



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**PAPEL DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA 3  
ASOCIADA A VESÍCULAS, (VAMP3) EN LA  
INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS MURINOS CON  
*Brucella melitensis*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**ALFREDO CASTAÑEDA RAMÍREZ**



TUTOR: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ  
COMITÉ TUTORAL: DR. JOSE LUIS PUENTE GARCÍA  
DR. ALFONSO GONZALEZ NORIEGA

MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A **TERE Y A ALANNA**, MI FAMILIA, QUE REPRESENTÓ LA PRINCIPAL MOTIVACIÓN PARA EL LOGRO DE ESTA META, PERO TAMBIÉN POR SU APOYO INCONDICIONAL Y POR SU CAPACIDAD DE SOPORTAR MIS ALTIBAJOS EMOCIONALES. GRACIAS.

A MIS PADRES **GREGORIA RAMÍREZ Y BARDOMIANO CASTAÑEDA**, YA QUE SIN EL ESFUERZO Y SACRIFICIO QUE REALIZARON PARA MI FORMACIÓN, NO HUBIERA SIDO POSIBLE LLEGAR A ESTE MOMENTO.

A MIS HERMANOS **CARMEN, ALEJANDRO, JOSÉ LUIS, FRANCISCO, CARLOS, ERIKA Y OCTAVIO** Y A TODOS MIS SOBRINOS, YA QUE LA UNIDAD FAMILIAR QUE PROFESAMOS ES UN SOPORTE INVALUABLE EN MI VIDA.

A TODOS ESOS JOVENES Y NO TAN JOVENES QUE SE ENCUENTRAN EN EL CAMINO DE SU FORMACIÓN, TENIENDO EN CUENTA QUE PARA EL LOGRO DE SUS OBJETIVOS EL ESFUERZO, LA DEDICACIÓN, MUCHAS VECES EL SACRIFICIO, PERO SOBRETUDO LA HUMILDAD ANTE EL CONOCIMIENTO, SON REQUISITOS FUNDAMENTALES. NO SE DEN POR VENCIDOS, LO MEJOR ESTA POR VENIR.

## AGRADECIMIENTOS

AL **DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**, POR SU APOYO Y SU CONFIANZA AL EMPRENDER ESTE PROYECTO, PERO ANTE TODO POR SU AMISTAD.

A MI COMITÉ TUTOR: **DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA** Y **DR. ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA** POR CUMPLIR CABALMENTE CON SU FUNCIÓN Y AÚN MÁS, AL SEÑALARME MIS ERRORES CUANDO FUE NECESARIO, PERO TAMBIÉN POR ORIENTARME Y LLEVARME A DAR LO MEJOR DE MI EN LA REALIZACIÓN ESTE TRABAJO.

AL **DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ** CON QUIEN TUVE LARGAS CONVERSACIONES Y DISCUSIONES SOBRE LA BRUCELOSIS Y LA CIENCIA, QUE DIERON ORIGEN DE ESTE PROYECTO.

A LA **DRA. BEATRÍZ ARELLANO REYNOSO** POR PROPORCIONARNOS LÍNEAS CELULARES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR: **EDITH, MIRIAM, GABY, ILANE, MAURICIO, ADOLFO, JULIO, DIANA, AIDE**, POR SU APOYO, PERO ESPECIALMENTE A **KARLA CANO** POR COLABORAR CONMIGO EN ALGUNOS EXPERIMENTOS Y POR SU AMISTAD. IGUALMENTE, A LA **SRA. FRANCIS** POR SU DEDICACIÓN EN LA PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES DE LABORATORIO.

AL **DR. RAYMUNDO ITURBE**, POR SU APOYO TÉCNICO Y PORQUE SIEMPRE CONTE CON SUS PALABRAS DE ALIENTO.

A TODOS LOS MIEMBROS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA, POR SU APOYO.

A MIS COMPAÑEROS DE LA SECCIÓN DER FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA EN LA UACH, POR SU APOYO.

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), POR HABERME OTORGADO UNA BECA PARA LLEVAR ADELANTE MIS ESTUDIOS.**

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE SUPERARME ACADÉMICAMENTE.**

## CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
1. RESUMEN.....	VI
2. ABSTRACT .....	VII
3. INTRODUCCIÓN.....	1
Etiología .....	1
Epidemiología .....	2
Características bacteriológicas y factores de patogenicidad .....	4
Antecedentes experimentales .....	8
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos específicos .....	16
6. MATERIALES Y METODOS.....	17
7. RESULTADOS.....	23
8. DISCUSION.....	30
9. LITERATURA CITADA.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>DIAGRAMA 1 .....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 1 .....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 3 .....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 4 .....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 5 .....</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 6 .....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 7 .....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURA 8 .....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 9 .....</b>	<b>29</b>

## RESUMEN

Se ha propuesto que diversos patógenos intracelulares son capaces de alterar la expresión o la función de las proteínas responsables del tránsito vesicular y de la fusión de membranas, para poder sobrevivir dentro de las células. *Brucella melitensis*, es un patógeno intracelular capaz de evadir la fusión fagosoma-lisosoma y replicarse intracelularmente. Por otro lado, la proteína de membrana 3 asociada a vesículas (VAMP3) es una proteína localizada en vesículas y que promueve la exocitosis de citocinas proinflamatorias en sitios donde ocurre la fagocitosis. Las células J774.A1 de origen murino fueron estimuladas utilizando el lipopolisacárido (LPS) de *B. melitensis*, con lo cual se identificó un aumento en la expresión de la proteína VAMP3 (5.3 veces arriba del control) a los 30 minutos. Esta sobre-expresión fue seguida por un descenso a los 60 min al nivel de los controles. Con las células estimuladas con el LPS de *Salmonella enterica* serotipo Minnesota, encontramos un cambio similar al detectado con el LPS de *B. melitensis*, aunque el nivel de VAMP3 nunca fue semejante al control (6.6 a 3.5 veces arriba del control). En ambos casos las diferencias detectadas fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Posteriormente, se determinó el nivel de la misma proteína en células infectadas con *B. melitensis*, donde se produjo un incremento drástico a los 30 min y se mantuvo hasta los 60 min (2.8 veces más que el control en promedio). Estas diferencias fueron también estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Finalmente, para determinar el efecto de la supresión de VAMP3 sobre la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis*, se inhibió la expresión de la proteína en las células J774.A1 y se infectaron con una cepa patógena de la bacteria. En estas células, la tasa de recuperación en la sobrevivencia de las bacterias entre las 24 y las 36 h post-infección fue menor. A las 36 h post-infección, la recuperación de bacterias fue del 70%, comparado con los 80% de recuperación en las células control no tratadas. No obstante, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas.

**Palabras Clave:** *Brucella*, intracelular, patógeno, macropinocitosis, SNARE, siRNA

ROLE OF VESICLE ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 3 (VAMP3) ON  
MURINE MACROPHAGE INFECTION BY *Brucella melitensis*

**ABSTRACT**

It has been proposed that intracellular pathogens may interfere with expression or function of proteins that mediate vesicular traffic in order to survive inside cells. *Brucella melitensis* is an intracellular pathogen that evades phagosome-lysosome fusion, surviving in the so-called *Brucella*-containing vacuoles (BCV). Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP3) is a v-SNARE protein that promotes the exocytosis of the proinflammatory cytokine TNF at the phagocytic cup when docking to its cognate t-SNARE proteins syntaxin-4 and SNAP-23 at the plasma membrane. We determined the expression level of VAMP3 in J774.1 murine macrophages stimulated with *B. melitensis* lipopolysaccharide (LPS) and detected a transitory increase of VAMP3 mRNA expression at 30 min. A similar result was obtained when cells were incubated in the presence of LPS from *Salmonella enterica* serovar Minnesota (SeM). This increase of VAMP3 mRNA was also observed on infected cells with *B. melitensis* even after one hour. In contrast, infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SeE) did not cause such increase, suggesting that membrane components other than LPS modulate VAMP3 expression differently. To determine the effect of VAMP3 inhibition on macrophages infection, the expression of VAMP3 in J774.A1 cells was silenced and then infected with wild type *B. melitensis*. Although a slight decrease in the rate of recovery of surviving bacteria was observed between 12 h and 36 h post-infection with *B. melitensis*, this was not significant indicating that VAMP3 is not involved in *Brucella* survival.

**Key Words:** *Brucella*, intracellular, pathogen, macropinocytosis, SNARE, siRNA

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los animales domésticos y silvestres, así como al ser humano. De acuerdo con la Organización para la Alimentación y la Agricultura de los Estados Unidos de América (FAO por las siglas en inglés), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), esta es una de las zoonosis bacterianas de mayor prevalencia en el mundo, ya que anualmente se reportan aproximadamente 500 000 casos nuevos en humanos (1) principalmente en países del Mediterráneo, Asia Central, Península Arábiga, India y América Latina (2). Aunque no es una enfermedad mortal, tiene un impacto significativo tanto en la salud pública como en la producción animal.

### **Etiología**

La brucelosis es causada por bacterias del género *Brucella* spp, las cuales se encuentran clasificadas dentro de la subdivisión Alfa-2 de las Proteobacterias, junto con otros géneros bacterianos que se asocian a organismos eucariontes, ya sea como patógenos (como *Bartonella*) o como simbioses (como *Rhizobium*) (3,4). El género está formado por varias especies, que se definen de acuerdo a su patogenicidad y su preferencia por las especies de mamíferos que afectan. De ese modo, *B. abortus* produce infecciones principalmente a bovinos, *B. melitensis* afecta a los caprinos, *B. suis* a los suinos, *B. ovis* a ovinos, *B. canis* a los caninos y *B. neotomae* que afecta a los murinos (5). Además, en los últimos años se han añadido cepas aisladas de mamíferos marinos, a partir de las cuales se reconocen dos especies nuevas, *B. pinnipedialis* que afecta a pinnípedos y *B. ceti* que afecta a cetáceos (6). Por otro lado, también se ha determinado la existencia de una especie que afecta a ratones campestres llamada *B. microti* (7) y se ha propuesto otra aislada de la infección de un implante mamario en humanos denominada *B. inopinata* (8). Aunque esta es la clasificación más aceptada hasta nuestros días,

existen estudios genéticos de *Brucella* spp que consideran a *B. melitensis* como la especie tipo y a las demás como subespecies (9).

### **Epidemiología**

A pesar de que la mayoría de las especies de *Brucella* spp pueden afectar al hombre, la especie que más comúnmente se asocia con la infección en humanos es *B. melitensis* (2, 10). Aunque la muerte por brucelosis en humanos es poco común, ocasiona cuadros clínicos incapacitantes muy severos que se caracterizan por fiebre intermitente, debido a la septicemia, razón por la cual la enfermedad también recibe el nombre de fiebre de Malta, fiebre del Mediterráneo o fiebre ondulante (11). Adicionalmente, en estas infecciones se presentan mialgias, espondilitis, artralgias, artritis, afecciones respiratorias y en casos crónicos se pueden producir abscesos en diferentes órganos (2, 10).

Los hospederos preferenciales de *B. melitensis* son los caprinos, pero ocasionalmente también afecta a los ovinos y a los bovinos (2, 12). La brucelosis está ampliamente distribuida en el mundo, pero la mayor incidencia se presenta en países del litoral del Mar Mediterráneo, de la Península Arábiga, en Asia central y en algunas regiones de América Latina (1,13). En México se reportaron 2730 casos nuevos de brucelosis humana en el 2010 que representan una incidencia aproximada de 2.43 casos por cada 100 000 habitantes y para el 2011 se reportaron 3531 casos lo que representa una incidencia de 3.143 casos/100 000 habitantes (14).

Con relación al ganado caprino, se ha cuantificado una prevalencia de 2.56% de animales infectados y un 11.65% de hatos infectados en el 2006, de acuerdo a los últimos datos publicados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México.

Para los países de alta incidencia, la brucelosis también representa un factor importante de pérdidas económicas en la ganadería, a causa de los problemas de infertilidad y abortos que ocasiona en especies animales de importancia en la obtención de productos de origen animal. En varios de estos países, las pérdidas económicas y los problemas de salud pública que representa la enfermedad, han obligado al establecimiento de programas permanentes de control y erradicación, siguiendo las recomendaciones de la OMS (15,16,17,18,19). Estos programas contemplan acciones que tienen como finalidad la reducción de la incidencia de la brucelosis en las especies animales que afecta y, en consecuencia, también la reducción de las infecciones en el humano. Desafortunadamente, los programas de control y erradicación en México se orientan fundamentalmente a la brucelosis bovina que es causada por *B. abortus*, que si bien reducen el impacto económico que ocasiona la enfermedad en la producción bovina, tienen un efecto muy limitado para el control de la enfermedad en los humanos, ya que la principal causante de la brucelosis humana es *B. melitensis* que afecta a los caprinos (20).

Regularmente, en estas campañas se contemplan acciones contra la enfermedad que incluyen la identificación de animales enfermos para su eliminación, así como la vacunación del resto de los animales en los hatos. No obstante, estas medidas se aplican de acuerdo a las condiciones económicas de cada país y no siempre se logran los resultados que se esperan en el corto plazo (20,21,22). Para la profilaxis de la brucelosis en animales, se emplean las cepas bacterianas S19 de *B. abortus* para la inmunización de bovinos y la cepa Rev1 para la inmunización de pequeños rumiantes en la mayoría de los países, pues ha demostrado una eficiencia superior a otras cepas (10), esto a pesar de que no hay una estrategia enteramente segura en el uso de la cepa Rev1 (23, 24). En el caso de la inmunización en bovinos, actualmente también se utiliza la cepa RB51 de *B. abortus* para la vacunación de animales silvestres y domésticos en varios países y aunque ofrece algunas ventajas sobre la cepa S19, como la discriminación de

animales vacunados en las pruebas de diagnóstico, su eficacia ha resultado controversial (25,26). Adicionalmente, en algunos de esos países también se han evaluado modelos potenciales de vacunas subunitarias, susceptibles de ser aplicadas en humanos, en las que se han utilizado péptidos sintéticos de *B. melitensis*, desarrollados a partir de proteínas de la membrana externa, así como proteínas liberadas al medio de cultivo específicas de la bacteria, con resultados variables (27,28).

De ese modo, con la combinación de diversas acciones llevadas a cabo hasta ahora de manera continua y ordenada, se ha logrado que la incidencia de la brucelosis en animales y humanos se haya reducido en algunos de los países que aplican esos programas de control (29,30). Sin embargo, no se puede olvidar que la presentación de una enfermedad infecciosa, es resultado de la combinación de diversos factores, entre los que se encuentran la virulencia del microorganismo, su modo de transmisión y la susceptibilidad del hospedero (31) y aunque se han logrado avances significativos en la investigación en esos campos de la brucelosis, no han sido suficientes para lograr el control de la enfermedad en los países en desarrollo, que son los que presentan la mayor incidencia (32).

### **Características bacteriológicas y factores de patogenicidad**

El género *Brucella* spp está conformado por bacterias con morfología de coco-bacilos, Gram negativos, que no poseen cápsula, no esporulan y se les considera inmóviles, a pesar de que se han encontrado genes que codifican para una estructura flagelar (33). Son microorganismos aerobios, aunque algunas especies crecen mejor con bajas tensiones de CO<sub>2</sub>. Su metabolismo es de tipo oxidativo y producen oxidasa, catalasa, ureasa y reducen nitratos a nitritos. Debido a que no fermentan azúcares, las pruebas de identificación bioquímica tradicionales no son útiles en su caracterización. Para su identificación se utilizan métodos de fagotipificación, de crecimiento en medios con diferentes concentraciones de los colorantes tionina y fucsina, la producción de la enzima

ureasa y la producción de H<sub>2</sub>S (34). Cabe precisar en este aspecto, que el considerar a las bacterias del género *Brucella* spp como microorganismos aerobios, se debe primordialmente a las propiedades descritas en los primeros ensayos desarrollados para conocer la biología del agente. Actualmente, se sabe que la bacteria es capaz de utilizar nitratos como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria, una de las características que le permiten a estos microorganismos sobrevivir dentro de células eucariontes o en medios sin oxígeno (35, 36).

