



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

VIRULENCIA E INMUNOGENICIDAD DE LA CEPA MUTANTE *invA* DE *Brucella*  
*melitensis*

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

PRESENTA:  
JORGE ALVA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR  
DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

DEDICATORIA.

Para ti hija, Mónica Valentina. Te amo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter*, por darme la oportunidad de todos estos años de formación académica, científica y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca obtenida para la realización de este doctorado.

A los integrantes del jurado, Dra. Mireya de la Garza Amaya, Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr. Francisco Suárez Güemes, Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Alfredo Sahagún Ruiz. Muchas gracias por las aportaciones críticas a este trabajo.

A mi tutor principal Dr. Francisco Suárez Güemes y a los miembros del comité tutorial, Dra. Beatriz Arellano Reynoso y Dr. Rigoberto Hernández Castro. Gracias a ustedes por todo el apoyo, pero sobre todo gracias por ser mis amigos.

A mi familia. Esperanza Pérez Aguirre, Jorge Fernando Alva Barroso y Rodrigo Alva Pérez. Gracias por apoyarme en esta etapa tan trascendental en mi vida.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis, a todos aquellos que he visto venir e irse. Yuliet, Uziel, Rosalía, Cristina, Liliana, Anayántzin, Juan Carlos, Ramón, Alejandro Benítez, Ariel, Omar, Areli, Anaíd, Irasema, Pablito, Edgar Alfonseca, Jose Ángel, Susana Flores, Jorge de la Garza, Yanela, Adrián, Alejandra, Rodrigo y Adriana. Todos me han ayudado durante estos años en el desarrollo de esta tesis, gracias por todos los momentos vividos.

## INDICE

Resumen.	1
Abstract.	2
Palabras clave.	2
Abreviaturas.	3
1. Introducción.	5
1.1 Generalidades.	5
1.1.1 Situación epidemiológica y presencia de la enfermedad en los seres humanos.	5
1.1.2 Características morfológicas y taxonómicas.	7
1.1.3 Características antigénicas.	9
1.1.4 Características genéticas.	11
1.2 Brucelosis.	12
1.2.1 Brucelosis en los animales domésticos.	12
1.2.2 Brucelosis en el ser humano.	14
1.2.3 Mecanismo de invasión y replicación intracelular.	15
1.2.4 Mecanismos de inmunidad.	19
1.2.5 Vacunación.	22
1.2.6. Diagnóstico.	24
1.2.6.1 Diagnóstico de la brucelosis animal.	24
1.2.6.2 Diagnóstico de la brucelosis humana.	26
1.3 Estrés bacteriano asociado a la invasión.	27
1.3.1 Respuesta astringente.	28
1.3.2 Mecanismos de respuesta ante el estrés intracelular en <i>Brucella</i> spp.	29
1.4 Alarmonas y su control.	33
1.5 Enzimas NUDIX.	35
1.5.1 El control de las alarmonas por enzimas NUDIX en bacterias patógenas y su relevancia en la virulencia.	36

2. Justificación.	38
3. Hipótesis.	39
4. Objetivo.	39
5. Material y Métodos.	39
5.1. Cepas bacterianas.	39
5.2 Construcción de la cepa mutante <i>B. melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km.	41
5.3 Complementación de la cepa <i>B. melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km.	41
5.4 Ensayos de invasión en células HeLa.	42
5.5 Ensayos de fagocitosis y sobrevivencia intracelular en macrófagos caprinos.	43
5.6 Evaluación del tránsito intracelular a través de inmunofluorescencia.	44
5.7 Ensayo <i>in vivo</i> en el modelo murino.	45
5.7.1 Determinación de virulencia residual.	46
5.7.2 Determinación de inmunidad humoral.	46
5.7.3 Determinación de producción de IFN- $\gamma$ .	47
5.8 Análisis estadístico.	48
6. Resultados.	49
6.1 Construcción y análisis de la cepa mutante <i>B. melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km y la cepa complementada <i>B. melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km <sup>C</sup> .	49
6.2 Invasión en células HeLa.	50
6.3 Sobrevivencia y multiplicación intracelular en macrófagos caprinos.	52
6.4 Tránsito intracelular en macrófagos murinos.	53
6.5 Determinación de virulencia residual en el modelo murino.	57
6.6 Determinación de la inmunidad humoral.	60
6.7 Determinación de la expresión de IFN- $\gamma$ .	65
7. Discusión.	65
8. Conclusiones.	71
9. Perspectivas.	72

10. Anexo 1. Artículo publicado.	73
11. Referencias.	74

## Resumen

Los mecanismos de invasión y de sobrevivencia intracelular para el patógeno *Brucella melitensis* no son completamente conocidos. Gracias a la secuenciación completa del genoma de *B. melitensis* se conoce que esta especie produce una proteína de la subfamilia NUDIX, la cual se ha descrito en otras especies bacterianas como invasinas. En la presente tesis se generó una mutación en el gen BMEI0215 (*invA*) en la cepa *B. melitensis* 133, para determinar la participación de dicho gen en la virulencia. Los resultados de la invasión en células HeLa demostraron que la sobrevivencia de la cepa mutante disminuyó hasta 5 veces menos que la cepa parental a las 2 h pi ( $P < 0.001$ ). En la infección con macrófagos de cabra la replicación de la cepa mutante fue hasta 8 veces menor que la cepa parental a las 24 h pi ( $P < 0.001$ ); sin embargo a las 48 h pi no hubo diferencias significativas en la replicación intracelular. Adicionalmente, la colocalización de la cepa mutante con calregulina fue significativamente menor a las 24 h pi comparado a la colocalización observada para la cepa parental. Además, la cepa mutante exhibió una menor colocalización con catepsina D, lo que fue similar a la cepa parental a las 24 h pi. Los resultados de la infección en el modelo murino demostraron que la colonización del bazo fue significativamente menor en la cepa mutante que en la cepa parental ( $P < 0.001$ ). La respuesta inmune, medida a través de la transcripción de IFN- $\gamma$  y producción de anticuerpos, fue similar entre la cepa vacunal Rev 1 y la cepa mutante. Esta respuesta fue menor que la producida por la cepa parental. Estos resultados demuestran que el gen *invA* es importante durante la invasión pero no en el periodo de replicación intracelular, aunado a que la mutación produce atenuación en el modelo *in vivo*.

## ABSTRACT

Some of the mechanisms underlying the invasion and intracellular survival of *B. melitensis* are still unknown, including the role of a subfamily of NUDIX enzymes, which have been described in other bacterial species as invasins and are present in *Brucella* spp. We have generated a mutation in the coding gene of one of these proteins, the *invA* gene (BMEI0215) of *B. melitensis* strain 133, to understand its role in virulence. HeLa cell invasion results showed that mutant strain survival was decreased 5-fold compared with that of the parental strain at 2 h pi ( $P < 0.001$ ). In the goat macrophage infection assay, mutant strain replication was 8-fold less than in the parental strain at 24 h pi ( $P < 0.001$ ); yet, at 48 h pi, no significant differences in intracellular replication were observed. Additionally, colocalization of the *invA* mutant with calregulin was significantly lower at 24 h pi compared with that of the parental strain. Furthermore, the mutant strain exhibited a low level of colocalization with cathepsin D, which was similar to the parental strain colocalization at 24 h pi. Mouse infection results demonstrated that spleen colonization was significantly lower with the mutant than with the parental strain. The immune response, measured in terms of antibody switching and IFN- $\gamma$  transcription, was similar for Rev 1 and infection with the mutant, although it was lower than the immune response elicited by the parental strain. Consequently, these results indicate that the *invA* gene is important during invasion but not for intracellular replication. Additionally, mutation of the *invA* gene results in in vivo attenuation.

Palabras clave.

*Brucella*, invasión, enzima NUDIX, replicación intracelular.

## Abreviaturas.

Amp	Antibiótico ampicilina.
ARS	Enzimas RNAt sintetasas.
BCV	Vacuola(s) endocítica(s) de <i>Brucella</i> .
DOP	Enzima dinucleósido oligofosfatasa.
EEA1	Antígeno endosomal temprano 1.
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
ERES	Sitios de salida del retículo endoplásmico.
HSPs	Proteínas de choque térmico.
Km	Antibiótico kanamicina.
LAMP1	Proteína de membrana asociada al lisosoma 1.
LPS	Lipopolisacárido.
MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad I.
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad II.
NLR	Receptor tipo "NOD".
NUDIX	Difosfatos nucleosídicos unidos a otras fracciones X.
OD	Densidad óptica o densidades ópticas.
OMPs	Proteínas de membrana externa.
ORF	Marco abierto de lectura.
Pcm	Por cada millón de habitantes.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Post-infección.
PTS	Sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato.
RE	Retículo endoplásmico.
RNAm	RNA mensajero.
RNAP	Polimerasa de RNA.
RNAt	RNA de transferencia.
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido.
Tc	Antibiótico tetraciclina.

TLR	Receptor tipo "Toll".
UFC	Unidades formadoras de colonias.
URE	Unidades relativas de expresión.

## 1. Introducción.

### 1.1 Generalidades.

#### 1.1.1 Situación epidemiológica y presencia de la enfermedad en los seres humanos.

La brucelosis es una enfermedad zoonótica endémica en México causada por diferentes especies de *Brucella*. En todo el territorio nacional se ha aplicado desde 1995 el programa nacional para el control y la erradicación de la brucelosis animal (NOM-041-ZOO-1995)<sup>1</sup>. La información oficial del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación indica que al 27 de enero de 2014 el 77.55% del territorio nacional se encontraba en fase de control, el 14.43% en fase de erradicación y sólo el 8.02% del territorio nacional tiene el estatus libre de brucelosis en bovinos.<sup>2</sup> (Fig. A).



Figura A. Mapa del territorio nacional mostrando las zonas en fases de control (rojo), erradicación (amarillo) y libre (verde) de la brucelosis en bovinos, según la campaña oficial. Información obtenida de la página oficial <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>.<sup>2</sup>

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud notifica en su boletín epidemiológico que a la 13<sup>o</sup> semana del 2014 se reportaron 524 casos confirmados de brucelosis humana, en el 2013 se reportaron 2,794, mientras que en el año 2012 se reportaron 3,063.<sup>3</sup> Como puede ilustrarse, la incidencia de la enfermedad en los animales está directamente relacionada con la presencia de la enfermedad en los seres humanos. La brucelosis humana se define como una enfermedad debilitante que produce pérdidas económicas debido a la incapacidad laboral. Los principales síntomas son: fiebre recurrente, mialgias y debilidad general, aunque la enfermedad puede presentarse de manera asintomática. El periodo de incubación suele ser de 2 a 3 semanas. Si no es tratada correctamente la enfermedad puede volverse crónica y puede limitar la calidad de vida del paciente debido a la afectación de diversos órganos. Excepcionalmente puede llegar a ser mortal.<sup>4,5</sup> La transmisión hacia el hombre ocurre principalmente por el consumo de alimentos de origen animal, en donde los productos lácteos juegan un papel muy importante como fuente de infección. También es determinante la transmisión de la enfermedad debido al continuo contacto con animales, como es el caso del riesgo ocupacional de médicos veterinarios y granjeros. A nivel mundial la brucelosis está presente en la mayor parte del planeta, siendo algunas regiones geográficas libres de la enfermedad (algunos estados de Estados Unidos América, Canadá, la isla de Malta e Irlanda). Se presenta de manera endémica en África, Sudamérica, Asia central, así como la mayor parte de la región de la meseta del mediterráneo (Fig. B). En países en donde la incidencia es suficientemente baja como para representar un problema de salud pública, los reservorios de las diferentes especies de *Brucella* se encuentran principalmente en la fauna silvestre.<sup>6,7</sup>

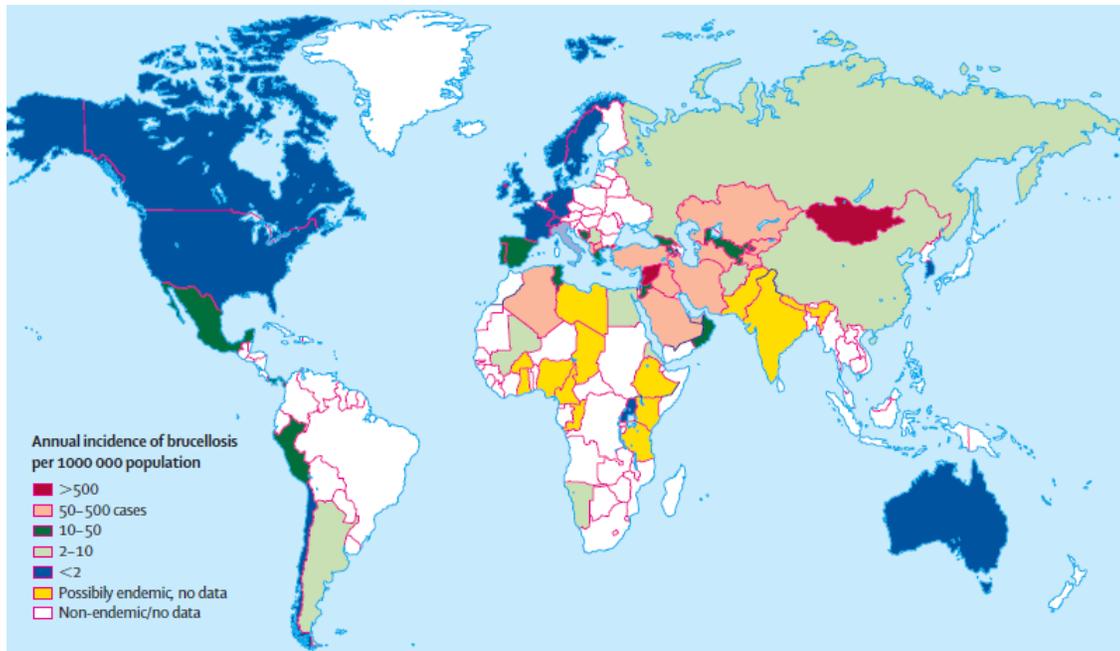


Figura B. Mapa mundial de la situación de la brucelosis humana hasta el año 2006. Las regiones en rojo muestran más de 500 casos por cada millón de habitantes (pcm), las regiones en rosa de 50 a 500 casos pcm, las regiones en verde de 10 a 50 casos pcm, las regiones geográficas en gris de 2 a 10 pcm, las regiones en azul muestran una incidencia de menos de dos casos pcm, las regiones en amarillo muestran una alta probabilidad de ser regiones endémicas pero no se encuentran datos y las regiones en blanco son regiones geográficas no endémicas y en donde no hay información disponible, respectivamente. Tomada de Pappas G, et al. (2006).<sup>7</sup>

### 1.1.2 Características morfológicas y taxonómicas.

El agente causante de la brucelosis en seres humanos fue aislado por primera vez en 1887 por Sir David Bruce.<sup>8</sup> El género *Brucella* está compuesto por diez especies reconocidas actualmente, las cuales son: *Brucella melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. cetaceae*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. neotomae*. Las primeras tres especies son las principales responsables de producir enfermedad en el ser humano. Las bacterias de la especie *B. canis* también se han reconocido por producir enfermedad en el hombre de manera ocasional, así como también se ha notificado de brucelosis en seres humanos provocadas por *B. cetaceae* y *B. pinnipedialis*, cuya presentación principal se caracteriza por ser neurológica.<sup>6,9</sup> Recientemente se aisló una bacteria que podría clasificarse dentro del género *Brucella*, ésta fue aislada a partir de ranas.<sup>10</sup>

Genéticamente relacionadas entre sí, las diferentes especies de *Brucella* presentan cierta preferencia de hospedador, de esta forma *B. melitensis* infecta principalmente ovinos y caprinos, aunque se ha aislado de bovinos, *B. abortus* en bovinos y se ha podido aislar de caballos, cerdos y rumiantes silvestres. *B. suis* afecta principalmente cerdos, y se ha podido aislar de bovinos y roedores. Esta es la especie que muestra mayor variabilidad genética y también se ha aislado de una gran variedad de hospedadores silvestres. *B. canis* se aísla principalmente de perros y algunos cánidos silvestres, siendo ocasional la infección en el hombre. Tanto *B. pinipedialis* como *B. cetaceae* se han aislado de mamíferos marinos, aunque la afectación al hombre demuestra la adaptabilidad de estas especies. *B. ovis* afecta a ovinos y no se ha demostrado que afecte otras especies. *B. neotomae* se ha aislado de ratas del desierto únicamente, mientras que *B. microti* se ha recuperado de arvicolinos, pequeños roedores distribuidos tanto en América como en Europa. Por otro lado, *B. inopinata* recientemente fue agregada dentro de las especies del género, únicamente se han reportado dos casos de infección en seres humanos.<sup>6,11,12</sup>

Taxonómicamente, *Brucella* spp. pertenece al subgrupo  $\alpha 2$  de las proteobacterias, orden *Rhizobiales*, familia *Brucellaceae*. Estas bacterias de vida intracelular facultativa mantienen estrecha relación filogenética con bacterias endosimbiontes de plantas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, así como bacterias patógenas de animales domésticos como *Bartonella* y *Rickettsia*, entre otras. Morfológicamente estas bacterias se definen como cocobacilares, Gram negativas, inmóviles y no esporuladas.<sup>9</sup>

La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C, con un rango de crecimiento entre 20° C y 40° C. El pH óptimo de desarrollo es de 6.6 a 7.4. De metabolismo principalmente aerobio, pueden desarrollarse en condiciones de anaerobiosis y algunas cepas necesitan suplementación con CO<sub>2</sub>. El primoaislamiento se favorece con la adición de sangre o suero al medio, aunque estos factores no son determinantes para el crecimiento *in vitro* de *Brucella* spp. Estas bacterias pueden sobrevivir en el suelo y en diversos fomites hasta por ocho meses, sobre todo en condiciones de bajas temperaturas. Sin embargo, *Brucella* spp. es sensible a la

mayoría de los desinfectantes comunes, aunque es particularmente resistente a los cuaternarios de amonio, tal como el cloruro de benzalconio.<sup>5,9</sup>

### 1.1.3 Características antigénicas.

El lipopolisacárido (LPS), al igual que en otras bacterias Gram negativas, constituye la porción estructural bacteriana que se encuentra en contacto con el ambiente externo. Por tanto, resulta lógico determinar que se trata de la región más antigénica. Las bacterias de este género se pueden clasificar según la naturaleza del LPS en especies de fenotipo liso o de fenotipo rugoso. Las especies lisas presentan la cadena O del LPS completo, mientras que las especies rugosas lo presentan incompleto o no lo presentan. El LPS está compuesto, como en otras bacterias Gram negativas, de tres unidades estructurales: el lípido A, el centro oligosacárido y la cadena O. El lípido A está insertado en la membrana celular externa de la bacteria. Formado por un esqueleto disacárido de aminoglucosa en uniones  $\beta$  1-6 unido a cadenas saturadas de hasta 28 átomos de carbono a través de enlaces amido o éster, no presenta etanolamina o arabinosamina como es el caso de las enterobacterias. Es gracias a esta conformación química que presenta baja endotoxicidad.<sup>13,14</sup> El núcleo oligosacárido, que se encuentra unido a la cadena O y al lípido A contiene quinovosamina (2-amino, 2,6-didesoxiglucosa), KDO (3-desoxi D-mano 2-octulosonato), glucosamina (2-amino, 2-desoxi-D-glucosa) y manosa. En ausencia de grupos fosfato ligados al núcleo oligosacárido, la carga negativa del LPS está dada por el KDO.<sup>15,16</sup> La cadena O del LPS es la estructura que le da a la bacteria determinación antigénica, en las especies de fenotipo liso la cadena O es un homopolímero de perosamina (4,6-dideoxi 4-formamido- $\alpha$ -D manopiranosil) con la mayoría de las uniones en  $\alpha$  1-2 y hasta un 2% en uniones  $\alpha$  1-3 (epitopo A, característico de *B. abortus*) o con uniones  $\alpha$  1-3 y cada cuatro enlaces se presenta la unión  $\alpha$  1-2 (epitopo M, característico de *B. melitensis*). La longitud de la cadena O en especies de fenotipo liso puede ser de hasta 100 subunidades glucosídicas (Fig C).<sup>17,18</sup> Los determinantes antigénicos descritos como epitopo A

y epitopo M se utilizan como marcadores epidemiológicos y resultan de la aglutinación con sueros monoespecíficos. Según la dominancia de estos epitopos se han descrito diversos serotipos o biovars en las diferentes especies. *B. melitensis* posee tres biotipos, *B. abortus* tiene ocho y *B. suis* cuatro.<sup>17,19</sup>

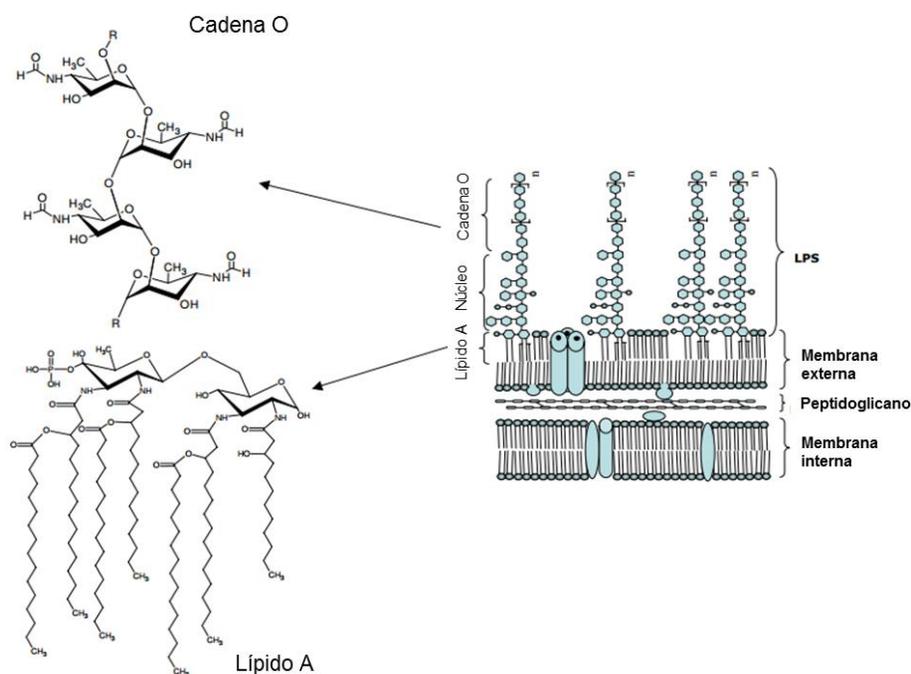


Figura C. Estructura molecular del LPS liso de *Brucella*. Tomada de Cardoso et al. (2006).<sup>18</sup>

Resulta evidente que la determinación serológica en base a la cadena O del LPS se utilice principalmente en especies lisas como lo son la mayoría de las especies de *Brucella*. Para las especies de fenotipo rugoso como *B. canis* y *B. ovis*, así como las variantes de fenotipo rugoso a partir de las especies naturales de fenotipo liso, la antigenicidad principal también está determinada por el LPS. Tanto el núcleo oligosacárido como la presencia de una cadena O incompleta son importantes determinantes antigénicos en estas especies. Sin embargo, las proteínas de membrana externa (OMPs por sus siglas en inglés Outer Membrane Protein) son estructuras que contribuyen a la determinación antigénica en estas especies.<sup>18,20</sup>

Aunque en menor proporción, también se han considerado a las proteínas periplásmicas, algunas proteínas del citosol y a los ribosomas como estructuras antigénicas.<sup>8</sup>

#### 1.1.4 Características genéticas.

En base a estudios genéticos y de filogenia se ha establecido que el género es monoespecífico, y la diferencia entre especies y biovares resulta de deleciones, inserciones e inactivaciones genéticas que no representan más del 10% de la secuencia completa. Las diferencias en el genoma de las diferentes especies de *Brucella* pueden ser las principales responsables de la preferencia a diferentes hospedadores, así como características particulares en la patogenicidad.<sup>21,22</sup>

Hasta el año 2012 se habían secuenciado 30 genomas de diferentes especies y biovariedades de *Brucella* spp.<sup>23</sup> El genoma de *Brucella* está compuesto por dos cromosomas (de aproximadamente 2 millones de pares de bases, cromosoma I, y de 1 millón de pares de bases, cromosoma II), a excepción de *B. suis* biovar 3, que cuenta con un solo cromosoma de 3.1 millones de pares de bases. El genoma es muy estable y no se han descrito plásmidos para este género.<sup>24</sup> El contenido de G + C es de 57%, y ambos cromosomas forman un genoma de 3200 a 3400 genes, sin embargo el genoma de *Brucella* sp. 83/13 contiene 3,167 genes, mientras que *Brucella ceti* cepa Cudo contiene 3,610 genes.<sup>22,23</sup> Tal como se mencionó anteriormente los genomas de las diferentes especies de *Brucella* spp. son muy homogéneos, y presentan entre ellos una similitud cercana al 100%<sup>23</sup>; sin embargo, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* presentan una homogeneidad del 77% en comparación con *B. abortus*,<sup>25</sup> mientras que *B. microti* presenta una homología del 84%.<sup>26</sup> Las diferencias genéticas entre *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* se han identificado en regiones identificadas como islas genómicas (mayores de 20 kilobases). La comparación de estos tres genomas a través de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP's, por sus siglas en inglés Singular Nucleotide Polymorphism) en estas islas genéticas, así como la presencia de inserciones, inversiones y deleciones ha puesto de manifiesto que *B. suis* procede

evolutivamente como especie de manera más temprana que *B. abortus* y *B. melitensis*. Mientras que *B. abortus* comparte 30 genes con *B. melitensis*, éste comparte 27 con *B. suis*, y entre *B. suis* y *B. abortus* comparten 22 genes de manera idéntica. En cuanto a presencia de genes únicos *B. abortus* no presenta genes únicos, *B. melitensis* presenta un solo gen y *B. suis* presenta 22 genes únicos.<sup>27</sup> La especie que menor divergencia genética presenta es *B. ovis*, lo que indica probablemente que se trata de la especie de *Brucella* más reciente.<sup>28</sup> En estudios filogenéticos se ha concluido que *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* y *B. ovis* forman grupos independientes. *B. canis* está emparentado filogenéticamente con *B. suis* (biovares 3 y 4), mientras que las especies *B. ceti* y *B. pinnipedialis* forman un grupo independiente.<sup>29</sup>

## 1.2 Brucelosis.

### 1.2.1 Brucelosis en los animales domésticos.

En general, la infección por las diferentes especies de *Brucella* se caracteriza por afectación al sistema reproductivo, tanto del macho como el de la hembra. Adicionalmente, en las hembras el signo preponderante es el aborto, el cual puede ser el único signo de la enfermedad. *B. melitensis* y *B. abortus* producen aborto en el tercer tercio de gestación en sus respectivos hospedadores principales.<sup>30,31</sup> En el caso de la infección con *B. suis* y *B. canis* el aborto en cerdas y perras gestantes, respectivamente, ocurre en cualquier etapa de la gestación.<sup>32,33</sup> La infección de borregas con *B. ovis* en raras ocasiones produce aborto.<sup>34</sup> En machos el principal signo es la esterilidad, que se puede presentar a consecuencia de orquitis y epididimitis.<sup>6</sup>

La infección se presenta de manera horizontal entre el contacto con animales enfermos. Aunque las vías más conocidas de entrada del patógeno son la oral y la conjuntival, cualquier mucosa puede servir como portal de entrada. Se ha reportado que la vía venérea es importante en la diseminación de *B. canis* y *B. ovis*. Posterior a la entrada al hospedador, las bacterias viajan libres o fagocitadas

por vía linfática o sanguínea y encuentran el primer sitio de replicación en el linfonodo regional. La posterior colonización a diferentes tejidos y órganos, principalmente bazo, hígado, gónadas, placenta y pulmón, puede deberse a la diseminación de las bacterias por macrófagos, produciéndose una infección sistémica.<sup>8,35</sup> El aborto puede presentarse en hembras gestantes que han adquirido la infección y en las gestaciones subsecuentes tener partos normales, aunque el aborto puede volverse a presentar de manera sorpresiva. Tanto las secreciones vaginales, las membranas placentarias y el aborto constituyen las principales fuentes de infección.<sup>30</sup> Se ha relacionado la presencia de eritritol como la principal fuente de atracción de *Brucella* hacia los trofoblastos, causando placentitis y el posterior aborto. Este poliol sería la principal fuente de carbono y energía para *Brucella* spp.<sup>36</sup> Sin embargo, se ha demostrado en el modelo murino que la infección con *B. abortus* provoca aborto y esta especie no presenta eritritol en su placenta, por lo que se ha relacionado a la presencia de IFN- $\gamma$  como la responsable del aborto.<sup>37</sup> Al parecer la combinación de varios factores intervienen en la preferencia de las bacterias por la colonización tanto de la placenta como del feto.

