



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES DE CÉLULAS EUCARIOTAS
INVOLUCRADAS EN LA INVASIÓN de *Brucella abortus* S19**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

KARLA YULIETT MÉNDEZ GONZÁLEZ

Tutor Principal: Dra. Beatriz Arellano Reynoso-FMVZ

Comité Tutoral: Dr. Francisco Suárez Güemes-FMVZ

Dr. Edgar Zenteno Galindo-Facultad de Medicina

MÉXICO, D. F. AGOSTO 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.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial: Dra. Beatriz Arellano Reynoso, al Dr. Francisco Suárez Güemes y al Dr. Edgar Zenteno Galindo por haberme guiado y apoyado para la realización de esta tesis.

A los proyectos de CONACYT Ciencia Básica SEP CONACYT No. 80052 y PAPIIT IN216608

A mi jurado:

Dra. Ahidé López Merino, Dr. José Angel Gutiérrez Pabello, Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda y Dr. Raúl Chávez Sánchez.

A la Productora Nacional de Biológico Veterinarios (PRONABIVE) por proporcionarnos la cepa vacunal de *B. abortus* S19.

Al laboratorio del Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, al Dr. Ulises Hernández Chiña y al Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán por haberme brindado un poquito de su tiempo y abrirme las puertas en su laboratorio.

A mi gran amigo Alejandro Benítez Guzmán por su apoyo en la realización de la tesis, gracias por tu amistad nunca cambies.

A Pablo Vera Sánchez por su ayuda en el laboratorio y porque siempre me hacía amena los días, gracias nunca cambies.

A mis amigos y compañeros del laboratorio a Juan Ramón Torres Ríos, Dra. Irasema Juana Yela Miranda, Yanela Villareal Morales, Jorge de la Garza García, Ariel Deliler Sánchez López, Jorge Alva, Juan Carlos Mora, Cristina Ibarra Zazueta, Aldo Rivera y Omar Aliaga Palomares, que siempre estuvieron en las buenas y en las malas.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi mamá Cristina González Ramírez que siempre ha confiando y creído en mi y que gracias a ella me apoyo desde que inicie en este largo camino y que hoy por fin voy a terminar para poder empezar mi nueva etapa de mi vida, a mi nueva familia Amy Juliette Torres Méndez y Juan Ramón Torres Ríos y a mi queridísimo Lucero (como no recordarlo), a mi Sabrina, Bax, Hércules y Salem, que siempre estuvieron en las buenas y las malas como olvidar aquellos tiempos en el que siempre que regresaba de la escuela, me recibían con una agradable sonrisa gracias donde quiera que estén. Y a todo mi familia, gracias.

“En el corazón y la mente siempre encontraremos a nuestros seres queridos”

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. <i>Brucella abortus</i>	3
1.1.1. Transmisión	5
1.1.2. Manifestaciones patológicas	5
1.2. Endocitosis	5
1.3. Balsas lipídicas	6
1.4. Morfología de las caveolas	7
1.5. Caveolina	8
II. Justificación	9
III. Objetivo General	10
3. 1. Objetivos particulares	10
IV. Hipótesis	11
V. Material y Método	12
5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	12
5.2. Inmunofluorescencias de la colocalización de <i>Brucella</i> con Cav1 en macrófagos J774 A.1.....	12
5.3. Porcentaje de colocalización de las células tratadas con la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) en células infectadas por <i>Brucella</i>	13
5.4. Efecto de la inhibición de la caveolas durante la infección de <i>Brucella</i>	13
5.5. Efecto de la inhibición d las caveolas durante la multiplicidad intracelular de <i>Brucella</i>	14
5.6. Análisis de la composición de las balsas lipídicas involucradas en la interacción de <i>Brucella</i>	14
5.6.1. Extracción de la membrana externa de <i>B. abortus</i> S19	14

5.6.2. Preparación de las células para la purificación de las balsas lipídicas.....	15
5.7. Inmunoprecipitaciones de las proteínas de membrana externa <i>B. abortus</i> S19 con las proteínas de las balsas lipídicas de las células.....	16
5.8. Identificación de proteínas localizadas en las balsas lipídicas en células J774A.1, estimuladas con proteínas de la membrana externa de <i>Brucella abortus</i> S19.....	17
5.9. Análisis estadístico.....	18
V. Resultados	19
6.1. Porcentaje de colocalización de <i>Brucella</i> con caveolina (Cav1) en macrófagos murinos J774A.1.....	19
6.2. Porcentaje de las células tratadas con la subunidad B de la toxina cólera (CTB) en células infectadas por <i>Brucella B. abortus</i>	21
6.3. Efecto de la CTB en la invasión durante la entrada de <i>Brucella</i> a las células	22
6.4. Efecto de la inhibición de las caveolas durante la internalización de <i>Brucella</i>	23
6.5. Efecto de la inhibición d las caveolas durante la multiplicidad intracelular de <i>Brucella</i>	24
6.6. Análisis de la composición de las balsas lipídicas involucradas en la interacción de <i>Brucella</i>	26
6.7. Identificación de proteínas localizadas en las balsas lipídicas en células J774A.1 estimuladas con proteínas de la membrana externa de <i>B. abortus</i> S19.....	29
VII. Discusión	31
VIII. Conclusiones	34
IX. Bibliografía	35
Anexos	40

Lista de Figuras y Cuadros

Figura 1. Productos de los genes que influyen en el tráfico intracelular de las cepas de <i>Brucella</i> en las células huéspedes.	4
Figura 2. Fotos de microscopía electrónica de la formación de las caveolas.....	8
Figura 3. Fotos de microscopía confocal de la interacción de <i>B. abortus</i> S19 con Cav1.....	19
Figura 4. Porcentaje de colocación de Cav1 con <i>Brucella</i> S19 y 2308.....	20
Figura 5. Fotos de microscopía confocal de la interacción de CTB con <i>B. abortus</i> S19.....	21
Figura 6. Efecto del tratamiento del CTB en los macrófagos infectados con <i>B. abortus</i> S19 durante 0, 4, 8 y 24 h.....	22
Figura 7. Porcentaje de colocación de Cav1 con <i>B. abortus</i> S19 y 2308.....	23
Figura 8. Efecto de la nistatina y metil- β -ciclodextrina en las células J774 infectadas con <i>B. abortus</i> S19.	27
Figura 9. Efecto de la nistatina y metil- β -ciclodextrina en las células J774 infectadas con <i>B. abortus</i> 2308.....	27
Figura 10. Western blot de Cav1 (40 μ g) de las fracciones obtenidas de los gradientes de optiprep.....	26
Figura 11. Proteínas de la línea celular J774A.1 en un gel de 2-D.....	34
Figura 12. Western Blot de las proteínas de la línea J774A.1 (100 μ g) inmunoprecipitadas con las proteínas de la membrana externa de <i>Brucella abortus</i> S19 en un gel de 2-D.....	27
Figura 13. Proteínas del gradiente 5 de la línea celular J774A.1 (100 μ g) en un gel de 2-D.....	28

Cuadro 1. Representa a las 14 proteínas por análisis proteómico.....29

RESUMEN

Brucella abortus (*B. abortus*) es una bacteria intracelular facultativa Gram-negativa, que infecta a una gran variedad de especies animales, incluyendo al humano. Las balsas lipídicas también llamadas caveolas son plataformas en la membrana plasmática de las células eucariotas, ricas en colesterol, esfingolípidos y glicolípidos. Las caveolas son invaginaciones formadas principalmente Caveolina 1 (Cav1), la cual es una proteína importante para la formación de las caveolas que le da estabilidad a la misma. Sin embargo, se ha demostrado que un gran número de patógenos utiliza como vía de entrada a las balsas lipídicas/caveolas presentes en la membrana plasmática de las células huésped. Poco se sabe acerca de los mecanismos que ocurren durante la invasión de *Brucella* a las células eucarióticas. El objetivo del presente trabajo fue identificar si Cav1 y otras moléculas de las balsas lipídicas presente en los macrófagos murinos J774A.1 interaccionan con *Brucella abortus* S19 y 2308 para su internalización. Las células J774A.1 fueron infectadas con *B. abortus* S19 ó 2308 durante 1, 5, 15 y 30 min, posteriormente se analizó la colocalización con caveolina 1 por el método de microscopia confocal para verificar la posible interacción dependiente de caveolas. Las caveolas fueron bloqueadas con metil- β -ciclodextrina y nistatina, estas dos drogas destruyen la función de las caveolas y el porcentaje de colocalización fue evaluado por microscopia confocal y además se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias en ambas cepas. Por el método de inmunoprecipitaciones se demostró si las proteínas de la membrana externa de *B. abortus* interaccionaban con las proteínas de las balsas lipídicas. Los resultados obtenidos muestran un 50% de colocalización de Cav1 con *B. abortus* S19 y 2308 al minuto 1 de incubación. Sin embargo, a los 30 min disminuyó a un 15% en S19 y 2308. Se observó que la nistatina y la metil- β -ciclodextrina reducen significativamente el porcentaje de colocalización de ambas cepas con Cav1, pues desde el min 1 de incubación se encontró una colocalización de solo el 2%. Así también se evaluó el efecto de la nistatina y metil- β -ciclodextrina en la supervivencia y replicación de S19 y 2308 y se observó un decremento en el número de bacterias viables intracelulares detectadas después del tiempo 0 con respecto a los macrófagos no estimulados con las dos drogas. Las proteínas que se identificaron fueron Hps 90, Hps 70 y valosina por medio de inmunoprecipitaciones. Estos resultados sugieren que *B. abortus* S19 y 2308 infectan a los macrófagos a través de caveolas.

Palabras claves: caveolas, *B. abortus*, nistatina, metil- β -ciclodextrina, colocalización.

ABSTRACT

Brucella abortus (*B. abortus*) is an intracellular gram-negative bacterium that comprises numerous species infective for a variety of mammalian host, including humans. The lipid rafts also called caveolae are structural in membrane plasmatic of the cells, rich in cholesterol, sphingolipids and glycolipids. Caveolae are invaginations of the caveolin-1 of the plasma membrane. However, it has been shown that a growing number of pathogens utilize lipids rafts/caveolae in their interactions with host cells, including pathogen entry. Little is known about mechanisms occurring during *Brucella* invasion to eukaryotic cells. This study aims to identify if Cav1 and others molecules of lipids rafts present in J774A.1 murine macrophages interact with *B. abortus* S19 or 2308 for their internalization. J774A.1 cells were infected with *B. abortus* S19 and 2308 during 1, 5, 15, and 30 minutes, then colocalization with caveolin-1 (Cav1) was investigated by confocal microscopy. Caveolae were blocked with methyl- β -cyclodextrin and nystatin as these drugs disrupt the caveolar function. Results showed that 50% of *B. abortus* S19 and 2308 co-localizes with Cav1 as soon as 1 minute, decreasing this colocalization at further times (15% at 30 minutes). Nystatin and methyl- β -cyclodextrin reduced the colocalization with Cav1 with *Brucella* (2% at minute 1). In the present study, we evaluated the effect of nystatin and methyl- β -cyclodextrin on survival and replication of the S19 and 2308 strains, and observed a decrease in the number of intracellular viable bacteria after time 0 in treated cells compared to macrophages that were not treated with these drugs. On the other hand, immunoprecipitation assays were performed with the outer membrane proteins of *B. abortus* S19 and J774 cells membrane proteins, these results were analyzed by sequencing. We found proteins as Hps 90, Hps 70, and valosin interacting with *Brucella*. These results suggest that *B. abortus* S19 and 2308 enter macrophages through caveolae.