Con relación al genoma de la bacteria, casi todas las especies de *Brucella* poseen 2 cromosomas, un replicón grande de aproximadamente 2.1 Mpb (cromosoma 1) y otro más pequeño de 1.2 Mpb (cromosoma 2). El caso de *B. suis* biovar 3 es especial, ya que sólo posee un replicón de 3.1 Mpb y no se ha reportado la existencia de plásmidos en esta especie (2).

Al igual que las demás especies del género *Brucella* spp, *B. melitensis* se comporta como un patógeno intracelular o extracelular facultativo, ya que es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células que infecta, aunque también puede crecer en medios de cultivo bacteriológicos en el laboratorio (36). La habilidad de sobrevivir dentro de las células, se ha relacionado con la capacidad de la bacteria de evadir los mecanismos de destrucción intracelular de los macrófagos durante la fagocitosis, con lo que logra establecerse en las vesículas donde ocurre su replicación, denominadas “vacuolas que contienen *Brucella* o BCV por sus siglas en inglés (37).

La habilidad de *B. melitensis* de sobrevivir intracelularmente ocurre tanto en células fagocitarias como en no fagocitarias, con lo que adquiere la capacidad de penetrar los tejidos y diseminarse fácilmente en el organismo del hospedero, evadiendo de esa forma, el efecto de diversos mecanismos de defensa (38,39,40).

La posibilidad de penetrar y establecerse en sus hospederos se debe a los factores de patogenicidad que poseen las bacterias del género *Brucella* spp, algunos de los cuales se han caracterizado y entre los se encuentran:

1. **El lipopolisacárido (LPS).** El LPS de *Brucella* spp posee una importancia primordial en la patogenicidad, ya que su integridad determina la capacidad de la bacteria de invadir y sobrevivir en las células que infecta (40). Este componente de la membrana externa presenta múltiples características diferentes al LPS “clásico” de las enterobacterias. Por ejemplo, el lípido A de su molécula posee una estructura central compuesta de diaminoglucosa, (en lugar de glucosamina como en enterobacterias) y sus grupos acilo son más largos (C18, C19, C28 en vez de los C12 o C14 de los LPS típicos). Además, el lípido A está unido al núcleo oligosacárido únicamente por medio de enlaces amido en vez de los amido más ester de las enterobacterias. La reducida endotoxicidad del LPS de *Brucella* spp se atribuye principalmente a las características del lípido A (41) Por otro lado, la cadena O polisacárida es más larga que la del LPS enterobacteriano, por lo que es considerado un LPS “atípico” y se piensa que esta propiedad le confiere a la bacteria la capacidad de evadir mecanismos de defensa del hospedero como la fijación del complemento y el efecto de los péptidos catiónicos séricos como defensina NP-2, cecropina P1, lactoferricina B, y péptidos activos provenientes de la proteína catiónica 18 y de bactenecina (42). Estas propiedades del LPS de *Brucella* spp, hacen que sea varios cientos de veces menos activo y menos tóxico que los LPS clásicos de las enterobacterias. Además, debido a estas propiedades se presume que puede interferir con la secreción de citocinas proinflamatorias secretadas por las células fagocitarias invadidas, como es el caso del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (40). En contraste, las cepas

rugosas de *Brucella* spp (que no poseen la cadena O) entran a las células fagocíticas por vías endocíticas diferentes a las cepas lisas en vacuolas que se fusionan rápidamente con los lisosomas para ser destruidas (43).

2. **Los glucanos cíclicos.** Se ha encontrado también la producción de moléculas con características de glucanos cíclicos hacia el espacio periplásmico en *B. abortus*. Estas moléculas poseen un efecto extractor del colesterol en la membrana plasmática de las células infectadas, sobre todo en los dominios membranales conocidos como “Balsas Lipídicas”, semejante al efecto que se produce con la metil- $\beta$ -ciclodextrina. Una interferencia con la producción de estos factores reduce la virulencia de la bacteria (44). Al parecer, los glucanos cíclicos están involucrados en el ensamble correcto de estructuras macromoleculares de la membrana de la bacteria, que se requieren para una interacción efectiva con las células hospederas (45).
3. **El sistema BvrS/BvrR.** Se ha descrito también un sistema de regulación de dos componentes llamado BvrS/BvrR, compuesto por una proteína que funciona como sensor (BvrS) y otra como reguladora (BvrR). En conjunto, se encargan de regular la expresión de proteínas de la membrana externa (OMPs), lo que a su vez permite a la bacteria regular la homeostasis en dicha membrana externa (46). Aunque esta función ha sido asociada a la virulencia del microorganismo, su papel en la virulencia de *B. abortus* ha sido cuestionado (47).
4. **El sistema de secreción tipo IV (VirB).** Ha sido ampliamente caracterizado el sistema de secreción tipo IV en varias especies de *Brucella* que se encuentra codificado en el operón *virB*, que es semejante al descrito en *Agrobacterium tumefaciens* (bacteria

patógena de plantas) y que presumiblemente, es crucial en la sobrevivencia de *Brucella* spp en las células fagocíticas y no fagocíticas que invade (48). Mutaciones en diferentes genes que codifican para este sistema, reducen drásticamente la virulencia de la bacteria (49). Por otro lado, por mucho tiempo no había sido posible determinar los productos secretados por este sistema, sin embargo actualmente se han identificado y caracterizado algunos de ellos, aunque su relación con la patogenicidad de la bacteria no ha podido establecerse claramente (50, 51).

5. Finalmente, también se han descrito mecanismos asociados a la virulencia que le permiten a la bacteria resistir el daño oxidativo, el efecto del óxido nítrico, el pH endosomal y la privación de nutrientes (52) así como componentes genéticos como el BMEI021 (53), cuyo papel se ha asociado con la habilidad de la bacteria para invadir, sobrevivir y replicarse en células fagocitarias profesionales y no profesionales, pero que aún está en su fase de caracterización.

### **Antecedentes experimentales**

En el proceso de infección, también se han estudiado diversos componentes que se forman con la fagocitosis de *Brucella* spp, en las células hospedadoras. En este campo, ahora se conoce el papel que juegan algunos de ellos durante los procesos de invasión y tránsito de los fagosomas que contienen la bacteria. No obstante, todavía existen interrogantes en diversos procesos intracelulares que ocurren durante la infección (54). De ese modo, aunque se sabe que la bacteria es ingerida por las células fagocitarias por medio de receptores, estos no han sido totalmente caracterizados. No obstante, se han estudiado el CD14, TLR-4, TLR-2, los receptores para manosa y receptores semejantes a lectina (55, 56) como participantes en la fagocitosis de *Brucella* spp. Después de

la ingestión, en la etapa temprana de la infección, los fagosomas formados adquieren distintas proteínas que son reconocidas como marcadores endosomales. Estas proteínas permiten identificar las etapas de su proceso de “maduración” que llevan a esos fagosomas a fusionar con los lisosomas, dando lugar a la degradación del microorganismo. Los marcadores se dividen en tempranos, como Rab5, EEA1 y el receptor para transferrina (TfR) o tardíos como Rab7 y LAMP-1 (37). Aunque al inicio de la infección los fagosomas con brucelas pueden adquirir ambos tipos de marcadores, poco a poco las vacuolas fagocíticas van perdiendo la capacidad de adquirir al marcador tardío Rab7, aunque puede mantener LAMP1, lo cual significa que dichos fagosomas dejan de interactuar con los lisosomas. Sin embargo, se ha observado que aproximadamente después de una hora, estos fagosomas pueden adquirir marcadores de retículo endoplásmico (RE) como calreticulina o  $\text{sec61}\beta$  (57) dando lugar a la formación de vacuolas permisivas para la replicación de la bacteria conocidas como BCVs (37, 58). Con estos hallazgos, se ha propuesto la hipótesis de que los fagosomas que contienen la bacteria toman una ruta de tránsito semejante a los autofagosomas en células no fagocitarias o se transforman en endosomas con características de RE en macrófagos (59) (Diagrama 1).

En este contexto, Harricane y col. (60), en experimentos con macrófagos humanos infectados con *B. suis*, reportaron que los fagosomas con la bacteria carecían de anexina I, que es una proteína involucrada en el tránsito vesicular y en la transducción de señales, y que funciones como la producción de interferón gama ( $\text{IFN}\gamma$ ) en el macrófago, se encontraban afectadas. Kusumawati y col. (61), ensayando con macrófagos murinos y monocitos humanos, también reportaron este fenómeno y descubrieron que las bacterias opsonizadas con inmunoglobulinas son fagocitadas más rápidamente, sólo después de adherirse, produciendo los cambios en la membrana del macrófago requeridos para la fagocitosis, como la acumulación de actina F. Pizarro-Cerdá y col. (62), trabajando

en el mismo proceso pero con células HeLa, reportaron la colocalización de cepas patógenas y no patógenas de

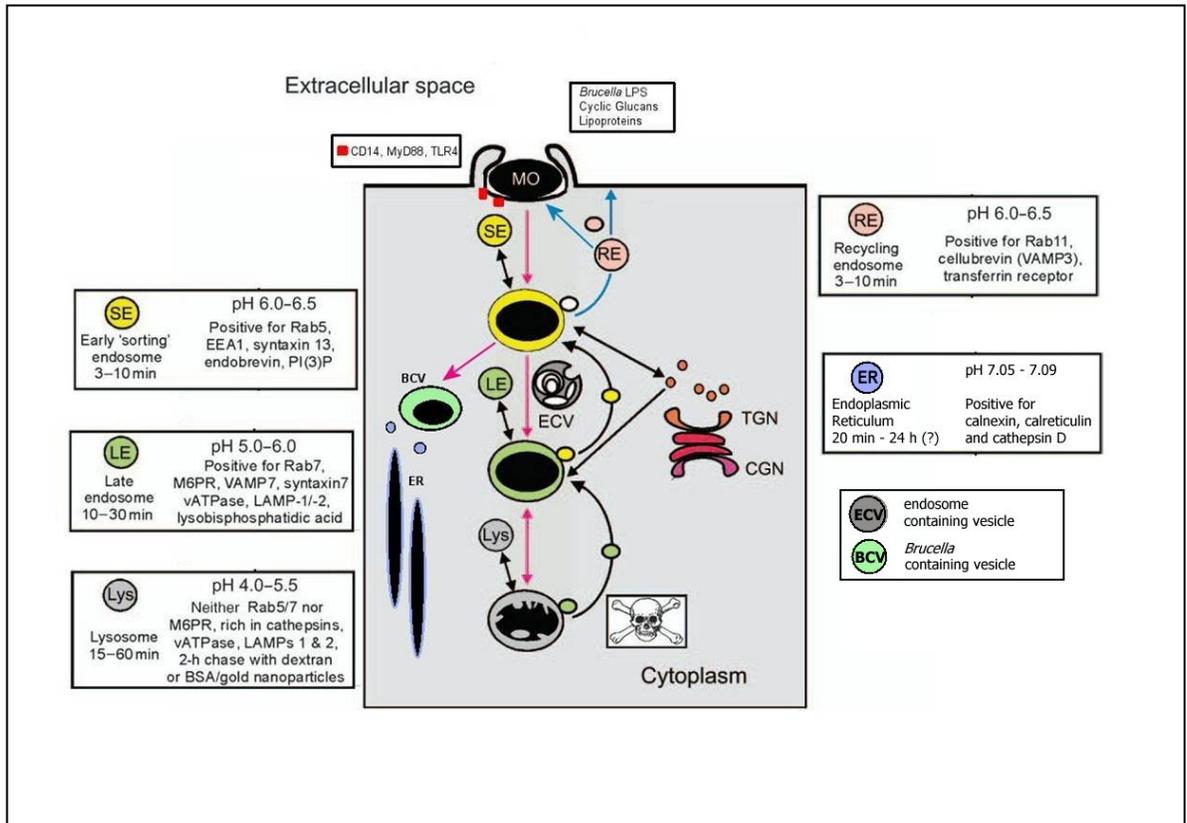


Diagrama. 1 Adaptado de Hass A. *Traffic* 2007, 8:311-330.

*B. abortus*, con el marcador endosomal temprano EEA1 y con los marcadores lisosomales LAMP1 y LAMP2 (pero con la ausencia de la hidrolasa ácida catepsina D) y, posteriormente, la colocalización de bacterias patógenas con el marcador del RE sec61 *beta*, confirmando con ello que *B. abortus* puede alterar el proceso de maduración de fagosomas y modificar su tránsito en el citoplasma. Se sabe que

*B. melitensis* también es capaz de evadir la fusión fagolisosomal, induciendo la fusión de los fagosomas donde se hallan, con vacuolas que presentan marcadores del RE, al menos en experimentos realizados con células VERO y HeLa, así como trofoblastos bovinos (62, 63).

La participación de componentes del citoesqueleto en la infección por *Brucella* spp en células epiteliales, también ha sido demostrada con los trabajos de Guzmán-Verri y col. (64) y Chávez y col. (65), quienes encontraron la intervención de GTPasas pequeñas de la familia de Rho y Rab en el tránsito intracelular de *B. abortus*, al observar la activación específica de Cdc42 (una GTPasa pequeña) con cepas patógenas de esta especie. También reportaron que inhibidores de las enzimas tirosina cinasa y MAP cinasa bloquean la invasión de *B. abortus*.

Con todos estos trabajos se pudo llegar a la conclusión de que las bacterias del género *Brucella* spp, tienen la capacidad de evadir la fusión fago-lisosomal, que ésta cualidad depende de la viabilidad de la bacteria y muestran que algunos factores de virulencia juegan un papel crucial en su capacidad de sobrevivencia intracelular.

Si bien existen varios reportes de proteínas producidas por *B. melitensis* que participan en eventos relacionados con la patogénesis molecular de la infección, ninguna de ellas ha sido relacionada con la modificación del tránsito intracelular observado durante la infección por ésta u otras especies de *Brucella*. En este sentido, se ha propuesto que la cadena O del LPS de *B. melitensis* también es determinante en su patogenicidad y junto con algunas proteínas de la membrana externa, es responsable del bloqueo de la actividad bactericida del suero y participa en la evasión de su destrucción por las células fagocitarias. Lo anterior permite la sobrevivencia de la bacteria dentro de fagocitos mononucleares y polimorfonucleares (66, 67). También, se ha observado que el LPS tiene una participación activa en las fases tempranas de la fagocitosis de la bacteria, pues por un lado, se ha detectado la alteración de las señales que produce la célula fagocítica, al inhibir la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  (68). Igualmente, se ha propuesto interferir en la apoptosis de las células infectadas (69), aunque en este campo existe escasa información. Por otro lado, se ha visto que interactúa con las

moléculas del MHC II en la membrana citoplasmática de macrófagos, interfiriendo con la presentación de antígenos por los linfocitos B (70). Lo anterior sugiere que la interacción LPS- membrana plasmática, podría ocurrir primordialmente en áreas de la misma conocidas como balsas lipídicas o "lipid rafts" (71). Estos sitios se consideran microdominios membranales con abundante presencia de colesterol y glicoesfingolípidos (71, 72). No obstante, también existen datos que indican la presencia de receptores potenciales localizados en otros sitios de la membrana (73, 74, 75).

Como parte de la discusión sobre el papel de componentes de las membranas celulares en las células hospedadoras durante la infección por *Brucella* spp, Arellano-Reynoso y col. (44), describieron el papel de los glucanos cíclicos producidos por *B. abortus*, en su sobrevivencia intracelular y demostraron que estos compuestos tienen la capacidad de integrarse a la membrana de los fagosomas que contienen la bacteria, justamente en las balsas lipídicas. Esto abre nuevas expectativas en la investigación sobre los mecanismos empleados por microorganismos intracelulares para evadir la fusión fagosoma-lisosoma y con ello escapar de su destrucción (76). Adicionalmente, aunque se sabe que las bacterias del género *Brucella* spp son fagocitadas en microdominios ricos en colesterol como lo son las balsas lipídicas, no existen evidencias que sugieran que esta bacterias también sean endocitadas por la vía de las caveolinas.

Es importante resaltar que la fagocitosis se considera como un proceso de captación y remoción de partículas relativamente grandes por parte de células especializadas, que se lleva a cabo dentro de vacuolas específicas. También es considerado un mecanismo central en los fenómenos de remodelación de tejidos, en la inflamación y en la defensa contra agentes infecciosos (77). Paradójicamente, la fagocitosis es también uno de los mecanismos más comúnmente empleados por microorganismos patógenos intracelulares, para establecerse en células donde pueden sobrevivir y replicarse (78). De forma

clásica, el proceso de la fagocitosis se ha dividido para su estudio en cuatro eventos centrales; adherencia de la partícula a la superficie de la célula fagocitaria, formación del fagosoma, maduración del fagosoma para convertirse en fagolisosoma y finalmente la digestión dentro del fagolisosoma (79).

