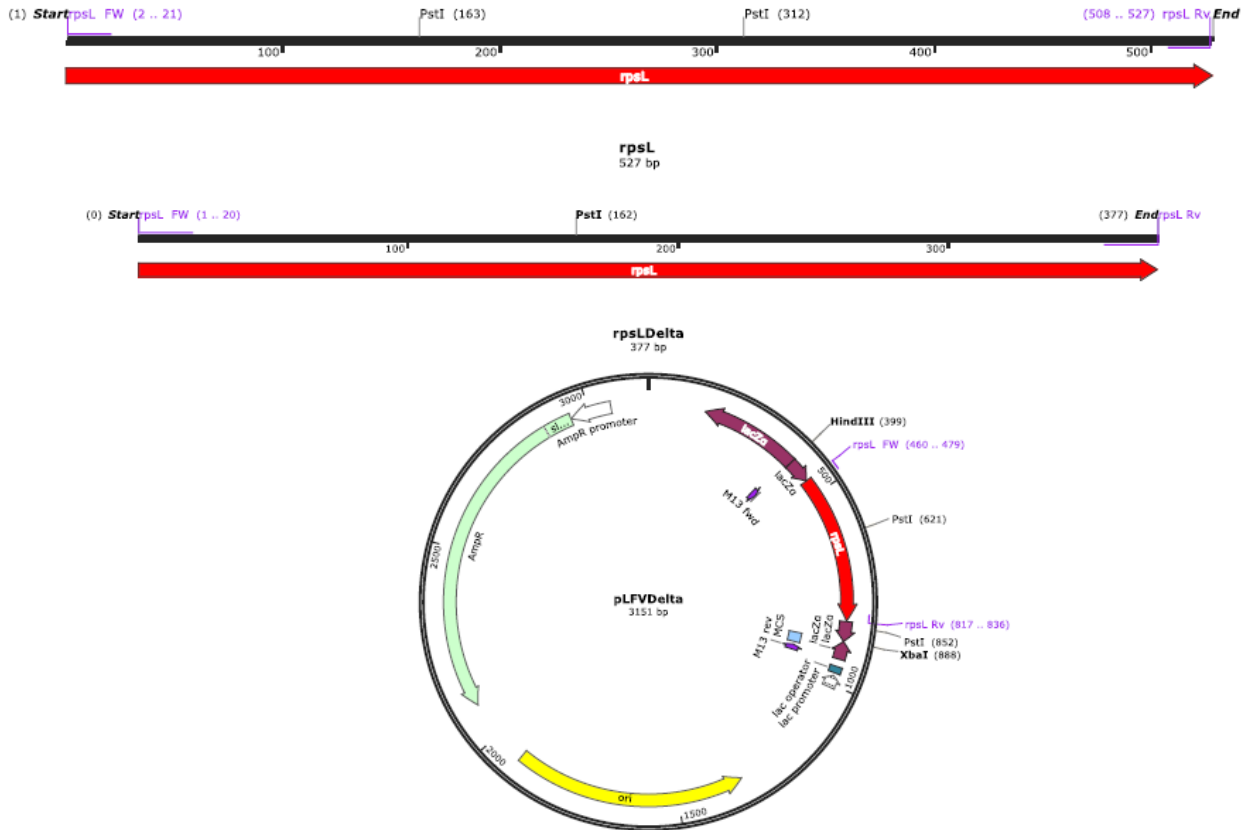


Fig. 3 Mapa del plásmido pLFVΔ. pUC18 que contiene el gen *rpsL* de *B. melitensis* con una región de 149 nucleótidos eliminados de su secuencia. Se muestra los sitios de restricción *XbaI*, *HindIII* y *PstI* y, el casete de resistencia a Amp. Imagen creada en el software *Snagene*

7. RESULTADOS

7.1 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL GEN *omp22*

Mediante la técnica de PCR se amplificó el producto de un tamaño de 558 pb del gen *omp22*. Los fragmentos de PCR obtenidos fueron cuantificados obteniendo una concentración promedio de 1 µg/µl. Se realizó una electroforesis para verificar que el tamaño del amplificado corresponda al tamaño esperado de 558 pb del gene *omp22*. Los fragmentos de PCR fueron purificados a partir de fragmentos de geles de agarosa al 1.5% y centrifugados a 13,000 rpm durante 10 segundos en columnas con fibra de vidrio elaboradas en nuestro laboratorio (Fig. 13).

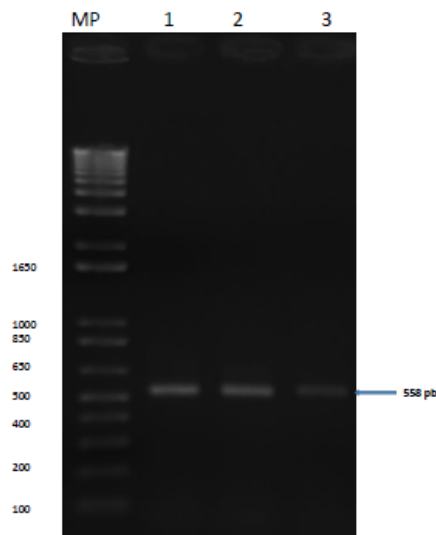


Fig. 4. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1-3. Control positivo del gen *omp22*, la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 558 pb.

7.2 CLONACIÓN DEL GEN *omp22* en el plásmido pTZ5R/T

El producto de PCR del gen *omp22* fue clonado en el vector comercial pTZ5R/T (obteniendo el plásmido pV22), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido con el inserto ligado, fue transformado en la cepa *E. coli* DH5α. Se realizó una PCR de colonia a las clonas resistente a Ampicilina para comprobar la clonación del gen *Omp22* en el plásmido (Fig. 14).

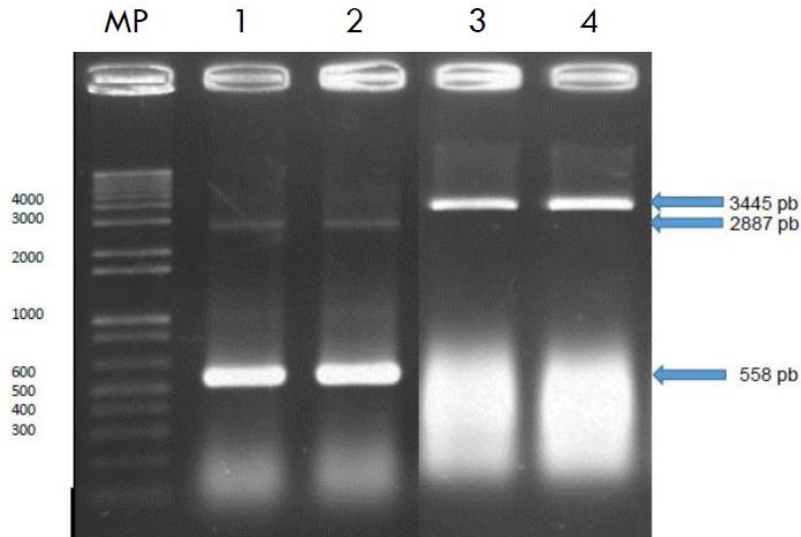


Fig. 5. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1. Control positivo del gen *omp22*, Carril 2,4 y 5. Clonas positivas del plásmido pV22, la flecha indica el tamaño del fragmento esperado de 558 pb.

7.3 INACTIVACIÓN DEL GEN *omp22* DE *Brucella melitensis*

Inactivación del gen mediante la inserción de un casete de kanamicina: Para la inactivación del gen *omp22*, el plásmido pV22 fue digerido con la enzima *NcoI*, una vez digerido el plásmido fue purificado con el protocolo mencionado en la metodología. Al plásmido pLFV digerido y purificado se le insertó un casete de Kanamicina en el sitio de restricción *NcoI*, obtenido del plásmido pKD4 previamente digerido con la enzima *NcoI*, obteniendo el plásmido pV22K. Dicho plásmido contiene la secuencia del gen *omp22* interrumpida con una secuencia de ADN que confiere resistencia a la Kanamicina.

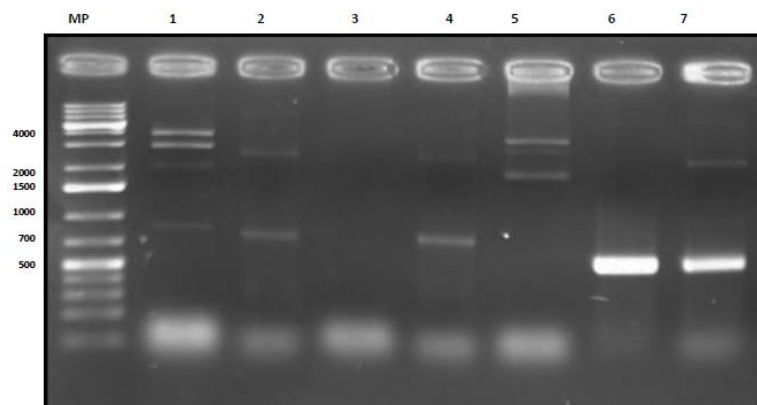


Fig. 6. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1: pTZ22KAN Dig. *HindIII-XbaI*, Carril 2: PCR Ptz22kan, Carril 3: Control (-), Carril 4: PCR Ptz22kan, Carril 5: Ptz22kan Sin digerir, Carril 6: Control (+), Carril 7: Control (+) pTZ22.

7.4 INACTIVACIÓN DEL GEN *rpsL* DE *Brucella melitensis*

- Inactivación del gen mediante la inserción de un casete de kanamicina: Para la inactivación del gen *rpsL*, el plásmido pLFV fue digerido con la enzima *PstI*, una vez digerido el plásmido fue purificado con el protocolo mencionado en la metodología. Al plásmido pLFV digerido y purificado se le insertó un casete de Kanamicina en el sitio de restricción *PstI*, obtenido del plásmido pUC4k previamente digerido con la enzima *PstI*, obteniendo el plásmido pLFV26. Dicho plásmido contiene la secuencia del gen *rpsL* interrumpida con una secuencia de ADN que confiere resistencia a la Kanamicina. El plásmido pLFV26 fue digerido con la enzima *PstI* para liberar un fragmento de 1300 pb correspondiente al casete de Kanamicina insertado en la secuencia del gen *rpsL* (Fig. 15).

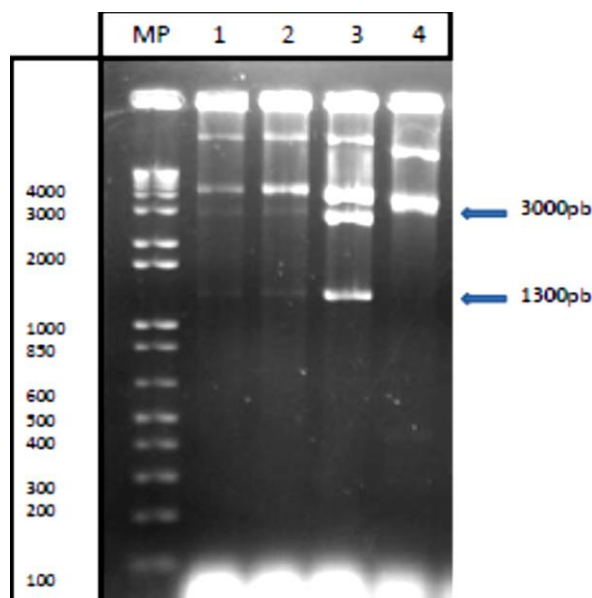


Fig 7. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb “ladder” plus. Carril 1,3. Plásmido pLFV26 digerido con la enzima *PstI*, la flecha superior indica el tamaño del plásmido pLFV de 3000 pb, la flecha inferior indica el tamaño del casete de Kanamicina de 1300pb. Carril 5. Plásmido pLFV26 sin digerir.

- Inactivación del gen *rpsL* mediante la delección de un fragmento del gen *rpsL*: Para la delección de un fragmento del gen *rpsL*, el plásmido pLFV fue digerido con la enzima *PstI*, una vez digerido el plásmido fue purificado con el protocolo mencionado en la metodología. Una vez digerido y purificado el plásmido pLFV se realizó una reacción de ligazón para unir los sitios donde fue liberado un fragmento del gen *rpsL*, obteniendo el plásmido pLFVΔ. El cual fue transformado por electroporación en la cepa *E. coli* DH5α.

Las clonas se seleccionaron mediante resistencia a Amp (50µg) y positivas a la PCR de colonia del gen *rpsL* con el fragmento deletado.

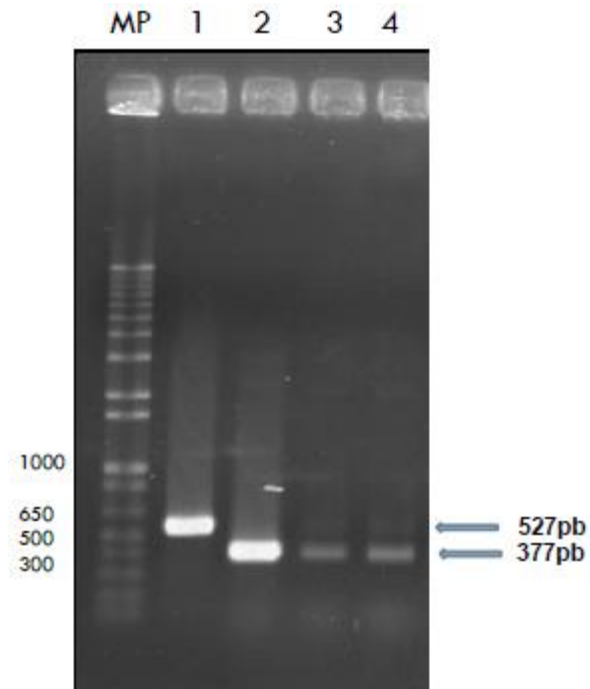


Fig 8. Gel de agarosa al 1% en TAE1X teñido con bromuro de etidio. Carril MP. Marcador de peso molecular 1 kb "ladder" plus. Carril 1. Inserto de 527pb del gen *rpsL* amplificado de la cepa silvestre *B. melitensis*. Carril 2-4. Inserto de 377pb del gen *rpsL* inactivado (mediante la delección de 149pb) amplificado del plásmido pLFVΔ

8. DISCUSIÓN

Numerosas investigaciones han conducido a que muchos de los aspectos de la virulencia de *Brucella* se hayan relacionado con las características de su ME (50).

En la superficie celular de *Brucella* se encuentran expuestas, de manera minoritaria, las lipoproteínas Omp10 y Omp19, junto con las proteínas mayoritarias Omp25 y Omp31 (51). Si bien su implicación en la virulencia de las distintas especies del género *Brucella* no está claramente delimitada, se considera que estos elementos contribuyen de forma relevante al mantenimiento de la integridad de la ME y, por tanto, a la fisiología de la bacteria (38, 46).

