



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA
PRODUCCIÓN ANIMAL**

**EVALUACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DIFERENCIAL DE MACRÓFAGOS
HUMANOS INFECTADOS CON DIFERENTES CEPAS DE *Brucella melitensis*.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

QUEIJEIRO BARROSO CLOÉ

TUTOR

ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR

JORGE RAMÍREZ SALCEDO

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. SEPTIEMBRE
2021.**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres: No hay palabras que demuestren cuanto les agradezco el apoyo y el amor que me han dado. Este logro es de ustedes y para ustedes. Los amo.

A mi Agustín, gracias infinitas por todo. Love you.

AGRADECIMIENTOS

A los Proyectos PAPIIT IN218519 e IN222516 “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”, los cuales financiaron parte de este trabajo de investigación y del cual es responsable el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

Al Proyecto CONACYT 11303 “Expresión diferencial de proteínas SNARE de macrófagos durante la infección de *Brucella melitensis*”, el cual financió parte de este trabajo y el cual es responsable el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Al Proyecto CONACYT y Texas A&M 2016-010 “*Molecular analysis of Brucella intracellular parasitism*”, el cual financió parte de este trabajo.

A mi comité tutor por sus comentarios y críticas durante el desarrollo de este proyecto. Especialmente a mi tutor principal el Dr. Antonio Verdugo por todo el apoyo que me ha proporcionado durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología molecular.

A todos los alumnos del laboratorio de Microbiología molecular, por su apoyo, ayuda y amistad durante todo este tiempo.

RESUMEN

Queijeiro Barroso Cloé. “Evaluación del transcriptoma diferencial de macrófagos humanos infectados con diferentes cepas de *Brucella melitensis*”. Tutor principal: Verdugo Rodríguez Antonio. Comité tutor: Ramírez Salcedo Jorge y Puente García José Luis.

Brucella spp. son pequeños cocobacilos gram negativos, inmóviles, aerobios y patógenos intracelulares facultativos responsables de infecciones zoonóticas. *B. melitensis* puede sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos, los fenómenos moleculares de esta interacción hospedero: patógeno siguen siendo totalmente conocidos. Se planteó el objetivo de caracterizar la respuesta molecular de los macrófagos THP-1 a diferentes cepas de *Brucella melitensis* (*B. melitensis* de campo (BM133), *B. melitensis* ATCC 23456 (BM16M) y *B. melitensis* 133 mutante de *omp31* (LVM31)) ya que, ayudaría a comprender esta interacción. Primero, identificamos la fase de crecimiento logarítmica tardía. La infección se llevó a cabo a una MOI de 100: 1 durante 2 y 4 h. Se realizó extracción del RNA total, transcripción reversa y se hibridó con un microarreglo de cDNA humano de 10K. Se analizaron seis laminillas: Experimento A: BM133 / BM16M 2 h p.i. ; B: BM133 / LVM31 2 h p.i. ; C: BM16M / LVM31 2 h p.i. ; D: BM133 / BM16M 4 h p.i. ; E: BM133 / LVM31 4 h p.i. y F: BM16M / LVM31 4h p.i. Se observó una diferencia en la expresión genética en todos los experimentos. Se evaluó la caracterización de las vías metabólicas; en el experimento A, se alteraron las vías cAMP, PPAR, PI3K-Akt y la respuesta a la infección por Herpes simplex. En B, se alteraron las vías cAMP, PI3K-Akt y de cáncer. En C, vía de señalización MAPK y hepatitis. En D, MAPK, las vías de señalización de Ras. En E, se alteraron la respuesta a la legionelosis y de influenza, la señalización de PPAR y la vía PI3K-Akt. En F, la señalización de Rap1, la señalización de PPAR y las vías metabólicas. Con estos resultados podemos dilucidar que la infección con BM16M tiene una sobre expresión de vías antiinflamatorias y una sub expresión de vías inflamatorias, en las que están implicadas *IL1A* e *IL10*, en contraste con la infección por BM133. Además, podemos sugerir que la mutante BMLV31, estimula la expresión de la proteína catepsina D en las primeras etapas de la infección. Y la respuesta a esta mutante a las 4 h p.i. tiene una sobre expresión de las vías de apoptosis e inflammasoma.

Palabras clave: *Brucella*, microarreglos, transcriptómica.

ABSTRACT

Queijeiro Barroso Cloé. **“Evaluation of the differential transcriptome of human macrophages infected with different strains of *Brucella melitensis*”.**

Brucella spp. are small aerobes non-motile Gram-negative coccobacilli that are facultative intracellular pathogens responsible for zoonotic infections. *B. melitensis* can survive and replicate within host macrophages, the molecular phenomena of this host:pathogen interaction remain totally unknown. We evaluated the THP-1 macrophage cells molecular response to different strains of *Brucella melitensis* (*B. melitensis* wild- type (BM133), *B. melitensis* ATCC 23456 (BM16M) and a *B. melitensis* 133 *omp31* mutant (LVM31)) infection. First, we identified the late logarithmic phase of growth. The infection was carried out at a MOI of 100:1 for 2 and 4 h. Total RNA was then extracted, reverse transcribed and hybridized to a 10K cDNA human microarray. Six slides were analyzed: Experiment A: BM133/BM16M 2h p.i.; B: BM133/LVM31 2h p.i.; C: BM16M/LVM31 2h p.i.; D: BM133/BM16M 4h p.i.; E: BM133/LVM31 4h p.i. and F: BM16M/LVM31 4h p.i. Differential gene expression was observed in all experiments. Further characterization of metabolic pathways was evaluated, in experiment A, cAMP, PPAR, PI3K-Akt pathways and response to Herpes simplex infection were altered. In B, cAMP, PI3K-Akt pathways and cancer were altered. In C, MAPK signaling pathway and hepatitis. In D, MAPK, Ras signaling pathways were altered. In E, response to Legionellosis and Influenza, PPAR signaling, and PI3K-Akt pathway were altered. In F, Rap1 signaling, PPAR signaling and metabolic pathways were altered. With these results we can elucidate that infection with BM16M has an up-regulation of anti-inflammatory pathways and down regulation of inflammatory pathways where *IL1A* and *IL10* are involved, in contrast with BM133 infection. Also, we can suggest that the mutation of BMLV31 impairs the evasion of cathepsin D in early stages of the infection. And the response to this mutant at 4 h p.i. has an up- regulation of pathways of apoptosis and inflammasome.

Keywords: *Brucella*, microarrays, transcriptomic.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Brucella</i> spp	3
1.2. Factores de virulencia.....	4
1.3. Transito Intracelular	7
1.4. Respuesta inmune contra <i>Brucella</i>	7
1.5. Análisis transcripcional de la respuesta a la infección por <i>Brucella</i> spp.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVO GENERAL.....	14
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
6. MATERIAL Y METODOS.....	15
6.1. Cultivo Celular.....	15
6.2. Cepas bacterianas.....	15
6.3. Cinética de crecimiento de <i>Brucella melitensis</i> 133, 16M y LVM31	16
6.4. Ensayos de infección	16
6.5. Determinación de sobrevivencia intracelular	17
6.6. Extracción de RNA	17
6.7. Transcripción inversa.....	18
6.8. Marcaje y purificación del aacDNA	20
6.9. Hibridación en los microarreglos de DNA	21
6.10. Lectura y cuantificación de fluorescencia.....	23
6.11. Análisis y comparación de la expresión de genes.....	23
7. RESULTADOS	24

7.1. Cultivo Celular.....	24
7.2. Cinética bacteriana.....	26
7.3. Determinación de la sobrevivencia intracelular.....	28
7.4. Extracción y visualización de RNA de macrófagos infectados	29
7.5. Análisis y comparación de la expresión genética.....	31
7.6. Análisis de vías metabólicas	33
7.7. Análisis de Componentes celulares.....	35
7.8. Análisis de Procesos Biológicos	40
8. DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	55
10. PROSPECTIVA	55
11. REFERENCIAS.....	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	3
Figura 2.....	6
Figura 3.....	25
Figura 4.....	25
Figura 5.	26
Figura 6.....	27
Figura 7.....	27
Figura 8.....	29
Figura 9.....	30

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mezcla A para reactivos de Transcripción Inversa	19
Cuadro 2. Mezcla B para reactivos de Transcripción Inversa	19
Cuadro 3. Características de los microarreglos utilizados.	21
Cuadro 4. Comparaciones en los microarreglos y el marcaje de las muestras utilizadas.	22
Cuadro 5. Vías metabólicas alteradas del experimento A.	33
Cuadro 6. Vías metabólicas alteradas del experimento B.	33
Cuadro 7. Vías metabólicas alteradas del experimento C.	34
Cuadro 8. Vías metabólicas alteradas del experimento D.	34
Cuadro 9. Vías metabólicas alteradas del experimento E.	34
Cuadro 10. Vías metabólicas alteradas del experimento F.	35
Cuadro 11. Componentes celulares alterados del experimento A.	35
Cuadro 12. Componentes celulares alterados del experimento B.	36
Cuadro 13. Componentes celulares alterados del experimento C.	36
Cuadro 14. Componentes celulares alterados del experimento D.	37
Cuadro 15. Componentes celulares alterados del experimento E.	38
Cuadro 16. Componentes celulares alterados del experimento F.	39
Cuadro 17. Procesos biológicos alterados en el experimento A.	40
Cuadro 18. Procesos biológicos alterados en el experimento B.	41
Cuadro 19. Procesos biológicos alterados en el experimento C.	42
Cuadro 20. Procesos biológicos alterados en el experimento D.	43
Cuadro 21. Procesos biológicos alterados en el experimento E.	43
Cuadro 22. Procesos biológicos alterados en el experimento F.	45

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una zoonosis de origen bacteriano causada por miembros del género *Brucella* (Corbel, 2006). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) incluye a la brucelosis en la lista de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos, debido al impacto negativo económico y sanitario (OIE 2015); además se encuentra entre las zoonosis más comunes, con más de 500 000 casos nuevos al año en el humano (Pappas, 2006; Figueiredo *et al.*, 2015).

Las especies de *Brucella* se han dividido en dos distintos clados, las especies “Clásicas” que presentan >99% de similitud del DNA (Ácido desoxirribonucleico) y las especies “No clásicas” con aproximadamente el 97% de similitud. Las especies “clásicas” son *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. papionis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti porpoise*, *B. ceti dolphin*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. spp BCCN84.3*, *B. sp F5/99* y las especies “no clásicas” son *B. inopinata* BO1, *B. vulpis* F60, *B. sp BO2* y especies aisladas de anfibios y peces (Suárez *et al.*, 2020).

B. melitensis es la especie más frecuentemente reportada y aislada en casos humanos. Es considerada la especie más virulenta y asociada a un cuadro agudo. Infecta generalmente cabras y ovejas, pero puede infectar otras especies como bovinos, camellos y perros (Corbel, 2006).

Las fuentes principales de infección en las personas incluyen el consumo de productos lácteos no pasteurizados, contacto con productos de abortos de animales y la inyección accidental de vacunas atenuadas de *Brucella* (Corbel, 2006). La presentación clínica incluye

sintomatología como un cuadro febril agudo, dolores generalizados, sudoración extrema y signos gastrointestinales como diarrea, vómitos y náuseas. En ocasiones se observan complicaciones como artritis, espondilitis, meningitis y endocarditis (Figueiredo *et al.*, 2015; CFSPH 2010).

La transmisión en animales ocurre por contacto con placenta, fetos, fluidos fetales y descargas vaginales de animales infectados. (Corbel, 2006; CFSPH 2010). En hembras no gestantes la enfermedad suele ser asintomática, las hembras gestantes desarrollan placentitis, que provoca aborto en el último tercio de la gestación. La glándula mamaria y los nódulos linfáticos regionales resultan infectados, por lo que en leche encontramos macrófagos infectados. En el macho puede aparecer orquitis y epididimitis, aunque no es frecuente (Martirosyan *et al.*, 2011).

En México, se encuentra vigente la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales (NOM-041-ZOO-1995), que marca los lineamientos para el control, prevención y diagnóstico de esta enfermedad en animales domésticos (NOM-041 1996). De acuerdo con los datos reportados hasta noviembre del 2020, Sonora se encuentra en fase libre de brucelosis causada por especies lisas, el estado de Baja California Sur está reconocido como libre de Brucelosis. El 28.99% del territorio nacional se encuentra en fase de erradicación y el resto del país en fase de control (Figura 1). En el periodo de Enero-Diciembre 2019 se reportó una frecuencia de animales positivos, del 0.07% de bovinos, del 0.4% en caprinos y del 0.14% en ovinos (SENASICA 2020). Para la vacunación contra la brucelosis bovina se debe usar la cepa *B. abortus* 19, en dosis clásica (5×10^{10} UFC) para becerras de 3 a 6 meses

de edad y en dosis reducida (3×10^8 a 3×10^9 UFC) para hembras mayores a 6 meses. La cepa *B. melitensis* REV 1 se debe de usar para la vacunación contra la brucelosis en ovejas y cabras; en dosis clásica (1 a 2×10^9 UFC) de 3 a 4 meses de edad y la dosis reducida (1×10^5 UFC) para hembras mayores de 4 meses. Ninguna de estas vacunas se debe de usar en machos, debido a que son virulentas en estos (NOM-041 1996).



Figura 1. Mapa de los Estados Unidos Mexicanos donde se muestra el estatus zoonosanitario de la brucelosis en los animales domésticos (SENASICA 2020).