Keywords: caveolae, *B. abortus*, nystatin, methyl- β -cyclodextrin, co-localization.

I. Introducción

1.1. *Brucella abortus*

Brucella abortus, es un cocobacilo de 0.5 x 0.5 μm de longitud; el cual se caracteriza por ser una bacteria intracelular facultativa Gram-negativa, su virulencia está relacionada con la capacidad que posee en adherirse, penetrar y multiplicarse en gran variedad de células eucariotas, tanto en los fagocitos profesionales (macrófagos) y fagocitos no profesionales (células epiteliales) (Guzmán-Verri *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2013). Con base en el análisis de las secuencias del ARN ribosomal 16S, se ubica a *Brucella* en el grupo alfa subgrupo 2 de las proteobacterias, dentro de la familia *Rhizobiaceae* (Verger *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 2002). Esta familia incluye bacterias patógenas de plantas y animales como *Agrobacterium*, *Bartonella* y *Brucella*, bacterias con capacidad para interactuar con células eucariotas en forma intracelular. El género de *Brucella* ha sido clasificado en diez especies: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. suis* (cerdos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (perros), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. ceti* (mamíferos marinos como los cetáceos: delfines, ballenas y marsopas), *B. pinnipedialis* (focas), *B. microti* (roedores de campo y los zorros rojos), *B. inopinata* (fue aislada en el 2009 de un implante del mamario humano) (Audic *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2007). La bacteria es capaz de escapar a los fagocitos favoreciendo así la invasión en su huésped, el mecanismo molecular exacto no se conoce aún. Previos estudios han explicado la vía que sigue para sobrevivir intracelularmente. Estos trabajos han demostrado que *Brucella abortus* utiliza moléculas en la superficie de los macrófagos como receptores del tipo scavenger clase A, que regulan la internalización y replicación dentro de la célula huésped (Lauer *et al.*, 2014). Durante las primeras etapas del tráfico intracelular los compartimientos de las vesículas de *Brucella* (BCVs) son fagocitados, formando un endosoma, el cual interactúa con los endosomas tempranos, después de una estancia transitoria pasa a los endosomas tardíos, de ahí se dirige a otro compartimiento con características de vesícula autofágica. Posteriormente se fusionan con los lisosomas donde el pH de 4 permite la transcripción del gen *virB*, el cual codifica para los componentes del sistema de secreción Tipo IV, favoreciendo a la bacteria replicarse en el retículo endoplasmático (Figura 1) (Roop *et al.*, 2009; Köhler *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2013; Roop *et al.*, 2009).

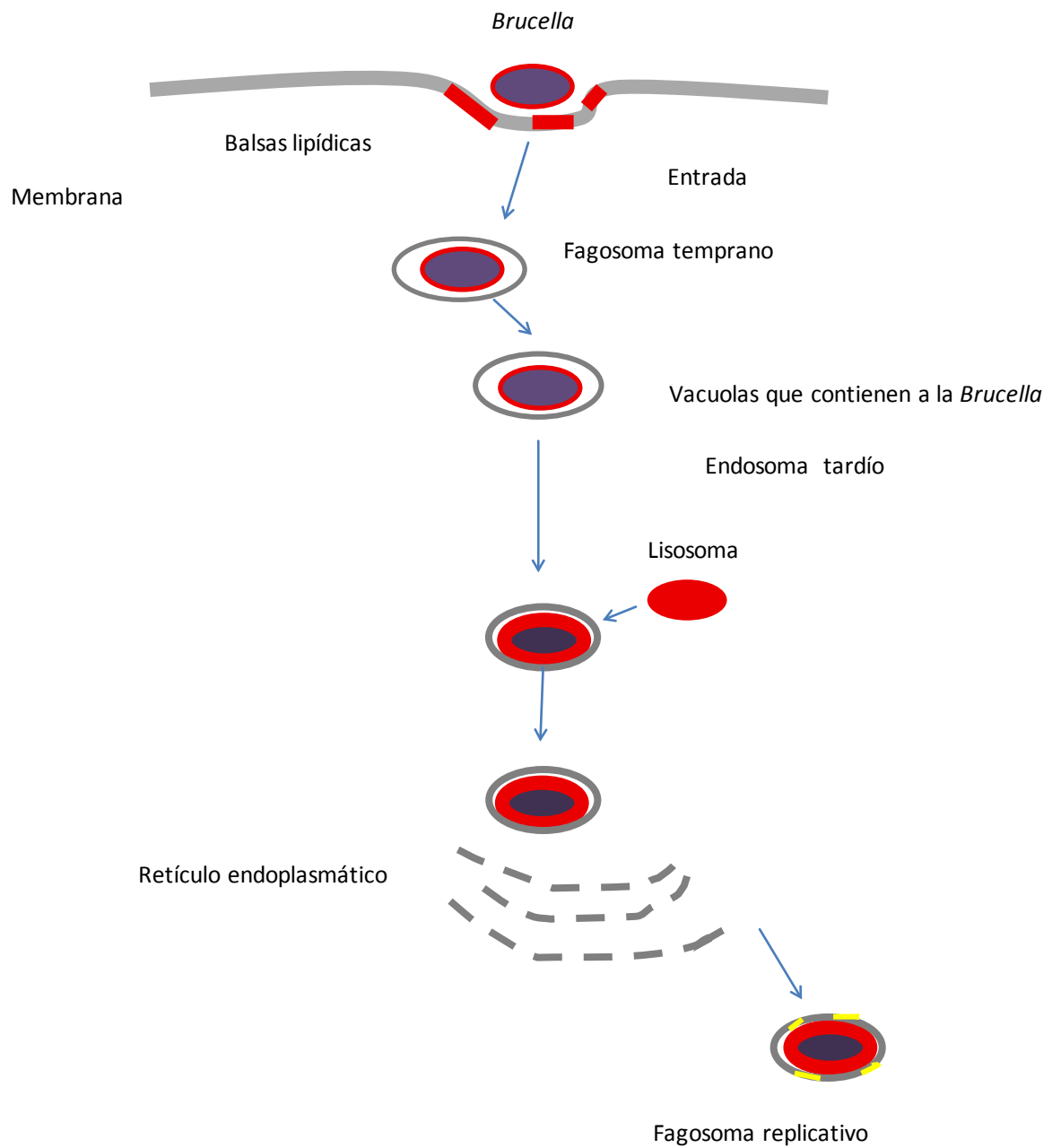


Figura 1. Productos de los genes que influyen en el tráfico intracelular de las cepas de *Brucella* en las células huésped. (Tomado de Roop *et al.*, 2009).

Adicionalmente al reclutamiento de las estructuras del citoesqueleto, se ha constatado la activación de proteínas que participan en eventos de señales internas de la misma célula y que *Brucella* utiliza a su favor. Se ha demostrado que *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* y *B. canis* puede utilizar el monosialogangliosido (GM1) como una vía de entrada a las

células huésped, ya que éste se encuentra formando parte de las balsas lipídicas (Naroeni and Porter, 2002).

1.1.1. Transmisión

La posible adquisición de la brucelosis incluye: exposición ocupacional, consumo de alimentos contaminados, usualmente resulta del contacto directo con animales infectados por fetos abortados. La bacteria puede sobrevivir por largo período de tiempo en agua, fetos abortados, carne y productos lácteos no pasteurizados. La sobrevivencia depende por muchas variables como el número de microorganismos, temperatura, pH, la presencia de otros contaminantes microbianos. La infección de la brucelosis está asociada con las ocupaciones laborales como ganaderos, trabajadores de las granjas, personas que atienden a las ovejas, cerdos, veterinarios inseminadores son un riesgo directo con animales infectados o a través de continuas exposiciones con ganado infectado. La infección puede ocurrir por inhalación, contaminación conjuntival, ingestión accidental, contaminación en la piel vía cutánea o abrasiones y accidentes en el laboratorio con el uso de vacunas vivias, así como también personas involucradas en el proceso de productos de origen animal. La ingestión de leche fresco o preparación de productos lácteos son riesgo de infección. La contaminación de la leche de vaca, borrega, cabra (Gorvel, 2006).

1.1.2. Manifestaciones patológicas

Los pacientes presentan fiebres ondulantes, mialgia y otras manifestaciones como esplenomegalia, hepatomegalia, espondilitis, anemia, trombosis, endocarditis, vasculitis leucocitoclastica, leucopenia, abscesos en hígado, linfadenopatologías, meningitis, nefritis, neuritis optica, pancitopenia, abscesos en bazo, trombocitopenia y uveitis (Sauret and Vilissova, 2002).

1.2. Endocitosis

Las endocitosis es un mecanismo de internación celular por medio del cual ingresan moléculas de 0.5 μm de diámetro dentro de compartimientos de la membrana (Scita and Di Fiore, 2010). Durante la endocitosis las moléculas unidas a la membrana y las proteínas transmembranales son atrapadas en vesículas pequeñas derivadas de la membrana plasmática a través de mecanismos dependientes de clatrina y caveolas. Después de su formación las vesículas son dirigidas a los endosomas tempranos, donde

tienen la capacidad de diferenciar, organizar y redirigir las partículas ingresadas, estas estructuras pueden ser identificadas por la presencia de Rab5 (miembro de la familia de proteína G monomérica con actividad GTPasa) ó el antígeno de endosomas temprano 1 (EEA1 del inglés *early endosome antigen 1*). El lumen de los endosomas tempranos es relativamente pobre en proteasas y es un poco ácido con un pH de 6.0. De manera alternativa, las moléculas destinadas para degradación se mueven de los endosomas tempranos a los tardíos. Los endosomas tardíos son más ácidos que los tempranos alcanzando un pH de 5.5 y están enriquecidos con enzimas hidrolíticas. Pueden ser identificados por su naturaleza multivesicular, la cual consta de pequeñas vesículas intraluminales y por la presencia de Rab7 y Rab9, ácido lisofosfatídico, el receptor de manosa-6-fosfato y las proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMPs del inglés *lysosomal-associated membrane proteins*). Sin embargo, existe una diferencia de opinión sobre cómo ocurre el tráfico de endosoma temprano a tardío, con dos puntos de vista predominantes, a) el modelo de transporte vesicular y b) el modelo de maduración. De acuerdo al modelo de transporte vesicular, los endosomas tempranos son organelos estables de donde los intermediarios del transporte o cuerpos multivesiculares son derivados para posteriormente ser dirigidos a los endosomas tardíos. El modelo de maduración propone que los endosomas tempranos son organelos transitorios que maduran para formar cuerpos multivesiculares a través de una serie de eventos de fusión y fisión pobremente caracterizada, para finalmente generar los endosomas tardíos. Independientemente del mecanismo preciso de formación de los endosomas tardíos, es entendido que los lisosomas son el paso final en la secuencia endocítica. Los lisosomas contienen un arsenal a base de proteasas y lipasas, además de tener un pH ácido (5.5). Por lo tanto, el mejor método para la identificación de lisosomas es la adquisición de marcadores de fase fluida como dextrán conjugado a fluorocromos o peroxidasa de rábano picante (Gutiérrez, 2010).