Con base en estos hallazgos, uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar el efecto de la mutación de *omp31* de *B. melitensis* en cuanto a su papel en la integridad de la ME y la sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos murinos y células HeLa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que Omp31 juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la ME de *B. melitensis*, ya que su ausencia ocasionó una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia de la bacteria debida a la acción microbicida de péptidos catiónicos, detergentes aniónicos así como a la acción de mecanismos moleculares del suero (Anexo 1, Apartado 10.3.2).

Después de comprobar que la presencia de Omp31 desempeña un papel importante sobre las propiedades de la ME de *Brucella*, se decidió evaluar el efecto de la mutación de *omp31* en la internación y la sobrevivencia intracelular de la *B. melitensis* mediante ensayos *in vitro* así como determinar su participación en la virulencia de la bacteria mediante ensayos *in vivo* con la finalidad de evaluar la virulencia residual o persistencia de la bacteria en bazo de ratones inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 en comparación con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y la cepa virulenta de campo *B. melitensis* Bm133.

Nuestros resultados demostraron que la mutación de *omp31* provocó una disminución estadísticamente significativa en la internación y sobrevivencia de la bacteria en macrófagos murinos J77A4.1 y células HeLA (Anexo1, Apartado 10.3.3)

Posteriormente se evaluó en *in vivo* mediante ensayos de infección en el modelo murino donde nuestros hallazgos de este trabajo demostraron que Omp31 juega un papel relevante en la virulencia de la *B. melitensis* ya que la ausencia de esta proteína ocasionó una disminución significativa en la colonización esplénica sin ocasionar lesiones o cambios histopatológicos en el bazo en los diferentes grupos experimentales (Anexo 2, Apartado 11.3.1). Por último a pesar de la atenuación moderada que

ocasiono la mutación de *omp31*, la inmunización con la cepa *B. melitensis* LVM31 confirió una respuesta protectora similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta de campo *B. melitensis* Bm133 (Anexo 2, Apartado 11.3.3).

En la actualidad se sabe que debido a las características físico químicas de la ME *Brucella* son resistentes a mecanismos microbicidas de la respuesta inmune innata del huésped,(28) esto podría explicar la relación que tiene Omp31 en el mantenimiento de la integridad de la ME de la bacteria. Aunque la resistencia de *Brucella* spp. a los mecanismos independientes de oxígeno no se ha explicado sobre una base estructural. Los mecanismos independientes de oxígeno incluyen las acciones sinérgicas de varias proteínas y péptidos catiónicos que, en un primer paso, se unen a objetivos aniónicos de la ME y hacen que la envoltura celular sea permeable y susceptible a las enzimas líticas, bloqueando así las funciones celulares que dependen de la integridad de la membrana (31). Se ha demostrado que este género posee una elevada resistencia a una gran variedad de péptidos catiónicos bactericidas tales como, defensinas NP-2, lactoferrina, cecropina, lisozima, péptidos derivados de bacterenecina y polimixina B, así como también a extractos lisosomales de leucocitos polimorfonucleares (39).

Otras investigaciones han descrito que bacterias del género *Brucella* son también más resistentes a la acción de algunos detergentes que otras bacterias Gram negativas, algo que también se ha atribuido a las características peculiares de la ME de *Brucella*. Con base en estos hallazgos se ha sugerido una relación entre las propiedades de la ME de *Brucella* y su patogenicidad (52).

Por este motivo, en este trabajo se evaluó la susceptibilidad al deoxicolato de sodio (un detergente aniónico) y de la polimixina B (péptido catiónico) como modelo para evaluar las posibles alteraciones de la ME de la cepa mutante en comparación con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y la cepa virulenta de campo *B. melitensis* 133. Por lo que nos planteamos la hipótesis si la mutación de *omp31* afecta dichas propiedades de la ME de la bacteria. Para comprobar esta hipótesis nos planteamos el objetivo de evaluar la resistencia de la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 frente a la acción de la polimixina B, el deoxicolato de sodio en comparación con las cepas de control. Se utilizó polimixina B y desoxicolato de sodio para determinar la estabilidad de la ME y también como indicador para determinar la susceptibilidad de las cepas de *B. melitensis* por el efecto bactericida mediado por péptidos catiónicos en el huésped.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 fue más susceptible a la acción de la polimixina B y del deoxicolato de sodio, ya que hubo una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia de la cepa mutante en comparación con las cepas control.

Otros estudios han demostrado que el LPS de *Brucella* también se encuentra involucrado en la inhibición de la cascada del complemento, lo que favorece la supervivencia extracelular de la bacteria (53). Se ha observado que *B. abortus* posee una particular resistencia a sueros no inmunes, la cual es debida en parte, a que las cadenas polisacarídicas O de su LPS bloquean el acceso de C1q (subunidad proteica del primer componente del complemento en la ruta clásica) a las proteínas de la membrana externa de *Brucella* spp (54). Sin embargo, la resistencia que presenta el género *Brucella* a la lisis por el complemento no depende exclusivamente de la presencia de estas cadenas polisacarídicas en la molécula de LPS, ya que se ha observado que especies naturalmente rugosas muestran una menor o igual sensibilidad que cepas lisas a la actividad de suero no inmune de cordero (55). Por tanto, deben existir otras diferencias en la superficie de las especies de *Brucella* que expliquen este distinto comportamiento. Con base en estos resultados decidimos determinar si la ausencia de Omp31 de *Brucella melitensis* disminuiría el porcentaje de sobrevivencia de la bacteria frente a la acción de mecanismos microbicidas del suero. Por lo tanto, se evaluó la sobrevivencia de la cepa mutante en presencia de suero no inmune de cabra.

Nuestros resultados mostraron que la cepa mutante fue más susceptible a la acción del suero debido a que hubo una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia de la cepa mutante en comparación únicamente con la cepa virulenta de campo.

Después de evaluar la susceptibilidad que tiene la ME de la cepa mutante frente a la acción de péptidos catiónicos, detergentes aniónicos y del suero, nuestros resultados sugieren que Omp31 juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la ME de *B. melitensis*.

Como se mencionó, *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo que posee una serie de factores que difieren ampliamente de los clásicos factores de virulencia de otras bacterias Gram negativas (56). Es importante destacar que las especies de *Brucella* lisas pueden entrar, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas, así como en células no fagocíticas como células trofoblásticas y células epiteliales (células HeLa) (52, 57). Debido a que *Brucella* spp no posee factores de virulencia clásicos como otras bacterias, en los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PMEs

de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella* (58). De acuerdo con esto, nos propusimos determinar el efecto de la mutación de la PME Omp31 de *B. melitensis* mediante la evaluación de la internación y sobrevivencia intracelular de la cepa mutante en macrófagos murinos y células HeLa.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la presencia de la PME Omp31 está involucrada en la internación de la bacteria en macrófagos murinos y en las células HeLa. Estos resultados son parecidos a los resultados experimentales obtenidos en otros estudios, donde demostraron que la ausencia de las PMEs Omp31, Omp25d y Omp22 en la membrana externa de *B. ovis* PA causa un descenso de la capacidad invasiva de esta bacteria en macrófagos murinos J774.A1. En vista de estos resultados, las tres PMEs podrían estar involucradas en la entrada de *B. ovis* PA en las células J774.A1 a través de procesos dependientes de las “balsas lipídicas” (43).

En cuanto a la capacidad de sobrevivencia y multiplicación intracelular en macrófagos J774.A1 y células HeLa, la mutación de *omp31* causó una disminución significativa en la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en otros trabajos,(44) ya que la evaluación de diferentes cepas mutantes de *B. ovis* PA en genes de la familia *omp25/omp31*, observaron que solamente la ausencia de Omp25d o de Omp22 afectaba gravemente a la replicación intracelular de la bacteria. Así, mientras que la cepa mutante $\Delta omp25d$ fue capaz de sobrevivir en los macrófagos, la cepa mutante $\Delta omp22$ fue completamente eliminada a las 24 horas p.i. Esta incapacidad para multiplicarse intracelularmente mostrada por las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA, podría justificar, al menos en parte, la fuerte reducción en la virulencia que presentan ambas cepas en ratón.

La consecución de un nicho de replicación en los macrófagos, principales células hospedadoras de este patógeno, le va a proporcionar a este microorganismo una protección frente al complemento y a anticuerpos durante su diseminación por el hospedador, y la capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo en el organismo afectado, con la consiguiente cronicidad de la infección (59). Esta habilidad que presentan las estirpes de *Brucella* en fase lisa implica un proceso complejo, en el cual, este patógeno interfiere con las funciones propias de la célula hospedadora, llegando incluso a controlar su propio tráfico intracelular. Así, cuando una especie lisa de *Brucella* es fagocitada por el macrófago, sigue una ruta endocítica en la cual evita degradaciones hidrolíticas por fusión con los lisosomas, favoreciendo en los estadios tempranos de la infección, su supervivencia intracelular (60, 61). Por lo que la virulencia de *Brucella* se asocia con la supervivencia en células fagocíticas.

Esto podría explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo entre la relación que hubo en la disminución de la internación de la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 y la disminución de la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria a partir de las 4 horas hasta las 72 horas post infección tanto en los macrófagos murinos como en las células HeLa. Con base en estos resultados concluimos que la proteína Omp31 ejerce papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular de *B. melitensis* 133.

Después de demostrar que la proteína Omp31 juega un papel importante en la integridad de las propiedades de la ME y en la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos y células epiteliales nos planteamos el objetivo de determinar el efecto de la mutación de *omp31* en la virulencia de la bacteria en un modelo murino (46).

Los ratones, aunque no son hospedadores naturales de *Brucella* spp es el modelo experimental de laboratorio más utilizado para estudiar la virulencia de *Brucella* in vivo (62). En este modelo, *Brucella* puede colonizar múltiples tejidos, incluyendo el bazo y el hígado, donde se forman microgranulomas. Durante las etapas crónicas de la infección., un estudio reciente que utiliza cepas de *Brucella* bioluminiscentes, también encontró que se dirigen a las glándulas salivales, lo que podría ser importante en relación con la infección humana, donde la inoculación se produce por ingestión de alimentos contaminados. Además, los ratones presentaron una infección crónica de las articulaciones de la cola con *Brucella* parecida a la brucelosis osteoarticular en los animales y humanos (63, 64).

El curso de la brucelosis murina depende de la virulencia de la cepa bacteriana, la dosis y la ruta de inoculación, así como raza, antecedentes genéticos, edad, sexo y estado fisiológico de los ratones. Por lo tanto, los experimentos significativos requieren una definición de estas variables. Por lo tanto, los experimentos significativos requieren una definición de estas variables. Los perfiles de replicación del bazo de *Brucella* son altamente reproducibles y se desarrollan en cuatro fases: i), inicio o colonización del bazo (primeras 48 h); ii), fase aguda, desde el tercer día hasta el momento en que las bacterias llegan números máximos; iii), fase constante crónica, donde los números bacterianos son mesetas; y iv), fase de declinación crónica, durante la cual se eliminan las bacterias del género *Brucella*. Este mismo comportamiento se observó en nuestro estudio en los ratones que fueron infectados con la cepa virulenta de campo *B. melitensis* Bm133. Este patrón muestra signos fisiopatológicos claros y es sensible a pequeñas variaciones de virulencia, lo que hace posible evaluar la atenuación cuando se utilizan bacterias totalmente virulentas como controles (65). Con base en estas investigaciones incluimos diferentes variables en el presente estudio. Utilizamos dos cepas

control de *Brucella melitensis* con diferentes grados virulencia con el objetivo de determinar la colonización esplénica de la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 tanto en ratones hembras como en machos Balb/c en comparación con las cepas control. Otra variable que incluimos en el estudio fue el estado fisiológico de los animales, debido que en el presente estudio inoculamos ratones hembras gestantes con las diferentes cepas de *Brucella* con el objetivo de determinar la colonización esplénica de las crías nacidas de las hembras ya que diversos estudios han reportado tanto la transmisión vertical y horizontal en crías nacidas de hembras experimentalmente infectadas.(66) Por lo que nos planteamos la hipótesis si la mutación de omp31 causaría una disminución en la propagación de la cepa mutante por estas vías de transmisión.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la ausencia de la proteína Omp31 provocó una disminución en la colonización esplénica tanto en ratones machos y hembras Balb/c, además de que los órganos de los ratones inoculados con la cepa mutante no presentaron lesiones o cambios histopatológicos aparentes en comparación con los ratones inoculados con las cepas control. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos en otros trabajos, donde demostraron que la ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, a pesar de que reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón, no disminuye su persistencia en bazo (50).

En cuanto la evaluación del grado de propagación de la cepa mutante en los ratones en estudio, nuestros resultados demostraron que hubo una disminución en la colonización esplénica en los ratones nacidos de las hembras inoculados con la cepa *B. melitensis* LVM31 en comparación con las cepas control.

Estos resultados se podrían explicar debido a que la proteína Omp31 también se le ha atribuido un papel inmunomodulador en *B. melitensis* 16M(41), así como características de función porina (67) y de unión a grupos hemo en *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. suis* (35). Sin embargo, no se han descrito efectos drásticos en la virulencia *in vivo* de *B. melitensis* Rev1 y de *B. ovis* PA, en ausencia de Omp31(42, 43). De acuerdo con los hallazgos encontrados en el presente trabajo, llegamos a la conclusión que la proteína Omp31 no solo está involucrada en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa, en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos y células epiteliales sino además juega un papel relevante en la virulencia de *B. melitensis* ya que en todos los grupos experimentales que fueron inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31,

hubo una disminución en la colonización esplénica además de no generar lesiones o cambios histopatológicos en bazo en comparación con las cepas control.

Otro aspecto muy importante es la persistencia de la bacteria en bazo ya que es un indicador de virulencia o atenuación útil y se utiliza en el control de calidad de las vacunas (virulencia residual). Los candidatos vacunales a menudo se analizan en ratones mediante la determinación de la colonización esplénica (conteo de UFC/ml) después de la prueba de desafío con las dosis de *Brucella* virulentas adecuadas en los tiempos precisos posteriores a la vacunación. Dado que la mayoría de las vacunas de *Brucella* vivas o muertas brindan cierta protección en ratones, los controles en los ratones inmunizados con vacunas de referencia (S19 o Rev1) son críticos. Finalmente, los ratones se han utilizado con éxito para evaluar aplicaciones profilácticas o terapéuticas contra la brucelosis.

Con base en estas investigaciones nos planteamos el objetivo de evaluar la protección conferida en ratones inmunizados con la cepa mutante (LVM31), la cepa vacunal (Rev1) y PBS (control negativo) frente al desafío con una dosis infectante de *B. melitensis* Bm133. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que hubo una menor persistencia estadísticamente significativa de la bacteria en bazo de los ratones inmunizados con la cepa mutante y la cepa vacunal en comparación con los ratones inmunizados con PBS, en cuanto la colonización esplénica en los ratones vacunados con la cepa mutante y la cepa vacunal no hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos post desafío con la cepa virulenta de campo. Con base en estos resultados, concluimos que la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 confirió una respuesta protectora similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta de campo *B. melitensis* Bm133.