Por simplicidad, se había asumido que el fagosoma que se forma en el proceso de fagocitosis, estaba compuesto fundamentalmente de porciones de membrana originadas de la membrana celular que se colocan alrededor de la partícula fagocitada, esto como resultado de una extensión y deformación de la membrana plasmática. Inclusive, los primeros trabajos en esta área consideraban la existencia de una síntesis rápida de membrana nueva durante el proceso de fagocitosis (80). Actualmente, este concepto ha cambiando y se sugiere que la fusión de endosomas preexistentes en el citoplasma (por ejemplo, endosomas de reciclamiento) con la membrana celular en los sitios de formación del fagosoma, provee de la membrana necesaria para su formación (81).

En este contexto, Murray y col. (82) demostraron la participación de las proteínas VAMP3, syntaxina 4, SNAP25 y otras de la familia Proteínas Solubles de Unión al Factor Sensible a la N-Etilmaleimida (SNARE por sus siglas en inglés) durante la fagocitosis, promoviendo al mismo tiempo la secreción del TNF- $\alpha$ . Esta citocina con actividad proinflamatoria, es liberada en los sitios donde ocurre la ingestión de microorganismos por el macrófago y representa una de las primeras señales de alerta del hospedero ante la presencia de un agente patógeno (83).

Las proteínas SNARE se encargan de regular el tránsito vesicular durante el proceso de secreción de productos celulares y se clasifican en dos grupos de acuerdo a su localización; v-SNARE localizadas a nivel de la membrana de las vesículas de secreción y t-SNARE localizadas a nivel de la membrana blanco donde sirven para la unión con las v-SNARE. La proteína VAMP3 pertenece al grupo de las v-SNARE y se localiza primordialmente el los endosomas de

reciclamiento que funcionan como estaciones intermedias en la secreción del TNF- $\alpha$ , así como para el reciclamiento de receptores celulares como el receptor de la transferrina (TfR) (84). Sintaxina 4 y SNAP-25 son proteínas del tipo t-SNARE, se localizan a nivel de la cara citoplasmática de la membrana celular y sirven para la unión de VAMP3 durante la secreción (85).

No obstante, la participación de VAMP3 en la formación de fagosomas, es un fenómeno reportado previamente (86, 87, 88) y en su trabajo, Murray y col. relacionan esta función con la secreción del TNF- $\alpha$ . Con sus hallazgos, este grupo logra establecer también una conexión, al menos de forma temporal, entre dos procesos importantes en la fagocitosis, la formación de vesículas endocíticas y la secreción de citocinas, algo que también ha sido propuesto por otros grupos de investigación (89, 90). Al establecer una asociación de lo anterior, con la observación de que la secreción de TNF- $\alpha$  se ve drásticamente disminuida durante la fagocitosis de *B. suis* en macrófagos de la línea U937 (91), podría suponerse que, en algún momento, la bacteria interfiere con el proceso de liberación de la citocina a nivel de la membrana o induce una alteración de la ruta de secreción de la misma, cuando está ocurriendo la fagocitosis de la bacteria por el macrófago. Esto explicaría, por lo menos de forma parcial, la razón por la cual *Brucella* es capaz de inhibir muchos de los eventos tempranos de la inmunidad innata durante la infección (92).

A pesar de esto, también se ha encontrado que VAMP3 no es absolutamente necesaria para la fagocitosis en macrófagos primarios (87), pero por otro lado, también se ha observado que esta proteína es blanco de modificaciones en su concentración y su integridad durante la infección de macrófagos por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (93).

De ese modo, dilucidar los eventos a través de los cuales se da lugar la asociación entre vesículas de secreción de citocinas y los fagosomas, podría

ayudar a comprender los mecanismos por los cuales microorganismos como *B. melitensis*, modifican el tránsito intracelular de la célula hospedadora. Recientemente y en concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que el bloqueo de la expresión de la GTPasa Sar1, involucrada en el movimiento de vesículas del RE hacia el aparato de Golgi, inhibe la replicación de *B. abortus* en las células tratadas, estableciendo una relación entre las rutas de secreción celular con la patogénesis intracelular de esta bacteria (94).

El objetivo de este trabajo es evaluar la dinámica que presentan moléculas involucradas en tránsito intracelular como VAMP3, ya que esta proteína participa activamente en la fusión de vesículas de secreción a nivel de las balsas lipídicas, que son dominios membranales donde se lleva a cabo la fagocitosis de *B. melitensis* y debido también a la asociación que se ha propuesto entre la infección de macrófagos por *B. suis*, *B. abortus* y *B. canis* y la inhibición de la expresión del TNF- $\alpha$  en las células infectadas (95).

Con el fin de comprobar la participación de VAMP3 en la patogénesis molecular de la brucelosis, se estudió su cinética de expresión en macrófagos J774.A1. Nuestros resultados muestran diferencias en la expresión de VAMP3 en macrófagos murinos de la línea J774.1 cuando son estimulados con el LPS de *B. melitensis* o cuando son infectados con bacterias viables de la misma especie. En las células J774.A1 tratadas con siRNA para inhibir la expresión de VAMP3, detectamos un retardo en el crecimiento bacteriano, cuando estas células fueron infectadas con *B. melitensis*.

## HIPÓTESIS

Si la expresión de la proteína VAMP3 es modulada por *Brucella melitensis*, entonces la inhibición de la expresión de VAMP3 podría afectar la replicación de esta bacteria en macrófagos de la línea J774.A1

## OBJETIVOS

**Objetivo General:** Determinar el papel que juega VAMP3 en el tránsito intracelular en macrófagos infectados con *B. melitensis*, mediante análisis de expresión y silenciamiento de genes, con el fin de conocer eventos celulares que permiten a este patógeno establecerse en vesículas de replicación y modificar la respuesta normal en estas células.

### **Objetivos Específicos:**

- I. Determinar a través de ensayos de Western blot y RT-PCR la dinámica de la expresión de la proteína VAMP3, en macrófagos murinos de la línea J774 estimulados con lipopolisacárido y microorganismos viables de *Brucella melitensis*.
- II. Bloquear la expresión de VAMP3 utilizando técnicas de inhibición con siRNAs.
- III. Analizar la sobrevivencia intracelular de *Brucella melitensis* en macrófagos J774.A1 con expresión negativa de VAMP3, a través de ensayos de sobrevivencia con gentamicina.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### CEPAS BACTERIANAS Y EXTRACCIÓN DEL LPS

Para la obtención del LPS de *B. melitensis* así como para los ensayos de infección se utilizó la cepa Bm133 biotipo 1, que es una cepa virulenta silvestre mexicana (53). Además, se utilizó una cepa silvestre de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (Ambas, de la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM). Por otro lado, también se empleó el LPS puro de *Salmonella enterica* serotipo Minnesota (Sigma) así como el LPS de *B. melitensis* que fue extraído y purificado a partir de la cepa Bm133 de acuerdo al método descrito por Kreutzer y Robertson (96). Posteriormente, el LPS fue cuantificado por el método del 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) con ácido tiobarbitúrico descrito por Karhkanis et al (97). La concentración de proteína en los extractos fue determinada por el método de Bradford.

### CULTIVOS CELULARES E INFECCIONES

Se utilizaron macrófagos de origen murino de la línea J774.A1 los cuales fueron mantenidos en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco-Invitrogen), 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y una mezcla de 100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomina por mL (Gibco-Invitrogen). Las células fueron mantenidas en una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub>.

Estos macrófagos fueron cultivados en placas de 6 pozos para la determinación de VAMP3 utilizando para su estimulación el LPS de *B. melitensis* extraído previamente. Brevemente, las células fueron mantenidas hasta llegar al 90 o 100% de confluencia y fueron estimuladas con 200 ng/ml del LPS de *B. melitensis* (Bm-LPS) o de *S. enterica* serotipo Minnesota (SeM-LPS) durante periodos de 30 y 60 min. Después de ese tiempo, se realizó una extracción de proteínas de cada pozo. De forma semejante, se realizó la infección de los macrófagos J774.A1 con las cepas Bm133 de *B. melitensis* o *S. enterica* serotipo Enteritidis a una MOI de 50:1. Las bacterias fueron sembradas en caldo Brucella (Bioxon) y en caldo Luria-

Bertani respectivamente. Ambos cultivos se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una concentración de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> bacterias/ml, lo cual se determinó calculando una absorbancia de 0.08 a 0.1 del cultivo en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 625 nm. Las células J774.A1 se sembraron 24 h antes de la infección en placas de 6 pozos con una densidad de 500 000 células/pozo. Utilizando la MOI indicada arriba, las células fueron infectadas en hielo para después centrifugar a 250 g por 5 min y luego incubarlas en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min. Para la extracción del ARN total, las células fueron tratadas con Trizol (Invitrogen) a los 15, 30, 45 y 60 min post-infección y congeladas a -80 °C hasta la realización de la extracción. Se realizó una réplica de estos ensayos para la extracción de proteínas.

Para los ensayos de sobrevivencia, las células infectadas fueron tratadas con gentamicina a una concentración de 50 µg/ml para eliminar las bacterias no fagocitadas, continuando con la infección por 48 h. Las células se trataron con Tritón X100 al 1% a las 2, 4, 8, 12, 24 y 36 h post-infección para coleccionar y contar las bacterias viables, sembrando las suspensiones en placas de Agar Tripticasa Soya (Bioxon). El porcentaje de sobrevivencia se determinó estableciendo la relación entre las bacterias empleadas en la infección y las bacterias recuperadas en cada uno de los tiempos indicados (98). Los experimentos fueron realizados por triplicado

#### ENSAYO DE PROTECCIÓN A LA GENTAMICINA.

Los macrófagos J774.A1 fueron sembrados en placas de 6 pozos con una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> por pozo y cultivados bajo las condiciones descritas arriba, hasta obtener una confluencia de 90 a 100%. Los monoestratos fueron lavados dos veces con PBS antes de la infección. La cepa BM133 de *B. melitensis* fue crecida en el medio BBL caldo *Brucella* hasta obtener una OD<sub>600nm</sub> de 1.0 (aproximadamente 3 x 10<sup>9</sup> bacterias/ml) posteriormente se diluyó apropiadamente, hasta obtener un inóculo para realizar la infección a una MOI de 50:1 como en el caso anterior. Las placas se centrifugaron a 600 g por 2 min a 4°C para la

sincronización de la fagocitosis y después se incubaron a 37°C por 1 h en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. En este momento se estableció el tiempo cero. Al finalizar la incubación las células fueron lavadas con PBS para después ser incubadas por 2 h con medio de cultivo DMEM con 100 µg/ml de gentamicina para matar las bacterias adheridas pero no las fagocitadas. Después de la incubación el medio fue remplazado ahora por DMEM con gentamicina a una concentración de 15 µg/ml durante el resto del experimento. Células J774.A1 sin infectar fueron incubadas con gentamicina igual que las infectadas sin presentar efectos por el tratamiento y mantenidas como testigo. Los monoestratos fueron colectados a diferentes periodos de tiempo hasta las 36 h, lavando primero con PBS y luego tratándolos con un buffer de lisis con 1% de Triton X100 estérilmente. El lisado con las bacterias liberadas fue diluido con diluciones décuples y sembrado en placas de agar *Brucella* (BBL Medium, BD Diagnostics) para determinar el número de bacterias intracelulares viables por conteo de UFC.

#### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MACRÓFAGOS TRATADOS.

Las proteínas totales de los macrófagos tratados con los LPS, así como de los infectados con *B. melitensis* o *S. enterica* serotipo Enteritidis se obtuvieron a los 15, 30, 45 y 60 min postratamiento con la solución de lisis RIPA ([NaCl 150 mM, NP-40 1.0%, 0.5% desoxicolato de sodio, SDS 0.1%, Tris 50 mM, pH 8.0, 1 mM PMSF y el inhibidor de proteasas "Complete" (Roche)] (99). En el caso de los macrófagos infectados el extracto se pasó a través de un filtro con una membrana de 0.45 µm, esto se realizó para remover las bacterias. Los extractos se precipitaron con ácido acético al 10% y se centrifugaron a 5 000g para posteriormente lavar los paquetes de proteínas con etanol absoluto frío y resuspenderlos con una solución de Tris 16 µM con pH 8.3. Las proteínas se conservaron a -80 °C hasta su empleo. Estos experimentos fueron realizados por triplicado.

## ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

Se utilizó el equipo de electroforesis Protean-II (BioRad). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% con solución Tris-glicina con una corriente de 2.5 Amp con 60 volts (100). Por cada muestra se realizaron dos geles, uno de ellos para ser teñido con nitrato de plata y otro transferido a membrana de nitrocelulosa para su análisis con sueros anti-VAMP3 y actina beta.

## TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON NITRATO DE PLATA.

Se utilizó el método de tinción con nitrato de plata descrito por Sambrook (101), con algunas modificaciones. Brevemente, terminada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron fijados con metanol, ácido acético y glutaraldehído. Posteriormente se realizaron lavados con agua en abundancia, para que después los geles fueran incubados por 30 min con una solución de nitrato de plata al 1%. Para el revelado se empleó una solución de ácido cítrico al 0.005% con formaldehído. Para la tinción con nitrato de plata del LPS extraído de *B. melitensis*, se utilizó el método descrito por Dubray y Bezard (102).

## TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS Y ENSAYO TIPO WESTERN BLOT.

Se utilizó un sistema MiniBlot (Bio-Rad) y membranas de nitrocelulosa (Millipore), Se colocaron 250 µg por pozo de cada muestra de proteínas de los extractos en la SDS-PAGE, empleando geles al 12%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 0.1 mA durante 16 a 28 h. Después, las membranas fueron tratadas por 4 h con una solución de bloqueo (TBS-0.1 Tween y 5% de leche descremada). Al término de este tiempo las membranas fueron lavadas en tres ciclos de 5 min con solución TBS-T (PBS 0.1% Tween 20). Como anticuerpos primarios se emplearon anti actina β (Santa Cruz) y anti Vamp3 (Novus Biologicals) de origen caprino. Como anticuerpo secundario se utilizó uno anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa (Sigma) (101).

## PCR CUANTITATIVA (PCR-Q)

Tanto de los macrófagos sensibilizados con LPS como de los infectados, se realizó una extracción de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen) que posteriormente fue utilizado con el sistema SYBR®GreenER Two-Step qRT-PCR (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del productor. Se utilizaron las siguientes condiciones en la PCR: 1 ciclo de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min; 35 ciclos de 95°C por 15 seg (desnaturalización), 60°C por 60 seg (alineamiento) y 72°C por 90 seg (extensión) y una extensión final de 72°C por 10 min. Por otro lado, a partir de la secuencia del ARNm de VAMP3 reportada en el *Gene Bank* (número de acceso NM\_009498) se diseñó un juego de iniciadores empleando el programa Primer Quest de Integrated DNA Technologies® (103) y se utilizó el equipo Light Cycler 480 (Roche). Las secuencias de los oligonucleótidos obtenidos fueron; VAMP3-1 (Fw 5'-AGAACCTGCCGTGTTATCGAGCTT-3' y Rev 5'-ACACAAGTCCTCTTTCCCAGTCCA-3'), que generó un producto de 195 pb. Como control constitutivo, se determinó la expresión del ARNm de la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH), para lo cual también se diseñó un juego de iniciadores con base en los reportados por Fan y col (104): GAPDH (Fw 5'-GCTCATGACCACAGTCCATGCC-3' y Rev 5'-GCACATTGGGGGTA GGAACACA-3') que generan un producto de 201 pb. Finalmente, se determinó la eficiencia de la prueba y condiciones como: concentración de Mg<sup>2+</sup>, concentración de Taq polimerasa y concentración de cDNA, con un ensayo de diluciones del ADN blanco para el cálculo del Punto de Cruce (Crossing Point o CP) que es un indicador de la eficiencia de la prueba.

Los resultados fueron analizados utilizando la ecuación de Pfaffl que indica los cambios en la expresión de los genes blanco (105).