1.1. *Brucella* spp

Son bacilos cortos Gram negativos, no poseen cápsula y son inmóviles, aunque poseen genes para codificar flagelo y estos se expresan bajo ciertas condiciones *in vitro* (European Commission 2001; Fretin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2013). La temperatura óptima de crecimiento es de 36-38° C, el pH de 6.8 y son aerobios, pero pueden crecer en condiciones de 5-10% de CO₂ (European Commission 2001). Las especies de *Brucella* poseen 2 cromosomas de 2.1 Mb y 1.2 Mb aproximadamente, excepto *B. suis* biovar 3 que presenta un solo cromosoma

de 3.1 Mb (Jumas-Bilak *et al.*, 1998). Las especies de *Brucella* se presentan naturalmente como lisas (S-LPS), presentando un LPS con una cadena O completa y cepas rugosas (R-LPS) con un LPS ausente o mínimo de cadena O (Haag *et al.*, 2010; Ducrotoy *et al.*, 2016). Las especies naturalmente rugosas son *B. canis* y *B. ovis* (Li *et al.*, 2013; Martirosyan *et al.*, 2011). Son bacterias intracelulares- extracelulares facultativas, se ha descrito la invasión y replicación en células fagocíticas profesionales como macrófagos y células dendríticas y en no profesionales como células epiteliales y trofoblastos. La entrada de *Brucella* a las células sigue sin describirse en su totalidad (von Bargen *et al.*, 2012; Case *et al.*, 2016; Martirosyan *et al.*, 2011). Después de la internación, *Brucella* desarrolla diferentes estrategias para evadir los mecanismos de resistencia del hospedero. Modula el tráfico intracelular de la vacuola contenedora de *Brucella* (BCV por sus siglas en inglés) para evadir la fusión y degradación en el lisosoma; para llegar al retículo endoplásmico (ER) donde es su nicho de replicación (Gorvel J, 2008; Ahmed *et al.*, 2016).

1.2. Factores de virulencia

Factores de virulencia como el Lipopolisacárido (LPS), los glucanos β -1,2 cíclicos (C β G), el sistema de secreción tipo IV (SST4) y sus efectores, son clave fundamental para que *Brucella* llegue a su nicho de replicación y se logre establecer la infección.

El SST4 está codificado por el operon *virB*, es activado rápidamente después de la internación, debido a la acidificación de la BCV en la vía endocítica (Gorvel J *et al.*, 2002; Ke *et al.*, 2015). Se han identificado aproximadamente 15 efectores del SST4, de la mayoría de estos se desconoce su función biológica. Se sugiere que tienen funciones en los eventos

moleculares como: pérdida de marcadores de endosoma tardío o lisosomales; adquisición de marcadores de ER; interacción con vías secretorias; adquisición de marcadores de autofagosoma y regulación de la activación de algunas vías del sistema inmune (Ke *et al.*, 2015).

Los C β G interactúan extrayendo el colesterol de las balsas lipídicas en la membrana celular del hospedero, esta perturbación modifica la señalización de las vías cAMP-PKA (*Cyclic Adenosin Monophosphate- Protein kinase A*) (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Martirosyan *et al.*, 2011). También se ha observado que los C β G quedan adsorbidos en las balsas lipídicas del lumen de los fagosomas; por lo que se piensa que actúan estabilizando las membranas e impidiendo interacciones proteicas; evitando así, activación de algunas vías del sistema inmune (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005, Haag *et al.*, 2010, von Bargen *et al.*, 2012).

El LPS se encuentra conformado por tres dominios: el Lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O. *Brucella* posee un LPS no clásico comparado con el LPS de enterobacterias como *Escherichia coli* (Cardoso *et al.*, 2006). La estructura bioquímica del LPS de *Brucella*, le permite ser resistente a los efectores anti microbianos del sistema inmune innato, ya que es menos endotóxico que el de las enterobacterias, además es pobre inductor del estallido respiratorio, de especies reactivas de nitrógeno y de secreción de lisozima, además de tener poca influencia en la producción de citocinas proinflamatorias, como Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Interferón (IFN) I y II, así como proteínas anti microbianas como GTPasas de la familia p-47 y péptidos antimicrobianos, es capaz de inhibir la activación del Complemento y es un agonista parcial de la activación del TLR4 (Haag *et al.*, 2010; Lapaque

et al., 2005; Cardoso *et al.*, 2006; Byndloss *et al.*, 2015). La activación parcial del TLR4 se debe al incompleto acoplamiento de las cadenas de ácidos grasos del lípido A con el complejo MD-2 TLR4 (Byndloss *et al.*, 2015).

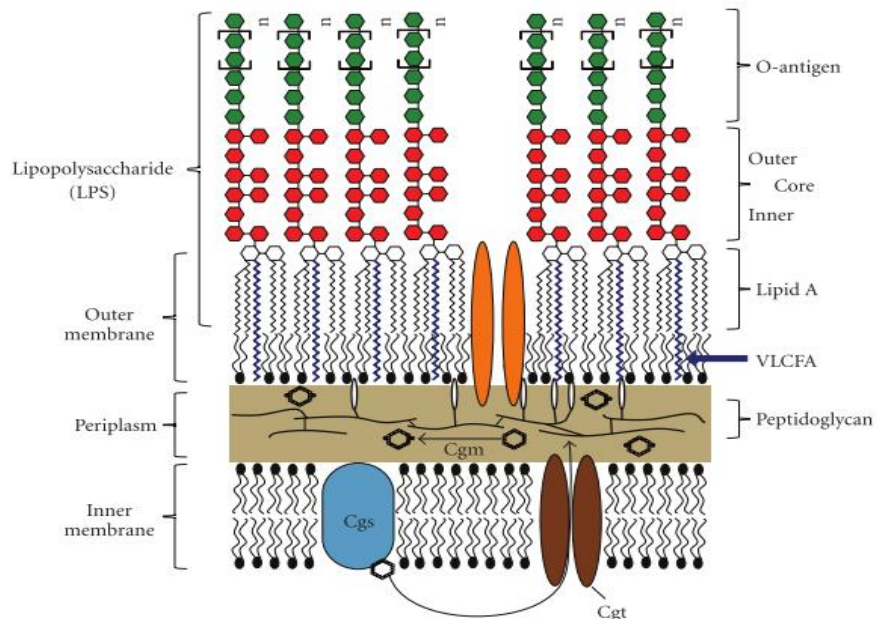


Figura 2. Representación de la envoltura celular de *Brucella*. Está compuesta de una membrana interna, constituida de una bicapa fosfolipídica, y una ME, compuesta en su porción interna de fosfolípidos y en la porción externa de un LPS. El antígeno-O se encuentra orientado al espacio extracelular y es reconocido por la respuesta inmune adaptativa, se encuentra conectado al núcleo, molécula compuesta de azúcares. El lípido A forma un ancla hidrofóbica, contiene ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA). Los C8G son sintetizados por la Cgs en la membrana interna y transportados al periplasma por el transportador-ABC Cgt, donde son modificados con dos residuos succinilos por Cgm (Haag *et al.*, 2010).

1.3. Transito Intracelular

Brucella se comporta como un patógeno intracelular facultativo, utiliza principalmente a los macrófagos como célula hospedera. Se adhiere a la célula vía receptores con residuos de sulfato y ácido siálico, es internada en pocos minutos mediante fagocitosis mediada por receptores. Posterior a la invasión, *Brucella* reside en un compartimiento membranoso llamado la eBCV (*endosomal Brucella-containing Vacuole*) y comienza su maduración. Esta vacuola interactúa con los endosomas tempranos, ya que se pueden detectar proteínas como Rab5, EEA1 (*Early Endosomal Antigen 1*) y TfR (*Transferrin receptor*) en las BCV. Después de 30 min se encuentran proteínas de endosoma intermedio y tardío como LAMP1 (*Lysosomal Associated Membrane Protein 1*), CD63 y Rab7, que demuestran la maduración de la BCV. Posteriormente madura a rBCV (*replicative Brucella-containing Vacuole*), en donde se pueden encontrar los marcadores IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1*), Atg9 y Sar1. La rBCV se localiza en los sitios ERES (*Endoplasmic reticulum exit sites*), donde *Brucella* comienza su replicación intracelular. Por último, sucede la biogénesis de la aBCV (*autophagy-related Brucella-containing Vacuole*), adquiriendo proteínas como Beclina 1, ULK1 y ATG14L, la adquisición de estas proteínas facilita el egreso de la bacteria (Celli, 2015; Miller *et al.*, 2017; Gorvel *et al.*, 2002).

1.4. Respuesta inmune contra *Brucella*

Macrófagos, células dendríticas, NK y neutrófilos son las primeras células en responder ante una infección. Las NK son activadas, pero no son esenciales en el control de la infección,

igualmente, la fagocitosis por neutrófilos no estimula la desgranulación, por lo que no juegan un papel importante (Dorneles *et al.*, 2015).

Los macrófagos, juegan un papel fundamental en la infección por *Brucella*, ya que permiten la replicación, sobrevivencia del microorganismo y la diseminación a otros órganos (nódulos linfáticos, bazo, hígado y médula ósea) vía linfática y hematológica. La actividad bactericida de los macrófagos activos es la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que su secreción es inducida por el IFN γ y el TNF α . (Dorneles *et al.*, 2015)

El reconocimiento de los PAMPs, se caracteriza por los receptores Toll-like (TLR) y NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), el primero reconoce lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos, y el NOD reconoce fragmentos de peptidoglicano. Los receptores NOD, no contribuyen al control de la infección por *Brucella*. El reconocimiento de PAMPs por TLRs estimula la activación de MyD88, que a su vez activa a MAP quinasas (ERK, JNK y p38) y la expresión de genes de citocinas proinflamatorias bajo el control del NF- κ B. La activación de TLR2 y TLR4 activan MyD88 vía TIRAP, TLR3 y TLR4 activan la vía TRIF que resulta en la expresión de IFN- β . (Oliveira *et al.*, 2008; Dorneles *et al.*, 2015)

Lipoproteínas de *Brucella* (Omp19 y Omp16) activan al TLR2 en macrófagos murinos, donde se secreta TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10. Pero estudios demuestran que el reconocimiento por TLR2 no juega un papel en el control de la infección. El reconocimiento de DNA por el TLR9, activa una respuesta Th1.

Otro receptor involucrado en la respuesta a la infección por *Brucella*, es el IFNR (IFN tipo I receptor). Este receptor estimula síntesis de IFN- β vía fosforilación de Jak1, la subsecuente

activación de STAT1 y STAT2 y la transcripción de genes con promotor ISRE, como IRF7 y PKR, que a su vez promueven la transcripción de IFN I. *Brucella* induce secreción de IFN I al activar al TLR9, este IFN activa al IFNR para producir mayor cantidad de IFN. Algunos estudios con ratones deficientes en IFNR muestran mayor resistencia a la infección por *Brucella*, por lo que hace falta caracterizar qué papel juega una respuesta por IFN I (Oliveira *et al.*, 2008)

Se ha encontrado que el LPS de *Brucella* se localiza en la superficie celular con el Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en ingles), donde interfiere con la presentación a células T CD4+, ya que en estos macrodominios se conglomeran los MHC-II y el LPS produce un efecto estérico, que impide un reconocimiento suficiente entre el receptor de células T (TCR) y el complejo péptido- MHC-II; aunque no se ha observado este efecto en la presentación de antígenos por el MHC-I (Gorvel *et al.*, 2002, Lapaque *et al.*, 2005; li *et al.*, 2013).

La respuesta inmune contra *Brucella* ha sido caracterizada principalmente en el modelo murino. Durante etapas tempranas de la infección se desarrolla una respuesta tipo cooperadora Th1, con producción de IFN por células NK y Th1. También la secreción de IL-12 y TNF α por macrófagos infectados (Gorvel *et al.*, 2002; Byndloss *et al.*, 2015)

En humanos la respuesta inmune inicial es caracterizada por niveles elevados de citocinas pro inflamatorias asociadas a una respuesta Th1, como la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF α e IFN- γ . Además, *Brucella* induce la secreción de IL-10, por medio de la proteína PrpA, en infecciones de *Brucella* en ratones deficientes de secreción de IL-10, se exhibe una

disminución en la sobrevivencia bacteriana en hígado y bazo (Gorvel *et al.*, 2002; Byndloss *et al.*, 2015).

Durante infecciones crónicas, la respuesta inmune comienza a tener características de una Th2, con aumento en la producción de IL-13 por células T (Gorvel *et al.*, 2002.)

Como ya se mencionó los macrófagos representan la célula blanco para *Brucella*. Se han observado poblaciones de macrófagos diferentes en bazo durante etapas agudas y crónicas. Durante las etapas agudas, predomina la población de macrófagos activados clásicamente (CAM) con capacidad bactericida y proinflamatoria, que se correlaciona con niveles altos de IFN γ y reducción en la sobrevivencia de la bacteria. Durante la etapa crónica, hay un cambio en la población de macrófagos, donde predominan los macrófagos activados alternativamente, que tienen actividad de reparación y no inflamatoria. Este cambio en poblaciones es dependiente de la activación intracelular de PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*). Esta proteína es un receptor nuclear activado por ácidos grasos, asociado a la polarización del fenotipo de macrófagos. Una consecuencia importante de la polarización de estos es el metabolismo celular, ya que usan diferente fuente de carbono y energía. Los CAM utilizan principalmente la glicolisis, por lo que consumen la mayoría de la glucosa intracelular. Por el contrario, AAM obtienen energía por la vía de β - oxidación, degradando ácidos grasos; por lo que se observa una acumulación de glucosa intracelular. *Brucella* utiliza esta glucosa disponible en los AAM para una persistencia crónica (Byndloss *et al.*, 2015).

1.5. Análisis transcripcional de la respuesta a la infección por *Brucella* spp

Debido a la necesidad de entender por completo la interacción patógeno: hospedero, se han utilizado diferentes técnicas para estudiar el perfil transcripcional de diferentes células hospederas y diferentes patógenos; como la secuenciación de RNA (Ácido ribonucleico) y los microarreglos de cDNA (Ácido desoxirribonucleico complementario).

Los microarreglos son una colección de fragmentos de DNA en una superficie sólida, esta herramienta puede ser usada para analizar la expresión diferencial de genes, midiendo el nivel de hibridación entre la sonda y la molécula diana, mediante fluorescencia (Schena *et al.*, 1995; Ramírez *et al.*, 2003).

