



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA
SNAP25 DURANTE LA INFECCIÓN TEMPRANA DE
Brucella melitensis EN MACRÓFAGOS DE ORIGEN
HUMANO.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LAURA ERENDIRA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TUTOR

**ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

COMITÉ TUTOR

**ALFONSO GONZÁLEZ NORIEGA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
RICARDO OROPEZA NAVARRO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

MÉXICO, DF. MARZO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A los venerables maestros de la L. B., quienes abrieron el camino y dieron las oportunidades para iniciar y culminar este proyecto, principalmente al Gran Maestro Jeshua Ben Pandirá



A mi madre, quien no sólo estuvo detrás de mí como principal cimiento sino que, además, fungió como madre amorosa para mi hijo en todo momento mientras yo no estuve.

A mi padre, quien siempre ha visto por nosotros y ha sido nuestro sostén, no sólo económica sino también emocionalmente. Siempre tuviste las palabras de consuelo y apoyo que me impulsaron a continuar.

A Jorge, quien con su amor y valioso apoyo esperó pacientemente el cierre de este ciclo para iniciar miles nuevos juntos. Gracias amor!!

A mis hermanas de vida Silvia, Roxana y Leslie, quienes siempre estuvieron al pendiente de mí y de mi camino durante esta etapa, sobre todo en los días de encierro en la Unidad de Bioseguridad. A mi querida hermanita Osma, quien con toda la angustia del mundo me acompañó incontables fines de semana, fuera la hora que fuera. Gracias por tus mensajes, tu compañía y tu preocupación.

A todas aquellas personas, amigos y familiares, que en su momento estuvieron ahí para escucharme, apoyarme e impulsarme, ya fuera con sus palabras, sus conocimientos o su presencia.



Pero sobre todo....

A mi amado hijo DANTE, quien con tanta alegría siempre esperaba mi regreso y añoraba cada fin de semana para podernos ver, aunque a veces no sucediera.

Este trabajo, lleno de espacios entre tú y yo, está lleno de dedicación, constancia, esfuerzo, pasión, sacrificio y paciencia, esperando que sea ejemplo de vida para ti. TE AMO!

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto PAPIIT IN-221513, “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”, el cual financió la mayor parte de este trabajo de investigación y del cual es responsable el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, por la ayuda en cuanto a algunos medios de cultivo y otros reactivos, a través del área de Preparación de Medios.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular, por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio.

A mi Comité Tutor, por sus valiosos comentarios durante los tutorales y fuera de ellos, así como por el material y los reactivos proporcionados. De manera particular, al Dr. Alfonso González Noriega y su esposa Colette, por haberme enseñado el trabajo en cultivo celular, por haberme guiado en el proceso de fijación de las células para el análisis de inmunohistoquímica, por toda la orientación recibida para el análisis de las mismas una vez procesadas así como por canalizarme con el personal del laboratorio del Dr. Alfonso León, para el análisis de los ensayos por quimioluminiscencia Al Dr. Ricardo Oropeza por su apoyo en el financiamiento de los iniciadores y la Taq Polimerasa.

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso, por sus enseñanzas en el Laboratorio de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología, ya que de ella aprendí el trabajo con la bacteria *Brucella* spp. A Lázaro Verdiguel, quien me apoyó durante los ensayos de infección y las cinéticas bacterianas.

A Vania y a Rafa, del laboratorio del Dr. Alfonso León, por todo su tiempo al enseñarme la técnica de quimioluminiscencia y el análisis de las imágenes. Al Dr. Alfonso León, por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Laura Chávez Macías, por su tiempo en la sala de *postmortem* del Hospital General de México, y su confianza al proporcionarme las muestras necesarias para los controles positivos para SNAP 25.

Al Biol. Armando Medina, a Liz, Aline y a todo el personal que trabaja en el Laboratorio de Inmunohistoquímica del Hospital General de México, por abrirme las puertas del mismo y brindarme todo su apoyo, tanto en conocimientos como en equipo y reactivos. Gracias a ellos se pudo realizar la técnica de inmunohistoquímica de todas las muestras. Todos esas conversaciones fueron invaluable! Al laboratorio de Citología del Hospital General de México, por el uso del citospin.

Al Dr. Espiridión Ramos, de la UME del Hospital General de México, por su tiempo y sus valiosos comentarios con respecto a los resultados obtenidos de biología molecular. Eso me permitió reorientar mis técnicas.

Al Dr. Basurto Alcántara, por permitirme el uso de su termociclador para concluir la PCR punto final, pero principalmente por toda su ayuda al procurar mi salud, tanto mental como física.

Al Dr. Esaú Floriano Sánchez, de la Escuela Médico Militar, y al Dr. Sánchez Betancourt, del Depto. de Cerdos de la FMVZ, por todo su apoyo en cuanto a reactivos y la facilidad de utilizar los termocicladores para los ensayos piloto de la PCR tiempo real.

Al MVZ Orlando Juárez, por su asesoría en el análisis estadístico.

A todos los que no menciono por falta de espacio, pero que en su momento aportaron un granito de arena para que este trabajo se pudiera terminar. GRACIAS A TODOS USTEDES!

Este trabajo fue financiado por el proyecto:

PAPIIT IN-221513. “Modulación de proteínas de tránsito intracelular por *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos”. Segunda Parte.

Responsable: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La Brucelosis	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Diagnóstico	5
1.4 Medidas de prevención y control de la enfermedad	8
1.5 El género <i>Brucella</i> spp.....	10
1.6 Patogenia.....	13
1.7 Factores de virulencia	17
1.8 Tránsito intracelular.....	22
1.9 Proteínas de fusión que participan en la vía secretora	25
1.10 Proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP 25).....	32
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVO GENERAL	40
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 Cultivo celular	41
6.2 Cepas bacterianas	41
6.3 Ensayos de infección.....	41
6.4 Determinación del índice de fagocitosis.....	42
6.5 Extracción de ARN.....	43
6.6 Visualización y cuantificación de ARN.....	43
6.7 Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	44
6.8 Extracción de proteínas de las células THP-1	45
6.9 Cuantificación de proteínas	46
6.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 12% con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	46
6.11 Transferencia de proteínas e inmunodetección.....	47
6.12 Inmunohistoquímica	48
6.12.1 Fijación y preparación de las células.....	48
6.12.2 Inactivación de la peroxidasa endógena y recuperación antigénica.....	49
6.12.3 Inmunodetección.....	49
6.12.4 Cuantificación y detección del H-score	50
6.12.5 Análisis estadístico.....	50
7. RESULTADOS	52
8. DISCUSIÓN.....	69
9. CONCLUSIONES.....	76

10. PROSPECTIVA	77
11. LITERATURA CITADA	78
12. ANEXO	95

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y ESQUEMAS

Gráfica 1	95
Gráfica 2	95
Gráfica 3	96
Gráfica 4	66
Gráfica 5	67
Esquema 1	44
Esquema 2	45

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1.....	4
Figura 2.....	18
Figura 3.....	20
Figura 4.....	24
Figura 5.....	29
Figura 6.....	30
Figura 7.....	31
Figura 8.....	34
Figura 9.....	35
Figura 10.....	36
Figura 11.....	36
Figura 12.....	52
Figura 13.....	53
Figura 14.....	53
Figura 15.....	54
Figura 16.....	55
Figura 17.....	56
Figura 18.....	56
Figura 19.....	57
Figura 20.....	58
Figura 21.....	58
Figura 22.....	59
Figura 23.....	59
Figura 24.....	60
Figura 25.....	60
Figura 26.....	61
Figura 27.....	62
Figura 28.....	63
Figura 29.....	64
Figura 30.....	65
Cuadro 1.....	12
Cuadro 2.....	44
Cuadro 3.....	45
Cuadro 4.....	45
Cuadro 5.....	95
Cuadro 6.....	96
Cuadro 7.....	96
Cuadro 8.....	96

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa considerada como la principal zoonosis a nivel mundial que se transmite por alimentos de origen animal contaminados con bacterias del género *Brucella* spp. *B. melitensis* es la especie que más se reporta como agente etiológico de la brucelosis humana. Dado que *Brucella* spp. se comporta como un patógeno intracelular facultativo, sus mecanismos de patogenicidad están orientados a promover su establecimiento y sobrevivencia en las células hospederas, modificando la expresión o el funcionamiento de las proteínas que promueven la fusión vesicular y el tránsito intracelular del fagosoma que la contiene. Las proteínas de la familia SNARE funcionan como maquinaria fundamental para que se lleven a cabo eventos de fusión de membranas, por lo que son “blanco” de modificación o modulación por parte del patógeno. En trabajos previos se demostró que el bloqueo de la expresión de Sintaxina 4, una Qa-SNARE, reduce significativamente la invasión de *B. melitensis* en macrófagos humanos, más no así el bloqueo de VAMP3, una R-SNARE. El objetivo de este trabajo fue determinar si la proteína SNAP25, una Qbc-SNARE, se expresa en esta línea celular y posteriormente evaluar si es modificada por *B. melitensis* durante la infección temprana, utilizando perlas de látex como control, mediante ensayos de inmunohistoquímica, PCR punto final y *Western blot*. Los resultados muestran que esta proteína se expresa en el 31.1% de los macrófagos, y que ésta es significativamente menor en las células infectadas por el microorganismo a diferencia de lo que sucede con las perlas de látex, donde hay mayor fluctuación en su expresión con un pico importante a los 45 min. Se concluye que *B. melitensis* es capaz de disminuir la expresión de SNAP25 durante la infección temprana, pudiendo encontrarse involucrada en su internación y sobrevivencia.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, proteínas SNARE, SNAP25, macrófagos THP-1, infección temprana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano causada por bacterias del género *Brucella* spp. Afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos,¹ tanto marinos² como terrestres, incluyendo al ser humano, además de que se ha aislado de peces³ y anfibios.^{4,5}

Existen aproximadamente 1 500 patógenos que afectan al ser humano, de los cuales el 61% son agentes causantes de zoonosis.⁶ De éstas, las transmitidas por alimentos contaminados con dichos microorganismos ocupan el cuarto lugar, un grupo donde la brucelosis es una de las principales enfermedades.^{7, 8} En los animales, se le conoce como aborto contagioso, brucelosis o Enfermedad de Bang; en el hombre, a la patología también se conoce como Fiebre ondulante, Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo, Fiebre de Chipre, Fiebre Napolitana, Fiebre de Gibraltar, entre otros sinónimos.^{9,10}

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) incluye a la Brucelosis dentro de su Lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos 2015 en la sección de “Enfermedades, infecciones e infestaciones comunes a varias especies”, debido a su impacto negativo a nivel socioeconómico y sanitario y cuya repercusión en el comercio internacional de animales y sus productos es considerable.¹¹ Por otro lado, la brucelosis humana también constituye un problema particularmente grave, ya que con frecuencia produce invalidez cuando no se trata de forma correcta desde su inicio.¹²

La Clasificación Internacional de Enfermedades, en su décima revisión (CIE-10) por la Asamblea Mundial de la Salud Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1994, asigna a la brucelosis el código A23, dentro del rubro de Ciertas zoonosis bacterianas.¹³

1.2 Epidemiología

La brucelosis es una enfermedad que se encuentra distribuida ampliamente en el mundo y se considera la zoonosis más diseminada, con un estimado de más de 500 000 nuevos casos

en humanos por año.^{14, 15} La incidencia real, tanto de brucelosis humana como animal, se desconoce, debido principalmente al limitado diagnóstico - en zonas endémicas, cerca del 20% de los individuos infectados permanecen sin diagnóstico -, y el escaso monitoreo y reporte de los casos positivos.⁸ Considerando lo anterior, se estima una incidencia de brucelosis humana, en zonas endémicas, que varía de <0.01 a >200 por cada 100 000 habitantes: mientras que en algunas regiones endémicas se observa una alta incidencia de infección aguda.¹⁶ La baja incidencia reportada en otras áreas, también endémicas, puede deberse al pobre diagnóstico y la escasa vigilancia y reporte de la enfermedad. Se considera que dentro de los principales factores de riesgo están los deficientes métodos de preparación de los alimentos, la falta de pasteurización y el contacto directo con los animales infectados.^{9, 16}

La mayor incidencia se presenta en países del litoral del Mar Mediterráneo - principalmente en los de África y el este del Mediterráneo, como Egipto, Libia, las islas de Sicilia, Malta, Chipre y Creta, la península itálica, Portugal, etc.-; Asia Central y Sur - principalmente en India, China, Mongolia y Corea -; y en algunos países de América Latina - como Perú, México y Argentina -. Se reporta que varios países de Europa Occidental y del Norte, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda están libres del agente.^{8, 14}

En países industrializados y regiones donde las medidas de higiene previenen la transmisión de enfermedades por alimentos contaminados, la brucelosis es meramente ocupacional, asociándose principalmente al contacto directo con el ganado, sus productos o la manipulación del agente (Médicos Veterinarios, ordeñadores, laboratoristas, faenadores, granjeros, etc.),^{8, 17} donde la mayoría de los casos sucede en individuos del género masculino, entre 20 y 45 años, y es causada principalmente por *B. abortus* o *B. suis*. A su vez, los países o áreas donde las prácticas de mercado y distribución de los productos lácteos provenientes de cabra u oveja dificultan el cumplimiento de dichas medidas, *B. melitensis* es la que presenta mayor incidencia, lo que pone en riesgo a toda la población, aunque se observan más casos en mujeres y niños.¹