Por último, debido a que la mutación de *omp31* provocó una atenuación significativa de la bacteria tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, la cepa *B. melitensis* LVM31 podría ser evaluado como un potencial candidato vacunal para el control de la brucelosis caprina.

9. CONCLUSIONES

1. La proteína Omp31 juega un papel importante sobre el mantenimiento de la integridad de la membrana externa y en la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos murinos y células HeLa.
2. La mutación de *omp31* de *B. melitensis* ocasiono una disminución significativa en la persistencia y en la colonización esplénica de la bacteria además de no causar lesiones histopatológicas en bazo y testículos en comparación con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133 por lo que la ausencia de la proteína Omp31 está implicada en la atenuación de la virulencia de la bacteria.
3. La cepa *B. melitensis* LVM31 confirió una respuesta protectora similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133, considerando que la cepa mutante podría ser un potencial candidato vacunal en el control de la brucelosis caprina.
4. Se inactivó el gen *omp22* de *B. melitensis* para después ser transformado en *B. melitensis* 133 y evaluar el efecto de dicha mutación en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria.
5. Se inactivó el gen *rpsL* de *B. melitensis* mediante la inserción de una secuencia con resistencia a la kanamicina para después ser transformado en *B. melitensis* 133 y evaluar el efecto de dicha mutación en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria.
6. Se inactivó el gen *rpsL* de *B. melitensis* mediante la eliminación de una secuencia de 150 pares de bases para después ser transformado en *B. melitensis* 133 y evaluar el efecto de dicha mutación en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria.

10. ANEXO 1: Artículo publicado

Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells

L. Verdiguél-Fernández¹ · R. Oropeza-Navarro² · Francisco J. Basurto-Alcantara³ ·
A. Castaneda-Ramírez⁴ · Antonio Verdugo-Rodríguez¹

Arch Microbiol (2017) 199:971–978
DOI 10.1007/s00203-017-1360-7
ORIGINAL PAPER

La proteína Omp31 juega un papel importante sobre las propiedades de la membrana externa y en la sobrevivencia intracelular de *Brucella melitensis* en macrófagos murinos y células HeLa.

Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells

L. Verdiguél-Fernández¹ · R. Oropeza-Navarro² · Francisco J. Basurto-Alcántara³ · A. Castañeda-Ramírez⁴ · Antonio Verdugo-Rodríguez¹

Received: 27 September 2016 / Revised: 21 February 2017 / Accepted: 7 March 2017 / Published online: 5 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Brucellosis is an infectious disease that affects practically all species of mammals, including human, and is a major zoonosis worldwide. *Brucella* spp. are facultative intracellular pathogens that have the ability to survive and multiply in phagocytic and nonphagocytic cells such as trophoblast and epithelial cells. Among the six recognized species of the genus *Brucella*, *Brucella melitensis* is the main etiological agent involved in goat brucellosis and is also the most pathogenic for human. It causes significant losses in livestock production as a result of abortions, metritis, infertility, and birth of weak animals. Outer membrane proteins (OMPs) are exposed on the bacterial surface and are in contact with cells and effectors of the host immune response, whereby they could be important virulence factors of *Brucella* species. To evaluate this hypothesis, the gene encoding for the major outer membrane protein Omp31 was amplified, cloned into pUC18

plasmid, and inactivated by inserting a kanamycin cassette, rendering pLVM31 plasmid which was transformed into *B. melitensis* wild-type strain to obtain LVM31 mutant strain. The Outer membrane (OM) properties of the mutant strain were compared with *B. melitensis* Bm133 wild-type and *B. melitensis* Rev1 vaccine strains, in assessing its susceptibility to polymyxin B, sodium deoxycholate, and nonimmune serum. The mutant strain was assessed *in vitro* with survival assays in murine macrophages J774.A1 and HeLa cells. Our results demonstrate that LVM31 mutant is more susceptible to polymyxin B, sodium deoxycholate, and nonimmune serum than control strains; moreover, Omp31 mutation caused a decrease in the internalization and a significant decrease in the intracellular survival compared with the reference strains in both cell lines. These results allow us to conclude that Omp31 is important for maintaining OM integrity, but also it is necessary for bacterial internalization, establishment and development of an optimal replication niche, and essential for survival and intracellular multiplication.

Communicated by Erko Stackebrandt.

✉ Antonio Verdugo-Rodríguez
antoverduro@hotmail.com

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, colonia UNAM CU, Coyoacán C.P 04510, CdMx, Mexico

² Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³ Laboratorio de Vacunología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, CdMx, Mexico

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Mexico

Keywords *Brucella melitensis* · Omp31 · Intracellular replication

Introduction

Microorganisms belonging to the genus *Brucella* are Gram-negative, facultative intracellular bacteria causing infections in many animal species and humans (Boschirolí et al. 2001). Ten species, classified on the basis of differences in pathogenicity and host preference, are recognized within the genus *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microi*, and *B. inopinata* (Moreno et al. 2002; Scholz et al.

2010). *Brucella melitensis*, besides its important zoonotic aspect, is the most relevant etiologic agent of ovine and caprine brucellosis, a disease that causes abortion in ewes and goats resulting in huge economic losses, particularly in Mediterranean countries (Blasco 1997). Vaccination is the most suitable way to control both infections in sheep in endemic situations. The live attenuated *B. melitensis* Rev.1 strain is considered the best vaccine available for the prophylaxis of brucellosis in sheep and goats (Garin-Bastuji et al. 1997). However, this vaccine may cause abortion if used in animals in late pregnancy and its use is known to induce antibody responses indistinguishable by the current conventional serological tests from those observed in *B. melitensis* infected animals, this fact limits the extended use of Rev.1 in countries applying eradication programs based on serological testing and slaughtering of seropositive animals (de Bagüés et al. 1992; Schurig et al. 2002). Finally, this vaccine strain is fully virulent for humans and many accidental injection infections have been documented. To solve these problems, several strategies have been used to improve current vaccines. For safety improvement, the deletion of virulence-related genes, reduced-dose vaccination, and vaccination via the oral and conjunctival routes have widely been used (Barrio et al. 2009; Wang and Wu 2013; Yang et al. 2013). Outer membrane proteins (OMPs) are exposed on the bacterial surface and are in direct contact with cells effectors of the host immune response, whereby they could be important virulence factors of *Brucella* species (Martín-Martín et al. 2011). The *Brucella* spp. Omp25/Omp31 family is formed by seven homologous OMPs (Salhi et al. 2003). Regarding virulence, mutant strains of *B. melitensis*, *B. abortus*, and *B. ovis* by *omp25* inactivation have been found to be attenuated in mice, goats (*B. melitensis*) (Edmonds et al. 2002a, b), and cattle (*B. abortus*) (Edmonds et al. 2001, 2002). In addition, Omp25

has been shown to inhibit the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by human macrophages (Jubier-Maurin et al. 2001) and to be involved in the permeability of *Brucella* membrane, allowing for secretion of periplasmic proteins, in acidic medium (Boigegrain et al. 2004). Several reports showed that the inactivation of the genes coding for the five OMPs of this family in virulent *B. ovis* PA, and demonstrated that the absence of Omp25d or Omp22 proteins leads to a striking decrease on virulence of *B. ovis* PA in mice (Caro-Hernández et al. 2007; Vizcaíno et al. 2004). Furthermore, it was demonstrated that Omp25d and Omp22 are essential for invasion and survival of *B. ovis* inside host cells, justifying the strong attenuation of the $\Delta omp25d$ and $\Delta omp22$ mutants. In contrast, little is known about the role of the Omp31 on virulence in smooth strains (Martín-Martín et al. 2008). The aim of this work was to generate an *omp31* mutant of *B. melitensis* Bm 133 strain and evaluate its effect on OM properties and intracellular survival of bacteria in murine macrophages J774.A1 and HeLa cells.

Materials and methods

Bacterial strains, growth conditions, and cloning vectors

The strains used in this work are listed in Table 1. *Brucella* strains were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 72 h. They were typically propagated in *Brucella* broth (BB; Difco Laboratories, Detroit, MI) or *Brucella* agar (BA; Difco Laboratories), both supplemented with 0.3% yeast extract (YE; Difco Laboratories) and 5% fetal bovine serum (FBS; GIBCO-BRL Life Technologies, Germany) (BB-YE-FBS and BA-YE-FBS).

Table 1 Bacterial strains and plasmids

	Relevant genotype	Relevant characteristic	Origin
Bacterial strain			
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	$\Delta lacZ$ M15, <i>endA1</i> and <i>recA1</i> mutations	This strain of <i>E. coli</i> is not pathogenic, and was developed for laboratory cloning use	LMM
<i>Brucella melitensis</i> biotype 1 Bm133	Mexican reference strain (wild-type)	Smooth virulent <i>Brucella</i> strain	LMM
<i>Brucella melitensis</i> LVM31	<i>omp31::Kan^r</i>	<i>Brucella melitensis</i> with a Kanamycin resistance cassette inserted into the <i>SaI</i> site of <i>omp31</i>	This work
Plasmids			
pLV	Amp ^r Kan ^r	<i>Brucella melitensis omp31</i> gene cloned into pCR2.1 TOPO vector	This work
pLVM	Amp ^r	<i>Brucella melitensis omp31</i> gene inserted into the <i>HindIII-XbaI</i> sites of pUC18	This work
pLVM31	<i>omp31::Kan^r</i>	pLVM with a Kanamycin resistance cassette inserted into the <i>SaI</i> site of <i>omp31</i>	This work

LMM Molecular Microbiology Laboratory, Immunology and Microbiology Department, FMVZ-UNAM

Plasmids pCR2.1 TOPO (Invitrogen, USA), pUC4K, and pUC18 were used as cloning vectors. pUC18 does not replicate in *Brucella* spp., so it works as a suicide plasmid required for homologous recombination. Plasmids were propagated in *Escherichia coli* DH5 α . Recombinant *E. coli* cells were grown in Luria–Bertani (LB; Difco Laboratories) medium supplemented with 50 μ g/ml of the required antibiotic(s) depending on plasmid resistance. *Brucella* and *E. coli* strains were provided by LMM (Molecular Microbiology Laboratory, Immunology and Microbiology Department, FMVZ-UNAM, Mexico).

Primers and DNA techniques

Chromosomal DNA of *Brucella melitensis* Bml33 was obtained by the guanidine thiocyanate method, as directed by the protocol described by Sambrook and Russell 2001. Prior to DNA extraction, biomass of bacteria was suspended in 5 ml of sterile distilled water and incubated in a water bath at 80 °C for 45 min for inactivation.

The *omp31* nucleotide sequence was retrieved from the genome sequence of *B. melitensis* reference strain 16 M (GenBank accession no. JF918757.1). Primers were designed to amplify the entire *omp31* gene (723 bp). The primers were *omp31*Fw (forward primer 5'ATGAAATCC GTAATTTTGGCG 3') and *omp31*Rv (reverse primer 5'TTAGAACTTGTAGTTCAGACC 3'). Primers were purchased from Sigma Genosys (United States). PCR was performed on extracted DNAs as follows: 35 cycles of PCR, with 1 cycle consisting of 1 min at 95 °C for DNA denaturation, 1 min at 50 °C for DNA annealing, and 1 min at 72 °C for polymerase-mediated primer extension. The last cycle included incubation of the sample at 72 °C for 5 min. Five microliters of the amplified product were analyzed

by electrophoresis in 1.5% agarose gels in TAE buffer (20-mM Tris base, acetate acid, 2-mM EDTA [pH 8.0]) (Sigma–Aldrich).

Inactivation of *omp31* gene in *B. melitensis* Bm 133 by homologous recombination

Construction of recombinant pLV plasmid was carried out using the amplification product of *omp31* and cloned into plasmid pCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA). The ligation mixture was transformed into electrocompetent *E. coli* DH5 α cells, plated on LB agar with kanamycin (100 μ g/ml), and incubated at 37 °C overnight. Subsequently, plasmid extraction was performed. pLV plasmid was digested with *Hind* III (Thermo-SCIENTIFIC) and *Xba* I (Thermo-SCIENTIFIC) enzymes and *omp31* was subcloned into pUC18 plasmid previously digested with both enzymes, rendering pLVM. The pLVM plasmid was digested with *Sal*I (Thermo-SCIENTIFIC) and *omp31* inactivation was performed by inserting a kanamycin resistance cassette obtained from pUC4K to render pLVM31. This plasmid was transformed by electroporation into the *B. melitensis* strain, obtaining the mutant strain *B. melitensis* LVM31 (Fig. 1).

Growth kinetics of bacterial strains

To determine *B. melitensis* 133 biovar 1, *Brucella melitensis* Rev1, and *Brucella melitensis* LVM31 growth rates, five colonies of fresh cultures were taken and inoculated into a tube with 5 ml of *Brucella* broth, which were incubated at 37 °C to 150 rpm for 22 h. Thus, a 1/50 dilution of each culture in 200 ml of *Brucella* broth was made and cultures were incubated at 37 °C at 150 rpm for 120 h. To determine

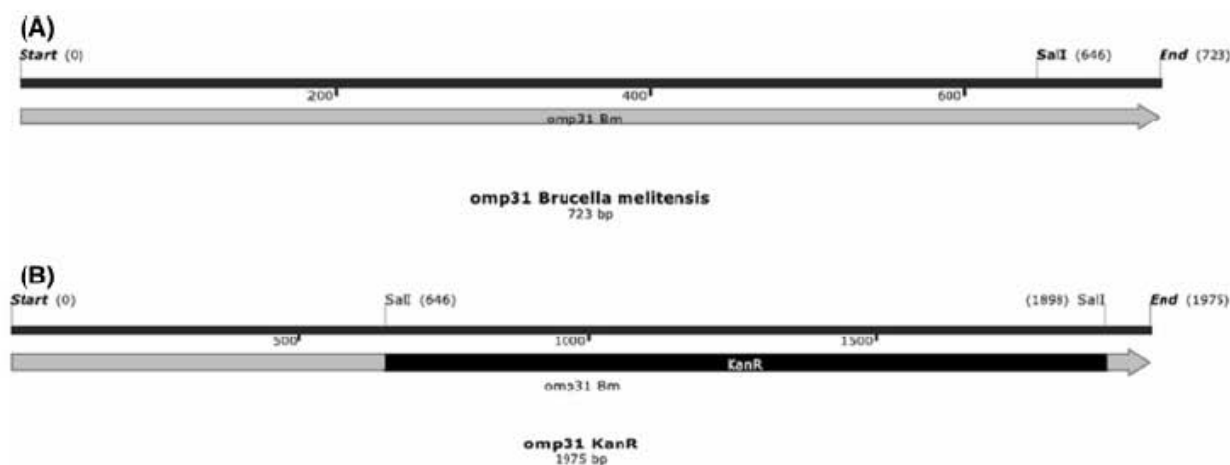


Fig. 1 Schematic view of the gene inactivation performed in *B. melitensis* 133. **a** Fragment of 723 bp of the *omp31*. **b** Inactivation by inserting a kanamycin cassette into the *Sal*I restriction site of *omp31*

the number of CFU, absorbance was measured at 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72, 96, and 120 h of culture and 20 ml of a 10^{-6} dilution were plated in triplicate on Brucella agar with or without antibiotic to count colony-forming units (CFUs).