En un estudio realizado por Eskra *et al.*, (2003) utilizaron los microarreglos para conocer la respuesta molecular a la infección por *B. abortus* en macrófagos de origen murino de la línea celular RAW 264.7 a las 4 horas post infección (p.i.), donde identificaron más de 140 genes alterados; como aumento en los transcritos de citocinas pro inflamatorias y quimiocinas y la inhibición de transcritos de genes involucrados en apoptosis y en tránsito vesicular intracelular (Eskra *et al.*, 2003).

Posteriormente He *et al.*, (2006) utilizaron macrófagos murinos de la línea J774.A1 infectados con *B. melitensis* 16M y evaluaron el transcriptoma a las 0, 4, 8, 24, 48 y 72 horas p.i. Observaron que la mayoría de los cambios en el transcrito sucedían en etapas tempranas de la infección (4 h p.i.) y a las 24-48 horas el transcriptoma regresaba a valores normales (He *et al.*, 2006).

Wang *et al.*, (2011) obtuvieron macrófagos de peritoneo de ratón, realizaron infecciones con cepas de *B. melitensis* de diferente virulencia, la cepa virulenta M28 y la cepa atenuada M5-90 y evaluaron el transcriptoma a las 4 horas p.i. utilizando la técnica de secuenciación de RNA. Los genes con regulación positiva incluían genes relacionados a la respuesta inflamatoria, metabolismo de lípidos, endocitosis, respuesta inmune innata, apoptosis, transporte y adhesión celular. Los genes con regulación negativa fueron relacionados a endocitosis (Wang *et al.*, 2011)

Rossetti *et al.*, (2012) realizaron infecciones por *B. melitensis* 16M en células epiteliales humanas de la línea celular HeLa a las 4 y 12 horas p.i., observaron que a las 12 horas no había alteraciones significativas en el transcriptoma de la célula hospedera, comparándolo con la respuesta a las 4 horas p.i. donde se pudo observar alteración en vías de metabolismo de lípidos, vía de activación del complemento por lectina y diferentes vías de señalización como MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), con esta información del perfil transcripcional, seleccionaron genes específicos para silenciarlos y conocer la alteración al momento de la infección (Rossetti *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Se requieren de estudios transcripcionales de las diferentes cepas de *Brucella melitensis* y de las distintas células hospederas, para poder elucidar esta interacción patógeno hospedero y entender la patogenia y la respuesta a la infección. Los microarreglos proporcionan una lectura global de la expresión genética y facilitan la selección de genes para su análisis individual.

En los trabajos realizados por otros grupos de investigación, se evaluó la expresión del transcriptoma exclusivamente de macrófagos de origen murino y células epiteliales humanas infectadas con *B. melitensis* 16M. Por esto, es necesario la evaluación de macrófagos de origen humano infectados con las cepas de *B. melitensis* 133, 16M y LVM31 (*B. melitensis omp31::kan*)

3. HIPÓTESIS

La infección de macrófagos humanos de la línea THP-1 con las cepas de *Brucella melitensis* 16M, 133 y LVM31, resultará en un perfil transcripcional diferente en cada infección; se observará en la infección con la mutante una regulación positiva de genes relacionados a inflamación, respuesta inmune innata y apoptosis, en contraste a la infección con las cepas BM133 y BM16M.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión génica de macrófagos de la línea celular THP-1, infectados con *Brucella melitensis* 16M, 133 y LVM31, mediante la técnica de microarreglos, para identificar las diferencias en el transcrito durante etapas tempranas de la infección.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

-Realizar la infección de macrófagos de la línea THP-1 con *Brucella melitensis* 16M, *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* LVM31

-Extraer el RNA de los macrófagos y se hibridará el cDNA en los microarreglos de DNA humano 10K

-Analizar y comparar la expresión genética.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Cultivo Celular

Se utilizaron monocitos de origen humano de la línea celular THP-1 ATTC 9184[®] para los ensayos de infección. Se mantuvieron en medio RPMI-1640 (GIBCO-Invitrogen[®]) suplementado con 0.45% de glucosa (BD BIOXON[®]), 25 mM de HEPES (USB[®]), 10% de suero fetal bovino (GIBCO[®]), 2 mM de L-glutamina (GIBCO[®]), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO[®]) y 0.05 mM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich[®]) a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

6.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas *Brucella melitensis* 133 biovariedad 1 (Cepa silvestre mexicana), *B. melitensis* 16M (cepa tipo) y *B. melitensis* LVM31 (mutante de la cepa 133 con inactivación del gen *omp31*) para los ensayos de infección. Tanto para las cinéticas como para las infecciones se sembraron en caldo Brucella (Becton, Dickinson[®]) en un tubo cónico de 15 mL y se incubaron a 1 xg durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente se realizó una dilución 1/50, sembrando 100 μ L del cultivo primario en 4.9 mL de caldo Brucella en un tubo cónico de 15 mL y se incubaron a 1 xg a 37°C durante diferentes tiempos. Para los conteos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) se sembraron 20 μ L en agar Brucella (Becton, Dickinson[®]) y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 72 horas. El manejo de estas cepas se realizó en la Unidad de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

6.3. Cinética de crecimiento de *Brucella melitensis* 133, 16M y LVM31

Se determinó la hora del cultivo secundario en la que la bacteria se encuentre en fase logarítmica tardía y posteriormente se determinó el número de UFC para realizar la infección (Rossetti *et al.*, 2009).

Para la identificación de la fase logarítmica tardía de crecimiento, se realizaron lecturas de las UFC a diferentes tiempos del cultivo. Se cultivaron en 5 ml de caldo Brucella, 10 μ L de cada cepa a 1 xg, 37 °C por 24 horas en un tubo cónico de 15 mL. Posteriormente a las 24 horas se realizó un cultivo secundario con una dilución 1/50 del cultivo inicial, se sembró 100 μ L en 4.9 mL de caldo Brucella, y se incubó a 1 xg, 37°C. Posteriormente se realizaron conteos de UFC, a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 horas del cultivo, se tomaron 20 μ l del cultivo y se homogeneizó en 180 μ L de caldo Brucella, para realizar diluciones decuples seriadas hasta la dilución 10^{-9} , de cada dilución se sembraron 3 gotas de 20 μ L cada una en agar Brucella y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera con 5% de CO₂. A las 72 horas de incubación, se realizaron las lecturas del número de UFC, se graficaron y se determinó para cada cepa bacteriana la fase logarítmica. Cada cinética se realizó por triplicado.

6.4. Ensayos de infección

Los monocitos THP-1 se crecieron en placas de 6 pozos, donde a cada pozo se colocaron 3 x 10^6 células con PMA (phorbol 12-miristato 13- acetato) (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 437.5 nM durante 48 horas, para llevar a cabo la diferenciación de

monocitos a macrófagos. Posteriormente se retiró el medio con PMA y se colocó medio suplementado sin PMA y se incubaron 24 horas.

Las infecciones con cada cepa bacteriana se llevaron a cabo con una MOI 100:1. Se colocó el inóculo necesario de cada cultivo bacteriano en RPMI solamente suplementado con SFB 10% y piruvato de sodio, en cada pozo con los macrófagos diferenciados. Se centrifugó la placa a 896 *xg por* 10 min a 4 °C y se incubó por 1 h a 37 °C con una atmósfera del 5% de CO₂, se retiró el medio RPMI con bacteria y se colocó medio RPMI con Gentamicina (50mg/ml) (GIBCO®) para eliminar las bacterias no fagocitadas. Se incubó durante 2 y 4 h.

6.5. Determinación de sobrevivencia intracelular

Después del tiempo de incubación de 2 o 4 h, se retiró el medio de cada pozo y se realizaron 2 lavados con PBS estéril. Se colocó 500 µL de Tritón (Sigma-Aldrich®) 0.1% estéril y se incubó en la placa por 10 min a temperatura ambiente. Se homogeneizó y se tomaron 20 µL y se colocaron en 180 µl de caldo Brucella, se prosiguió a realizar diluciones decuples seriadas para realizar la metodología previamente descrita para el conteo de UFC, se realizó por triplicado.

6.6. Extracción de RNA

Posteriormente del tiempo de incubación de 2 o 4 h, se retiró el medio de cada pozo y se colocó 1 mL de TRIzol (Invitrogen®). Se homogeneizó en el pozo para desprender los macrófagos adheridos a la placa. Se colocó esta mezcla en un tubo cónico de 1.5 mL y se

congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El procedimiento de extracción de RNA se realizó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un gabinete de bioseguridad clase II con puntas con filtro y material estéril. Se colocaron $200\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo (J.T. Baker- Fisher Scientific[®]), se homogenizó por inversión 8 veces y se centrifugó a $3800\text{ }xg$ durante 15 min; se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo cónico de 1.5 mL y se agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio (Invitrogen[®]) 3M, pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol (Merck[®]) al 100%, se homogeneizó con la pipeta y se centrifugó a $4500\text{ }xg$ durante 20 min; se decantó y se adicionó $500\text{ }\mu\text{L}$ de etanol al 75% con agua DEPC (Diethyl pirocarbonato)(Sigma-Aldrich[®]), se centrifugó a $1500\text{ }xg$ por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla y se suspendió en $40\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific[®]) y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se hicieron mezclas de repeticiones de infecciones con el fin de aumentar la concentración de RNA y de disminuir efectos de experimentos individuales.

El producto de la extracción fue evaluado en un gel de agarosa (Thermo Scientific[®]) al 1% en amortiguador TAE y visualizado en un transiluminador de luz UV.

6.7. Transcripción inversa

Se realizó la generación del DNA complementario a partir del RNA obtenido, incorporando el Aminoallyl-dUTP. Se realizaron dos mezclas de reactivos por separado para llevar a cabo la reacción a las que se les denominó Mezcla A y Mezcla B (Cuadro 1 y 2) por cada RNA obtenido. Primero se preparó la mezcla A (Cuadro 1), se homogeneizó varias veces con la micropipeta y se incubó la reacción a 65°C por 10 min.

Cuadro 1. Mezcla A para reactivos de Transcripción Inversa

Mezcla A	
Reactivo	Cantidad
RNA total	1 µg
Oligo (dT) (1 µg/ µl)	1.0 µl
Hexameros al azar (3 µg/ µl)	1.0 µl
Agua con DEPC	c.b.p. 19 µl

Por otro lado, se realizó la mezcla B (Cuadro 2) y se incorporó con la mezcla A, se homogeneizó, se centrifugó a 4500 *xg* durante 30 s y se incubó 10 min a 25 °C, luego 2 h a 42 °C.

Cuadro 2. Mezcla B para reactivos de Transcripción Inversa

Mezcla B	
Reactivo	Cantidad
5X RT Reaction Buffer (SuperScript II)	8.0 µl
MgCl (25 mM)	2.0 µl
Aminoallyl-dNTP mix (dATP,dCTP y dGTP 5mM; dTTP 1.5 mM; AA-dUTP 3.0 mM)	4.0 µl
DTT (0.1 M)	4.0 µl
SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/ µl)	3.0 µl
Volumen final	21.0 µl

Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis del RNA; se agregó 5 μ l de NaOH 1N y 1 μ l de EDTA 0.5 M, se incubó 10 min a 65 °C y se añadió 25 μ l de HEPES 1 M, pH 7.5. Finalmente, se realizó la purificación del aacDNA, (aminoalil cDNA) se añadió 7 μ l de Acetato de sodio 3 M y 400 μ l de *binding buffer*, se homogeneizó con micropipeta y se colocó en una columna Qiagen®, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 5200 *xg* durante 1 min. Se lavó con 500 μ l de etanol al 80% y se centrifugó a 5200 *xg* durante 1 min, repitiendo este paso tres veces. En un nuevo tubo, se colocó la columna para recuperar el aacDNA, se agregó 30 μ l de agua con DEPC al 0.1%; se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugó a 5200 *xg* durante 1 min, repitiendo este paso 2 veces. La pastilla se secó en un equipo concentrador de vacío (*Integrated Speed Vac® System ISS110, Savant®*) y se suspendió en 4.5 μ l de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9.0) (Ramírez *et al.*, 2003).

6.8. Marcaje y purificación del aacDNA

Se realizó la conjugación de los fluoróforos Alexa₅₅₅ y Alexa₆₄₇ con el aacDNA. Primero se disolvieron los colorantes en 4.5 μ l de Dimetil sulfóxido (DMSO), se homogeneizaron con el vórtex y se agregó a el aacDNA, se mezcló con micropipeta y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente, para realizar la purificación, se añadió 71 μ l de agua, 8 μ l de Acetato de sodio 3 M y 400 μ l de *binding buffer*, se homogeneizó con la micropipeta y se colocó en una columna Qiagen®, se incubó 1 minuto y se centrifugó a 5200 *xg* por 1 min.

Se realizaron tres lavados con 500 µl de etanol al 80% y se centrifugó a 5200 xg por 1 min entre cada lavado. Para remover el exceso de etanol en los tubos, se centrifugó nuevamente por 1 min. En un tubo nuevo se coloca la columna y se añadió 50 µl de agua desionizada estéril, se incubó a temperatura ambiente por 2 min y se centrifugó a 5200 xg durante 1 min, este paso se realizó dos veces (Ramírez *et al.*, 2003).

6.9. Hibridación en los microarreglos de DNA

La hibridación se realizó en microarreglos de DNA de *Homo sapiens* proporcionados por la unidad de microarreglos, IFC-UNAM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los microarreglos utilizados.

Microarreglo de Humano 10K	
Número de genes	10 000
Fuente información	NCBI/GenBank
Tamaño de las sondas	50 mer
Número de aplicaciones por gen	2
Número total de aplicaciones	21,168
Los oligos son fabricados por la compañía MWG	

Se utilizaron 6 microarreglos para evaluar la diferencia en la expresión génica de los macrófagos infectados con las diferentes cepas de *B. melitensis* en distintos tiempos (2 y 4 h post infección) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparaciones en los microarreglos y el marcaje de las muestras utilizadas.