La transmisión entre seres humanos es poco común, aunque se han reportado casos por transfusión sanguínea, trasplante de médula ósea y vía sexual.^{1, 18, 19, 20} La tasa de mortalidad, sin tratamiento, es del 2%, y generalmente sucede como consecuencia de

endocarditis. En promedio, la recuperación ocurre de uno a tres meses, aunque la convalecencia puede durar un período más prolongado.^{1, 8, 18}

En México, la brucelosis se considera como una enfermedad endémica de notificación obligatoria y semanal según lo establecido en la Ley General de Salud y las Normas Oficiales Mexicanas NOM-022-SSA2-2012, para los humanos,²¹ y NOM-041-ZOO-1995, para los animales.²² El número de casos de brucelosis reportados por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) fue de 2,562 para el 2014, lo que representa una incidencia acumulada de 0.022 por cada 100 000 habitantes. La mayor contribución a esta cifra está dada por el estado de Sinaloa, con 295 casos; Michoacán, con 292 casos; Puebla, con 232 casos y Guanajuato con 221 casos.²³ Para la semana epidemiológica 7 del 2016 ya se reportan 262 casos, donde la mayor contribución es de Sinaloa, con 37 casos; Michoacán, con 34 casos; Coahuila, con 24 casos y Nuevo León y Tamaulipas, con 14 casos.²⁴ Se reporta que el 98% de los casos de brucelosis humana son causados por *B. melitensis*, y alrededor del 2% son de origen bovino.^{15, 25}

En relación al ganado caprino, se ha notificado una frecuencia nacional de brucelosis en los hatos de 0.01%. Chihuahua es el estado que mayor frecuencia reporta, con 11.06%; seguido de Morelos, con 4.76%; Guanajuato, con 2.26% y Sinaloa, con 2.23%, de acuerdo a los últimos datos publicados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México, durante el período de Enero a Junio del 2015.²⁶ Hay que mencionar que dichos datos muestran una constante con respecto a aquellos reportados en el año 2014.

De acuerdo a la NOM-041-ZOO-1995, existen tres fases para el control de la brucelosis en el país, y de acuerdo con los datos reportados hasta marzo del 2015, el 72.34% se encuentra en fase de control, el 27.66% en fase de erradicación (Baja California Sur, Yucatán, Campeche, algunas regiones de Quintana Roo y Guerrero - Costa Chica y Costa Grande, principalmente -), y el 8.14% en fase libre (norte de Sonora), únicamente de *B. abortus* (**Figura 1**).^{22, 27}



FIGURA 1. Mapa de los Estados Unidos Mexicanos donde se muestran las diferentes fases de control para la brucelosis en los animales domésticos, específicamente bovinos, caprinos y ovinos. El 72.34% del país se encuentra en fase de control; el 27.66% está en fase de erradicación y el 8.14% se encuentra reportado como libre pero únicamente de *B. abortus*, ya que el mismo porcentaje del territorio nacional se considera en fase de erradicación para *B. melitensis* y *B. ovis*. Últimos datos reportados para Marzo del 2015.

Considerando un inventario nacional caprino de aproximadamente 9 millones de cabezas, la cobertura de vacunación para el 2014 fue de 278,499 cabezas, representando sólo el 3.09%, lo que indica una cobertura pobre. Para el primer semestre del 2015, esta cobertura de vacunación alcanzó 163,116 cabezas, lo que representa apenas el 1.8%.²⁸ A su vez, en el 2014 se realizaron 254,448 pruebas de tarjeta al 3% para la vigilancia de la enfermedad en animales en movilización, exportación o ambos, durante el período de Enero a Septiembre del 2014, con una detección de 1,091 animales positivos, y durante el primer semestre del 2015 se realizaron 90,066 pruebas de tarjeta al 3%, con lo que se detectaron 732 animales positivos.²⁹

Las causas que ocasionan un impacto económico nacional negativo son: 1) disminución de los parámetros productivos en las producciones pecuarias por aborto - del 60 al 70% de los abortos en vacas, pequeños rumiantes y cerdos; en promedio, ocasiona aborto al 15% de las hembras de primer o segundo parto -, nacimiento de crías débiles o inviables, retraso en el crecimiento de becerros al afectar la ganancia de peso hasta en un 17%; infertilidad - por alteraciones en el aparato genital de los machos - y disminución de la producción láctea hasta un 30%; 2) desecho de los productos y subproductos lácteos, ya que el microorganismo se excreta en grandes cantidades en el calostro y la leche - hasta 10

billones de bacterias/g -; y 3) con respecto a la brucelosis humana, hay pérdidas en la economía familiar y nacional - dado que sus efectos no se perciben de inmediato, su diagnóstico y tratamiento se complica, lo que se manifiesta en los altos costos del mismo y el tiempo prolongado de postración. Por otro lado, hay que mencionar que la brucelosis representa una restricción para la exportación de animales hacia los países libres de la enfermedad.^{6, 22}

En años pasados se observó una mayor incidencia hacia las personas del sexo femenino, siendo amas de casa o estudiantes (64.7%) y con rango de edad entre 15 y 45 años (38.1%),³⁰ lo cual prevalece al analizar el reporte del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, con 649 casos de brucelosis en hombres y 1046 casos en mujeres para la semana epidemiológica 32 del año 2015.²⁴

Hay que considerar que, aunque varios países han erradicado a *B. abortus*, la infección por *B. melitensis* está re-emergiendo como un importante problema de salud pública; ello se debe a que la vacuna contra *B. abortus* no protege efectivamente contra la infección ocasionada por *B. melitensis*. Un problema similar ha surgido en Sudamérica - mayormente en Brasil y Colombia -, donde la infección por *B. suis* biovar 1 ha aparecido también en los bovinos.^{8, 18, 31}

1.3 Diagnóstico

A pesar de la distribución mundial y el impacto negativo que ocasiona en la salud humana y animal así como en la economía de los países, las acciones de los países y los organismos nacionales e internacionales para el control y la erradicación de la brucelosis no han sido suficientes. Esto se observa principalmente en zonas endémicas, generalmente aquellas con bajos recursos, donde la enfermedad es apenas atendida.^{15, 32} Para lograr un adecuado control de la enfermedad en el hombre es fundamental el desarrollo de programas de medicina preventiva en los hatos. Asimismo, la vigilancia epidemiológica en la población expuesta es fundamental, ya que un diagnóstico temprano permite una rápida mejoría, lo que evita complicaciones por cronicidad.^{18, 33}

Como en la mayoría de las enfermedades bacterianas, el diagnóstico definitivo de la brucelosis es, por excelencia, el aislamiento y la identificación del microorganismo, el cual, a su vez, es útil para la vigilancia epidemiológica y la evaluación del progreso de los

programas de vacunación.^{1, 34} Tanto en humanos como en los animales, el diagnóstico no se puede emitir únicamente con los hallazgos de la historia clínica y el examen físico debido a que los signos y síntomas son inespecíficos, por lo que para su confirmación, se deben realizar pruebas de tipo serológicas y bacteriológicas.^{1, 21, 22}

En el caso de los humanos, las muestras para el aislamiento de *Brucella* spp. se pueden obtener a partir de médula ósea, líquido cefalorraquídeo, sinovial, pleural, heridas, pus y sangre. El material biológico que más se emplea para el diagnóstico bacteriológico es la sangre y se recomienda el sistema bifásico Ruiz-Castañeda como medio de cultivo, con un período de incubación de por lo menos 45 días para poder emitir un diagnóstico negativo.^{1, 32, 35} Aunque existen nuevos métodos semiautomáticos que reducen el tiempo de incubación, como el BACTEC® y Bac/Alert®, muchos de ellos han fallado en detectar muestras positivas corroboradas por el método tradicional.³⁶ Hay que enfatizar que la sensibilidad de los métodos de aislamiento dependerá principalmente de la fase de la enfermedad en que se realice el muestreo y el uso de antibióticos previo al mismo - hasta un 90% de positividad en la fase aguda para los métodos de aislamiento tradicionales -. Finalmente, los frotis se preparan para realizar tinciones de Gram y Stamp (Ziehl-Neelsen modificada), y la identificación de *Brucella* spp. a nivel de género se puede realizar con base en la morfología de las colonias, afinidad tintorial y los resultados a las prueba de oxidasa y catalasa.^{34, 37}

Alternativamente, se han propuesto y utilizado varios métodos moleculares para la identificación del agente, dentro de los cuales, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) es la que mayor atención ha recibido para complementar el diagnóstico. En esta técnica se ocupan iniciadores que flanquean regiones conservadas género específicas, como los genes *16S-23S* que codifican para el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), el gen *bcsp31* que codifica para la proteína de membrana externa Omp31 BCPS31 y el gen *omp2a* que codifica para la proteína de membrana externa Omp2a.^{1, 15, 32, 35} Esta técnica se aconseja, sobre todo, para el diagnóstico de pacientes con complicaciones específicas como neurobrucelosis o con lesiones localizadas, donde las pruebas de aislamiento y serológicas presentan baja sensibilidad.³⁵

Dado que muchas veces no se puede realizar el aislamiento, el diagnóstico se hace de manera indirecta mediante la detección de anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) liso de *Brucella* spp. en el individuo sospechoso, con variantes de la técnica de aglutinación (la

prueba de Rosa de Bengala para monitoreo y la seroaglutinación, como prueba confirmatoria), el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima indirecto (iELISA, *indirect enzyme-linked immunosorbent assay*) y la fijación del complemento. Actualmente, se tienen pruebas rápidas de monitoreo como el ensayo de polarización por fluorescencia (FPA, *fluorescence polarization assay*) y la inmunocromatografía de flujo lateral para *Brucella* IgM/IgG (LFA, *lateral flow fluorescence assay*).^{32, 35} Se debe tener cuidado al emitir un diagnóstico positivo con las técnicas serológicas, ya que el LPS liso de *Brucella* spp. tiene reactividad cruzada con otras bacterias Gram negativas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y O:116, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* grupo N O:30 y *Pseudomona maltophilia*.³²

El diagnóstico bacteriológico en los animales implica grandes costos, mucho tiempo y mayor riesgo de contagio para el personal que lo desarrolla, por lo que se usa sólo en circunstancias especiales (animales de gran valor genético, como sementales o grandes productoras, y para la evaluación de la sensibilidad de pruebas serológicas y de la eficacia de los programas de vacunación).³⁴ Por ello, el diagnóstico se realiza primero a nivel de hato mediante la detección de anticuerpos a partir de leche con pruebas basadas en la técnica de aglutinación, como el anillo en leche o Rosa de Bengala; posteriormente, se ocupa suero para las pruebas tamiz donde la identificación ya es individual, como la de tarjeta al 3% y 8%, y finalmente las pruebas de Rivanol, fijación del complemento, inmunodifusión doble o ELISA como pruebas confirmatorias. Se deben emplear antígenos internacionalmente estandarizados de *B. abortus* y la interpretación de los resultados se debe realizar considerando la prevalencia de la zona geográfica, la vacunación y la posibilidad de falsos positivos.^{1, 22, 32} Hay que mencionar que, a la fecha, no hay prueba diagnóstica disponible que distinga entre animales positivos a la infección de aquellos positivos por vacunación.¹

Para el aislamiento bacteriológico, las muestras se pueden obtener a partir de placenta, membranas fetales, descargas vaginales, semen, leche y contenido abomasal, pulmones y bazo de fetos abortados. La siembra debe hacerse en medios de cultivo selectivos o enriquecidos (agar tripticosa soya con 5% de suero, agar sangre, agar chocolate, infusión cerebro-corazón, modificado de Thayer-Martin, *Brucella*, etc.) y es de gran importancia evitar la contaminación ambiental o con heces fecales de las muestras.^{34, 37} El cultivo se mantiene de 15 días hasta 11 semanas, con 8 - 10% de CO₂ atmosférico, 37°C y en un pH de 6.6 a 7.4. Si no se obtienen colonias es conveniente realizar la siembra a partir de

linfonodos supramamarios, ilíacos internos y retrofaríngeos, bazo, glándula mamaria, testículos y útero.^{1, 32, 34} Los frotis que se obtienen de dichas muestras se tiñen con Ziehl-Neelsen modificado o el método de Köster y la observación de agregados intracelulares teñidos débilmente con morfología de cocobacilos son evidencia presuntiva de brucelosis, aunque se debe tener cuidado ya que otros agentes patógenos, como *Coxiella burnetii* o *Chlamydia* spp., pueden parecerse a *Brucella* spp. Para la identificación a nivel de género se evalúa la morfología de las colonias, la afinidad tintorial para Gram y Ziehl-Neelsen así como la reacción de oxidasa y catalasa.^{1, 34, 37} Hay que considerar que el tiempo de incubación puede ser muy largo en los animales infectados y que los individuos pueden permanecer serológicamente negativos por períodos considerables post-infección.^{1, 18, 22}