Susceptibility assays

To evaluate the susceptibility of *Brucella* strains to polymyxin B (Sigma–Aldrich) and sodium deoxycholate (Sigma–Aldrich), bacterial suspensions containing 1×10^5 CFU/ml were prepared, and 1 ml of them was mixed in wells of a 24-well sterile plate with 1 ml of 2-mg/ml polymyxin B or 0.2-mg/ml sodium deoxycholate (final concentrations in the wells, 1 and 0.1 mg/ml, respectively). After a 2-h incubation at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, the content of each well was mixed, and 50 µl were spread by triplicate on BA-YE-FBS plates supplemented with antibiotic(s) when required. The CFU obtained after each treatment were counted, and the percentages of survival were established with respect to a control culture of bacteria incubated in PBS (100% survival) (De Tejada et al. 1995). To determine the susceptibility to nonimmune serum, 5 ml of serum was obtained from a specific free pathogens (SPF) goat. Half of the serum was heated at 56 °C for 30 min to remove complement (control serum) and the other half was used fresh. Briefly, 1 ml of bacterial suspensions with approximately 1×10^5 CFU/ml in PBS were mixed in wells of a 24-well sterile plate with 200 µl of either fresh serum or heated serum. After a 4-h incubation at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, the content of each well was gently mixed by pipetting and 50 µl of each bacterial suspension were spread in triplicate on BA-YE-SFB plates supplemented with antibiotic(s) when required. The CFU obtained after exposure to fresh serum were counted, and the percentages of survival were established with respect to the CFU obtained with the heated serum (100% survival) (Corbeil et al. 1988).

Cell culture and infection of HeLa and J774.A1 cells

Prior to infection, cell suspensions were prepared in the basal medium Dulbecco's Modified Eagle [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)] (Gibco-BRL), supplemented with fetal bovine serum (FBS); 5% (v/v) for HeLa cells and 10% (v/v) for murine macrophages, and with 4-mM L-glutamine (complete DMEM medium) at a concentration of 1×10^5 cells/ml. Subsequently, cells were distributed in 24-well culture plates (1 ml/well) and incubated for 18 h in the case of HeLa cells, and 24 h for macrophages J774.A1. To perform infection assays, *Brucella melitensis* Bm133 and *Brucella melitensis* LVM31 were grown on *Brucella* agar plates (supplemented or not with

antibiotic as required) for 48 h, and thus, five colonies were grown in 5 ml of *Brucella* broth, at 37 °C, 150 rpm for 22 h. A 1/50 dilution of each culture in 200 ml of *Brucella* broth was performed, with incubation at 37 °C, 150 rpm for 26 h. From this culture, serial dilutions 1/2 to 1/10 of the bacteria in *Brucella* broth were made for a multiplicity of infection (MOI) of 100:1 for murine macrophages and 300:1 for HeLa cells.

Statistical analysis

Analyses were performed using the commercial package for statistical analysis R[®], using the Chi-square method with a normal distribution of data by time, achieving greater significance of 99% ($P < 0.01$). Statistical analysis took into account the absolute UFC values obtained in survival tests to determine whether the observed variation in the number of CFU is attributed to the dependent variable; for purposes of our studies, it was the intracellular survival of *B. melitensis* LVM31 mutant strain in HeLa cells and murine macrophages.

Results

Amplification and inactivation of the gene encoding Omp31 in *B. melitensis* Bm 133 by homologous recombination

The *omp31* gene was amplified and interrupted as described in methodology. Thus, to obtain the mutant strain, the pLVM31 plasmid was transformed in *B. melitensis*. Bacteria were spread on Brucella agar plates supplemented with 5% FBS, 3% YE, and 50 µg of kanamycin, which were incubated at 37 °C for 48 h. Kanamycin-resistant and ampicillin sensitive transformants were selected. DNA extraction was performed to verify, by PCR, the integration of the inactivated *omp31* gene by homologous recombination into the genome of the wild strain (Fig. 2).

Growth rate of *Brucella* strains

To determine the effect of interrupt *omp31* on the growth rate, growth kinetics using control and mutant strains were performed and CFU/ml were determined by the method of Miles and Misra at different times during 120 h (Slack and Wheldon 1978). A significant decrease ($P < 0.01$) in the growth rate of the mutant strain *B. melitensis* LVM31 was observed at 4, 12, 16, 24, 48, 72, 96, and 120 h as compared to the field *B. melitensis* 133 and *B. melitensis* Rev1 vaccine strains (Fig. 3).

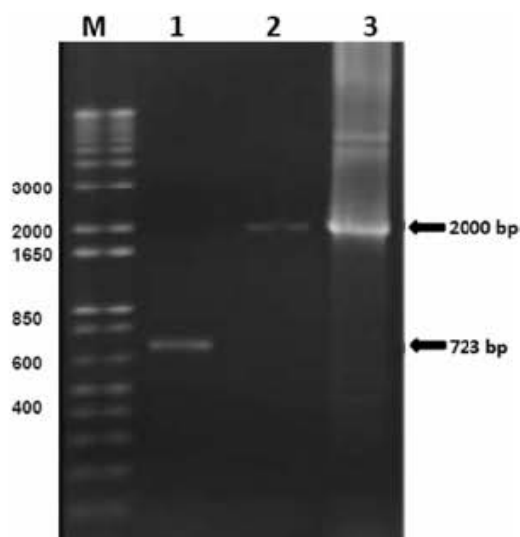


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *omp31* gene fragments from *Brucella* prototype strains. Lane M 1 kb “ladder” plus. Lane 1 amplified *omp31* fragment (723 bp) from *B. melitensis* Bm133 strain (Wild-Type). Lane 2 amplified *omp31* fragment (2000 bp) from *B. melitensis* LVM31 (mutant strain). Lane 3 amplified *omp31* fragment (2000 bp) from pLVM31 plasmid

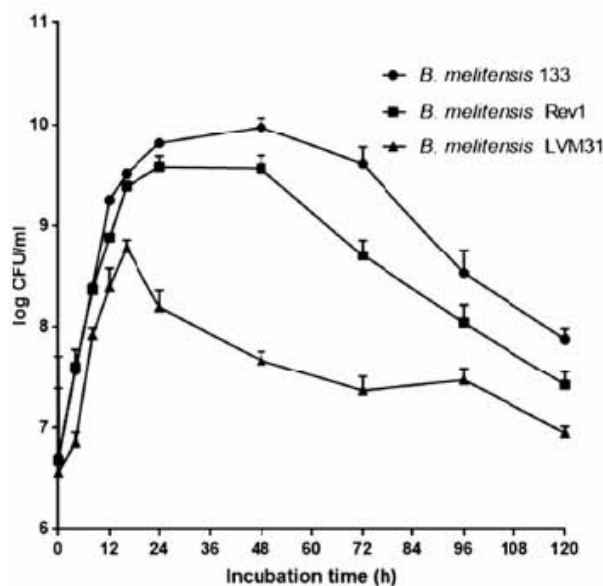


Fig. 3 Growth kinetics of *B. melitensis* 133, *B. melitensis* Rev1, and *B. melitensis* LVM31. The results are expressed as the means \pm SD ($n=3$) of the log CFU/well at each time point

Role of the Omp31 on the OM properties of *Brucella melitensis*

To indirectly evaluate the OM integrity of the *B. melitensis* strains under study, the susceptibility of them to polymyxin

B (1 mg/ml), sodium deoxycholate (0.1 mg/ml), and serum was determined. A 100% survival for each strain was assessed, as described in “Materials and methods” section. A statistically significant decrease ($P<0.001$) in mutant survival exposed to polymyxin B and sodium deoxycholate (42.32 and 50.71% respectively) compared with both *B. melitensis* Bm133 (77.15 and 86.52 respectively) and *B. melitensis* Rev1 (68.57 and 74.28% respectively) strains was observed. In contrast, LVM31 mutant strain was only more susceptible ($P<0.01$) (59.53%) to serum than *B. melitensis* Bm133 strain (70.59%) (Fig. 4). Therefore, Omp31 could be involved in maintaining outer membrane integrity and bacterial virulence.

Role of the Omp31 protein in intracellular survival of *Brucella melitensis*

To determine the effect of *omp31* mutation, the intracellular survival of *B. melitensis* 133 and *B. melitensis* LVM31 strains in HeLa cells and murine macrophages was evaluated. The number of viable bacteria in the assay was determined at 0-, 4-, 8-, 12-, 24-, 48-, and 72-h postinfection. The number of CFU for *B. melitensis* LVM31 mutant strain invading the macrophage and HeLa cells (time zero) was lower statistically significant ($P<0.001$) (1.5×10^3 and 4.1×10^3 CFU/ml respectively) as compared with *B. melitensis* 133 strain (3.8×10^4 and 5.4×10^4 CFU/ml respectively). Intracellular survival of *B. melitensis* LVM31 was lower statistically significant ($P<0.001$) in both HeLa cells and murine macrophages at any sampling time as compared with *B. melitensis* Bm133 wild-type strain (Fig. 5).

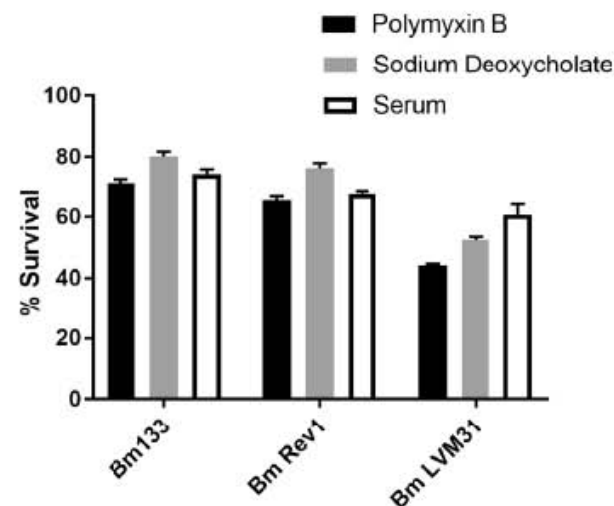


Fig. 4 Susceptibility to polymyxin B, sodium deoxycholate, and non-immune serum of *B. melitensis* Bm133, *B. melitensis* Rev1, and *B. melitensis* LVM31

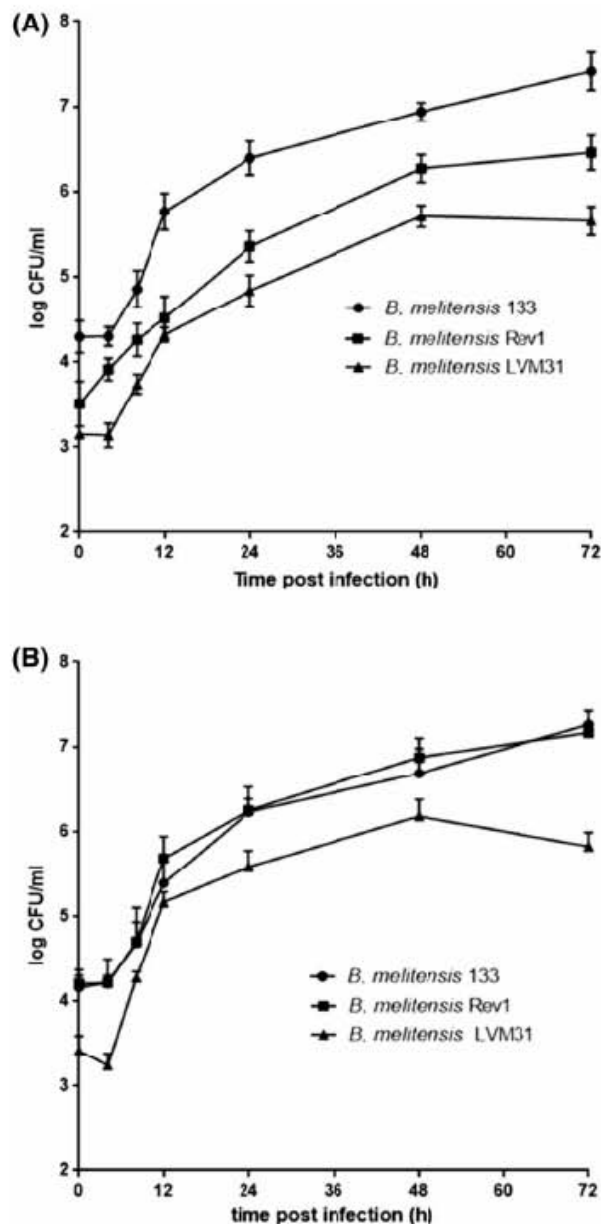


Fig. 5 Evaluation of the intracellular survival in murine macrophages (a) and HeLa cells (b) of wild-type *B. melitensis* Bm133 and the mutant strain *B. melitensis* LVM31. Results are expressed as means \pm SD of the log CFU/ml; the sampling at different times was made by triplicate

Discussion

The resistance of *Brucella* spp. to oxygen-independent mechanisms has not been explained on a structural basis. Oxygen-independent mechanisms include the synergistic actions of several cationic proteins and peptides which, in a first step, bind to OM anionic targets and render the cell envelope permeable and susceptible to lytic enzymes,

thereby blocking cell functions that depend on membrane integrity (Groisman 1994; Lehrer et al. 1993). The previous studies have shown that *Brucella* envelope has permeability properties and sensitivities to anionic detergents (de Tejada and Moriyon 1993) that are different from those common to Gram-negative bacteria, and on this basis, it has been suggested a relationship between *Brucella* OM properties and its pathogenicity. In this work, *B. melitensis* LVM31 mutant strain was studied for its resistance to polymyxin B, sodium deoxycholate, and nonimmune serum compared to control strains. Polymyxin B and sodium deoxycholate were used to determine OM stability and also as an indicator of *B. melitensis* LVM31 mutant susceptibility to the bactericidal effect mediated by cationic peptides in the host. In this case, *B. melitensis* LVM31 mutant was more susceptible to polymyxin B and sodium deoxycholate ($P < 0.001$) as compared with wild-type and vaccine strains. *Brucella* spp. are also at least partially resistant to killing mediated by the action of host nonimmune serum (Corbeil et al. 1988; Eisenschenk et al. 1999; Estein et al. 2004), which may contribute to virulence. Thus, *B. melitensis* LVM31 mutant survival was evaluated in the presence of nonimmune goat serum. Our results showed that mutant strain is more susceptible to serum action as compared with the wild-type strain ($P < 0.01$). These results suggest that Omp31 might be involved in maintaining the integrity of *B. melitensis* OM. As mentioned, *Brucella* is a facultative intracellular bacterium. Importantly, smooth *Brucella* species are able to enter, survive, and multiply in professional phagocytic cells as macrophages and dendritic cells as well as in non-phagocytic cells such as trophoblastic cells and epithelial cells (HeLa cells) (Billard et al. 2007; Pizarro-Cerdá et al. 2000). Accordingly, we set out to determine the effect of mutate *omp31* in *B. melitensis* by evaluating internalization and intracellular survival of the mutant strain in HeLa cells and murine macrophages. Our results indicated that *omp31* mutation caused a significant decrease in *Brucella* intracellular survival, both in murine macrophages and HeLa cells. These results differ from those obtained in other studies (Martín-Martín et al. 2008), where different mutant strains of *B. ovis* PA on genes belonging to the *omp25/omp31* family were evaluated. On that instance, only the absence of Omp25d or Omp22 severely affected bacterial intracellular replication. Thus, while $\Delta omp25d$ mutant strain was able to survive in macrophages, $\Delta omp22$ mutant strain was completely eliminated at 24-h postinfection. Therefore, these contradictory results could be explained considering that the O chains in S-LPS mask other surface antigens such as outer membrane proteins (OMPs), preventing both a specific immune response against them and antibodies accessibility (Bowden et al. 1995; Cloeckaert et al. 1991). Conversely, rough strains of *Brucella*, such as *B. ovis* and *B. canis*, do not have this problem, since they lack

of O-polysaccharide, and thus, OMPs are exposed on the bacterial surface (Bowden et al. 2000; Vizcaíno et al. 2004; Vizcaíno et al. 2001). Based on these results it is necessary to evaluate the role of the OMP25/31 family in *B. melitensis* to clarify differences between smooth and rough phase species of *Brucella*.