Experimento	Microarreglo	Muestra- Alexa ⁵⁵⁵	Muestra-Alexa ⁶⁴⁷
A	H10K_07_39	Bm133 2 h	Bm16M 2 h
B	H10K_07_40	Bm133 2 h	BmLVM31 2 h
C	H10K_07_41	Bm16M 2 h	BmLVM31 2 h
D	H10K_07_42	Bm133 4 h	Bm16M 4 h
E	H10K_07_43	Bm133 4 h	BmLVM31 4 h
F	H10K_07_44	Bm16M 4h	BmLVM31 4 h

Las laminillas se hidrataron para conseguir una mayor homogeneidad de los puntos de impresión, mediante la exposición a vapor de agua durante 10 segundos por tres ocasiones. Posteriormente se fijó el DNA de las laminillas con dos ciclos de luz UV (0.12 J/cm²) en el entrecruzador de DNA (spectrolinker XI-1500, UV cross linker[®]) y se incubaron en la solución de prehibridación (SSC 5X, SDS 0.1% y BSA 1%) a 2 xg por 1 h a 42 °C.

Se sumergieron en una solución de SDS 0.1%-SSC 2X durante 3 min a temperatura ambiente a 2 xg. Al mismo tiempo las plataformas fueron lavadas con SSC 2X durante 3 min, se incubaron en agua hirviendo por 2 min, en etanol al 95% durante 2 min y por último se centrifugaron a 60 xg durante 5 min.

Se tomaron 25 pmol de cada uno de los aacDNA marcados y se mezclaron dependiendo del experimento, se añadió 24.5 µl de solución de hibridación y c.b.p. 70 µl de TE. Se homogeneizó la mezcla y se incubó a 94 °C por 5 min y a 65 °C por 30 seg; a continuación, se colocó sobre la laminilla cubriendo la superficie con un cubreobjetos. Se colocó en la cámara de hibridación (Corning®) y se incubó sumergido en agua por 18 h a 42 °C. Se lavaron las laminillas en agitación con una solución de SSC 2X-SDS 0.1% a 42 °C, un lavado de SSC1X a temperatura ambiente durante 5 min y un lavado con SSC 0.05X a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, se centrifugó a 60 xg por 5 min para su secado (Ramírez *et al.*, 2003).

6.10. Lectura y cuantificación de fluorescencia.

La lectura de los microarreglos se realizó con el *GenPix 4100^a* (*Molecular Devices*®) y se realizó la cuantificación de la fluorescencia de las imágenes con el software *Array Pro Analyzer*®.

6.11. Análisis y comparación de la expresión de genes

Se utilizó la herramienta bioinformática *GenArise*®, que resta el ruido de fondo, normaliza los datos por zonas con la función de Lowees, determina la media geométrica de las réplicas técnicas y calcula el Z-score que indica a cuantas desviaciones estándar se encuentra cada valor de nuestro conjunto de datos con respecto a la media. Con los gráficos obtenidos del Z-Score se identifican los genes que modificaron su expresión entre las muestras que se comparan.

Finalmente se utilizó la plataforma en línea *DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources 6.8* para clasificar los genes sobre o bajo expresados en vías metabólicas o interacciones moleculares reportadas en la *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)* y su clasificación por su *GO (Gene Ontology)*.

7. RESULTADOS

7.1. Cultivo Celular

Se llevó a cabo el crecimiento y mantenimiento de Monocitos humanos de la línea THP-1 ATCC 9184® a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, en medio RPMI-1640 suplementado. Las células se observan redondeadas, sin proyecciones en su membrana y en suspensión (Fig. 3). Posteriormente se llevó a cabo la diferenciación con PMA, evaluando la morfología celular a las 24, 48 y 72 horas; las células se observaron adheridas a la placa y con proyecciones en su membrana (Fig. 4.)

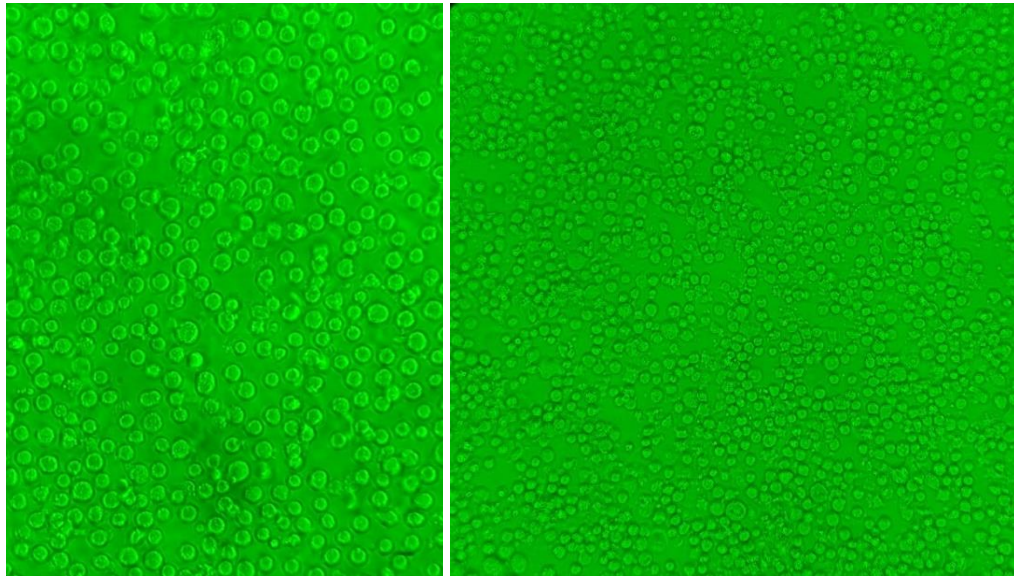


Figura 3. Fotografías de Monocitos humanos de la línea THP-1. Monocitos en suspensión en medio RPMI-1640 suplementado. Morfología circular y con algunas proyecciones de membrana, sin aglutinación y refringentes (izquierda: 400x, derecha: 100x) (Microscopio invertido con luz halógena y filtro verde).

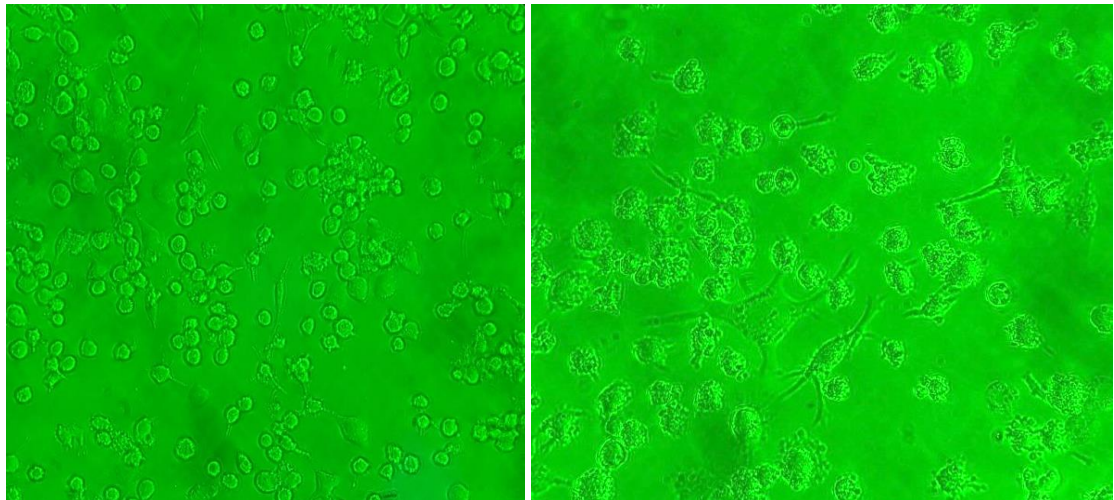


Figura 4. Fotografías de Monocitos humanos de la línea THP-1 diferenciados a macrófagos. Macrófagos en monocapa en medio RPMI-1640 suplementado, 72 horas post PMA. (aumento 400x) (Microscopio invertido con luz halógena y filtro verde).

7.2. Cinética bacteriana

Se determinó la curva de crecimiento de las 3 cepas, así como la hora de cultivo donde la bacteria se encuentra en fase logarítmica tardía, mediante la metodología previamente descrita.

En las figuras 5, 6 y 7 se muestran los resultados de forma gráfica de 3 repeticiones en UFC.

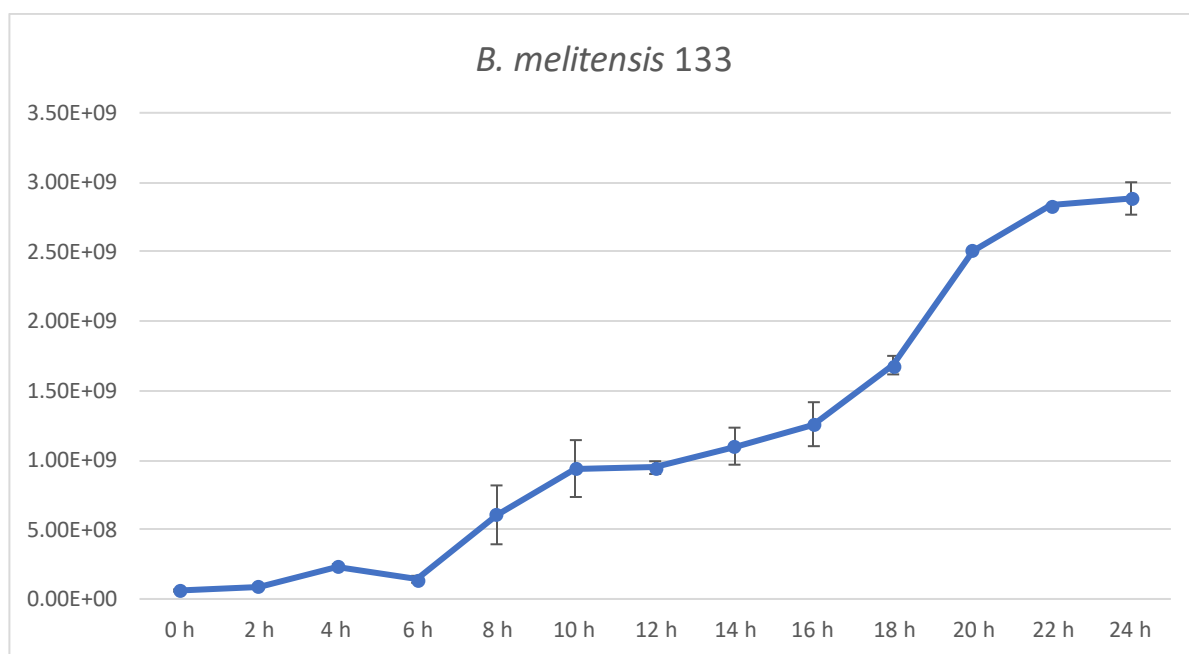


Figura 5. Valores de UFC obtenidos a diferentes tiempos de la cepa *B. melitensis* 133 de las 0 a las 24 h.

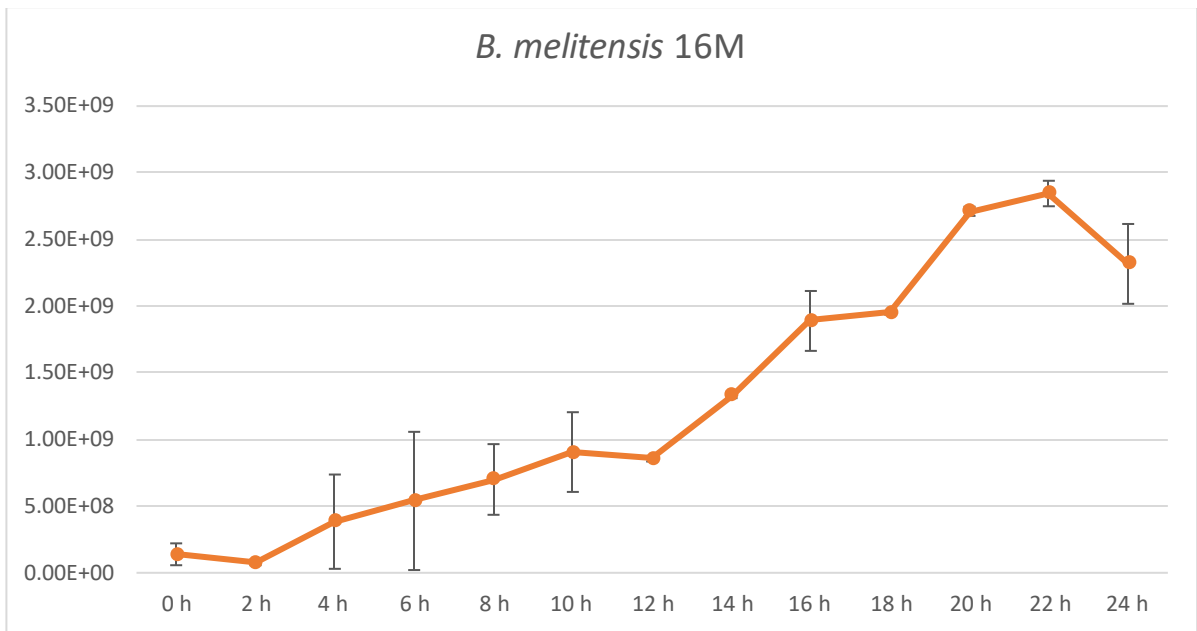


Figura 6. Valores de UFC obtenidos a diferentes tiempos de la cepa *B. melitensis* 16M de las 0 a las 24 h