1.3. Balsas lipídicas

Las balsas lipídicas o microdominios, son plataformas en la membrana plasmática de las células eucariotas, ricos en colesterol, esfingolípidos y glicolípidos. Estos glicolípidos se asocian por sus largas cadenas aciladas, formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por los puentes de hidrógeno, que se producen entre sus cadenas azucaradas; el colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas, donde provoca una disminución de su flexibilidad llamada fase de orden en la membrana así es como

forma un bicapa lipídica compacta (Radin, 2006), este empaquetamiento lateral de los esfingolípidos y el colesterol conduce a la formación de dominios dispersos que se encuentran en una fase similar a la fase sólida que se denominan balsas o “rafts” dentro de la bicapa de las membranas (Martín, 2000). Una de las características de estas balsas lipídicas es que permiten la segregación lateral de proteínas en la membrana plasmática, actuando como plataformas de señalización (Simmons and Toomre, 2001). Los mecanismos que regulan la segregación lateral de proteínas, no han sido bien reconocidos; sin embargo, se sabe que la incorporación de residuos de ácido mirístico (miristilación) y ácido palmítico (palmitolación) en las proteínas, permite la movilidad y la retención en las balsas lipídicas (Dykstra *et al.*, 2003).

Las balsas lipídicas están involucradas en múltiples procesos celulares como la “puerta de entrada” de virus y bacterias (Zhu *et al.*, 2011; Maldonado-García *et al.*, 2004; Lafont and Van der Goot, 2005; Kiss, 2012; Scita and Di Fiore, 2010).

1.4. Morfología de las caveolas

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática, fueron descubiertas por primera vez por Palade y Yamada en 1950 (Chidlow and Sessa, 2010; Harvey and Calaghan, 2012; Palade, 1953; Yamada 1995); son invaginaciones en la membrana con un diámetro de 50-80 nm (Choudhury *et al.*, 2006). Estas estructuras son ricas en esfingolípidos y colesterol, se consideran subdominios de los microdominios de la membrana plasmática (Matveev *et al.*, 2001). En la década pasada el concepto de caveola se consideraba como formas especializadas de las balsas lipídicas; sin embargo hoy en día ambas formas de balsas lipídicas y caveolas provienen de plataformas de la membrana, estas caveolas se han relacionado con el tráfico vesicular (como la endocitosis), y este mecanismo se ha demostrado con el virus de simio (SV40), el cual es internalizado por medio de las caveolas (Parkar *et al.*, 2009). Diversos grupos de investigadores han aclarado que la caveola/balsas lipídicas median el transporte de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) (Matveev *et al.*, 2001). Las caveolas están enriquecidas principalmente por el monosialogangliosido GM1, caveolina 1, dinamina y colesterol, que le confieren estabilidad a la estructura (Sobo *et al.*, 2007). Existen agentes farmacológicos que eliminan el colesterol uno de ellos y el más estudiado es la nistatina, la cual causa destrucción de la caveola, por lo cual se ha sugiriendo que el colesterol es el responsable de la invaginación de la caveola; sin embargo, recientes estudios realizados por el grupo de Lisanti sugieren que la oligomerización de la

caveolina es lo que da la estructura a la caveola promoviendo su invaginación (Matveev *et al.*, 2001).

1.5. Caveolina

La caveolina es una proteína estructural de la subclase de las balsas lipídicas en las fracciones de la membrana de baja densidad (Figura 2). Existen tres tipos de caveolinas la caveolina 1 (Cav1) y caveolina 2 (Cav2) que se han identificado en tejidos y órganos, mientras que la caveolina 3 (Cav3) es expresada en células del musculo esquelético, liso, cardíaco (Harvey and Calaghan, 2012; Sonino and Prinetti, 2013).

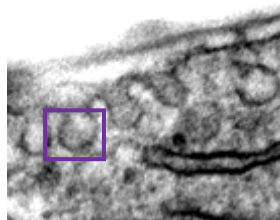


Figura 2. Foto de microscopía electrónica de la formación de las caveolas tomada del autor Jin *et al.*, 2011.

El gen de la Cav1 codifica para una proteína de 178 aminoácidos, se han identificado dos isoformas de caveolina; una de 24 kDa (residuos 1-178 aminoácidos) y otra de 21 kDa (residuos de 32-178 aminoácidos) son generadas por una maduración del mRNA. Estas dos isoformas difieren por 31 aminoácidos presentes en la isoforma de su aminoácido terminal (residuos 1-31). La Cav1 está formada por 14 a 16 cadenas polipeptídicas, la región del carboxilo terminal de Cav1 contiene tres residuos de cisteína palmitoilato, esta proteína es importante para su oligomerización, así mismo esta proteína es esencial para la formación de la caveola (Jin *et al.*, 2011).

II. Justificación

La interacción de proteínas de *Brucella abortus* con el macrófago es importante para el destino que tendrá la bacteria en la células huésped. Existen diversas moléculas de la superficie del microorganismo que son ligandos de múltiples receptores tipo “scavenger”, gangliosido GM1 y proteína prion (PrPC), siendo capaces de interactuar directamente con la membrana plasmática (Köhler et al., 2002; Martín-Martin et al., 2010; Watarai et al., 2003), se sabe también que dichos receptores no son los únicos responsables en la introducción de la bacteria en la célula. El conocimiento de las moléculas involucradas en las caveolas/balsas lipídica que posiblemente puedan ser utilizadas por *Brucella* para entrar en su célula huésped, contribuiría en el estudio de los mecanismos de virulencia usados por este patógeno para causar enfermedad. Además, este descubrimiento aportaría elementos para entender mejor la patogénesis de la brucelosis, así como para el desarrollo de estrategias de tratamiento, como fármacos y drogas, dirigidas hacia estos receptores de *Brucella*.

En el presente trabajo proponemos identificar la existencia de moléculas de las caveolas/balsas lipídicas de la membrana de los macrófagos que permitan la interacción con *Brucella* spp.

III. Objetivo General

Identificar si Cav1 y otras moléculas de las balsas lipídicas interaccionan con *Brucella abortus* S19 y 2308 para su internalización.

Objetivos particulares

- Identificar si Cav1, como integrante de las balsas lipídicas interacciona con *B. abortus* 2308 y S19 para su internalización.
- Identificación de proteínas de las membranas de células J774A.1 diferente a Cav1 como moléculas que están relacionadas con las caveolas/balsas lipídicas y que podrían ser utilizadas por *Brucella* spp para invadir a las células.

IV. Hipótesis

Brucella abortus S19 y 2308 utilizan moléculas involucradas en la vía dependiente de caveolas (balsas lipídicas) de las células eucariotas, para invadirlas.

V. Material y Métodos

5.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *B. abortus* 2308 (cepa de referencia, perteneciente al cepario del Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis, UNAM) y la cepa vacunal de *B. abortus* S19 (proporcionada por Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE)) fueron crecidas a 37° C en caldo brucella con agitación orbital a 100 xg durante 18 h para las cepa 2308 y 22 h para la cepa S19 (De la Rosa, 2000).

5.2. Inmunofluorescencias de la colocalización de *Brucella* con Cav1 en macrófagos J774 A.1

Se utilizaron macrófagos murinos de la línea celular J774 A.1 ATCC (5×10^5 células/ml) para determinar la distribución de las balsas lipídicas y la colocalización del marcador Cav1. Las células fueron sembradas en medio de cultivo celular DMEM (Invitrogen N. York, E.U), suplementado con suero fetal bovino al 5%, glutamina 2 mM, (Invitrogen N. York, E.U.) y aminoácidos no esenciales al 5% (Invitrogen N. York, E.U) (medio de cultivo celular DMEMc), sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pozos y se incubaron a 37° C toda la noche. Las células fueron lavadas con amortiguador de fosfatos salino (PBS) y se agregó medio de cultivo celular sin suero, glutamina y aminoácidos; se dejaron reposar durante 2 h. Posteriormente fueron inoculadas con las bacterias a una multiplicidad de infección (MOI) de 100:1 a los tiempos de 1, 5, 15 y 30 min. Después de la infección, se realizó inmunofluorescencia a las células, las cuales fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 3% en PBS durante 15 min. Las células fijadas fueron lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas con Triton X-100 al 0.025% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluido en PBS, después se lavaron con PBS-saponina al 0.1% durante 1 min y con PBS-saponina al 0.05% durante 1 min; posteriormente fueron bloqueadas con suero de caballo al 10% diluido en PBS-saponina al 1% e incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-Cav1 (Santa Cruz, Biotechnology San Diego, USA) y anticuerpo policlonal de cabra anti-brucela, a temperatura ambiente por 1 hora y marcadas con un segundo anticuerpo Alexa Fluor 488® y Alexa Fluor 594®, en el caso del triple marcaje se utilizó Cyn-

5Fluor (Santa Cruz, Biotechnology San Diego, USA). Como control positivo a la unión a caveolas se usó la subunidad B de la toxina de cólera (CTB-FITC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finalmente, fueron lavadas y montadas con Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para evaluar la colocalización entre *B. abortus* S19 ó 2308 con Cav1. Se realizó el conteo de al menos 100 bacterias intracelulares en un microscopio de fluorescencia (Leica DM1000). La colocalización de las bacterias con Cav1 se corroboró con un microscopio confocal (Olympus F10). Los experimentos se hicieron con 3 repeticiones cada experimento y los resultados se expresan en porcentajes de colocalización de *Brucella* con Cav1.

5.3. Porcentaje de colocalización de las células tratadas con la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) en células infectadas por *Brucella*

Las células J774A.1 (5×10^5) fueron sembradas en placas de 24 pozos (Sarted) como se indicó en el punto 5.2. y fueron pre-incubadas a 37° C durante 30 min, con 0.74 nM de CTB-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Matveev *et al.*, 2001; Van Hamme *et al.*, 2008) o con medio de cultivo celular DMEM como control. Después del tratamiento las células fueron infectadas con *B. abortus* 2308 ó S19 durante 1, 5, 10 y 30 min a una MOI de 100:1; posteriormente fueron lavadas, fijadas y analizadas en un microscopio de fluorescencia y confocal, como se indicó en el punto 5.2.

5.4. Efecto de la inhibición de las caveolas durante la infección de *Brucella*

Con la finalidad de verificar la importancia de las balsas lipídicas durante la entrada de *Brucella* a las células, se utilizaron dos fármacos con diferentes acciones inhibitoras sobre las balsas lipídicas, para posteriormente realizar infecciones con *Brucella*.

Las células J774A.1 (5×10^5) fueron sembradas en placas de 24 pozos (Sartedt) como se indicó en el punto 5.2. y fueron pre-incubadas a 37° C durante 30 min, ya sea con 25 µg/ml de nistatina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), cuya función es destruir las caveolas (Zhu *et al.*, 2011), y con 10 mM de metil-β-ciclodextrina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (que ejercen su efecto sobre esfingolípidos y colesterol, destruyendo la funcionalidad de las caveolas) o con 0.74 nM de CTB-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Matveev *et al.*, 2001; Van Hamme *et al.*, 2008) o con medio de cultivo celular DMEM como control. Después del tratamiento las células fueron

infectadas con *B. abortus* 2308 ó S19 durante 1, 5, 10 y 30 min a una MOI de 100:1; posteriormente fueron lavadas, fijadas y analizadas en un microscopio de fluorescencia y confocal, como se indicó en el punto 5.2.

5.5. Efecto de la inhibición de las caveolas durante la multiplicidad intracelular de *Brucella*

Un total de 1×10^5 células/pozo, fueron sembradas en placas de 24 pozos, las células fueron pre-incubadas 30 min a 37° C, ya sea con 25 µg/ml de nistatina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Zhu *et al.*, 2011), 10 mM de metil-β-ciclodextrina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.74 nM CTB-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) o con medio de cultivo celular DMEM como control (Van Hamme *et al.*, 2008). Después de este tiempo las células fueron infectadas con *B. abortus* 2308 ó S19 a una MOI 100:1. Después de 15 min, los pozos fueron lavados 5 veces con PBS y se añadió DMEM (Invitrogen, N. York, E.U.) sin suero con 100 µg/ml de gentamicina; el cual se consideró como el T0; se lavaron los macrófagos y se lisaron con Tritón al 0.1% a los tiempos 0, 4, 8 y 24 h y se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en agar brucella. El inóculo inicial fue diluido y sembrado en agar brucella para verificar a posterior la viabilidad y cantidad de bacterias inoculadas.