Achieving a replication niche in macrophages, the main host cells for this pathogen, provides protection to complement and antibodies action, allowing for dissemination into the host, and to remain for longer periods of time in the organism, resulting in subsequent chronic infection. This ability of *Brucella* smooth phase strains involves a complex process in which this pathogen interferes with host cell functions even to control their own intracellular trafficking. Thus, when a smooth *Brucella* strain is phagocytized by the macrophage, it starts an endocytic pathway in which prevents hydrolytic degradation by fusion with lysosomes, favoring in early stages of infection and intracellular survival (Celli 2006). *Brucella* virulence is associated with survival in phagocytic cells. The results obtained in this study highlight a relationship between a decrease in intracellular survival and replication of *B. melitensis* LVM31 mutant strain in both murine macrophages in HeLa cells and the absence of Omp31. Therefore, Omp31 is involved on maintaining outer membrane integrity, but also could be relevant to virulence of *B. melitensis* 133 by exerting important roles in intracellular survival and multiplication, although studies must be done in mice to test this hypothesis.

Acknowledgements This work was supported by PAPIIT IN212610, PAPIIT IN-221513, and PAPIIT IN-222516, UNAM. The authors acknowledge Beatriz Arellano for her technical support and Mrs. Francisca Muñoz for her administrative support.

References

- Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, Jacques I, González D, de Miguel MJ, Gorvel J-P (2009) Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine* 27(11):1741–1749
- Billard E, Dornand J, Gross A (2007) *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun* 75(10):4980–4989
- Blasco JM (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 31(3):275–283
- Boigegrain R-A, Salhi I, Alvarez-Martinez, M-T, Machold J, Fedon Y, Arpagaus M, Rouot B (2004) Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun* 72(10):5693–5703
- Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4(1):58–64
- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G (1995) Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* 63(10):3945–3952
- Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckaert A (2000) Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2(5):481–488
- Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel M-J, Martín-Martín AI, Cloeckaert A, Grilló M-J, Vizcaíno N (2007) Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* 75(8):4050–4061
- Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 157(2):93–98
- Cloeckaert A, Jacques I, Bosseray N, Limet JN, Bowden R, Dubray G, Plommet M (1991) Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *J Med Microbiol* 34(3):175–180
- Corbeil LB, Blau K, Inzana TJ, Nielsen KH, Jacobson RH, Corbeil RR, Winter AJ (1988) Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 56(12):3251–3261
- de Tejada MG, Moriyon I (1993) The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol* 175(16):5273–5275
- de Bagiés MP, Marin CM, Blasco JM, Moriyon I, Gamazo C (1992) An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination. *Vet Microbiol* 30(2):233–241
- De Tejada MG, Pizarro Cerda J, Moreno E, Moriyon I (1995) The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* 63(8):3054–3061
- Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH (2001) Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62(9):1461–1466
- Edmonds MD, Cloeckaert A, Elzer PH (2002a) *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 88(3):205–221
- Edmonds MD, Cloeckaert A, Hagius SD, Samartino LE, Fulton WT (2002b) Pathogenicity and 21 protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion 22 mutant. *Res Vet Sci* 72:235–239
- Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM (1999) Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68(3):235–244
- Estein SM, Cheves PC, Fiorentino MA, Cassataro J, Paolicchi FA, Bowden RA (2004) Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet Microbiol* 102(3):203–213
- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger JM (1997) *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet Res* 29(3–4):255–274
- Groisman EA (1994) How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol* 2(11):444–449
- Jubier-Maurin V, Boigegrain R-A, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martinez M-T, Terraza A, Dornand J (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* 69(8):4823–4830
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11(1):105–128

- Martín-Martín AI, Caro-Hernández P, Orduña A, Vizcaíno N, Fernández-Lago L (2008) Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect* 10(5):706–710
- Martín-Martín AI, Sancho P, Tejedor C, Fernández-Lago L, Vizcaíno N (2011) Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet J* 189(1):103–105
- Moreno E, Cloeckeaert A, Moriyón I (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90(1):209–227
- Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Gorvel J-P (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* 2(7):829–835
- Salhi I, Boigegrain R-A, Machold J, Weise C, Cloeckeaert A, Rouot B (2003) Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun* 71(8):4326–4332
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Maquart M (2010) *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(4):801–808
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ (2002) Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90(1):479–496
- Slack MP, Wheldon DB (1978) A simple and safe volumetric alternative to the method of Miles, Misra and Irwin for counting viable bacteria. *J Med Microbiol* 11(4):541–545
- Vizcaíno N, Kittelberger R, Cloeckeaert A, Marín CM, Fernández-Lago L (2001) Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* Species. *Infect Immun* 69(11):7020–7028
- Vizcaíno N, Caro-Hernández P, Cloeckeaert A, Fernández-Lago L (2004) DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* 6(9):821–834
- Wang Z, Wu Q (2013) Research progress in live attenuated *Brucella* vaccine development. *Curr Pharm Biotechnol* 14(10):887–896
- Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW (2013) Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol* 8(1):60–77

11. Anexo 2. Manuscrito en preparación

Evaluación de la virulencia y de la protección conferida en ratones Balb/c inoculados con la cepa mutante LVM31 de *Brucella melitensis*

Resumen

Brucella melitensis es la especie más virulenta dentro del género *Brucella* para los seres humanos, y es el principal agente causal de la brucelosis en cabras, ocasionando pérdidas significativas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes se utiliza la vacuna viva atenuada de *B. melitensis* cepa Rev1, la cual es considerada la mejor vacuna contra la enfermedad en pequeños rumiantes, sin embargo puede ocasionar abortos, artritis o la presentación de la enfermedad en los animales además de que es virulenta para el humano. Con base en estos aspectos es fundamental identificar proteínas asociadas a la virulencia de la bacteria para generar un candidato vacunal. Las PMEs mayoritarias de la familia Omp25/31 han sido objeto de estudio ya que estas proteínas contribuyen de forma relevante al mantenimiento de la integridad de la membrana externa pero su implicación en la virulencia de las distintas especies de este género no está claramente descrita. En trabajos previos demostramos que la ausencia de la proteína Omp31 altero la propiedades de la ME y disminuyó la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos murinos y células HeLA. Debido a estos resultados nos planteamos el objetivo de estudiar el papel en la virulencia de dicha proteína mediante la determinación de la virulencia residual y detección de lesiones en bazo y testículos de ratones inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 además de evaluar la protección conferida en ratones inmunizados con la cepa mutante frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133. Nuestros resultados demostraron que la mutación de *omp31* provocó una disminución en la colonización esplénica sin generar lesiones o cambios histopatológicos aparentes en ambos órganos en comparación con las cepas control y que la cepa mutante confirió una protección similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133. Estos resultados nos permiten concluir que Omp31 juega un rol importante en la implicación de la virulencia de *B. melitensis* en el modelo murino y debido a la atenuación de la cepa podría ser un potencial candidato vacunal contra brucelosis caprina.

Abstract

Brucella melitensis is the most virulent species within the genus *Brucella* for humans, and is the main causal agent of brucellosis in goats, causing significant losses in livestock production because it causes abortions, metritis, infertility and the birth of weak animals. For the control of brucellosis in small ruminants live attenuated of *B. melitensis* Rev1 vaccine strain is used, which is considered the best vaccine against the disease in small ruminants, however it can cause abortions, arthritis or the presentation of the disease in the animals besides that it is virulent for the human. Based on these aspects, it is essential to identify proteins associated with the virulence of the bacteria to generate a vaccine candidate. The majority PME of the Omp25 / 31 family have been studied since these proteins contribute in a relevant way to the maintenance of the integrity of the outer membrane but its implication in the virulence of the different species of this genus is not clearly described. In previous studies, we demonstrated that the absence of the Omp31 protein altered the outer membrane properties and decreased the intracellular survival of *B. melitensis* in murine macrophages and HeLA cells. Due to these results we set ourselves the objective of studying the role in the virulence of this protein by determining the residual virulence and detection of lesions in spleen and testis of mice inoculated with the *B. melitensis* LVM31 mutant strain in addition to evaluating the conferred protection in mice immunized with the mutant strain against challenge with the *B. melitensis* Bm133 virulent strain. Our results showed that the mutation of omp31 caused a decrease in splenic colonization without generating lesions or histopathological changes apparent in both organs in comparison with the control strains and that the mutant strain conferred a similar protection to the *B. melitensis* Rev1 vaccine strain against the challenge with *B. melitensis* Bm133 virulent strain. These results allow us to conclude that Omp31 plays an important role on the virulence of *B. melitensis* in the murine model and due to the attenuation of the strain could be a potential vaccine candidate against goat brucellosis.

11.1 Introducción

Los microorganismos del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos que infectan una gran variedad de mamíferos, produciendo aborto epizoótico en animales y una enfermedad febril septicémica en el hombre denominada brucelosis también fiebre de Malta o fiebre ondulante, una de las zoonosis de mayor distribución e importancia mundial.(2) Actualmente se han reconocido diez especies del género *Brucella* de las cuales *B. melitensis* es la especie más aislada y patógena en el humano y es el agente etiológico de la brucelosis caprina la cual ocasiona fuertes pérdidas económicas ya que provoca infertilidad en machos, abortos, mastitis, artritis en los animales.(68) Por lo tanto la vacunación tiene que ser considerada la herramienta fundamental para bloquear la diseminación de la brucelosis entre los animales. La vacuna Rev1 es considerada la mejor cepa para el control y prevención de la brucelosis caprina y ovina, sin embargo su aplicación presenta efectos adversos ya que puede ocasionar abortos y hembras que están en lactación pueden secretar la cepa vacunal por la leche, infectando a las crías, interfiere con el diagnóstico serológico además de que es virulenta para el humano.(13, 14, 69)

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Brucella spp.*, las cuales son bacilos cortos, Gram negativos, inmóviles, no esporulados, sin cápsula por lo que estos patógenos no poseen factores de virulencia clásicos como otras bacterias. Con base en estos hallazgos varios estudios han conducido a que muchos de los aspectos de la virulencia de *Brucella* se hayan relacionado con las características de su membrana externa (ME). La ME de *Brucella* posee propiedades particulares demostradas por ser resistentes a la acción de péptidos catiónicos (lisozima, lactoferrina, defensinas o catelicidinas), detergentes, EDTA, suero no inmune y compuestos catiónicos.(15, 43, 56) Los principales componentes de la ME de *Brucella* es el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de membrana externa (PME). Las PME se encuentran expuestas en la superficie de la bacteria y entran en contacto directo con las células y los efectores de la respuesta inmune del organismo hospedador.(38) Por tanto, su estudio dentro de este campo es de gran interés, ya que puede proporcionar un conocimiento más amplio sobre los

mecanismos de interacción huésped-parásito empleados por este género, que podría además, permitir el desarrollo de nuevas vacunas atenuadas mejores a las existentes.(28, 70) En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PME de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella*.(51) En cuanto a la proteína mayoritaria que compone esta familia de PMEs, Omp31, diversos estudios han mostrado que la proteína muestra alrededor de un 32 % de identidad con HbpA, la cual pertenece a la familia de proteína fijadoras de hemina Hbp de *Bartonella quintana*.(40) Debido a esto, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha comprobado que la proteína Omp31 de *B. suis* posee una cierta capacidad para unir hemina, y que la expresión del gen que la codifica, se induce cuando la bacteria se cultiva en condiciones con limitación de hierro. (35). Además se sabe que Omp31 no es necesaria para la virulencia de *B. abortus*, ya que en esta especie no está presente el gen que la codifica debido a una delección en su genoma.(33) Asimismo, se ha demostrado que tampoco afecta a la virulencia de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 en ratón (42), aunque cabe destacar que dicha cepa presenta niveles de la proteína Omp31 inferiores a los observados en la cepa parental de la que procede, por lo que no puede descartarse que este hecho esté relacionado con la atenuación de esta cepa.(45) Por otro lado, otros estudios demostraron, que la ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, a pesar de que reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón, no disminuye su persistencia en bazo. (43)

En nuestro grupo de trabajo demostramos que la mutación de la PME Omp31 alteró las propiedades de la membrana externa de *B. melitensis* y provocó una disminución significativa en la internación, en la sobrevivencia y replicación intracelular de la bacteria en macrófagos murinos J774.A1 y en células HeLa (46), por lo que Omp31 podría desempeñar un papel relevante en la virulencia de la bacteria. Para comprobar dicha hipótesis nos planteamos el objetivo de determinar el efecto de la mutación de *omp31* en la virulencia de la bacteria en un modelo murino.

11.2 Material y métodos

11.2.1 Cepas bacterianas y Condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo están enlistadas en la tabla 1. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en agar *Brucella* suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 3% (p/v) de extracto de levadura (EL) durante 72 h. a 37° C. Previo a su empleo, las cepas fueron caracterizadas a través de pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos del género *Brucella* como Triple azúcar hierro (TSI), citrato, urea, ácido sulfhídrico-indol-motilidad (SIM)), así como tinción de Gram. El manejo de la bacteria se realizó en la Unidad de Bioseguridad 2 del Departamento de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Genotipo relevante	Características relevantes	Origen
<i>Brucella melitensis</i> biotipo 1 Bm133	Cepa de referencia mexicana (wild type)	Cepa lisa virulenta de <i>Brucella</i>	LMM ^a
<i>Brucella melitensis</i> Rev1	Cepa vacunal de referencia	Cepa lisa virulenta de <i>Brucella</i> con resistencia a estreptomomicina	LMM ^a
<i>Brucella melitensis</i> LVM31	<i>omp31::Kan^r</i>	Cepa mutante de <i>Brucella melitensis</i> con resistencia a kanamicina.	Verdiguél et al 2017

^a LMM, Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología e Inmunología, UNAM.