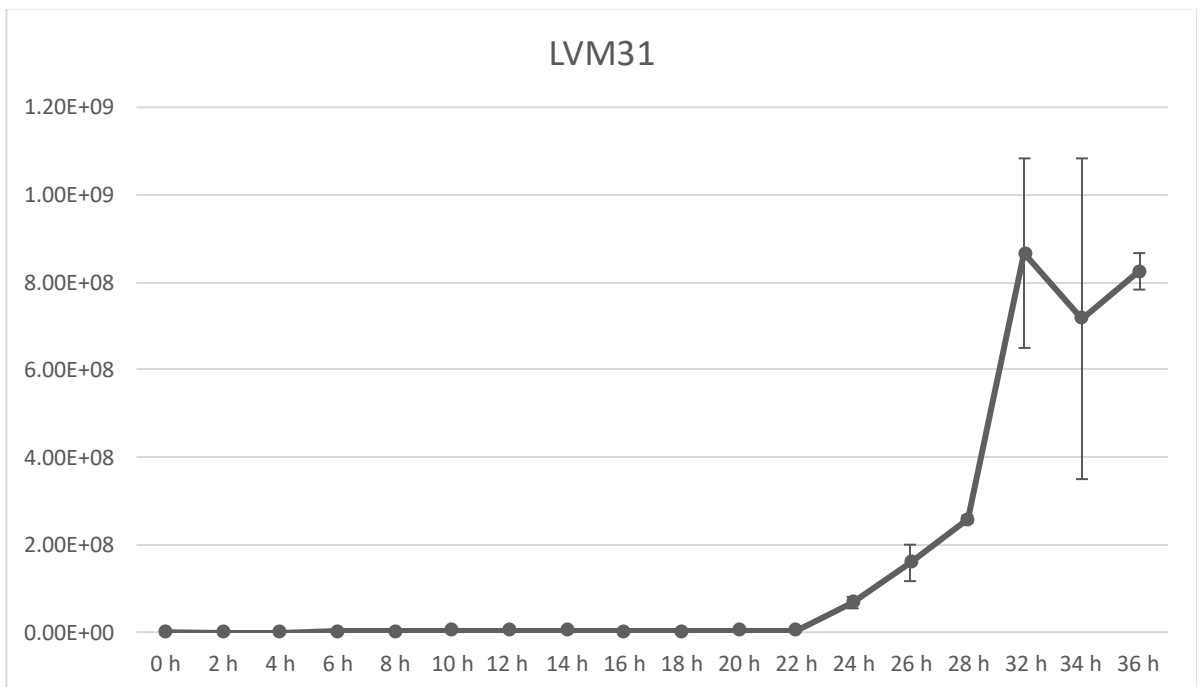


Figura 7. Valores de UFC obtenidos a diferentes tiempos de la cepa *B. melitensis* LVM31 de las 0 a las 36 h

Se pueden observar que las curvas tienen un comportamiento sigmoide. La determinación de la fase logarítmica para la cepa de *B. melitensis* 133 comienza a las 6 h del cultivo y termina a las 20 h; para la cepa *B. melitensis* 16M comienza a las 6 h y termina a las 18 h del cultivo. La cepa mutante presenta un crecimiento más lento, es por esto que la curva se realizó hasta las 36 h y la logarítmica se observa de las 24 h a las 32 h. De estos resultados se decidió usar a la cepa *B. melitensis* 133 a las 18 h del cultivo secundario, a la cepa 16M a las 16 h y la cepa LVM31 a las 28 h, para llevar a cabo las infecciones. A las 18 h del cultivo de la cepa BM133 se contabilizaron 1.68×10^9 UFC por mL de cultivo, a las 16 h del cultivo de la cepa BM16M se contabilizaron 1.89×10^9 UFC por mL y a las 28 h del cultivo de la cepa BMLVM31 se contabilizaron 2.58×10^8 UFC por mL.

7.3. Determinación de la sobrevivencia intracelular

Se llevó a cabo el protocolo de ensayo de protección a la gentamicina para determinar el número de UFC que hayan sido fagocitadas y que hayan sobrevivido a las 2 y 4 h p.i. Se realizaron las lecturas después de una incubación por 72 h.

Se encontró un comportamiento similar en el número de UFC a las 2 y 4 h.p.i., ya que ninguna de estas cepas tuvo un aumento a las 4 horas. Se obtuvieron 75 000 UFC a las 2 h.p.i. de la cepa BM133 y 72 222 UFC por 2.5×10^6 células diferenciadas. En el caso de la cepa BM16M a las 2 h.p.i. se obtuvieron 66 666 UFC y a las 4 h.p.i. 72 222 UFC por 2.5×10^6 de células diferenciadas. En las infecciones realizadas con la cepa de BM LVM31, se obtuvieron los resultados de bacterias fagocitadas más bajos, a las 2 h.p.i. se obtuvieron 5 555 UFC y a las 4 h.p.i. 13 888 UFC por 2.5×10^6 células diferenciadas (Fig. 8).

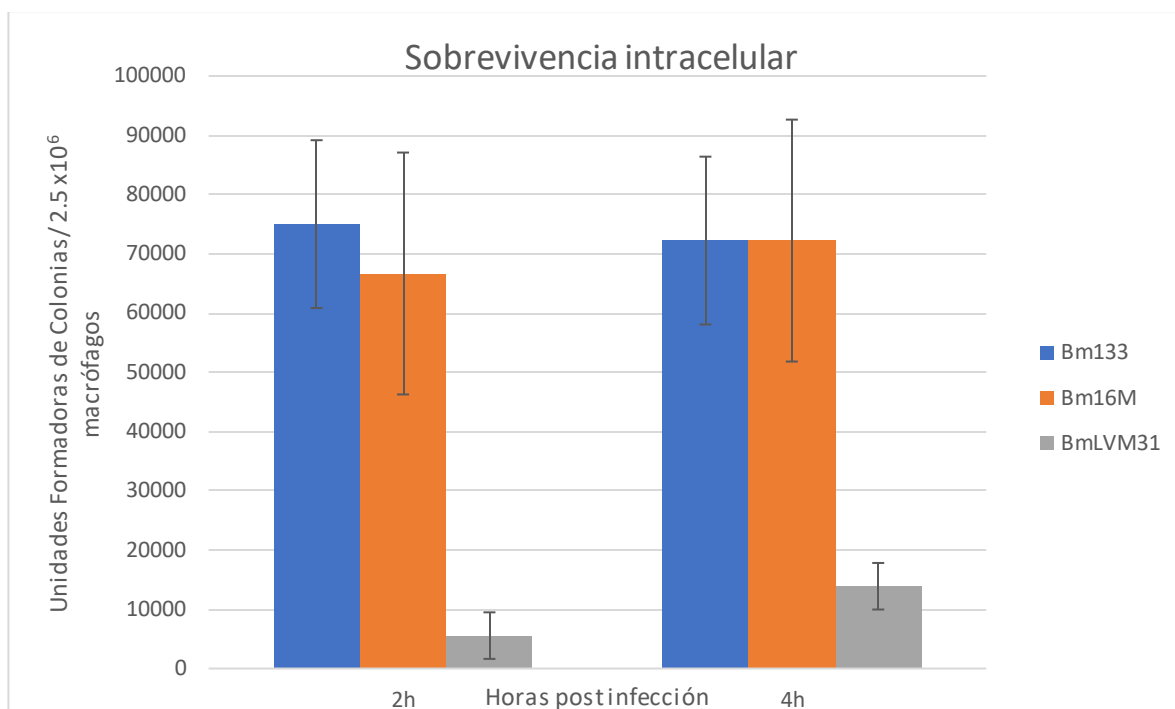


Figura 8. Valores de UFC obtenidos a las 2 y 4 h p.i. de las cepas de *B. melitensis* en el ensayo de protección a la gentamicina. El gráfico representa el número de UFC por cada 2.5×10^6 macrófagos y las horas post infección. La barra en azul representa la cepa BM133, la naranja la cepa BM16M y en gris la mutante BMLVM31.

7.4. Extracción y visualización de RNA de macrófagos infectados

Para evaluar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE. Como se puede observar en la Figura 9, en todas las muestras se observan las bandas ribosomales (28S, 18S y 5S). Así mismo se observó que la banda ribosomal 28 S es dos o más veces más intensa que la banda 18S, criterio que se utiliza para determinar la integridad del RNA (Fig. 9).

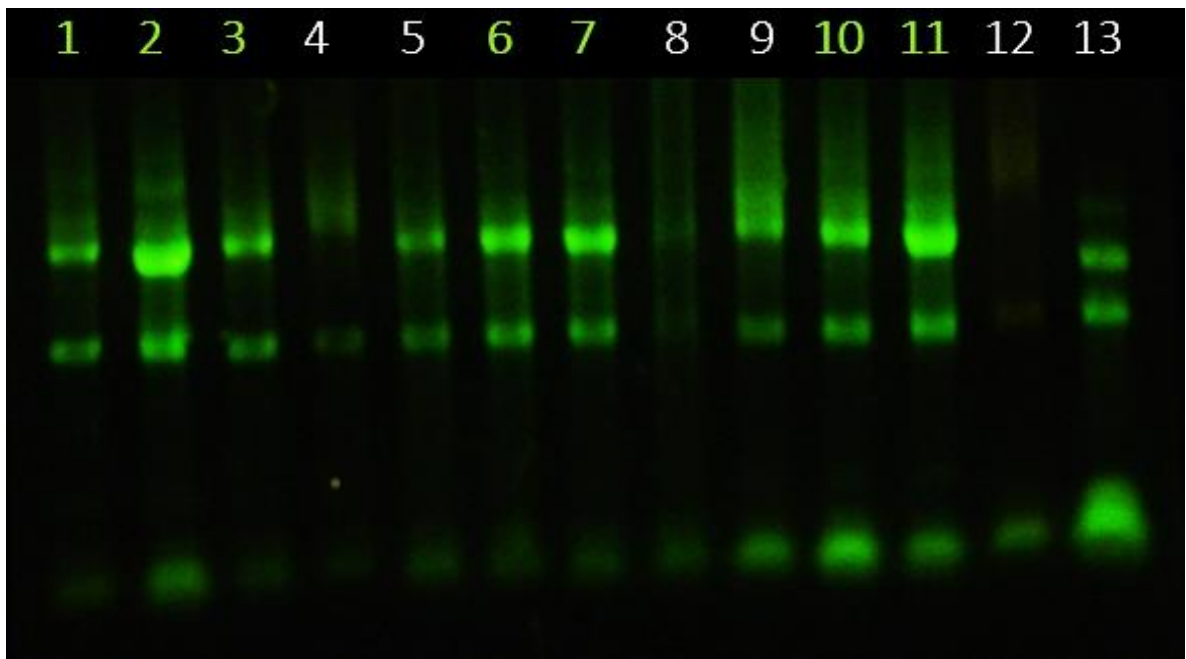


Figura 9. Extracción de RNA total. Fotografía de un gel de agarosa al 1%. Carril 1: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 2 h p.i. con BM133. Carril 2: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 4 h p.i. con BM133. Carril 3: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 2 h p.i. con BM16M. Carril 4: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 2 h p.i. con BM16M. Carril 5: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 4 h p.i. con BM16M. Carril 6: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 4 h p.i. con BM16M. Carril 7: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 2 h p.i. con BMLVM31. Carril 8: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 4 h p.i. con BMLVM31. Carril 9: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 2 h p.i. con BMLVM31. Carril 10: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos 4 h p.i. con BMLVM31. Carril 11: RNA total de 5×10^6 macrófagos humanos control negativo de infección 2 h p.i. Carril 12: RNA total de 1×10^6 macrófagos humanos. Carril 13: RNA total de levadura como control de electroforesis. (Gel teñido con bromuro de etidio).

7.5. Análisis y comparación de la expresión genética

Se utilizó el software *GenArise*[®] para identificar los genes que de manera significativa modificaron su expresión. Se agruparon los genes dependiendo del valor Z-Score que obtuvieron. Los genes entre -1.5 y 1.5 se consideran sin cambio en su expresión. Para los genes con valores mayores a 1.5 sobreexpresados, menores que -1.5 sub expresados y con un valor mayor que 2 o menor que -2 se consideran con un cambio estadísticamente confiable en su expresión. Posteriormente se realizó el análisis y búsqueda de las vías metabólicas alteradas y ontología (componente celular y proceso biológico) de los genes seleccionados utilizando la plataforma en línea *DAVID*.

7.5.1. Experimento A: H10K_07_39 Bm133 y Bm16M 2 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 2.91% (291) tuvieron una sobre expresión y el 1.6% (160) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 6.94 % (694) sobre expresados y el 5.17% (517) sub expresados.

7.5.2. Experimento B: H10K_07_40 Bm133 y BmLVM31 2 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 3.14% (314) tuvieron una sobre expresión y el 1.5% (150) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 7.26 % (726) sobre expresados y el 4.84% (484) sub expresados.

7.5.3. Experimento C: H10K_07_41 Bm16M y BmLVM31 2 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 2.49% (249) tuvieron una sobre expresión y el 2.32% (232) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 6.43 % (643) sobre expresados y el 5.85% (585) sub expresados.

7.5.4. Experimento D: H10K_07_42 Bm133 y Bm16M 4 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 2.29% (229) tuvieron una sobre expresión y el 2.33% (233) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 6.10 % (610) sobre expresados y el 5.82% (582) sub expresados.

7.5.5. Experimento E: H10K_07_43 Bm133 y BmLVM31 4 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 3.07 % (307) tuvieron una sobre expresión y el 1.94 % (194) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 6.71 % (671) sobre expresados y el 4.95 % (495) sub expresados.

7.5.6. Experimento F: H10K_07_44 Bm16M y BmLVM31 4 horas p.i.

De un total de 10 000 genes analizados, utilizando el valor Z mayor a 2 o -2, el 2.36% (236) tuvieron una sobre expresión y el 2.19% (219) una sub expresión. Utilizando el valor mayor a 1.5 o menor a -1.5, el 5.90 % (590) sobre expresados y el 5.58% (558) sub expresados.