5.6. Análisis de la composición de las balsas lipídicas involucradas en la interacción de *Brucella*

5.6.1. Extracción de la membrana externa de *B. abortus* S19

Se tomaron 5 g de biomasa de *B. abortus* S19, previamente inactivada a 90° C/40 min. Se hicieron dos lavados con PBS y se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min, posteriormente se adicionaron en 10 ml de PBS y se procedió a sonicar durante 3 ciclos con 1 minuto de pulsación con una potencia 1500 ghz y 1 minuto de descanso, se centrifugó a 15000 xg /2 min, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 15000 xg durante 30 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó Triton al 2%, incubándose a 37° C durante 30 min, esto se hace con la finalidad de separar membranas externas de membranas internas; posteriormente se centrifugó a 15000 xg durante 30 min, se removió el sobrenadante, el cual correspondería a las

membranas internas. El pellet se resuspendió con 1 ml de PBS y se centrifugó a 15000 xg durante 30 min, se retiró el sobrenadante y se guardó a -20° C y el pellet se resuspendió con PBS en 100 µl, se le adicionó PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM y cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se almacenaron las alicuotas a -20° C.

5.6.2. Preparación de las células para la purificación de las balsas lipídicas

Para la obtención de fracciones enriquecida de balsas lipídicas se levantó la monocapa con un total de 1×10^8 células, se centrifugaron a 1000 xg durante 5 min, se decantó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 340 µl del buffer TEN (Tris-HCl 2M, EDTA 0.25M pH 8, NaCl 1M), se realizaron gradientes con Optiprep (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) de 40%, 30% y 5%, se centrifugó a 60000 xg durante 2 horas a 4° C, se obtuvieron 7 fracciones, los cuales se recolectaron, se cuantificaron la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se guardaron a -20° C (Yuan *et al.*, 2002), posteriormente se realizaron ensayos de Western blot de las fracciones, las cuales se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12% a 30 mA durante 45 min, posteriormente se transfirieron a membranas de PDVF (Polivinilidene fluoride Thermo Scientific, USA), una vez terminada la transferencia se bloquearon con solución de bloqueo (PBS con leche semidescremada al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente, después se incubaron las membranas con los anticuerpos primario policlonal de conejo IgG anti-cav1 (Santa Cruz, diluido 1:1000) como control de balsas lipídicas (Santa Cruz diluido 1:1000) y como control negativo el anticuerpo monoclonal de ratón IgG anti-actina (Santa Cruz diluido 1:1000) todos diluidos en PBS. Se incubó durante 1 h, las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario de conejo IgG- (Fc): peroxidasa de rábano conjugada (HRP) (AbD SeroTec, E.U.), las membranas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.3% durante 5 min y con PBS y se revelaron con el sistema de quimioluminiscencia (SuperSignal® West Femto Thermo scientific, Rockford, USA).

5.7. Inmunoprecipitaciones de las proteínas de membrana externa *B. abortus* S19 con las proteínas de las balsas lipídicas de las células

Las fracciones que se obtuvieron de la extracción de las balsas lipídicas se corrieron en un gel de doble dimensión (2-D) de la siguiente manera: primero se procedió a tratar 25 µg de las proteínas de las células obtenidas de las balsas lipídicas con el ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con la finalidad de eliminar las concentraciones de sales presentes en la muestra, posteriormente las proteínas (25 µg) fueron colocadas en tiras de IPG (isoelectroenfoque Ready Strip™ IPG Bio-Rad, USA) en pH 3-7. Después las tiras fueron rehidratadas en un Protean IEF Cell Bio-Rad por 50 V 20° C durante 12 h, seguido por los parámetros de enfoque que fueron los siguientes: 250 voltaje (V) linear, incrementándose a 4000 V durante 2 h y finalmente a 10000 V. Posteriormente las tiras fueron equilibradas con buffer de equilibrio I y II (ReadyPrep™ 2-D Starter Kit BioRad) y se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 12% y los geles fueron teñidos con Coomasie (Wiley, 2007).

Para realizar las inmunoprecipitaciones se hizo lo siguiente: se tomo 60 µg de las proteínas de las células J774 con 60 µg de las proteínas de la membrana externa de *Brucella abortus* S19 se le adicionaron 300 µl de Fosfato de sodio 0.01M, cloruro de sodio 0.15M, pH 7 y anticuerpo policlonal de conejo anti-*Brucella* diluido 1:50, se dejaron incubando en agitación a 4° C toda la noche, posteriormente se le adicionaron 5 µl de proteína A (Aff-gel Protein A gel BioRad Laboratories, USA), y se incubaron 30 min a 4° C, posteriormente se centrifugaron a 1000 xg 10 min a 4° C, el sobrenadante se colocó en otro de la mezcla obtenida se tomaron aproximadamente 200 µl se adicionaron 20 µl del el buffer de Laemmli (Laemmli, 1970) y se calentó a 95° C y se corrió un gel SDS-PAGE (los resultados no se muestran); y los otros 200 µl restantes se corrieron en geles de doble dimensión. El procedimiento se hizo de la siguiente manera: primero se cuantificó la concentración de proteína y a 25 µl (25 µg) de proteína de interés se procedió a tratar con el ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, USA) con la finalidad de eliminar las concentraciones de sales presentes en la muestra. Las proteínas (25 µg) fueron colocadas en tiras IPG (isoelectroenfoque Ready Strip™ IPG Bio-Rad, USA) de pH 3-7. Después las tiras se rehidrataron en un Protean IEF Cell Bio-Rad a 50 V a 20° C durante 12 h, incrementándose a 250 V linear, 4000 V durante 2 h y finalmente a 10000 V. Posteriormente las tiras fueron equilibradas con buffer de

equilibrio I y II (ReadyPrepTM 2-D Starter Kit BioRad) y se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 12% y se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con Coomasie y fueron transferidos a una membrana de PDFV y por afinidad esta membrana fue incubada con las proteínas de la membrana externa de la bacteria (1:1000 diluida en PBS) a 4° C toda la noche, posteriormente fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-brucella (1:1000 diluido en PBS) a 4° C toda la noche, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG HRP (1:10000) durante 1 hora a 4° C, se lavó tres veces con PBS -Tween 20 al 0.3%, y una sola vez se lavó con PBS y se reveló con el sistema de quimioluminiscencia.

Las proteínas identificadas en los geles de doble dimensión se cortaron y se analizaron para la microsecuenciación realizada en la Unidad de Proteómica Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, México.

5.8. Identificación de proteínas localizadas en las balsas lipídicas en células J774A.1, estimuladas con proteínas de la membrana externa de *Brucella abortus* S19

La línea celular J774A.1 se cultivó en frascos de 25 cm², en medio de cultivo DMEM (Invitrogen N. York, E.U.), suplementado con suero fetal bovino al 5%, glutamina 2 mM, (Invitrogen N. York, E.U.) y aminoácidos no esenciales al 5% (Invitrogen N. York, E.U.) (medio de cultivo celular DMEMc), hasta tener una confluencia del 80% (5 millones de células por frasco aproximadamente). Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se agregó medio de cultivo celular sin suero y se dejaron reposar 2 h. Las células fueron estimuladas con 20 µg del extracto de las proteínas de la membrana externa de *B. abortus* S19 (se realizó una estandarización con concentraciones de 10, 20, 40 µg de proteínas de la membrana externa de la bacteria, no se muestran los resultados). La interacción de las células J774 con los componentes proteicos de *Brucella* se analizó a los 1, 5 y 15 min. Después de la estimulación se procedió a realizar la purificación de las balsas lipídicas, el procedimiento se realizó como se menciona en el punto 5.6.2. Posteriormente se realizó una inmunoprecipitación de la fracción 4 y 5 con Cav1 a una dilución 1:1000 y se dejaron incubando toda la noche a 4° C obteniendo un volumen final de 500 µl, el cual se le adicionó 5 µl de proteína A y se incubaron a 4° C durante 30 min, para centrifugarse a 6000 xg durante 5 min. Al sobrenadante del pellet que se formó se le adicionaron 15 µl de solución de Laemmli

(Laemmli, 1970) y se corrió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. Las proteínas identificadas en los geles SDS-PAGE se cortaron las bandas aleatoriamente (en donde se obtuvo mayor expresión de la proteína) y se analizaron sólo 10 bandas por microsecuenciación realizada en la Unidad de Proteómica Instituto de Biotecnología UNAM.

5.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las inmunofluorescencias cuantificando el porcentaje de las colocalizaciones entre las bacterias con Cav1 a los diferentes tiempos de incubación (1, 5, 15 y 30 min) fueron evaluados con la prueba de t de Student y los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar. El valor $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico de cada tratamiento fue analizado por el programa Prism3, versión 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

VI. Resultados

6.1. Porcentaje de colocalización de *Brucella* con caveolina (Cav1) en macrófagos murinos J774A.1

Para evidenciar la interacción de *B. abortus* con las caveolas, se realizaron los experimentos de colocalización con Cav1 (Figura 3). Para tal efecto se contabilizaron cien bacterias y de cada una se verificó si colocalizaban o no con la proteína Cav1. Se encontró que existe un 50% de colocalización de Cav1 desde el primer minuto de incubación para las cepas 2308 y S19 (Figura 4), pero en tiempos posteriores (5, 15 y 30 min) se observa una disminución importante en el porcentaje de colocalización, es decir, la colocalización fue tiempo-dependiente, posterior a los 15 min de incubación la colocalización se había reducido al 25% para ambas cepas. Es interesante notar que a los 30 min la colocalización disminuyó hasta un 15-16% de la inicial. La cinética de colocalización de las cepas 2308 y S19 con Cav1 presentes en la membrana de los macrófagos fue muy similar en ambas cepas (Figura 4).

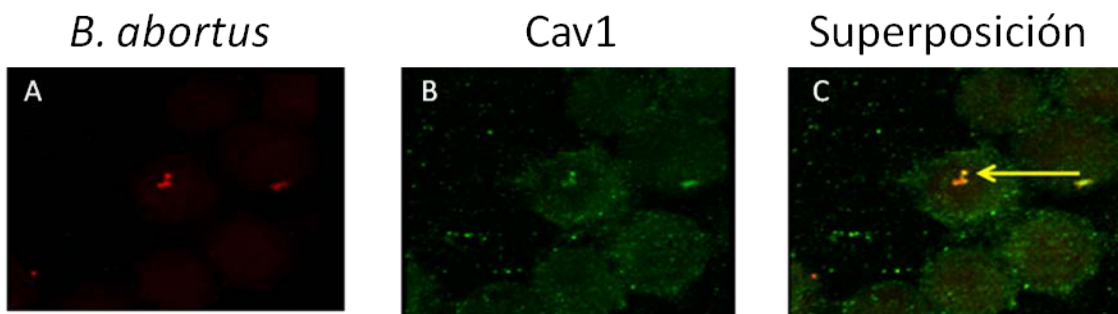


Figura 3. Fotos de microscopía confocal de la interacción de *B. abortus* S19 con Cav1. Las células J774A.1 fueron infectadas a una MOI de 100:1 durante 1 min. Después de varios lavados fueron fijadas e incubadas con el anticuerpo correspondiente en la imagen. A) Las bacterias se tiñeron con un fluorocromo Alexa 594 (rojo), en la imagen B) Cav1 fue teñida con un fluorocromo Alexa 488 (verde) y en la imagen C) se observa la colocalización de color amarillo representado con la flecha. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con sus réplicas.