11.2.2 Animales de experimentación y lineamientos éticos

Se requirieron grupos representativos para que se puedan hacer muestreos de sangre y la recolección de órganos a diferentes tiempos con la finalidad de evaluar la virulencia residual y la protección conferida por la cepa mutante en comparación con la cepa vacunal con la finalidad que se pueda realizar el análisis estadístico de los resultados.

Se verificó la salud diaria de los animales, el comportamiento, el mantenimiento del peso constante del animal, signología de alguna enfermedad de tipo infecciosa. En caso de que los animales presenten alguna alteración de los parámetros antes mencionados, se procedió a su sacrificio.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical de acuerdo a la NOM- 062 - ZOO- 1999 y los cadáveres fueron incinerados de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.(71, 72).

Una vez sacrificados los animales se extrajo el bazo en condiciones asépticas. Cada bazo fue homogenizado en bolsas estériles en 0.5ml de PBS, posteriormente se realizaron diluciones decuples seriadas (v/v) y 20 µl de cada homogenizado se sembraron por triplicado y por repetición doble por ratón en placas de agar *Brucella* suplementado. Las placas se incubaron a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta poder realizar el conteo de UFC. Esta metodología se realizó para de determinar la virulencia residual y de la protección conferida en ratones inoculados con las cepas de *Brucella*

11.2.3 Determinación de la virulencia residual y de la protección conferida en ratones inoculados con las cepas de *Brucella*

Grupos de 10 ratones hembras y 10 ratones machos BALB/C de 8 semanas de edad, fueron inoculados intraperitonealmente con aproximadamente 5X10⁵ UFC de la cepa de campo, con la cepa vacunal y con la cepa mutante en 0.2ml de PBS; la cuantificación de las UFC obtenidas del bazo para 2 ratones por cepa fueron determinadas a la semana 3, 6, 9, 12 y 15 pos inoculación para los ratones hembras y la cuantificación de las UFC obtenidas del bazo para 2 ratones por cepa fueron determinadas a la semana 4, 8 y 12 pos inoculación para los ratones machos (Cuadro 1)

Grupo 1	Determinación de la virulencia residual de ratones hembras inoculados con la cepa de campo <i>Brucella melitensis</i> Bm133.
Grupo 2	Determinación de la virulencia residual de ratones hembras inoculados con la cepa vacunal <i>Brucella melitensis</i> Rev1.
Grupo 3	Determinación de la virulencia residual de ratones hembras inoculados con la cepa mutante de <i>B. melitensis</i> LVM31
Grupo 4	Determinación de la virulencia residual de ratones hembras inoculados con 0.2 ml de PBS

Grupo 5	Determinación de la virulencia residual de ratones machos inoculados con la cepa de campo <i>Brucella melitensis</i> Bm133.
Grupo 6	Determinación de la virulencia residual de ratones machos inoculados con la cepa vacunal <i>Brucella melitensis</i> Rev1.
Grupo 7	Determinación de la virulencia residual de ratones machos inoculados con la cepa mutante de <i>B. melitensis</i> LVM31
Grupo 8	Determinación de la virulencia residual de ratones machos inoculados con 0.2 ml de PBS

Cuadro 1. Grupos de ratones (n=10) inoculados con las cepas de *Brucella*.

11.2.4 Evaluación de la protección conferida de ratones inmunizados con la cepa mutante y la cepa vacuna frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133

Grupos de 10 ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad, fueron inmunizados vía subcutánea con 1×10^9 UFC con la cepa mutante y con la cepa vacunal en una suspensión de 0.2ml y un grupo control de 10 ratones no vacunados, fueron inoculados con 0.2ml de PBS. Treinta días pos inmunización los ratones fueron desafiados vía intraperitoneal con 10^8 UFC/ratón de la cepa de campo. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical tres, seis y nueve semanas después pos desafío y se obtuvieron los bazo de los ratones y fueron procesados individualmente para cuantificar las UFC por ratón. (Cuadro 2)

Grupo 1	Determinación de la protección conferida en ratones vacunados con la cepa mutante <i>Brucella melitensis</i> LVM31
Grupo 2	Determinación de la protección conferida en ratones vacunados con la cepa vacunal <i>Brucella melitensis</i> Rev1.
Grupo 3	Determinación de la protección conferida en ratones vacunados con una solución estéril de PBS.

Cuadro 2. Grupos de ratones (n=10) inoculados con las cepas de *Brucella*

11.2.5 Evaluación de la virulencia residual en crías nacidas de hembras inoculadas con las cepas de *Brucella*

Grupos de 3 ratones hembras BALB/c de 10 semanas de edad fueron inoculados intraperitonealmente con una suspensión de 0.2ml (5×10^5 UFC) de la cepa de campo, la cepa vacunal, la cepa mutante y con 0.2ml de PBS. Siete días pos inoculación se introdujo un ratón macho BALB/c en las jaulas correspondientes a cada uno de los grupos. El macho fue retirado hasta el momento que empezaron a parir las hembras para evitar comportamientos de tipo canibalismo. Las crías fueron separadas tres semanas post nacimiento y confinadas en otras jaulas. Las crías fueron sacrificadas a las seis semanas de edad y aleatoriamente se tomaron muestras de bazo de tres ratones por grupo, los bazos fueron procesados como se menciona en la metodología para determinar la colonización esplénica de las crías mediante cuantificación de las UFC. (Cuadro 3)

Grupo 1	Determinación de la virulencia residual de crías de hembras inoculados con la cepa mutante <i>Brucella melitensis</i> LVM31.
Grupo 2	Determinación de la virulencia residual de crías de hembras inoculados con la cepa vacunal <i>Brucella melitensis</i> Rev1.
Grupo 3	Determinación de la virulencia residual de crías de hembras inoculados con la cepa de campo <i>Brucella melitensis</i> Bm133.
Grupo 4	Determinación de la virulencia residual de crías de hembras inoculados con 0.2ml de PBS

Cuadro 3. Crías de hembras gestantes (n=3) inoculadas con las cepas de *Brucella*

11.2.6 Evaluación de lesiones de órganos de ratones BALB/c inoculados con las cepas de *Brucella*

A la semana 15 pos infección, dos ratones fueron sacrificados por grupo de los animales enlistados en el cuadro 1 y en el cuadro 2 para tomar muestras de bazo y de testículos en caso de los machos, las cuales fueron fijadas en formalina al 10% con un pH de 7.2 y se tiñeron con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) para ser observadas en un microscopio fotónico para su revisión e interpretación de lesiones histopatológicas.(73)

11.3 RESULTADOS

11.3.1 Evaluación de la virulencia residual en ratones inoculados con las cepas de *Brucella*.

Con base en los resultados de nuestro equipo de trabajo donde se demostró que la mutación de *omp31* altero las propiedades de la membrana externa y disminuyó la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos murinos y células Hela (resultados del Anexo 1), decidimos evaluar el papel de la proteína Omp31 en la virulencia de la bacteria en un modelo murino. Por lo que ratones BALB/c fueron inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 con la finalidad de evaluar la virulencia residual mediante la determinación de la colonización esplénica en comparación con ratones inoculados con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133 y con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1.

Los resultados de este trabajo demostraron que hay una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.01$) en la colonización esplénica en los ratones hembras inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 en la semana 3, 6, 9, 12 y 15 post infección en comparación con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133, mientras que en comparación con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 hubo una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.01$) en la colonización esplénica en en la semana 9, 12 y 15 post infección. (Fig. 1A)

Cuadro 7. Datos de la cinética de la colonización esplénica de ratones hembras inoculados con las cepas de <i>Brucella</i> .								
Tiempo p.i. (S)	<i>B. melitensis</i> 133		<i>B. melitensis</i> Rev1		<i>B. melitensis</i> LVM31		PBS	
	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar
3	6.5X10 ⁴	0.042	3.6X10 ³	0.021	9.5X10 ²	0.042	-	-
6	4.6 X10 ⁶	0.035	9.4 X10 ⁴	0.07	9.3X10 ³	0.042	-	-
9	8.5 X10 ⁷	0.049	7.2 X10 ⁵	0.035	8.5X10 ²	0.028	-	-
12	8.6 X10 ⁵	0.021	9.6 X10 ³	0.021	9.3 X10 ¹	0.063	-	-
15	1.1 X10 ⁴	0.014	0.85X10 ³	0.021	2.4 X10 ¹	0.021	-	-

En cuanto a los ratones machos, se demostró que hubo una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.01$) en la colonización esplénica en los ratones inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 en la semana 4, 8, y 12 post infección en comparación con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133 y con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1. (Fig. 1b) En ambos ensayos los ratones inoculados con

0.2ml de PBS (control negativo) no hubo crecimiento de colonias en los medios de cultivos.

Cuadro 8. Datos de la cinética de la colonización esplénica de ratones machos inoculados con las cepas de *Brucella*.

Tiempo p.i. (S)	<i>B. melitensis</i> 133		<i>B. melitensis</i> Rev1		<i>B. melitensis</i> LVM31		PBS	
	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar	Media de UFC/ml	Desviación estándar
4	1.7X10 ⁵	0.078	8.9X10 ³	0.028	0.3X10 ³	0.035	-	-
8	1 X10 ⁷	0.042	7.2 X10 ⁵	0.042	9.2X10 ³	0.057	-	-
12	3.9 X10 ⁶	0.049	2.6 X10 ⁴	0.057	3.0X10 ²	0.057	-	-

Con base en estos hallazgos pudimos comprobar la hipótesis planteada en el anexo 1, demostrando que la proteína Omp31 juega un papel importante en la virulencia de *B. melitensis* en el modelo murino.

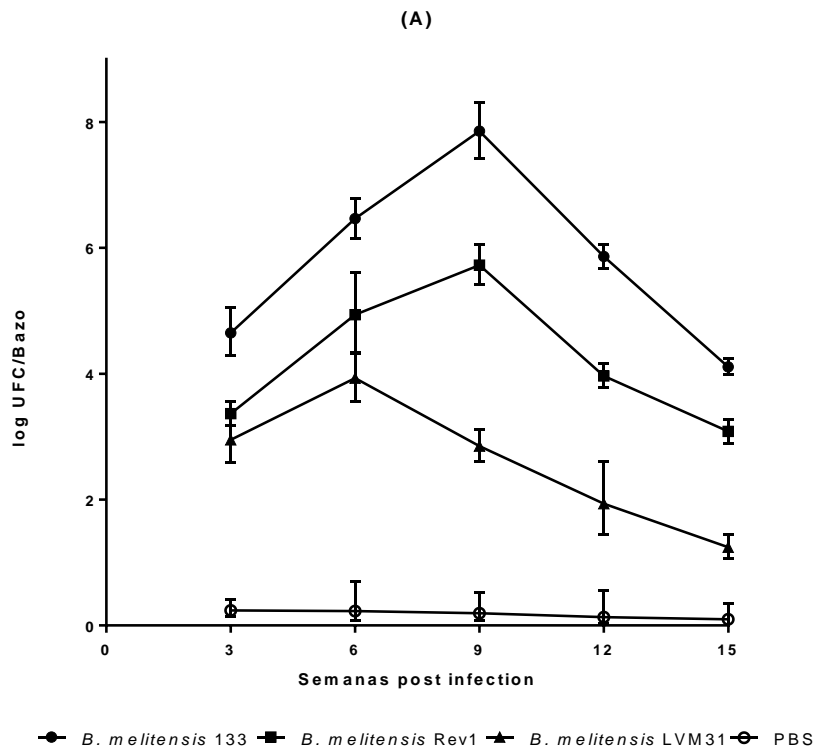


Figura 1 (A). Colonización esplénica de ratones hembras BALB/c inoculados con las cepas de *Brucella*

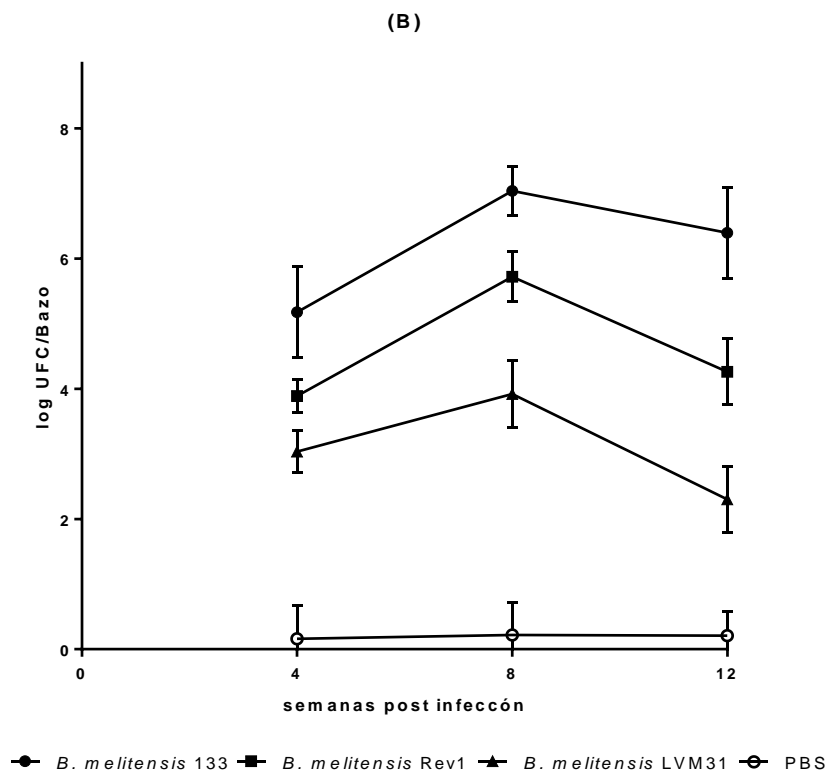


Figura 1 (B). Colonización esplénica de ratones machos BALB/c inoculados con las cepas de *Brucella*

11.3.2 Evaluación de la protección conferida en ratones inmunizados con las cepas vacunales

El objetivo de este ensayo fue determinar si la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 era capaz de proteger a ratones hembras BALB/c frente al desafío con la cepa de campo virulenta de *B. melitensis* Bm133. Los ratones inmunizados intraperitonealmente con 0.2ml (1×10^9 UFC/ml) con la cepa mutante, la cepa vacunal (control positivo) y con 0.2ml de PBS estéril (control negativo), fueron desafiados 30 días pos vacunación con la cepa virulenta de campo. Se tomaron muestras de bazo de dos ratones por grupo y se determinó la colonización esplénica en la semana 3, 6 y 9 post desafío. Se realizó el conteo de UFC por triplicado y por repetición. Los resultados representan la media \pm desviación estándar del log UFC/ml.