7.6. Análisis de vías metabólicas

Con la plataforma *DAVID* se analizaron las vías metabólicas alteradas para los genes seleccionados con un valor mayor a 2 o menor que -2, de cada experimento y que involucren más de 3 genes en la vía.

Las vías metabólicas alteradas para cada experimento se enlistan en los siguientes cuadros:

Cuadro 5. Vías metabólicas alteradas del experimento A.

Experimento A: BM133 VS 16M 2H	
Vías sobre expresadas	Genes involucrados
Vía de señalización cAMP	7
Vía de señalización PPAR	4
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Vía de señalización de PI3K-Akt	9
Vía de señalización de MAPK	7
Infección por Herpes simple	5
Leishmaniasis	4

Cuadro 6. Vías metabólicas alteradas del experimento B.

Experimento B: BM133 VS LVM31 2H	
Vías Sobre expresadas	Genes involucrados
Vías de señalización cAMP	7
Diferenciación de osteoclastos	6
Migración transendotelial de leucocitos	6
Vías de señalización de esfingolípidos	5
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Vías de señalización de PI3K-Akt	9
Vías en cáncer	7
Metabolismo de colina en cáncer	4

Cuadro 7. Vías metabólicas alteradas del experimento C.

Experimento C: BM16M VS LVM31 2H	
Vías Sobre expresadas	Genes involucrados
Sin vías Sobre expresadas	0
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Vías de señalización MAPK	9
Guía de Axones	5
Hepatitis	5

Cuadro 8. Vías metabólicas alteradas del experimento D.

Experimento D: BM133 VS BM16M 4H	
Vías Sobre expresadas	Genes involucrados
Vía de señalización MAPK	7
Carcinogénesis viral	6
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Vías metabólicas	26
Vía de señalización Ras	8
Diferenciación de osteoclastos	7
Influenza A	7
Secreción pancreática	5
Vía señalización VEGF	4
Vía señalización Fc épsilon RI	4

Cuadro 9. Vías metabólicas alteradas del experimento E.

Experimento E: BM133 VS BMLVM31 4H	
Vías Sobre expresada	Genes involucrados
Influenza A	9
Legionelosis	5
Esclerosis lateral amiotrófica ALS	4
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Vía de señalización PI3K-Akt	8

Transportadores ABC	4
Señalización PPAR	4
Metabolismo de drogas- citocromo P450	4
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	4
Carcinogénesis química	4

Cuadro 10. Vías metabólicas alteradas del experimento F.

Experimento F: BM16M VS BMLVM31 4H	
Vías Sobre expresadas	Genes involucrados
Vías metabólicas	26
Vías Sub expresadas	Genes involucrados
Señalización Rap1	8
Señalización PPAR	4
Uniones adherentes	4

De las vías metabólicas alteradas por BM16M comparado con BM133 no se obtuvieron vías sobre expresadas, ni sub expresadas a las 4 h p.i.

7.7. Análisis de Componentes celulares

Con el software *DAVID* se analizaron de cada experimento, los componentes alterados de los genes con valor mayor a 2 o -2 y con 4 o más genes involucrados.

Cuadro 11. Componentes celulares alterados del experimento A

Experimento A: BM133 VS 16M 2H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Exosoma extracelular	47
Membrana	37
Región perinuclear del citoplasma	16
Cuerpo neuronal celular	9
Vesícula extracelular	4
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados

Núcleo	57
Citoplasma	56
Citosol	37
Exosoma extracelular	31
Membrana de Retículo Endoplásmico	13
Membrana intracelular de organelos	9
Proyección neuronal	6
Melanosoma	5
Envoltura nuclear	5
Membrana de organelos	4
Membrana de vesículas citoplásmicas	4

Cuadro 12. Componentes celulares alterados del experimento B

Experimento B: BM133 VS BMLVM31 2H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Componentes integrales de membrana	80
Membrana	40
Componentes integrales de membrana plasmática	32
Cuerpo neural celular	9
Vesícula sináptica	5
Membrana de Golgi cis	4
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados
Citoplasma	48
Citosol	32
Componentes integrales de membrana plasmática	17
Membrana de retículo endoplásmico	13
Matriz extracelular	6
“Speck” nuclear	5
Proyección neuronal	5
Membrana de vesículas citoplásmicas	4

Cuadro 13. Componentes celulares alterados del experimento C

Experimento C: BM16M vs BMLVM31 2H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Mitocondria	20
Complejo de factor de transcripción	7

Región telomérica, cromosoma	3
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados
Núcleo	84
Citoplasma	73
Nucleoplasma	51
Citosol	48
Nucleolo	18
Membrana de retículo endoplásmico	16
Membrana intracelular de organelos	15
Adhesión focal	12
Envoltura nuclear	6
Red trans-Golgi	5
Membrana de vesículas citoplasmáticas	5

Cuadro 14. Componentes celulares alterados del experimento D

Experimento D: BM133 VS 16M 4H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Citoplasma	57
Cuerpo neuronal	8
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados
Núcleo	76
Membrana plasmática	56
Citosol	52
Mitocondria	27
Membrana de retículo endoplásmico	17
Retículo endoplásmico	16
Proyección neuronal	7
Cuerpo medio	6
Membrana basolateral	6
Axón	6
Melanosoma	5
Huso	5
Red trans-Golgi	5
Envoltura nuclear	5
Célula	4

Cuadro 15. Componentes celulares alterados del experimento E

Experimento E: BM133 VS LVM31 4H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Citoplasma	83
Membrana plasmática	67
Nucleoplasma	51
Membrana	42
Región extracelular	35
Componente integral de membrana plasmática	32
Espacio extracelular	31
Región perinuclear del citoplasma	15
Dendrita	9
Célula	6
Vesícula extracelular	4
Complejo de factor de transcripción RNA polimerasa II	4
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados
Citosol	44
Membrana	33
Mitocondria	19
Componente integral de membrana plasmática	19
Membrana de retículo endoplasmico	17
Aparato de Golgi	14
Membrana de organelos intracelulares	10
Membrana de Golgi	10
Centrosoma	8
Envoltura nuclear	7
Matriz extracelular	7
Membrana basolateral	6
“Speck” nuclear	6
Paso 2 catalítico del spliceosoma	4
Complejo spliceosoma	4
Melanosoma	4
Membrana de endosoma temprano	4

Cuadro 16. Componentes celulares alterados del experimento F

Experimento F: BM16M VS LVM31 4H	
Componentes celulares sobre expresados	Genes involucrados
Membrana plasmática	58
Nucleoplasma	41
Exosoma extracelular	39
Membrana	36
Componente integral de membrana plasmática	26
Superficie celular	16
Membrana de Golgi	14
Dendrita	10
Cuerpo neuronal	8
Lumen de retículo endoplásmico	7
Cromatina nuclear	7
Membrana lisosomal	7
Membrana de endosoma temprano	5
Complejo receptor	5
Lamelipodio	5
Membrana vesicular fagocítica	4
Componentes celulares sub expresados	Genes involucrados
Núcleo	73
Citoplasma	68
Nucleoplasma	44
Exosoma extracelular	44
Citosol	43
Membrana	30
Membrana intracelular de organelos	19
“Speck” nuclear	8
Unión adherente célula -célula	8
Matriz extracelular proteica	7
Cuerpo medio	6
Membrana nuclear	6
Proyección neuronal	6
Complejo receptor	5
Membrana de organelos	4
Melanosoma	4
Huso de microtúbulos	4
Puente intercelular	4

7.8. Análisis de Procesos Biológicos

Con el software *DAVID* se analizaron de cada experimento, los procesos biológicos alterados de los genes con valor mayor a 2 o -2 y con 4 o más genes involucrados.

Cuadro 17. Procesos biológicos alterados en el experimento A.

Experimento A: BM133 VS 16M 2H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Regulación positiva de transcripción del promotor de RNA polimerasa II	20
Transcripción del promotor de RNA polimerasa II	14
Regulación negativa del proceso apoptótico	13
Regulación negativa de proliferación celular	12
Regulación positiva de proliferación celular	12
Señalización de transducción intracelular	11
Cascada MAPK	8
Regulación de proliferación celular	7
Organización de actina del citoesqueleto	6
Regulación positiva de la concentración de calcio citosólico	6
Coagulación de sangre	6
Regulación positiva de migración celular	6
Regulación de estabilidad proteica	5
Respuesta a estrés en retículo endoplásmico	5
Quimiotaxis	5
Regulación positiva de secreción del citocromo C de mitocondria	4
Transporte de protones	4
Vía de señalización de activación del receptor acoplado a proteína G del adenilato ciclasa	4
Respuesta celular al estrés oxidativo	4
Regulación negativa de la actividad de endopeptidasa en el proceso apoptótico	4
Respuesta a nutrientes	4
Regulación positiva de fosforilación de peptidil-tirosina	4
Activación de actividad de endopeptidasa tipo cisteína involucrada en el proceso apoptótico	4

Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Regulación negativa del proceso apoptótico	9
Respuesta inflamatoria	8
Reparación del DNA	7
Morfogénesis de la estructura anatómica	5
Desfosforilación peptidil-tirosina	5
Respuesta de defensa a virus	5
Vía de señalización de interferón tipo I	4
Desfosforilación proteica	4

Cuadro 18. Procesos biológicos alterados en el experimento B.

Experimento B: BM133 VS LVM31 2H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Regulación positiva de transcripción del promotor de la RNA polimerasa	21
Regulación negativa de proliferación celular	14
Transcripción del promotor de la RNA polimerasa	13
Regulación negativa del proceso apoptótico	11
Migración leucocitaria	7
Regulación de proliferación celular	6
Regulación del ciclo celular	5
Regulación de adhesión celular	4
Beta oxidación de ácidos grasos	4
Vía de señalización del receptor acoplado a proteína G del adenilato ciclasa	4
Regulación negativa de fosforilación proteica	4
Respuesta celular al estrés oxidativo	4
Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Regulación negativa del proceso apoptótico	10
Transporte de proteínas	8
Espermatogénesis	7
Transmisión química sináptica	6
Señalización célula-célula	6
Regulación de la señal de transducción del mediador clase p53	5

Vía de señalización del receptor unido a proteína G	4
Respuesta a heridas	4
Vía de señalización de interferón tipo 1	4
Desfosforilación proteica	4

Cuadro 19. Procesos biológicos alterados en el experimento C.

Experimento C: BM16M VS LVM31 2H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Regulación positiva de transcripción del promotor de RNA polimerasa II	18
Regulación negativa del proceso apoptótico	11
Regulación negativa de proliferación celular	10
Fosforilación proteica	10
Desarrollo del sistema nervioso central	7
Proceso viral	7
Ensamblaje de complejos proteicos	5
Adhesión celular homofílica vía membrana plasmática	5
Regulación negativa de autofagia	4
Organización de filamentos de actina	4
Respuesta a estrés de retículo endoplásmico	4
Homeostasis redox celular	4
Desarrollo muscular	4
Regulación positiva de la actividad de unión del factor de transcripción de secuencias DNA específicas	4
Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Regulación negativa del proceso apoptótico	11
Adhesión celular	10
Guía de axón	8
Señalización célula-célula	8
Transporte transmembranal	7
Desfosforilación proteica	6
Transporte mediado por vesículas	6
Percepción visual	6
Respuesta a heridas	5
Exocitosis	5

Desfosforilación peptidil-tirosina	5
Regulación negativa de la actividad de quinasa	5
Transcripción viral	5
Vía de señalización mediada por citocinas	5
Regulación positiva de polimerización de filamentos de actina	4
Vía de señalización de interferón I	4

Cuadro 20. Procesos biológicos alterados en el experimento D.

Experimento D: BM133 VS BM16M 4H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Regulación negativa de proliferación celular	11
Proceso viral	8
Reparación de DNA	6
Regulación positiva de la actividad de unión a secuencias específicas de DNA del factor de transcripción	4
Modificación covalente de cromatina	4
Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Proceso apoptótico	12
Proceso metabólico	7
Transmisión química sináptica	7
Respuesta inmune adaptativa	6
Exocitosis	5
Localización proteica en membrana	4
Respuesta a heridas	4
Vía de señalización del receptor acoplado a fosfolipasa C activador de proteína G	4
Respuesta de defensa	4

Cuadro 21. Procesos biológicos alterados en el experimento E.

Experimento E: BM133 VS LVM31 4H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Señal de transducción	27
Regulación negativa del proceso apoptótico	16
Transcripción del promotor de la polimerasa II de RNA	14

Proteólisis	13
Respuesta inflamatoria	11
Respuesta inmune	11
Proceso metabólico lipídico	7
Regulación del proceso apoptótico	7
Desarrollo al sistema esquelético	6
Respuesta a nutrientes	5
Respuesta a estradiol	5
Desgranulación de plaquetas	5
Señalización mediada por fosfatidilinositol	5
Regulación positiva de liberación de citocromo C de mitocondria	4
Regulación negativa de la actividad de unión en secuencia específica de DNA del factor de transcripción	4
Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Proceso apoptótico	10
Regulación negativa del proceso apoptótico	9
Transporte de proteínas	8
Proceso metabólico lipídico	6
Autofosforilación proteica	6
Reparación de DNA	6
Transporte transmembranal	6
Traducción	6
Exocitosis	5
Transcripción viral	5
Desfosforilación proteica	5
Proceso metabólico	5
Regulación de estabilidad proteica	4
Proteína cotraduccional dependiente de SRP dirigida a la membrana	4
Desfosforilación peptidil-tirosina	4
Respuesta a etanol	4

Cuadro 22. Procesos biológicos alterados en el experimento F.