## BLOQUEO DE LA EXPRESION DE VAMP3.

Para inhibir la expresión de VAMP3, se llevó a cabo la transfección de macrófagos J774.A1 con cuatro diferentes siRNA que hacen blanco en la región UTR (exon 5) del RNAm de VAMP3 y que han sido validados previamente (*Silencer Validated*

siRNA ID#186988-90, Ambion) (82). Como control negativo de la actividad siRNA, se empleó la secuencia 5'-GCG CGC UUU GUA GGA UUC G-dTdT-3' (106). En todos los casos se utilizó Silimport™ para la transfección de acuerdo a las indicaciones del productor (Upstate-Millipore). Las células fueron cultivadas por 18 a 20 h y posteriormente se determinó la producción de VAMP3 por Western blot y PCR de tiempo real por triplicado. Para ello, se utilizó el método de extracción de ARN del Trizol (Invitrogen) y el sistema SYBR®GreenER Two-Step qRT-PCR (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del productor, así como el equipo Light Cycler 480 (Roche).

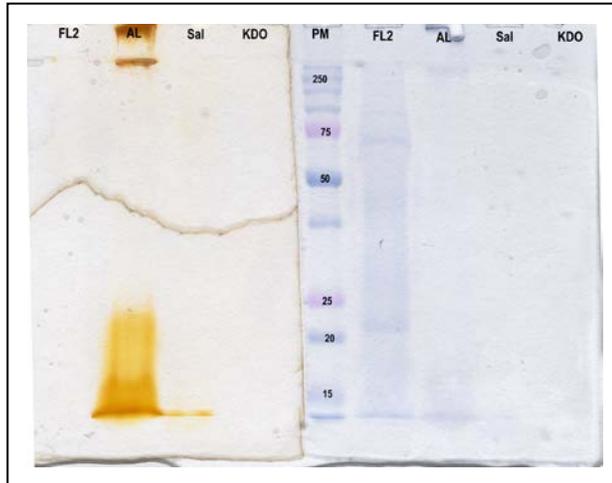
#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados fue realizado por medio de la prueba *t* de Student.

## RESULTADOS.

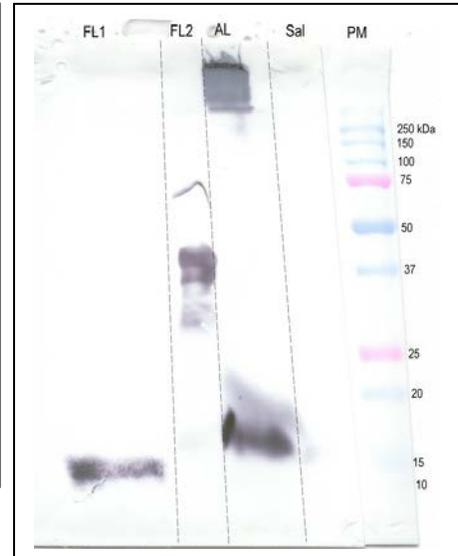
Se ha reportado que durante las primeras etapas de la fagocitosis, VAMP3 interviene en la fusión de membranas endosomales, al unirse a la proteína syntaxina 4, que previamente es reclutada en la copa fagocítica. Esto permite tanto una ingestión eficiente de microorganismos, como la secreción de citocinas (88). Con base en esta idea, buscamos investigar si el LPS de *B. melitensis* o las bacterias completas regulan positivamente los niveles de ARNm de VAMP3 en macrófagos asegurando así la disponibilidad de esta proteína durante la infección y si la inhibición de la proteína tenía algún efecto sobre la replicación intracelular de la bacteria.

La extracción de LPS de *B. melitensis* (Bm-LPS) tuvo un rendimiento de 4.5 mg/ml con <0.5% de proteína residual (Fig. 1), que es comparable con lo reportado previamente para la extracción de LPS de *Brucella spp.* (107).



**Fig. 1 Electroforésis en geles de poliacrilamida.**

La imagen muestra dos geles de poliacrilamida teñidos con plata (izq) y con azul de Coomassie (der) de varias fases de la extracción de LPS. La fase AL fue utilizada en el tratamiento de células J774.A1. FL2= fenólica pesada, AL=acuosa ligera, Sal= LPS de *Salmonella enterica* Minnesota, KDO=ácido 2-ceto-deoxioctónico. FL2 = 3.6 µg y AL < 0.022 µg de proteína/100 µg extracto.



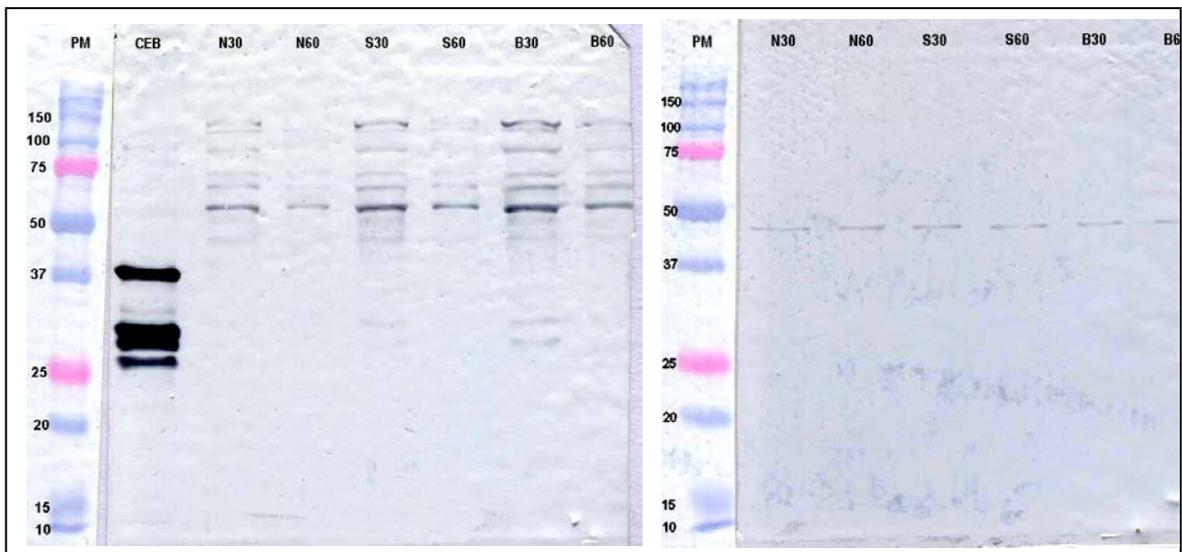
**Fig. 2. Western Blot del extracto de LPS.**

Imagen de un Western Blot con antisuero anti-LPS-S de 3 fases de la extracción del LPS de *B. melitensis*. FL1=fenólica ligera, FL2=fenólica pesada; AL=acuosa ligera; Sal=LPS de *S. enterica*. PM=marcador de peso molecular

La presencia de la forma lisa del LPS (LPS-S) fue corroborada por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-LPS-S (Fig. 2).

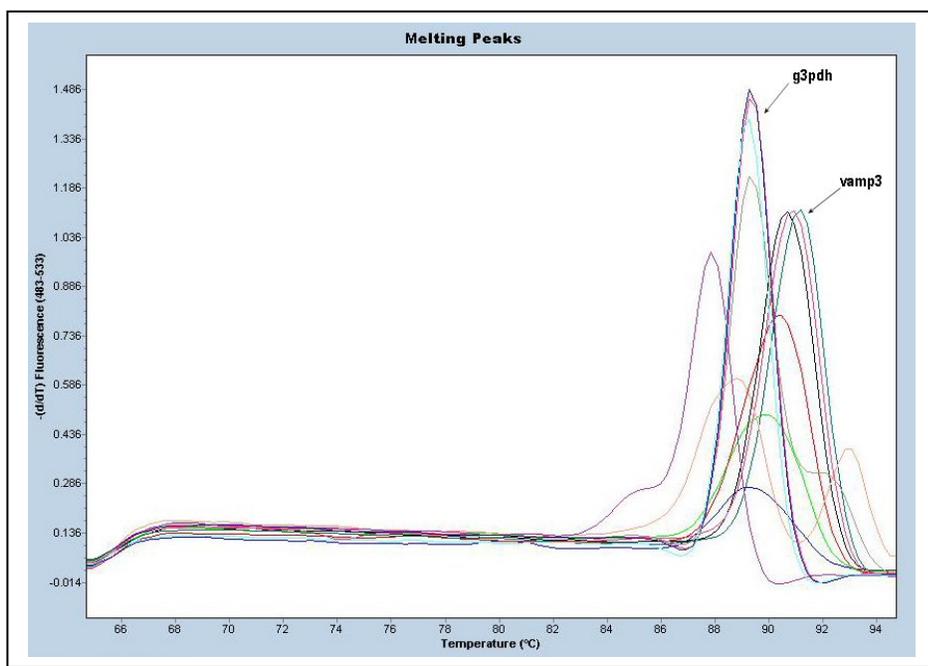
En el Western blot solo pudo ser detectada la presencia de VAMP3 formando complejos con otras proteínas (probablemente SNAREs), observando la inmuno-reacción a nivel de los 50 kDa de peso molecular (Fig. 3).

Para la Q-PCR, se determinó primero la concentración de iniciadores empleando concentraciones entre 50 y 900 pM, para conocer la eficiencia de su funcionamiento, así como la determinación de las curvas de TM, que indican su especificidad. Al respecto, el resultado fue que la concentración de iniciadores para la amplificación del gen para G3PDH específicos fue de 900 pM para el sentido (Fw) y de 50 pM para el antisentido (Rev). Para los iniciadores VAMP3-1 la concentración

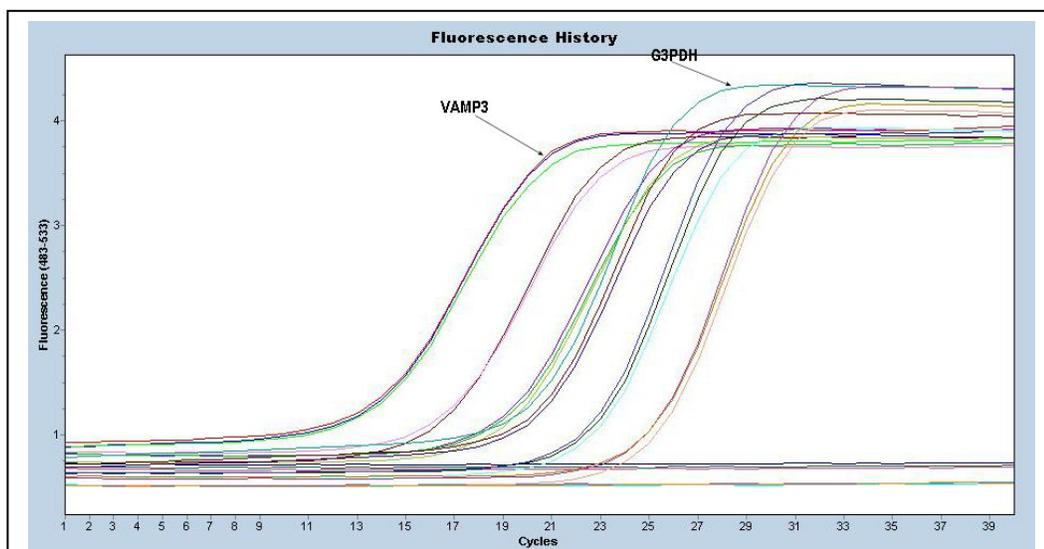


**Fig.3 Western Blot de un extracto de proteínas de macrófagos J774.A1.** Izquierda, células tratadas y sin tratar con LPS y utilizando un primer anticuerpo anti-VAMP3. N30= s/tratar 30 min; N60=s/tratar 60 min; S30=<tratados con LPS de *S. enterica* 30 min; S60=igual que el anterior a 60 min; B30= ttatados con LPS de *B. melitensis* 30 min; B60=igual que anterior 60 min. CEB= Vamp3 recombinante con una etiqueta de GST (glutathion S Transferasa). Derecha, Igual que izq., pero incubado con un primer anticuerpo anti-actina beta utilizada como control de expresión.

determinada fue de 50 pM para el Fw y 900 pM para el Rev. Las gráficas de este ensayo no mostraron la formación de dímeros u otras curvas de disociación



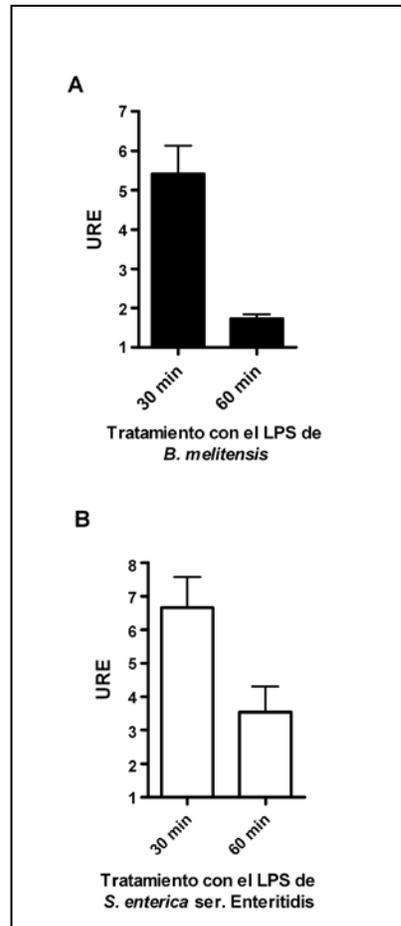
**Fig. 4** Grafica de los picos de disociación de las diferentes combinaciones de concentración de iniciadores. Las flechas indican los picos de las concentraciones óptimas usadas en la prueba.



**Fig. 5.** Curvas de fluorescencia de las diferentes diluciones del cDNA. Diferentes diluciones del cDNA empleado en la determinación de la eficiencia de la prueba, generaron curvas de fluorescencia que muestran el número de ciclos donde se dispara la curva y que corresponde a los CP con los que fue calculada la eficiencia.

inespecíficas (Fig. 4). Así mismo, no se observaron curvas inespecíficas con las diferentes concentraciones del ADNc y los productos de la PCR se generaron a

partir del ciclo 15 a 23. La eficiencia para ambos juegos de iniciadores se encontró dentro de los requerimientos de la prueba y del Light Cycler 480 (Software ver.1.2, Roche) (Fig. 5).

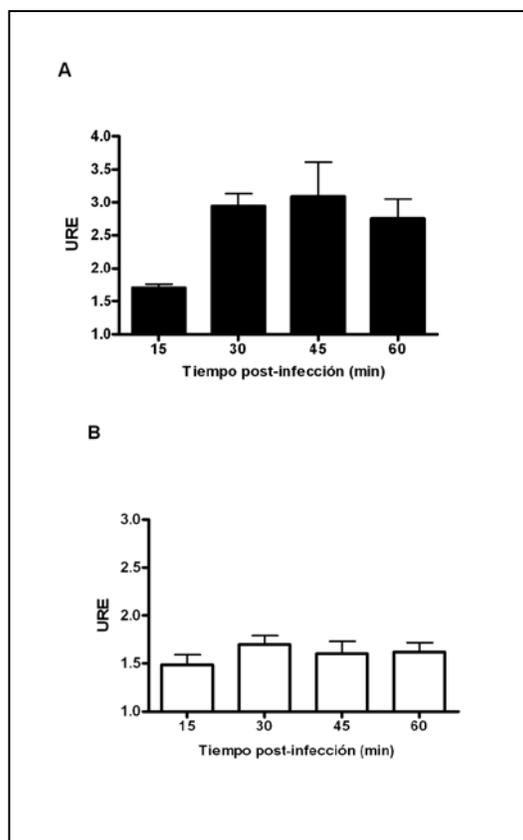


**Fig. 6. Gráfica de la expresión de ARNm de VAMP3 en macrófagos J774.A1 tratados con LPS.** (A) células tratadas con el LPS de *Brucella melitensis* BM133 y (B) células tratadas con el LPS de *Salmonella enterica* Minnesota durante 30 o 60 minutos. Los valores se expresan en URE (unidades relativas de expresión) que señalan las veces que la expresión es diferente del control no sensibilizado y son el promedio de los resultados de un experimento realizado por triplicado.