La transmisión de la infección por vía vertical también se ha demostrado. Las crías que nacen de hembras infectadas, o que han tomado leche con presencia de *Brucella* spp., pueden tener resultados negativos en pruebas serológicas y empezar a eliminar bacterias una vez que entran en su etapa reproductiva. La transmisión de *Brucella* spp. hacia la cría resulta en la exposición constante de las bacterias en el centro de producción.<sup>38</sup>

La capacidad de sobrevivir intracelularmente es lo que caracteriza que la infección sea crónica y recurrente.<sup>6</sup> En rumiantes la persistencia de la infección se relaciona con la capacidad de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* de residir en la glándula mamaria y en los linfonodos, esto produce una intermitente eliminación de las bacterias en leche.<sup>39,40</sup>

Aunque ninguna de las lesiones es patognomónica, las principales lesiones observadas en hembras gestantes infectadas son: placentitis necrótica y mastitis intersticial, mientras que en fetos abortados o mortinatos las lesiones

características consisten en pleuroneumonía fibrinosa y neumonía intestinal. La placenta puede presentar necrosis intercotiledonaria y vasculitis. En machos la lesión característica es la orquitis como resultado de epididimitis y de vasculitis seminal. Esta lesión es característica en carneros infectados por *B. ovis*.<sup>34</sup> Puede observarse también fibrosis del parénquima testicular. Algunas otras lesiones incluyen linfadenitis granulomatosa, pericarditis, esplenitis, peritonitis y exudado fibrinoso con áreas de consolidación (sugerentes a necrosis) en bazo e hígado.<sup>30</sup>

### 1.2.2 Brucelosis en el ser humano.

Como se mencionó al inicio, la brucelosis en el ser humano está íntimamente ligada a la presencia de la enfermedad en los animales, ya que los productos de origen animal, así como el contacto con animales infectados son las principales fuentes de infección. Se trata de la zoonosis más importante a nivel mundial.<sup>7,6</sup> Es provocada principalmente por *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* y en menor medida *B. canis*.<sup>31</sup> También se ha reportado que la infección puede ser provocada por especies de *Brucella* de origen marino.<sup>41,42,43</sup>

La brucelosis humana se define como una enfermedad febril aguda o subaguda acompañada de anorexia, postración y malestar generalizado. La infección sistémica es detectable después de un periodo de incubación de 2 a 3 semanas, en donde la sintomatología preponderante es la presencia de fiebre, en algunos casos la infección es asintomática. Es en este periodo donde se puede encontrar bacteremia. Por otro lado, la enfermedad puede presentarse después de varias semanas o meses. La fiebre se presenta después del mediodía, presentando un patrón muy característico, en donde aumenta y disminuye intermitentemente por periodos de varios días (por ello a la enfermedad también se le denomina como “fiebre ondulante”).<sup>31</sup>

Al igual que la infección en animales, cualquier mucosa puede servir como vía de entrada. Sin embargo, la vía oral es la más recurrente, debido al consumo de productos lácteos no pasteurizados.<sup>31</sup> Se ha demostrado la infección horizontal entre humanos,<sup>44</sup> y la infección por vía transplacentaria hacia el feto. A diferencia

del principal signo de la enfermedad en animales, la evidencia de aborto en mujeres infectadas no ha sido del todo concluyente.<sup>5,45</sup> Algunas de las características particulares de la infección en seres humanos es la afectación al sistema reticuloendotelial, principalmente linfonodos, bazo e hígado. Si la enfermedad se vuelve crónica la infección hacia otros tejidos es probable, produciendo particularmente complicaciones osteoarticulares, endocarditis, meningitis, entre otras lesiones. En el caso de hombres infectados se ha identificado orquitis y epididimitis, generalmente de manera unilateral.<sup>6,31</sup>

La cronicidad de la infección se puede determinar cuando existe la presentación intermitente de los síntomas antes descritos en por lo menos 12 meses. Generalmente estos pacientes tienen elevados títulos de IgG. Esto es debido principalmente a un inadecuado tratamiento, además del estado inmunológico del paciente. En la brucelosis crónica puede observarse artritis y osteomielitis.<sup>31,46</sup>

Debido a que se trata de un patógeno bacteriano intracelular la antibioterapia es prolongada y es basada generalmente en dos antibióticos, los cuales son sinérgicos. Generalmente se usa doxiciclina, rifampicina, estreptomycinina o trimetoprim-sulfametoxazol. Actualmente no existe ninguna vacuna completamente eficaz para uso humano.<sup>6</sup>

### 1.2.3 Mecanismo de invasión y replicación intracelular.

Las diferentes especies de *Brucella* no poseen factores clásicos de virulencia (tales como fimbrias, adhesinas, toxinas y cápsula), sino que la principal estrategia de *Brucella* spp. es pasar desapercibida por el sistema inmune y, una vez que ha infectado intracelularmente, evitar los mecanismos de destrucción intracelular (péptidos catiónicos, defensinas etc.). Esto lo logra a través de respuestas coordinadas que promuevan la adaptación a estos factores adversos. Es esta principal característica lo que hace que este género produzca infecciones crónicas. Las células de estirpe fagocítica (macrófagos y células dendríticas) son las principales células blanco de *Brucella* spp. en donde una vez que se establece la infección intracelular alrededor del 90% de las bacterias son destruidas. Los

macrófagos activados son más eficientes para eliminar a las bacterias. Por otro lado, se ha determinado que *Brucella* spp. es capaz de infectar una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales y leucocitos.<sup>12</sup> También se ha demostrado la capacidad de unión a fibronectina y vitronectina, proteínas de matriz extracelular, lo cual puede ser importante para la diseminación sistémica.<sup>47</sup> Las bacterias que sobreviven intracelularmente se multiplican en el retículo endoplásmico (RE), después de modificar el tránsito endocítico, sin intervenir en las funciones celulares normales o produciendo el menor daño posible a las células. Un ejemplo de esto es que la infección con las especies lisas de *Brucella* spp. pueden inhibir la apoptosis en las células infectadas.<sup>48,49</sup>

Tanto el LPS como algunas OMPs parecen ser los principales interlocutores en el reconocimiento de receptores celulares para la invasión, aunado a la participación del sistema de dos componentes BvrR/BvrS, cuya expresión regula la transcripción tanto de genes de regulación metabólica como proteínas de membrana. La regulación genética por parte de este sistema de dos componentes prepara a las células bacterianas para la invasión y sobrevivencia intracelular.<sup>50,51</sup> El mecanismo de invasión en células no fagocíticas no es conocido por completo; sin embargo, se reconoce la participación del gen BMEI0216<sup>52</sup> y la isla genómica Bab1\_2009-2012 de *B. abortus*, que también participa en la internalización y adhesión de macrófagos.<sup>53</sup> En el caso de células fagocíticas profesionales, y probablemente otros leucocitos, se ha reconocido la internalización dependiente de balsas lipídicas. Dentro de estas estructuras se ha contemplado como receptores celulares a la proteína prion PrPc y al receptor proteico SR-A. Estas se unen con los ligandos bacterianos Hsp60 y particularmente con la cadena O del LPS, aunque se cree que existen otros ligandos bacterianos (probablemente OMPs), especialmente en las especies naturales rugosas. Si *Brucella* spp. es opsonizada una menor proporción de bacterias sobrevivirá a comparación con las bacterias no opsonizadas en macrófagos; en el caso de células dendríticas de origen murino las bacterias opsonizadas no se replican.<sup>12,23</sup> Aunque la participación de la proteína prion PrPc ha sido controversial, ya que no se ha demostrado completamente la participación de este receptor en algunos tipos

celulares,<sup>54</sup> se ha reconocido la participación de receptores eucarióticos ricos en ácido siálico en la internalización de las bacterias. El ligando bacteriano que reconoce a estos receptores es la proteína SP41, que se halla en la membrana externa de *Brucella* spp.<sup>47</sup>

La invasión intracelular se produce por un rearrreglo del citoesqueleto, en donde la activación de las proteínas GTPasas Cdc42, Rac y Rho es determinante.<sup>55</sup> Una vez dentro, las bacterias quedan contenidas en vacuolas endocíticas, conocidas como BCV (*Brucella* Containing Vacuole, por sus siglas en inglés). Al inicio de la infección las BCV se unen de manera inmediata con endosomas tempranos, adquiriendo en su exterior las proteínas Rab5 y EEA1.<sup>56</sup> Esta unión es transitoria y posteriormente las BCV presentan marcadores de endosomas tardíos y lisosomas, tales como Rab7, el receptor de manosa-6-fosfato (CD63) y LAMP1. Después las BCV adquieren características típicas de un autofagosoma (presencia de proteínas del RE como calreticulina y el translocador Sec61 $\beta$ ), cuya morfología resulta ser multilamelar.<sup>55,57,58,59</sup>

Un autofagosoma normal se uniría con los lisosomas, y de esta manera la célula puede reciclar el material celular, además presentaría en su interior enzimas como la catepsina D, que es característica de lisosomas.<sup>60</sup> Esta enzima no se encuentra en las BCV de cepas virulentas (etapa de maduración), de esta manera *Brucella* spp. se vuelve a desligar de la cascada de la autofagocitosis y por medio de una transportación retrógrada la bacteria alcanza su nicho de replicación final, que es el RE en el área perinuclear, en donde se provee de los nutrientes necesarios para su replicación.<sup>61</sup> Las bacterias opsonizadas aún pueden multiplicarse, esto se ha observado en monocitos THP1 de origen humano, en donde las bacterias se replican en BCV negativas a marcadores de RE y positivas a la proteína LAMP1.<sup>62</sup> Por otro lado, se ha demostrado que las especies patógenas pueden fusionarse de manera controlada con lisosomas, sin que por ello represente una destrucción significativa.<sup>57</sup> En la modificación del tránsito intracelular de la BCV interviene el  $\beta$ 1-2 glucano cíclico, lo cual contribuye a la evasión de la destrucción intracelular bacteriana.<sup>63</sup> En la figura D puede observarse la representación gráfica del tránsito intracelular de *Brucella* spp.

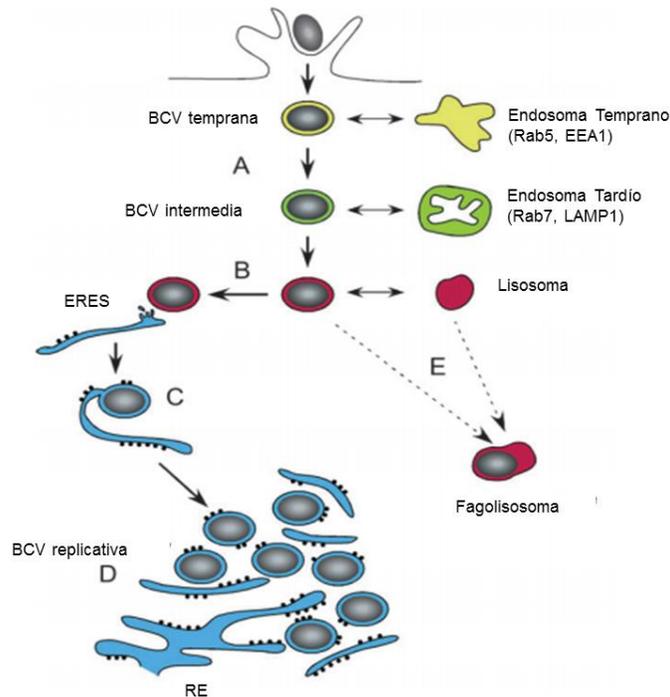


Figura D. Representación esquemática de la invasión intracelular de *Brucella* spp. Después de la internalización la BCV interactúa con endosomas tempranos, esta unión es transitoria (de 10 a 15 min) y posteriormente la BCV adquiere marcadores de endosomas tardíos y lisosomas (A). Estas interacciones son requeridas para que la BCV siga una transportación retrógrada a los sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES, B) y se fusione con el RE (C). Posteriormente se generarán vacuolas replicativas (alrededor de 8 horas después de la internalización, D). Las bacterias avirulentas no pueden controlar el tránsito vesicular de la BCV y son degradadas en el fagolisosoma (E). El operón *virB* es indispensable para la generación de vacuolas replicativas. Tomado de Starr et al. (2008).<sup>57</sup>

La acidificación producida en la BCV produce un cambio en la transcripción genética, lo cual favorece la transcripción de los genes del operón *virB* (sistema de secreción tipo IV, SSTIV), que se reconoce como el principal factor responsable de que la BCV se una con el RE, y por tanto contribuye a la replicación bacteriana.<sup>64</sup> Las BCV se unen al RE a través de la interacción con la vía de secreción temprana del RE, una vía de comunicación endocítica especializada entre el RE y otros organelos. Existen subdominios del RE, denominados sitios de salida del RE (ERES por sus siglas en inglés) en donde se presenta esta vía de secreción. Esta vía es controlada por la GTPasa Sar1 que controla la fusión y fisión de los endosomas a través del complejo proteico COPI y COPII. Las BCV interactúan con el complejo Sar1/COPII para poder integrarse al RE, y de esta manera permitir la replicación intracelular.<sup>49</sup> Recientemente se demostró que la proteína CstA de

*Brucella* spp. puede interactuar con Sec24A, componente del complejo COPII de la vía temprana de secreción del RE. Sin embargo, aún no se ha demostrado su translocación intracelular *in vitro*.<sup>65</sup> Otra proteína que interactúa con el RE y que contribuye al establecimiento del nicho de replicación intracelular es RicA. Esta proteína interactúa con la GTPasa Rab2, componente imprescindible en el tráfico vesicular del aparato de Golgi al RE. La interacción de RicA con Rab2 produce la transportación retrógrada de las BCV con características de autofagosomas al RE.<sup>66</sup> Tanto CstA y RicA son efectores del SSTIV.<sup>65,66</sup>

Finalmente la replicación intracelular de las bacterias se presenta sin la intervención en las funciones normales celulares.<sup>12</sup>

#### 1.2.4 Mecanismos de inmunidad.

La infección producida por *Brucella* spp. desencadena inmunidad innata y adaptativa, que favorece principalmente la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a linfocitos Th1, y por tanto una respuesta celular y en menor medida, aunque no menos importante, una respuesta humoral estimulando a los linfocitos B.<sup>67</sup> Durante las primeras horas de infección el aumento de citocinas en sangre es poco evidente; sin embargo, se tiene evidencia de que *Brucella* spp. puede encontrarse en sangre dentro de células fagocíticas, principalmente neutrófilos.<sup>68</sup> Por otro lado, la mayor capacidad fagocítica de los macrófagos en ratones se alcanza hasta los 18 días post-infección (pi), precisamente en la parte final de la fase aguda, manteniéndose durante 4 semanas. Es probable que este comportamiento se presente también en animales domésticos.<sup>68</sup> La fase aguda de la enfermedad, primeras 3 semanas de infección, se caracteriza por una inflamación significativa del bazo y linfonodos, niveles elevados de IFN- $\gamma$ , así como IL-12, IL-6 y RANTES (CCL5) se pueden detectar en el suero de animales enfermos. La citocina clave en el proceso de defensa contra la infección es el IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos T activados, principalmente CD4+ y en menor medida los linfocitos T CD 8+. <sup>50,69</sup> En ratones deficientes de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup>) o en el factor regulador del IFN- $\gamma$  (IRF-1 <sup>-/-</sup>)

la infección produce una alta mortalidad, indicando la importancia de esta citocina.<sup>68,70,71,72</sup>

La principal responsabilidad de la inmunidad innata contra *Brucella* spp. es la degradación de los antígenos y la presentación de éstos a través, principalmente, de la molécula clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC II). Sin embargo, Barrionuevo *et al.* (2008) han demostrado que la infección de monocitos con *B. abortus* inhibe la expresión de MHC II y el consecuente procesamiento antigénico.<sup>73</sup> En macrófagos humanos, además, se ha demostrado que *B. abortus* puede inhibir la presentación de antígenos a través de MHC I, inhibiendo la activación de linfocitos CD8+ productores de IFN- $\gamma$ .<sup>74</sup> Los linfocitos CD8+ desempeñan un papel importante en la defensa contra la brucelosis, al limitar la presencia de células infectadas.<sup>50</sup> El principal reconocimiento inmune entre las células fagocíticas y las bacterias se presenta por los receptores tipo toll (TLR), en donde la unión del LPS bacteriano en cepas lisas con TLR-4 promueve la fagocitosis bacteriana y el control de la infección. También se ha demostrado la participación del TLR-2 en el reconocimiento de lipoproteínas de membrana. Una vez que la bacteria ha sido fagocitada existen varios mecanismos de reconocimiento intracelular, entre ellos destacan la proteína TLR-9 que reconoce el DNA de *Brucella* spp y los receptores tipo NOD (NLR), tales como NOD1 y NOD2 que reconocen antígenos específicos de la pared celular.<sup>75</sup> La activación de estos receptores produce una cascada de señalizaciones que concluye en la activación de factores de transcripción, tales como NF $\kappa$ B y AP-1, entre otros. Esto promueve la secreción de citocinas pro-inflamatorias y la diferenciación de los linfocitos T a la respuesta inmune celular (Th1, inmunidad adaptativa).<sup>76,77</sup> Sin embargo, se ha reportado la existencia de la proteína Btp1/TcpB tanto en *B. abortus* como en *B. melitensis* (proteína con dominio TIR) que inhibe la señalización de los receptores TLR2 y TLR4, lo cual inhibe la maduración de células dendríticas, la expresión de MHC II y el receptor tipo I de la porción Fc de IgG (Fc $\gamma$ RI).<sup>78,79,80,81</sup> Una vez que se ha dado la presentación de antígenos, los linfocitos T activarán a las células presentadoras de antígenos (CPA) a través del ligando CD40. Además, los linfocitos T activados secretarán IFN- $\gamma$  que promoverá

el reclutamiento de células fagocíticas, por lo que existirá una mayor y eficiente fagocitosis. Las CPA activadas son capaces de secretar citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, así como IL-6. La estimulación a los linfocitos B promueve la secreción de IgG2, principalmente. Los anticuerpos anti-*Brucella* son detectados después de dos semanas de infección, siendo relevante la presencia de IgG3 e IgG2a. Por otro lado, el primer anticuerpo generado en la brucelosis es IgM. La presencia de IgG1 apenas es perceptible y aumenta en la fase final de la fase aguda de la infección. En ratones se ha demostrado que la producción de IgG3, IgG2a e IgG2b específicos contra el LPS de *Brucella* es dependiente de la producción endógena de IFN- $\gamma$  y de la señalización a través de TLR-4.<sup>50,82,83,84</sup>

Por otra parte, niveles basales de IL-4 no se han relacionado directamente a la estimulación específica de anticuerpos en el modelo murino. La respuesta del tipo Th2 es marginal, así lo ha demostrado la baja expresión de IL-4.<sup>85</sup>

La inmunidad contra las cepas atenuadas de *Brucella* de diferentes especies es mucho más efectiva que en contra de las cepas virulentas. Al parecer las cepas rugosas atenuadas de *Brucella* promueven la apoptosis de macrófagos y células dendríticas mediada por caspasa-2, mientras que las cepas lisas la inhiben.<sup>86</sup> Esta apoptosis produce la activación de NF- $\kappa$ B, lo que promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ .<sup>87,88</sup> Es por ello que el intrincado balance entre las diferentes activades realizadas tanto por el hospedador, como por la bacteria determinan el resultado final. Puede ser que la muerte de células dendríticas genere una respuesta inmune mayor en bacterias atenuadas que en virulentas.

Se ha observado en pacientes humanos que del 10% al 30% de los pacientes desarrollan una brucelosis crónica. En animales domésticos la cronicidad está relacionada con la inaparente presencia de signos clínicos y la falta de un diagnóstico oportuno. La total eliminación de la infección en estos pacientes se ve comprometida gracias a que ciertas especies virulentas de *Brucella* pueden inhibir a la inmunidad adaptativa del tipo Th1, favoreciendo la inmunidad del tipo Th2 al promover la secreción de IL-10 e IL-4. Se ha observado que la IL-10 alcanza el mayor nivel sérico durante la primera semana pi, desapareciendo en suero alrededor de las 2 semanas pi. En la brucelosis humana la presencia de

anticuerpos de IgM en suero después de 18 semanas de infección se relaciona con una recaída o con cronicidad. Además, posterior a la fase aguda, se ha relacionado la falta de respuesta a la estimulación de IL-12 por parte de IFN- $\gamma$ . Es probable que la incapacidad de destrucción intracelular de las bacterias sea la causa de esta falta de respuesta.<sup>89,90</sup> Es en esta fase donde la infección de otros tejidos y órganos, tales como pulmones, corazón, articulaciones y cerebro, se vuelve importante en humanos, complicando la resolución sin secuelas. A la necropsia, se ha observado en animales domésticos con brucelosis crónica la presencia de un mayor número de granulomas, tanto en hígado como en bazo.<sup>68</sup> Se ha observado además que en pacientes crónicos los linfocitos T se vuelven anérgicos al estímulo constante de los antígenos de *Brucella* spp, mientras que la infección de los linfocitos B promueve la cronicidad al mantener un nicho estable en donde las bacterias no se multiplican.<sup>83,91,92</sup> La expansión clonal de estos linfocitos B promueve la síntesis TGF- $\beta$ , de naturaleza antiinflamatoria, lo que también contribuye al mantenimiento de la infección.<sup>93</sup>

La capacidad de tener células de memoria después de una primoinfección es el paso fundamental para una inmunidad prolongada. Generalmente éstas se desarrollan después de la fase aguda, y son las responsables de generar una respuesta del tipo Th1 constante en la fase crónica de la enfermedad.<sup>50</sup> La presencia de linfocitos T CD4+ de memoria es la base para la efectividad de la vacunación.