Experimento F: BM16M VS LVM31 4H	
Proceso biológico sobre expresado	Genes involucrados
Proceso de oxido reducción	12
Adhesión celular	10
Estabilización proteica	6
Desarrollo de sistema esquelético	6
Homeostasis redox celular	5
Inicio de la transcripción a partir del promotor de la RNA polimerasa II	5
Memoria de largo plazo	4
Unión de esperma a zona pelúcida	4
Regulación positiva de ensamblaje de sinapsis	4
Respuesta a estradiol	4
Proceso biológico sub expresado	Genes involucrados
Proceso apoptótico	12
Regulación negativa del proceso apoptótico	11
Proliferación celular	11
Replicación del DNA	7
Autosfosforilación proteica	7
Cascada MAPK	7
Arresto del ciclo celular	6
Proceso metabólico lipídico	6
Organización de lisosoma	5
Regulación positiva de cascada de MAPK	5
Desfosforilación peptidil-tirosina	5
Fosforilación	5
Respuesta a etanol	5
Regulación de las vías de señalización mediadas por el factor de necrosis tumoral	5
Regulación positiva de fosforilación proteica	5
Fosforilación peptidil-tirosina	5
Regulación positiva de la actividad de fosfolipasa	4

Regulación positiva de proliferación de células de musculo cardiaco	4
Vía de señalización apoptótica	4
Transporte de lípidos	4
Proceso catabólico dependiente del complejo que promueve anafase	4
Regulación de crecimiento celular	4
Fosforilación de fosfatidilinositol	4
Axonogénesis	4

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó de manera cualitativa la expresión diferencial de genes en la respuesta de macrófagos humanos de la línea celular THP-1 infectados con diferentes cepas de *B. melitensis*, mediante el uso de microarreglos.

En los resultados obtenidos del experimento A, se observó una sobreexpresión de la vía de señalización de cAMP en la respuesta a la infección con BM16M contra la respuesta a BM133. La sobre expresión de la vía de señalización de cAMP, conlleva a un aumento de la concentración de cAMP intracelular, que es un segundo mensajero en procesos celulares, que en niveles elevados se ha demostrado que tiene una actividad anti inflamatoria y efecto protector de tejidos. Su concentración está determinada por la actividad de adenilato ciclasa (AC) y la fosfodiesterasa (PDE) (Erdogan *et al.*, 2008). El aumento de cAMP suprime la secreción de TNF alfa en monocitos, macrófagos y células T, la producción de aniones superóxido de neutrófilos y la producción de IFN- γ por células Th1, pero también aumenta la transcripción de IL-10 (citocina anti inflamatoria) en monocitos (Erdogan *et al.*, 2006). En infecciones con *B. melitensis* se ha demostrado un aumento en la concentración de cAMP y

este tiene un efecto inhibitor de secreción de IL-12, mientras que no tiene efecto en la secreción de IL-10, TNF- α e IFN- γ (Erdogan *et al.*, 2008). En este trabajo se observó un aumento de expresión de la vía de señalización de cAMP en la infección con BM16M comparado con la infección por BM133. Lo que nos sugiere que la cepa BM16M estimula esta vía con mayor eficiencia y al analizar las citocinas (TNF α y IFN- γ), no hay ningún cambio en la expresión de estas. Tampoco se observó que este aumento tuviera efecto en el crecimiento intracelular bacteriano a las 4 h p.i. Una sobre expresión en la vía de PPAR (Receptores activados por proliferadores peroxisomales), vía involucrada en el metabolismo de lípidos y de glucosa, diferenciación celular y procesos antiinflamatorios (Gopal *et al.*, 2019). Se ha observado que *B. abortus* tiene una mayor replicación y sobrevivencia intracelular en Macrófagos activados alternos (AAM), que se encuentran en infecciones crónicas; en los AAM hay una activación de PPAR, que promueve la expresión de genes de β -oxidación, por lo que, aumenta la concentración de glucosa intracelular, ya que, disminuye el consumo metabólico celular. El consumo de glucosa por *B. abortus*, es crucial para la replicación y para mantener una infección crónica (Byndloss *et al.*, 2015, Xavier *et al.*, 2014). Aunque, en *B. melitensis* no se han realizado estudios de este tipo, se sugiere que BM16M promueve una activación mayor de la vía de PPAR para su sobrevivencia intracelular.

Estos resultados indican que la respuesta a BM16M es de sobre expresión de vías anti inflamatorias para evitar la secreción de citocinas, la activación de otros macrófagos y aumentar las probabilidades de sobrevivencia y replicación intracelular.

Por otro lado, las vías sub expresadas en BM16M contra BM133, en el caso de la vía de señalización PI3K-Akt, varios estudios han confirmado que *Brucella* expresa proteínas (TcpB o BtpA) que contienen sitios TIR (*Toll Interleukin 1 receptor*), que compiten el sitio TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) con MyD88 (*Myeloid differentiation response gene 88*), por lo que resulta en una degradación e interferencia en la señalización de TLR4/TLR2. La vía de PI3K-Akt, promueve la unión de proteínas TIR en la membrana plasmática y la señalización de receptores Toll (Figuereido *et al.*, 2015), por lo que, se sugiere que la respuesta a la infección por BM16M, promueve una sub expresión de esta vía, por lo tanto, una menor señalización por receptores Toll. Por otro lado, Rosetti y colaboradores, realizaron una predicción *in silico* donde la infección de *B. abortus* en células epiteliales estimula la activación de la vía MAPK y al silenciar el gen de MAPK1 se demostró que la internación y replicación intracelular de *B. abortus* se ve disminuida en células epiteliales (Rossetti *et al.*, 2012). Lo contrario a lo observado en macrófagos murinos, donde no se activa la vía MAPK en la infección por *B. melitensis*, ni *B. abortus* (Jimenez *et al.*, 2005). Dimitrakopoulos y colaboradores demostraron que *B. melitensis* en monocitos humanos, activa lentamente la vía de MAPK, mediada por activación de TLR2 y que esta activación es necesaria para la replicación intracelular (Dimitrakopoulos *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que la respuesta a BM16M tiene una sub expresión de la vía MAPK ya que también existe una sub expresión de señalización de receptores Toll por una regulación a la baja de la vía de PI3K.

Las otras vías suprimidas tienen relación con la respuesta inmune. Los genes de infección por Herpes simples (*Interferon alpha8 IFN8*, *Interferon gamma receptor 2 IFNGR2* y *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 IFIT1*), se encuentran relacionados exclusivamente a infecciones virales. En la literatura no se encuentra información relacionada a *Brucella* o a bacterias. En la vía de Leishmaniasis, encontramos regulados a la baja el gen *Interleukin 1 alpha (IL1A)*, *Interleukin 10 (IL10)* y el *Interferon gamma receptor 2 (IFNGR2)*.

El producto del gen *IL1A* es la Interleucina 1 α , potente regulador de la respuesta inmune innata. En infecciones de macrófagos murinos con *B. abortus* se secreta una elevada concentración de IL-1 α (150 pg/ml). Su silenciamiento reduce significativamente la secreción de IL-10, IL-1 β y TNF; además de aumentar la susceptibilidad de los macrófagos a la infección por *Brucella*, por lo cual la IL-1 α es necesaria para la eliminación de la bacteria. Esta protección requiere de MyD88 y el resultado es la producción de óxido nítrico (Hop *et al.*, 2019). El gen de *IL10*, tiene como producto a la Interleucina 10, citocina anti inflamatoria, producida por células Th2, monocitos, macrófagos y células B. Varios estudios han demostrado que en ausencia de IL-10 hay una disminución en la sobrevivencia intracelular de *Brucella*, ya que en presencia de IL-10 hay una disminución en la expresión de reguladores de tráfico de membranas y enzimas lisosomales, ayudando a la evasión de la fusión fagosoma lisosoma (Hop *et al.*, 2018). Esta sub expresión de IL-1 α , podría explicar la regulación a la baja de IL-10.

Con los resultados anteriores, se puede elucidar que en la respuesta a BM16M hay una mayor activación de componentes antiinflamatorios, excepto por IL-10 que la sub expresión ayuda al control de la infección.

En el experimento D, se evaluó la respuesta a la infección a las 4 h con BM16M comparándola con BM133, la vía de señalización de MAPK se encuentra sobre expresada y ya no encontramos sub expresada a la vía de señalización PI3K. Por lo que, esta normalización en la vía PI3K, sugiere una activación de receptores Toll que da como resultado el aumento en expresión de la vía de MAPK.

En las vías sub expresadas, se encuentran Vías metabólicas y Vías de señalización Ras, que están involucradas en procesos celulares como proliferación, diferenciación, transporte de proteínas, secreción de proteínas y movimiento del citoesqueleto (Bivona *et al.*, 2003). Esto sugiere que en la respuesta a la cepa 133 a las 4 h p.i. se mantiene un metabolismo activo y que en la respuesta a BM16M este metabolismo disminuye. Además, las vías de osteoclastos, secreción pancreática, señalización VEGF y vía de señalización Fc épsilon RI; en donde se engloban genes relacionados a metabolismo. Por último, la vía de Influenza A, donde el gen *IL1A* se mantiene sub expresado y ya no se observa una sub expresión de *IL10*. Esto sugiere que la cepa de BM133 estimula la secreción de citocinas reguladoras, pero el resultado en la sobrevivencia intracelular a las 4 h es la misma que la cepa BM16M. En esta misma vía sub expresada, se encuentra el gen de *Toll Like Receptor 7 (TLR7)*, este gen tiene como producto al TLR7, que detecta el RNA de cadena sencilla. Campos y col. estimularon células dendríticas con RNA de *B. abortus* y observaron que hay secreción de IL-12 e IL-6,

dependientes de TLR7 (Campos *et al.*, 2017); por lo que se sugiere que la infección con la bacteria completa estimula de la misma manera el TLR7 y BM133 estimula significativamente de mayor manera la expresión del TLR7, y en la respuesta a BM16M este gen se encuentra sub expresado. No obstante, hacen falta estudios con RNA de *B. melitensis* y la bacteria completa para afirmar esta hipótesis.

En el experimento B, se evaluó la respuesta a BMLV31 comparada con BM133 2 h p.i y se encontró sobre expresada la vía de señalización de cAMP, diferenciación a osteoclastos, migración transendotelial de leucocitos, señalización de esfingolípidos y biosíntesis de glicoesfingolípidos. La sobre expresión de la vía de señalización de cAMP, indica que BM16M (Experimento A) y BMLVM31 estimulan con mayor eficiencia la expresión de esta vía comparándola con la respuesta a BM133. Como se mencionó en el análisis del experimento A, la sobre expresión de esta vía conlleva a una actividad anti inflamatoria, disminución en la secreción de TNF alfa e IL-12 y aumento en IL-10 (Erdogan *et al.*, 2008). Al no observar ninguna alteración de estas citocinas, se sugiere que la expresión de estas es igual en la respuesta a las 2 cepas (BM133 y BMLVM31). La sobre expresión de esta vía podría favorecer la replicación intracelular de la cepa mutante a las 4 h p.i.

En las vías de diferenciación de osteoclastos, migración transendotelial de leucocitos y vías de señalización de esfingolípidos se encuentran genes relacionados a la vía de señalización de MAPK, que sugieren que esta sobre expresión promueve la replicación en etapas tardías.

Por otro lado, en la vía de señalización de esfingolípidos se encuentra sobre expresado el gen de *CSTD*, que su expresión tiene como producto proteico a Catepsina D, hidrolasa que

se encuentra en el lisosoma. En infecciones con *Brucella* no es posible detectar a esta proteína en las BCV (Von Bargen *et al.*, 2012, Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000), pero en infecciones *in vitro* con mutantes de *Brucella* la vacuola adquiere catepsina D, degradando en el lisosoma a la bacteria (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2011), esto sugiere que el bajo número de bacterias BMLVM31 a las 2 h p.i. se debe a la adquisición de catepsina D en la vacuola y la fusión fagosoma-lisosoma.

En las vías sub expresadas, la vía de señalización PI3K-Akt, cuya expresión resulta en una activación de receptores Toll (Figueredo *et al.*, 2015), la cepa BM133 estimula una expresión mayor que BMLVM31 a las 2 h p.i. Esto sugiere que, aunque a las 2 h p.i. haya una mayor degradación bacteriana, a las 4 h p.i. la baja activación de receptores Toll, permiten la replicación intracelular de BMLVM31.

En las otras vías sub expresadas, se encuentran vías de cáncer y metabolismo de colina en cáncer, donde se encuentra el gen *RAC1 (Ras- related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1))* que el producto de su expresión está involucrado en regulación de transducción de señales y de reorganización del citoesqueleto de actina. En infecciones con una mutante rugosa de *B. melitensis* 16M se ha observado una sobre expresión de este gen, debido a que la cepa rugosa no se interna a la célula por medio de balsas lipídicas (Lauer *et al.*, 2014), sugiere que la mutante BMLVM31 no estimula la expresión como la cepa BM133; ya que, al tener una alteración la membrana externa podría verse afectada su internación por balsas lipídicas y así también verse disminuido el número de bacterias intracelulares a las 2 h p.i. (Verdiguel *et al.*, 2017)

A las 4 h p.i. de BMLVM31 contra BM133 (Experimento E), las vías sobre expresadas son Influenza, Legionelosis y Esclerosis lateral amiotrófica ALS. En estas tres vías tenemos a los genes *caspase 1 (CASP1)* y *caspase 9 (CASP9)*. La expresión de estos genes da como producto a las caspasas 1 y 9, respectivamente. Caspasa 1 juega un papel en la respuesta inflamatoria al activar a la IL-1 β e IL-18 y en piroptosis, un tipo de muerte celular programada. Por otro lado, Caspasa 9 juega un papel crítico en el proceso apoptótico. Las especies de *Brucella* son capaces de inhibir la apoptosis para su sobrevivencia y replicación intracelular en macrófagos; por otro lado, se ha observado la expresión de Caspasa 1 y de activación del inflamasoma (Zhang *et al.*, 2016, Lacey *et al.*, 2018, Terwagne *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que OMP31 juega un papel en la inhibición de este proceso apoptótico, Zhang y col. observaron que mutante en *omp31* de BM16M, tiene una menor sobrevivencia, mayores niveles de apoptosis, y una expresión elevada de TNF- α , caspasa 8, caspasa 3, caspasa 9 y citocromo C (Zhang *et al.*, 2016). Lo que nos ayuda a sugerir que a las 4 h p.i. hay una activación del inflamasoma y de la apoptosis, debido a la ausencia de OMP31. Además, Verdiguél y col. demostraron que la infección en un modelo murino no es tan eficiente como la infección con BM133, ya que se observa una menor colonización en bazo (Verdiguél *et al.*, 2020).