Como se muestra en la Fig. 6, las células J774.A1 tratadas con 200 ng / ml de LPS-Bm mostraron un aumento de 5.3 veces los niveles de ARNm de VAMP3 a los 30 minutos post-tratamiento, seguido por un retorno a niveles de las células testigo al ser determinado por PCR-Q. En el caso del LPS-SeM (Sigma Aldrich), también se detectó un cambio, pero el nivel de expresión del ARNm VAMP3 fue siempre mayor que el control (de 6.6 a 3.5 veces por arriba del control). Esto fue similar a lo observado con el LPS-Bm, pero en este caso los niveles no regresaron a los de las células control a los 60 min. En ambas condiciones el incremento observado fue transitorio aunque el LPS estuvo presente en el medio a

lo largo del experimento. Se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en ambos casos.

Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión VAMP3 en respuesta a la infección por *B. melitensis* y con *S. enterica* serotipo Enteritidis. Después de la infección de las células J774.A1 con *B. melitensis* BM133, la expresión del ARNm VAMP3 se incrementó temporalmente de forma similar al observado con el tratamiento con LPS purificado. Aquí, el aumento drástico se alcanzó a los 30 minutos (2.8 veces más que el control) y se mantuvo a este nivel



hasta los 60 min. Los valores muestran diferencias significativas en comparación con los de las células control no infectadas ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 7A). En contraste, la expresión de ARNm VAMP3 en células infectadas con *S. enterica* serotipo Enteritidis fue casi constante durante el curso del experimento (Fig. 7B), pero por debajo de lo observado con las células infectadas con *B. melitensis*. En este caso

no fueron detectadas diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con relación al control sin infectar.

Por último, al inhibirse la expresión de VAMP3 en las células J774.A1 con siRNA específicos ( $100 \text{ nM}/1 \times 10^6$  células), se encontró que el punto de máxima supresión de la proteína ocurrió entre las 18 y las 20 h post-tratamiento (Fig. 8) con una inhibición máxima de 87.2%. Dentro de este período de tiempo post-tratamiento, las células fueron infectadas con la cepa BM133 de *B. melitensis* para medir la supervivencia bacteriana, esto mediante la determinación de UFC a diferentes tiempos hasta las 36 h. En este caso, se encontró una pequeña disminución en la replicación bacteriana a las 12, 24 y 36 h post-infección, en comparación con la cuantificación de UFC en las células control no tratadas e infectadas igualmente.

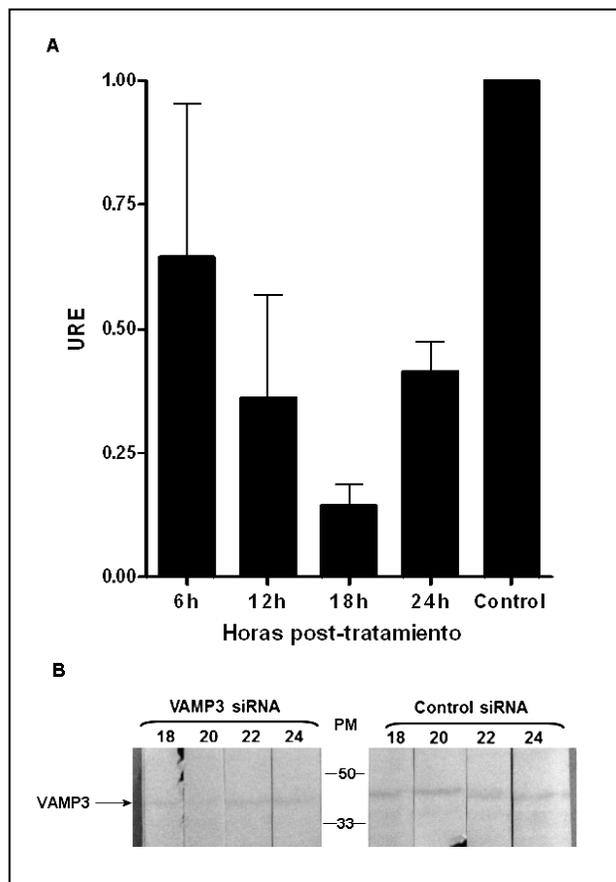
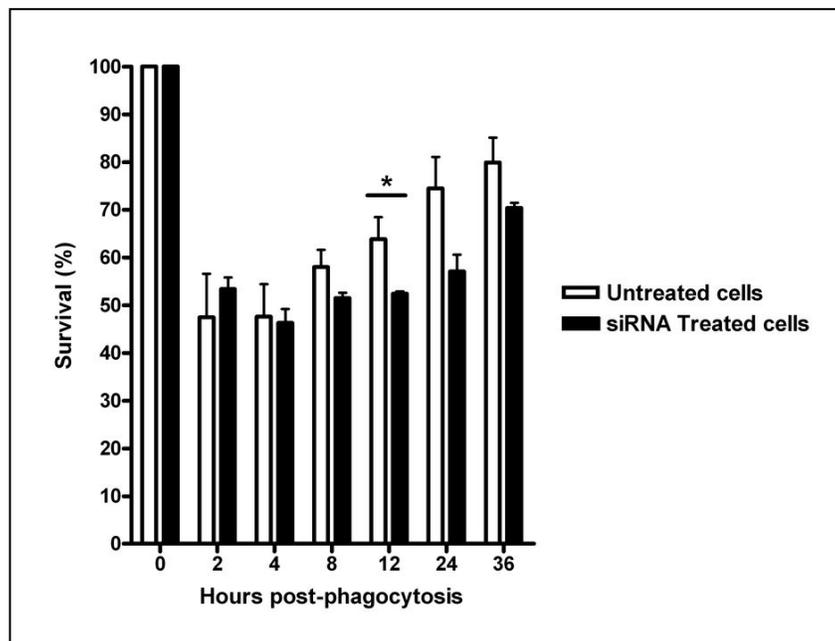


Fig. 8. Expresión de ARNm para VAMP-3 en células J774.A1 tratadas con siRNA. (A) Grafica del ensayo de PCR en Tiempo Real donde se muestra la expresión de VAMP3 en intervalos de 4 horas entre la hora 6 y la hora 24. (B) Westrn Blot del ensayo anterior donde el intervalo de lectura de redujo a 2 horas para precisar mejor el intervalo de máxima inhibición. URE. unidades relativas de expresión.

Aproximadamente 10% menos UFC fueron recuperadas a partir de células que habían sido silenciados para la expresión del ARNm VAMP3 (Fig. 9). En las células no tratadas con siRNAs, la cantidad de bacterias se redujo hasta el 47.3% durante las primeras 2 h, para luego aumentar ese porcentaje hasta 80% a las 36 h post-infección (Fig. 9). En el caso de la infección de células tratadas con los siRNA, se observó una disminución similar (46.3%) a las 4 h, pero para las 36 h, la recuperación sólo había llegado a 70.4%.

No obstante, esta reducción no fue estadísticamente significativa, con excepción de lo determinado a las 12 h post-infección. El tiempo cero representa el total de las UFC ( $68 \times 10^6$  UFC/ml = 100%) después de 1 h de fagocitosis y previo al tratamiento con gentamicina.



**Fig. 9. Porcentaje de sobrevivencia de *B. melitensis* en células J774.A1 tratadas con siRNA para VAMP3.** Macrófagos de la línea J774.A1 fueron transfectados con tres diferentes siRNA diseñadas para inhibir la expresión de VAMP3 y posteriormente fueron infectados con *B. melitensis* BM133 a una MOI de 50:1. Las bacterias fueron recuperadas de acuerdo al procedimiento indicado en Materiales y Métodos. El conteo de UFC se realizó a diferentes intervalos en un periodo de 36 h. Las gráficas muestran el promedio de 3 experimentos independientes. \*En este tiempo, se determinó una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Se sabe que la expresión de proteínas que dirigen el tráfico vesicular durante la fagocitosis, se puede ver alterada por varios componentes de las envolturas bacterianas (57). A la fecha, el LPS, los glucanos cíclicos, las lipoproteínas de la membrana externa y las OMPs de *Brucella* spp, han mostrado jugar un papel relevante en la supervivencia de bacterias intracelulares, al interferir directa o indirectamente con el acoplamiento de fagosomas y lisosomas (108, 109). Por otro lado, también se sabe que la mayoría de las especies de *Brucella* spp, han desarrollado una estrategia sigilosa para establecerse intracelularmente, ya sea inhibiendo la expresión de las señales proinflamatorias tempranas o resistiendo el efecto de moléculas antibacterianas, sobre todo al inicio de la infección (110). Kay y col. (88) demostraron que, antes de que concluya la formación de fagosomas al inicio de la fagocitosis en macrófagos, ocurre la secreción del TNF- $\alpha$  mediada por VAMP3, en la denominada “copa fagocítica”, en ensayos con *Candida albicans*. Además, el mismo grupo detectó un aumento en la expresión de VAMP3 durante la fagocitosis, lo cual era previsible, ya que anteriormente había sido propuesto que la fagocitosis y la secreción de citocinas son fenómenos que están estrechamente conectados (68, 89).

En este trabajo se pudo determinar que la endocitosis del LPS de *B. melitensis* o de *S. enterica* en macrófagos produce un incremento transitorio en los niveles de ARNm VAMP3 que regresaron a los niveles normales en momentos posteriores. Este incremento transitorio también se observó en células J774.A1 infectadas con *Brucella*, pero no con *Salmonella*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de *Brucella* cuando los macrófagos fueron silenciados con siRNAs para VAMP3. Estos resultados sugieren que VAMP3 podría estar vinculado a la expansión de la membrana durante macropinocitosis e indican que los estímulos externos como el LPS o la infección por *Brucella* ocasiona un aumento en la expresión VAMP3, probablemente para

hacer la proteína disponible durante este proceso. No obstante, los cambios en los niveles de VAMP3 post-infección parecen no ser de particular importancia para la supervivencia de *Brucella* spp y por lo tanto para la biogénesis de las BCVs.

Diferentes observaciones sugieren que VAMP3, una proteína v-SNARE localizada en los endosomas de reciclaje, juega un papel importante en la secreción de citocinas, así como en la fagocitosis. Esto se debe a su participación en los eventos de fusión de vesículas de secreción, que ocurren en los sitios de formación de fagosomas, promoviendo de ese modo la extensión de pseudópodos (84, 111). Con base en esta idea, Coppolino y col. utilizaron una quimera de VAMP3 etiquetada con GFP, la cual observaron acumularse en los sitios de invasión de *Salmonella* y *Candida albicans* (111). Además, se ha determinado que la microinyección de las toxinas tetánica o botulínica (que degradan VAMP2 y VAMP3) puede reducir la fagocitosis de una variedad de partículas, hasta en alrededor 66% en células J774.A1 (87, 112).

No obstante, estudios llevados a cabo con *S. enterica* serotipo Typhimurium indican que VAMP3 no tiene ningún papel directo en la fagocitosis. Por ejemplo, el reclutamiento de VAMP3-GFP en los sitios de invasión de *Salmonella* fue bloqueado por la toxina tetánica; sin embargo, esto no inhibió la invasión (111). Además, en el mismo trabajo pero utilizando células NSF dominante-negativas, la invasión por *S. enterica* Typhimurium o la remodelación membranal asociada, no se vieron afectadas, pero la fusión de vacuolas que contenían *Salmonella* con endomembranas fue impedida significativamente. Lo que nosotros encontramos en este trabajo, fue una reducción en los niveles de mRNA VAMP3 cuando *S. enterica* seritipo Enteritidis se utilizó en la infección de las células J744.A1. Las diferencias en la expresión de VAMP3 observada en células tratadas con el LPS de *Salmonella* y las células infectadas con bacterias viables, sugieren que los componentes de la membrana diferentes al LPS también juegan un papel en este proceso.

Han sido publicados resultados contradictorios con respecto al papel de la estructura no canónica y la composición del LPS de *Brucella*, sobre la modulación de la secreción del TNF- $\alpha$  (113). Esto se debe a que el fenómeno podría estar relacionado tanto a la modulación de la expresión de proteínas del tráfico vesicular, como a la de otros factores intracelulares. Varios de estos hallazgos sugieren que las fluctuaciones en la expresión de VAMP3 muy temprano durante la fagocitosis, pueden influir en el movimiento de vesículas secretoras hacia la membrana plasmática (108). Murray *et al* (82) demostraron que la expresión máxima de VAMP3 ocurre 2 h después de la estimulación de macrófagos murinos RAW264.7 con el LPS de *S. enterica* serovar Minnesota.

La posibilidad de que *B. melitensis* modifique la expresión así como la función de las proteínas que promueven el tránsito intracelular durante la fagocitosis, ya ha sido propuesta anteriormente (114, 115). Se demostró que el LPS es un constituyente bacteriano capaz de modular la secreción de citocinas proinflamatorias mediada por la v-SNARE VAMP3, que a su vez se localiza principalmente en los endosomas de reciclamiento (116). Esta proteína tiene que anclarse a las proteínas t-SNARE syntaxina-4 y SNAP23 en la membrana plasmática, promoviendo así la fusión de membranas y la secreción. Sería razonable suponer que si las llamadas balsas lipídicas son sitios preferenciales de entrada de la *Brucella* en los macrófagos, las proteínas asociadas a estos macrodominios, podrían verse afectadas al comienzo de la fagocitosis. En esta etapa, es probable que las bacterias comiencen a definir el destino de los fagosomas (114). En contraste con esta idea, en este trabajo no nos fue posible encontrar diferencias significativas en la capacidad de *B. melitensis* de sobrevivir y replicarse en los macrófagos con silenciamiento del ARNm VAMP3. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que otras proteínas SNARE, como syntaxina-3, Ti-VAMP y VAMP8 (117), desempeñen un papel durante la invasión de *Brucella*, ya sea que su expresión se modifique o no, en respuesta a la infección.

En su conjunto, los datos mostrados en este trabajo proponen que la infección por *B. melitensis*, implicaría una alteración de las SNAREs u otras proteínas de tráfico vesicular, durante la fase inicial de la invasión. La detección temprana de una reducción seguida del incremento en la expresión de VAMP3 en la primera hora post-infección, así lo sugieren. De hecho, como un organismo que se establece intracelularmente de manera sigilosa, se ha encontrado que los eventos iniciales de la infección por *B. abortus*, tienen lugar con mínima o ninguna secreción de TNF- $\alpha$  (73). Se podría pensar que este fenómeno está relacionado con la reducción en la actividad o una disminución en la expresión de VAMP3, no obstante, esta asociación no se había estudiado hasta ahora.

La detección de una reducción significativa de VAMP3 en macrófagos J774.A1 de origen murino, al ser estimulados con el LPS de *B. melitensis* (fig. 1) puede ser un indicio en esa dirección, aunque esta reducción fue menor cuando se realizó la infección de las células con una cepa patógena viable (fig. 2). El fenómeno no fue detectado cuando se realizó la infección con *S. enterica* serotipo Enteritidis.

Los ensayos de Western blot arrojaron resultados similares a los de la PCR en tiempo real (Fig. 2). Sin embargo, la proteína VAMP3 detectada tenía un peso molecular mayor de lo esperado, sugiriendo la persistencia de los complejos que se forman con otras SNAREs, como se ha reportado anteriormente (118).

Las fluctuaciones en la expresión de VAMP3 detectadas en este trabajo, que se presentan muy temprano durante la fagocitosis, podrían relacionarse con hallazgos previos, en los que modificaciones en las proteínas de tránsito vesicular influyen en el movimiento de fagosomas en dirección a los lisosomas (119), como lo encontrado por Murray y col. (82) en células de la línea RAW264.7. Los autores mostraron datos de la expresión de VAMP3 entre las 0 y las 12 h, con intervalos

de 1 h, pero desafortunadamente, con esos intervalos no es posible observar los cambios que se producen en la primera fase de la fagocitosis.