#### 1.2.5 Vacunación.

El objetivo de una buena vacunación contra *Brucella* spp. consiste en desencadenar una eficiente inmunidad celular principalmente y una buena inmunidad humoral, sin el desarrollo de la enfermedad. Las principales metas de los diferentes programas de vacunación es el control, prevención y la erradicación de esta enfermedad, especialmente en países en vías de desarrollo.<sup>94,95</sup> Se ha comprobado que es importante que el inmunógeno sea una cepa viva atenuada, de esta forma se recrean las condiciones pertinentes de la inmunidad celular,

produciendo una infección controlada que genera una respuesta inmune eficaz y duradera.<sup>96</sup>

Para el control de la brucelosis causada por *B. melitensis* y *B. ovis*, en ovinos y caprinos se utiliza la cepa *B. melitensis* Rev 1. En México se utiliza la dosis clásica para ovejas y cabras de 3 a 4 meses de edad que contiene de 1 a  $2 \times 10^9$  UFC, mientras que para hembras mayores de 4 meses se utiliza la dosis reducida de  $1 \times 10^5$  UFC. Ambas dosis se aplican por vía conjuntival, aunque también se ha aplicado por vía subcutánea. No se utiliza la vacuna en machos por disposición oficial.<sup>1</sup> Se trata de una cepa lisa, resistente a la estreptomina que presenta, entre otras mutaciones no completamente dilucidadas, una mutación genética ribosomal.<sup>97</sup> Esta vacuna protege eficientemente en campo (entre 95% y 100%) y es estable genéticamente.<sup>95,98,99</sup> La cepa vacunal Rev 1 presenta algunos inconvenientes, principalmente por la virulencia residual y el riesgo ocupacional para el hombre, ya que permanece plenamente virulenta para éste. Si se vacunan cabritas gestantes (no expuestas a *B. melitensis*) éstas abortarán en el último tercio de la gestación. Por otro lado, se ha comprobado que interfiere con las principales pruebas diagnósticas, debido a que es una cepa lisa.<sup>95,100</sup> Sin embargo, se ha demostrado que la interferencia en el diagnóstico y el aborto pueden eliminarse si la vacunación se aplica por vía conjuntival en animales de hasta 4 meses de edad.<sup>6</sup> Se ha argumentado el uso de otras vacunas para la protección de *B. melitensis*, tal como la cepa RB51; sin embargo, la eficiencia de esta cepa ha sido cuestionada.<sup>101</sup>

Para el control de la brucelosis causada por *B. abortus* en México se utilizan dos tipos de vacunación con la cepa *B. abortus* S19: la dosis clásica y la reducida. La dosis clásica se ocupa en becerras de 3 a 6 meses de edad y es de  $5 \times 10^{10}$  UFC. La dosis reducida se utiliza en hembras mayores de 6 meses de edad y es de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  UFC. Al igual que el uso de la cepa *B. melitensis* Rev 1 en México, no se vacunan a los machos por disposición oficial.<sup>1</sup> La vía aplicación de esta vacuna es de gran importancia, ya que la aplicación subcutánea puede interferir con el diagnóstico serológico y producir aborto en animales gestantes. Además, por esta vía se llegan a presentar infecciones subclínicas que pueden dar lugar a

la eliminación de la cepa S19 en leche. La aplicación conjuntival con la dosis reducida en animales adultos disminuye los efectos indeseables antes mencionados.<sup>6</sup> El uso de esta vacuna ha probado una eficiente protección en campo y, al igual que la cepa Rev 1, es virulenta para el hombre.<sup>102</sup> También se ha demostrado que la vacunación con la cepa S19 protege al ganado bovino contra la infección de *B. melitensis*.<sup>103</sup>

El uso de la cepa *B. abortus* RB51 como cepa vacunal se ha descontinuado en la mayor parte del mundo, debido principalmente a una mayor eficacia de protección conferida con el uso de la cepa S19. La cepa *B. abortus* RB51 de naturaleza rugosa, resistente a rifampicina y penicilina. Tiene una mutación en el gen *wboA* y probablemente otros defectos genéticos aún desconocidos. Aunque menos virulenta, esta cepa puede producir abortos en animales gestantes. Por otro parte, al ser una cepa rugosa, no interviene en la mayoría de las pruebas de diagnóstico serológico, aunque si puede interferir en pruebas como la de ELISA y la de fluorescencia polarizada. Se han reportado pocos casos de brucelosis humana relacionados con esta cepa.<sup>104,105</sup>

#### 1.2.6. Diagnóstico.

##### 1.2.6.1 Diagnóstico de la brucelosis animal.

El diagnóstico de la brucelosis animal es sumamente importante, ya que desde el aspecto epizootiológico permite la vigilancia de los programas de control y erradicación. Por otro lado, permite el control de productos de origen animal libres de *Brucella* spp.<sup>106</sup> Puede ser difícil lograr el diagnóstico definitivo a través del aislamiento bacteriológico, ya que la concentración bacteriana suele ser baja debido a la característica de ser una infección intracelular. Esto es muy importante ya que durante el curso de la infección no siempre hay una excreción continua y homogénea de bacterias, es por ello que se utilizan medios enriquecidos y diferenciales,<sup>19,106</sup> a excepción de *B. canis* ya que se puede aislar de manera continua a partir de sangre.<sup>107</sup> Las muestras de elección que se utilizan

antemortem son: leche, semen (principalmente para *B. ovis*) y fluidos vaginales. Se puede utilizar el feto abortado completo para el aislamiento, del cual se toman muestras del contenido abomasal, hígado, pulmón y bazo. Las muestras de elección a la necropsia de animales adultos son: bazo, hígado, linfonodos, médula ósea (para el diagnóstico de *B. canis*), útero y glándula mamaria. En el caso de *B. ovis* las glándulas accesorias del pene, así como el epidídimo son tejidos de elección para el aislamiento, el cual puede obtenerse hasta después de 6 semanas de infección.<sup>108</sup> Para el aislamiento es necesario trabajar en un nivel de bioseguridad que no permita la exposición del patógeno hacia el personal (nivel III).<sup>19</sup> Los medios de cultivo recomendados para el aislamiento son: agar Farell para un primoaislamiento a partir de muestras contaminadas; agar brucella, agar tripticosa soya (TSA), agar sangre para aislamiento de *B. canis*, medio Thayer-Martin para aislamiento de *B. ovis* y el medio bifásico de Ruiz-Castañeda (aunque éste es utilizado principalmente para el aislamiento de *Brucella* spp. a partir de muestras humanas). Es necesario sembrar las muestras por duplicado para corroborar la necesidad de CO<sub>2</sub>. Una vez que se tienen resultados positivos de crecimiento se utiliza la identificación colonial y microscópica (tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen modificada de Stamp). Las pruebas bioquímicas de elección son: oxidasa, reducción de los nitratos a nitritos, catalasa y ureasa. Para la identificación de especie se recurre a la lisis por bacteriófagos, aunque también la sensibilidad a los colorantes (fucsina básica y tionina), así como la aglutinación con sueros monoespecíficos (A y M), ayudan a la identificación de especie y biotipo. Esto es muy importante en laboratorios de referencia epidemiológica.<sup>19</sup> En México, según la norma oficial mexicana, el aislamiento del agente constituye el diagnóstico definitivo; sin embargo, la importancia del uso de pruebas serológicas permiten llevar a cabo los programas de control y erradicación de esta enfermedad en el país. Las pruebas serológicas aceptadas por la norma oficial mexicana son la prueba de tarjeta (o Rosa de Bengala), prueba de rivanol, prueba de fijación del complemento y prueba de anillo en leche.<sup>1</sup>

### 1.2.6.2 Diagnóstico de la brucelosis humana.

Para el diagnóstico de la brucelosis humana es muy importante la historia clínica, ya que la sintomatología no es específica. Datos como consumo de productos lácteos no pasteurizados, así como trabajar o convivir con animales en donde la prevalencia es alta, son aspectos importantes en la orientación del diagnóstico. La prueba serológica de tarjeta (o Rosa de Bengala), puede utilizarse como prueba tamiz. Un resultado positivo deberá confirmarse con otras pruebas serológicas más específicas como la prueba de aglutinación en tubo o en placa, o la prueba de ELISA. Para estas pruebas es muy importante fijar el título de anticuerpos que refleje la presencia de la enfermedad, la seropositividad es el indicio de una infección que, dependiendo de la prevalencia de la brucelosis en la zona, puede estar correlacionada con enfermedad.<sup>109</sup>

El aislamiento bacteriológico constituye el diagnóstico definitivo y confirmatorio, sin embargo poder obtener bacterias viables a partir de sangre principalmente, y otras muestras como líquido cefalorraquídeo, resulta poco probable. El medio de aislamiento bacteriológico *in vitro* más utilizado es el medio bifásico de Ruiz-Castañeda. Este medio está conformado por una fase sólida y una líquida. También se han utilizado medios peptonados enriquecidos. La incubación se realiza con 5% de CO<sub>2</sub>, con un tiempo de incubación entre 7 y 21 días. El porcentaje de positividad disminuye después de este periodo. Es recomendable el subcultivo después de una semana de incubación sin resultados positivos. El subcultivo se realiza a partir de la fase líquida. Una vez que se tienen colonias sospechosas, la identificación final se realiza tomando en cuenta los mismos parámetros para el diagnóstico bacteriológico de la brucelosis animal.<sup>109</sup>

En cuanto a pruebas moleculares se ha utilizado la amplificación de la secuencia intergénica del RNA ribosomal 16s y 23s, la secuencia de inserción IS711 y el gen *omp2a*.<sup>6,110</sup>

### 1.3 Estrés bacteriano asociado a la invasión.

Para algunas bacterias intracelulares la respuesta a los diferentes mecanismos de defensa del hospedador consiste mayormente en la adaptación a los efectos estresantes. Las bacterias intracelulares (como *Brucella* spp.) evolutivamente han modificado su metabolismo para adaptarse a un ambiente estresante, como lo es el intracelular. La adaptación a este estilo de vida ha traído como consecuencia que sea difícil el discernimiento entre verdaderos factores de virulencia y factores esenciales para la sobrevivencia. A diferencia de otras bacterias patógenas, la adaptación al nicho intracelular ha ocasionado que estas bacterias regulen la transcripción de varios genes dependiendo de las señales ambientales, estableciendo mecanismos de control exactos para evitar la destrucción intracelular.<sup>111,112</sup>

Una de las respuestas ante el estrés que mayormente se conocen es la respuesta al estrés calórico o choque térmico. Esta respuesta, que es activada a temperaturas mayores a 37° C, es coordinada genéticamente y promueve la acumulación de ciertas proteínas denominadas como proteínas de estrés calórico (HSPs, por sus siglas en inglés). La función general de estas proteínas es el mantenimiento de las funciones celulares bajo estas condiciones, aunque también se han identificado en algunos otros tipos de estrés. Algunas son proteínas chaperonas ya que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas, o también a la eliminación de proteínas reactivas que al acumularse se vuelven tóxicas. Además, están directamente relacionadas con mecanismos de señalización intracelular, especialmente con la apoptosis.<sup>113</sup>

Otro de los mecanismos generales de defensa ante el estrés, sobre todo nutricional, es la disminución del metabolismo a niveles basales, conocido como fase estacionaria del crecimiento bacteriano. La transición hacia la fase estacionaria es un mecanismo para reprimir la transcripción de genes centrales del metabolismo, como la glicólisis, en condiciones de limitación de nutrientes. Los componentes de regulación que participan en esta transición son el gen *hfq*,<sup>114</sup> los

reguladores transcripcionales sigma <sup>115</sup> así como el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS).<sup>116</sup>

### 1.3.1 Respuesta astringente.

La respuesta astringente es el principal mecanismo que regula la transición hacia la fase estacionaria de crecimiento bacteriano. Esta regulación es llevada a cabo en condiciones de limitación de nutrientes, y la principal molécula que interviene en el proceso es la alarmona ppGpp (guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato) y (p)ppGpp (guanosina 5'-trifosfato-3'-difosfato). Estas moléculas son sintetizadas a partir de GDP o GTP respectivamente por transferencia pirofosforil de una molécula de ATP. La expresión y actividad de muchos factores de virulencia de bacterias patógenas es mediado por ppGpp, relacionando por tanto la patogenicidad bacteriana con el metabolismo. El metabolismo de esta alarmona es llevado a cabo por dos clases de enzimas: monofuncionales (RelA) encargadas de la síntesis y bifuncionales (SpoT) encargadas de la síntesis e hidrólisis. Existe un tercer tipo, denominado Rsh (homólogo de RelA/SpoT), presente en *Brucella spp.*, aunque se han descrito proteínas variantes con la misma funcionalidad en otras especies como *Vibrio cholerae* y *Bacillus*. La principal señal para la síntesis de ppGpp es la acumulación de RNA de transferencia (RNAt) a consecuencia de la limitación de aminoácidos. Sin embargo, las bacterias que además de RelA sintetizan la enzima bifuncional SpoT (como *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersina pestis* y la mayoría de las gammaproteobacterias) pueden responder a una gran variedad de señales de limitación, tal como escasez de fósforo, carbono y hierro. Adicionalmente, las enzimas RelA, SpoT o Rsh pueden ser reguladas tanto transcripcionalmente como post-transcripcionalmente durante el estrés producido por alta osmolaridad, pH extremo y por acción de antibióticos.<sup>117</sup>

### 1.3.2 Mecanismos de respuesta ante el estrés intracelular en *Brucella* spp.

Las BCV son vacuolas de naturaleza oxidativa, ácida y proteolítica, lo que hace a *Brucella* ser especialmente sensible a estos agentes estresantes. Aunque la mayoría de las bacterias mueren (cerca del 90%), las restantes logran sobrevivir y multiplicarse.<sup>12</sup> La regulación del metabolismo central en estas condiciones se ha puesto de manifiesto en *B. suis* y *B. abortus*.<sup>118,119</sup> Estos trabajos han mostrado que la estabilidad y composición de la membrana externa es determinante en la sobrevivencia intracelular, es la primera línea de contacto entre el hospedador y la bacteria. Factores como la expresión de proteínas de membrana externa, la presencia de fosfatidilcolina (siendo el fosfolípido más abundante) y fosfatidiletanolamina son determinantes en la transmisión de señales ambientales externas para la transición fisiológica bacteriana que permita la sobrevivencia y adaptación.<sup>120,121</sup> Siendo la membrana externa el lugar en donde se encuentran los mayores determinantes antigénicos, transportadores de nutrientes y factores de virulencia; esta estructura dinámica es regulada principalmente por el sistema de dos componentes BvrS/R<sup>51</sup>, los reguladores transcripcionales VjbR y BabR,<sup>122</sup> y MucR<sup>123</sup>.

El sistema de dos componentes BvrR/BvrS fue uno de los primeros sistemas directamente relacionados con la regulación de factores de virulencia. Después de recibir el o los estímulos (aún no identificados) la histidina cinasa de membrana (BvrS) se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a un residuo de aspartato en la proteína reguladora (BvrR). Las mutaciones de BvrR, BvrS o ambas produce múltiples efectos en la virulencia, metabolismo y morfología de la bacteria. Fenotípicamente las mutantes son rugosas, y tanto la estabilidad como la composición de la membrana externa están alteradas en estas mutantes, lo cual las hace más susceptibles a péptidos catiónicos y detergentes. Intracelularmente las mutantes son incapaces de reclutar las GTPasas de la subfamilia Rho y Cdc42 para lograr la polimerización de actina, por lo que rápidamente son degradadas en fagolisosomas. La participación de estas proteínas es determinante en la adaptación de la vida extracelular a la intracelular. En un extenso trabajo de

proteómica, Lamontagne et al. (2007) demostraron que este sistema regula la expresión de más de 100 genes diferentes. En cuanto a la composición membranal este sistema aumenta la expresión de OMPs como Omp25 y Omp22, que son altamente inmunogénicas y están relacionadas con la virulencia. Además altera la composición del lípido A del LPS y regula la expresión de lipoproteínas. También se demostró que reprime la expresión de proteínas periplásmicas relacionadas con la obtención de nutrientes como aminoácidos, oligopéptidos, carbohidratos y micronutrientes (como Fe y Mn).<sup>51,124,125</sup>

El regulador MucR es necesario para resistir condiciones de estrés osmótico y oxidativo, se ha relacionado específicamente con la expresión de polisacáridos de membrana ( $\beta$  glucano cíclico), así como la represión de genes flagelares (*ftcR*) y es fundamental en la modificación del lípido A del LPS. Aunque se ha descrito como una bacteria inmóvil, *B. melitensis* presenta 13 genes necesarios para la producción de un flagelo funcional. La expresión de esta estructura esta relacionada con la persistencia en el modelo murino.<sup>126</sup> La alteración de la producción de estructuras de membrana hace a la mutante de *mucR* de *B. melitensis* susceptible a polimixina B y detergentes como el tritón. En *B. abortus* (pero no en *B. melitensis*) la cepa mutante de *mucR* es rugosa, indicando la alteración en el LPS. Este regulador esta bajo control de la proteína de “quorum sensing” VjbR.<sup>123,127</sup>

Los reguladores transcripcionales VjbR y BabR (BlxR) pertenecen a la familia de reguladores Lux-R y están relacionados con la regulación genética asociada a la producción de C<sub>12</sub>-HSL (N-dodecanoil-homoserina lactona). Esta molécula es difusible y al alcanzar cierta concentración se une a estos reguladores transcripcionales. C<sub>12</sub>-HSL reprime la transcripción de VjbR, mientras que promueve la transcripción de BabR. Este sistema, descrito como “quorum-sensing” se ha reportado en poblaciones bacterianas que forman biopelícula. En *B. melitensis* ambos reguladores transcripcionales son fundamentales en la transición metabólica para lograr la adaptación al estrés intracelular. Mientras que VjbR promueve la transcripción de OMPs, el operón *virB*, el operon *cgs*, genes flagelares (*fliF*, *flgE*), genes de respuesta de estrés (*groEL*, *groES*, *sodC*),

biogénesis del LPS y de muerína, por otro lado reprime la transcripción del metabolismo de carbohidratos, y de replicación y transcripción del DNA. Además, se ha demostrado que la mutación de *vjbR* en *B. melitensis* produce una mayor sensibilidad a polimixina B, una expresión alterada de OMPs y fenotipo aglutinante, indicando por tanto alteraciones en la membrana externa. La funcionalidad del regulador BabR es opuesta a VjbR, de hecho inhibe la transcripción de este último. La expresión de *babR* promueve principalmente la activación de genes relacionados con el transporte y metabolismo de carbohidratos, oligopéptidos y aminoácidos. Esto muestra la intrincada regulación que depende de los factores ambientales. Aunque no se ha demostrado cuál es la regulación directa, se ha determinado que BvrR promueve la activación de VjbR, esto muestra que ambos sistemas trabajan de manera coordinada. Como se puede determinar, VjbR es transcrito en condiciones estresantes y BabR es expresado cuando el escenario es idóneo para la multiplicación bacteriana (disponibilidad de nutrientes).<sup>122,128,129</sup>

Por otro lado, las HSPs que participan en la resistencia y adaptación de *Brucella* al estrés por calor son las chaperonas citoplasmáticas DnaK, ClpB, ClpA, GroEL, RRF y las proteínas periplásmicas HtrA y AapJ. Estas proteínas se han identificado como inmunogénicas y se han considerado como factores de virulencia.<sup>130,131,132,133,134</sup> El aumento de la expresión de la proteína DnaK está relacionado además con una disminución del pH, mientras que el aumento de GroEL está relacionado con el estrés calórico, pero no en condiciones de bajo pH o estrés oxidativo.<sup>118</sup> Las chaperonas HtrA y AapJ están implicadas en la degradación de proteínas anormales en el periplasma.<sup>135</sup> El aumento en la transcripción de HtrA también está relacionado con el estrés oxidativo.<sup>136</sup> Por otro lado, la proteína RRF se transcribe únicamente bajo condiciones de estrés calórico, el promotor de esta proteína mantiene una homología muy cercana al promotor  $\sigma^{32}$  de *E. coli*. Esta proteína parece tener una función similar a las metaloenzimas Mn SOD y Fe SOD.<sup>135</sup> En *B. suis* la expresión de las proteínas ClpA y ClpB como chaperonas moleculares no está relacionada con la replicación intracelular, sin embargo estas proteínas aumentan en condiciones de estrés

calórico, osmótico y oxidativo. Al parecer estas proteínas tienen la misma función que la proteína DnaK.<sup>133</sup>

En cuanto a proteínas que regulan la transcripción uniéndose a RNAP, en *B. abortus* se ha descrito la proteína HF-I, similar a la proteína HF-I de *E. coli*. Esta proteína está implicada en la transición a la fase estacionaria en condiciones ácidas y de estrés prevalcientes en el fagosoma. Se observó que la cepa mutante *hfq* (HF-I) de *B. abortus* es incapaz de mantener la infección intracelular tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto puede ser explicado ya que la proteína HF-I de *B. abortus* promueve la transcripción del operón *virB*, a través del componente de la respuesta astringente *rsh*.<sup>137</sup> Las enzimas Rsh (fundamentales en la síntesis de ppGpp para la activación de la respuesta astringente) de *B. melitensis* y *B. abortus* son primordiales para el establecimiento de una infección crónica en el modelo murino. Por otro lado, la cepa mutante de *rsh* de *B. abortus* no sobrevivió en el modelo de infección de macrófagos murinos.<sup>138,139</sup> Al parecer, en *B. abortus* se determinó que la acidificación es la señal necesaria para la transición hacia la respuesta astringente, pero no en *B. melitensis* o *B. suis*.<sup>139</sup> Además, se ha demostrado que la mutación de *rsh* en *B. suis* o *B. melitensis* produce menores niveles detectables de VirB. Estos resultados demuestran el control de ppGpp sobre el operón *virB* en respuesta a la limitación de nutrientes.<sup>138</sup>

Se han identificado diferentes factores sigma en *B. melitensis*, los cuales son codificados por BME110072 ( $\sigma^{ECF}$ ), *rpoD* ( $\sigma^{70}$ ), *rpoH1* ( $\sigma^{H1}$ ), *rpoN* ( $\sigma^{32}$ ), *rpoH2* ( $\sigma^{H2}$ ), *rpoE1* ( $\sigma^{E1}$ ) y *rpoE2* ( $\sigma^{E2}$ ).<sup>140</sup> De estas proteínas la cepa mutante del gen *rpoH2* en *B. melitensis* resultó ser más sensible al peróxido de hidrógeno que la cepa parental, además, fue incapaz de crecer a temperaturas extremas y presentó atenuación tanto en el modelo celular como en el modelo murino. En base al trabajo de Delory et al. (2006), se determinó que mientras  $\sigma^{H2}$  es necesario en la fase aguda de la infección (durante la sobrevivencia intracelular), los factores  $\sigma^{E1}$ ,  $\sigma^{E2}$  y  $\sigma^{H1}$  son requeridos para el mantenimiento.<sup>140</sup> En cuanto a la represión específica de la transcripción, se ha encontrado que *rpoE1* y *rpoH2* reprimen la expresión de genes flagelares, incluyendo el regulador transcripcional *ftcR*.<sup>141</sup> Por

otra parte, *rpoE1* mantiene control sobre *virB8*<sup>140</sup> y *rpoH1* controla la expresión de proteínas de choque térmico.<sup>142</sup>

Otros agentes involucrados en la resistencia y adaptación a diferentes agentes estresantes son: el gen *aqpX*<sup>143</sup> descrito en *B. abortus* y la proteína CenR (BMEI0066) de *B. melitensis*<sup>144</sup> necesarios para enfrentar el estrés osmótico. Otro componente es la proteína periplásmica CydX en *B. abortus* que contribuye a la resistencia al estrés oxidativo,<sup>145</sup> entre otros mecanismos.

Aunque se han explicado en los párrafos anteriores las principales proteínas de la intrincada red de regulación de genes del metabolismo y virulencia en el proceso de adaptación a la vida intracelular en respuesta al estrés, aún se desconoce exactamente cuales son los mecanismos que transfieren las señales ambientales para la regulación. En este sentido, se conoce que el sistema PTS puede tener un papel importante en la comunicación de la disponibilidad de carbohidratos y la fosforilación de BvrS. Este sistema compuesto por los genes *hprk*, *ptsM* y *ptsO* está encargado del registro de la disponibilidad de carbohidratos, a través de traslocación de los mismos y fosforilación. Se ha demostrado que estos genes se transcriben de manera conjunta con *bvrS/bvrR*, por lo que es probable que trabajen de manera conjunta en la respuesta ante la limitación de nutrientes.<sup>125,146</sup>

Como puede observarse, *Brucella* spp. ocupa múltiples mecanismos para adaptarse a los diferentes agentes estresantes, involucrando todos los aspectos centrales del metabolismo bacteriano. La adaptación es fundamental en la virulencia de este género.