En el experimento C (BM16M y BMLVM31 a las 2 h p.i.) no se encontraron vías sobre expresadas, esto indica que la respuesta a la cepa BMLVM31 tiene un perfil transcriptómico similar a la respuesta a BM16M

Las vías sub expresadas son la de Vías de señalización MAPK, guía de axones y hepatitis, en estas vías se encuentra el gen *RAC1*. La sub expresión de *RAC1* sugiere lo observado en el experimento B, que esta mutante presenta algún problema de internación por medio de balsas lipídicas, que resulta en un número bajo de bacterias a las 2 h p.i. (Verdiguel *et al.*, 2017).

A las 4 h p.i., en el experimento F, las vías sub expresadas eran de señalización de Rap1, señalización de PPAR y Uniones Adherentes. Como se discutió anteriormente la vía de PPAR tiene como resultado un cambio en el metabolismo celular a β -oxidación y con esto, un aumento en la disponibilidad de glucosa intracelular, que, *Brucella* aprovecha para su replicación. Por lo anterior, se puede sugerir que al estar sub expresada esta vía en la infección con BMLV31 y mantener un metabolismo celular normal de consumo de glucosa, la replicación en etapas tardías no será eficiente.

La expresión de Rap1 tiene como función principal el aumento de adhesiones celulares vía receptores de integrina. Rap1 es una pequeña GTPasa activada vía cAMP (Sassone-Corsi *et al.*, 2021), lo cual confirma que se encuentra también sub expresada la vía de Uniones adherentes. En estas dos vías se encuentran los genes de *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* y *fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)*, que Rossetti y col. encontraron sobre expresada la vía de *fibroblast growth factor receptors*, en infecciones con *B. melitensis* en células HeLa a las 4 h p.i., pero no existe una explicación a este fenómeno (Rossetti *et al.*, 2012).

9. CONCLUSIONES

- 9.1.** La cepa *B. melitensis* BM16M estimula en macrófagos de origen humano una sobre expresión de vías antiinflamatorias (vía de señalización cAMP y PPAR) y sub expresión de vías inflamatorias (PI3K-Akt y MAPK) y de citocinas (IL-1A, IL-10) comparada a la respuesta a BM133 a las 2 h p.i.
- 9.2.** La cepa mutante *B. melitensis* BMLVM31 en macrófagos humanos a las 2 h p.i. estimula una sobre expresión de *CSTD* y sub expresión de *RAC1*, que sugiere que la ausencia de OMP31, estimula una fusión fagosoma lisosoma.
- 9.3.** La cepa mutante de *B. melitensis* BMLVM31 en macrófagos humanos a las 4 h p.i. estimula la sobre expresión de las vías de inflammasoma y apoptosis, debido a la ausencia de OMP31.

10. PROSPECTIVA

- 10.1.** Realizar ensayos de qPCR para la validación de los resultados.
- 10.2.** Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes *IL1A*, *IL10*, *CSTD* y *RAC1* en la infección con las cepas de *Brucella*
- 10.3.** Determinar el mecanismo de internación de la cepa mutante de *B. melitensis* BMLVM31, para determinar si OMP31 interactúa en esta etapa.
- 10.4.** Evaluar la apoptosis generada por la infección de la cepa mutante de *B. melitensis* BMLVM31.

11. REFERENCIAS

1. [NOM-041] *Norma Oficial Mexicana* [20 ago 1996]. NOM-041-ZOO-1995. Campaña contra la Brucelosis en los Animales. México: DOF-SAGARPA
2. [SENASICA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2017. *Brucelosis en animales*. México. <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-contra-la-brucelosis> [consulta: 03 marzo 2018]
3. Ahmed W, Zheng K, Liu Z-F. 2016. Establishment of Chronic Infection: Brucella's Stealth Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6:1–12. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00030.
4. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini E, Ugalde R, Moreno E, Moriyo I, Gorvel J. 2005. Cyclic b -1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*. 6:618–625. DOI: 10.1038/ni1202.
5. Bivona TG., Philips MR. 2003. Ras pathway signaling on endomembranes. *Current Opinion in Cell Biology* 15:136–142. DOI: 10.1016/S0955-0674(03)00016-4.
6. Byndloss M, Tsolis R. 2015. *Brucella* spp. Virulence factors and immunity. *Annual review of animal biosciences* 2016:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.
7. Campos PC., Gomes MTR., Guimarães ES., Guimarães G., Oliveira SC. 2017. TLR7 and TLR3 sense *Brucella abortus* RNA to induce proinflammatory cytokine production but they are dispensable for host control of infection. *Frontiers in Immunology* 8:1–10. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00028.

8. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. 2006. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 5. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13.
9. Case E, Samuel J. 2016. Contrasting lifestyles within the host cell. *Microbiology spectrum* 4:1–31. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0014-2015.
10. Celli J. 2015. The changing nature of the *Brucella*-containing vacuole. *Cellular Microbiology* 17:951–958. DOI: 10.1111/cmi.12452.
11. CFSPH. 2010. “Brucellosis” [En línea]. USA, disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucellosis.pdf> [Consulta: 16 ago 2017]
12. Corbel MJ. 2006. Brucellosis in humans and animals. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>.
13. Dimitrakopoulos O., Liopeta K., Dimitracopoulos G., Paliogianni F. 2013. Replication of *Brucella melitensis* inside primary human monocytes depends on mitogen activated protein kinase signaling. *Microbes and Infection* 15:450–460. DOI: 10.1016/j.micinf.2013.04.007.
14. Dorneles EMS., Teixeira-Carvalho A., Araújo MSS., Sriranganathan N., Lage AP. 2015. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine* 33:3659–3666. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057.

15. Ducrotoy M, Conde-Álvarez R, Blasco J, Moriyón I. 2016. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 171:81–102. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.02.002.
16. Erdogan S., Aslantas O., Celik S., Atik E. 2008. The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Research in Veterinary Science* 84:18–25. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.02.003.
17. Erdogan S., Celik S., Aslantas O., Kontas T., Ocak S. 2007. Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis*-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Research in Veterinary Science* 82:181–186. DOI: 10.1016/j.rvsc.2006.07.008.
18. Eskra L, Mathison A, Splitter G. 2003. Microarray Analysis of mRNA Levels from RAW264 . 7 Macrophages Infected with *Brucella abortus*. *Infection and Immunity* 71:1125–1133. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1125.
19. European Commission. 2001. Brucellosis in Sheep and Goats. *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*. 20.
20. Figueiredo P De, Ficht TA., Rice-ficht A, Rossetti C, Adams L. 2015. Pathogenesis and immunobiology of Brucellosis review of *Brucella*- host interactions. *The American Journal of Pathology* 185:1505–1517. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
21. Gopal R., Mendy A., Marinelli MA., Richwalls LJ., Seger PJ., Patel S., Mchugh KJ., Rich HE., Groud JA., Forno E., Alcorn JF. 2019. Clearance during Influenza-Bacterial Super-Infection. *Viruses* 11.

22. Gorvel J. 2008. *Brucella*: a Mr 'Hide' converted into Dr Jekyll. *Microbes and Infection* 10:1010–1013. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.07.007.
23. Gorvel JP, Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* 90:281–297. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00214-6.
24. Haag AF, Myka KK, Arnold MFF, Caro-Hernández P, Ferguson GP. 2010. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in *Brucella*-Mammalian Infections. *International journal of microbiology* 2010:124509. DOI: 10.1155/2010/124509.
25. He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, Ding X, Lathigra R, Craig J, Sobral B, Schurig G, Sriranganathan N, Boyle S, Mmun I. 2006. *Brucella melitensis* Triggers Time-Dependent Modulation of Apoptosis and Down-Regulation of Mitochondrion-Associated Gene Expression in Mouse Macrophages. *Infection and Immunity* 74:5035–5046. DOI: 10.1128/IAI.01998-05.
26. Hop HT., Reyes AWB., Arayan LT., Huy TXN., Vu SH., Min WG., Lee HJ., Kang CK., Rhee MH., Kim S. 2019. Interleukin 1 alpha (IL-1 α) restricts *Brucella abortus* 544 survival through promoting lysosomal-mediated killing and NO production in macrophages. *Veterinary Microbiology* 232:128–136. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.04.019.
27. Hop HT., Reyes AWB., Huy TXN., Arayan LT., Min WG., Lee HJ., Rhee MH., Chang HH., Kim S. 2018. Interleukin 10 suppresses lysosome-mediated killing of *Brucella abortus* in cultured macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 293:3134–3144. DOI: 10.1074/jbc.M117.805556.

28. li RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin W. 2013. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol.* 198. DOI: 10.1007/s00430-009-0123-8.
29. Jiménez De Bagüés MP., Gross A., Terraza A., Dornand J. 2005. Regulation of the mitogen-activated protein kinases by *Brucella* spp. expressing a smooth and rough phenotype: Relationship to pathogen invasiveness. *Infection and Immunity* 73:3178–3183. DOI: 10.1128/IAI.73.5.3178-3183.2005.
30. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O’Callaghan D, Ramuz M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Molecular Microbiology.* 27:99–106. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00661.x.
31. Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. 2015. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 5:1–10. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00072.
32. Lacey CA., Mitchell WJ., Dadelahi AS. 2018. Caspase-1 and Caspase-11 Mediate Pyroptosis, Inflammation and Control of *Brucella* Joint Infection. *Infection and Immunity*:1–15.
33. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 8:60–66. DOI: 10.1016/j.mib.2004.12.003.
34. Martirosyan A, Moreno E, Gorvel J. 2011. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews* 240:211–234.

35. Miller C, Smith E, Cundiff J, Knodler L, Bailey Blackburn J, Lupashin V, Celli J. 2017. A *Brucella* Type IV Effector Targets the COG Tethering Complex to Remodel Host Secretory Traffic and Promote Intracellular Replication. *Cell Host & Microbe*:1–13. DOI: 10.1016/j.chom.2017.07.017.
36. Oliveira SC., de Oliveira FS., Macedo GC., de Almeida LA., Carvalho NB. 2008. The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection* 10:1005–1009. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.07.005.
37. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos V. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet infectious diseases* 6:91–99. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
38. Ramírez J, Chávez L, Santillán J, Guzmán S. 2003. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico* 27:97–120.
39. Rossetti C, Drake K, Adams L. 2012. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: A molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes and Infection* 14:756–767. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2012.01428.x. Identification.
40. Rossetti CA., Galindo CL., Lawhon SD., Garner HR., Adams LG. 2009. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC microbiology* 14:1–14. DOI: 10.1186/1471-2180-9-81.

41. Sassone-Corsi P. 2012. The Cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:3–5. DOI: 10.1101/cshperspect.a011148.
42. Schena M, Shalon D, Davis R, Brown P. 1995. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 270:467-470. DOI: 10.1126/science.270.5235.467
43. Suárez-Esquivel M., Chaves-Olarte E., Moreno E., Guzmán-Verri C. 2020. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–23. DOI: 10.3390/ijms21207749.
44. Terwagne M., Ferooz J., Rolán HG., Sun YH., Atluri V., Xavier MN., Franchi L., Núñez G., Legrand T., Flavell RA., De Bolle X., Letesson JJ., Tsolis RM. 2013. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*. *Cellular Microbiology* 15:942–960. DOI: 10.1111/cmi.12088.
45. Verdiguél-Fernández L., Oropeza-Navarro R., Basurto-Alcántara FJ., Castañeda-Ramírez A., Verdugo-Rodríguez A. 2017. Omp31 plays an important role on outer membrane properties and intracellular survival of *Brucella melitensis* in murine macrophages and HeLa cells. *Archives of Microbiology* 199:971–978. DOI: 10.1007/s00203-017-1360-7.
46. Verdiguél-Fernández L., Oropeza-Navarro R., Ortiz-A., Robles-Pesina MG., Ramírez-Lezama J., Ramírez-Castañeda A., Verdugo-Rodríguez A. 2020 *Brucella melitensis* omp31 Mutant is attenuated and confers protection against virulent *Brucella melitensis* challenge in BLAB/c mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30(4):497-504.

47. von Bargen K, Gorvel J-P, Salcedo SP. 2012. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews* 36:533–562. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x.
48. Wang F., Hu S., Liu W., Qiao Z., Gao Y., Bu Z. 2011. Deep-Sequencing Analysis of the Mouse Transcriptome Response to Infection with *Brucella melitensis* Strains of Differing Virulence. *PLoS ONE* 6. DOI: 10.1371/journal.pone.0028485.
49. Whatmore AM. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, genetics and evolution*. 9:1168–1184.
50. Xavier MN., Winter MG., Spees AM., Hartigh AB Den., Roux CM., Silva TMA., Atluri VL., Kerrinnes T., Keestra M., Monack DM., Luciw PA., Eigenheer RA., Andreas J., Santos RL., Tsolis RM. 2014. PPAR mediated increase in glucosa availability sustains chronic *Brucella abortus* infection in alternatively activated macrophages. *Cell Host & Microbe* 14:159–170. DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.009.PPAR.
51. Zhang K., Wang H., Guo F., Yuan L., Zhang W., Wang Y., Chen C. 2016. OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- α . *Experimental and Therapeutic Medicine* 12:2783–2789. DOI: 10.3892/etm.2016.3655.