1.4 Medidas de prevención y control de la enfermedad.

Una serie de medidas de control y erradicación de la brucelosis se han implementado en varios países del mundo a partir de que los Doctores David Bruce, en 1886, y Bernhard Bang, en 1895, descubrieron a los agentes causales de la Fiebre de Malta y el aborto contagioso, respectivamente, y de que el Dr. Themistokles Zammit encontrase, en 1905, que el *Micrococcus melitensis* se excretaba en la leche de las cabras.¹⁰ Entre las principales medidas se encuentran la pasteurización de la leche, la aplicación de técnicas diagnósticas eficientes para detectar animales y humanos positivos, la vacunación del ganado bovino, ovino y caprino, la eliminación de animales positivos y el control de la movilización del ganado entre las regiones libres y endémicas.^{9, 12}

En México, con la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, se establece la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, en la cual se resaltan acciones como la identificación y eliminación de animales infectados, la vacunación de bovinos con la cepa S19 y la vacunación de caprinos y ovinos con la cepa Rev1, ya sea a dosis clásica o reducida según sea el caso.^{1,22} La cepa RB51 de *B. abortus* también se ocupa en la vacunación de animales silvestres y bovinos domésticos en varios países, como Estados Unidos, y ofrece la ventaja, sobre la cepa S19, de discriminar a los animales vacunados en las pruebas de diagnóstico.³⁸

Debido a que estas vacunas están hechas con cepas vivas atenuadas, tienen algunas desventajas como: provocar aborto en el 2 – 3% de las hembras vacunadas,³⁹ son

patógenas para el ser humano; presenta resistencia a antibióticos; y no permiten la discriminación, en las pruebas serológicas, de los animales positivos de aquellos que fueron vacunados.⁴⁰

Debido a esto, mucha investigación se ha enfocado en producir vacunas más seguras y eficaces que puedan aplicarse incluso a los humanos. Algunos ejemplos de prospectos de vacunas, muy prometedores y que deben seguirse evaluando son: inmunógenos a partir de fracciones subcelulares - como la proteína de 18.5 kDa superóxido dismutasa Cu/Zn -; ⁴¹ la vacuna pCISP41, probada apenas en el modelo murino con resultados muy prometedores; ⁴² y nuevas construcciones de cepas mutantes, como aquella con delección por reemplazo del gen que codifica a la enzima fosfoglicerato cinasa (*pgk*). ⁴⁰

Existe tratamiento para la brucelosis pero sólo se aplica en el ser humano, y éste dependerá del cuadro clínico que se observe al momento de detectarse, por lo que un diagnóstico adecuado y preciso es fundamental para que el tratamiento se administre lo más pronto posible y se puedan evitar complicaciones.¹⁰ A pesar de 15 años de investigación y evaluación de los diversos protocolos, el tratamiento recomendado por la OMS para el cuadro agudo es rifampicina (600-900 mg cada 24 horas, por vía oral) más doxiciclina (200 mg cada 24 horas, por vía oral) durante 6 semanas como mínimo. En cuadros no complicados se ha observado buena respuesta con doxiciclina (100 mg cada 12 horas) por seis semanas, más un aminoglucósido, generalmente estreptomycin (1 g al día por vía intramuscular), que se administra durante las primeras dos a tres semanas del tratamiento. En la infección complicada, donde ya se observa meningoencefalitis, endocarditis u osteomielitis, se requiere la combinación de rifampicina o cotrimoxazole, alguna tetraciclina y un aminoglucósido, durante por lo menos ocho semanas. En los niños, los antibióticos recomendados para los cuadros no complicados son rifampicina, cotrimoxazole o la combinación de éstos.^{1, 8}

Hay que decir que a pesar de la administración de los protocolos mencionados, se ha observado un porcentaje de recaída del 5-16%, por lo que sigue la investigación en nuevas opciones terapéuticas que mejoren este panorama. Una de ellas, evaluada apenas en células THP-1, es el empleo de microesferas que contienen gentamicina: estas partículas son fagocitadas exitosamente por los macrófagos sin afectar su viabilidad, se unen a las vacuolas que contienen al patógeno y lo destruyen. Con estos ensayos se observó una disminución de hasta 2.2 logaritmos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) durante

la infección con *B. melitensis*, a una dosis de 30 ug del antibiótico a nivel intracelular, por lo que se podría sugerir como tratamiento complementario en la antibioterapia de la brucelosis.⁴³

1.5 El género *Brucella* spp.

Las bacterias de este género son bacilos cortos, Gram negativos, extracelulares-intracelulares facultativos, aerobios - aunque algunas especies requieren una atmósfera con CO₂ para su crecimiento -⁴⁴ y pertenecen a la familia α -2 Proteobacteriacea.^{45, 46, 47} En esta familia se encuentran otros géneros bacterianos que se asocian a eucariontes, ya sea como patógenos intracelulares (*Bartonella* spp. y *Rickettsias*), oportunistas (*Ochrobactrum* spp. y *Caulobacter* spp.) o simbioses (*Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp. y *Wolbachia* spp.).^{48, 49}

Se caracterizan por medir de 0.5 a 0.7 x 0.6 a 1.5 μ m, y a diferencia de otras bacterias patógenas, no presentan los factores de virulencia clásicos como exotoxinas, citolisinas, cápsula, plásmidos, esporas, variación antigénica, inductores de apoptosis, fimbrias, flagelos -^{34, 50} aunque posee los genes para codificar a este último^{51, 52} -, etc. Son microorganismos con una membrana externa que contiene LPS y tres grupos principales de proteínas. El contenido de guanina-citosina (GC) en el ácido desoxirribonucleico (ADN) es de 55-58 moles/cm (58-59%)^{8, 44} y poseen dos cromosomas, generalmente de 2.1 y 1.1 Kb, a excepción de *B. suis* biovariedad 3 que sólo posee uno.^{34, 53, 54} No contienen plásmidos de manera natural, sin embargo, pueden transformarse con plásmidos de otras especies.⁴⁴

La división del género en seis especies clásicas y cuatro recién aceptadas está ampliamente difundida debido a cuestiones históricas y clínicas, sin embargo, en estudios de homología genética se encontró una similitud de más del 94% entre sus miembros. Estos hallazgos postulan a *B. melitensis* como única especie y a las demás como subespecies, según la preferencia en el hospedador.^{55, 56} El Subcomité para la Taxonomía de *Brucella* acepta la clasificación convencional del género en 10 especies.⁵⁷ Las especies consideradas como clásicas son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*.⁴⁵ Las tres primeras, que a su vez se subdividen en biovariedades, son las más virulentas para el ser humano, aunque sus reservorios preferenciales son las cabras, los bovinos y los cerdos, respectivamente. Cabe destacar que *B. melitensis* también se ha notificado en bovinos y

camélidos.⁵⁸ *Brucella canis* tiene como reservorio preferencial al perro y tiene un ligero potencial zoonótico. *Brucella neotomae* y *B. ovis*, notificados en el roedor del desierto y en ovinos, respectivamente, no se han relacionado con la brucelosis humana.^{9, 45} Las especies recientemente aceptadas son: *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, reportadas en cetáceos y pinnípedos;^{59, 60} *B. microti*, en el topillo campesino^{61, 62} y *B. inopinata*, aislada de un implante mamario.⁶³ De éstas, sólo *B. ceti*, *B. pinnipedialis* y *B. inopinata* pueden afectar al ser humano.^{45, 64, 65}

La morfología de las colonias de *Brucella* spp. depende de las estructuras que conforman al LPS. Así, hay colonias de fenotipo liso que sintetizan la cadena O del LPS, la cual, además, suele ser muy larga; en medios sólidos enriquecidos se observan redondas, convexas, de bordes lisos, translúcidas, de 0.5-1 um y aparecen en 2 a 5 días. Dentro de las especies que presentan este fenotipo encontramos a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. microi*, *B. pinnipedialis* y *B. inopinata*. Las colonias con fenotipo rugoso no sintetizan la cadena O del LPS, son redondas, brillantes, convexas y su naturaleza rugosa se percibe con iluminación oblicua. Las especies rugosas son *B. canis* y *B. ovis*.^{17, 34, 37}

El metabolismo del género es oxidativo mostrando actividad sobre algunos carbohidratos poco convencionales como el eritritol.⁴⁴ La bacteria es capaz de utilizar nitratos como aceptores finales de electrones en la cadena respiratoria, lo que le permite sobrevivir dentro de las células eucariontes o en medios sin O₂.⁶⁶ Son ácido resistentes cuando se tiñen con Ziehl-Neelsen al 0.5%, catalasa, oxidasa (excepto *B. ovis* y *B. neotomae*) y ureasa positivos (excepto *B. ovis*), no hemolíticos y no crecen en agar McConkey. Son moderadamente sensibles al calor y a la acidez, por lo que se pueden eliminar mediante la pasteurización.^{34, 37, 47}

Las especies de *Brucella*, así como las biovariedades, se pueden diferenciar mediante pruebas bioquímicas y biológicas como: producción de ácido sulfhídrico, degradación de urea y peróxidos, requerimientos de CO₂, sensibilidad a fuscina básica y tionina, fagotipificación - utilizando los bacteriófagos Tibilisi (Tb), Firenze (Fi/13), Weybridge (Wb), Berkley (Bk2), Izatnagar (Iz), Nepean (Np), R/C y R/M - y serotipificación al detectar los principales antígenos de superficie (**Cuadro 1**).^{34, 67}

Cuadro 1. Caracterización de las especies y biovariedades de *Brucella* spp. ^a

Especie	Biovariedad	Cepa	Requerimiento de CO2 en el primo-aislamiento	Producción de H2S	Sensibilidad a colorantes (20 ug/ml)		Epítotos diferenciales del LPS	Morfología de colonia	Reducción de nitratos a nitritos	Sensibilidad a fagos	Ureasa	Oxidasa
					Tionina	Fuscina básica						
<i>B. melitensis</i>	1	16M	-	-	+	+	M	L	+	Bk2	+	+
	2	63/9	-	-	+	+	A				+	+
	3	Ether	-	-	+	+	AM				+	+
<i>B. abortus</i>	1	544	+	+	-	+	A	L	+	Tb, Wb, Bk2	+	+
	2	86/8/95	+	+	-	-	A		+		+	
	3	Tulya	+	+	+	+	A		+		+	
	4	292	+	+	-	+	M		+		+	
	5	B3196	-	-	+	+	M		+		+	
	6	870	-	-	+	+	A		+		+	
	7	-	-	- o +	+	+	AM		+		+	
	8	-	-	-	+	+	AM		+		+	
	9	C68	+ o -	+	+	+	M		+		+	
<i>B. suis</i>	1	1330	-	+	+	-	A	L	+	Tb, Wb, Bk2	+	+
	2	Thomsen	-	-	+	-	A		+		+	
	3	686	-	-	+	+	A		+		+	
	4	40	-	-	+	-	AM		+		+	
	5	513	-	-	+	-	M		+		+	
<i>B. neotomae</i>	-	5K33	-	+	- ^b	-	A	L	+	Tb, Bk2	+	-
<i>B. canis</i>	-	RM6/66	-	-	+	-	R	R	+	R/C	+	+
<i>B. ovis</i>	-	63/290	+	-	+	-	R	R	-	R/C	-	-
<i>B. ceti</i>	-	-	-	-	+	+	AM	L	+	Wb, Iz, Bk2, Fz	+	+
<i>B. pinnipedialis</i>	-	-	+	-	+	+	A	L	+	Bk2, Iz	+	+

^aAdaptado de Moreno E y Moriyón I, (2006). "The genus *Brucella*" en Dworkin M, et. al., (ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of the bacteria*. 3rd ed., Springer Science. Minneapolis, USA; y de Brenner DJ, et. al., (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. Third section*. 2nd edition. Springer. USA.

*L: lisa, R: rugosa; Tb: Tibilisi, Bk2: Berkley, W: Weybridge, Fz: Firenze, Iz: Izatnagar, R/C: fago R con pases en *B. canis*, R/C.