#### 1.4 Alarmonas y su control.

Además del nucleósido ppGpp, existen otras alarmonas cuyas funciones son similares a esta molécula. Tanto en eucariotas como procariontes, estos componentes están relacionados con la respuesta ante el estrés y, en algunas bacterias patógenas, indirectamente relacionadas con la invasión.<sup>147,148,149</sup>

A excepción de ppGpp, químicamente las alarmonas son dinucleósidos oligofosfatados (dinucleósidos 5', 5'''- $P^1$ ,  $P^n$ -polifosfatados,  $N_p N'$ , donde N y N' son 5'-O-nucleósidos y  $n$  es el número de residuos de fosfato en la cadena de polifosfatos que une los dos nucleósidos esterificados en 5') que se encuentran en concentraciones submicromolares (1  $\mu$ M a 3  $\mu$ M) en condiciones normales. Ante condiciones estresantes (principalmente estrés oxidativo, aunque también en condiciones de estrés calórico u osmótico), la concentración de estas moléculas aumenta considerablemente (mayor a 3  $\mu$ M), lo que es interpretado intracelularmente como una señal de alerta, promoviendo la adaptación. Aunque pueden ser benéficas en un principio, la acumulación es dañina para las células.<sup>150,151,152</sup> Algunas de las alarmonas conocidas son: ppGpp, Ap3A (diadenosina 5',5'''- $P^1$ , $P^3$ -trifosfato), Ap4A (diadenosina 5',5'''- $P^1$ , $P^4$ -tetrafosfato), Ap3G2, y derivados adenilados. Los nucleósidos adenilados (Ap3A, Ap4A) son sintetizados en bacterias por aminoacil RNAt-sintetasas dependientes de Mg o Zn,<sup>153,154</sup> acil-coenzima A sintetasas<sup>155</sup> y DNA ligasas.<sup>151</sup> Principalmente son producidos como metabolitos secundarios de las reacciones de las enzimas aminoacil RNAt-sintetasas (ARS). La alarmona es producida cuando ciertos nucleótidos remplazan el fósforo (PPi) en una segunda reacción enzimática (en sentido contrario) de la ARS. La enzima produce una adenilación del nucleótido (Fig. E).<sup>149</sup> Se ha demostrado que agentes oxidantes (quinonas, agentes sulfhidrilos no aromáticos, oxidantes de glutatión) alteran la funcionalidad de las ARS, inactivando los sitios activos, lo que inhibe la unión del aminoácido correspondiente con el RNAt. Esto promueve la reacción enzimática inversa y por lo tanto la acumulación de alarmonas. De hecho las ARS son susceptibles a la oxidación.<sup>150</sup> Aunque se desconoce la relación exacta del aumento de las alarmonas adeniladas con la respuesta ante el estrés oxidativo, así como su relevancia biológica, se ha comprobado un aumento en la transcripción de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa, glutatión transferasa y glicosilasas específicas relacionadas a la reparación del daño oxidativo al DNA.<sup>150</sup> Por otro lado, se ha confirmado que estos compuestos compiten con el ATP en reacciones metabólicas, debido a su similitud química, lo que produce inhibición

de las funciones celulares básicas. Además, las alarmonas se unen a receptores de nucleótidos, lo cual también es perjudicial para la célula.<sup>151</sup>

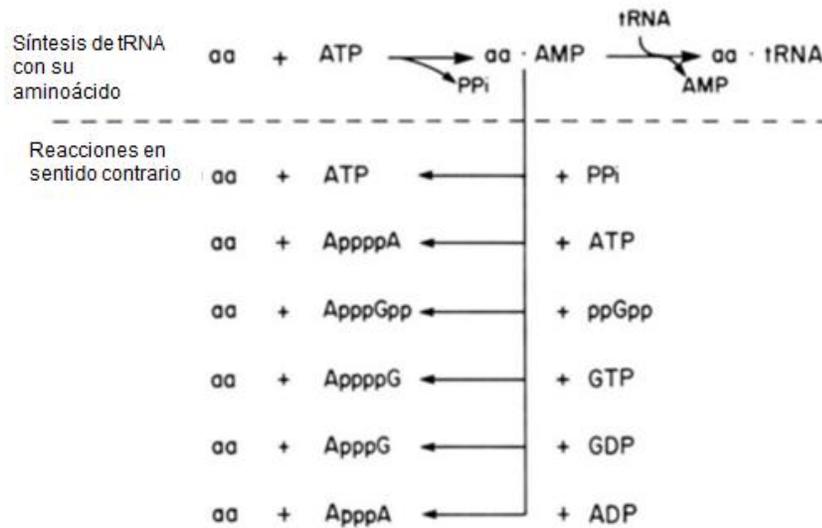


Figura E. Síntesis de aminoacil-RNA y las reacciones en sentido contrario que dan origen a las alarmonas adeniladas. Tomada de Lee et al. (1983).<sup>149</sup>

Para evitar los efectos tóxicos de la acumulación de estas moléculas, el control de estas alarmonas está relacionado con la actividad de hidrolasas (Ap4A hidrolasa, la enzima ApaH de *E. coli* y *Salmonella enterica*),<sup>151,156,157</sup> pirofosfatasa/fosfodiesterasa no específicas<sup>158</sup> y algunas enzimas de la familia NUDIX.<sup>148,159,160</sup>

### 1.5 Enzimas NUDIX.

Las hidrolasas NUDIX son una familia de enzimas que requieren  $Mg^{2+}$  (aunque también pueden utilizar  $Zn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) y están distribuidas en virus, bacterias, arqueas y eucariotas. Catalizan la hidrólisis de difosfatos nucleosídicos unidos a otras fracciones "x" (de aquí el acrónimo en inglés NUDIX). Los miembros de esta familia son reconocidos por presentar una secuencia consenso de 23 aminoácidos, la caja NUDIX (GX<sub>5</sub>EX<sub>7</sub>REUXEEXGU: donde X es cualquier aminoácido y U es isoleucina, leucina o valina). Este dominio contiene el sitio catalítico y el sitio de unión a  $Mg^{2+}$ . Los substratos enzimáticos son variados e incluyen nucleósidos trifosfatados intactos u oxidados, nucleótidos, 5' 7-

metilguanosina ARN (caperuza del ARN), coenzimas dinucleotídicas y polifosfatos dinucleósidos (alarmonas). Estas enzimas se caracterizan por tener una amplia gama de sustratos nucleotídicos o nucleosídicos, lo que generalmente las hace inespecíficas en este sentido. En general las funciones de estas enzimas son muy variadas y algunas de las más importantes son las de protección, procesamiento de ácidos nucleicos, regulación y señalización.<sup>161,162</sup> Específicamente en bacterias, las principales funciones de estas enzimas son: metabolismo de la pared celular,<sup>163</sup> metabolismo de ARN,<sup>164,165</sup> sanitización de nucleótidos oxidados,<sup>166,167</sup> resistencia a sustancias tóxicas<sup>168</sup> y catabolismo de alarmonas.<sup>148,159,160</sup>

### 1.5.1 El control de las alarmonas por enzimas NUDIX en bacterias patógenas y su relevancia en la virulencia.

El control de las alarmonas a través de las enzimas NUDIX está directamente relacionado con la virulencia de ciertas bacterias. La enzima representativa del control de las alarmonas es una dinucleósido oligofosfato pirofosfatasa (DOP), en la mayoría de las veces se trata de una diadenosina tetrafosfato pirofosfatasa. La reacción enzimática se muestran a continuación:<sup>161</sup>

Ecuación 1:



Esta enzima requiere de tres cationes divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ ), dos de los cuales están unidos a la enzima y uno al sustrato. El pH óptimo de las DOP es de 8 a 9. Las DOP son inhibidas por  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{F}^-$ .<sup>161</sup>

Algunos ejemplos de las DOP se enuncian a continuación. En la bacteria invasiva *E. coli* K1 la enzima YgdP, es una DOP cuyo sustrato preferido es Ap5A, con actividad menor en Ap4A y Ap6A. Esta proteína está directamente relacionada con la invasión al endotelio microvascular del cerebro humano.<sup>147</sup> La enzima YgdP es estructuralmente parecida a la enzima IalA de *Bartonella bacilliformis*, otra DOP cuyo sustrato preferido es Ap4A, siendo Ap5A y Ap6A sustratos con menor

actividad. La enzima se transcribe junto con el gen *ialB* y juntos confieren un fenotipo invasivo en las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* HB101.<sup>160</sup> En *Legionella pneumophila* el sustrato preferido de la enzima NudA es Ap5A. En el trabajo de Edelstein et al. (2005) la mutación del gen *nudA* en la cepa *L. pneumophila* F2310 produjo una menor sobrevivencia en macrófagos, mayor resistencia a medios salinos y un crecimiento retardado a 25° C, 37° C y 42° C comparado con la cepa silvestre. Sin embargo, el estudio demostró que el gen *nudA* no está relacionado con la invasión.<sup>148</sup> En *Rickettsia prowazekii* la enzima InvA mantiene una especificidad por nucleósidos adenilados de más de 5 fosfatos, siendo el sustrato preferido Ap5A. Además, en el trabajo de Gaywee et al. (2002) se demostró que la transcripción de *invA* aumentó en los periodos de estrés intracelular (30 min. después de la internalización, 24 h y 192 h postinfección), indicando que esta DOP es determinante para la infección.<sup>159,169</sup> En otro trabajo presentado por Ismail et al. (2003) se determinó que las proteínas YgdP y ApaH de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium catalizan la hidrólisis de Ap4A y Ap5A. Sin embargo únicamente YgdP es una DOP, aunque ambas trabajan de manera conjunta en la reducción de estas alarmonas. Estas enzimas están directamente relacionadas con la adhesión e invasión en células epiteliales, ya que la mutación de una o ambas produce un fenotipo filamentoso no invasivo.<sup>157</sup>

Como se mencionó anteriormente, la disminución de la concentración de las alarmonas contribuye a eliminar la toxicidad producida por éstas en condiciones de estrés. Este efecto puede indirectamente contribuir a la invasión y sobrevivencia de bacterias patógenas. Una de las hipótesis sugeridas por Gaywee et al (2002), mencionan que la producción de ATP como molécula energética en la reacción enzimática (Ecuación 1) puede ser determinante para la obtención de energía en el proceso de invasión, en donde como se ha determinado, la concentración de nutrientes es escasa.<sup>159</sup> Por otro lado, el aumento de las alarmonas parece tener una relación directa con la regulación de genes relacionados al metabolismo (RpoF y PtsP). La unión de nucleósidos adenilados al promotor de PtsP (parte del sistema PTS) puede inhibir el registro de la disponibilidad de carbohidratos, por lo que la bacteria no puede entrar en la fase

astringente.<sup>157</sup> Los diferentes trabajos publicados al respecto muestran la importancia de estas enzimas y el control de las alarmas en la virulencia.

## 2. Justificación.

En el genoma de *B. melitensis* se identificó que la secuencia del gen BMEI0215 presentaba características de DOP. En el análisis de aminoácidos se mostró que el gen presentaba 52% de similitud con enzimas NUDIX de otras bacterias patógenas (Fig. F). Presentó la mayor similitud (76%) con el gen *invA* de *R. prowazekii* y el locus *ialAB* (locus *nudH-ialB*) de *B. bacilliformis*, por lo que se renombró al gen BMEI0215 como *invA*. Dada la importancia de la adaptación al estrés en la virulencia de *B. melitensis*, el gen *invA* puede ser determinante en el proceso de infección, tal como ha sido demostrado para otras bacterias patógenas. Se plantea conocer la participación de este gen en la virulencia, realizando la mutación del gen *invA* en una cepa silvestre de *B. melitensis*, y analizar, a través de modelos *in vivo* e *in vitro*, la capacidad de invasión y sobrevivencia intracelular de la cepa mutante.

```

B. bacilliformis IalA      -----MDTMDFKTLPYRKGVGIVVFNREG---QVWIGRRLLITSSHTYAEVSKLWQFPQ  GGIDEGEPELDAAR
B. melitensis BMEI0215 (invA) -MSEHKGPTGAMVDPESLPYRPCVGLMVLNKAG---LVNAGRRIVIPGDEMGGATQLWQMPQ  GGIDKGEDPAQAAL
H. pylori InvA          -----MLHKKYRPNVAIIMSPPDYNACEVFI AERIDIEG-----AWQFPQ  GGIDEGETPLEALH
R. prowazekii InvA      MRSSNKYLDLPYRPGVGMILLNADN---QIFVGKRIDTKIS-----SWQMPQ  GGIVPGETPSIAAM
E. coli O:157H7 YgdP    -----MIDDDGYRPNVGVICNRQG---QVMWARRFGQHS-----WQFPQ  GGINPGESAEQAMY
S. Typhimurium Inv     -----MIDDDGYRPNVGVICNRQG---QVMWARRFGQHS-----WQFPQ  GGINPGESAEQAMY
P. aeruginosa (di)NPH  -----MIDSDGFRPNVGIILANEAG---QVLWARRINQEA-----WQFPQ  GGINDRETPEEALY
L. pneumophila NudA    -----MKIKNIPYYVATRVVKRIQSGLNLTLG---ARAIVTNTTEHVLLVKHTYQPHWYLPG  GGIVKKGESTKAAVI

B. bacilliformis IalA      RELYEETG MR--SVNLIK EVQDWF CYDFPQELIGHV LNNQYRGM QKWFAFOE IGETSEIVINS PENSNKAEFDQNK
B. melitensis BMEI0215 (invA) RELYEETG MT--SVSLL EASDNIN YDLP PHLVGLAL KGYRGTQXWFA YRFEGDESEI AINPPGGHTAEFDCWE
H. pylori InvA          RELLEEIG TN--EIEILA QYPRNIA YDFPSNMEHKFYS--FDGQKQRYFLVR LKHTN-MIDLN----KHTPEFRAYQ
R. prowazekii InvA      REMLEEIG SN--KGYIIA ESKCHYSY DVPSFLIPK LWNFNFRGQKQRWFLIRE TGNKNDINI H----TSNPEFDQWR
E. coli O:157H7 YgdP    RELFEEVG LSRKDVRI LASTRNW LRYKLPKRLVRWDTK PVICIGQKQKWFLLQ LVSQDAEINMQT---SSTPEFDGWR
S. Typhimurium Inv     RELFEEVG LSRKDVRI LASTRNW LRYKLPKRLVRWDTK PVICIGQKQKWFLLQ LMSADAEINMQT---SSTPEFDGWR
P. aeruginosa (di)NPH  RELNEEVG LEAGDVRI LACTRGL WLRYL PQLRVRTHSQPL CIGQKQKWFLLR LMSDEARVRMDI---TSKPEFDGWR
L. pneumophila NudA    RELHEEVG LVVAEQD VILFG-----IYHKKY LGVNDYPV IYVKNFTSHVTHSR-----EIEQIG

B. bacilliformis IalA      WINLEVLPSIVSFKRHVYMKVWHEFRNII-----
B. melitensis BMEI0215 (invA) WKPMADLPNLIVPFRKRVYEQVATFRHLAA-----
H. pylori InvA          FIHLKDLLKRIVPFKROVYRQVIAYFKREGYL-----
R. prowazekii InvA      WTSLDEL LSIIPFKRKL YQAVVKEFESLIQ-----
E. coli O:157H7 YgdP    WVSYWYPVRQVVSFKRDVYRRVMKEFASVVM SLQENTPKPQNASAYRRKRK G
S. Typhimurium Inv     WVSYWYPVRQVVSFKRDVYRRVMKEFASVVM ALQDNPPKLQ SAPAYRRKRK G
P. aeruginosa (di)NPH  WVSYWYPLGQVWTFKREVVRRALKELAPRLLARD-----
L. pneumophila NudA    WFSLDALPEMVSPTGKRRLLGEYFONNP ISEKW-----

```

Figura F. Página anterior. Comparación de la secuencia de aminoácidos del gen *invA* (BMEI0215) de *B. melitensis* y la secuencia de otras proteínas homólogas a través de una búsqueda BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El dominio NUDIX se encuentra dentro del marco negro. Los aminoácidos idénticos están resaltados en gris oscuro, mientras que los aminoácidos similares están resaltados en gris claro.

### 3. Hipótesis.

La mutación del gen *invA* de *B. melitensis* 133 producirá un fenotipo atenuado en el modelo de infección de células epiteliales y macrófagos comparado con la cepa parental *B. melitensis* 133. Así mismo, la mutación del gen *invA* de *B. melitensis* 133 producirá una menor colonización en ratones, así como una respuesta inmune eficiente comparado con la cepa parental *B. melitensis* 133.

### 4. Objetivo.

Comparar la invasión, sobrevivencia y replicación intracelular de la cepa mutante del gen *invA* en el modelo de infección celular, y la virulencia residual e inmunogenicidad en el modelo murino con la cepa parental.

### 5. Material y Métodos.

#### 5.1 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas, así como los plásmidos que se utilizaron en el presente trabajo se muestran en el cuadro 1. Las cepas *B. melitensis* 133, *B. melitensis* Rev 1 y *B. melitensis* 16M fueron crecidas en caldo o agar brucella (Becton Dickinson and Company. Sparks MD, EU. No. de catálogo: 211088 y 211086). Las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* S17.1 fueron crecidas en caldo o agar Luria Bertani (Becton, No. de catálogo: 241420 y 241320), en caso de ser necesario se adicionó al medio de cultivo kanamicina (50  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich, St. Louis MO, EU. No. de catálogo 60615) y ampicilina (100  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich, No. de catálogo: A9393). Las

condiciones de manipulación genética se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándares.<sup>170</sup>

**Cuadro 1. Plásmidos y cepas bacterianas utilizadas.**

Plásmidos y cepas.	Características.	Referencias.
<i>Brucella melitensis</i> 133 (Bm 133).	Biotipo 1 Cepa mexicana de campo; Nal <sup>R</sup>	<sup>171 172</sup>
<i>Brucella melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km (Bm A).	Cepa 133 mutante (gen BMEI0215 interrumpido); Km <sup>R</sup> .	Este trabajo
<i>Brucella melitensis</i> 133 <i>invA</i> -km <sup>C</sup> (Bm AC).	Cepa 133 <i>invA</i> -km complementada (complementada con el plásmido pJA4)	Este trabajo
<i>Brucella melitensis</i> Rev 1 (Bm Rev 1).	Biotipo 1 cepa vacunal; Str <sup>R</sup>	
<i>Brucella melitensis</i> 16M (Bm 16M).	Biotipo 1 ATCC 23456; Nal <sup>R</sup> .	
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	
pCR 2.1	Vector de clonación 3.9 kb; Km <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pJA1	Plásmido pCR 2.1 con el gen BMEI0215 de <i>B. melitensis</i> 133 (1.6 kb)	Este trabajo
pJA2	Plásmido pJA1 con el fragmento de 1.6 kb del gen BMEI0125 interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina (2.9 kb)	Este trabajo
pJA3	Plásmido pKOK.4 con el fragmento de 2.9 kb del plásmido pJA2	Este trabajo
pJA4	Plásmido pBBR4MCS con el gen BMEI0215 completo (1.6 kb); Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pSU4111	Plásmido de 9.3 kb; Km <sup>R</sup>	<sup>173</sup>
pKOK.4	Vector suicida para <i>Brucella</i> ; Amp <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	<sup>174</sup>
pBBR4MCS	Vector de clonación; Amp <sup>R</sup>	<sup>175</sup>

## 5.2 Construcción de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km.

El fragmento de 1.6 kb conteniendo el gen *invA* (BMEI0215) de 537 pb fue amplificado por PCR usando el par de iniciadores 466 (5'-AGG ATG TGA CCC GTT TCG AT-3') y 467 (5'-CGA TGC GCA AAA TGA TAA GG-3'). El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo a 94° C por 5 min, seguido de 33 ciclos con el siguiente programa: 94° C por 40 seg, 61° C por 39 seg y 72° C por 2 min, y una extensión final de 72° C por 7 min. El producto de amplificación fue clonado directamente en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen-Life Technologies, Grand Island NY EU, No de catálogo K4500-01) para generar el plásmido pJA1. El plásmido pJA1 fue digerido en el sitio único de corte *Cla*I que interrumpe el gen *invA*, para de esta manera introducir el casete de resistencia a kanamicina (1.3 kb obtenido del plásmido pSU4111) y generar el plásmido pJA2. El plásmido fue digerido con *Eco*RI para obtener el fragmento de 2.9 kb que contenía el gen *invA* interrumpido con el casete de kanamicina y se clonó directamente en el plásmido suicida pKOK.4 para generar el plásmido pJA3. El plásmido pJA3 fue introducido a la cepa *B. melitensis* 133 a través de ensayos de conjugación con la cepa donadora *E. coli* S17.1. Las colonias trans-conjugantes fueron seleccionadas por desarrollar resistencia a kanamicina y susceptibilidad a tetraciclina y ampicilina (todos los antibióticos de Sigma Aldrich. Tetraciclina: No. de catálogo: T7660). La interrupción del gen *invA* fue confirmada por PCR y secuenciación.

## 5.3 Complementación de la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km.

Para restaurar el gen *invA* se utilizó el plásmido pBBR4MCS. El gen completo *invA* proveniente del amplicón de 1.6 kb fue directamente clonado en el sitio *Eco*RI del plásmido pBBR4MCS para generar el plásmido pJA4. El plásmido fue transformado a través de electroporación a bacterias electrocompetentes de la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km. Las condiciones de electroporación fueron: 1.6 kV de voltaje, 50  $\mu$ F de capacitancia y menos de 200  $\Omega$  de resistencia, en un tiempo de 4 a 8 mseg, utilizando el electroporador GenePulser Xcell 165-2660 (Bio-Rad

Laboratories Inc. Hercules CA, EU). Se seleccionaron las colonias transformantes resistentes a ampicilina y kanamicina, y posteriormente fueron analizadas por lisis alcalina y por PCR.

#### 5.4 Ensayos de invasión en células HeLa.

Se cultivaron células HeLa a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio mínimo esencial Dulbecco's (DMEM, Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 11995-065), adicionado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 12483-020) 2 mmol/L de glutamina (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 25030-081) y 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 11140-050). El medio se denominó DMEMc. Se utilizó una concentración celular de  $5 \times 10^5$  células depositadas en placas de cultivo celular de 24 pozos. Para realizar los ensayos de invasión y sobrevivencia intracelular se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 500 bacterias por célula (MOI 500:1)<sup>60</sup> de cada una de las cepas bacterianas. Las placas de cultivo celular fueron centrifugadas por 10 min a 400 g a 4° C, para posteriormente incubarse a una temperatura de 37° C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 15 min (considerado como tiempo cero, inicio de la infección) las células fueron lavadas tres veces con solución amortiguada de fosfatos (PBS) para remover las bacterias que no se adhirieron. Los monoestratos fueron incubados con DMEMc suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (Sigma Aldrich, No. de catálogo: G1272) durante 1 h para eliminar la bacteria extracelular. Para los tiempos de infección posteriores a 1 h, el medio de cultivo celular fue reemplazado por un medio con 10 µg/ml de gentamicina. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS y fueron lisadas con una solución de PBS-Tritón X-100 al 0.1% (Tritón X-100: Sigma Aldrich, No. de catálogo: T8787) a los 30, 60 y 120 min pi. Para la determinación de las bacterias intracelulares (a través de unidades formadoras de colonias, UFC/ml) se cuantificó a través de diluciones décuples seriadas y siembra en agar brucella. Se repitió el ensayo de

invasión celular al menos cinco veces y cada repetición contó con tres réplicas de cada cepa bacteriana.

#### 5.5 Ensayos de fagocitosis y sobrevivencia intracelular en macrófagos caprinos.

Se utilizaron macrófagos caprinos aislados de sangre periférica provenientes de cinco cabras sanas y libres de brucelosis de la raza alpina francesa de dos años de edad. Todos los procedimientos realizados sobre las cabras fueron aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, siguiendo los estándares internacionales éticos. Los macrófagos caprinos se mantuvieron en medio CRPMI: medio RPMI 1640 (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 23400-062), 2.2 mmol/L de L-glutamina, 1.1% de MEM aminoácidos no esenciales, 1.1 mmol/L de piruvato de sodio (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo 11360-070), 7.5% de bicarbonato de sodio (Sigma Aldrich, No. de catálogo: S5761) y 10% se suero autólogo. La sangre fue recolectada (200 ml) por punción de la vena yugular y resuspendida en 8 ml de ACD (citrato trisódico 74.8 mmol/L (No. de catálogo: S4641), ácido cítrico 38 mmol/L (No. de catálogo: 251275) y dextrosa 135.9 mmol/L (No. de catálogo: D9559) todos los reactivos obtenidos de Sigma Aldrich). Posteriormente la sangre fue centrifugada a 1000 g durante 20 min, para la obtención de la porción rica en leucocitos. Esta porción fue resuspendida en PBS-ácido cítrico (PBS y citrato trisódico 12.6 mM) para un volumen final de 30 ml. Este volumen fue depositado sobre un gradiente de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Suecia. No. de catálogo: 17089101) con una gravedad específica de 1.074 g/ml en un volumen de 15 ml. Se sometió a una centrifugación isopícnica (1000 g por 30 min) para la separación de leucocitos. Las células fueron resuspendidas en medio CRPMI y sembradas en cajas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>. Se seleccionaron a los monocitos del resto de los leucocitos caprinos por su capacidad adherente. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos durante 13 días, determinado después del análisis de la máxima producción de óxido nítrico (NO<sub>2</sub>) en las células a través de la técnica de Griess (Promega, Madison WI, EU.

Nó de catálogo: G2930). Para los ensayos de fagocitosis y sobrevivencia intracelular se utilizaron  $5 \times 10^4$  macrófagos caprinos, utilizando una MOI de 100:1<sup>176</sup> de cada una de las cepas bacterianas. La metodología de infección y determinación de bacteria intracelular fue similar a la metodología que fue utilizada en los ensayos de invasión celular. Se determinó la concentración bacteriana a las cero horas, 4 h (fagocitosis) y a las 24 h y 48 h (sobrevivencia y replicación intracelular) pi. Cada experimento se realizó al menos 3 veces y cada repetición tuvo 3 réplicas.