Los resultados de este trabajo demostraron que hubo una disminución en la colonización esplénica en ratones inmunizados con la cepa mutante en comparación con los ratones inmunizados con la cepa vacunal. Debido a que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre dichas cepas, estos resultados nos

permiten concluir que la cepa mutante de *B. melitensis* LVM31 confirió una protección similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta *B. melitensis* Bm133. (Fig.2)

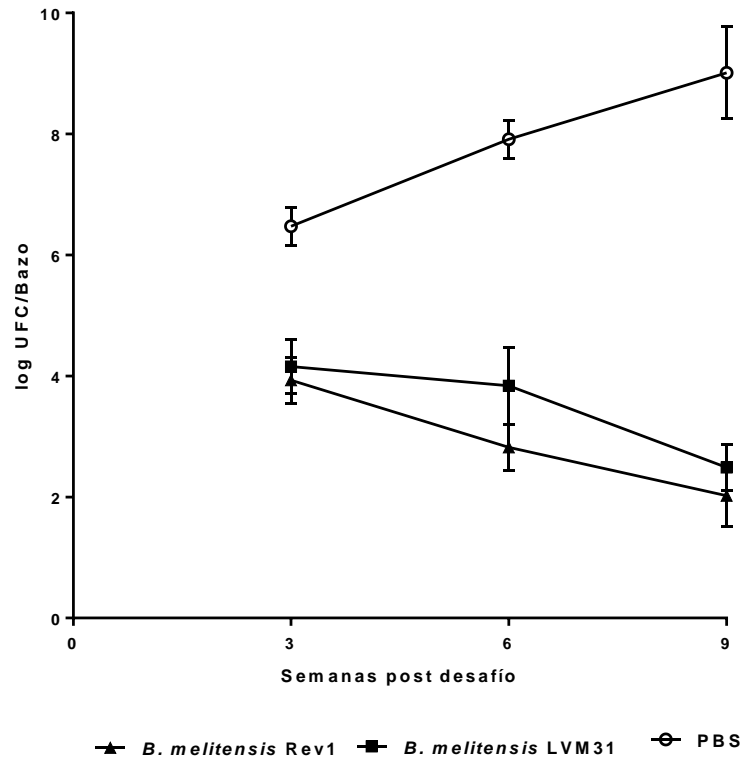


Figura 2. Evaluación de la protección conferida de ratones hembras Balb/c inmunizadas con la cepa mutante y la cepa vacunal

11.3.3 Evaluación de la virulencia residual en crías nacidas de hembras inoculadas con las cepas de *Brucella*

El objetivo de este experimento fue determinar la colonización esplénica en ratones BALB/c de seis semanas de edad nacidos de hembras BALB/c inoculadas con las cepas de *Brucella* y con PBS.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que hubo una menor colonización esplénica en los ratones nacidos de las hembras inoculadas con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 en comparación con la cepa vacunal y la cepa de campo virulenta. Con base en estos resultados se puede concluir que la transmisión de la bacteria de la madres a las crías fue estadísticamente significativa reducida en los ratones inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 en comparación con las cepas control.

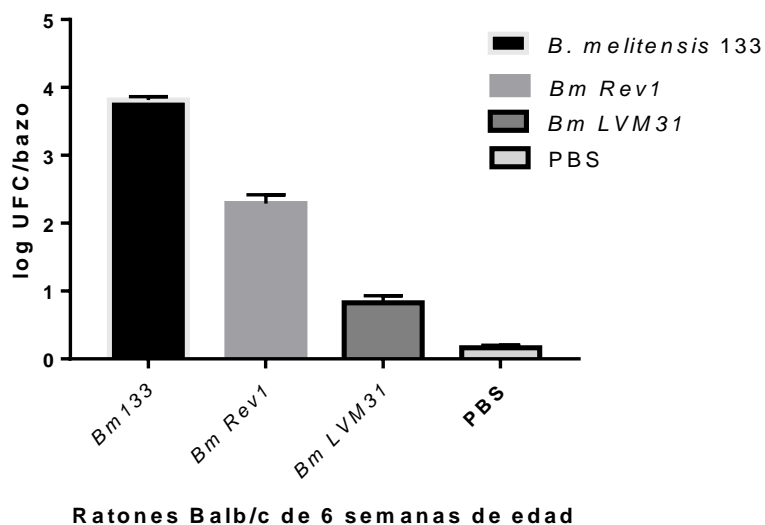


Figura 3. Evaluación de la virulencia de crías nacidas de hembras inoculadas con las cepas de *Brucella* spp.

11.3.4 Evaluación de lesiones de órganos de ratones BALB/c inoculados con las cepas de *Brucella*

Después de demostrar que la mutación de *omp31* generó una disminución en la colonización esplénica, por lo tanto una atenuación en la virulencia de la bacteria en el modelo murino, se tomaron muestras de bazo y de testículos (en caso de machos) de dos ratones por grupo 15 semanas post inoculación con las cepas de *Brucella* con la finalidad de determinar las lesiones histopatológicas de los órganos.

Los resultados de este trabajo demostraron que los bazos de los ratones inoculados con PBS (Fig. 4A) y con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 (Fig. 4B) no presentaron cambios histopatológicos aparentes mientras que los bazos de los ratones inoculados con la cepa de campo (Fig. 4C) y la cepa vacunal (Fig. 4D) presentaron atrofia linfoide discreta difusa en pulpa blanca con abundante megacariocitos en pulpa roja y atrofia linfoide moderada difusa con escasos megacariocitos respectivamente.

En cuanto a los testículos de los ratones inoculados con las cepas de *Brucella*, no presentaron cambios histopatológicos aparentes en ninguno de los casos.

(A)

(B)

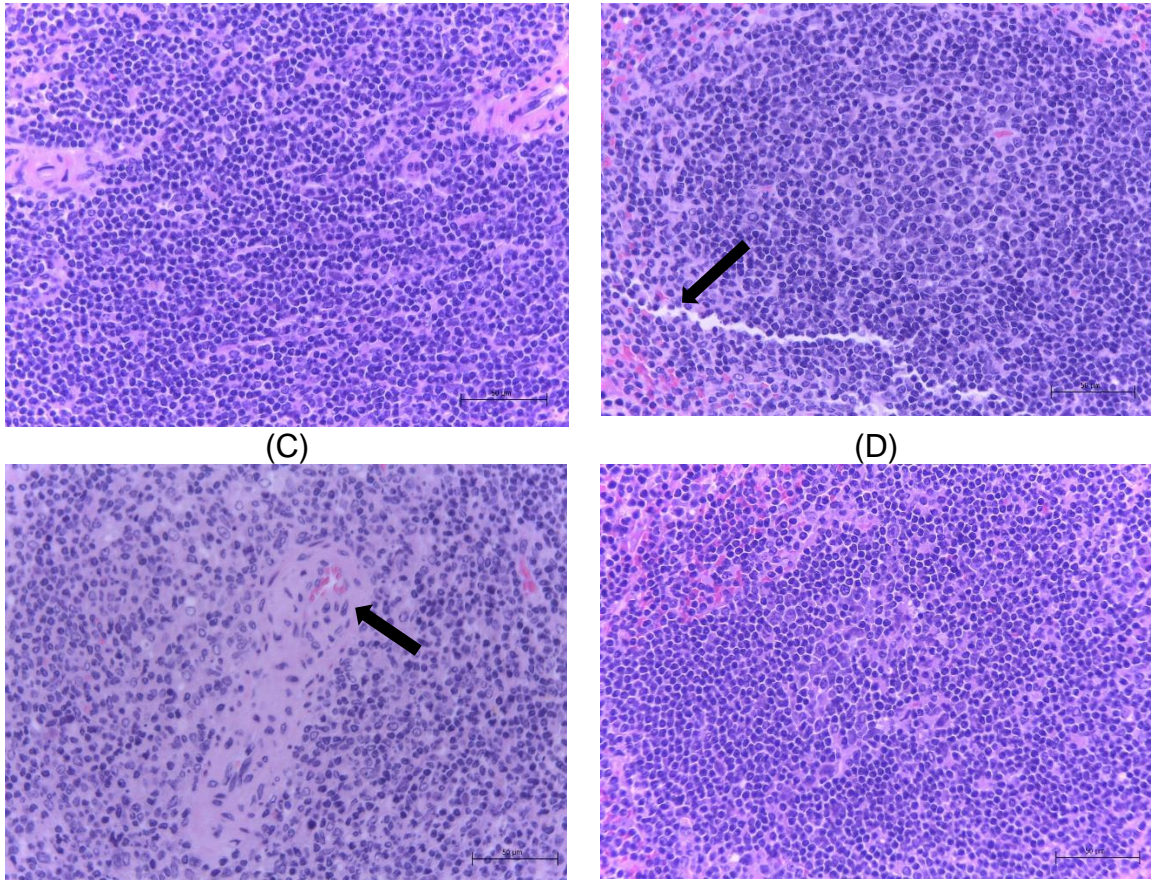


Figura 5. Muestras de bazo de ratones inoculados con las cepas de *Brucella*. Fig. 5(A) Bazo de ratón inoculado con *B. melitensis* LVM31. Fig. 5(B) Bazo de ratón inoculado con *B. melitensis* Rev1. Fig. 5(C) Bazo de ratón inoculado con *B. melitensis* Bm133. Fig. 5(D) Bazo de ratón inoculado con PBS.

En el caso de los ratones hembras BALB/c inmunizados con la cepa mutante y la cepa vacunal y, desafiados con la cepa campo 30 días post inmunización, se tomaron muestras de bazo de dos ratones por grupo 9 semanas post desafío.

Los hallazgos de este trabajo demostraron que los bazos de los ratones inoculados con la cepa mutante (Fig. 5A) y la cepa vacunal (Fig. 5B) presentaron hiperplasia linfoide grave difusa en pulpa blanca y moderada cantidad de megacariocitos en pulpa roja, mientras que los bazos de los ratones inmunizados con PBS (Fig. 5C) presentaron atrofia linfoide moderada difusa en pulpa blanca y abundante cantidad de megacariocitos en pulpa roja.

(A)

(B)

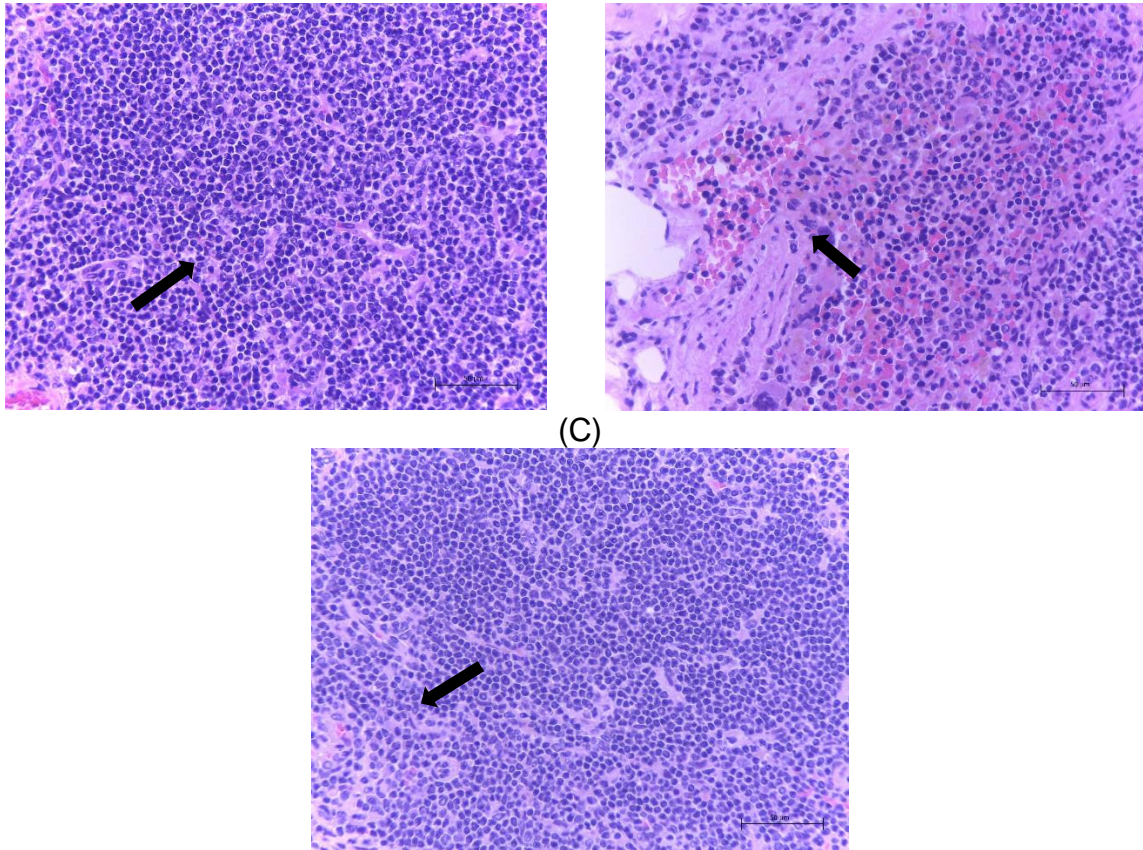


Figura 6. Muestras de bazo de ratones inmunizados con la cepa mutante y vacunal. Fig. 6(A) Bazo de ratón inmunizado con *B. melitensis* LVM31. Fig. 6(B) Bazo de ratón inmunizado con *B. melitensis* Rev1. Fig. 6(C) Bazo de ratón inoculado con PBS.

12. Discusión

Brucella es un patógeno intracelular facultativo. Es importante destacar que las especies de *Brucella* lisas pueden entrar, sobrevivir y multiplicarse en células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas, así como en células no fagocíticas como células trofoblásticas y células epiteliales (células HeLa) (52, 57) Debido a que *Brucella* spp no posee factores de virulencia clásicos como otras bacterias, en los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones con el objeto de determinar la influencia que ejercen las PME de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia del género *Brucella* (58). La consecución de un nicho de replicación en los macrófagos, principales células hospedadoras de este patógeno, le va a proporcionar a este microorganismo una protección frente al complemento y a anticuerpos durante su diseminación por el hospedador, y la capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo en el organismo

afectado, con la consiguiente cronicidad de la infección (59). Esta habilidad que presentan las estirpes de *Brucella* en fase lisa implica un proceso complejo, en el cual, este patógeno interfiere con las funciones propias de la célula hospedadora, llegando incluso a controlar su propio tráfico intracelular. Así, cuando una especie lisa de *Brucella* es fagocitada por el macrófago, sigue una ruta endocítica en la cual evita degradaciones hidrolíticas por fusión con los lisosomas, favoreciendo en los estadios tempranos de la infección, su supervivencia intracelular (60). Por lo que la virulencia de *Brucella* se asocia con la supervivencia en células fagocíticas. Esto podría explicar los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación entre la relación que hubo en la disminución de la internación de la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 y la disminución de la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria a partir de las 4 horas hasta las 72 horas post infección tanto en los macrófagos murinos como en las células HeLa. Con base en estos resultados concluimos que la proteína Omp31 ejerce papeles fundamentales en la capacidad de invasión y multiplicación intracelular de *B. melitensis* 133.