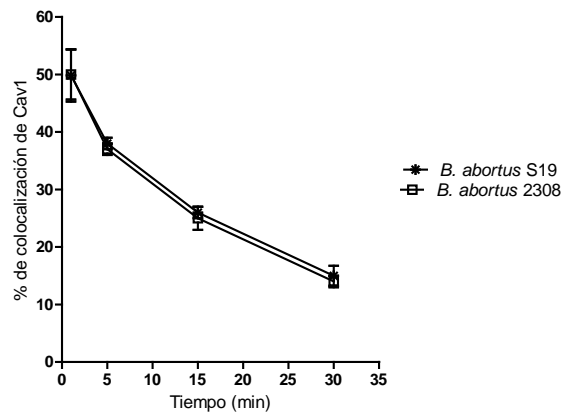


Figura 4. Porcentaje de colocación de Cav1 con *Brucella* S19 y 2308 por inmunofluorescencia.

6.2. Porcentaje de las células tratadas con la subunidad B de la toxina cólera (CTB) en células infectadas por *Brucella*

La CTB se utiliza como marcador de las caveolas, la cual interactúa con la Cav1, por lo que para corroborar la presencia de Cav1 en las balsas lipídicas, se utilizó la CTB como control (Doherty and McMahon, 2009; Matveev *et al.*, 2001) (Figura 5A).

Con la finalidad de evidenciar si la bacteria estaba utilizando las caveolas para entrar dentro de los macrófagos se procedió a hacer un triple marcaje entre Cav1, *B. abortus* y CTB-FITC por el método de inmunofluorescencia. Los resultados mostraron solo colocación entre Cav1 y CTB-FITC, pero no entre Cav1 y *B. abortus*, lo cual se sugiere que la CTB-FITC ocupa previamente la caveola impidiendo la unión de las cepas S19 y 2308 (Figura 5B).

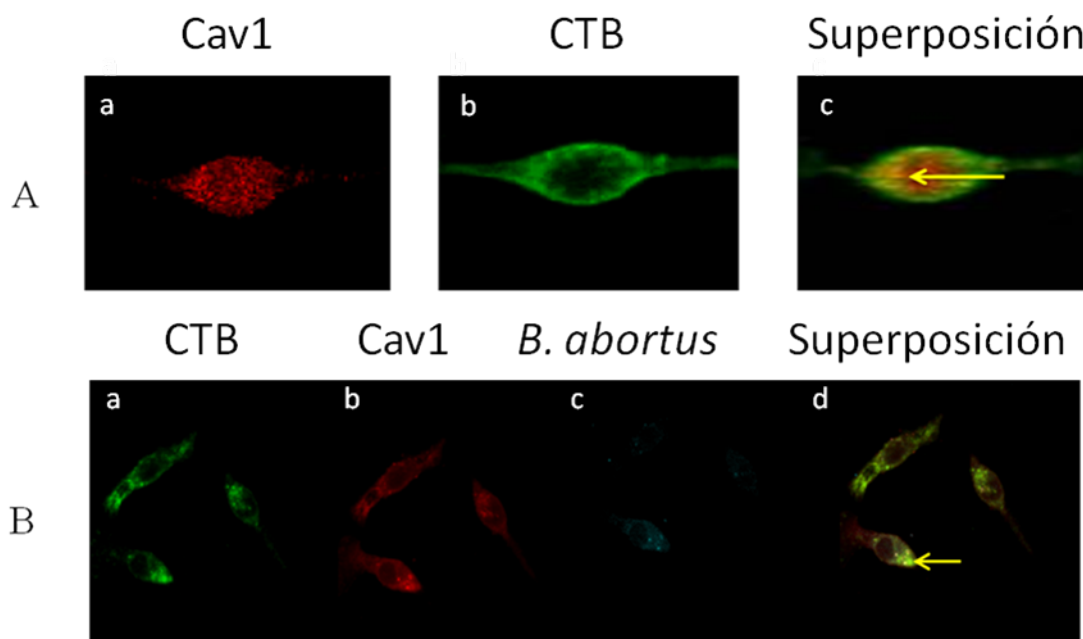


Figura 5. Fotos de microscopía confocal de la interacción de CTB con *B. abortus* S19. Visualización de macrófagos J774A.1 tratados con CTB durante 30 min a 37° C (A y B) e infectados con S19 a una MOI de 100:1 durante 1 min. Después de varios lavados fueron fijadas e incubadas con el anticuerpo correspondiente. (A) En la primera secuencia de imágenes observamos la colocación de Cav1 con CTB. En el inciso B indica la superposición de CTB con Cav1 y *Brucella*. El color amarillo indica colocación de CTB con Cav1 (señalado con flechas de color amarillo). Imagen representativa de tres experimentos independientes.

6.3. Efecto de la CTB en la invasión durante la entrada de *Brucella* a las células

Se observó que a los 15 min posteriores a la entrada en el T0 (tiempo cero) la internalización de *B. abortus* S19 disminuyó 2 log en las células tratadas (4.1×10^5 UFC/ml), en comparación con las células no tratadas (1.3×10^7 UFC/ml); sin embargo, a tiempos posteriores (4, 8 y 24 h) el número de UFC/ml decreció paulatinamente.

Por otro lado, el número de bacterias intracelulares de la cepa 2308 al T0, fue 2 log menor en las células tratadas con CTB (1×10^5 UFC/ml), comparada con el control (1.2×10^7 UFC/ml); sin embargo, a las 8 y 24 h post-infección las UFC/ml se mantuvieron a los mismos niveles de multiplicidad (3×10^4 UFC/ml) en comparación con el grupo control; en tiempos posteriores (8 y 24 h) el número de bacterias viables permanece constante en las células tratadas (Figura 6).

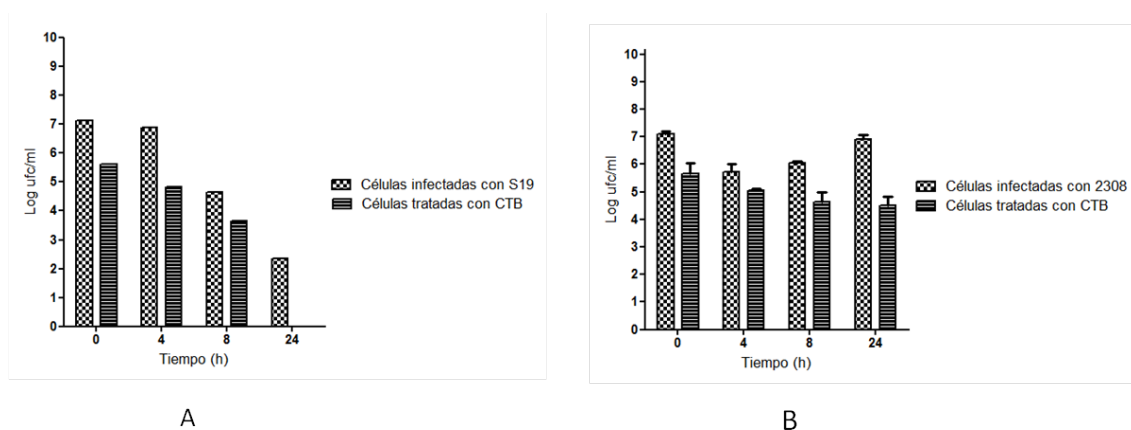


Figura 6. (A) Efecto del tratamiento con CTB en los macrófagos infectados con *B. abortus* S19 durante 0, 4, 8 y 24 h. Cada valor es representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. (B) Efecto de la CTB en las células infectadas con la cepa 2308 durante 0, 4, 8 y 24 h. Cada valor es representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

6.4. Efecto de la inhibición de las caveolas durante la internalización de *Brucella*

Para confirmar la entrada de *B. abortus*, se utilizaron los fármacos nistatina y metil- β -ciclodextrina, que ejercen su efecto sobre esfingolípidos y colesterol, destruyendo la funcionalidad de las caveolas (Simmons and Toomre, 2001). Se observó que la nistatina y la metil- β -ciclodextrina redujeron significativamente el porcentaje de colocación de ambas cepas con Cav1, pues desde el min 1 de incubación se encontró una colocación de solo el 2% (Figura 7A y B) ($p < 0.05$) y que dicho efecto permaneció tiempos posteriores como se muestra en la figura 7C.

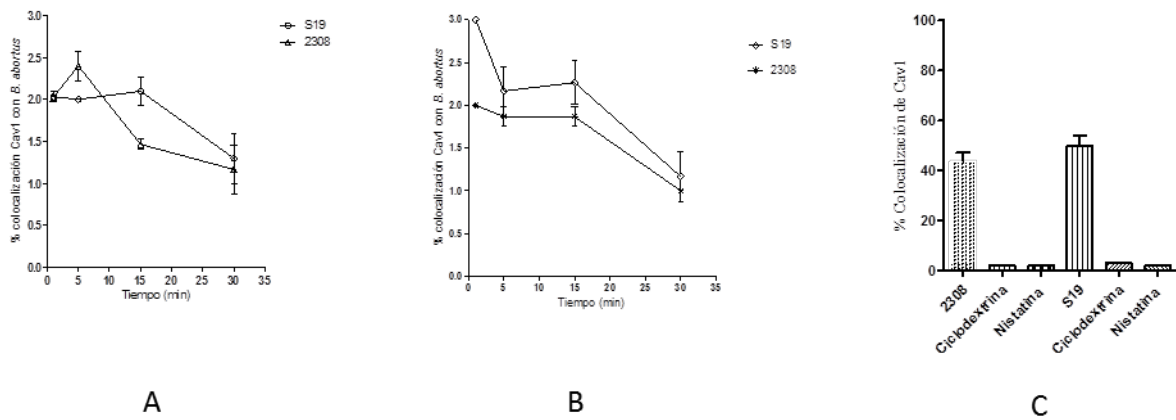


Figura 7. Porcentaje de colocación de Cav1 con *B. abortus* S19 o 2308. Las células J774A.1 fueron tratadas ya sea con nistatina (25 μ g/30 min) (A) o con metil- β -ciclodextrina (0.5 mM/30 min) (B) y fueron infectadas a una MOI 100:1 durante 1, 5, 15 y 30 min, fijadas y teñidas para inmunofluorescencia. El análisis estadístico demostró significancia estadística entre el porcentaje de colocación de Cav1 previas al tratamiento e infectadas con S19 ó 2308 (solo se muestra al min 1) ($p < 0.05$) (C).

6.5. Efecto de la inhibición de las caveolas durante la multiplicidad intracelular de *Brucella*

Para comprobar los efectos biológicos que tienen los inhibidores dado que una de las características fundamentales de la virulencia de la bacteria reside en su capacidad de replicarse en el interior de la célula huésped, se analizó la multiplicación intracelular de ambas cepas en macrófagos J774A.1, previamente tratados ya sea con nistatina o metil- β -ciclodextrina. Se observó que a los 15 min posteriores a la entrada, T0 (tiempo cero) la internalización de *Brucella* S19 disminuyó 2 log en las células tratadas con nistatina (6.5×10^5 UFC/ml), en comparación con las células no tratadas (1.3×10^7 UFC/ml); sin embargo, a tiempos posteriores (4, 8 y 24 h) el número de UFC/ml decreció en la misma proporción en ambas condiciones (células tratadas con y sin nistatina). En el caso de las células tratadas con metil- β -ciclodextrina e infectadas con S19 encontramos una disminución de 2 log (3.2×10^5 UFC/ml) al momento de la entrada de las bacterias, con respecto al control sin tratar con la droga; sin embargo, observamos que a tiempos posteriores de incubación el número de UFC/ml intracelulares decreció 2 log en la misma proporción para ambas condiciones (células tratadas con y sin metil- β -ciclodextrina (Figura 8).