### 5.6 Evaluación del tránsito intracelular a través de inmunofluorescencia.

Se realizaron experimentos de infección en macrófagos murinos de la línea celular J774A.1 sobre cubreobjetos circulares. Se infectaron  $2.5 \times 10^5$  macrófagos en los ensayos de fagocitosis y sobrevivencia intracelular, con una MOI de 100:1<sup>176</sup> de cada una de las cepas bacterianas, utilizando los mismos tiempos pi previamente descritos en el ensayo de fagocitosis y sobrevivencia intracelular de macrófagos caprinos. Se emplearon estas células para el análisis del tránsito intracelular debido a que es un modelo que ya ha sido descrito.<sup>177, 178</sup> A los diferentes tiempos pi los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 3% (PFA 3%, Sigma Aldrich No. de catálogo: P6148) durante 15 min o con metanol frío (Sigma Aldrich No. de catálogo: 322415) durante 4 min. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y en el caso de haber fijado las células con PFA al 3% se les agregó PBS-NH<sub>4</sub>Cl 50 mmol/L (NH<sub>4</sub>Cl: Sigma Aldrich No. de catálogo: 254134) para neutralizar radicales libres. Posteriormente se adicionó PBS-saponina al 0.1% durante 1 min y se incubó además con PBS-Tritón al 0.1% durante 4 min más. Se incubaron los cubreobjetos con 10% de suero de caballo diluido en PBS-saponina 0.05% durante 10 min. La incubación de los anticuerpos primarios contra las proteínas específicas de fagosomas fue la siguiente: goat polyclonal anti-EEA1 (Santacruz Biotechnology Santa Cruz CA, EU. No. de catálogo: SC6415), goat polyclonal anti-calregulin (T-19) (Santacruz, No. de catálogo: T-19 SC-7431), mouse monoclonal anti-(H43A) LAMP1 (ABCAM, Cambridge RU. No. de catálogo:

AB25630), goat polyclonal anti-cathepsin D (G-19) (Santacruz, No. de catálogo: G-19 SC-6494) y suero policlonal anti-LPS de *B. melitensis* de cabra o ratón. Todas las incubaciones se realizaron durante 40 min. Los anticuerpos fueron diluidos en PBS-saponina al 0.05%, más suero de caballo al 5%. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS-saponina 0.05%. Los anticuerpos secundarios fluorescentes que se utilizaron fueron: Alexa 594 (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: A11005) y Alexa 488 (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: A1100), éstos se incubaron por 40 min. Finalmente los cubreobjetos se lavaron con PBS y agua destilada, y se montaron en laminillas de vidrio utilizando Mowiol (Sigma Aldrich, No. de catálogo: 324590). Se determinó el porcentaje de colocalización de los marcadores de proteínas de los fagosomas con las células bacterianas utilizando para ello un microscopio de fluorescencia Leica DM100 (Leica Microsystems, Wetzlar Alemania). Además se verificó la colocalización con un microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus America Corporate, Philadelphia EU) y el análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa de cómputo Olympus Fluoview FV1000.

### 5.7 Ensayo *in vivo* en el modelo murino.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad que se distribuyeron de manera homogénea en 5 grupos. Cada grupo contó con 17 ratones las cuales se inocularon con  $10^4$  UFC/ml por vía intraperitoneal<sup>126</sup> de las cepas *B. melitensis* 133, *B. melitensis* *invA*-km, *B. melitensis* *invA*-km<sup>C</sup> y *B. melitensis* Rev 1. Además se inoculó otro grupo con 100 µl de PBS como grupo control. Se sacrificaron 3 ratones de cada grupo durante los días 7, 15, 30, 60 y 90 días pi. Todos los procedimientos realizados sobre los animales, así como su manutención fueron aprobados por el Comité Interno del Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, siguiendo los estándares éticos internacionales.

### 5.7.1 Determinación de virulencia residual.

En cada muestreo se extrajo asépticamente el bazo de cada ratón. Éste se pesó para determinar la esplenomegalia y posteriormente se maceró en 1 ml de PBS para calcular la concentración de bacterias por gramo de tejido, realizando diluciones décuples seriadas y posteriormente sembrando en agar brucella. La determinación de UFC se realizó posterior a 48 h de incubación a 37° C.

### 5.7.2 Determinación de inmunidad humoral.

De los diferentes muestreos se obtuvo suero para la determinación de la concentración de anticuerpos a través de la técnica de ELISA. El suero se obtuvo a través de la obtención de sangre completa por enucleación ocular de los ratones insensibilizados. Los anticuerpos que se analizaron fueron IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM a través del kit Mouse monoclonal antibody isotyping reagents ISO2-1 (Sigma Aldrich, No. de catálogo: ISO2-1) siguiendo las instrucciones del fabricante, los sueros se mantuvieron en congelación antes de ser procesados. Brevemente, se prepararon placas de ELISA con 100 ng de LPS de *B. melitensis* por pozo, que se mantuvieron en refrigeración antes de realizar la prueba. Para el bloqueo de los receptores inespecíficos se agregó por pozo 200 µl de PBS con 5% de leche descremada, incubando 1 h a 37° C. Cada pozo se lavó 3 veces con PBS-Tween 20, 0.05% (Tween 20: Sigma Aldrich, No. de catálogo: P9416). Cada suero se diluyó 1:200 antes de agregar a los pozos, cada muestra de suero se procesó por triplicado. Una vez que los sueros se pusieron en cada pozo (100 µl/pozo), se incubó cada placa de ELISA durante 1 h a 37° C para posteriormente lavar cada placa con PBS-Tween 20, 0.05%, tres veces. Antes de agregar 100 µl de cada subtipo de anticuerpo anti-IgG o anti-IgM de ratón e incubar a temperatura ambiente por 30 min, cada anticuerpo anti-IgG o anti-IgM se diluyó 1:1000 en PBS. Posterior a esta incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20, 0.05%. El anticuerpo “rabbit anti-goat IgG peroxidase labeled” (Sigma Aldrich, No. de catálogo: A5420) fue diluido 1:5000 en PBS-Tween 20, 0.05%, antes de colocar

100  $\mu$ l en cada pozo, posteriormente se procedió a una incubación a temperatura ambiente por 15 min. Se procedió al lavado de la placa, como se ha descrito anteriormente. El sustrato de la enzima fue preparado de la siguiente forma: se preparó una solución de 1mg/ml de ácido 5-aminosalicílico (Sigma Aldrich, No. de catálogo: A3537) en una disolución de fosfato de sodio 0.02 M (fosfato de sodio: Sigma Aldrich, No. de catálogo: 342483) pH 6.8. Por cada 10 ml de esta solución se agregó 100  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 1% (peróxido de hidrógeno: Sigma Aldrich, No. de catálogo. 216763). El sustrato fue agregado a cada pozo en un volumen de 100  $\mu$ l, previo lavado con PBS-Tween 20, 0.05%. La placa con el sustrato se incubó 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Para parar la reacción enzimática se agregaron 50  $\mu$ l de una solución 3 N de hidróxido de sodio (Sigma Aldrich, No. de catálogo: S5881) a cada pozo. Inmediatamente después se procedió a la lectura de la placa en el lector VECTOR 3, Multilabel counter (PerkinElmer Waltham MS. EU) con una longitud de onda de 490 nm, considerando los controles correspondientes.

### 5.7.3 Determinación de producción de IFN- $\gamma$ .

Para evidenciar la respuesta inmune celular del tipo Th1 y compararla entre los diferentes grupos de ratones, se utilizó la determinación cuantitativa de la expresión del ARN mensajero de la citocina IFN- $\gamma$ ; a través de la técnica de PCR en tiempo real. La obtención de ARN total se realizó a partir de sangre completa, con el reactivo Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany, No. de catálogo: 11667157001) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se eliminó el ADN genómico con el uso de DNase I (Invitrogen-Life Technologies, No. de catálogo: 18068-015) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procedió a la determinación de la concentración y pureza del ARN a través de espectrofotometría. Se utilizó el kit Omniscript RT (Qiagen, Hilden Alemania No. de catálogo: 20511) para transformar el ARN mensajero (RNAm) en ADN complementario (DNAc), utilizando 4 unidades de Oligo-dT 18 (Thermo Scientific, Rockford IL, EU, No. de catálogo: SO132), por

cada 1000 ng de ARN total a transformar. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con una incubación inicial de 37 °C por 60 min, y una incubación final 95 °C por 5 min. La concentración y pureza de cada muestra de DNAC fue determinada por espectrofotometría. Las muestras de DNAC fueron mantenidas a -20° C hasta su posterior análisis. Para la realización del PCR cuantitativo (PCRq) se utilizó el kit LightCycler 480 DNA SYBR Green Master I mix (Roche, No. de catálogo 04707516001) utilizando 100 ng de DNAC, 0.5 pM de oligonucleótidos de IFN- $\gamma$  o  $\beta$ -actina y 8  $\mu$ l de SyBR Green Master I mix en un volumen final de 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Las siguientes secuencias de oligonucleótidos fueron utilizadas: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' y 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' para el transcrito de  $\beta$ -actina; 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' y 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3' para el transcrito de IFN- $\gamma$ .<sup>179</sup> Para la realización del PCRq se utilizó el equipo y software LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), las condiciones del termociclador fueron las siguientes: preactivación: 95° C por 10 min; seguido por 42 ciclos de 95° C por 10 seg, 72° C por 25 seg y 86° C por 4 seg. En esta última temperatura se realizó la medición de fluorescencia. Para determinar la especificidad de los amplicones se utilizó un programa adicional de disociación ("melting"). Éste consistió en un ciclo de 95° C por 5 seg, seguido por 60° C por 3 seg, para finalmente detectar la fluorescencia de manera continua de 60° C a 97° C. Para finalizar la reacción, cada placa de PCRq fue enfriada a 40° C por 30 seg. Cada muestra de DNAC se analizó por triplicado. El nivel de expresión de RNAm de IFN- $\gamma$  entre los grupos de ratones infectados a los diferentes tiempos de infección y el grupo control se determinó a través de la técnica de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta C_t$ ), utilizando como transcrito normalizador la expresión de  $\beta$ -actina.

## 5.8 Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de análisis de varianza y comparación de medias de tratamiento a través de la prueba de Bonferroni. Para los resultados de

colocalización se utilizó la media geométrica antes de la realización del análisis de varianza. La elaboración de los gráficos y el análisis de resultados fue realizado con el programa de cómputo Prism 5 GraphPad. El nivel de significancia se fijó en  $P < 0.05$  o  $P < 0.001$ .

## 6. Resultados.

### 6.1 Construcción y análisis de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km y la cepa complementada *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup>.

La cepa mutante 133 *invA*-km (Bm A) se obtuvo por intercambio alélico a través de ensayos de conjugación bacteriana utilizando *E. coli* S.17 como cepa donadora. Las colonias trans-conjugantes resistentes a kanamicina y susceptibles a tetraciclina y ampicilina se analizaron por PCR (Fig.1). Finalmente, se confirmó la mutación del gen *invA* a través de secuenciación. Para la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> (Bm AC), que se obtuvo por inserción del plásmido pJA4 a través de electroporación, se seleccionaron las colonias transformantes que fueron resistentes a ampicilina y a kanamicina. Se verificó la presencia del plásmido por lisis alcalina y posteriormente se realizó análisis por PCR.

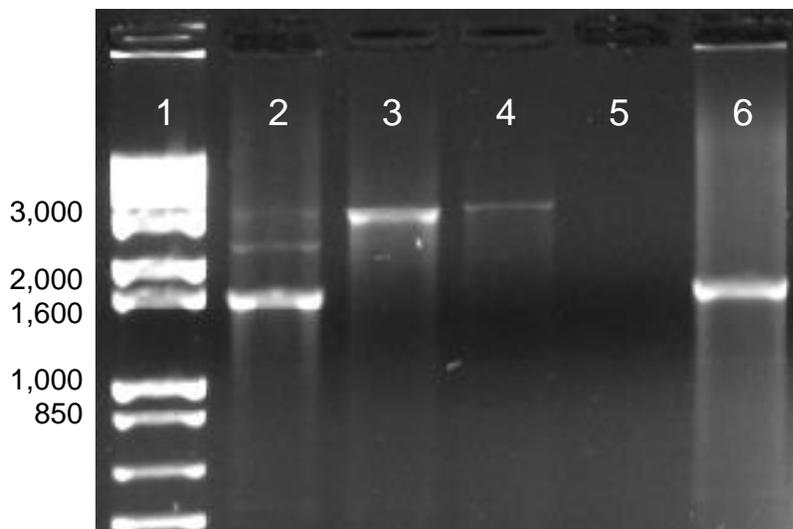


Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación por PCR para detectar el gen *invA*. El producto de amplificación del gen completo es de 1.6 kilobases (kb), mientras que la interrupción del gen *invA* por inserción del gen de kanamicina produce un amplicón de 2.9 kb. Carril 1: marcador de tamaño molecular 1kb plus (Invitrogen-Life Technologies No. de catálogo: 10787-018), carril 2: amplificación de la cepa mutante complementada *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> (mostrando el resultado de ambas amplificaciones), carril 3 y 4: amplificación de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km, carril 5: testigo negativo de PCR y carril 6: amplificación de la cepa 133 de *B. melitensis*.

## 6.2 Invasión en células HeLa.

El fenómeno de invasión fue analizado en la línea de células epiteliales HeLa con las diferentes cepas de *B. melitensis*, utilizando una MOI de 500 (Fig 2). Al inicio de la infección (tiempo de incubación cero), todas las cepas mostraron un promedio de invasión de  $4.72 \times 10^6$  UFC/ml, a excepción de la *B. melitensis* 16M (Bm 16M, cepa de referencia) que invadió 2.2 veces más que el resto ( $P < 0.05$ ). A los 30 min pi, Bm 16M mostró una sobrevivencia 1.6 veces mayor que la sobrevivencia observada en la cepa *B. melitensis* 133 ( $P < 0.05$ , Bm 133, cepa parental) y 4 veces mayor que las cepas *B. melitensis* 133 *invA*-km (Bm A, cepa mutante), *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> (Bm AC, cepa complementada) y *B. melitensis* Rev 1 (Bm Rev 1, cepa vacunal),  $P < 0.001$ . En este mismo tiempo pi, la sobrevivencia de Bm 133 fue 2.5 veces mayor que la observada para Bm A, Bm AC y Bm Rev 1 ( $P < 0.05$ ). Posteriormente, a los 60 min pi, no se observaron diferencias significativas entre la sobrevivencia intracelular de todas las cepas. Un aumento en la concentración bacteriana de Bm 16M, Bm 133 y Bm AC fue

evidente a los 120 min pi, en contraste, Bm Rev 1 y Bm A retuvieron los mismos niveles de bacterias intracelulares comparadas con los 60 min pi. Este aparente incremento en la concentración bacteriana puede ser atribuido al tiempo de duplicación de *Brucella* spp. Se ha determinado que las cepas virulentas de *Brucella* en fase log presentan un tiempo de duplicación de 2 a 2.5 horas en medio de cultivo.<sup>180,181</sup> Es probable que las cepas virulentas estuvieran en este estado durante el periodo de invasión. La sobrevivencia de Bm A y Bm Rev 1 a los 120 min fue similar ( $P > 0.05$ ) y fue 5 veces menor que la concentración bacteriana de la cepas Bm 133, Bm 16M y Bm AC ( $P < 0.001$ , Fig.2).

La concentración observada a los 120 min pi para las cepas Bm A y Bm Rev 1 puede estar relacionada con un fenotipo de atenuación. Aunque la cepa Bm AC tuvo una sobrevivencia intracelular similar a la cepa Bm 133 a los 120 min pi, no se observó la misma concentración entre esta cepa y la cepa parental, indicando por tanto una complementación parcial de la cepa (Fig. 2)

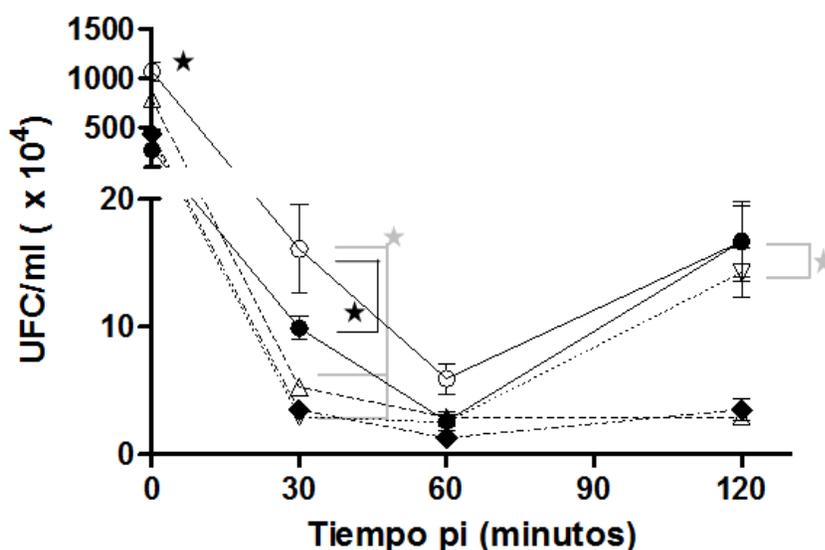


Figura 2: Invasión intracelular y sobrevivencia en células HeLa. Los resultados se muestran en UFC a diferentes tiempos pi. Las diferencias significativas se muestran como estrellas negras ( $P < 0.05$ ) o como estrellas grises ( $P < 0.001$ ). Las líneas y símbolos representan:  $\bullet$  : *B. melitensis* 133;  $\triangle$  : *B. melitensis* 133 *invA-km*;  $\nabla$  : *B. melitensis* 133 *invA-km*<sup>C</sup>;  $\blacklozenge$  : *B. melitensis* Rev 1 y  $\square$  : *B. melitensis* 16M. Los resultados son el promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar.

### 6.3 Supervivencia y multiplicación intracelular en macrófagos caprinos.

La supervivencia intracelular de las diferentes cepas de *Brucella* fue detectada a diferentes tiempos pi en macrófagos caprinos infectados con una MOI de 100. A las 0 y 4 h pi no se observaron diferencias significativas en la invasión y la supervivencia intracelular de los macrófagos, con la excepción de Bm Rev 1, que exhibió una supervivencia 2.5 veces menor que las otras a las 4 h pi ( $P < 0.05$ , Fig. 3). A las 24 h pi, las cepas Bm 133 y Bm 16M sobrevivieron y se replicaron de manera uniforme 11 veces más que el resto de las cepas ( $P < 0.001$ ). A las 48 h pi las cepas Bm 133, Bm 16M y Bm A tuvieron una replicación 16 veces mayor a la replicación intracelular de las cepas Bm Rev 1 y Bm AC ( $P < 0.001$ ). Durante los periodos de fagocitosis (0 h) y adaptación (4 h), no hubo diferencias significativas entre la cepa Bm A y la cepa Bm 133 ( $P > 0.05$ ). A las 24 h pi la cepa Bm A tuvo una replicación 8 veces menor a la observada en la cepa Bm 133. Ésta fue la diferencia entre las dos cepas más pronunciada en términos de concentración bacteriana ( $P < 0.001$ ). En contraste, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las cepas Bm 133 y Bm A a las 48 h pi, indicando que la mutación del gen *invA* produjo un retraso en la multiplicación intracelular (24 h pi) que alcanzó los mismos niveles observados en la cepa parental (48 h pi). Como se observa en la figura 3, la complementación no restauró la capacidad de supervivencia y multiplicación intracelular de la cepa Bm A a las 24 h y 48 h pi. De hecho, Bm AC demostró una supervivencia 4.2 veces menor que Bm A a las 24 h pi y 6.2 veces menor a las 48 h pi ( $P < 0.05$ ).

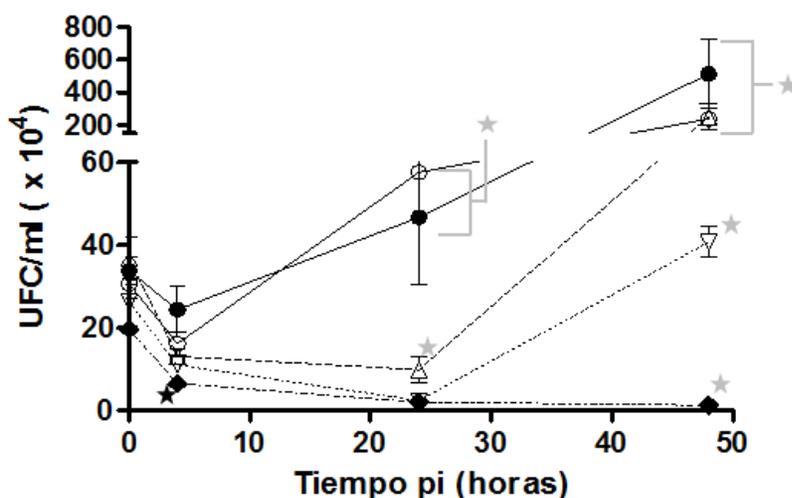


Figura 3: Fagocitosis y sobrevivencia intracelular en macrófagos caprinos. Los resultados se muestran en UFC a diferentes tiempos pi. Las diferencias significativas se muestran como estrellas negras ( $P < 0.05$ ) o como estrellas grises ( $P < 0.001$ ). Las líneas y símbolos representan: ● : *B. melitensis* 133; △ : *B. melitensis* 133 *invA*-km; ▽ : *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup>; ◆ : *B. melitensis* Rev 1 y ○ : *B. melitensis* 16M. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos  $\pm$  la desviación estándar.

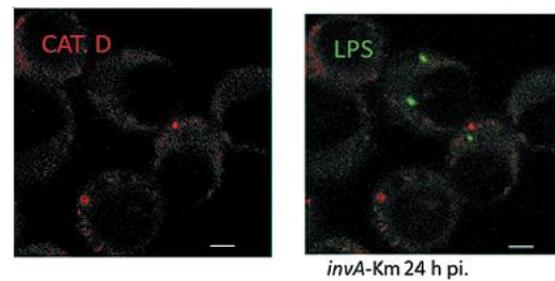
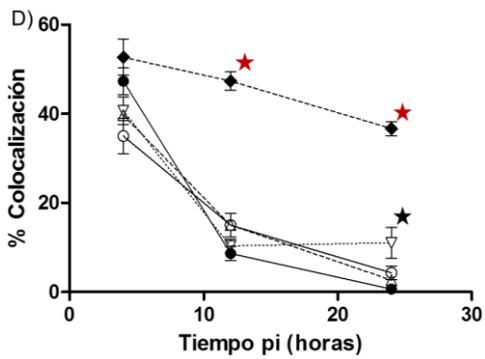
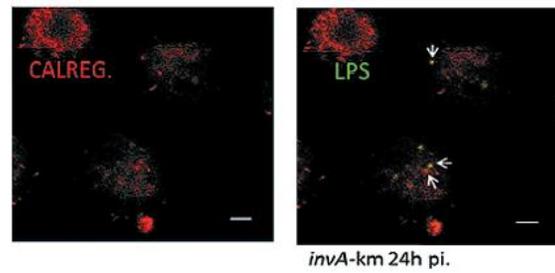
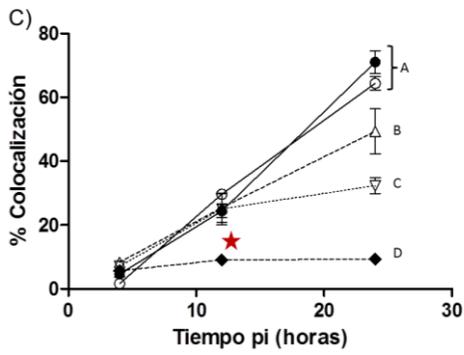
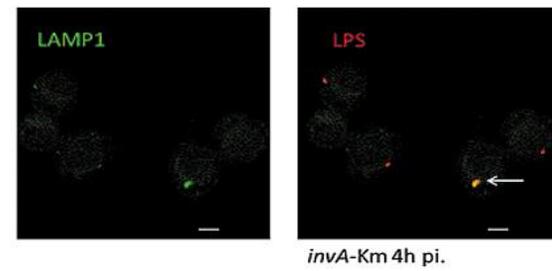
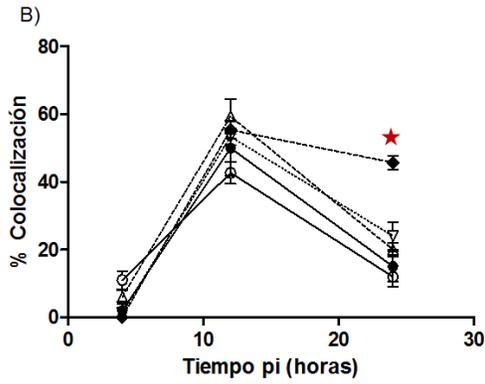
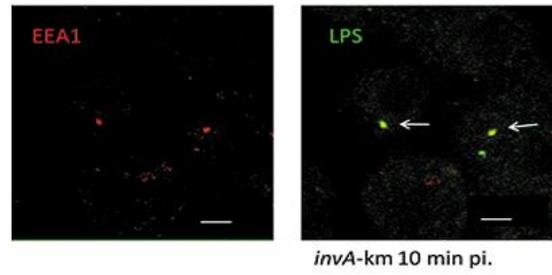
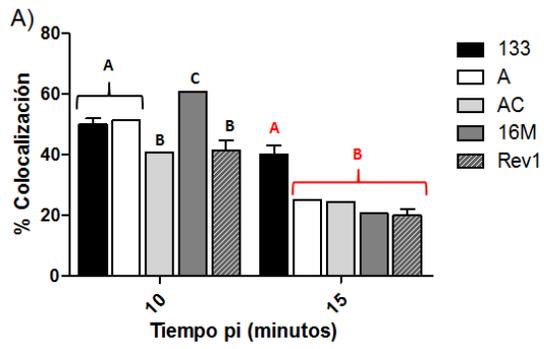
#### 6.4 Tránsito intracelular en macrófagos murinos.