1.6 Patogenia

La brucelosis es, en esencia, una enfermedad de los animales, especialmente de los domésticos. Debido a que el ser humano ha convivido y se ha alimentado de ellos, la transmisión a este se considera como accidental.⁶⁸

Ya que el microorganismo puede atravesar mucosas intactas y la piel lesionada, tiene varias vías de entrada al hospedero, aunque la principal es la oral. La mayoría de los casos en el ser humano ocurre cuando se ingieren productos lácteos contaminados no pasteurizados; la infección ocupacional también representa una importante causa de brucelosis cuando se tiene contacto con fluidos, carne o aerosoles contaminados y sucede principalmente en el personal que trabaja en las granjas, en mataderos o en el laboratorio.^{64, 68} Debido a su gran infectividad por vía aérea, el *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* de los Estados Unidos de América, coloca al género dentro de la lista B, en la cual se encuentran los patógenos que pueden utilizarse como potenciales armas biológicas.^{69, 70} En el caso de los animales, la infección sucede por la ingesta de membranas fetales o secreciones del tracto genital de la hembra, por amamantamiento con calostro o leche proveniente de hembras infectadas o por vía transplacentaria. La transmisión por vía sexual sucede básicamente en los rumiantes, principalmente ovinos; perros y cerdos,⁶⁴ aunque se han reportado algunos casos de transmisión sexual interhumana.¹⁹

Así como otros microorganismos de vida intracelular, *Brucella* spp. requiere de cuatro pasos principales para que la infección se lleve a cabo: adherencia, invasión, establecimiento y diseminación.⁶⁴ Los microorganismos del género *Brucella* spp. son capaces de invadir y sobrevivir tanto en células fagocíticas profesionales (macrófagos y células dendríticas), como en fagocíticas no profesionales (epiteliales, trofoblastos y fibroblastos). Así, los macrófagos, las células dendríticas y los trofoblastos son su principal blanco. Para ello, *Brucella* spp. atraviesa las barreras naturales del sistema digestivo (mediante la llegada a los linfonodos regionales de la cavidad oral y a través de la invasión de las células M en el tubo digestivo), respiratorio y genitourinario, y posteriormente, es fagocitada por los macrófagos residentes y las células dendríticas, lo que resulta en su posterior diseminación.^{64, 71}

Tanto las bacterias opsonizadas como las no opsonizadas son capaces de desarrollar una infección.³³ Se postula que la entrada de las bacterias no opsonizadas a las células se lleva

a cabo en regiones de la membrana citoplasmática ricas en colesterol, glucoesfingolípidos y glucoesfingomiélin, conocidas como balsas lipídicas,^{72, 73} lo que produce un alto porcentaje de sobrevivencia en la vacuola contenedora de *Brucella* (VCB), y el subsecuente establecimiento en su nicho de replicación.⁶⁴ Asimismo, se sabe que en estos sitios ocurren eventos de endocitosis y exocitosis celular de manera simultánea a la fagocitosis gracias a la presencia de múltiples receptores y proteínas de diversa índole.⁷⁴

Las bacterias opsonizadas entran a la célula gracias a la presencia de receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc, *fragment crystallizable*) y son altamente susceptibles a la degradación intracelular. Aunque muchas de ellas mueren – entre el 80 y el 90% - por la actividad bactericida de los radicales libres de oxígeno y de óxido nítrico de los macrófagos, las que sobreviven lo hacen gracias a la expresión de ciertos genes que son esenciales en las primeras etapas de la infección, cuyos productos son capaces de inhibir la unión del fagosoma con el lisosoma y de resistir el medio ácido y lítico del fagolisosoma.⁶⁴

Aunque el mecanismo de adherencia de *Brucella* spp. a las células blanco no está bien comprendido, se ha propuesto la participación de varios receptores de reconocimiento a patrones (PRRs, *pattern recognition receptors*) - como el antígeno 1 asociado a función leucocitaria (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*); el receptor 3 del complemento (CR3, *complement receptor 3*); las integrinas α -5 β -1 y α -5 β -3; los receptores de manosa-6-fosfato (MPR, *mannose-6-receptors*), los gangliósidos, como el GM₁; los receptores *scavenger* tipo A;⁷⁵ los receptores tipo *Toll*; algunas lectinas y receptores de fibronectina – que se unen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*).^{66, 71, 76}

En cuanto a los receptores tipo *Toll* (TLRs, *Toll-like receptors*) – específicamente los TLR2, TLR4 y TLR9, que se unen a lipoproteínas, LPS y fragmentos de ADN no metilados, respectivamente -, hay que decir que, aunque interactúan con la superficie bacteriana para iniciar la fagocitosis que desencadenará a su vez otros mecanismos de la inmunidad innata, recientemente se encontró que, una vez dentro de la célula hospedera, *Brucella* spp. codifica para una proteína llamada TcpB (*TIR domain-containing protein*), que tiene homología con dominios de los receptores tipo *Toll* e interleucina 1 (IL-1), y cuya expresión causa la degradación acelerada de la proteína parecida al adaptador fosforilado de MyD88 (MAL, *MyD88 adapter-like protein*) unido al TLR4, mediante

poliubiquitinación. Esta proteína representa la única molécula hasta ahora detectada que es capaz de suprimir, de manera específica, la respuesta innata.^{64, 77, 78}

Con respecto a la invasión en células fagocíticas no profesionales, como las células HeLa, se ha encontrado que un conjunto de proteínas de membrana externa de la bacteria se unen selectivamente al ácido siálico presente en la membrana plasmática. Así, la proteína bacteriana denominada SP41 (*surface protein of 41 kDa*) mostró una importancia relevante durante este proceso, ya que al bloquearse con anticuerpos específicos y mutar el gen que la codifica (*ugpB*, localizado en el cromosoma II de *Brucella melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*), la capacidad de adherencia e invasión de la bacteria se redujo significativamente.^{79, 80, 81} Ya se ha identificado además la isla de patogenicidad Bab1_2009-2012, que codifica para una adhesina, y que juega un papel muy importante en la infección por vía oral.⁸²

Con relación a la invasividad, se ha observa una menor eficiencia de *Brucella* spp. al tener contacto con células epiteliales en comparación con otras bacterias patógenas como *Salmonella* spp.⁸³ La invasión a los trofoblastos se presenta durante la fase tardía de la gestación y su replicación sucede gracias a la presencia de altas concentraciones de hormonas esteroideas y eritritol.^{64, 71}

Las células dendríticas, a comparación de los macrófagos, presentan mayor susceptibilidad de invasión por parte de la bacteria, lo que se observa con una alta multiplicación intracelular. Estas células juegan un papel importante en la diseminación del microorganismo debido a sus capacidades migratorias. La bacteria inhibe su maduración y compromete varias de sus funciones como su labor de células presentadoras de antígenos (CPA); la secreción de determinadas citocinas, como la interleucina 12 (IL-12) y la señalización MyD88-depediente, que favorece la activación de los linfocitos T y la producción de interferón gamma (IFN- γ).^{66, 64, 84}

Una vez que la bacteria logró invadir a las células blanco, se establece en su nicho de replicación, en una vacuola con características de retículo endoplásmico (RE) llamada vacuola contenedora de *Brucella* (VCB), donde se divide sin afectar la integridad y fisiología de la célula hospedera. La diseminación del microorganismo sucede al momento de la división celular o por lisis mecánica de las células infectadas debido al acúmulo de los microorganismos.^{64, 66}

1.6.1 Signos clínicos.

De las especies que afectan al humano, el cuadro clínico más grave es provocado por la especie *B. melitensis*. La enfermedad tiene carácter crónico-debilitante y, aunque no es mortal, puede complicarse y comprometer la vida. De los individuos que adquieren la enfermedad, el 10% suele presentar recaídas meses o incluso años a pesar de haber recibido tratamiento.^{35, 85} Después de la exposición al agente, los signos clínicos pueden aparecer dentro de los próximos 5 a 60 días y dependerán de la fase de la enfermedad y los órganos afectados. La mayoría de los pacientes sufren un curso agudo que se caracteriza por la presencia de signos inespecíficos: fiebre intermitente (síntoma más común, 91-93%); debilidad (95%); sudoración (82-87%); linfadenopatía (50%); cefalea (81%), dolor generalizado (91%); hepatoesplenomegalia (19-51%); trastornos gastroentéricos, como vómito y diarrea (2-20%); problemas respiratorios semejantes a una gripa común (24% o menos) y aborto.^{1, 35, 65, 86} Los pacientes que desarrollan un curso crónico manifiestan sintomatología osteoarticular (40-87%; como artritis, espondilitis u osteomielitis), enfermedad genitourinaria (2-20%; como orquitis, epididimitis, glomerulonefritis y/o abscesos en riñones),⁸⁷ así como meningoencefalitis (4%); abscesos hepáticos o endocarditis (3%).¹

En los animales domésticos, la brucelosis generalmente desarrolla un cuadro agudo, con signos como placentitis; aborto en el segundo o tercer trimestre de la gestación; nacimiento de crías débiles; mastitis (este último en las dos terceras partes de los casos); metritis postparto; orquitis y epididimitis. Aunque el aborto en los primeros dos trimestres de la gestación es el signo predominante de la enfermedad, éste sólo ocurre una vez, de tal forma que las hembras pueden gestarse de manera subsecuente pariendo crías que si bien pueden nacer débiles, también pueden encontrarse totalmente saludables. Progresivamente, el cuadro crónico de la enfermedad se manifiesta casi exclusivamente con mastitis; disminución de la producción láctea con diseminación de la bacteria a través de la leche e infertilidad en los machos.^{1, 8,} De manera particular, la infección en los cerdos por *B. suis* generalmente es asintomática, lo que dificulta su diagnóstico y favorece su diseminación; sin embargo, cuando hay signos clínicos, estos reflejan afección al tracto genital - como orquitis, epididimitis, infertilidad, aborto en cualquier etapa de la gestación y alta mortalidad neonatal -, o bien, a huesos y articulaciones - como artritis, osteomielitis, espondilitis y parálisis -. La infección por *B. canis* en los perros, además de los signos ya

mencionados referentes al daño en los aparatos reproductores, también se manifiesta con una bacteremia prolongada. Los animales marinos infectados por *B. ceti* y *B. pinnipedialis* desarrollan abscesos cutáneos, necrosis hepática y esplénica, meningoencefalitis, discoespondilitis y aborto.⁷¹

1.7 Factores de virulencia

A pesar de que *Brucella* spp. es un microorganismo que no tiene los factores clásicos de virulencia de otras bacterias Gram negativas, su potencial como patógeno radica en aquellos mecanismos moleculares (algunos de los cuales se han identificado) que utiliza para su invasión, sobrevivencia y replicación intracelular, a saber: LPS atípico, glucanos β -1,2 cíclicos, sistema de secreción tipo IV y algunas proteínas de membrana externa.^{50,64}

El LPS de *Brucella* spp. se considera como el principal factor de virulencia ya que, además de ser vital para mantener la integridad funcional y estructural de la bacteria, le confiere resistencia contra diversos mecanismos de defensa: disminuye la efectividad de destrucción por los péptidos catiónicos, por el estallido respiratorio y por las enzimas lisosomales; inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF α , *tumor necrosis factor-alpha*) y los interferones tipo I y II (IFN I y II), también inhibe la activación de la vía clásica del complemento e interfiere con la presentación de antígenos por medio de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II.⁶⁴

Se dice que es “atípico” o “no clásico” porque, a pesar de tener los tres dominios que conforman un LPS, presenta grandes diferencias bioquímicas en comparación con el de las enterobacterias: por ejemplo, la cadena O, o antígeno O (LPS-S, *lipopolysaccharide-smooth*), presente sólo en las cepas lisas, es un homopolímero no ramificado de formil perosamina (4,6-dideoxi-4-formamida- α -D-manopiranosil) que tiene una extensión de 96 a 100 subunidades de longitud; el núcleo o *core*, unido al antígeno O, consta de un polímero de carbohidratos diversos como manosa, glucosa, quinovosamina (2-amino-2,6-dideoxi-D-glucosa), glucosamina (2-amino-2-dideoxi-D-glucosa), ácido octulosónico (ácido 3-deoxi-D-mano-2-oculosónico; KDO, *keto-deoxi-ocutlosonic acid*) y otros azúcares aún no identificados; y por último, el lípido A, unido al *core*, está formado por un esqueleto de disacáridos de diaminoglucosa (2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa) con enlaces β 1-6 al

cual se unen grupos amida y largas cadenas de ácidos grasos saturados ($C_{16:0}$ a $C_{18:0}$) e hidroxilados (3-OH- $C_{12:0}$ a 29-OH- $C_{30:0}$), además de tener adheridos varios fragmentos de proteínas de membrana externa (OMPs, *outer membrane proteins*) que no se remueven por los métodos convencionales de extracción utilizados para las enterobacterias.⁸⁸ La etanolamina, los azúcares neutros, los ácidos grasos acil-oxalil y los grupos fosfato que de manera normal se encuentran unidos al *core* y al lípido A de las enterobacterias, no se encuentran en el LPS de *Brucella* spp.⁸⁸ Todas estas características le dan la propiedad de ser menos endotóxico y activo, lo que permite a la bacteria entrar a la célula hospedadora y evadir la respuesta inmune (Figura 2).⁸⁹