Después de demostrar que la proteína Omp31 juega un papel importante en la integridad de las propiedades de la ME y en la supervivencia intracelular de *B. melitensis* en macrófagos y células epiteliales nos planteamos el objetivo de determinar el efecto de la mutación de *omp31* en la virulencia de la bacteria en un modelo murino.(46)

Los ratones, aunque no son hospedadores naturales de *Brucella* spp es el modelo experimental de laboratorio más utilizado para estudiar la virulencia de *Brucella* in vivo. (62) En este modelo, *Brucella* puede colonizar múltiples tejidos, incluyendo el bazo y el hígado, donde se forman microgranulomas. Durante las etapas crónicas de la infección., un estudio reciente que utiliza cepas de *Brucella* bioluminiscentes, también encontró que se dirigen a las glándulas salivales, lo que podría ser importante en relación con la infección humana, donde la inoculación se produce por ingestión de alimentos contaminados. Además, los ratones presentaron una infección crónica de las articulaciones de la cola con *Brucella* parecida a la brucelosis osteoarticular en los animales y humanos.(63, 64)

El curso de la brucelosis murina depende de la virulencia de la cepa bacteriana, la dosis y la ruta de inoculación, así como raza, antecedentes genéticos, edad, sexo y estado fisiológico de los ratones. Por lo tanto, los experimentos significativos requieren una definición de estas variables. Por lo tanto, los experimentos significativos requieren una definición de estas variables. Los perfiles de replicación del bazo de *Brucella* son altamente reproducibles y se desarrollan en cuatro fases: i), inicio o colonización del bazo (primeras 48 h); ii), fase aguda, desde el tercer día hasta el momento en que las bacterias llegan números máximos; iii), fase constante crónica, donde los números bacterianos son mesetas; y iv), fase de declinación crónica, durante la cual se eliminan las bacterias del género *Brucella*. Este patrón muestra signos fisiopatológicos claros y es sensible a pequeñas variaciones de virulencia, lo que hace posible evaluar la atenuación cuando se utilizan bacterias totalmente virulentas como controles (65). Con base en estas investigaciones incluimos diferentes variables en el presente estudio. Utilizamos dos cepas control de *Brucella melitensis* con diferentes grados virulencia con el objetivo de determinar la colonización esplénica de la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 tanto en ratones hembras como en machos Balb/c en comparación con las cepas control. Otra variable que incluimos en el estudio fue el estado fisiológico de los animales, debido que en el presente estudio inoculamos ratones hembras gestantes con las diferentes cepas de *Brucella* con el objetivo de determinar la colonización esplénica de las crías nacidas de las hembras ya que diversos estudios han reportado tanto la transmisión vertical y horizontal en crías nacidas de hembras experimentalmente infectadas (66). Por lo que nos planteamos la hipótesis si la mutación de *omp31* causaría una disminución en la propagación de la cepa mutante por estas vías de transmisión.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la ausencia de la proteína *Omp31* provocó una disminución en la colonización esplénica tanto en ratones machos y hembras Balb/c, además de que los órganos de los ratones inoculados con la cepa mutante no presentaron lesiones o cambios histopatológicos aparentes en comparación con los ratones inoculados con las cepas control. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos en otros trabajos, donde demostraron que la

ausencia de esta proteína en la membrana externa de la cepa *B. ovis* PA, a pesar de que reduce en un logaritmo los niveles máximos de colonización esplénica de la bacteria en ratón, no disminuye su persistencia en bazo (50). En cuanto la evaluación del grado de propagación de la cepa mutante en los ratones en estudio, nuestros resultados demostraron que hubo una disminución en la colonización esplénica en los ratones nacidos de las hembras inoculados con la cepa *B. melitensis* LVM31 en comparación con las cepas control.

Estos resultados se podrían explicar debido a que la proteína Omp31 también se le ha atribuido un papel inmunomodulador en *B. melitensis* 16M(41), así como características de función porina (67) y de unión a grupos hemo en *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. suis*.(35) Sin embargo, no se han descrito efectos drásticos en la virulencia *in vivo* de *B. melitensis* Rev1 y de *B. ovis* PA, en ausencia de Omp31.(42, 43) De acuerdo con los hallazgos encontrados en el presente trabajo, llegamos a la conclusión que la proteína Omp31 no solo está involucrada en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa, en la internación y sobrevivencia intracelular de la bacteria en macrófagos y células epiteliales sino además juega un papel relevante en la virulencia de *B. melitensis* ya que en todos los grupos experimentales que fueron inoculados con la cepa mutante *B. melitensis* LVM31, hubo una disminución en la colonización esplénica además de no generar lesiones o cambios histopatológicos en bazo en comparación con las cepas control.

Otro aspecto muy importante es la persistencia de la bacteria en bazo ya que es un indicador de virulencia o atenuación útil y se utiliza en el control de calidad de las vacunas (virulencia residual). Los candidatos vacunales a menudo se analizan en ratones mediante la determinación de la colonización esplénica (conteo de UFC/ml) después de la prueba de desafío con las dosis de *Brucella* virulentas adecuadas en los tiempos precisos posteriores a la vacunación. Dado que la mayoría de las vacunas de *Brucella* vivas o muertas brindan cierta protección en ratones, los controles en los ratones inmunizados con vacunas de referencia (S19 o Rev1) son críticos. Finalmente, los ratones se han utilizado con éxito para evaluar aplicaciones profilácticas o terapéuticas contra la brucelosis.

Con base en estas investigaciones nos planteamos el objetivo de evaluar la protección conferida en ratones inmunizados con la cepa mutante (LVM31), la cepa vacunal (Rev1) y PBS (control negativo) frente al desafío con una dosis infectante de *B. melitensis* Bm133. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que hubo una menor persistencia estadísticamente significativa de la bacteria en bazo de los ratones inmunizados con la cepa mutante y la cepa vacunal en comparación con los ratones inmunizados con PBS, en cuanto la colonización esplénica en los ratones vacunados con la cepa mutante y la cepa vacunal no hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos post desafío con la cepa virulenta de campo. Con base en estos resultados, concluimos que la cepa mutante *B. melitensis* LVM31 confirió una respuesta protectora similar a la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 frente al desafío con la cepa virulenta de campo *B. melitensis* Bm133.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que la proteína Omp31 juega un papel relevante en la virulencia de la bacteria debido a que hubo una disminución significativa en la colonización esplénica y una menor persistencia de la bacteria (virulencia residual) en bazo tanto en ratones machos, hembras Balb/c infectados experimentalmente con la cepa mutante en comparación con las cepas control.

Por último, debido a que la mutación de *omp31* provoco una atenuación significativa de la bacteria tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, la cepa *B. melitensis* LVM31 podría ser evaluado como un potencial candidato vacunal para el control de la brucelosis caprina.

REFERENCIAS

1. Boschirola ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2001;4(1):58-64.
2. Pappas G. The changing Brucella ecology: novel reservoirs, new threats. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36:S8-S11.
3. Al-Anazi K, Al-Jasser A. Brucellosis: A Global Re-emerging Zoonosis History, Epidemiology. *Microbiology, Immunology and Genetics EsciencecentralOrg* [Internet]. 2014:1-10.
4. <http://www.sinave.gob.mx/>.
5. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-022-SSA2-2012, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN EL SER HUMANO.
6. Olsen SC, Stoffregen W. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert review of vaccines*. 2005;4(6):915-28.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña contra la Brucelosis de los Animales. *Diario Oficial de la Federación*, México, DF.
8. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4415>.
9. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>.
10. Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M. Identification of the Brucella melitensis vaccine strain Rev. 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1475-80.
11. Banai M, Adams L, Dangott L, Frey M, Ficht T. Brucella attenuation and relevance to vaccine properties. *Small Ruminant Research*. 2002;45(2):129-37.
12. Garin-Bastuji B, Blasco J, Grayon M, Verger J. Brucella melitensis infection in sheep: present and future. *Veterinary research*. 1997;29(3-4):255-74.
13. Blasco J. A review of the use of B. melitensis Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive veterinary medicine*. 1997;31(3):275-83.
14. Blasco J, Diaz R. Brucella melitensis Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *The Lancet*. 1993;342(8874):805.
15. Boussau B, Karlberg EO, Frank AC, Legault BA, Andersson SGE. Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(26):9722-7.
16. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):209-27.
17. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(11):2688-93.
18. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, et al. Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008;58(2):375-82.
19. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2010;60(4):801-8.

20. Essenberg RC, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I. Sugar metabolism by Brucellae. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):249-61.
21. Baek SH, Rajashekara G, Splitter GA, Shapleigh JP. Denitrification genes regulate Brucella virulence in mice. *Journal of bacteriology*. 2004;186(18):6025-31.
22. Robinson A, Melling J. Envelope structure and the development of new vaccines. *Journal of Applied Microbiology*. 1993;74(S22):43S-51S.
23. Adams LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the Brucella genome. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):553-61.
24. Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, et al. Deletion of wboA Enhances Activation of the Lectin Pathway of Complement in Brucella abortus and Brucella melitensis. *Infection and immunity*. 2001;69(7):4407-16.
25. Haag AF, Myka KK, Arnold MF, Caro-Hernández P, Ferguson GP. Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1, 2-glucans in Brucella-mammalian infections. *International journal of microbiology*. 2010;2010.
26. Gorvel J-P. Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells Thais Lourdes Santos Lacerda, Suzana Pinto Salcedo and. *Current Opinion in Microbiology*. 2013;16:45-51.
27. Lacerda TLS, Salcedo SP, Gorvel J-P. Brucella T4SS: the VIP pass inside host cells. *Current opinion in microbiology*. 2013;16(1):45-51.
28. Byndloss MX, Tsolis RM. Brucella spp. virulence factors and immunity. *Annual review of animal biosciences*. 2016;4:111-27.
29. De Jong MF, Tsolis RM. Brucellosis and type IV secretion. *Future microbiology*. 2012;7(1):47-58.
30. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, et al. Cyclic β -1, 2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology*. 2005;6(6):618-25.
31. Roset MS, Ibanez AE, de Souza Filho JA, Spera JM, Minatel L, Oliveira SC, et al. Brucella cyclic β -1, 2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PloS one*. 2014;9(7):e101279.
32. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet J-Y, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):229-47.
33. Vizcaíno N, Caro-Hernández P, Cloeckaert A, Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the omp25/omp31 family of Brucella spp.: identification of a 1.7-kb inversion in Brucella cetaceae and of a 15.1-kb genomic island, absent from Brucella ovis, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes and infection*. 2004;6(9):821-34.
34. Foreman DL, Vanderlinde EM, Bay DC, Yost CK. Characterization of a gene family of outer membrane proteins (ropB) in Rhizobium leguminosarum bv. viciae VF39SM and the role of the sensor kinase ChvG in their regulation. *Journal of bacteriology*. 2010;192(4):975-83.
35. Delpino M, Cassataro J, Fossati CA, Goldbaum FA, Baldi PC. Brucella outer membrane protein Omp31 is a haemin-binding protein. *Microbes and infection*. 2006;8(5):1203-8.
36. DelVecchio VG, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer CV. The genome of Brucella melitensis. *Veterinary microbiology*. 2002;90(1):587-92.

37. Salhi I, Boigegrain R-A, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infection and immunity*. 2003;71(8):4326-32.
38. Vizcaíno N, Cloeckaert A. Biology and genetics of the *Brucella* outer membrane. *Brucella molecular microbiology and genomics*. 2012:133-61.
39. De Tejada GM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and immunity*. 1995;63(8):3054-61.
40. Carroll JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6750-7.
41. Zhang K, Wang H, Guo F, Yuan L, Zhang W, Wang Y, et al. OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- α . *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(4):2783-9.
42. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco J-M, et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev. 1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*. 2004;22(21):2827-35.
43. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel M-J, Martín-Martín AI, Cloeckaert A, Grilló M-J, et al. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infection and immunity*. 2007;75(8):4050-61.
44. Martín-Martín AI, Caro-Hernández P, Orduña A, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes and infection*. 2008;10(6):706-10.
45. Eschenbrenner M, Wagner MA, Horn TA, Kraycer JA, Mujer CV, Hagiús S, et al. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *Journal of bacteriology*. 2002;184(18):4962-70.
46. Verdigué-Fernández L, Oropeza-Navarro R, Basurto-Alcántara FJ, Castañeda-Ramírez A, Verdugo-Rodríguez A. Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells. *Archives of microbiology*. 2017;199(7):971-8.
47. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. *Vaccine*. 2002;20(19):2546-50.
48. Björkman J, Samuelsson P, Andersson DI, Hughes D. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*. 1999;31(1):53-8.
49. Barnard AM, Simpson NJ, Lilley KS, Salmond GP. Mutations in rpsL that confer streptomycin resistance show pleiotropic effects on virulence and the production of a carbapenem antibiotic in *Erwinia carotovora*. *Microbiology*. 2010;156(4):1030-9.
50. Sancho P, Tejedor C, Sidhu-Muñoz RS, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Veterinary research*. 2014;45(1):61.
51. Martín-Martín AI, Sancho P, Tejedor C, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *The Veterinary Journal*. 2011;189(1):103-5.

52. von Bargen K, Gorvel J-P, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(3):533-62.
53. Ahmed W, Zheng K, Liu Z-F. Establishment of chronic infection: *Brucella*'s stealth strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:30.
54. Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM. Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Veterinary microbiology*. 1999;68(3):235-44.
55. Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Clausse M, Manazza J, Cassataro J, et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine*. 2009;27(48):6704-11.
56. de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-Host Interactions. *The American journal of pathology*. 2015;185(6):1505-17.
57. De Bolle X, Crosson S, Matroule J-Y, Letesson J-J. *Brucella abortus* cell cycle and infection are coordinated. *Trends in microbiology*. 2015;23(12):812-21.
58. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Veterinary microbiology*. 2008;129(1-2):1-14.
59. Roop RM, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Molecular microbiology*. 2004;52(3):621-30.
60. Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Research in microbiology*. 2006;157(2):93-8.
61. Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cellular microbiology*. 2001;3(3):159-68.
62. Silva T, Costa EA, Paixão TA, Tsolis RM, Santos RL. Laboratory animal models for brucellosis research. *BioMed Research International*. 2011;2011.
63. Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA. Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cellular microbiology*. 2005;7(10):1459-73.
64. Rajashekara G, Glover DA, Banai M, O'Callaghan D, Splitter GA. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (*virB4*), GR024 (*galE*), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infection and immunity*. 2006;74(5):2925-36.
65. Grilló M-J, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary research*. 2012;43(1):29.
66. Wang Z, Wang S, Wang G, Wu T, Lv Y, Wu Q. A pregnant mouse model for the vertical transmission of *Brucella melitensis*. *The Veterinary Journal*. 2014;200(1):116-21.
67. Vizcaino N, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infection and immunity*. 1996;64(9):3744-51.
68. Godfroid J, Garin-Bastuji B, Saegerman C, Blasco J. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*. 2013.
69. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. *Journal of veterinary science*. 2017;18(S1):281-90.
70. López-Goñi I, O'Callaghan D. *Brucella*: molecular microbiology and genomics: Horizon Scientific Press; 2012.
71. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

72. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
73. Parkinson CM, O'Brien A, Albers TM, Simon MA, Clifford CB, Pritchett-Corning KR. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011 (54).