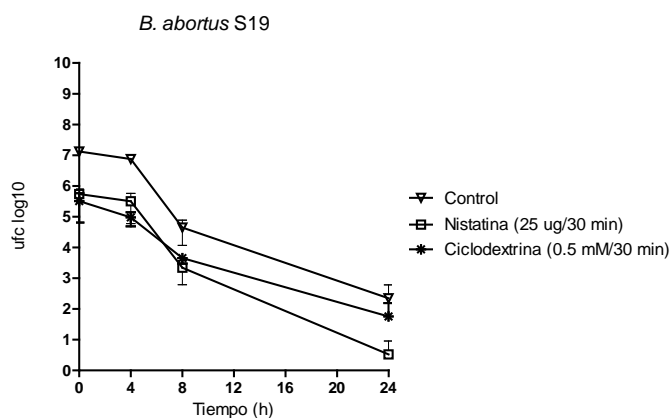


Figura 8. Efecto de la nistatina y metil- β -ciclodextrina en las células J774 infectadas con *B. abortus* S19. Las células J774A.1 fueron tratadas ya sea con nistatina (25 μ g/ml) o metil- β -ciclodextrina (0.5 mM/ 30 min), e inoculadas con S19 con una MOI 100:1 durante 0, 4, 8 y 24 h. El error de barras y los puntos de los datos representan la media de las UFC de muestras independientes realizados por triplicado y su desviación estándar.

Por otro lado, el número de bacterias intracelulares de la cepa 2308 al T0, fue 2 log menor en las células tratadas con nistatina (1.4×10^5 UFC/ml), comparada con el control (1.2×10^7 UFC/ml); sin embargo, a las 8 y 24 h las UFC/ml se mantuvieron a los mismos niveles de multiplicidad (4.7×10^5 UFC/ml). Cuando las células fueron tratadas con metil- β -ciclodextrina e infectadas con la cepa 2308 también observamos un efecto inhibitorio al T0 (1.3×10^5 UFC/ml) en comparación con el grupo control (Figura 9); en tiempos posteriores (8 y 24 h) el número de bacterias viables permanece constante.

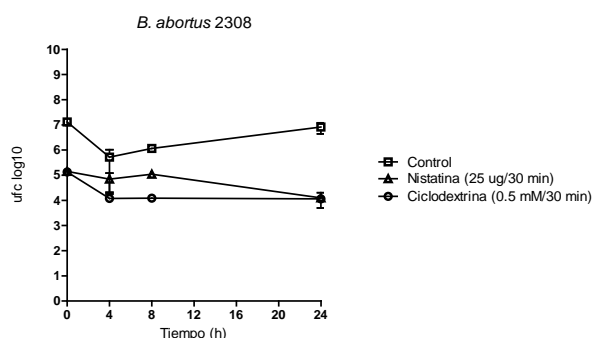


Figura 9. Efecto de la nistatina y metil- β -ciclodextrina en las células J774 infectadas con *B. abortus* 2308 con una MOI 100:1 durante 0, 4, 8 y 24 h. El error de barras y los puntos de los datos representan la media de las UFC de muestras independientes realizados por triplicado y su desviación estándar.

Estos resultados en conjunto indican que ambas cepas se ven afectadas a períodos de incubación cortos (previos a 15 min) y que es mediada por las caveolas ya que es importante al momento de la entrada de *B. abortus* a las células; adicionalmente sugiere que el efecto en la disminución del número de bacterias a tiempos tardíos se debe a la reducción en el número de bacterias que entraron en las células tratadas con nistatina o metil- β -ciclodextrina, probablemente tomando más tiempo para su replicación, o bien permitiendo al macrófago controlar la infección.

6.6. Análisis de la composición de las balsas lipídicas involucradas en la interacción de *Brucella*

Una de las características de las balsas lipídicas es que permite la asociación de estas proteínas para la señalización. Por eso se evaluó si las proteínas de las balsas lipídicas interaccionan con las proteínas de la membrana externa de *Brucella*.

La centrifugación nos permitió separar la membrana en 7 fracciones, se utilizó como control positivo a la Cav1, proteína presente en las balsas lipídicas, por lo que se encontró a las balsas lipídicas en las fracciones 3, 4, 5 y 6, como se observó en el ensayo de Western blot revelado con anticuerpos (Figura 10).

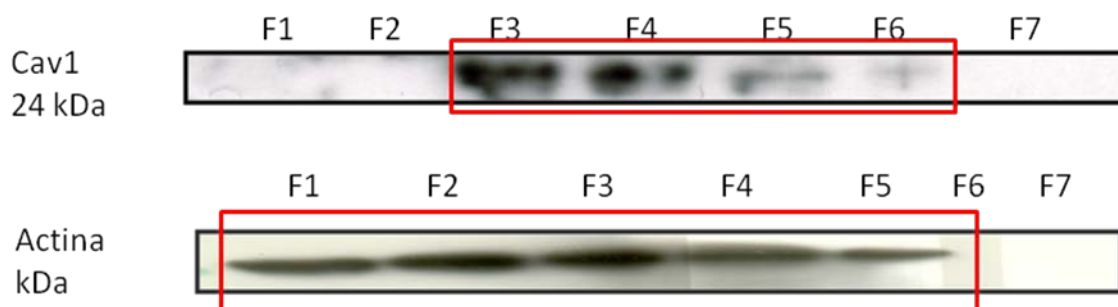


Figura 10. Western blot de Cav1 (40 μ g) de las fracciones obtenidas de los gradientes de optiprep.

Una vez identificadas las fracciones donde se encontró el mayor enriquecimiento de balsas lipídicas se separaron las proteínas por medio de electroforesis, posteriormente se hicieron inmunoprecipitaciones como se menciona en la metodología (apartado 5.7.) de las cuales se corrieron geles de dos dimensión (Arellano *et al.*, 2005). Para realizar el análisis de estos puntos identificados se hizo lo siguiente: se compararon los geles de doble dimensión de la de las células (Figura 11) con los puntos que se identificaron en la inmunoprecipitación (Figura 12).

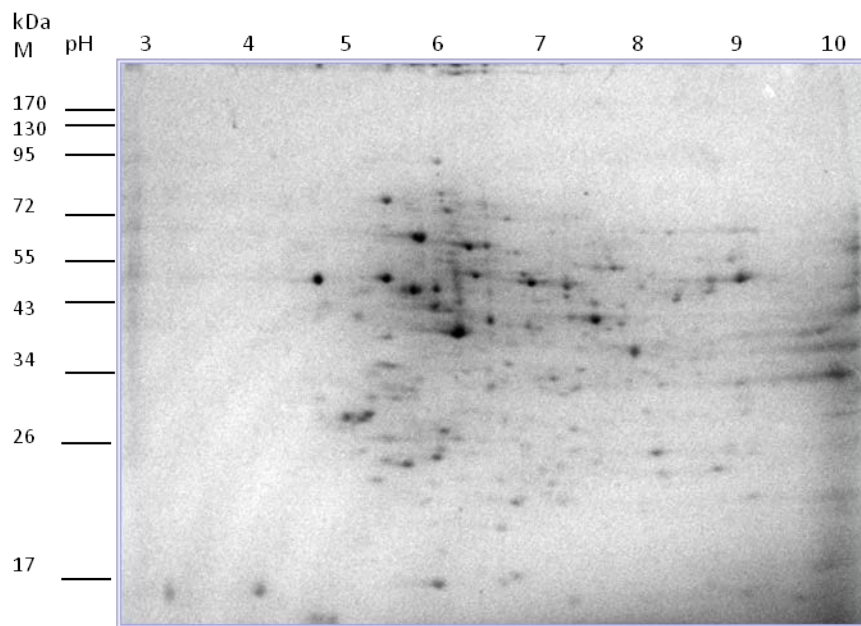


Figura 11. Proteínas de la línea celular J774A.1 (100 µg) en un gel de 2-D enfocadas en tiras IPG con un rango de pH de 3 a 10, migradas en un gel SDS-PAGE al 12%. Teñida con Coomassie.

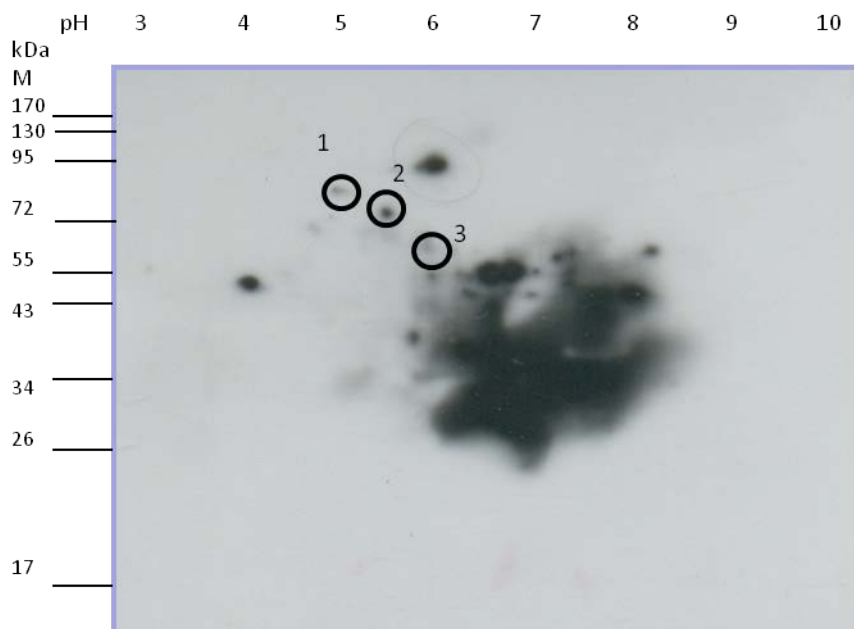


Figura 12. Western blot de las proteínas de la línea J774A.1 (100 µg) inmunoprecipitadas con las proteínas de la membrana externa de *Brucella abortus* S19 en un gel de 2-D enfocadas en tiras IPG con un rango de pH de 3 a 10, migradas en un gel SDS-PAGE al 12%. Reveladas con estreptoavidina-peroxidasa 1:10000 y reveladas

con quimioluminiscencia en autorradiografía. Los círculos indican una interacción de las proteínas de la membrana externa con las proteínas de los macrófagos.

Posteriormente las proteínas identificadas fueron analizadas con las proteínas de las células J774A.1 esto se realizó con el programa Melanie Viewer 7.0 (Figura 13) y se identificaron estas proteínas por secuenciación. Entre las proteínas que mayor se expresaron en la fracción correspondiente a las balsas lipídicas, se encontraron proteína de choque térmico 90 (92 kDa pI 4.7 miembro beta 1 HSP90B1), valosina (89.3 kDa pI 5.2 proteína importante para la unión de la clatrina) (Pleasure *et al.*, 1993) y proteína de choque térmico 70 proteína reguladora del precursor de glucosa (72 kDa pI 6.1).