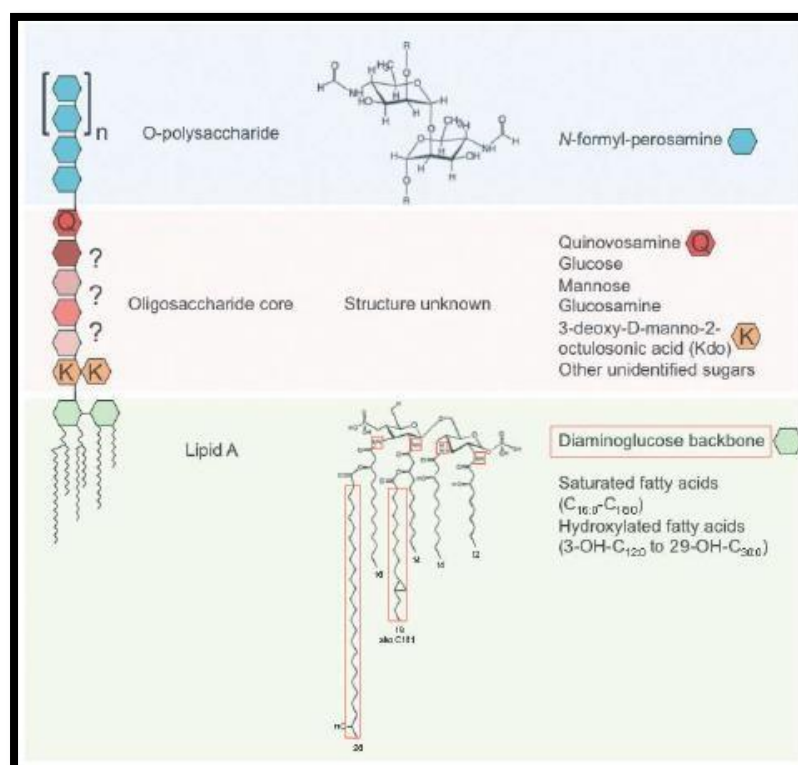


FIGURA 2. LPS de *Brucella abortus*. La cadena O del LPS está compuesta por un homopolímero de 4,6-dideoxi-4-formamida- α -D-manopiranosil, con un promedio de 96-100 subunidades. El *core*, aunque permanece poco caracterizado, contiene residuos de glucosa, manosa, quinovosamina, glucosamina, ácido 3-deoxi-D-mano-2-oculosónico (KDO) y varios residuos de carbohidratos aún no identificados. A diferencia de otros miembros de las α -Proteobacterias, carece de heptosas, grupos fosfato, ácido galacturónico y ácido glucurónico. El lípido A se considera no clásico porque está compuesto de 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa en vez de glucosamina, los grupos acilo se unen por un enlace amida y contienen cadenas de ácidos grasos hidroxilados muy largos. Estas características se resaltan en cuadros rojos dentro de la figura. Tomado de: **von Bargen K, Gorvel JP and Salcedo SP, (2012).** "Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle". *FEMS Microbiol Rev.* 36, pp. 533-562.⁶⁸

Los glucanos cíclicos bacterianos tienen varias funciones: son moléculas osmorreguladoras y sensores medioambiental, al interactuar con otros componentes periplásmicos; también ayudan a la estabilización estructural de la pared celular y, recientemente, se proponen como candidatos para adyuvantes, dado que los glucanos β -1,2 cíclicos tienen un efecto

potente en la activación de las células dendríticas dependiente del receptor TLR4 y los adaptadores MyD88/TRIF, sin ser inmunogénicos ni tóxicos.⁹⁰ Por otro lado, las formas O-metiladas y O-succiniladas β -1,2 tienen, además, una estructura muy parecida a las ciclodextrinas, las cuales se forman a partir de unidades de D-glucopiranososa con enlaces α -1,4. Ambos, cuando se ponen en contacto con las membranas, tienen la propiedad de acarrear y extraer de manera selectiva al colesterol, lo que conlleva a una reorganización de las balsas lipídicas presentes en las membranas plasmáticas así como en las de los endosomas tempranos y de reciclamiento.⁹¹

Los glucanos β -1,2 cíclicos de *Brucella* spp. pertenecen a la familia II de los glucanos periplásmicos y son moléculas formadas por un anillo de polisacáridos con 17 a 25 residuos de glucosa, un centro lipofílico y una superficie hidrofílica a la cual se unen diversos grupos químicos. Se encuentran en el espacio periplásmico y son sintetizados en la membrana interna de la bacteria por la enzima β -1,2 glucano cíclico sintetasa. Son moléculas abundantes que representan entre el 1 y el 5% del peso seco bacteriano.⁹¹

Cuando se forman las VCB's y se unen a los endosomas tempranos, los glucanos β -1,2 cíclicos interactúan con el colesterol y modulan la organización de las balsas lipídicas, incluyendo a las proteínas que se reclutan en estos microdominios. Tal es el caso de la flotilina 1, la cual es una proteína involucrada en la señalización que permite la maduración del fagosoma. Se ha propuesto que este evento altera el tráfico intracelular de la VCB en la vía endocítica, ya que impide que el fagosoma se una al lisosoma y, en vez de eso, adquiera marcadores de RE para establecerse en su nicho de replicación.^{90, 91}

El sistema de secreción tipo IV (SST4) es un complejo multiproteico que atraviesa las membranas bacterianas y permite que puedan exportarse varios tipos de sustratos. Se encuentra en muchas bacterias Gram negativas, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila* y *Brucella* spp., y está implicado en variedad de funciones como conjugación, obtención de fragmentos de ADN a partir del medio extracelular y liberación de proteínas efectoras hacia el interior de las células blanco para promover la sobrevivencia bacteriana.⁹²

En el género *Brucella* spp., el SST4 es altamente conservado y está codificado por el operón *virB*, el cual se encuentra en el cromosoma II y consiste de 12 marcos abiertos de

El momento en el que el SST4 se expresa es crucial para que las moléculas efectoras sean secretadas y translocadas a la célula hospedadora, y contribuyan así a la modulación de la respuesta inmune y la maduración de la VCB.⁹² A la fecha, se han identificado algunas proteínas efectoras en *Brucella* spp., de las cuales, los primeros sustratos detectados fueron VceA y VceC,⁹⁶ luego se encontraron a RicA,⁹⁷ BPE123, BPE043, BPE005, BPE275, BPE865, BPE159,⁹⁸ CstA, BspA, BspB, BspC, BspD, BspE, BspF, BspG, BspH, BspI, BspJ y BspK,⁹⁹ y finalmente a BtpB¹⁰⁰ y Btp1, también conocido como TcpB.⁷⁸ De estos, los efectores BTP865, BTP159, BspD, BspG, BspH, BspI, BspJ y BspK son translocados de manera VirB-independiente, lo cual indica la existencia de una vía alterna de translocación en este género aún no identificada.^{92, 98}

Aunque la función de la mayoría de los efectores es aún desconocida, se sabe que VceC es un efector que tiene acción proinflamatoria mediante la inducción de estrés en el RE, no obstante, su participación en la patogénesis de *Brucella* spp. aún no está esclarecida,⁹² RicA interactúa con Rab2 - GTPasa que regula el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi al localizarse en los compartimientos vesiculares y tubulares (VTC, *Vesicular Tubular Compartments*) -, favoreciendo el establecimiento de la bacteria en la VCB con marcadores de RE en la etapa tardía de la infección;⁹⁷ BspA, BspB y BspF inhiben la secreción proteica de la célula infectada, lo que altera la ruta secretoria y permite la biogénesis de la VCB de replicación;⁹⁹ CtsA interactúa con Sec24A - proteína componente de las vesículas COPII asociadas a los sitios de salida del RE - para permitir que la VCB adquiera marcadores de RE al interactuar con los sitios de salida del RE (ERES, *endoplasmic reticulum exit sites*);⁹² y Btp1 y BtpB impiden la activación de las CPA al interferir con la señalización intracelular del TLR4.⁷⁸ A pesar de todos estos hallazgos, ninguno de estos factores se han asociado individualmente con la virulencia de *Brucella* spp. y es probable que esta sea resultado de procesos multifactoriales que incluyan alguno o varios de estos componentes.

Los sistemas reguladores de dos componentes son mecanismos moleculares que sirven como transductor de señales, los cuales, al sentir el medio externo, permiten a los organismos adaptarse a los cambios ambientales. Típicamente se componen de una proteína “sensora”, localizada en la membrana celular con actividad histidin-cinasa, y una proteína “reguladora” citoplasmática con actividad transcripcional. Se encuentran ampliamente conservados en las bacterias, y aunque también se reportan en células

eucariontes (plantas, levaduras, hongos y protozoarios), están en menor cantidad. Actualmente, más de 4000 sistemas reguladores de dos componentes se han identificado en bacterias, donde se observa que entre más grande sea su genoma y su versatilidad metabólica, presentarán mayor número de genes que codifiquen para los mismos. Uno de los principales ejemplos son aquellos patógenos o simbioses de vida intracelular.¹⁰¹

En *Brucella abortus* se reportan 21 sistemas de dos componentes, de los cuales los más caracterizados son FeuP/Q, NtrB/C, VsrB, OmpR y BvrS/BvrR.⁶⁸ El más estudiado es BvrS/BvrR, el cual le permite regular la expresión de proteínas de membrana externa (OMPs, *outer membrane proteins*), como Omp25 y Omp22, involucradas tanto en el proceso de invasión (reclutamiento de las GTPasas pequeñas de la familia Rho y filamentos de actina) como en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa. Mutantes con delección en este sistema son incapaces de invadir a las células blanco ya que, además de que se altera la permeabilidad celular, la expresión de OMPs (principalmente la de Omp25) y el patrón de acilación del lípido A, son incapaces de reclutar a las GTPasas para poder internarse (particularmente a Cdc42), y de inhibir la unión del fagosoma con el lisosoma.^{71, 102, 103}

Finalmente, hay que mencionar que existe discrepancia en considerar al sistema BvrS/BvrR y a los glucanos cíclicos como factores de virulencia, ya que no sólo cumplen funciones específicas que le permiten al género su multiplicación intracelular sino también cumplen importantes tareas en la estructura y mantenimiento de la célula antes de infectar.¹⁰⁴

A pesar del avance que se tiene en cuanto al conocimiento de los factores de virulencia de *Brucella* spp., muchos aspectos relacionados a los mecanismos moleculares que participan en la interacción del género con las células blanco no han sido totalmente dilucidados.

1.8 Tránsito intracelular

Aunque el tránsito intracelular de *Brucella* spp. aún tiene varias interrogantes, se sabe que el mecanismo de adherencia e internación mediante el cual la bacteria invade a la célula blanco será decisivo para su sobrevivencia, ya que las vacuolas adquirirán diferentes marcadores según la ruta endocítica que sigan.⁶⁸

Cuando las bacterias no están opsonizadas, la entrada es promovida por el microorganismo y básicamente sucede en las balsas lipídicas, con receptores como: el *scavenger A*, la proteína priónica celular PrPc (que al parecer se une a la proteína de choque térmico Hsp60 de *Brucella* spp., y su acción aún es controversial) y los TLR4, presentes en macrófagos. Igualmente, la proteína ezrin en los trofoblastos, así como lectinas, receptores para fibronectinas y otros receptores que poseen residuos de ácido siálico, presentes tanto en las células fagocíticas profesionales como en las no profesionales.^{68, 71} Este proceso, dependiente de GMP cíclico, de las enzimas fosfatidilinositol-3-cinasa (PIP3), tirosín cinasa y de la proteína cinasa activadora mitogénica (MAP cinasa), y de la vía de señalización asociada al receptor TLR4, resulta en una activación apenas significativa de las células, donde las GTPasas pequeñas Cdc42, Rac y Rho promueven el reacomodo de los filamentos de actina para que pueda formarse el fagosoma. En el caso de las cepas rugosas que llegaran a entrar por otra región que no sean las balsas lipídicas, la inhibición de la activación celular no sucede y son destruidas eficientemente.^{50, 68, 71}

Todas estas observaciones concluyen que la entrada por las balsas lipídicas contribuye totalmente a la sobrevivencia intracelular de la bacteria, donde el principal factor de virulencia que se encuentra involucrado es el LPS, en específico la cadena O, y de manera indirecta el sistema regulador BvrS/BvrR, al permitir la acilación del lípido A y la expresión de genes que codifican para varias proteínas de membrana externa.^{68, 89}

Una vez que la bacteria no opsonizada entra a la célula blanco, ya sean fagocitos profesionales como no profesionales, residirá en una estructura conocida como vacuola contenedora de *Brucella* o VCB, la cual inicia un proceso de “maduración” hasta formar el nicho de replicación. Primero interactúa con los endosomas tempranos, adquiriendo marcadores como el antígeno de endosoma temprano (EEA-1, *early endosome antigen-1*) y la GTPasa Rab5. Como esta vacuola es rica en colesterol y flotilina-1, se ha propuesto que la bacteria altera la organización de estas regiones a través de la secreción de los glucanos β -1,2 cíclicos para evitar la fusión con el lisosoma. Esto sucede en los primeros 30 minutos después de la internación.^{68, 71, 72, 91}

Luego, el interior de la VCB se va acidificando al interactuar con los endosomas intermedios, adquiere marcadores como LAMP1, mas no de endosomas tardíos, como Rab 7, ni de los lisosomas, como catepsina. Esta acidificación permite que el operón *virB* se

expresen y, a través del SST4, se trasloquen los efectores (como RicA) que alterarán la vía endocítica.^{68, 99} Es entonces cuando la VCB entra en la ruta secretora e interactúa con los ERES, adquiriendo marcadores de RE como calnexina, calreticulina, sec61 β y Rab2.¹⁰⁵ Este proceso depende de la interacción con la GTPasa Sar1 y la formación de vesículas de transporte COPII dependientes. Finalmente, una vez que se encuentra en esta vacuola, la bacteria inicia el proceso de replicación (**Figura 4**).¹⁰⁵