Por otro lado, las diferencias en el patrón de supervivencia a largo plazo de *B. melitensis* detectadas en este trabajo en células J774.A1 tratadas con siRNA para VAMP3, apuntan hacia la existencia de una relación entre la integridad de la maquinaria de tráfico vesicular y la persistencia intracelular de la bacteria. Se ha sugerido anteriormente que alteraciones en este tipo de proteínas, representan un mecanismo clave para la supervivencia intracelular bacteriana (78). Esto puede ocurrir ya sea por la degradación, la interferencia, o la mimetización de proteínas SNARE, como sucede en la infección por distintos agentes patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis* (93, 120, 121). En el último caso, *Chlamydia trachomatis* interactúa específicamente con un subconjunto de SNAREs (incluyendo VAMP3) de la célula huésped, reclutando selectivamente vesículas citoplasmáticas alrededor de los cuerpos de inclusión que produce. La relación entre alteraciones en proteínas de tránsito intracelular y la supervivencia de *B. abortus* ya ha sido propuesta con anterioridad (114, 122). Por esta razón, resulta probable que en las fases tempranas de la fagocitosis, las bacterias comienzan a determinar el destino de los fagosomas que las contienen como se ha propuesto previamente.

## CONCLUSIONES Y PROSPECTIVAS

1. No sería sorprendente que la regulación de VAMP3 y otras proteínas SNARE sea un fenómeno que ocurre en células fagocíticas en el momento de la ingestión de *B. melitensis* y que este fenómeno pueda influir, por un lado, en el destino de las vesículas de secreción y por el otro, en el de las vacuolas fagocíticas, ya que la endocitosis y la exocitosis en macrófagos son fenómenos que ocurren de forma simultánea. Por lo tanto, es recomendable abundar tanto en la estructura que mantienen las proteínas durante la infección, así como en la relación que estas pueden tener con los factores de patogenicidad secretados por el sistema de secreción VirB de la bacteria.
2. También, es importante determinar si las proteínas t-SNARE syntaxina 4 y SNAP25, con las que VAMP3 se relaciona, juegan algún papel en el proceso de fagocitosis de *B. melitensis* o en su capacidad de evadir su destrucción por las células fagocitarias. Experimentos basados en la inhibición de la expresión de esas proteínas SNARE, están en curso.

## LITERATURA CITADA

1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* **2006**;6:91–99.
2. Cutler SJ and Cutler RR. Brucellosis: The most common bacterial zoonosis? *BMS* **2006** April06:336-341.
3. Moreno E, Stackebrand E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and Lipid A Reveal a Phylogenetic Relationship with members of the Alpha-2 Subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **1990**;172:3569-3576.
4. Corbel MJ. *Brucella*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections*. Vol. 2 *Systematic Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. USA: Oxford University Press, **1998**:799-827.
5. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, Almeida Jr. NF, Shukla M, Dickerman AW, *et al.* Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bact* **2009**;191:3569–3579.
6. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I and Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **2007**;57:2688–2693.
7. Scholtz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, *et al.* (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **2008**;58:375-82.
8. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, *et al.* *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **2010**;60:801-808.
9. Moreno E, Cloeckaert A and Moriyón I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* **2002**;90 209–227.

10. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals: WHO guidance. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Geneva, Switzerland **2005**.
11. Verger JM, Plomet M. *Brucella melitensis*. USA: Martinus Nijhoff Publishers, **1985**.
12. Cutler SJ, Whatmore AM and Commander NJ. Brucellosis – new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* **2005**;98:1270–1281.
13. Moyer NP, Holcomb LA. *Brucella*. In: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover RH editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. USA: American Society for Microbiology, **1995**:549-555.
14. Sistema Único de Información. Boletín Epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Secretaría de Salud. No. 01, vol. 29, sem. 01, México, **2012**.
15. Padilla PF, Picao GVS, Pereira LA. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol* **2002**;90:52-62.
16. Vargas OFJ. Brucellosis in Venezuela. *Vet Microbiol* **2002**;90: 39-44.
17. Rivera AS, Ramírez MC, Lopetegui PI. (2002) Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile. *Vet Microbiol* **2002**;90:45-53.
18. Baumgarten D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Vet. Microbiol* **2002**;90:63-69.
19. Moreno E. (2002) Brucellosis in Central America. *Vet Microbiol* **2002**;90:31-38.
20. Robinson A. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance, FAO. Animal Production and Health Paper 156. FAO, **2003**.
21. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* **2002**;90: 19-30.
22. Morrison WI. Biotecnología y Vacunas de uso veterinario. *Visión 2020* **1999**;2:3-10.

23. Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* **1997**;31:275-83.
24. Banai M. 2002. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol* **2002**;90:497-519.
25. Jiménez de Bagüés MP, Barberán M, Marín CM, Blasco JM. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **1995**;13:301-304.
26. Leal-Hernandez M, Díaz-Aparicio E, Pérez R, Hernández-Andrade L, Arellano-Reynoso B, Alfonseca E, *et al.* Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active brucellosis, with presence of atypical humoral response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **2005**;28: 63-70.
27. Venegas-Cureño E. Evaluación de la respuesta inmune humoral generada en cobayos inmunizados con péptidos sintéticos de proteínas de la membrana externa de *Brucella melitensis* (tesis de licenciatura) D.F. México, Fac. Med. Vet. Y Zoot. UNAM, **2007**.
28. Ortiz-Rico A. (2008) Caracterización de proteínas de *Brucella melitensis* presentes en el medio de crecimiento (tesis de licenciatura) D.F. México, Fac. Med. Vet. Y Zoot. UNAM, **2008**.
29. Sánchez-Serrano LP, Ordóñez-Banegas P, Díaz García MO, Torres-Frías A. Human and animal incidence of brucellosis declining in Spain. *Euro Surveill* **2005**;10:2687.
30. Jelastopulu E, Bikas C, Petropoulos C, Leotsinidis M. Incidence of human brucellosis in a rural area in Western Greece after the implementation of a vaccination programme against animal brucellosis. *BMC Public Health* **2008**;8:241.
31. Roop II, R M, Bellaire, B H, Valderas M W, Cardelli JA. (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **2004**;52:621-630.

32. Guerra H. The *Brucellae* and their success as pathogens. *Crit Rev Microbiol* **2007**;33:4, 325 – 331.
33. Fretin D, Fauconnier A, Köhler S, Halling S, Léonard S, Nijskens C, *et al.* The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 2005;7(5):687-98.
34. Essenberg R C, Seshadri R, Nelson K, Paulsen I. (2002) Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet Microbiol* **2002**;90: 249-261.
35. Baek SH, Rajashekara G, Splitter GA and Shapleigh JP. (2004) Denitrification genes regulate *Brucella* virulence in mice. *J Bact* **2004**;186:6025–6031.
36. Barbier T, Nicolas C and Letesson JJ. *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Letters* **2011**;585: 2929-2934.
37. Gorvel JP and Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **2002**;90:281–297.
38. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE* **2007**;2(7): e631. doi:10.1371/journal.pone.0000631.
39. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* **2003**;16:65–78.
40. Baldwin CL and Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol* **2006**;26:407–442.
41. Tumurkhuu G, Koide N, Takahashi K, Hassan F, Islam S, Ito H, *et al* Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol* **2006**;50:421-427

42. Martínez de Tejada G, Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Moriyón I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **1995**;63:3054-61.
43. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E and Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Op Microbiol* **2005**;8:60–66.
44. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, *et al.* Cyclic  $\beta$ -1-2 glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunol* **2005**;6:618-625.
45. Iñón de Iannino N and Ugalde RA. *Brucella* cyclic  $\beta$ -1,2-glucans: structure, biosynthesis, biological activities and rol in virulence. In: López-Goñi and Moriyón I, editors. *Brucella*. Molecular and Cellular Biology. England: Horizon Bioscience, **2004**;184-203.
46. López-Goñi, I, Guzmán-Verri, C, Manterola L, Moriyón I, Moreno E. (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system, BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* **2002**;90:329–339.
47. Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, de Miguel MJ, Moriyón I, *et al.* (2007) BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun* **2007**;75:4867-74.
48. Celli J, Chastellier C, Franchini D, Pizarro-Cerda J, Moreno E and Gorvel J. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **2003**;198:545-556.
49. den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, and Tsolis RM. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but Not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *J Bacteriol* **2008**;190:4427–4436.
50. de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB , van Dijl JM and Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **2008**;70:1378–1396.

51. Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP and Comerci DJ. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **2011**;13:1261-74.
52. Roop RM II, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC and Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* **2009**;198:221–238
53. Hernandez-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Puente-García JL and Suárez-Guemes F. The BME10216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microbial Pathog* **2008**;44:28-33.
54. Christopher S, Umapathy BL and Ravikumar KL. Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J Lab Phys* **2010**;2: 55-60.
55. Moreno E and Pizarro-Cerda J. Life and death of *Brucella* within cells. In: Gorvel JP, editor. *Intracellular pathogens in membrane interactions and vacuole biogenesis*. Molecular Biology Intelligence Unit. USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, **2004**;99-103.
56. Campos MA, Rosinha GMS, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, *et al.* Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* **2004**;72:176-186.
57. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA and Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **2008**;9: 678–694.
58. Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsolis RM and Santos RL. Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J* **2010**;4:109-118.
59. Fugier E, Pappas G and Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Exp Rev Mol Med* **2007**;9:1-10.

60. Harricane MC, Caron E, Porte F, Liatuard JP. Distribution of annexin I during non-pathogen or pathogen phagocytosis by confocal imaging and immunogold electron microscopy. *Cell Biol Inter* **1996**;20:193-203.
61. Kusumawati A, Cazevieille C, Porte F, Bettache S, Liatuard JP, Widada JS. Early events and implication of F-actin and annexin I associated structures in the phagocytic uptake of *Brucella suis* by the J-774A.1 murine cell line and human monocytes. *Microb Pathog* **2000**;28: 343-352.
62. Pizarro-Cerdá J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, López-Goñi I, *et al.* *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **1998**; 66: 5711-5724.
63. Anderson T D, Cheville N F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. *Am J Pathol* **1986**;124; 226-237.
64. Guzmán-Verri C, Chaves OE, von Eichel SC, Lopez GI, Thelestam M, Arvidson S, *et al.* GTPases of the Rho subfamily Are Required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* **2001**;276; 44435-44443.
65. Chaves OE, Guzmán-Verri C, Méresse S, Desjardins M, Pizarro CJ, Badilla J, *et al.* Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **2002**;4; 683-675.
66. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop-II RM, Robertson GL *et al.* Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: Bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **2003**;71: 2110–2119.
67. Porte F, Naroemi A, Ouahrani-Bettache S, Liautard J P. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* **2003**;71: 1481-1490.

68. Forestier C, Moreno E, Pizarro-Cerda J, Gorvel J P. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages an *in vitro* and *in vivo* study. *J Immunol* **1999**;162; 6784-6791.
69. He Y, Reichow S, Ramamoorthy S, Ding X, Lathigra R, Craig JC, *et al.* *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infect Immun* **2006**;74: 5035-5046.
70. Forestier C, Moreno E, Méresse S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, *et al.* Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infect Immun* **1999**;67:4048-4054.
71. Naroeni A, Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside GM1 in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* **2002**;70:1640-1644.
72. Pike L. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **2004**; 378:281–292.
73. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of Binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* **1994**;41; 295-306.
74. Rocha GRC, Castañeda REI, Giono CS, Giron JA. *Brucella* sp bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Let* **2002**;213; 219-224.
75. Rocha GRC, Avelino FF, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, *et al.* Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol* **2004**;6; 435-445.
76. Roy CR. Trimming the fat: a *Brucella abortus* survival strategy. *Nature Immunol* **2005**;6:546-548.
77. Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **1999**;17:593–623.

78. Gruenberg J and van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature Rev Mol Cell Biol* **2006**;7:495-504.
79. Torunn ET, Torunn L, Trond B. Phagosome dynamics and function. *Bioessays* **2000**;22:255-263.
80. Zena W, Zanvil AC. Plasma membrane synthesis of the macrophages following phagocytosis of polystyrene latex particles. *J Biol Chem* **1972**; 247:2439-46.
81. Tuoret N, Paroutis T, Greenstein S. The nature of the phagosomal membrane: Endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J Leukocyte Biol* **2005**; 77:878.
82. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG and Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* **2005**;310:1492-1495.
83. Rahman MM and McFadden G. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* **2006**;2: e4.
84. Hu C, Hardee D and Minnear F. Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs. *Exp Cell Res* **2007**;313: 3198-3209.
85. Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, and Stow JL. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF $\alpha$ . *J Cell Biol* **2007**;178:57-69.
86. Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, and Grinstein S. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* **2000**;149: 697–705.
87. Allen LAH, Yang C and Pessing JE. Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking VAMP3. *J Leukocyte Biol* **2002**;149:697-705.
88. Kay JG, Murray RZ, Pagan JK and Stow JL. Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *J Biol Chem* **2006**;281:11949-11954.
89. Braun V and Niedergang F. Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis. *Biol Cell* **2006**;98:195–201.

90. Vinet AF, Fukuda M and Descoteaux A. (2008) The exocytosis regulator synaptotagmin V controls phagocytosis in macrophages. *J Immunol* **2008**;181: 5289–5295.
91. Caron E, Peyrard, T, Kohler S, Cabane S, Liautard J and Dornand J. Live *Brucella* spp fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun* **1994**;62:6267-5274.
92. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA and Philipp MT. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* **2004**;173: 46354642.
93. Fratti RA, Chua J, Deretic V. Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *J Biol Chem* **2002**; 277:17320-17326.
94. Celli J, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci* **2005**;102:1673-1678.
95. Caron E, Gross A, Liautard JP, Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF- $\alpha$  expression, active on human macrophage-like cells. *J Immunol* **1996**;156:2885-2893.
96. Kreutzer DL and Robertson DC. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **1979**;23:819-828.
97. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ and Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram negative bacteria. *Anal Biochem* **1978**;85, 595–601.
98. Guignot J, Hudault S, Kansau I, Chau I, and Servin AL. Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect Immun* **2009**;77: 517-531.

99. Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, Zhou P, Fernandes ND and Band H. Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase. PNAS **2002**;99:3794-3799.
100. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **1970**;227:680-685.
101. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1. USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
102. Dubray G and Bezard G. A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. Analytical Biochem **1982**;119:325-329.
103. <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>
104. Fan Q, Ding J, Zhang J, Guan N, and Deng J. Effect of the knockdown of podocin mRNA on nephrin and  $\alpha$ -actinin in mouse podocyte. Exp Biol Med **2004**;229:964–970.
105. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res **2001**;29:2002-2007.
106. Gonzalez E, Nagiel A, Lin AJ, Golan DE, Michel T. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. J Biol Chem **2004**;279:40659-40669.
107. Kreutzer DL, Buller CS and Robertson DC. Chemical characterization and biologic properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. Infect Immun **1979**;23:811-818.
108. Haag AF, Myka KK, Arnold MFF, Caro-Hernández P, Ferguson GP. Importance of lipopolysaccharide and cyclic  $\beta$ -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. Int J Microbiol **2010**;124509. Published online 2010 December 1. doi: 10.1155/2010/124509 PMID: PMC2995898.
109. Fugier E, Pappas G and Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. Exp Rev Mol Med **2007**;9, 1-10.

110. Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martinez MT, Terraza A, *et al.* Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of Tumor Necrosis Factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* **2001**;69:4823-4830.
111. Coppolino MG, Kong C, Mohtashami M, Schreiber AD, Brumell JH, Finlay BB, *et al.* Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis. *J Biol Chem* **2001**; 276: 4772-80.
112. Hackam DJ, Rotstein OD, Siolin C, Schreiber AD, Trimble WS and Grinstein S. v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci* **1998**; 95: 11691-6.
113. Shohdy N, Efe JA, Emr SD, and Shuman HA. Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Nat Acad Sci* **2005**;102: 4866–4871.
114. Mañes S, Del Real G and Martínez-A C. Pathogens: Raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **2003**;3: 557-568.
115. van IJzendoorn, S.C.D. Recycling endosomes. *J Cell Sci* **2006**;119:1679-1681.
116. Hu K, Rickman C, Carroll J and Davletov B. A common mechanism for the regulation of vesicular SNAREs on phospholipid membranes. *Biochem J* **2004**;377, 781–785.
117. Pocard T, Le Bivic A, Galli T and Zurzolo, Ch. Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* **2007**;120: 3309-3320.
118. Xu T, Rammner B, Margittai M, Artalejo AR, Neher E and Jahn R. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* **1999**;99:713–722.
119. Niedergang F and Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Op Cell Biol* **2004**; 16:422–428.