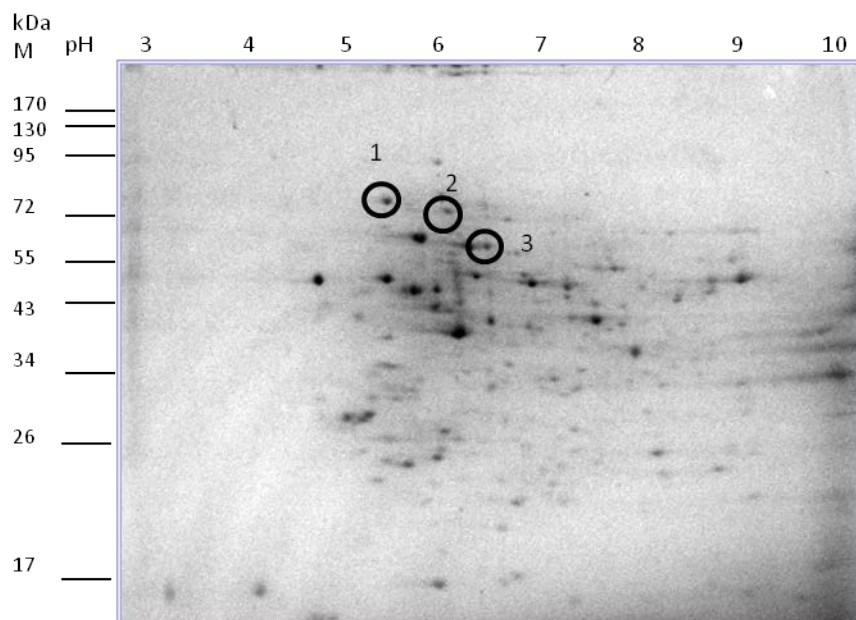


Figura 13. Proteínas de la línea celular J774A.1 (100 µg) en un gel de 2-D enfocadas en tiras IPG con un rango de pH de 3 a 10, migradas en un gel SDS-PAGE al 12%. Teñida con Coomassie. Los números en cirulos (1-3) son las proteínas identificadas. 1: HsP90, 2: Valosina, 3: Proteína reguladora de la glucosa 72 kDa.

6.7. Identificación de proteínas localizadas en las balsas lipídicas en células J774A.1 estimuladas con proteínas de la membrana externa de *B. abortus* S19

Aunque por tecnología de proteínas, se han identificado la presencia de proteínas de señalización en las balsas lipídicas, se desconoce cuál o cuáles son las proteínas que se asocian a las balsas lipídicas al momento de la infección de *B. abortus*, por lo que se expusieron las células con las proteínas de la membrana externa de *B. abortus* S19 y se realizó la metodología como se especifica en el punto 5.11, los péptidos resultantes se cortaron y se analizaron por microsecuenciación. En el cuadro 1 se muestra el número de bandas analizadas, el peso molecular aproximado, su punto isoeléctrico, y su identidad con proteínas en bases de datos (reconocimiento).

Cuadro 1. Representa 14 proteínas por análisis proteómico.

Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)	Proteína identificada
90	9.2	Proteína de choque térmico HSP 90
70	5.2	Proteína de choque térmico HSP 70
71	8.6	Fosfoglucomutasa
74	5.6	NADH deshidrogenasa (ubiquinona)
60	5.8	Proteína de choque térmico HSP 60
59	6.2	Seryl-aminocil-tRNA sintetasa
58	7.2	M2 tipo piruvato kinasa
58	4.8	Importina subunidad alfa 4
53	6.8	6-fosfatoglucano deshidrogenasa
50	6.3	ARP-3 Elongación factor gamma 1
48	9.4	Anexina 2

42	5.3	Actina
35	4.9	Anexina V
36	6.6	Receptor de proteína kinasa

VII. Discusión

Una de las características de las caveolas/balsas lipídicas es actuar como vía de entrada de microorganismos, estas forman invaginaciones cuando interactúan con los patógenos. Las caveolas se localizan en la superficie de las células y están formadas principalmente de caveolina 1 (Cav1). La Cav1 es una proteína que pesa 22 kDa y es fundamental para la biogénesis de las caveolas (Jin *et al.*, 2011; Matveev *et al.*, 2001; Sonnino and Prinetti, 2013); sin embargo, pocos estudios se han realizado acerca de la interacción de *B. abortus* con Cav1, y de la identificación de las proteínas de las balsas lipídicas que participan durante la entrada de la bacteria. La interacción de la bacteria con las células huésped es básico en el reclutamiento de moléculas de señalización de las balsas lipídicas (Lafont and Van der Goot, 2005).

En este trabajo nosotros analizamos las moléculas presentes en las balsas lipídicas presentes en los macrófagos que están interactuando con *Brucella abortus* S19 y 2308 y la asociación de Cav1 con *Brucella*.

B. abortus invade una variedad de células, incluyendo a los macrófagos, células HeLa, fibroblastos, células Vero (Celli *et al.*, 2003). En el presente trabajo observamos que esta proteína está interactuando tanto con la cepa vacunal S19 como con la cepa virulenta 2308, ambas se comportan de igual manera al momento de infectar a los macrófagos y promueven su internalización; sin embargo, en tiempos posteriores (24 h) la cepa 2308 se multiplica y la cepa S19 es eliminada como se espera para esta cepa vacunal. Aproximadamente el 50% de las bacterias de las cepas de *B. abortus* S19 y 2308 colocalizan con Cav1 en tiempos tempranos (1 min de incubación); sin embargo, en tiempos posteriores (5, 15 y 30 min) esta colocalización disminuye gradualmente llegando hasta un 15% en S19 y 14% en 2308, se sugiere que la vía endocítica dependiente de caveolas es una potencial vía de entrada de *Brucella* hacia la célula huésped, aunque no existen trabajos en los cuales hayan sido evaluada la proteína con las dos cepas. Cabe señalar que la colocalización de Cav1 (marcador de balsas lipídicas) fue inhibida por el tratamiento con nistatina (antimicótico cuya función es inhibir a las balsas lipídicas por medio de la unión al colesterol (Zhu *et al.*, 2011)). Se ha demostrado que la Cav1 es capaz de actuar como receptor de microorganismos como *E. coli*, en donde se utilizó la nistatina (Shin and Abraham, 2001). También es sabido que la colocalización de estos receptores de GM1 (marcador de balsas lipídicas) son inhibidos

con metil- β -ciclodextrina, (droga específica que destruye la estructura de las caveolas/balsas lipídicas por medio de la eliminación del colesterol).

Nosotros observamos un decremento en el número de bacterias viables intracelulares detectadas después del tiempo 0 en ambas cepas, con respecto a los macrófagos no estimulados con las dos drogas. Es posible que la reducción en el número de bacterias que penetraron en las células sea debido a que estas sustancias eliminan el colesterol y por lo tanto desorganizan las caveolas/ balsas lipídicas, por lo que las bacterias entrarían por otros mecanismos propios de los macrófagos como la fagocitosis (Malaviya and Abraham, 2001; Shin *et al.*, 1999).

De acuerdo a las revisiones bibliográficas realizadas Long (2012) encontró que *Cryptococcus neoformans* entra por medio caveolas/balsas lipídicas presenes en las células HBMEC se ha visto que este microorganismo interactúa con Cav1 jugando un papel esencial en este proceso (Long *et al.*, 2012). Sukumaran (2002) encontró que *E. coli* CXli K1 entra por medio de las caveolas a través del dominio Cav1 y esta proteína es importante en la formación de endosomas en la línea celular HBMEC (Ravi *et al.*, 1999; Sukumaran *et al.*, 2002).

Los datos sugieren que *B. abortus* podría utilizar a las caveolas para ingresar a las células, para fortalecer dicha teoría utilizamos marcadores específicos en dicha vía, tal es el caso de la CTB, pues se ha documentado que la CTB interactúa con Cav1 y que entra por caveolas/balsas lipídicas (Doherty and McMahon, 2009; Matveev *et al.*, 2001; Van Hamme *et al.*, 2008). Cuando se realizó la unión de CTB-FITC a caveolas, previo a la infección con la *Brucella*, se observó que la colocalización de ambas cepas con caveolas se disminuyó drásticamente. La colocalización de estos tres componentes: GM1, *Brucella* y Cav1 fortalecen la teoría del disparo de la vía endocítica como entrada; sin embargo se requiere realizar más estudios de cómo la Cav1 está jugando un papel importante en la interacción con *Brucella* aunque para ello se requiere hacer silenciamiento de Cav1 y hacer varios ensayos a diferentes tiempos de estímulo con proteínas de la bacteria.

Los resultados de este trabajo son similares a los de Köhler y colaboradores (2002) los que demostraron que el colesterol y el gangliósido GM1, dos componentes de las balsas lipídicas, son utilizados por *B. suis* en macrófagos murinos, empleando secuestradores de colesterol como la metil- β -ciclodextrina y GM1 unido a moléculas como CTB (Köhler *et al.*, 2002). En conjunto, nuestros resultados muestran que *B. abortus* 2308 y

S19, utilizan la vía endocítica dependiente de caveolas, como lo muestra su interacción con Cav1, ruta que favorece su internalización en la célula huésped; sin embargo, a tiempos tardíos, el destino de la cepa virulenta y la vacunal difieren, pues es conocido que la cepa vacunal es menos virulenta debido a una delección de 702 pb que afecta a los genes *eryC* y *eryD* del operón *ery*, los cuales participan en el catabolismo de eritritol, lo anterior posiblemente influyen para que sea fácilmente eliminada por el macrófago (Martínez *et al.*, 2006).

Por otra parte, el estímulo de macrófagos J774A.1 con las proteínas de la membrana externa indujo la presencia de balsas lipídicas. Es importante remarcar que las proteínas identificadas en el presente trabajo están participando en el momento de la interacción; sin embargo, se necesitan realizar más estudios relacionados con la interacción de *Brucella*, debido a que desafortunadamente no existen reportes que mencionen una asociación entre las proteínas identificadas por secuenciación con *Brucella* en el momento de su internalización, pero de acuerdo a nuestros resultados estas proteínas están involucradas con la interacción de *Brucella abortus* S19.

Se ha demostrado que la proteína de choque térmico Hsp70, participa en el plegamiento de diversas proteínas, en la respuesta al estrés celular y de manera importante en la inmunidad innata (Houlihan *et al.*, 2009; Tsan and Gao, 2009); la proteína de choque térmico Hsp 90, está asociado a el TLR4-MD2 y responde a la estimulación del LPS (Chen *et al.*, 2009; Triantafilou and Triantafilou, 2004; Waheed and Jones, 2002; Wandinger *et al.*, 2008); actina, forma parte del citoesqueleto. Esta proteína se localiza en los filopodios en otras protusiones de la membrana celular y por lo tanto, es importante en el movimiento celular (Tsukita and Yonemura, 1997); Arp 2/3, está involucrado en múltiples funciones, incluyendo endocitosis y motilidad celular (Lee *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012); Anexina V, se ha visto que interacciona con los microcomponentes de glicerofosfolípidos (Babiyshuk and Draeger, 2000; Diakonova *et al.*, 1997). De la identidad de estas proteínas se hace evidente su importancia en la actividad biológica de los macrófagos estimulados con las proteínas de *B. abortus*.

El análisis de la composición proteica de las balsas lipídicas ayudará a entender mejor el papel de estas estructuras de la membrana en la activación celular y patogénesis.

Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que *B. abortus* S19 y 2308 tienen la capacidad de interactuar con Cav1 de las células J774 en el momento de la internalización de manera significativa, comparada con las células tratadas con nistatina y metil- β -ciclodextrina, disminuyendo la interacción de las bacterias.