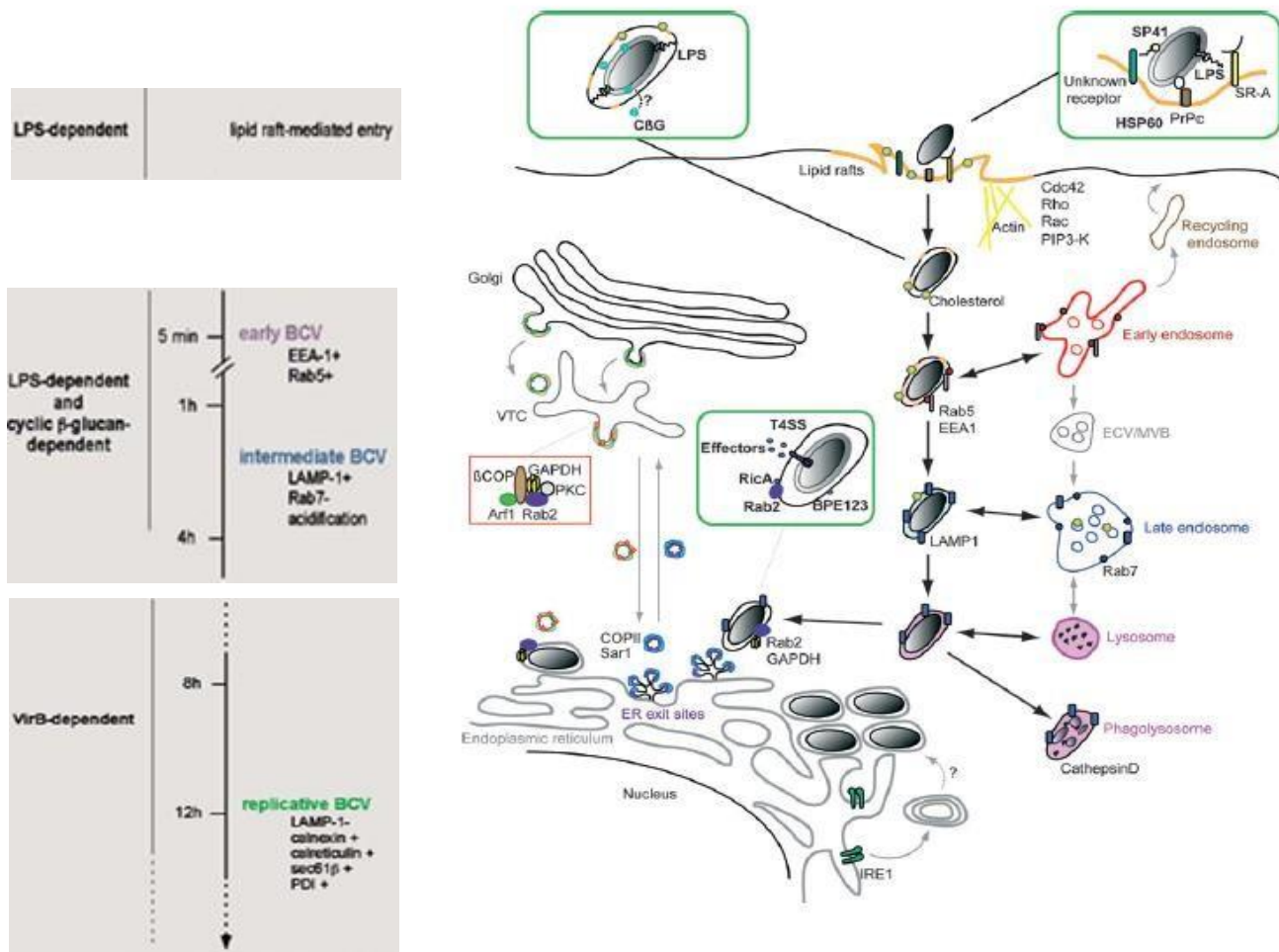


FIGURA 4. Modelo del tránsito intracelular de *Brucella* spp. La bacteria invade células fagocíticas profesionales y no profesionales a través de las balsas lipídicas con ayuda del LPS. Se muestran algunos de los receptores involucrados para su internamiento, como el scavenger A (SR-A) y la proteína príónica (PrPc), además de algunos de los factores que promueven la reorganización de los filamentos de actina, como la GTPasa pequeña Cdc42. Después de atravesar las balsas, el microorganismo se localiza en una vacuola que contiene a *Brucella* (VCB) que interacciona con endosomas tempranos, por lo cual se le conoce como VCB temprana y está marcada por EEA-1 y Rab5. Esto sucede dentro de los primeros 30 minutos a 1 h post-infección. Posteriormente, esta vacuola madura a VCB intermedia al adquirir marcadores como LAMP1 pero no Rab7, evitando así la unión con los endosomas tardíos y con los lisosomas. Esto sucede entre la hora y las 4-6 h post-infección, mediante mecanismos dependientes del LPS y los β -1,2 glucanos cíclicos. Las VCB tardías o de replicación interactúan con los ERES para adquirir marcadores de retículo endoplásmico, como calnexina, calreticulina, sec61 β y fosfatidilinositol, para generar así su nicho de replicación. Este mecanismo es dependiente del sistema de secreción tipo IV, en específico la acción de RicA al interactuar con Rab2 y la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para la formación de vesículas tipo COPII dependientes donde también participan las GTPasas Sar1. Este proceso se lleva a cabo entre las 8 y 12 h post-infección. En caso de que la interacción con los ERES falle, la VCB adquiere marcadores de endosomas tardíos, como Rab7, y de lisosomas, como cathepsina D, permitiendo la unión del lisosoma para que finalmente la bacteria sea degradada. Tomado de: **von Bargen K, Gorvel JP and Salcedo SP, (2012).** “Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle”. *FEMS Microbiol Rev.* 36, pp. 533-562⁶⁸ y adaptado con **Celli J, (2006).** “Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*”. *Res Microbiol.* 157(2), pp.93-98.¹⁰⁵

Por otro lado, cuando las bacterias han sido opsonizadas, entrarán a las células fagocíticas profesionales (macrófagos y células dendrítica) gracias a la presencia de los receptores Fc o del complemento, y aunque menos del 10% es capaz de sobrevivir al estallido respiratorio y replicarse, esta vía propiciará que la VCB adquiera marcadores que favorecen la unión fagosoma-lisosoma (como la glucoproteína de membrana asociada al lisosoma 1 [LAMP1, *lysosomal associated membrane proteín 1*], CD63, Rab 7, manosa 6-fosfato y catepsina D) de modo que la bacteria es destruida.⁵⁰

Hay que decir que los mecanismos que determinan el tránsito intracelular de las bacterias sobrevivientes en los fagocitos profesionales no han sido totalmente dilucidados. Existen dos teorías que explican parcialmente el fenómeno en este tipo de células. La primera menciona que las bacterias que han resistido los radicales libres de oxígeno y el óxido nítrico (gracias a la presencia de la cadena O del LPS y de la acción de la enzima superóxido dismutasa –SOD) durante los primeros minutos de la infección, permiten que la VCB interactúe con los endosomas tempranos y tardíos, y aunque adquieren marcadores de lisosoma, pueden excluirlos y redirigir la VCB hacia la vía secretora para adquirir marcadores de RE de manera similar a lo que sucede con las células que no fueron opsonizadas.⁷¹ Se ha propuesto que en este momento es importante la participación de los glucanos β -1,2 cíclicos y a la acción de los efectores translocados por el SST4.¹⁰⁵ La segunda teoría menciona que un porcentaje muy bajo de las VCB (<10%) siguen la ruta autofagosómica, sin utilizar las vacuolas con marcadores de retículo como nicho de replicación.¹⁰⁶

Se concluye que, aunque los mecanismos de interacción molecular de *Brucella* spp. con las células hospederas no se encuentran totalmente esclarecidos, su capacidad de sobrevivir intracelularmente es el resultado de la inhibición de la fusión vesicular entre la VCB y los lisosomas, para que pueda así alcanzar su nicho de replicación.

1.9 Proteínas de fusión que participan en la vía secretora.

El proceso de fusión de membranas en las células es un mecanismo fisiológico esencial para su correcto funcionamiento. El origen de la unidad anatomofisiológica de la vida bien pudo tener lugar con el “encapsulamiento de un caldo primordial dentro de un saco

membranoso, que con la subsecuente fisión y fusión de dicha membrana, originó finalmente a los diversos organelos que hoy en día se conocen”.¹⁰⁷

Se ha postulado que durante los eventos de fagocitosis y endocitosis, se requiere de la restitución de la membrana plasmática para compensar la que se emplea durante la formación de fagosomas o endosomas, de tal manera que se utiliza aquella que forma parte de organelos como los lisosomas, endosomas de reciclamiento y el retículo endoplásmico.¹⁰⁸ Para ello, se requieren eventos de acoplamiento y fusión entre las membranas, lo cual sucede gracias a la presencia de tres participantes: fosfolípidos aniónicos (fosfatidilinositol, fosfatidilserina), proteínas de membrana específicas y iones de calcio, todos participando de manera coordinada.¹⁰⁷

Durante los años 70 y 80, varios estudios de D. Papahadjopoulos y S. Ohki, demostraron que se requerían cationes divalentes, especialmente de calcio, para que se llevara a cabo la fusión de los fosfolípidos de membranas opuestas. Posteriormente, en 1990, James E. Rothman y col. demostraron la participación de tres proteínas en este fenómeno, las cuales forman un complejo altamente conservado en las células de los mamíferos y a las que denominaron “proteínas de unión solubles al factor sensible a la N-etilmaleimida” [*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)-attachment protein (SNARE)*, por sus siglas en inglés].^{109, 110} Dicho descubrimiento dilucidó por vez primera que los procesos de fusión de membranas suceden en sitios específicos y son estrictamente regulados, ya que se llevan a cabo gracias a la presencia de una maquinaria proteica igual de específica. Se observó también que son proteínas ubicuas que están involucradas en diversas vías del tránsito intracelular, principalmente en la exocitosis de neurotransmisores, hormonas y algunas citocinas, como el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF α).^{109, 111}

Posteriormente, con el uso de microscopía atómica y ensayos electrofisiológicos de membrana, Bhanu P Jena y su equipo demostraron que, 1) las proteínas SNARE interactúan entre sí sólo cuando se encuentran en membranas opuestas; 2) esta interacción origina un arreglo circular que permite la formación de un canal entre las dos membranas y el subsecuente paso del contenido vesicular de un lado a otro; 3) al acercar las membranas a una distancia de 2.8-3 Å, el Ca²⁺ establece un puente entre éstas y se expulsan las moléculas de agua, tanto las que están unidas al calcio hidratado como las unidas a las cabezas polares de los fosfolípidos, lo que permite el re-arreglo de los fosfolípidos y la

subsecuente fusión; 4) cuando el complejo se encuentra en solución (no unido a membranas), la interacción no se logra y tampoco la formación de dichos canales; 5) hay un parámetro de fusión bajo entre las SNARE en ausencia de Ca^{2+} (16 min), y uno de fusión alto cuando se exponen a Ca^{2+} (< 10 s), lo que establece un papel regulador fundamental de este elemento en el proceso; y 6) debido a que los complejos son extremadamente estables (resistentes a la desnaturalización con SDS, a la digestión por proteasas y a temperaturas mayores a 90°C^{111}), la presencia del *NSF-ATPasa* (factor soluble a la N-etilmaleimida unido a ATP) y su cofactor α -SNAP (*soluble NSF-attachente protein α*) permite el desensamble y reciclamiento del complejo *SNARE*, lo que finalmente inhibe la fusión de membranas.^{107, 112}

Actualmente se sabe que el flujo de calcio no es el único factor regulador de este proceso. En ensayos realizados con neuronas durante el momento de la liberación de neurotransmisores, se observó que sólo un número limitado de vesículas presinápticas pudieron liberar el neurotransmisor cuando el flujo de Ca^{2+} estuvo presente, lo que sugirió la participación de otros factores reguladores de este mecanismo.¹¹³ Se ha propuesto que otros factores como algunas proteínas enzimáticas o de recubrimiento, la naturaleza de la membrana citoplasmática, la organización del citoesqueleto, el pH intracompartamental así como procesos de modificación post-traducciona, regulan la formación, estabilidad y desensamble del complejo *SNARE*.^{113, 114, 115} Una familia de estas proteínas reguladoras son las proteínas cinasas, las cuales fosforilan sitios específicos tanto de las *v-* y *t-SNAREs* como de otras proteínas que interactúan con el complejo, tal es el caso de las sinaptotagminas.^{113, 114}

Las proteínas de recubrimiento vesicular – clatrina, COP I y COP II – y las GTPasas pequeñas – específicamente las de la familia Rab –, tienen también un papel importante durante los eventos de endocitosis y exocitosis, ya que proveen de mayor especificidad al mecanismo de fusión y tráfico vesicular.^{115, 116} Las vesículas con cubierta COP I y COP II transportan sustancias en las etapas iniciales de las rutas de secreción, y las revestidas por clatrina intervienen en el transporte de moléculas provenientes de espacio extracelular. Las vesículas COP I se forman a partir de vesículas pre Golgi y participan en el tránsito retrógrado de sustancias y están controladas por la GTPasa Arf. Las vesículas COP II se forman en el retículo endoplásmico, participan en el tránsito anterógrado de moléculas y se lleva a cabo mediante la GTPasa Sar1. Las vesículas de clatrina se forman a partir de la

membrana citoplasmática y tienen un tránsito hacia el RE, con la participación de varias GTPasas.^{105, 117}

La acilación por palmitoilación en residuos de cisteína es un proceso post-traducciona que regula la localización y la actividad de las proteínas SNARE y se asocia con la capacidad de unión de las membranas.^{113, 118}