La infección de los macrófagos murinos de la línea J774A.1 con las diferentes cepas de *B. melitensis* a una MOI de 100 se realizó para la determinación del tránsito intracelular a través de microscopía confocal, utilizando para ello anticuerpos contra las proteínas de endosomas (Fig. 4, paneles A a D). El análisis de microscopía confocal reveló un patrón similar de entrada de todas las cepas, con algunas diferencias a los 10 min pi (Fig. 4A). En este tiempo pi la cepa Bm 16M tuvo el mayor porcentaje de colocalización con el marcador EEA1 (antígeno de endosoma temprano 1, por sus siglas en inglés,  $60.6\% \pm 2\%$ ,  $P < 0.05$ ). EEA1 es una proteína que caracteriza a los endosomas tempranos y está involucrada en la transición del fagosoma al endosoma temprano.<sup>182</sup> Las BCV de la cepa Bm 133

retuvieron la proteína EEA1 ( $40\% \pm 2\%$ , Fig 4A) a los 15 min pi, resultando en el mayor porcentaje de colocalización comparado con otras cepas bacterianas ( $P < 0.001$ ), sugiriendo por tanto una invasión constante por parte de la cepa parental. La asociación de las BCV con EEA1 es transitoria y ocurre inmediatamente después de la internalización.<sup>183</sup> Durante la maduración del endosoma, las BCV adquieren enseguida la glicoproteína LAMP1, la cual es característica de endosomas tardíos y lisosomas.<sup>12</sup> Durante el periodo temprano de tránsito intracelular (4h pi) las BCV de las diferentes cepas exhibieron un patrón similar de colocalización con LAMP1 (Fig. 4B). A las 12 h pi, las cepas mostraron un promedio de 52% de positividad con LAMP1, y a las 24 h pi 17.8% de BCV colocalizaron con LAMP1, con la excepción de Bm Rev 1. El porcentaje de colocalización de la cepa Bm Rev 1 con LAMP1 a las 24 h pi fue de  $45.7\% \pm 2.08\%$  ( $P < 0.05$ ). Posteriormente durante el tránsito intracelular de BCV, las vacuolas replicativas son evidentes cuando los fagosomas progresivamente adquieren marcadores específicos del retículo endoplásmico, como calregulina, y pierden los marcadores de endosomas tardíos, como LAMP1.<sup>184</sup> Las BCV de las cepas Bm 133 y Bm 16M aumentaron progresivamente la adquisición de calregulina durante la infección, alcanzando el mayor porcentaje de colocalización a las 24 h pi. (Fig. 4C) Este tiempo de infección (24 h pi) está correlacionado con el inicio de la replicación intracelular en el modelo de infección de los macrófagos caprinos (Fig. 3). La colocalización de calregulina entre Bm 133 y Bm 16M fue similar ( $71\% \pm 3.6\%$  y  $64.3\% \pm 2\%$ , respectivamente) a las 24 h pi. Estos porcentajes fueron significativamente mayores a la colocalización de calregulina obtenida en las BCV de la cepa Bm A ( $49.3\% \pm 7\%$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 4C). Como se mostró en los resultados de la infección de los macrófagos (Fig. 3), la complementación de la cepa mutante fue sólo parcial, ya que la colocalización con calregulina a las 24 h pi en la cepa Bm AC fue significativamente menor que en la cepa Bm 133 ( $32.2\% \pm 2.5\%$  vs  $71\% \pm 3.6\%$ , respectivamente;  $P < 0.001$ ). Para determinar la unión de las BCV con los lisosomas se utilizó como marcador a la proteína catepsina D. Las bacterias replicativas nunca colocalizan con catepsina D, en contraste con las bacterias atenuadas.<sup>12</sup> La colocalización con catepsina D

disminuyó progresivamente durante el curso de la infección para todas las cepas (Fig. 4D), a excepción de Bm Rev 1 a las 12 h pi en comparación con el resto de las cepas ( $47.3\% \pm 2.08\%$  vs.  $12.2\% \pm 0.6\%$ , respectivamente;  $P < 0.001$ ) y a las 24 h pi ( $36.7\% \pm 1.5\%$  vs  $4.7\% \pm 1.3\%$ , respectivamente;  $P < 0.001$ ). De acuerdo con los resultados de colocalización de BCV negativas para LAMP1 y positivas para calregulina, en donde se observa el inicio de la replicación intracelular (Fig. 3, 24 h pi), se espera que estas cepas tengan un porcentaje bajo de colocalización con catepsina D a las 24 h pi. Con la excepción de la cepa Bm AC ( $11\% \pm 3.5\%$ ,  $P < 0.05$ ), las cepas Bm 133, Bm 16M y Bm A tuvieron un porcentaje de colocalización con catepsina D similar (promedio de  $7.5\% \pm 1.6\%$ ). Estos resultados indican que la destrucción intracelular de las cepas a las 24 h pi no fue de la misma magnitud que la observada en la cepa Bm Rev 1 (Fig. 4D).

Figura 4. Siguiendo página, porcentaje de colocalización  $\pm$  desviación estándar de las cepas de *B. melitensis* con los diferentes anticuerpos endosomales (izquierda) y fotografías de microscopía confocal representativas de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km (derecha) a diferentes tiempos pi en la infección de macrófagos J774A.1. Paneles A, C y D: colocalización del LPS (Alexa 488) con EEA1, calregulina y catepsina D (Alexa 594), respectivamente. Panel B: colocalización del LPS (Alexa 594) con LAMP1 (Alexa 488). La barra blanca en el extremo inferior derecho de las fotografías representa  $5\mu\text{m}$ , las flechas blancas ilustran la colocalización. Las diferencias significativas son mostradas en letras y estrellas (las estrellas negras representan una diferencia de  $P < 0.05$ , y las estrellas rojas representan una diferencia de  $P < 0.001$ ). Las líneas y símbolos representan:  $\bullet$  : *B. melitensis* 133;  $\triangle$  : *B. melitensis* 133 *invA*- km;  $\nabla$  : *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup>;  $\blacklozenge$  : *B. melitensis* Rev 1 y  $\ominus$  : *B. melitensis* 16M.



## 6.5 Determinación de virulencia residual en el modelo murino.

Para analizar la virulencia residual, cuatro grupos de ratones hembras fueron inoculados con las diferentes cepas de *B. melitensis* ( $1 \times 10^4$  UFC) intraperitonealmente. La colonización del bazo fue evidente desde el inicio de la infección (Fig. 5). A los 7 días pi, los ratones inoculados con la cepa Bm 133 tuvieron los mayores niveles de colonización del bazo, con una concentración de  $498.6 \pm 44.5$  UFC/mg, la cual fue 1.7 veces mayor que la detectada en la colonización del bazo de las otras cepas ( $P < 0.001$ ). Los mayores niveles de colonización del bazo se encontraron a los 15 días pi:  $648.6 \pm 153.3$  UFC/mg del grupo inoculado con la cepa Bm 133 contra el grupo inoculado con la cepa Bm A:  $480.3 \pm 155.5$  UFC/mg ( $P < 0.05$ ), para la cual la colonización del bazo fue 0.74 veces menor comparada con la cepa Bm 133. Por otro lado, los grupos inoculados con Bm Rev 1 y Bm AC mostraron una colonización del bazo 6.2 veces menor que la del grupo inoculado con Bm A ( $P < 0.001$ ) y 8.5 veces menor que el grupo inoculado con Bm 133 ( $P < 0.001$ ). El control de la infección comenzó a los 30 días pi, como se pudo notar por una disminución en la recuperación bacteriana de los bazos de los grupos inoculados con las cepas Bm Rev 1, Bm A y Bm AC ( $55.5 \pm 19.5$  UFC/mg,  $P > 0.05$ ). A los 30 días pi las concentraciones bacterianas en los bazos del grupo inoculado con la cepa Bm 133 fue 6 veces mayor que la de los grupos inoculados con las cepas Bm A, Bm AC y Bm Rev 1 ( $P < 0.001$ ). Finalmente, a los 90 días pi, la concentración bacteriana recuperada del grupo inoculado con la cepa Bm 133 fue 5.64 veces mayor que la del grupo inoculado con la cepa Bm A ( $P < 0.001$ ). No hubo recuperación bacteriana de los bazos de los ratones inoculados con la cepa Bm Rev 1 desde los 30 días pi hasta el final del experimento, o del grupo inoculado con la cepa Bm AC a los 90 días pi.

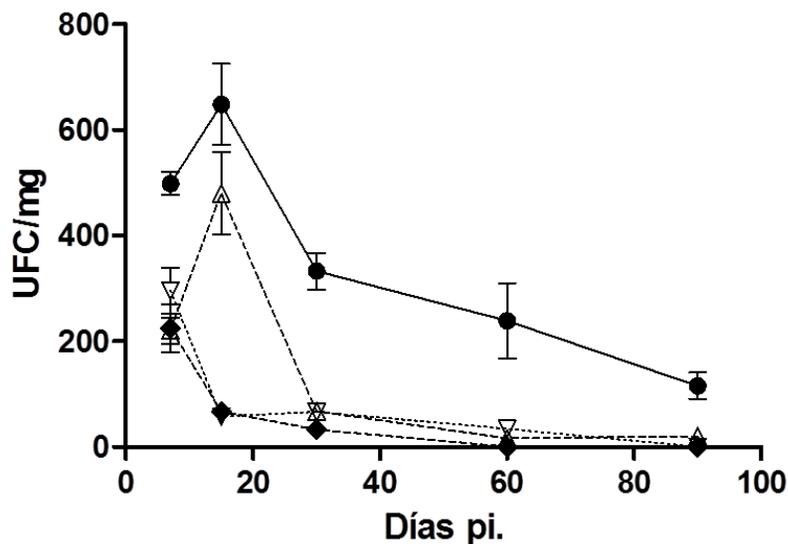


Figura 5. Colonización bacteriana del bazo de los diferentes grupos de ratones infectados. Los resultados son mostrados en UFC por miligrado de tejido (UFC/mg), a diferentes tiempos pi. Las líneas y símbolos representan: ● : *B. melitensis* 133; △ : *B. melitensis* 133 *invA*- km; ▽ : *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> y ◆ : *B. melitensis* Rev 1, respectivamente.

El peso del bazo de los diferentes grupos inoculados indicó una infección activa (cuadro 2). La esplenomegalia más prominente fue detectada en todos los grupos inoculados durante los primeros 15 días de infección. Para el grupo inoculado con la cepa Bm AC se detectó un peso constante del bazo del día 30 pi hasta el final del experimento (promedio de  $195.86 \pm 41.36$  mg) y una constante esplenomegalia fue observada a los 60 y 90 días pi para el grupo inoculado con la cepa Bm A ( $220.97 \pm 22.05$  mg y  $214.03 \pm 40.93$  mg, respectivamente). Como se puede observar en el cuadro 2, el grupo inoculado con la cepa Bm 133 tuvo el mayor peso del bazo durante todo el experimento hasta los 30 días pi. En este tiempo pi los pesos de los bazos de los grupos inoculados con la cepa Bm 133 y Bm A fueron similares ( $446.1 \pm 36.57$  mg y  $396.53 \pm 54.5$  mg, respectivamente;  $P > 0.05$ ). El peso de los bazos de estos dos grupos fue 2.16 veces mayor que el peso de los bazos de los grupos inoculados con la cepa Bm Rev 1 y Bm AC ( $P < 0.001$ ). Después de 60 días de infección, el peso de los bazos de los grupos inoculados con las cepas Bm A y Bm AC tuvieron valores similares ( $P > 0.05$ ), indicando por tanto patrones similares de inflamación durante la infección tardía *in*

*vivo*. Mientras tanto, la esplenomegalia causada por la cepa Bm 133 fue 1.96 veces mayor a la producida por las cepas Bm A y Bm AC ( $P < 0.001$ ) y 2.74 veces mayor a la producida por la cepa Bm Rev 1 ( $P < 0.001$ ). Finalmente, a los 90 días pi, la esplenomegalia causada por la cepa Bm 133 fue 1.96 veces mayor que la causada por las cepas Bm A, Bm AC y Bm Rev 1 ( $P < 0.001$ ).

**Cuadro 2.** Peso de los bazos de los diferentes grupos de inoculación a diferentes días pi.

Grupos de Inoculación.					
DPI	Bm 133	Bm 133 <i>invA</i> -km	Bm 133 <i>invA</i> -km <sup>c</sup>	Bm Rev 1	Control <sup>a)</sup>
7	126.78 ± 8.87	160.38 ± 49.25	161.15 ± 14.6	108.22 ± 44.33	115.93 ± 43.22
15 <sup>b)</sup>	497 ± 20.35	587.37 ± 14.8	276 ± 45.34	266.23 ± 52.99	106.3 ± 3.08
30 <sup>c)</sup>	446.1 ± 36.57	396.53 ± 54.5	188.29 ± 33.52	210.03 ± 37.77	107.55 ± 4.93
60 <sup>d)</sup>	431.87 ± 64.96	220.97 ± 22.05	217.63 ± 40.69	157.78 ± 16.09	111.7 ± 14.24
90 <sup>e)</sup>	352.2 ± 101.37	214.03 ± 40.93	181.68 ± 49.88	140.9 ± 6.79	110.93 ± 8.15

El peso del bazo fue obtenido a diferentes días pi (DPI). La peso esta determinado en miligramos ± desviación estándar.

- El grupo control demostró pesos de los bazos similares durante todo el experimento. Desde los 15 DPI hasta la finalización del experimento el grupo control fue significativamente menor al resto de los grupos inoculados ( $P < 0.001$ ).
- A los 15 DPI los grupos inoculados con Bm Rev 1 y Bm AC exhibieron similares pesos del bazo ( $P > 0.05$ ) y fueron significativamente menores que el peso de los bazos de los grupos inoculados con las cepas Bm 133 y Bm A ( $P < 0.001$ ). Adicionalmente, los pesos de los grupos inoculados con las cepas Bm 133 y Bm A fueron significativamente diferentes ( $P < 0.001$ ).
- El grupo inoculado con la cepa Bm 133 y el de la cepa Bm A exhibieron pesos del bazo similares a los 30 DPI y fueron significativamente mayores a los observados en los grupos inoculados con Bm Rev 1 y Bm AC ( $P < 0.001$ ). No hubo diferencia significativa entre estos últimos dos grupos ( $P > 0.05$ ).
- El grupo inoculado con la cepa Bm 133 tuvo la mayor esplenomegalia a los 60 DPI ( $P < 0.001$ ). Los grupos inoculados con las cepas Bm A y Bm AC tuvieron pesos del bazo similares ( $P > 0.05$ ) que fueron mayores al peso del bazo del grupo inoculado con Bm Rev 1 ( $P < 0.001$ ).
- El grupo inoculado con la cepa Bm 133 tuvo la mayor esplenomegalia a los 90 DPI ( $P < 0.001$ ) comparado con los otros grupos inoculados.

Los resultados de la infección *in vivo* en los ratones BALB/c demuestran que la cepa Bm A fue menos virulenta que la cepa Bm 133, aunque la colonización del bazo y la esplenomegalia indican que la atenuación no fue de la misma magnitud que la observada en el grupo inoculado con la cepa Bm Rev 1. Relacionado con los resultados *in vitro*, las cepas Bm A y Bm AC exhiben comportamientos similares de virulencia, indicando que la complementación fue parcial.

## 6.6 Determinación de la inmunidad humoral.

Los sueros de los diferentes grupos de ratones inoculados fueron colectados para determinar la concentración de diferentes isotipos de anticuerpos producidos a diferentes tiempos pi, durante el ensayo de virulencia residual (Fig. 6 paneles A a E). Durante la infección *in vivo* se detectó un incremento progresivo general de todos los anticuerpos durante los primeros 30 días pi. Posteriormente, en general los títulos de anticuerpos de IgG2b disminuyeron (Fig. 6C), mientras que los títulos de IgG1 (Fig. 6A), IgG2a (Fig. 6B) e IgG3 (Fig. 6D) se mantuvieron relativamente constantes hasta los 90 días pi. La cinética de producción de IgM para todos los grupos inoculados fue de títulos altos entre los 30 y 60 días pi (mayores a 0.370 en comparación con 0.055 del grupo control), para posteriormente disminuir a los 90 días pi (en promedio 0.309 en comparación con 0.090 del grupo control, Fig. 6E).

Durante los primeros 7 días pi el grupo inoculado con la cepa Bm 133 tuvo títulos de IgM que superaron los títulos de los diferentes subtipos de IgG ( $0.159 \pm 0.082$ , Fig. 6E); sin embargo, los títulos de IgG2b ( $0.110 \pm 0.018$ , Fig. 6C) y de IgG3 ( $0.036 \pm 0.021$ , Fig. 6D) fueron también perceptibles durante el mismo periodo. El incremento de los niveles de IgM para el grupo inoculado con la cepa Bm 133 fue constante hasta los 60 días pi. En comparación con el grupo inoculado con la cepa Bm A, el título de IgM fue significativamente mayor al título producido por la cepa Bm 133 a los 30 días pi ( $0.436 \pm 0.03$  contra  $0.270 \pm 0.024$ , respectivamente;  $P < 0.001$ ). Las diferencias entre las concentraciones de IgG3 entre el grupo inoculado con la cepa Bm 133 y Bm A fueron notables a los 30 días pi; los títulos del grupo inoculado con la cepa Bm 133 fueron 1.3 veces mayores a los producidos por la cepa Bm A ( $P < 0.001$ , Fig 6D). Es de llamar la atención que el grupo inoculado con la cepa Bm Rev 1 tuvo títulos de IgG1, IgG2a, IgG3 e IgM similares a los producidos por la cepa Bm A a los 30 días pi, indicando por tanto una respuesta inmune similar durante el primer mes de infección.

En general, los títulos de IgG2b fueron mayores a los del subtipo IgG2a durante los primeros 15 días pi, posteriormente a los 60 y 90 días pi los niveles de IgG2a

superaron los de IgG2b (Fig. 6B y 6C). Si se comparan los títulos de IgG2b entre los grupos inoculados con las cepas Bm A y Bm 133 se puede observar que la cepa Bm 133 produjo concentraciones significativamente mayores a los 7 ( $0.110 \pm 0.018$  contra  $0.008 \pm 0.005$ ,  $P < 0.001$ ), 30 ( $0.280 \pm 0.043$  contra  $0.105 \pm 0.027$ ,  $P < 0.001$ ) y 90 ( $0.175 \pm 0.138$  contra  $0.045 \pm 0.013$ ,  $P < 0.05$ ) días pi (Fig. 6C). En contraste, los títulos de IgG2a no varían entre los grupos inoculados con Bm 133 y Bm A, a excepción de los 30 días pi en donde el título de IgG2a del grupo de la cepa Bm A fue 5.28 veces mayor al producido por la cepa Bm 133 ( $P < 0.001$ , Fig 6B). Estos datos pueden indicar, por tanto, que la respuesta humoral fue considerablemente mayor en el grupo inoculado con la cepa Bm 133 que la producida por la cepa Bm A. Sin embargo, los títulos de IgG2a del grupo inoculado con la cepa Bm A mostraron una estimulación humoral constante después de los 30 días pi hasta el final del experimento (en promedio 0.144 en comparación con 0.013 del grupo control, Fig 6B).

Por otro lado, el título de IgG1 fue marcadamente menor a los títulos de IgG2a e IgG2b en todos los grupos inoculados, con algunas excepciones (Fig 6A). De los 30 a los 60 días pi los niveles de anticuerpos de IgG1 fueron constantes y similares entre los grupos inoculados con la cepa Bm 133 y Bm A. A los 90 días pi un ligero aumento en el título de IgG1 del grupo inculado con la cepa Bm 133 fue significativamente mayor al producido por la cepa Bm A ( $0.119 \pm 0.031$  contra  $0.032 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 6A).

Los anticuerpos IgG2a e IgG2b son marcadores de una respuesta inmune del tipo Th1. Estos son producidos para promover la fagocitosis por macrófagos y en consecuencia a la síntesis de IFN- $\gamma$  e IL-12.<sup>185,186</sup> En contraste, el anticuerpo IgG1 es un marcador típico de la respuesta inmune tipo Th2, la cual es característica de una respuesta inmunosupresora.<sup>50</sup> En general los grupos inoculados con las cepas Bm 133 y Bm A mostraron títulos de IgG2b e IgG2a dominantes sobre los títulos de IgG1, indicando por tanto una respuesta inmune del tipo Th1 en la infección *in vivo*. Por otro lado, los títulos de IgG2a e IgG2b del grupo inoculado con la cepa Bm AC muestran que fueron similares con los títulos del grupo inoculado con la cepa Bm A, a excepción del título de IgG2a a los 30 días pi, en donde el título de

IgG2a fue 3.25 veces mayor que el de Bm AC ( $P < 0.001$ ). Adicionalmente, no hubo diferencias entre los títulos de IgG2a entre los grupos inoculados con las cepas Bm 133 y Bm AC (Fig. 6B). El título de IgG2b varió únicamente entre estos dos grupos a los 30 y 90 días pi. A los 30 días la concentración de IgG2b producida por la infección con Bm 133 fue 2.2 veces mayor que la producida por Bm AC ( $P < 0.001$ ), mientras que a los 90 días el título detectado para el grupo inoculado con Bm 133 fue 7.3 veces mayor que el título del grupo inoculado con Bm AC ( $P < 0.001$ ). Estos resultados muestran la inestabilidad *in vivo* del plásmido, como se ha descrito anteriormente.<sup>187</sup>

Comparado con el grupo inoculado con la cepa Bm Rev 1, el grupo inoculado con la cepa Bm A exhibió niveles de IgG1 e IgG2a similares después de los 30 días pi ( $P > 0.05$ , Fig. 6A y 6B). Aunque también presentó títulos semejantes de IgG3 e IgM, a los 90 días pi el título de IgG3 del grupo inoculado con Bm A fue significativamente mayor ( $0.230 \pm 0.079$  contra  $0.148 \pm 0.055$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 6D), mientras que en el mismo periodo de tiempo el título de IgM fue significativamente menor ( $0.267 \pm 0.029$  contra  $0.380 \pm 0.006$ ,  $P < 0.001$ , Fig 6E). En contraste, el título de IgG2b de ambos grupos inculados (Bm A y Bm Rev 1) fue significativamente diferente desde el primer muestreo hasta los 60 días pi. Durante los primeros dos muestreos los títulos de IgG2b fueron mayores para Bm Rev 1 ( $0.084 \pm 0.031$  contra  $0.008 \pm 0.005$ ,  $P < 0.05$  a los 7 días pi y  $0.145 \pm 0.010$  contra  $0.073 \pm 0.02$ ,  $P < 0.001$  a los 15 días pi; Fig 6C). Esta condición se invirtió en los siguientes dos muestros, presentando un mayor título el grupo inoculado con la cepa Bm A ( $0.105 \pm 0.027$  contra  $0.073 \pm 0.009$ ,  $P < 0.05$  a los 30 días pi y  $0.042 \pm 0.017$  contra  $0.028 \pm 0.003$ ,  $P < 0.05$  a los 60 días pi; Fig 6C) . A los 90 días, el título de IgG2b fue similar para ambos grupos de inoculación ( $P > 0.05$ , Fig 6C).

Finalmente, se puede concluir que la respuesta inmune humoral fue mediada principalmente por los anticuerpos IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM. Los anticuerpos IgGM e IgG2b fueron evidentes desde la primera semana pi, hasta disminuir progresivamente después de 30 días pi, aunque los títulos de IgM permanecieron relativamente elevados hasta los 90 días pi. IgG3 fue generalmente perceptible a

los 15 días pi, después los títulos de este anticuerpo se mantuvieron altos hasta el final del experimento. En cuanto a la proporción de IgG2a e IgG2b comparada con IgG1 se mostró que todos los grupos de inoculación tuvieron títulos de IgG2a o IgG2b superiores a IgG1 durante todo el experimento. El perfil de anticuerpos producido por la infección de los ratones con Bm AC fue diferente a la infección con Bm 133, indicando inestabilidad plasmídica *in vivo*. Las particularidades de respuesta humoral para la inoculación con las cepas Bm A y Bm Rev 1 pueden explicar una eficiente respuesta inmune, en comparación con la inoculación con Bm 133.