Las proteínas de balsas lipídicas identificadas como Hsp90, valosina, Hsp70, NADH deshidrogenasa, M2 tipo piruvato kinasa, Hsp60, seryl-aminocil-tRNA sintetasa, fosfoglucomutasa, importina subunidad alfa 4, tubulina, actina, 6-fosfatoglucano deshidrogenasa, ARP-3 elongación factor gamma 1, Anexina 2, Anexina V y receptor de proteína kinasa, nos indican que están involucradas en la entrada de *Brucella*.

Por otro lado, después de haber identificado mediante análisis proteómico, algunas moléculas “candidatos” que se expresan en las balsas lipídicas de las células previamente estimuladas con proteínas de *B. abortus*, es necesario confirmarlo por otros métodos (western blot, citometría de flujo, microscopía confocal). Nuestros resultados darían pie a otras investigaciones del papel importante de las proteínas en la interacción con *Brucella*. Sin embargo, en futuras investigación sería necesario elucidar cuáles serían los posibles ligandos de *Brucella* que están involucrados en la interacción con las balsas lipídicas.

IX. Bibliografía

1. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I and Gorvel JP. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 2005; 6(6):618-625.
2. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Cloeckert A and Zygmunt MS. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*. *BMC Evol Biol.* 2011;11(11):200.
3. Babiychuk EB and Draeger A. (2000). Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol.* 150(5):1113-24.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
5. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E and Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med.* 2003;198:545–556.
6. Chen H, Xia Y, Fang D, Hawke D and Lu Z. Caspase-10-mediated heat shock protein 90 cleavage promotes UVB irradiation-induced cell apoptosis. *Mol and Cell Biol.* 2009;29(13):3657–3664.
7. Chidlow JH and Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovascular Research.* 2010;86: 219–225.
8. Choudhury A, Marks DL, Proctor KM, Gould GW and Pagano RE. Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nature Cell Biol.* 2006;8(4):317-328.
9. De la Rosa, A. Zoonosis Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. INDRE, México. 2000:35-62.
10. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liautard JP, Ger van der Vusse and Griffiths G. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J of Cell Science.* 1997;110(Pt 10):1199-1213.
11. Doherty GJ and McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857-902.

12. Dykstra M, Cherukuri A, Shon HW, Tzeng SJ and Pierce SK. Location is everything lipid rafts and immune cell signalins. *Annu Rev Immunol.* 2003 21:457-481.
13. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I and Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. and *Brucella pinnipedialis* sp. for *Brucella* stains with cetaceans and seals as their preferred host. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(11):2688-93.
14. Gorvel MJ. Brucellosis in humans and animals. OIE World Organisation for Animal Health. 2006;1-89.
15. Gutiérrez P. Inmunología Veterinaria. Manual Moderno, México. 2010:46-48.
16. Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP and Moreno E. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44435-43.
17. Harvey RD and Calaghan SC. Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J of Mol and Cell Car.* 2012;52(2):366-375.
18. Houlihan J, Metzler J and Blum J. HSP90 α and HSP90 β isoforms selectively modulate MHC class II antigen presentation in B cells. *J Immunol.* 2009;182(12):7451-7458.
19. Jin Y, Lee SJ, Minshall RD and Choi AMK. Caveolin-1: a critical regulator of lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300:L151-L160.
20. Kiss AL. Caveolae and the regulation of endocytosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012;729:14-28.
21. Köhler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J and Liautard JP. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):299-309.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680-685.
23. Lafont F and Van der Goot FG. Bacterial infection via lipid rafts. *Cell Microbiol.* 2005;7:613-620.
24. Lauer SA, Iyer S, Sanchez T, Forst CV, Bowden B, Carlson K, Sriranganathan N and Boyle SM. Proteomic analysis of detergent resistant membrane domains during early interaction of macrophages with rough and smooth *Brucella melitensis*. *PLoS One.* 2014;9(3):1-13.

25. Lee JJ, Kim DG, Kim DH, Simborio HL, Min W, Lee HJ, Her M, Jung SC, Watarai M and Kim S. Interplay between clathrin and Rab5 controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of *Brucella abortus* within HeLa cells. *J Biol Chem.* 2013;288(39):28049-28057.
26. Liu SL, May JR, Helgeson LA and Nolen BJ. Insertions within the Actin Core of Actin-related Protein 3 (Arp3) Modulate Branching Nucleation by Arp2/3 Complex. *J Biol Chem.* 2012;288(1):487-97.
27. Long M, Huang SH, Wu CH, Shackelford GM and Jong A. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells. *J Biomed Sci.* 2012;19:19.
28. Malaviya R and Abraham SN. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev.* 2001;179:16-24.
29. Maldonado-García G, Chico-Ortiz M, Lopez-Marin LM and Sánchez-García FJ. High-polarity Mycobacterium avium-derived lipids interact with murine macrophage lipid rafts. *Scand J Immunol.* 2004;60(5):463-70.
30. Martín TF. Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nature Cell Biol.* 2000;2(1):E9-11.
31. Martín-Martín Al, Vizcaíno N, Fernández-Lago L. *Microbes Infect.* 2010;12(3):246-251.
32. Matveev S, Li X, Everson W and Smart EJ. The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;49(3):237-250.
33. Moreno EA, Cloeckert and Moriyon. *Brucella evolution and taxonomy. Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):209-27.
34. Naroeni A and Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside gm(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.* 2002;70(3):1640-1644.
35. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys.* 1953;24:1424.
36. Parkar NS, Akpa BS, Nitsche L, Wedgewood LE, Place AT, Sverdlov MS, Chaga O and Minshall RD. Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(6):1301-1312.
37. Pleasure IT, Black MM and Keen JH. Valosin-containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin-binding protein. *Nature.* 1993;365(6445):459-62.

38. Radin N. Preventing the binding of pathogens to the host by controlling sphingolipid metabolism. *Microbes infect.* 2006;8(3):938-945.
39. Ravi M, Zhimin G, Krishnan T, P. Anton Van Der M, and Soman A. The mast cell tumor necrosis factor a response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc. Natl Acad Sci.* 1999;96(14):8110-5.
40. Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC and Martin DW. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol.* 2009;198(4):21–238.
41. Sauret JM and Vilissova N. Human Brucellosis. *J Am Board Fam Pract.* 2002;15(5):401-406.
42. Scita G and Di Fiore PP. The endocytic matrix. *Nature.* 2010;463:464-473.
43. Shin and Abraham. Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science.* 2001;293(5534):1447-8.
44. Shin JS, Gao Z and Abraham SN. Bacteria-host cell interaction mediated by cellular cholesterol/glycolipid-enriched microdomains. *Biosci Rep.* 1999;19(5):421-432.
45. Simmons K and Toomre D. Lipids rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;98:10517-10518.
46. Sobo K, Chevallier J, Parton RG, Gruenberg J and Van der Goot FG. Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS One.* 2007;2(4):e391.
47. Sonnino S and Prinetti A. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem.* 2013;20(1):4-21.
48. Sukumaran SK, Quon MJ and Prasadarao NV. *Escherichia coli* K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase Calpha interaction in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50716-24.
49. Triantafilou M and Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem So Trans.* 2004;32(Pt4):301-304.
50. Tsan MF and Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J of Leukocyte Biology.* 2009;85(6):905-910.

51. Tsukita S and Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;15:2603-2611.
52. Van Hamme E, Dewerchin HL, Cornelissen E, Verhasselt B and Nauwynck HJ. Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 9):2147-2156.
53. Verger JM, Grimont F, Grimont PA and Grayon M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 1987;138(2):235-238.
54. Waheed A and Jones T. Hsp90 Interactions and acylation target the G protein G alfa 12 but not G alfa 13 to Lipid Rafts. *The J of Biol Chemistriy.* 2002;277(36):32409–32412.
55. Wandinger SK, Richter K and Buchner J. The Hsp90 Chaperone Machinery. *The J Biol Chem.* 2008;283(27):18473–18477.
56. Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med.* 2003;7(1):5-17.
57. Wiley Sons. Current Protocols in Protein Science. 2007.
58. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol.* 1995;1:445–458.
59. Yuan, H, Takeuchi E and Salant D. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282: F585–F591.
60. Zhu X, Zhuang, Yan., Ben, Jing-Jing, Qian, Ling-Ling, Huang, Han-Peng, Hui Bai, Sha, Jia-Hao, Zhi-Gang and He. Caveolae-dependent endocytosis is required for macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8231-8239.

**ANEXOS: SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL PRESENTE
TRABAJO**

Acrilamida (30% w/v) bis-acrilamida y 0.8% (w/v) bisacrilamida

Acrilamida 30 g

bis-acrilamida 0.8 g

Filtrar la solución

Agua destilada 250 ml

Amortiguador de gel separador 1.5 M Tris-base (pH 8.8)

Tris-base 90.828 g

Agua destilada 500 ml

pH 8.8

Amortiguador del gel concentrador 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Tris-HCl 19.7 g

Agua destilada 250 ml

pH 6.8

Persulfato de amonio (100 mg/ ml)

Persulfato de amonio 0.5 g

Agua destilada 5 ml

Buffer de Laemmli 2X

Tris HCl pH 6.8 1 ml

Glicerol 0.8 ml

SDS (w/v) 2 % 1.6 ml de una solución de SDS 10%

B-mercaptoetanol 0.4 ml

Azul de bromofenol 1 g

Agua destilada 4 ml

Buffer de corrida 10X

Tris base 30 g

Glicina 144 g
SDS 10 g
Agua destilada 1000 ml

Buffer de transferencia 10X

Tris base 24.29 g
Glicina 12.5 g
Agua destilada 1000 ml

Para preparar la solución 1X

Solución 10X 100 ml
Metanol 200 ml
Agua destilada 700 ml

Plus One coomassie tablets PhastGel Blue R-350 (GE Healthcare)

Solución stock:
1 tableta en 80 ml de agua destilada
Metanol 120 ml
Filtrar
Solución 0.1% 1 parte de la solución stock con 1 partes de 20% de ácido acético en agua destilada

Medio de cultivo celular ADVANCE DEMEM 250 ml

L-glutamina 2.5 ml
Suero Fetal Bovino al 5% 12.5 ml
ADMEM 250 ml

Medio de cultivo celular DEMEM

Suero Fetal Bovino al 10% 50 ml
Piruvato 5.5 ml
L-glutamina 5.5 ml
Aminoácidos esenciales 5.5 ml
DEMEM 500 ml

Buffer de lisis (1.5 ml)

Triton X100 10% 150 µl

Tris -HCl pH 7.5 2 M 7.5 µl

EDTA 0.25M 30 µl

NaCl 1 M 225 µl

Coctel inhibidor de proteasas 2 µl

Agua destilada 940 µl

TEN 1X sin inhibidores (1.5 ml)

Tris-HCl 2 M pH 7.5 7.5 µl

EDTA 0.25 M pH 8 30 µl

NaCl 1 M 225 µl

Agua destilada 1235 µl

30% Optiprep / TEN 1X mas inhibidores (5ml)

Optiprep 60% 2.5 ml

Tris-HCl 2 M pH 7.5 25 µl

EDTA 0.25 M 100µl

NaCl 1M 750 µl

Coctel inhibidor de proteasas 2 µl (Sigma-Aldrich, USA)

Agua destilada 1145 µl

5% Optiprep (1.5 ml)

Optiprep 60% 125 µl

Tris-HCl 2 M pH7.5 7.5 µl

EDTA 0.25 M 30 µl

NaCl 1 M 225 µl

Coctel inhibidor de proteasas 2 µl

Agua destilada 965 µl