Como ya se ha mencionado, los microdominios referidos como balsas lipídicas (*lipid rafts*) son regiones no caveolares ricas en colesterol y glucoesfingolípidos, relativamente insolubles al Tritón X-100,¹¹⁹ que se asocian con la regulación de la transducción de señales y el tráfico de membranas, gracias a que tienen la habilidad de reclutar selectivamente proteínas específicas, principalmente aquellas unidas a grupos acilo, con dos o más cadenas de palmitato o miristato, y de excluir la presencia de otras.^{119, 120} De esta manera se ha comprobado que las balsas lipídicas influyen en el funcionamiento de las SNARE al determinar su distribución espacial, ya que regiones carentes de colesterol tienen menor cantidad de proteínas SNARE, y como consecuencia, un menor grado de exocitosis que aquellas ricas en colesterol.¹²¹

Para su estudio, estas proteínas se clasificaron, de acuerdo a su localización, en proteínas de membrana blanco, también llamadas *t-SNARE* (aquí se encuentran las sintaxinas - *synaptic protein syntaxin* - y las SNAP - *synaptosome-associated protein*-), y en proteínas de membrana asociadas a vesículas, o *v-SNARE*, (*vesicle associated membrane protein*, o sinaptobrevinas - *VAMP* -).^{109, 122} No obstante, también se ha propuesto otro criterio de clasificación que se basa en la abundancia del residuo de aminoácido más conservado que posean, dividiéndolas en *R-SNARE* (*arginin-containing SNARE*) y *Q-SNARE* (*glutamine-containing SNARE*).^{109, 123}

En general, la estructura cristalográfica de los complejos SNARE, a una resolución de 2.4 Å, revela un conjunto de cuatro α -hélices muy enroscadas y con sentido paralelo que difieren de otros complejos con α -hélice antes descritos.^{109, 111} Presentan regiones conservadas tipo cremallera de leucina en el centro del complejo de fusión, llamadas “motivos SNARE”, con una longitud de 60-70 aminoácidos, y a su vez, dentro de éstas, se encuentra otra región iónica compuesta de un residuo de arginina (R-SNARE) y de tres residuos de glutamina (Q-SNARE), provenientes de cada hélice. Estos residuos son

altamente conservados en toda la familia de proteínas SNARE. Las regiones tipo cremallera de leucina están flanqueadas por otras que contienen un núcleo hidrófobo, similar al que se encuentra en otras estructuras α -hélice. La superficie de fusión es altamente estriada y posee diferentes regiones hidrófobas, hidrófilas y con carga (**Figuras 5 y 6**).¹²⁴

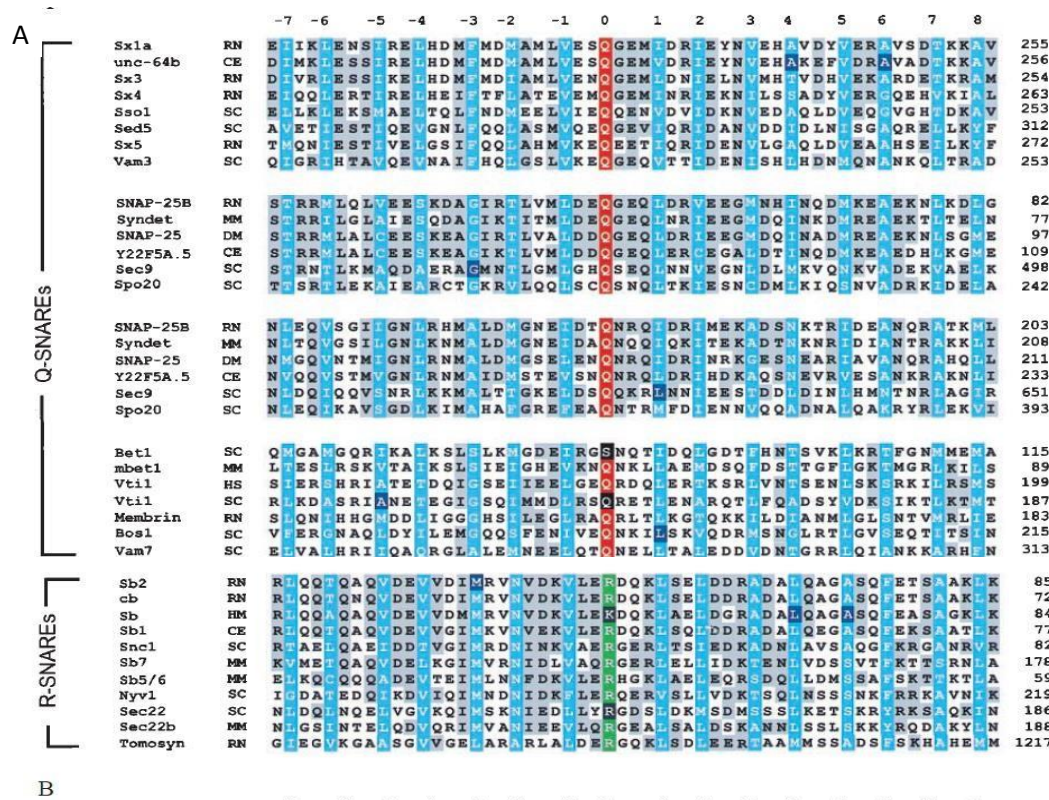


FIGURA 5. Proteínas Q- y R-SNARE. (A) Alineamiento de las secuencias correspondientes a la región de la fusión sináptica de las cuatro α -hélices de las proteínas más representativas de la familia SNARE. El análisis se consideró incluyendo 7 zonas río arriba (de -1 a -7) y 8 zonas río abajo (de +1 a +8) de la zona 0. A toda esta región se le conoce como el *motivo SNARE*. En gris se marcan los residuos conservados entre las proteínas; en rojo se marcan las regiones de la zona 0 ricas en glutamina, correspondientes a las *Q-SNARE* o *t-SNARE*, y en verde se marcan las regiones de la zona 0 ricas en arginina, correspondientes a las *R-SNARE* o *v-SNARE*. (B) Estructura cristalográfica del complejo de fusión que incluye únicamente el motivo SNARE, incluyendo las 7 zonas río arriba y las 8 zonas río debajo de la zona 0. Los grupos C^{α} se indican con líneas grises, los ejes de cada hélice se marcan con líneas de color azul para VAMP2, de color rojo para Syntaxina 1A y de color verde para las dos hélices de SNAP25b. A su vez, los enlaces entre los correspondientes C^{α} se marcan en negro. Tomado de: **Fasshauer D, et al, (1998)**. “Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 15781-15786.¹²³

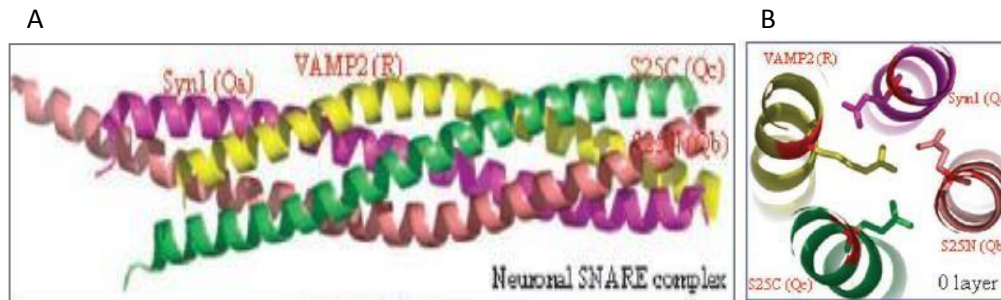


FIGURA 6. Estructura del complejo SNARE donde se observan las cuatro alfa hélices. Las hélices están representadas con la nomenclatura de su subclasificación de acuerdo al programa PyMol. En magenta se observa la hélice Qa de la Sintaxina 1, en rosa y verde las hélices Qb y Qc DE SNAP25 y en amarillo la hélice R de la VAMP2. (A) Vista lateral y (B) Vista frontal. Tomado de: **Hong W, (2005).** “SNAREs and traffic”. *Biochim Biophys Acta 174*, pp. 120-144.¹³⁵

Con el uso de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) y microscopía de fluorescencia en tiempo real, se observó que en algunas regiones de la célula, las SNARE se encontraban en otras configuraciones estables, por ejemplo pre-ensambladas, formando lo que se conoce como “complejos SNARE huérfanos”, en las regiones adyacente de unión vesicular, lo que da lugar a una exocitosis rápida. En otras regiones, el ensamble ocurre por la entrada de Ca^{2+} , resultando en una exocitosis más lenta en comparación con la anterior. Esto permitió concluir que los complejos SNARE son dinámicos.^{114, 125, 126} También se ha observado que la formación del complejo tiene un orden: primero se unen las *t-SNARE* y posteriormente se une la *v-SNARE* (VAMP), y la proporción en que debe ocurrir es de 1:1 de sintaxina y SNAP para que pueda unirse VAMP (**Figura 7**).^{127, 128}

Los eventos de fusión de membranas son relevantes durante la fagocitosis, que es una función que forma parte de los mecanismos de defensa del organismo contra agentes causantes de enfermedad. La formación del fagosoma es resultado de la activación del citoesqueleto de la célula fagocítica que ocurre debido al contacto de la membrana plasmática de los fagocitos con la superficie del microorganismo invasor.^{129, 130} La internación de éste en una vacuola exige el uso de membrana plasmática de las células fagocíticas, y aunque inicialmente se pensó que la superficie celular se reducía, se ha comprobado que durante la activación de los macrófagos con ésteres de forbol, la superficie celular se incrementa hasta en un 66%, y que además está correlacionado con la detección de marcadores de endosomas en la membrana plasmática.^{129, 131}

También se ha observado que la fagocitosis y la exocitosis son procesos que se encuentran íntimamente relacionados, de tal forma que también se da lugar a la participación de las

proteínas SNARE en la fagocitosis, por ejemplo: la fusión entre los endosomas de reciclamiento con la membrana plasmática está mediada por VAMP3; VAMP7 regula la fusión con endosomas tardíos y lisosomas; VAMP8 juega un papel inhibitorio de la fagocitosis en células dendríticas; Sintaxina 4 participa en la secreción del TNF- α cuando forma complejo con SNAP23 y VAMP3; SNAP23 juega un rol importante en el reclutamiento de complejos NADPH oxidasa y V-ATPasas a los fagosomas, etc.^{131, 132}

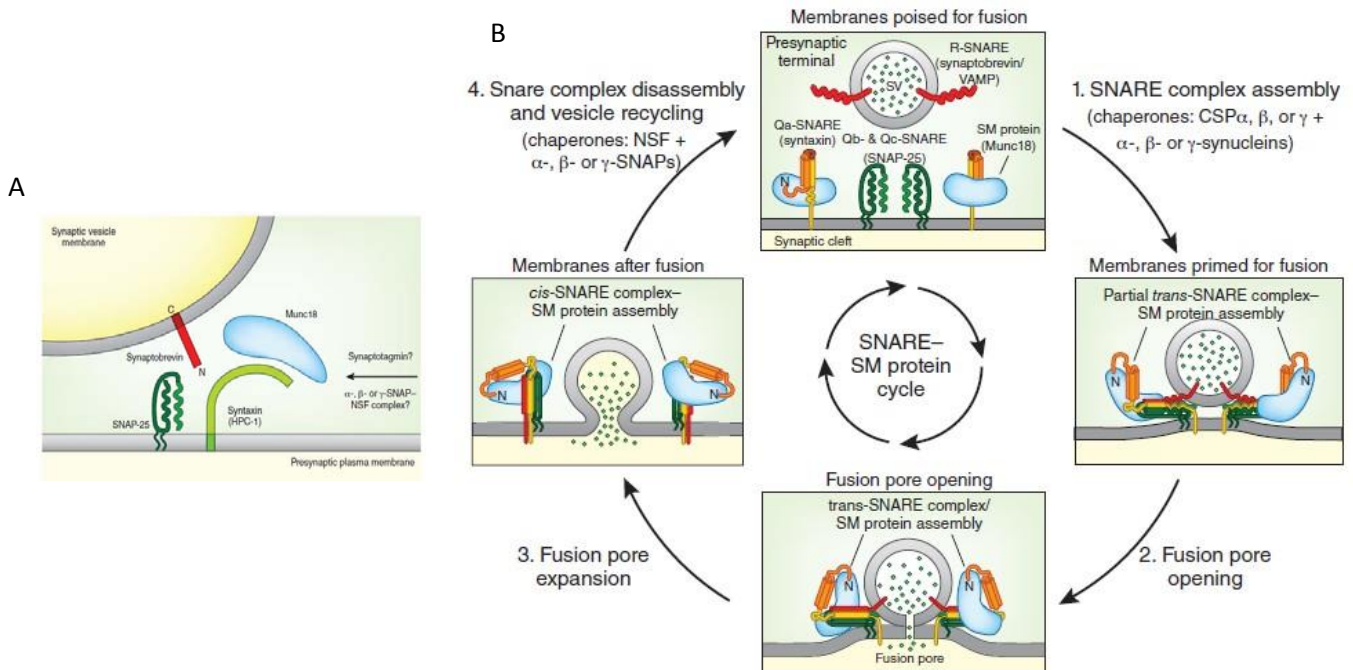


FIGURA 7. Localización y ciclo de ensamblaje y desensamblaje las proteínas SNARE. (A) Modelo de las proteínas que constituyen la maquinaria de fusión. En rojo se representa la proteína VAMP, la cual es transmembranal y se localiza en la vesícula secretora; en verde claro se representa a la sintaxina, la cual es transmembranal y se localiza en la cara citoplasmática de la membrana blanco; en verde oscuro se presenta la doble hélice que conforma a las SNAP, se localiza en la cara citoplasmática de la membrana blanco y es proteína periférica; en azul se representa a una proteína SM reguladora de la fusión de las Q-SNARE, la Munc18. (B) Modelo del ciclo de ensamblaje y desensamblaje de las proteínas SNARE durante la fusión de membranas. La formación del complejo necesariamente requiere la combinación de las hélices R-Qa-Qb-Qc. En la primera etapa, las Q-SNARE se preparan para fusionarse; esto implica que la conformación cerrada de las sintaxinas cambia gracias a la modificación, también estructural, de las proteínas SM. Esta conformación abierta permite que se formen complejos parciales *trans*-SNARE entre las Q-SNARE y luego con la R-SNARE. Esta etapa es facilitada por proteínas chaperonas recientemente descubiertas, como las sinucleínas y las proteínas de cadena de cisteína (CSPs), y su disfunción está asociada con neurodegeneración. En la etapa 2 sucede el enroscamiento del complejo a tal grado, que provoca la fusión de las membranas, y por lo tanto, la apertura del poro de fusión. Durante la tercera etapa, el poro de fusión se expande y los complejos *trans*-SNARE se convierten en complejos *cis*-SNARE. En este momento el contenido vesicular es liberado al espacio extracelular. En la cuarta etapa, los factores α SNAP y NSF median el desensamblaje del complejo, lo que permite su reciclamiento al igual que el de la membrana vesicular. Tomado de: Südhof TC, (2013). “A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond”. *Nat Med.* 19(10), pp. 1227-1231.¹²⁸