120. Arasaki K and Roy CR. *Legionella pneumophila* promotes functional interactions between plasma membrane syntaxins and Sec22b. *Traffic* **2010**; 11: 587–600.
121. Delevoye C, Nilges M, Dehoux P, Paumet F, Perrinet S, Dautry-Varsat A, *et al.* (2008). SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS Pathog* **2008**;4:e1000022.
122. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K and Shirahata T. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **2002**;4: 341–355.

# Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages

Alfredo Castañeda-Ramírez,<sup>1</sup> Jose L. Puente,<sup>2</sup> Alfonso González-Noriega<sup>3</sup> and Antonio Verdugo-Rodríguez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Universidad Nacional Autónoma de México; Distrito Federal, México;

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología Molecular; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; Cuernavaca, México; <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología; Instituto de Investigaciones Biomédicas; Universidad Nacional Autónoma de México; Distrito Federal, México

**Keywords:** *Brucella*, intracellular, pathogen, phagocytosis, macropinocytosis, SNARE, siRNA

**Abbreviations:** VAMP3, vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin); SNARE, soluble NSF attachment protein receptor; LPS, lipopolysaccharide

It has been proposed that intracellular pathogens may interfere with expression or function of proteins that mediate vesicular traffic in order to survive inside cells. *Brucella melitensis* is an intracellular pathogen that evades phagosome-lysosome fusion, surviving in the so-called *Brucella*-containing vacuoles (BCV). Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP3) is a v-SNARE protein that promotes the exocytosis of the proinflammatory cytokine TNF at the phagocytic cup when docking to its cognate t-SNARE proteins syntaxin-4 and SNAP-23 at the plasma membrane. We determined the expression level of VAMP3 in J774.1 murine macrophages stimulated with *B. melitensis* lipopolysaccharide (LPS) and detected a transitory increase of VAMP3 mRNA expression at 30 min. A similar result was obtained when cells were incubated in the presence of LPS from *Salmonella enterica* serovar Minnesota (SeM). This increase of VAMP3 mRNA was also observed on infected cells with *B. melitensis* even after one hour. In contrast, infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SeE) did not cause such increase, suggesting that membrane components other than LPS modulate VAMP3 expression differently. To determine the effect of VAMP3 inhibition on macrophages infection, the expression of VAMP3 in J774.A1 cells was silenced and then infected with wild-type *B. melitensis*. Although a slight decrease in the rate of recovery of surviving bacteria was observed between 12 h and 36 h post-infection with *B. melitensis*, this was not significant indicating that VAMP3 is not involved in *Brucella* survival.

## Introduction

Brucellosis is an important zoonotic bacterial disease with a high incidence in developing countries. This infection is caused by multiple species of *Brucella* spp, although *B. melitensis* is the species most frequently associated with human brucellosis. More than 500,000 new cases per year are reported worldwide.<sup>1</sup> The organism is a Gram-negative bacterium that causes infertility, abortion, feverish and septicemia in natural artiodactyls hosts (e.g., sheep, goats and cattle) and undulant fever, debilitation and disability in humans.<sup>2</sup> All species of *Brucella* are facultative intracellular pathogens that possess the ability to survive and multiply in professional and non-professional phagocytes<sup>3</sup> and their classification is mainly based on differences in pathogenicity and host preference.<sup>2,4</sup> These intracellular pathogens produce a set of factors, including lipopolysaccharides, virulence regulatory proteins and phosphatidylcholine, which are essential for invasion of host cells, whereas others are crucial to avoid elimination by the

host.<sup>3</sup> Strains pathogenic for humans (e.g., *B. abortus*, *B. suis* and *B. melitensis*) possess a smooth LPS that has also been associated to their infection capabilities. The LPS O-chain protects the bacteria from cellular cationic peptides, oxygen metabolites and complement-mediated lysis and it is a key factor for *Brucella* survival and replication within the host.<sup>5</sup> It is known that *Brucella* spp possess a non-classical LPS that, in the case of *B. abortus* lipid A, has a diaminoglucose backbone and the acyl groups are longer and linked to the core by simple amide bonds. It is proposed that this non-classical structure confers *B. abortus* LPS particular characteristics as a virulence factor. On the other hand, the O-chain and lipid A are also implicated in entry and in the early stages of *B. abortus* trafficking. The rough strains of *Brucella* spp (which do not possess the O-chain) do not enter the cells by lipid rafts but by a different mechanism and once inside rapidly fuse with lysosomes and get destroyed. By contrast, smooth *B. suis* entry is lipid-raft dependent and impairs phagosome-lysosome fusion during the first few hours of infection (for review, see ref. 3).

\*Correspondence to: Antonio Verdugo-Rodríguez; Email: verdugora@yahoo.com  
Submitted: 11/17/11; Revised: 03/06/12; 06/21/12; Accepted: 06/23/12  
<http://dx.doi.org/10.4161/viru.21251>

Characterization of pathogen entry pathways is essential for a clear understanding of infectious diseases, because individual pathogens have developed a range of strategies to modulate the host's normal macropinosytic pathways to invade the host cells, evade the host immune system and promote survival by manipulating the lipid and protein composition of the encapsulating macropinosome.<sup>6</sup> *Brucella* invades phagocytic and non-phagocytic cells through lipid rafts.<sup>4,7</sup> Once inside the cell *Brucella* is surrounded by a membrane-bound compartment to form the *Brucella*-containing vacuoles (BCV).<sup>8,9</sup> In these vacuoles it is able to escape the endocytic pathway to reach the endoplasmic reticulum (ER), where the bacteria are protected from host-defense mechanisms to ensure their replication and persistence within the host.<sup>10-12</sup>

One characteristic of phagocytes is their ability to ingest large numbers of particles or microbes quickly, suggesting that these cells have the capacity to rapidly replenish their plasma membrane. Using chimeric constructs of the SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) protein VAMP3 (vesicle-associated membrane protein 3) tagged with green fluorescent protein (GFP), it was demonstrated that endosomes bearing VAMP3 first fuse with the plasma membrane where phagocytosis is being initiated and are subsequently internalized.<sup>13</sup> Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles, presumably originating from recycling endosomes, was shown to occur in the vicinity of nascent phagosomes, and insertion of these membranes was suggested to account for the growth of pseudopods.<sup>13</sup> In fact, membrane traffic in activated macrophages has been linked for two critical events: proinflammatory cytokine secretion and phagocytosis of pathogens. In this way, it has been possible to associate the tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) secretion to VAMP3 incorporation at the site of phagocytic cup formation. Fusion of secretory vesicles at the cup simultaneously allows rapid release of TNF $\alpha$  and expansion of the membrane for phagocytosis.<sup>14</sup> In addition to VAMP3, syntaxin 4, syntaxin 6, Vti1b and SNAP-23 are upregulated during LPS-mediated activation to accommodate the increased trafficking during TNF secretion and provides excess of plasma membrane for microorganism engulfment at the lipid rafts.<sup>15,16</sup>

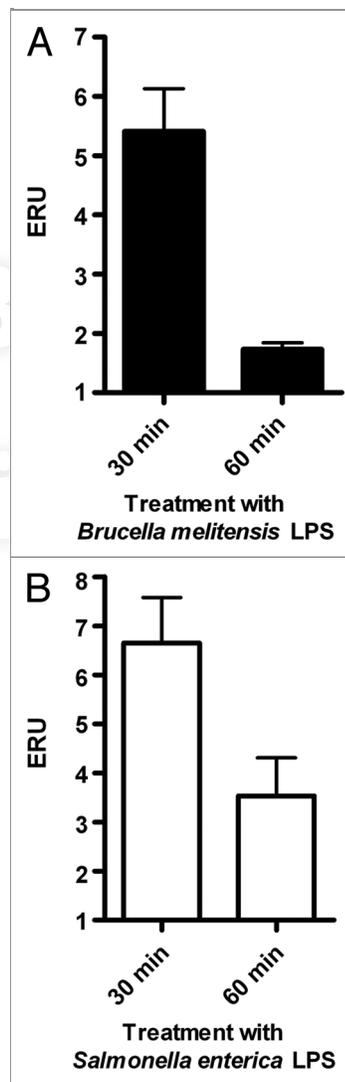
Because vesicular traffic is controlled by the regulation of vesicular traffic proteins expression,<sup>17</sup> early internalization events must be decisive for the fate of endocytic vacuoles. In the current study we have shown that VAMP3 mRNA is upregulated by live *B. melitensis* and also by LPS isolated from this microorganism. However, when the expression of VAMP3 mRNA was silenced in J774.A1 cells no significant differences in *B. melitensis* survival were observed compared with control cells.

## Results

It has been reported that during the early stages of phagocytosis, Syntaxin 4 is recruited to the phagocytic cup in a cholesterol-dependent manner, thus allowing insertion of VAMP3-positive recycling endosome membrane that is required for efficient ingestion of a pathogen.<sup>16</sup> Based on this notion, we wanted to investigate whether *B. melitensis* LPS or whole bacteria upregulate

VAMP3 mRNA levels in macrophages to ensure VAMP3 availability during infection.

Extraction of *B. melitensis* LPS (Bm-LPS) yielded 4.5 mg/ml with < 0.5% residual protein, which is comparable with previously reported results for the extraction of LPS from *Brucella* spp.<sup>18</sup> As shown in Figure 1, J774.A1 cells treated with 200 ng/ml of Bm-LPS showed a 4.5-fold transient increase of VAMP3 mRNA levels at 30 min post-treatment, followed by a return to control levels, as measured by qRT-PCR. In the case of *S. enterica* serovar Minnesota LPS (Sigma Aldrich), we detected a similar transient increase of VAMP3 mRNA levels, but in this



**Figure 1.** LPS treatment causes a transient increase in VAMP3 mRNA expression. Expression of VAMP3 mRNA was analyzed in J774.A1 cells treated with either *S. enterica* serotype Minnesota LPS (SeM) or *B. melitensis* LPS. J774.A1 cells were incubated for 30 or 60 min at 37°C in the presence of 200 ng/ml of SeM LPS or *B. melitensis* LPS. VAMP3 mRNA was quantified as described in Materials and Methods. Values are expressed in expression relative units (ERU). Bars represent the fold increase compared with its respective control cells at the same time points, by the Pfaffl equation. The results are representative of three independent experiments conducted in triplicate.

case control levels were not restored at this time point. In both conditions the increment observed was transitory even though LPS was present in the milieu along the experiment. Significant differences were detected ( $p \leq 0.05$ ) in both cases.

Next, we determined the levels of VAMP3 expression in response to *B. melitensis* and SeE infection. Upon infection of J774.A1 cells with *B. melitensis*, VAMP3 mRNA expression was also temporarily upregulated as with purified LPS. Here the increase reached a peak by 30 min (2.1 times over the control) and remained at this level even after 60 min. Values show significant differences as compared with that of control cells non-treated ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 2A). In contrast, the expression of VAMP3 in cells infected with SeE was nearly constant during the course of the experiment (Fig. 2B), but below that seen in non-infected control cells, no significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were detected.

Lastly, we infected J774.A1 cells silenced with VAMP3 siRNA (100 nM/1  $\times 10^6$  cells) with *B. melitensis* and measured bacterial

survival by determining the CFU at different time points up to 36 h. Using this approach, we found that the maximum decrease for the expression of VAMP3 was between 18 and 20 h (less than 15%, Fig. 3) and a slight decrease in bacterial replication compared with control cells after 12, 24 and 36 h, with about 10% less bacteria recovered from cells that had been silenced for VAMP3 mRNA expression (Fig. 4). However, this reduction was not statistically significant with the exception of 12 h time point. Time zero represents total CFU counts ( $6.8 \times 10^6$  CFU/ml = 100%) after 1 h of phagocytosis and previous to gentamicin treatment.

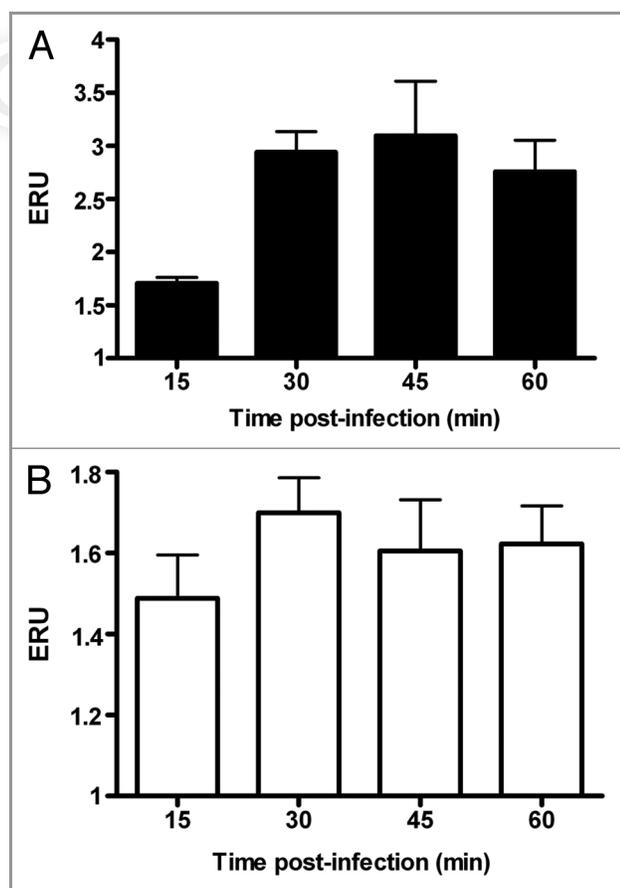
## Discussion

Here we report that endocytosis of Brucella or Salmonella LPS in macrophages produced a transitory increment in VAMP3 mRNA levels that return to normal levels at later time points. This transitory increment was also seen in J774 cells infected with Brucella, but not with Salmonella. However, no significant differences were observed in Brucella survival when macrophages were silenced with VAMP3 siRNAs. These results further indicate that VAMP3 could be linked to the membrane expansion during macropinocytosis and suggest that external stimuli such as LPS or infection by Brucella trigger an increase in VAMP3 expression probably to make the protein readily available during this process. However, changes in VAMP3 levels post infection do not seem to be of particular relevance for Brucella survival and thus for the biogenesis of the BCVs.