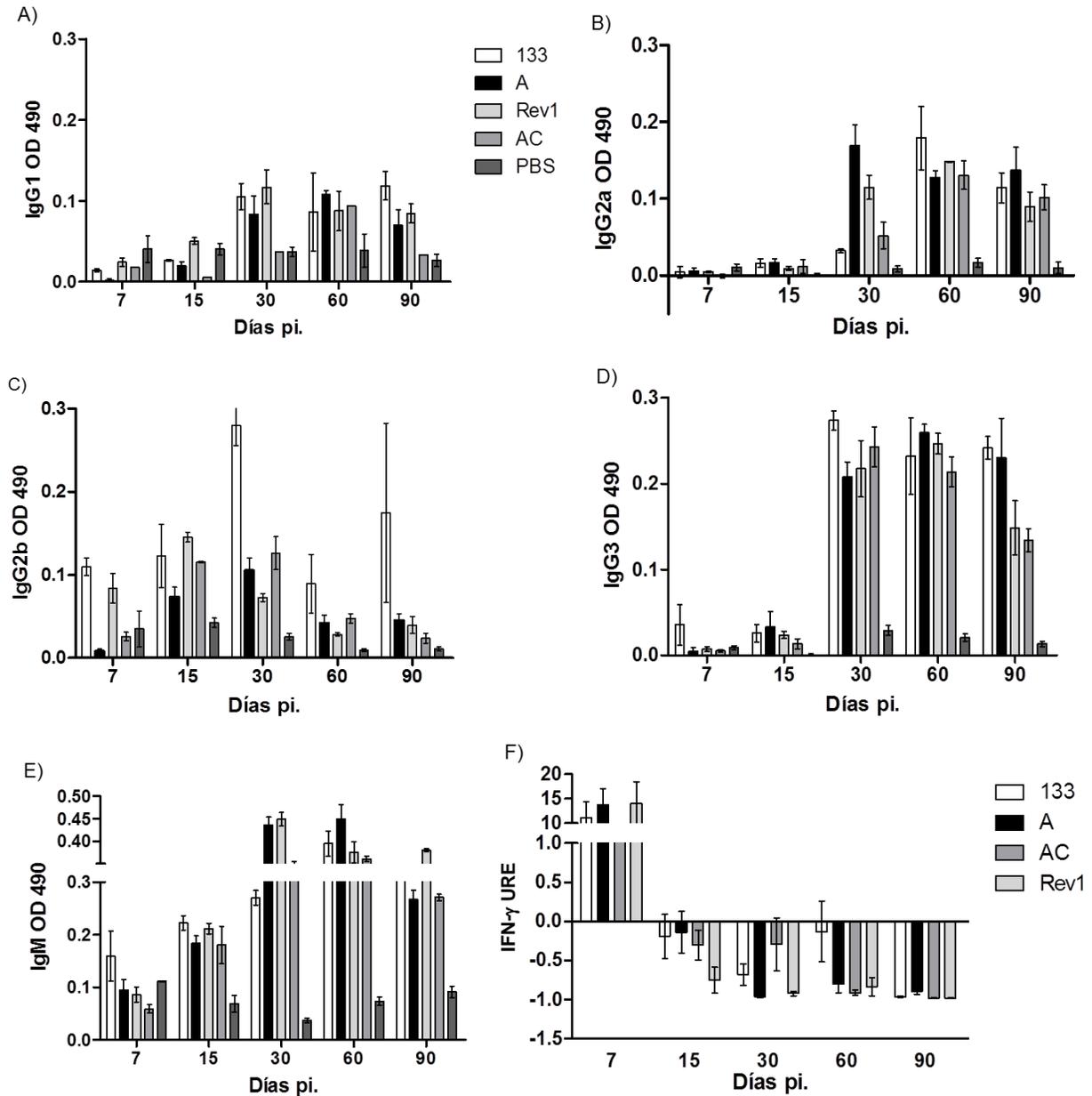


Figura 6. Respuesta inmune en los grupos de ratones infectados. Los paneles A a E corresponden a la respuesta humoral. Los resultados están expresados como el promedio de la lectura O.D. 490  $\pm$  desviación estándar a diferentes tiempos pi. Panel A: resultados de la concentración de IgG1, panel B: IgG2a, panel C: IgG2b, panel D: IgG3 y panel E: IgM. El panel F corresponde al nivel de transcripción de IFN- $\gamma$ , medido a través de Unidades Relativas de Expresión (URE)  $\pm$  desviación estándar comparado con el grupo control (sin estimular). La expresión de IFN- $\gamma$  fue normalizada usando la transcripción de  $\beta$ -actina.

## 6.7 Determinación de la expresión de IFN- $\gamma$ .

Las muestras de ARN fueron obtenidas a partir de la sangre de los diferentes grupos de ratones durante el experimento de virulencia residual. La determinación del nivel de expresión de IFN- $\gamma$  se realizó por PCR en tiempo real (qPCR, Fig. 6F). Como se puede observar, la transcripción de IFN- $\gamma$  fue promovida durante la primera semana pi para todos los grupos inoculados. No hubo diferencia en la transcripción de IFN- $\gamma$  entre los grupos inoculados con las cepas Bm 133, Bm A y Rev 1, indicando una polarización de la respuesta inmune del tipo Th1 para estos grupos. Después de la primera semana pi, la transcripción de IFN- $\gamma$  fue inhibida, indicando probablemente que otras citocinas están participando durante la infección *in vivo*.

## 7. Discusión.

Las hidrolasas NUDIX se han descrito tanto en procariotas, eucariotas y en virus. Están implicadas en varias funciones que incluyen el procesamiento del RNA, procesos metabólicos, detoxificación genética y patogénesis bacteriana.<sup>161</sup> La participación de estas enzimas en la invasión bacteriana ha sido demostrada en la funcionalidad de las proteínas YgdP de *E. coli*,<sup>147</sup> IalA de *B. bacilliformis*<sup>160</sup> e invA de *R. prowazekii*.<sup>159</sup> El objetivo principal de este trabajo fue determinar la participación del gen BMEI0215 con características de hidrolasa NUDIX en la virulencia de *B. melitensis*. Los resultados de invasión y sobrevivencia intracelular en el ensayo de infección sobre las células HeLa demostraron que la sobrevivencia de *B. melitensis* invA-km fue significativamente comprometida a las 2 h pi, indicando una incapacidad de la cepa mutante de sobrevivir durante la primera etapa de invasión. Adicionalmente, los resultados de sobrevivencia y replicación intracelular en el modelo de infección de los macrófagos caprinos revelaron una considerable disminución en la concentración intracelular de la cepa mutante (Bm A) a las 24 h pi, lo que fue 81% menor que la concentración de las cepas virulentas (Bm 16M y Bm 133). Sin embargo a las 48 h pi no se observaron

diferencias significativas entre la concentración de la cepa mutante y las cepas virulentas, indicando que la cepa mutante recuperó cierta capacidad de replicación intracelular. Los resultados de colocalización de catepsina D revelaron que no hubo diferencia significativa a las 24 h pi entre la cepa mutante y las cepas virulentas. En contraste, el porcentaje de positividad de calregulina para la cepa mutante fue menor al porcentaje obtenido por la cepa parental en el mismo tiempo pi (24 h), indicando una menor multiplicación intracelular de la cepa mutante que no necesariamente se correlacionó con destrucción intracelular (resultados de catepsina D). Estos hallazgos demuestran que la mutación del gen *invA* restringe la multiplicación intracelular a las 24 h pi. Sin embargo, a las 48 h pi, la concentración intracelular de la cepa mutante aumentó, la multiplicación bacteriana fue similar a la detectada por las cepas parental y de referencia (Bm 16M). Esta observación puede indicar una multiplicación intracelular retardada de la cepa mutante a las 24 h pi, que sin embargo alcanza los mismos niveles de multiplicación intracelular a las 48 h pi de las cepas virulentas. Este fenómeno se ha observado para otros factores de virulencia descritos en *Brucella*. En *B. abortus* la cepa mutante del gen *pncA*, que produce la enzima nicotinamidasa, no logra sobrevivir o multiplicarse en macrófagos al mismo nivel que la cepa parental; sin embargo a las 48 h pi alcanza los mismos niveles de multiplicación intracelular que la cepa parental. Por otro lado, al igual que la cepa mutante del gen *invA*, la cepa mutante del gen *pncA* de *B. abortus* mantiene los mismos niveles de colocalización de LAMP1 que la cepa parental, sugiriendo por tanto que este gen no interviene en el tránsito endocítico de las BCV.<sup>188</sup> En otro estudio, Del Giudice et al. (2013) demostraron que la mutación de la proteína SagA (con características de neuroaminidasa) de *B. abortus* producía un defecto en la exclusión de marcadores LAMP1, pero no en la adquisición de marcadores del RE. Además, al igual que los resultados de la multiplicación y sobrevivencia intracelular de la cepa mutante del gen *invA* en macrófagos, la cepa mutante de SagA no fue capaz de sobrevivir en las mismas condiciones que la cepa parental a las 24 h en el modelo de infección de células HeLa, sin embargo a las 48 h pi mostró los mismos niveles de replicación intracelular que la cepa parental.<sup>189</sup> Aunado a estas evidencias en la

virulencia de *Brucella*, Edelstein et al. (2005) demostraron que la mutación del gen *nudA* (NUDIX) de *L. pneumophila* produjo una disminución significativa en la multiplicación intracelular de macrófagos de cobayo después de 2 días pi, sin embargo la virulencia se restauró al 3º día pi.<sup>148</sup> Es probable que el gen *invA* de *B. melitensis* restaure los niveles homeostáticos de alarmonas, lo cual indirectamente promueve la invasión. Al igual que la mutación del gen *sagA*,<sup>189</sup> la mutación del gen *invA* de *B. melitensis* produjo una disminución en la concentración bacteriana en la primera etapa de la infección (invasión); sin embargo, no fue determinante en el establecimiento de la misma. Este hallazgo indica que, aunque el gen *invA* es importante en el enfrentamiento de las condiciones adversas intracelulares, *Brucella* spp posee múltiples mecanismos con funciones similares para la adaptación al estrés intracelular. La redundancia funcional genética en la detoxificación de *B. melitensis* indica que esta especie usa múltiples mecanismos para evadir la destrucción intracelular. Como se mencionó en la introducción, estos mecanismos incluyen a las proteínas AhpC (reductasa de alquil-hidroperóxido), Kat E (catalasa), transcripción de HSPs (*dnaK*, *groEL*, *clpB*) así como muchos otros. Consecuentemente, la funcionalidad del gen *invA* puede representar un mecanismo más que promueve la invasión en condiciones en las cuales esta especie se ha adaptado, y por lo tanto la mutación no afecta de manera significativa la replicación intracelular *in vitro*. Por otro lado, será necesaria la caracterización bioquímica de la enzima para determinar la especificidad del sustrato de InvA de *B. melitensis* y conocer las alarmonas específicas que se expresan en la etapa de invasión.

En contraste con los resultados de infección *in vitro*, la mutación de *invA* en *B. melitensis* resultó en atenuación *in vivo*. A los 15 días pi, la concentración de la cepa mutante en bazo fue menor a la concentración bacteriana de la cepa parental. Por otra parte, el grupo inoculado con la cepa mutante tuvo altos niveles de colonización bacteriana en el bazo comparados con la concentración bacteriana en los ratones infectados con la cepa vacunal (Bm Rev 1) y la cepa complementada (Bm AC). A partir de los 30 días pi la concentración de la cepa mutante disminuyó a niveles similares a la cepa vacunal, mientras que la cepa

parental mantuvo niveles de colonización del bazo altos. La esplenomegalia como signo de inflamación puede indicar colonización bacteriana, tal como sucedió con el grupo inoculado con la cepa parental (cuadro 2). Una disminución constante en la concentración bacteriana sugiere control de la infección (Fig. 5). Si podemos relacionar la baja concentración bacteriana con una eficiente respuesta inmune, es claro que el control inmunológico en el grupo inoculado con la cepa mutante fue más efectivo que el observado en el grupo inoculado con la cepa parental.

La respuesta inmune contra *Brucella* principalmente es mediada por una respuesta del tipo Th1.<sup>50</sup> La respuesta humoral, medida a través de algunos isotipos de anticuerpos por ELISA, en general sugiere este tipo de respuesta, ya que los títulos de IgG2a e IgG2b fueron predominantes sobre el título de IgG1 (Fig. 6). Las principales diferencias en los títulos de anticuerpos entre el grupo de la cepa parental y el de la cepa mutante se pueden observar a los 30 días pi; posterior a este punto las diferencias son mínimas. Es importante recalcar que la cepa parental produjo una respuesta inmune humoral más temprana en comparación con los otros grupos de inoculación, como lo evidencia la concentración de IgG2b, IgG3 e IgGM a los 7 días pi (Fig. 6). Se ha demostrado que en el control de especies atenuadas de *Brucella* la opsonización de IgG3 es más efectiva que el control humoral por IgM, mientras que este último juega un papel muy importante en la opsonización de especies virulentas en la fase aguda de la enfermedad.<sup>190</sup> De hecho, la opsonización por IgM de las especies de *Brucella* virulentas no contribuye significativamente a la destrucción intracelular, mientras que los diferentes subtipos de IgG están relacionados al control de la infección, siendo IgG3 el anticuerpo más representativo.<sup>50</sup> Esto podría explicar que un mayor título de anticuerpos (principalmente IgM) en el grupo inoculado con la cepa parental a los 7 días pi este relacionado con una mayor fagocitosis, y por tanto una mayor colonización en bazo, mientras que el aumento de IgG3 posterior a los 15 días pi este relacionado con la disminución de la colonización de la cepa mutante en bazo (Fig. 5). Al analizar los niveles de IgG1 se encontró que estos empiezan a ser evidentes desde los 30 días pi. La presentación de antígenos de *Brucella* posterior a la opsonización de IgG1 promueve la síntesis de IL-4 e IL-10,

por lo que se favorece una respuesta Th2.<sup>50</sup> Es por ello que una respuesta inmune anti-inflamatoria empieza a ser evidente posterior a los 30 días pi, registrando menores pesos del bazo para los grupos inoculados con las cepas parental, mutante y vacunal (cuadro 2). En contraste, la inoculación con la cepa mutante complementada produjo niveles de IgG1 similares a los del grupo control a los 30 y 90 días pi (Fig 6A), lo que se relaciona con una esplenomegalia constante. En cuanto al grupo inoculado con la cepa Bm Rev 1, los niveles de IgG1e IgG2a fueron similares a los producidos por la cepa mutante. Esto indica una respuesta humoral similar entre estas dos cepas.

La citocina representativa de la respuesta Th1 es IFN- $\gamma$ , y es crucial para activar la acción bactericida específica de los macrófagos en contra de *Brucella* spp.<sup>50</sup> Tal como se puede observar en la figura 6F, la transcripción de IFN- $\gamma$  fue promovida durante la primera semana pi para todos los grupos de inoculación. Después de 7 días pi, no hubo evidencia de transcripción de esta citocina en sangre. Esto sugiere que el control de *B. melitensis* es mediado por otras citocinas después de la primera semana de infección. Además de IFN- $\gamma$ , las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-2 son citocinas pro-inflamatorias que participan en la respuesta Th1 de ratones BALB/c.<sup>90</sup> Es probable que niveles de transcripción elevados de TNF- $\alpha$  e IL-2, así como de otras citocinas, pudieran enmascarar la transcripción de IFN- $\gamma$  después de la primera semana pi. Sin embargo, es claro que no hubo diferencia en la transcripción de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos inoculados en la primera semana pi, sugiriendo por tanto que la mutación del gen *invA* produce una respuesta inmune celular similar a la producida por la cepa parental al inicio de la infección.

La atenuación *in vivo* de la cepa mutante puede estar relacionada con la destrucción intracelular durante el proceso de invasión y, consecuentemente, a la presentación de antígenos.

Los resultados de la cepa mutante complementada (133 *invA*-km<sup>C</sup>), de los diferentes experimentos que se realizaron en esta tesis indicaron que una restauración completa de la virulencia (a niveles similares a la cepa parental) no fue posible. La complementación genética de *Brucella in trans* con el uso de la familia de plásmidos pBBR1MCS (plásmidos de moderado número de copias), ha

probado una restauración incompleta de la virulencia tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>144,187,191</sup> En el modelo de macrófagos de cabra, la sobrevivencia intracelular y la replicación de la cepa mutante complementada fue menor aún que la cepa mutante (Fig. 3). Este mismo fenómeno fue observado con la complementación de cepas mutantes de los genes de las OMP's en *B. ovis* por Caro-Hernández et al. (2007). Ellos observaron que las cepas mutantes complementadas fueron más susceptibles que las cepas mutantes al peróxido de hidrógeno, suero de carnero no inmune y algunas drogas. Además, la expresión de estas OMP's en las cepas mutantes complementadas no fueron similares a la expresión de estas proteínas en la cepa parental. Este hecho explica el porqué las cepas mutantes complementadas son más susceptibles a los factores descritos anteriormente, sugiriendo que cierto nivel de expresión de estas proteínas es necesario para mantener la integridad membranal.<sup>191</sup> Adicionalmente, se reportó que la complementación genética del gen *nudA* en la cepa mutante de *L. pneumophila*, así como la complementación del gen *invA* de *R. prowazekii* en su respectiva mutante, no restauraron la capacidad invasiva en los mismos niveles que sus respectivas cepas parentales. Esto fue atribuido principalmente a la baja producción y efectividad de estas enzimas.<sup>148,159</sup> Analizando el origen de la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km, la mutación fue creada interrumpiendo el gen con la inserción del gen de resistencia a kanamicina, proveniente del plásmido sin promotor pSUR411. Es por ello que un efecto polar en genes corriente abajo sea improbable. El uso de pBBR4MCS para la complementación genética de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km, así como una probable baja producción y transcripción del plásmido resultó en una restauración fenotípica incompleta. La determinación de la expresión de InvA en la cepa de *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> será importante para poder determinar si la complementación parcial fue debida a una expresión disminuida de la proteína.

## 8. Conclusiones.

1. Esta tesis demuestra que el gen *invA* de *B. melitensis* es determinante para la invasión intracelular y la adaptación, sin embargo no es necesario para la replicación intracelular.
2. Los resultados de la infección *in vivo* sugieren que el gen *invA* es requerido para una virulencia completa de *B. melitensis* en el modelo de infección murino. La mutación del gen *invA* produce una respuesta inmune humoral diferente a la provocada por la infección con la cepa parental, aunque una transcripción de IFN- $\gamma$  similar durante la primera semana pi.
3. El control de la infección alcanzó la mayor efectividad a los 30 días pi, en donde se observa la disminución significativa de la colonización del bazo aunado a un aumento considerable del título de anticuerpos.
4. La capacidad de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km de producir una infección atenuada en el modelo murino, plantea la hipótesis de que esta cepa pueda ser utilizada en trabajos subsecuentes como un nuevo inmunógeno.
5. La complementación genética de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km fue parcial, y pudo ser debida al uso del plásmido pBBR4MCS, así como a una baja transcripción y producción de InvA.

## 9. Perspectivas.

1. Los resultados de la determinación de inmunidad celular en la infección con las diferentes cepas no permitieron conocer completamente la producción de citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. La determinación de IL-12, IL-2, IL-10 e IL-4, aunado al conocimiento de IFN- $\gamma$  ampliarán el panorama de la respuesta inmune adaptativa.
2. Los resultados muestran una atenuación *in vivo* de la cepa mutante *B. melitensis* 133 *invA*-km, además de una inmunogenicidad comparable con la cepa *B. melitensis* Rev 1, por lo que un experimento de protección al desafío podría evidenciar el grado de protección que puede conferir la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km.
3. La importancia de las alarmonas en la virulencia de especies bacterianas patógenas ha quedado demostrada. Será importante determinar el tipo de alarmonas que son metabolizadas por InvA en *B. melitensis*, así como determinar el patrón de expresión de esta enzima en diferentes etapas de infección intracelular.
4. Los diferentes resultados de la cepa *B. melitensis* 133 *invA*-km<sup>C</sup> demostraron una complementación parcial. La utilización de otro plásmido diferente a pBBR4MCS para complementar puede proveer de una complementación total y determinar el nivel de producción de InvA en la cepa mutante complementada.

## 10. Anexo 1. Artículo publicado.

Virulence 5:4, 1–17, May 15, 2014, © 2014 Landes Bioscience

RESEARCH PAPER

## The *invA* gene of *Brucella melitensis* is involved in intracellular invasion and is required to establish infection in a mouse model

Jorge Alva-Pérez<sup>1</sup>, Beatriz Arellano-Reynoso<sup>1</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>2</sup>, and Francisco Suárez-Guemes<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico DF, Mexico;<sup>2</sup>Department of Ecology of Pathogen Agents, General Hospital "Dr. Manuel Gea González", National Health Department, Mexico DF, Mexico**Keywords:** *Brucella melitensis*, invasion, NUDIX enzyme gene, intracellular replication, strain attenuation**Abbreviations:** NUDIX, (di)nucleoside oligophosphate molecules linked to other "X" molecules; pi, post-infection; BCV, *Brucella*-containing-vacuole; Bm, *Brucella melitensis*; CFU, colony-forming units

Some of the mechanisms underlying the invasion and intracellular survival of *B. melitensis* are still unknown, including the role of a subfamily of NUDIX enzymes, which have been described in other bacterial species as invasins and are present in *Brucella* spp. We have generated a mutation in the coding gene of one of these proteins, the *invA* gene (BMEI0215) of *B. melitensis* strain 133, to understand its role in virulence. HeLa cell invasion results showed that mutant strain survival was decreased 5-fold compared with that of the parental strain at 2 h pi ( $P < 0.001$ ). In a goat macrophage infection assay, mutant strain replication was 8-fold less than in the parental strain at 24 h pi ( $P < 0.001$ ); yet, at 48 h pi, no significant differences in intracellular replication were observed. Additionally, colocalization of the *invA* mutant with calregulin was significantly lower at 24 h pi compared with that of the parental strain. Furthermore, the mutant strain exhibited a low level of colocalization with cathepsin D, which was similar to the parental strain colocalization at 24 h pi. In vivo infection results demonstrated that spleen colonization was significantly lower with the mutant than with the parental strain. The immune response, measured in terms of antibody switching and IFN- $\gamma$  transcription, was similar for Rev1 and infection with the mutant, although it was lower than the immune response elicited by the parental strain. Consequently, these results indicate that the *invA* gene is important during invasion but not for intracellular replication. Additionally, mutation of the *invA* gene results in in vivo attenuation.

### Introduction

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease that is mainly distributed in undeveloped countries. In animals, infection with the causative bacterium leads to reproductive problems, abortion and lesions in a variety of tissues, resulting in chronic illness.<sup>1</sup> Brucellosis caused by *B. melitensis* is controlled in animals by the Rev1 vaccine.<sup>2</sup> The *Brucella* genus lacks classical virulence mechanisms, and its metabolism is closely linked to its intracellular lifestyle.<sup>3</sup> *B. melitensis* combats the harsh intracellular environment by transcribing several genetic factors in order to inhibit intracellular destruction and promote bacterial multiplication.<sup>4–6</sup> It has been demonstrated that *Brucella* is capable of modulating the transcription of metabolic genes (for processes such as carbon, nitrogen and lipid metabolism) depending on the environmental conditions.<sup>7</sup> A crucial step for intracellular survival is the invasion process, during which *Brucella* spp. must deal with oxidative and nutrient stress.<sup>6,8</sup> A metabolic shift known as the stringent response occurs under nutrient starvation during the invasion process and is characterized by inhibition of RNA and

ribosomal protein synthesis.<sup>9</sup> These conditions raise the intracellular concentration of recognized molecules known as alarmones (oligophosphate nucleotides). This increase in alarmone concentration is interpreted by the cell as a signal alerting the cell to prepare for a stress adaptation with a transcriptional change.<sup>10,11</sup> Although initially beneficial, the accumulation of alarmones can also be detrimental to cells.<sup>12,13</sup> To inhibit the toxic effects of alarmone accumulation, a special subfamily of NUDIX enzymes can hydrolyze these oligophosphates. The NUDIX enzymes are a diverse family of enzymes that act on (di)nucleoside oligophosphate molecules linked to other "X" molecules.<sup>14</sup> These enzymes have been described in *R. prowazekii*,<sup>15</sup> *E. coli*,<sup>16</sup> *L. pneumophila*,<sup>17</sup> *S. Typhimurium*,<sup>18</sup> and *B. bacilliformis*.<sup>19</sup> The exact link between the transcription of these enzymes and their role in virulence is not fully understood; however, they may act to reduce stress-induced alarmone levels, promoting invasion and intracellular survival.<sup>15,19</sup>

In the *B. melitensis* genome, the BMEI0215 (*invA*) gene has phosphate nucleoside hydrolase characteristics. In an amino acid analysis, the *Brucella melitensis invA* gene had 52% similarity to

\*Correspondence to: Francisco Suárez-Guemes; Email: fsg@unam.mx  
Submitted: 10/04/2013; Revised: 03/12/2014; Accepted: 03/18/2014  
<http://dx.doi.org/10.1161/viru.2014.05.001>

## 11. Referencias

1. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Brucelosis en los Animales.
2. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación Actual de la Brucelosis en México. 2014. Disponible en URL: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>.
3. Secretaría de Salud. Servicio Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Epidemiológico. 2014; 31 (13). Disponible en URL: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/completo/sem13.pdf>.
4. Corbel MJ. Brucellosis in humans and animals. Genova, Suiza: World Health Organization; 2006.
5. Cherwonogrodzky JW. Medical countermeasures, protection and treatment, against the *Brucella* species. J Bioterr Biodef. 2013;(S3). Disponible en URL: 10.4172/2157-2526.S3-012.
6. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Med. 2011;102(2):118–131.
7. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E V. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2006;6(2):91–99.
8. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis. 1997;3(2):213–221.
9. Garrity George, Bell Julia, Lilburn Timothy. Family III. *Brucellaceae*. En: Garrity. G, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume II. The Proteobacteria. Part C The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonbacteria. 2<sup>a</sup> Edición. Nueva York, EU: Springer Science; 2005:370–385.
10. Eisenberg T, Hamann H-P, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschock M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. Appl Environ Microbiol. 2012;78(10):3753–3755.

11. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse H-J, Kumar De B. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(Pt 4):801–808.
12. Von Bargen K, Gorvel J-P, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):533–562.
13. Moriyón I, López-Goñi I. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. En: Díaz-Aparicio E, Hernández L, Valero G, Arellano-Reynoso B, editores. *Diagnóstico de brucelosis animal.* México: INIFAP; 2000.
14. Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard JC, Gorvel JP. Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.* 2006;8(3):401–413.
15. Moriyón I, López-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol.* 1998;1(1):19–26.
16. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(1):60–66.
17. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ, Meikle PJ, Perry MB, Peters T. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun.* 1989;57(9):2829–2836.
18. 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. Disponible en URL: <http://www.microbialcellfactories.com/content/5/1/13>
19. Walker R. *Brucella*. En: Hirsch D, Zee C, editores. *Veterinary Microbiology.* Massachusetts: Blackwell science; 1999.
20. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* 1991;28(2):171–188.

21. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol.* 2004;186(15):5040–5051.
22. Wattam AR, Foster JT, Mane SP, Beckstrom-Sternberg S, Beckstrom-Sternberg JM, Dickerman AW, Keim P, Pearson T, Shuckla M, Ward DV, Williams KP, Sobral BW, Tsolis RM, Whatmore AM, O'Callaghan D. Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae*: a path to virulence. *J Bacteriol.* 2014;196(5):920–930.
23. He Y. Analyses of *Brucella* pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:2. Disponible en URL: <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fcimb.2012.00002/abstract>.
24. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol.* 1998;27(1):99–106.
25. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckeaert 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(Pt 11):2688–2693.
26. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckeaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse H-J, Nöckler K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58(Pt 2):375–382.
27. Sturgill DM. Comparative genome analysis of three *Brucella* spp. a data model for automated multiple genome comparison. 2003. Tesis de maestría. Virginia Polytechnic Institute and State University. 12 de Septiembre de 2003. Blacksburg , Virginia. Estados Unidos.
28. Zhong Z, Wang Y, Xu J, Chen Y, Ke Y, Zhou X, Yuan X, Zhou D, Yang Y, Yang R, Peng G, Jiang H, Yuan J, Song H, Cui B, Huang L, Chen Z. Parallel gene loss and acquisition among strains of different *Brucella* species and biovars. *J Microbiol.* 2012;50(4):567–574.

29. Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 2007;7:34. Disponible en URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/34>.
30. Carvalho Neta A V, Mol JPS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J.* 2010;184(2):146–155.
31. Corbel M. Clinical Manifestation. En: *Brucellosis in humans and animals*. Genova, Suiza: World Health Organization; 2006.
32. Alton G. *Brucella suis*. En: Nielsen K, Duncan R, editores. *Animal Brucellosis*. Boca Ratón FL: CRC Press; 2000.
33. Carmichael LE. *Brucella canis*. En: Nielsen K, Duncan R, editores. *Animal Brucellosis*. Boca Ratón FL: CRC Press; 2000.
34. Blasco JM. *Brucella ovis*. En: Nielsen K, Duncan R, editores. *Animal Brucellosis*. Boca Ratón FL: CRC Press; 2000.
35. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard J P, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. From the discovery of the Malta fever' s agent to the discovery of a marine mammal reservoir , brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 2005;36:313–326.
36. Samartino LE, Enright F. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1993;16(2): 95-101.
37. Kim S, Lee DS, Watanabe K, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M. Interferon-gamma promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol.* 2005;5:22. Disponible en URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/22>.
38. Raw W, Brown R, Stringfellow D, Schnurrenberger P, Scanlan C, Swann A. Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192(2):182–186.
39. Ficht TA. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet Microbiol.* 2003;92(3):213–23.
40. Ewalt DR, Payeur JB, Rhyan JC, Geer PL. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study. *J Vet Diagnostic Investig.* 1997;9(4):417–420.

41. Brew S, Perrett LL, Stack JA, Macmillan AP, Staunton N. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec.* 1999;144(17):483.
42. McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humhrey S, Short P, Taylor J, Swingler CE, Dawson A, Whatmore M, Stubberfield E, Perrett LL, Simmons G. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4363–4370.
43. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(4):485–488.
44. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):e12–e15.
45. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2001;32(8):1172–1177.
46. Young E. Human brucellosis. *Rev Infect Dis.* 1983;5(5):821–842.
47. Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall’Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón J. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol.* 2004;6(5):435–445.
48. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol.* 2008;129(1-2):1–14.
49. Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol.* 2006;157(2):93–98.
50. Baldwin CL, 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(5):407–442.
51. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckeaert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, López-Goñi I. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(19):12375–12380.

52. 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(1):28–33.
53. Czibener C, Ugalde JE. Identification of a unique gene cluster of *Brucella* spp. that mediates adhesion to host cells. *Microbes Infect.* 2012;14(1):79–85.
54. Fontes P, Carnaud C, Köhler S, Gross A. Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun.* 2005;73(10):6229-6236.
55. Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):281–297.
56. Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, 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(4):545–556.
57. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 2008;9(5):678–694.
58. Jiménez de Bagüés MP, Gross A, Terraza A, Dornand J. Regulation of the mitogen-activated protein kinases by *Brucella* spp. expressing a smooth and rough phenotype: relationship to pathogen invasiveness. *Infect Immun.* 2005;73(5):3178–3183.
59. Dettelleux PG, Deyoe BL, Cheville NF. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. *Infect Immun.* 1990;58(7):2320–2328.
60. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun.* 1998;66(5):2387–2392.
61. Celli J, Salcedo SP, Gorvel J-P. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(5):1673–1678.
62. Bellaire BH, Roop II M, Cardelli JA. Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes *Infect Immun.* 2005;73(6):3702-3713.

63. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 2005;6(6):618–625.
64. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charchon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):341–348.
65. De Barsy M, Mirabella A, Letesson JJ, De Bolle X. A *Brucella abortus* *cstA* mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells. *Microbiology.* 2012;158(Pt 10):2610–2618.
66. De Barsy M, Jamet A, Filopon D, Nicolas C, Laloux G, Rual JF, Muller A, Twizere JC, Nkengfac B, Vandenhautte J, Hill DE, Salcedo SP, Gorvel JP, Letesson JJ, De Bolle X. Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol.* 2011;13(7):1044–1058.
67. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 2001;3(1):43–48.
68. Grilló M J, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res.* 2012;Apr13;43:29. Disponible en URL: <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/29>.
69. Vitry MA, De Trez C, Goriely S, Dumoutier L, Akira S, Ryffel B, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. Crucial role of gamma interferon-producing CD4+ Th1 cells but dispensable function of CD8+ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect Immun.* 2012;80(12):4271–4280.
70. Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Gomez G, Rice-Ficht AC. The *Brucella abortus* S19 DeltavjbR live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect Immun.* 2009;77(2):877–884.

71. Brandão APMS, Oliveira FS, Carvalho NB, Vieira LQ, Azevedo V, Macedo GC, Oliveira SC. Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN- $\gamma$  knockout than IL-12/ $\beta$ 2-microglobulin double-deficient mice. Clin Dev Immunol. 2012;2012:589494. Disponible en URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/589494/>.
72. Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Splitter GA. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. J Immunol. 2002;168(5):2433–2440.
73. Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino MV, Zwerdling A, Pasquevich KA, Samartino CG, Wallach JC, Fossati CA, Giambartolomei GH. *Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. Infect Immun. 2008;76(1):250–262.
74. Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG, Velásquez LN, Cassataro J, Giambartolomei GH. *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses. Cell Microbiol. 2012;15(4):487–502.
75. Gomes MTR, Campos PC, de Almeida LA, Oliveira FS, Costa MMS, Marim FM, Pereira GSM, Oliveira SC. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:130. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3480720>.
76. Jensen PE. Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol. 2007;8(10):1041–1048.
77. De Jong MF, Rolán HG, Tsolis RM. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. Cell Microbiol. 2010;12(9):1195–1202.
78. Sengupta D, Koblansky A, Gaines J, Brown T, West P, Zhang D, Nishikawa T, Sung-Gyoo P, Roop II M, Ghosh S. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. J Immunol. 2010;184(2):956–964.
79. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. J Immunol. 2004;173(7):4635–4642.

80. Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. MyD88-dependent activation of B220 CD11b LY-6C dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol*. 2007;178(8):5182-5191.
81. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E. *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. Disponible en URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0000631>.
82. Elzer P, Jacobson R, Nielsen K, Douglas J, Winter A. BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunol Lett*. 1994;42(3):145–150.
83. Fernández-Lago L, Monte M, Chordi A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996;15(2-3):109–114.
84. Pei J, Ding X, Fan Y, Rice-Ficht A, Ficht TA. Toll-like receptors are critical for clearance of *Brucella* and play different roles in development of adaptive immunity following aerosol challenge in mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:115. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22973560/>.
85. Fernandes DM, Jiang X, Jung JH, Baldwin CL. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996;16(3-4):193–203.
86. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop II M, Robertson GL, Hoover DL. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface o-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun*. 2003;71(4):2110–2119.
87. Chen F, He Y. Caspase-2 mediated apoptotic and necrotic murine macrophage cell death induced by rough *Brucella abortus*. *PLoS One*. 2009;4(8):e6830. Disponible en URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006830>.

88. Bronner DN, O’Riordan MXD, He Y. Caspase-2 mediates a *Brucella abortus* RB51-induced hybrid cell death having features of apoptosis and pyroptosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:83. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842122/>.
89. Sathiyaseelan J, Goenka R, Parent M, Benson RM, Murphy EA, Fernandes DM, Foulkes AS, Baldwin CL. Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell Immunol.* 2006;243(1):1–9.
90. Murphy EA, Parent M, Sathiyaseelan J, Jiang X, Baldwin CL. Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;32(1):85–88.
91. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect.* 2011;13(2):134–142.
92. Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerci DJ, Ugalde RA. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(44):16514–16519.
93. Goenka R, Guirnalda PD, Black SJ, Baldwin CL. B Lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis.* 2012;206(1):91–98.
94. Cassataro J, Velikovskiy CA, Bruno L, Estein SM, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH. Improved immunogenicity of a vaccination regimen combining a DNA vaccine encoding *Brucella melitensis* outer membrane protein 31 (Omp31) and recombinant Omp31 boosting. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(7):869–874.
95. Blasco JM. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Rumin Res.* 2006;62(1-2):33–37.
96. Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):479–496.
97. Cloeckert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine.* 2002;20(19-20):2546–2550.

98. Marín C, Barberán M, Jiménez de Bagués M, Blasco JM. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res Vet Sci*. 1990;48(2):209–215.
99. García-Yoldi D, Le Fleche P, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Vergnaud G, López-Goñi I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Vaccine*. 2007;25(15):2858–2862.
100. Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol*. 2002;90(1-4):497–519.
101. Adone R, Ciuchini F, Marianelli C, Tarantino M, Pistoia C, Marcon G, Petrucci P, Francia M, Riccardi G, Pasquali P. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. *Infect Immun*. 2005;73(7):4198–4204.
102. Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC. Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 4:D40–D43.
103. Jiménez de Bagués M, Marín C, Blasco JM. Effect of antibiotic therapy and strain- 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev Vet Med*. 1991;11:17–24.
104. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res*. 2004;35 (1):1–38.
105. Yazdi HS, Kafi M, Haghkhal M, Tamadon A, Behroozikhah AM, Ghane M. Abortions in pregnant dairy cows after vaccination with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet Rec*. 2009;165(19):570–571.
106. Suárez-Güemes F. Capítulo de Introducción. En: Díaz-Aparicio E, Hernández L, Valero G, Arellano-Reynoso B, editores. *Diagnóstico de brucelosis animal*. México: INIFAP; 2000.
107. Vásquez-Navarrete J. Diagnóstico de la brucelosis canina (*B. canis*) y preparación de antígenos rugosos. En: Díaz-Aparicio E, Hernández L,

- Valero G, Arellano-Reynoso B, editores. Diagnóstico de brucelosis animal. México: INIFAP; 2000.
108. Morales-Alvarez J. Epididimitis ovina. En: Díaz-Aparicio E, Hernández L, Valero G, Arellano-Reynoso B, editores. Diagnóstico de brucelosis animal. México: INIFAP; 2000.
  109. Corbel M. Diagnosis. En: Brucellosis in humans and animals. Genova, Suiza: World Health Organization; 2006.
  110. Hinić V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya CV, Frey J, Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 2008;75(2):375–378.
  111. Murray PJ, Young RA. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. J Bacteriol. 1992;174(13):4193–4196.
  112. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(2): 136-169
  113. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. J Cell Mol Med. 2008;12(3):743–761.
  114. Muffler A, Fischer D, Hengge-Aronis R. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. Genes Dev. 1996;10(9):1143–1151.
  115. Seeto S, Notley-McRobb L, Ferenci T. The multifactorial influences of RpoS, Mlc and cAMP on *ptsG* expression under glucose-limited and anaerobic conditions. Res Microbiol. 2004;155(3):211–215.
  116. Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2006;70(4):939–1031.
  117. Dalebroux ZD, Svensson SL, Gaynor EC, Swanson MS. ppGpp conjures bacterial virulence. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(2):171–199.
  118. Lamontagne J, Forest A, Marazzo E, Denis F, Butler H, Michaud J-F, Boucher L, Pedro I, Villeneuve A, Sitnikov D, Trudel K, Nassif N, Boudjelti D, Tomaki F, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Brunet S, Côté-Martin A,

- Hunter J, Moreno E, Paramithiotis E. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res.* 2010;8(3):1594–1609.
119. Al Dahouk S, Jubier-Maurin V, Scholz HC, Tomaso H, Karges W, Neubauer H, Köhler S. Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics.* 2008;8(18):3862–3870.
120. Conde-Alvarez R, Grilló MJ, Salcedo SP, de Miguel MJ, Fugier E, Gorvel JP, Moriyón I, Iriarte M. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol.* 2006;8(8):1322–1335.
121. Bukata L, Altabe S, de Mendoza D, Ugalde R a, Comerci DJ. Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 2008;190(24):8197–8203.
122. Uzureau S, Godefroid M, Deschamps C, Lemaire J, De Bolle X, Letesson J-J. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol.* 2007;189(16):6035–6047.
123. Mirabella A, Terwagne M, Zygmunt MS, Cloeckeaert A, De Bolle X, Letesson JJ. *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent and saline stresses and cell envelope modifications. *J Bacteriol.* 2012;195(3):453-465.
124. Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter J, Schirm M, Paquet C, Tian M, Kearney P, Hamaidi L, Chelsky D, Moriyón I, Moreno E, Paramithiotis E. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res.* 2007;6(4):1519–1529.
125. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* 1998;29(1):125–138.
126. Fretin D, Fauconnier a, Köhler S, Halling S, Léonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Vandenhoute J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in

- persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol.* 2005;7(5):687–698.
127. Caswell CC, Elhassanny AEM, Planchin EE, Roux CM, Weeks-Gorospe J, Ficht TA. The diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. *Infect Immun.* 2013;81(4):1040-1051.
  128. Uzureau S, Lemaire J, Delaive E, Dieu M, Gaigneaux A, Raes M, De Bolle X, Letesson JJ. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Prot Res.* 2010;(9):3200–3217.
  129. Léonard S, Ferooz J, Haine V, Danese I, Fretin D, Tibor A, de Walque S, De Bolle X, Letesson JJ.. FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in *Rhizobiaceae*. *J Bacteriol.* 2007;189(1):131–141.
  130. Cellier MF, Teyssier J, Nicolas M, Liautard JP, Marti J, Sri J. Cloning and characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein DnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1992;174(24):8036-8042.
  131. Lin J, Adams LG, Ficht T A. Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun.* 1992;60(6):2425–2431.
  132. Rafie-Kolpin M, Essenberg RC. Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 1996;64(12):5274-5283.
  133. Köhler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, Liautard JP. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):299–309.
  134. Delpino MV, Comerci JD, Wagner MA, Eschenbrenner M, Mujer CV, Ugalde RA, Fossati CA, Baldi PC, Delvecchio VG. Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic *virB* mutants. *Arch Microbiol.* 2009;191(7):571–581.
  135. Teixeira-Gomes AP, Cloeckeaert a, Zygmunt MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect Immun.* 2000;68(5):2954–2961.

136. Phillips RW, Roop II M. *Brucella abortus* HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Infect Immun* 2001;69 (9):5911-5913.
137. Sieira R, Comercci DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol.* 2004;54(3):808–822.
138. Dozot M, Boigegrain RA, Delrue R M, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, Danese I, Letesson JJ, De Bolle X, Köhler S. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*. *Cell Microbiol.* 2006;8(11):1791–1802.
139. Kim S, Watanabe K, Suzuki H, Watarai M. Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiology.* 2005;151(Pt 5):1607–1617.
140. Delory M, Hallez R, Letesson JJ, De Bolle X. An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M. *J Bacteriol.* 2006;188(21):7707–7710.
141. Ferooz J, Lemaire J, Delory M, De Bolle X, Letesson JJ. RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology.* 2011;157(Pt 5):1263–1268.
142. Rossetti CA, Galindo CL, Lawhon SD, Garner HR, Adams LG. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*:host initial interactions. *BMC Microbiol.* 2009;9:81. Disponible: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/81>.
143. Hernandez-Castro R, Rodríguez MC, Seoane A, García-Lobo JM. The aquaporin gene *aqpX* of *Brucella abortus* is induced in hyperosmotic conditions. *Microbiology.* 2003;149(11):3185–3192.
144. Zhang X, Ren J, Li N, Liu W, Wu Q. Disruption of the BMEI0066 gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int J Biol Sci.* 2009;5(6):570–577.
145. Sun YH, de Jong MF, den Hartigh AB, Roux CM, Rolán HG, Tsolis RM. The small protein CydX is required for function of cytochrome bd oxidase in

- Brucella abortus*. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:47. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417669/>
146. Dozot M, Poncet S, Nicolas C, Copin R, Bouraoui H, Mazé A, Deutscher JM, De Bolle X, Letesson JJ. Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. PLoS One. 2010;5(9). Disponible en URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012679>.
  147. Bessman MJ, Walsh JD, Dunn CA, Swaminathan J, Weldon JE, Shen J. The gene *ygdP*, associated with the invasiveness of *Escherichia coli* K1, designates a Nudix hydrolase, Orf176, active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine (Ap5A). J Biol Chem. 2001;276(41):37834–37838.
  148. Edelstein PH, Hu B, Shinzato T, Edelstein MAC, Xu W, Bessman MJ. *Legionella pneumophila* NudA is a nudix hydrolase and virulence factor. Infect Immun. 2005;73(10):6567–6576.
  149. Lee PC, Bochner BR, Ames BN. Diadenosine 5', 5'''-P, P-tetraphosphate and related adenylylated nucleotides in *Salmonella typhimurium*. J Biol Chem. 1983;258(10):6827–6834.
  150. Bochner BR, Lee PC, Wilson SW, Cutler CW, Ames BN. AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. Cell. 1984;37(1):225–232.
  151. Guranowski A. Analogs of diadenosine tetraphosphate (Ap4A). Acta Biochim Pol. 2003;50(4):947–972.
  152. Lee PC, Bochner BR, Ames BN. AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80(24):7496–7500.
  153. Plateau P, Mayaux J, Blanquet S. Zinc(II)-dependent synthesis of diadenosine 5', 5'''-(P) 1, P(4) tetraphosphate by *Escherichia coli* and yeast phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetases. Biochemistry. 1981;20(16):4654–4662.
  154. Goerlich O, Foeckler R, Holler E. Mechanism of synthesis of adenosine (5') tetra phospho(5')adenosine (Apppp A) by aminoacyl-tRNA synthetases. Eur J Biochem. 1982;126(1):135–142.

155. Fontes R, Günther Sillero MA, Sillero A. Acyl coenzyme A synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates. *J Bacteriol.* 1998;180(12):3152–3158.
156. Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ, Ames BN. An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(13):5010–5014.
157. Ismail TM, Hart CA, McLennan AG. Regulation of dinucleoside polyphosphate pools by the YgdP and ApaH hydrolases is essential for the ability of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to invade cultured mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32602–32607.
158. Ruiz A, Hurtado C, Meireles Ribeiro J, Sillero A, Günther Sillero M. Hydrolysis of bis(5'-nucleosidyl) polyphosphates by *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. *J Bacteriol.* 1989;171(12):6703–6709.
159. Gaywee J, Xu W, Radulovic S, Bessman MJ, Azad A. The *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) encodes a nudix hydrolase active on adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(3):179–183.
160. Cartwright JL, Britton P, Minnick MF, McLennan AG. The *lalA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (de)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256(3):474–479.
161. Mildvan a S, Xia Z, Azurmendi HF, Saraswat V, Legler PM, Massiah MA, Gabelli SB, Bianchet MA, Kang LW, Amzel LM. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433(1):129–143.
162. McLennan AG. Substrate ambiguity among the nudix hydrolases: biologically significant, evolutionary remnant, or both? *Cell Mol life Sci.* 2013;70(3):373–385.
163. Duong-Ly KC, Woo HN, Dunn CA, Xu W, Babic A, Bessman MJ, Amzel M, Gabelli SB. A UDP-X diphosphatase from *Streptococcus pneumoniae* hydrolyzes precursors of peptidoglycan biosynthesis. *PLoS One.* 2013;8(5):1–13. Disponible en URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0064241>

164. Piton J, Larue V, Thillier Y, Dorléams A, Pellegrini O, de la Sierra-Gallay II, Vasseur JJ, Debart F, Tisé C, Condon C. *Bacillus subtilis* RNA deprotection enzyme RppH recognizes guanosine in the second position of its substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):8858–8863.
165. Even S, Pellegrini O, Zig L, Labas V, Vinh J, Bréchemmier-Baey D, Putzer H. Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(7):2141–2152.
166. Patil AGG, Sang PB, Govindan A, Varshney U. *Mycobacterium tuberculosis* MutT1 (Rv2985) and ADPRase (Rv1700) constitute a two-stage mechanism of 8-oxo-dGTP and 8-oxo-GTP detoxification, and A to C mutation avoidance. *J Biol Chem*. 2013; 288(16):11252-11262.
167. Iida E, Satou K, Mishima M, Kojima C, Harashima H, Kamiya H. Amino acid residues involved in substrate recognition of the *Escherichia coli* Orf135 protein. *Biochemistry*. 2005;44(15):5683–5689.
168. Dunn CA, Handley SFO, Frick DN, Bessman MJ. Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of *trgB*, a gene associated with tellurite resistance. *J Biol Chem*. 1999;274(45):32318–32324.
169. Gaywee J, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. Transcriptional analysis of *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) during host cell infection. *Infect Immun*. 2002;70(11):6346–6354. doi:10.1128/IAI.70.11.6346.
170. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
171. Hernández-Castro R, Verdugo-Rodríguez A, Gutiérrez-Pabello JA, Adams L, Suárez-Güemes F, Sahagún-Ruiz A. Identification of four genes of the *Brucella melitensis* ATP synthase operon F0 sector: relationship with the *Rhodospirillaceae* family. *Microb Comp Genomics*. 2000;5(3):163–171.
172. Castañeda-Ramírez A, Puente JL, González-Noriega A, Verdugo-Rodríguez A. Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages. *Virulence* 2012;3(5):434-439.

173. Moncalián G, Grandoso G, Llosa M, de la Cruz F. oriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *J Mol Biol.* 1997;270(2):188–200.
174. Kokotek W, Lotz W. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene.* 1991;98:7–13.
175. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop II M, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 1995;166(1):175–176.
176. Pei J, Wu Q, Kahl-McDonagh M, Ficht TA. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infect Immun.* 2008;76(1):30–37.
177. Arenas GN, Staskevich AS, Mayorga LS, Staskevich ANAS, Aballay A. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 2000;68(7):4255-4263.
178. Naroeni A, Jouy N, Ouahrani-bettache S, Liautard J. *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun.* 2001;69(1):486–493.
179. Murray LJ, Lee R, Martens C. In vivo cytokine gene expression in T cell subsets of the autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Eur J Immunol.* 1990;20:163–170.
180. Rajashekara G, Glover DA, Banai M, Callaghan DO, Splitter GA. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (virB4), protection in mice. *Infect Immun.* 2006;74(5):2925–2936.
181. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 1993;61(1):124–134.
182. Fairn GD, Grinstein S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 2012;33(8):397–405.
183. Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, de Bolle P, Tibor A, Gorvel JP, Letesson. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol.* 2001;3(7):487–497.

184. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, Virgin HW, Celli J. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe*. 2012;11(1):33–45.
185. 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(1):65–78.
186. Germann T, Bongartz M, Dlugonska H, Hess H, Schmitt E, Kolbe L, Kölsch E, Podlaski FJ, Gately MK, Rude E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol*. 1995;25(3):823–829.
187. Lavigne J, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M, O’Callaghan D, Michaux-Charachon S. Identification of a New Virulence Factor, BvfA, in *Brucella suis*. *Infect Immun* 2005;73(9):5524–5529.
188. Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, Makino SI, Shirahata T, Watarai M. *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;234(2):289–295.
189. Del Giudice MG, Ugalde JE, Czubener C. A lysozyme-like protein in *Brucella abortus* is involved in the early stages of intracellular replication. *Infect Immun*. 2013;81(3):956–964.
190. Elzer PH, Jacobson RH, Jones SM, Nielsen KH, Douglas JT, Winter AJ. Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19. *Immunology*. 1994;82(4):651–658.
191. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel MJ, Martín-Martín AI, Cloeckert A, Grilló MJ, Vizcaíno N. Role of the omp25/omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun*. 2007;75(8):4050–4061.