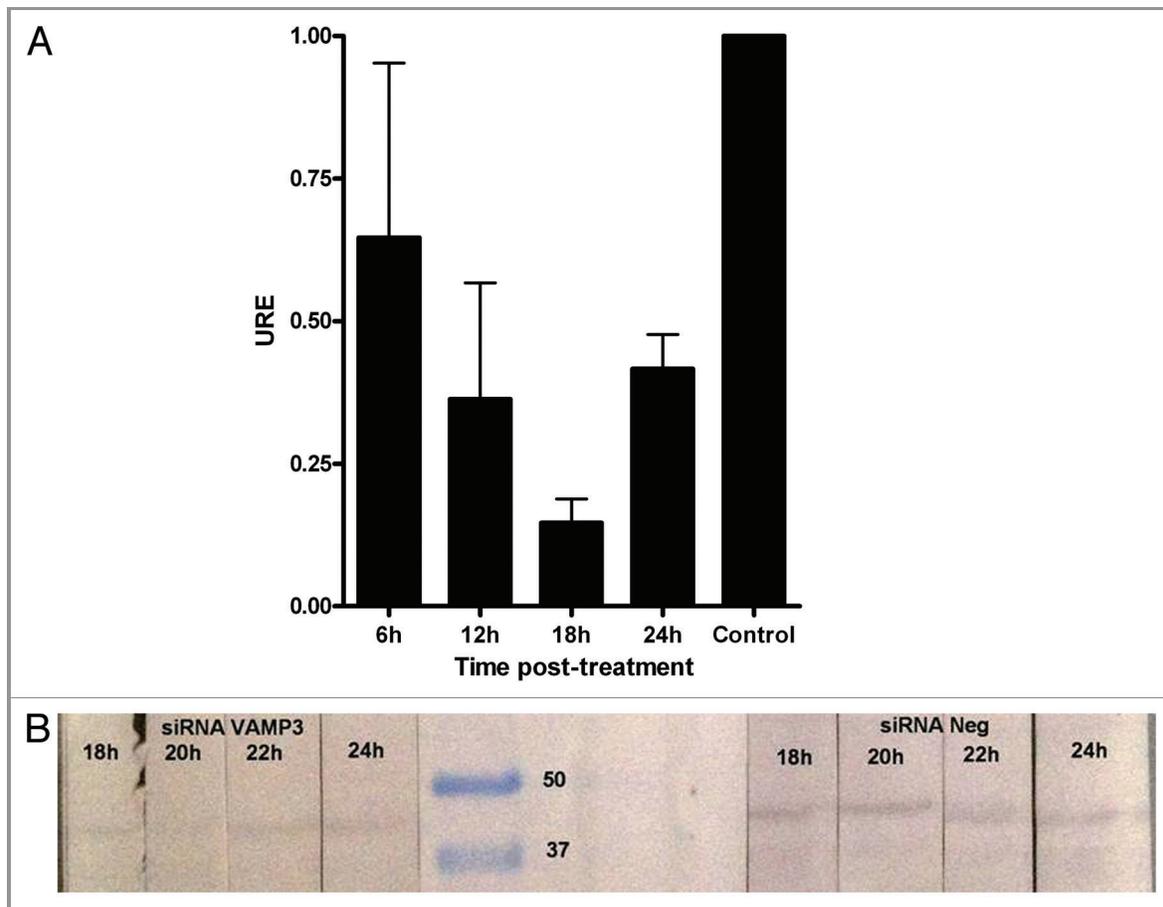
Different observations suggest that the soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor (SNARE) protein VAMP3, an integral component of the recycling endosomes, plays an important role in cytokine secretion and in phagocytosis, possibly participating in localized fusion events at the site of phagosome formation and thus driving pseudopodial extension.<sup>13,19</sup> Supporting this idea Coppolino and colleagues used a GFP-tagged chimera of VAMP3 that they found to accumulate at sites of Salmonella and *Candida albicans* invasion.<sup>16,19</sup> Moreover, microinjection of tetanus or botulinum toxins (which cleave and degrade vamp2 and vamp3) reduced phagocytosis of a variety of particles by ~66% in J774 cells.<sup>20,21</sup>

However, studies performed with *S. enterica* serovar Typhimurium indicate that VAMP3 has no direct role in its phagocytosis. For example, recruitment of GFP-VAMP3 at sites of Salmonella invasion was blocked by tetanus toxin; however, it did not inhibit invasion.<sup>19</sup> Furthermore, in dominant-negative NSF cells, cellular invasion by *S. Typhimurium* or the associated membrane remodeling were not affected, but fusion of Salmonella-containing vacuoles with endomembranes was significantly impaired.<sup>19</sup> Along these lines, we observed a reduction in VAMP3 mRNA levels when *S. Enteritidis* was internalized by J774 cells. The different effect on VAMP3 expression observed between Salmonella LPS-treated and infected J774 cells, suggest that membrane components other than LPS also play a role in this process.

Contradictory results have been published with respect to the role of the non-canonical structure and composition of the



**Figure 2.** Infection by *B. melitensis* increases VAMP3 expression in J774.A1 macrophages. J774.A1 cells were infected with *B. melitensis* or *S. enterica* serotype Enteritidis (SeE) at a MOI of 50:1, at 37°C. After 15, 30, 45 and 60 min cultures were washed and cells harvested for RNA purification. VAMP3 mRNA was quantified as described in Materials and Methods. Values are expressed in expression relative units (ERU). Bars represent the fold increase compared with respective control cells at the same time points, by the Pfaffl equation. These results are representative of three independent experiments conducted in triplicate.



**Figure 3.** Expression of VAMP3 in J774.A1 cells treated with siRNA VAMP3. (A) qRT-PCR was performed at 6 h intervals to determine the time lapse in which VAMP3 is inhibited at maximum. Control corresponds to siRNA negative in western blotting. (B) Western blotting assay for VAMP3 of J774.A1 cells treated with siRNA VAMP3, samples were monitored each 2 h in order to detect maximum inhibition more precisely.

Brucella LPS in the modulation of TNF secretion,<sup>20</sup> a fact that could be linked to the modulation of the expression of vesicular trafficking proteins or to other intracellular factors. These findings suggest that fluctuations in the expression of VAMP3 very early during phagocytosis possibly influence the movement of secretory vesicles to the plasma membranes.<sup>21,22</sup> Murray et al.<sup>15</sup> showed that the maximum expression of VAMP3 was detected at 2 h after stimulation of RAW264.7 murine macrophages using LPS from *S. enterica* serovar Minnesota.

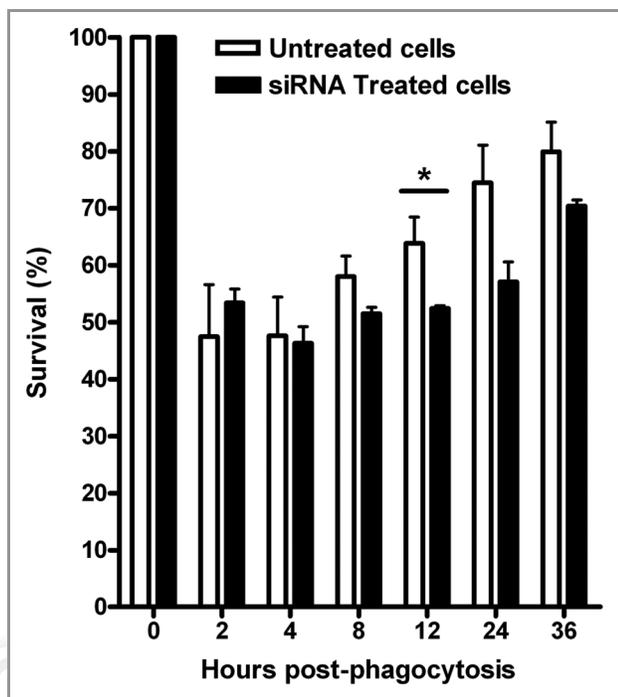
The possibility that Brucella modifies the expression and/or function of proteins that promote intracellular trafficking during phagocytosis has been previously proposed.<sup>20,23</sup> It was demonstrated that LPS is a bacterial constituent capable of modulating the secretion of proinflammatory cytokines mediated by the v-SNARE VAMP3, which in turn is located primarily in recycling endosomes.<sup>24,25</sup> This protein must engage itself to the t-SNARE proteins syntaxin-4 and SNAP23 in the plasma membrane thus promoting the fusion of membranes and secretion. It seems reasonable to suppose that if lipid rafts were preferred sites for Brucella entry into macrophages, then proteins associated with these macrodomains would be affected at the beginning of phagocytosis. In this stage, it is likely that bacteria have to resolve

the fate of the phagosomes.<sup>23</sup> In contrast to this notion, we did not find significant differences in the ability of Brucella to survive and replicate in macrophages upon VAMP3 mRNA silencing. However, we cannot rule out the possibility that other SNARE proteins such as the SNAREs syntaxin-3, Ti-VAMP and VAMP8,<sup>26</sup> could play a role during Brucella invasion, whether or not their expression is modified in response to infection.

## Materials and Methods

**Bacterial strains and LPS extraction.** The smooth, virulent *Brucella melitensis* strain BM133, a reference Mexican strain,<sup>27</sup> was used both for infections and for the extraction of LPS. Additionally, a wild-type strain of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SeE) from our departmental collection and commercially available LPS from *S. enterica* serovar Minnesota (Sigma Aldrich) were also used. *B. melitensis* LPS was extracted from a 1 L culture as previously described<sup>18</sup> and quantified by the 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) method.<sup>28</sup> The protein concentration in the LPS extract was determined by the Bradford method.<sup>29</sup>

**Cell culture and infections.** Murine J774.A1 macrophage cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium



**Figure 4.** siRNA silencing of VAMP3 expression does not affect *B. melitensis* replication and survival in J774.A1 macrophages. J774.A1 cells transfected with three different siRNAs designed to silence mouse VAMP3 were infected with *B. melitensis* at a MOI of 50:1. The CFU counts, expressed as survival %, were determined at different intervals during a period of 36 h. Viable intracellular bacteria were determined by the gentamicin protection assay. Time zero represents total CFU counts previous to gentamicin treatment. The graph shows the mean of CFU counts from three independent experiments. \*At this time point, a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) was determined.

(DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco), 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate and cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were plated in 6-well plates (Nunc) ( $1 \times 10^6$  cells per well) 24 h before stimulation with LPS. Briefly, the cells were grown until 90–100% of confluence and stimulated with 200 ng/ml of *B. melitensis* LPS (Bm-LPS) or SeM LPS (Se-LPS) for 30 and 60 min. Then total protein was extracted from each well using RIPA buffer<sup>30</sup> [150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM PMSF and Complete Protease Inhibitor (Roche)]. For infections, J774.A1 cells were cultured as previously indicated and infected at a MOI of 50:1 for 15, 30, 45 or 60 min at 37°C with *B. melitensis* BM133 grown in BBL Medium (BD Diagnostics) or SeE grown in LB broth. These experiments were performed three times, each in triplicate.

**Gentamicin protection assay (GPA).** J774.A1 cells were plated in 6-well plates at  $1 \times 10^6$  per well and cultured as indicated, to attain 90 to 100% confluence. Cell monolayers were washed twice with PBS before infection. *B. melitensis* BM133 grown in BBL Medium up to an OD<sub>600nm</sub> of 1.0 (approximately  $3 \times 10^9$  bacteria/mL) was diluted to set the infection at a MOI of 50:1. The plates were centrifuged at 500 rpm for 2 min at 4°C to synchronize phagocytosis and then incubated at 37°C in a 5%

CO<sub>2</sub> atmosphere for 1 h. Time zero was set at this point. Then the cells were washed and further incubated for 2 h in DMEM containing 100 µg/ml of gentamicin to kill adherent bacteria, but not those located within the cells. After this time the cells were washed again and the medium replaced once more but now containing 15 µg/ml of gentamicin for the rest of the experiment. Control cells were also incubated with DMEM supplemented with gentamicin at the same concentration with no effect on cells. The monolayer was washed once with PBS at different intervals up to 36 h and lysed with 1% sterile Triton X-100. Appropriate dilutions were plated on Brucella agar (BBL Medium, BD Diagnostics) to determine the number of viable intracellular bacteria by bacterial colony counting.

**Real-time PCR.** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with the Two-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions using total RNA extracted from infected or LPS-treated cells with Trizol (Invitrogen), according to company's protocol. Primers were designed from the sequence of VAMP3 mRNA reported in the Gen Bank (accession number NM\_009498). The sequences of the primers were VAMP3-1 (Forward) 5'-AGAACCTGCCGT GTTATCGAGCTT-3' and VAMP3-2 (Reverse) 5'-ACACAA GTCCTCTTTCCCAGTCCA-3'; these primers generated a 195-bp product. Control primers for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) housekeeping gene were modified from those reported by Fan et al.<sup>31</sup> The sequences obtained were GP-1 (Forward) 5'-GCTCATGACCACAGTCCA TGCC-3' and GP-2 (Reverse) 5'-GCACATTGGGGGTAGGAA CACA-3'; these primers generated a 201-bp product. The following PCR conditions were used: 50°C for 2 min; 95°C for 10 min; 35 cycles of 95°C for 15 sec (denaturation), 60°C for 60 sec (annealing) and 72°C for 90 sec (elongation); and a final extension at 72°C for 10 min. All reactions were performed using a Light Cycler 480 (Roche) and the results were analyzed with the Pfaffl equation, which indicates changes in the expression of target genes.<sup>32</sup> Values are expressed in expression relative units (ERU) that indicate the number of times that the expression changed with respect to the control. GAPDH levels were unchanged and used to normalize VAMP3 expression (data not shown).

**Small interfering RNA (siRNA) treatment.** J774.A1 cells plated on 6-well plates were transfected with three different siRNA constructs designed to silence mouse VAMP3 expression (Silencer Validated siRNA ID#186988-90, Ambion) using siIMPORTER (UPSTATE-Millipore) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR experiments were performed at different times upon transfection to establish the earliest time point when the VAMP3 mRNA was at its lower level with respect to untreated cells. Those experiments were conducted at 6 h intervals, but for western blotting intervals were reduced for 2 h, in order to identify the time lapse more precisely. Hence, J774.A1 cells were cultured for 18 to 20 h prior to infection with *B. melitensis*. Subsequently, bacterial colony counting was performed in a GPA assay as previously described.

**Statistics.** Differences in data from qPCR from LPS treatment and infections were analyzed by T-student test.

## Disclosure of Potential Conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

This work was supported by PAPIIT IN-222907 and PAPIIT IN-212610, UNAM.

## References

1. World Health Organization. Brucellosis in humans and animals: WHO guidance. Geneva, 2005.
2. Adams LG, Schutta CL. Natural resistance against brucellosis: A review. *Open Vet Sci J* 2010; 4:61-71.
3. Carvalho Neta AV, Mol JPS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J* 2010; 184:146-55; PMID:19733101; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.010>
4. Xavier MN, Paixão TA, den Hartigh AB, Tsois RM, Santos RL. Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet Sci J* 2010; 4:109-18.
5. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* 2006; 5:13-24; PMID:16556309; <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
6. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic* 2009; 10:364-71; PMID:19192253; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00878.x>
7. Kim S, Watarai M, Makino S, Shirahata T. Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog* 2002; 33:225-37; PMID:12473437; <http://dx.doi.org/10.1006/mpat.2002.0531>
8. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 2003; 198:545-56; PMID:12925673; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20030088>
9. Roop RM, 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 2009; 198:221-38; PMID:19830453; <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-009-0123-8>
10. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2002; 90:281-97; PMID:12414149; [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
11. Roop RM, 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA. Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 2004; 52:621-30; PMID:15101970; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04017.x>
12. Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 2006; 157:93-8; PMID:16364608; <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.10.002>
13. Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, Grinstein S. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *J Cell Biol* 2000; 149:697-706; PMID:10791982; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.149.3.697>
14. Stow JL, Manderson AP, Murray RZ. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:919-29; PMID:17124513; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1980>
15. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 2005; 310:1492-5; PMID:16282525; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120225>
16. Kay JG, Murray RZ, Pagan JK, Stow JL. Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *J Biol Chem* 2006; 281:11949-54; PMID:16513632; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600857200>
17. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:347-58; PMID:16633337; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1910>
18. Kreutzer DL, Buller CS, Robertson DC. Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1979; 23:811-8; PMID:110682
19. Coppolino MG, Kong C, Mohtashami M, Schreiber AD, Brumell JH, Finlay BB, et al. Requirement for N-ethylmaleimide-sensitive factor activity at different stages of bacterial invasion and phagocytosis. *J Biol Chem* 2001; 276:4772-80; PMID:11092884; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007792200>
20. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T. Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 2002; 4:341-55; PMID:12067319; <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00195.x>
21. Allen LAH, Yang C, Pessin JE. Rate and extent of phagocytosis in macrophages lacking vav3. *J Leukoc Biol* 2002; 72:217-21; PMID:12101283
22. Niedergang F, Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:422-8; PMID:15261675; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2004.06.006>
23. Mañes S, del Real G, Martínez-A C. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:557-68; PMID:12876558; <http://dx.doi.org/10.1038/nri1129>
24. van Ijzendoorn SCD. Recycling endosomes. *J Cell Sci* 2006; 119:1679-81; PMID:16636069; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02948>
25. Hu K, Rickman C, Carroll J, Davletov B. A common mechanism for the regulation of vesicular SNAREs on phospholipid membranes. *Biochem J* 2004; 377:781-5; PMID:14563208; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031164>
26. Pocard T, Le Bivic A, Galli T, Zurzolo Ch. Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 2007; 120:3309-20; PMID:17878240; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.007948>
27. Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Puente JL, Suárez-Güemes F. The BMEI0216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells. *Microb Pathog* 2008; 44:28-33; PMID:17881185; <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2007.08.008>
28. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Anal Biochem* 1978; 85:595-601; PMID:646115; [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90260-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(78)90260-9)
29. Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 1990; 182:50-68; PMID:2314256; [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
30. Rao N, Miyake S, Reddi AL, Douillard P, Ghosh AK, Dodge IL, et al. Negative regulation of Lck by Cbl ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3794-9; PMID:11904433; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.062055999>
31. Fan Q, Ding J, Zhang J, Guan N, Deng J. Effect of the knockdown of podocin mRNA on nephrin and alpha-actinin in mouse podocyte. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229:964-70; PMID:15388893
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45; PMID:11328886; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>