Este proceso de fusión de membranas se ha investigado durante aproximadamente un siglo, pero sólo en los últimos 20 años se ha logrado descifrar la maquinaria molecular y el mecanismo de fusión, dentro de lo cual, fungen como principales actores las SNARE.¹⁰⁷ Se han descubierto aproximadamente 60 proteínas pertenecientes a esta familia en las células de mamífero y levaduras, donde cada una se ha encontrado en diferentes compartimentos subcelulares.^{108, 133} En humanos, ya se han descrito 38.^{134, 135}

1.10 Proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa (SNAP 25)

La proteína asociada al sinaptosoma de 25 kDa, también conocida como SNAP25, RIC4, Sec9 y BA416N4.2, es una proteína periférica de tipo SNARE clasificada dentro de las *t*-SNARE (o Q-SNARE), ya que se encuentra, principalmente, en la membrana plasmática blanco de muchas células.¹³⁶ Tiene una localización subcelular mínima, encontrándola en el citoplasma, en la región perinuclear, en uniones celulares y sinapsis, y al igual que SNAP23, su homóloga, media principalmente procesos de exocitosis y fusión vesicular, aportando dos α -hélices al complejo de fusión de membranas.¹²⁴

Su descubrimiento en 1989 se realizó en una población de células nerviosas, donde se evidenció que en la secuencia correspondiente al ADN complementario había un único marco de lectura abierto que codificaba a un producto traducido de 206 aminoácidos, con un peso de 23,315 Da (23.3 kDa).^{136, 137, 138}

Aunque el péptido carece de una región estrecha hidrofóbica compatible con una región transmembranal, el amino terminal puede formar una hélice anfifílica que facilita el alineamiento con la membrana, permaneciendo anclada a ella y con disposición periférica.

¹³⁷

La secuencia de aminoácidos predicha también incluye un dominio central, codificado por el exón 5a o 5b, dependiendo del *splicing* alternativo, que contiene un grupo de cuatro residuos de cisteína muy cercanos entre sí (Cys-85, -88, -90 y -92).¹³⁹ Estos residuos pueden sufrir modificaciones post-traduccionales de tipo palmitoilación, lo cual se ha determinado como necesario para que se lleve a cabo una exocitosis eficiente.¹¹⁸ El residuo Cys-85 representa el principal sitio de palmitoilación al momento de la fusión de membranas. A su vez, este dominio rico en cisteína es similar al de algunas metaloproteasas, y lo que se ha visto es que cuando no sufren palmitoilación (clonada y expresada en *E. coli*), se forman grupos de unión a hierro. También se ha propuesto que el cambio en la variante por *splicing* conduce finalmente al cambio de nueve aminoácidos en el dominio de cisteínas, lo que modifica por completo la carga de la molécula, y a su vez, la presencia de una isoforma u otra.¹⁴⁰ Se ha visto que las isoformas son seleccionadas de forma diferente en las células del tejido nervioso, lo que sugiere que la palmitoilación puede modular esta selección en dicho tejido.^{118, 141}

SNAP25 permanece asociada a la fracción sinaptosómica de preparaciones de hipocampo después de una lisis hipoosmótica y se libera con detergentes no iónicos.^{136, 137} Las regiones nerviosas donde se encuentra en mayor concentración son las fibras presinápticas terminales del hipocampo y las capas internas de la circunvolución dentada. También se ha encontrado gran cantidad de su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en neuronas de las regiones del neocortex, la corteza piriforme, el núcleo anterior del tálamo, el puente y las células granulares del cerebelo. Esto sugiere una importante participación de la proteína en la liberación de neurotransmisores,^{137, 142, 143} aunque también se ha encontrado en otro tipo de células y regiones subcelulares, como en las células cromafines y semejantes a enterocromafines (ECL, *enterochromaffin-like cells*), durante la liberación de histamina por estimulación de la gastrina;^{144, 145} en neutrófilos, específicamente en la fracción membranosa de los gránulos peroxidasa-negativos;¹⁴⁶ en oocitos (SNAP25b) y células esteroideogénicas (SNAP25a), como las células de la granulosa y lúteas, donde se observó que su expresión es dependiente de la concentración de la hormona folículo estimulante y del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC);^{147, 148} en las células *beta* de los islotes de Langerhans, participando en la secreción de insulina, etc.¹³⁶

Los procesos de mayor relevancia en los que se ha reportado su participación son el tráfico de vesículas dependiente de clatrina, en la regulación de la liberación de insulina, en la liberación de neurotransmisores como serotonina, dopamina, noradrenalina y glutamina, y en la síntesis, el reciclamiento y la degradación del ácido gamma-amino butírico (GABA).

136

Forma complejos con las syntaxinas 1A, 2, 3, 4 y 11 y con las sinaptobrevinas 2, 7 y 8; además, también se une a otras proteínas no pertenecientes a la familia SNARE, como la proteína de centrómero F (CENPF), para regular el reciclamiento de la membrana plasmática; con BLOC-1 (*biogenesis of lysosome-related organelles complex 1*), para la biogénesis de organelos endosoma-lisosoma; con BLOC1S6 (la subunidad 6 de BLOC-1, llamada pallidina); con EQTN (*equatorin, sperm acrosome associated*), durante la fertilización; con CPLX1, TRIM9, RIMS1, SNAPIN, OTOF y HGS; interactúa con STXBP6 y forma complejo con SYT1 y SV2B.¹³⁶

La modificación de su estructura o su ausencia en algún tejido se relaciona con enfermedades como botulismo y tétanos (por la escisión específica de las neurotoxinas

botulínicas BoNT/A y BoNT/E en el C-terminal, donde BoNT/A corta en el noveno aminoácido, entre Gln¹⁹⁷ y Arg¹⁹⁸, y BoNT/E corta en el vigésimo sexto, entre Arg¹⁸⁰ e Ile¹⁸¹),¹⁴⁹ trastorno de hiperactividad y déficit de atención,^{150, 151, 152} parálisis, esquizofrenia,¹⁵³ insulinoma, enfermedad de Alzheimer,¹⁵⁴ coloboma, enfermedad de Huntington y desorden de bipolaridad.¹³⁶

Análisis de clonas con el ADNc de SNAP25 proveniente de ratón, pollo, *Drosophila melanogaster*, pez cebra, lagartija, rana africana, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* y el arroz, muestran que la proteína está altamente conservada a través de la evolución (genes ortólogos). A su vez, se han encontrado homólogos en levaduras.^{118, 136}

El gen que codifica esta proteína en el humano se encuentra en el cromosoma 20, en la región p12.2 del brazo menor y tiene una longitud de 88,592 pares de bases (pb) (**Figura 8**).¹⁵⁵

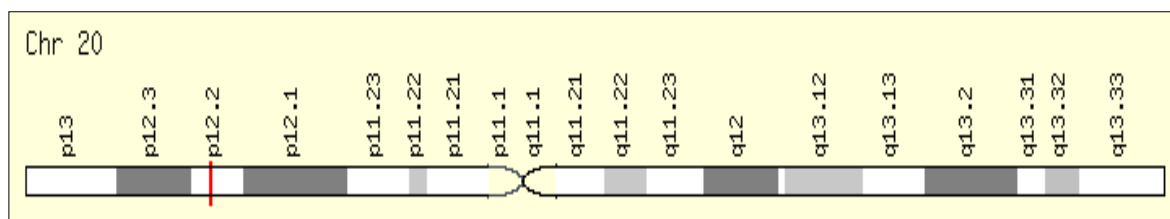


FIGURA 8. Esquema de dos brazos del cromosoma 20 de origen humano. La marca roja indica el sitio donde se localiza el gen que codifica a SNAP25, el cual tiene una longitud de 88.59 Kb. Número de referencia en el NCBI: NC_000020.¹⁵⁵

La transcripción del gen origina un ARNm de 2069 pb. El *splicing* alternativo en el exón 5 origina dos variantes, la 1 y la 2 (Números de referencia en el NCBI: NM_003081.3 y NM_130811.2, respectivamente).^{156, 157} Estas variantes tienen un 98% de identidad, dado que en cada secuencia hay una región distinta a la cual se le conoce como isoforma. De esta manera se tienen dos isoformas, la A, cuando el exón 5a es el que se transcribe, y la B, cuando el exón 5b es el que se transcribe. Las isoformas tienen la misma longitud (620 pb) y van del nucleótido 213 al 833.

Cada una de las secuencias de las variantes contienen: un codón de paro río arriba; un sitio de escisión proteolítica dada por la toxina botulínica E (aa 180); ocho exones, dentro de los cuales se observa una región conocida como “región de resistencia a los inhibidores de homólogos de la colinesterasa 4” en donde se encuentra la isoforma; la señal de poliA y el

sitio poliA. Además, la variante 2 contiene la región de interacción con la proteína de centrómero F (CENPF).¹⁵⁷

La isoforma A (SNAP25A, número de referencia del NCBI: NP_003072.2), tiene las siguientes características: dos dominios receptores al factor NSF (también llamados regiones *t*-SNARE), dos capas cero, dos flancos *zipper* de leucina, una región de la familia SNAP25, dos regiones de fosforilación (aminoácidos 138 y 187) y cuatro sitios de palmitoilación (aminoácidos 85, 88, 90 y 92) (**Figura 9**).¹⁵⁸

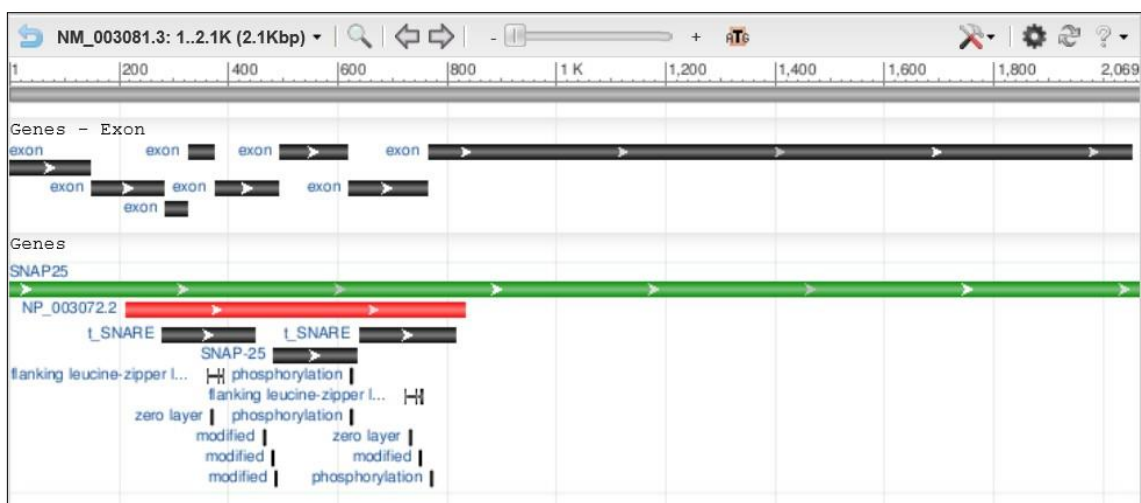


FIGURA 9. Regiones de la isoforma A de SNAP25. El ARNm de SNAP25 (línea verde continua) consta de 2,069 pb, en el cual se identifican 8 exones (líneas superiores en negro con flechas en su interior, dirección de transcripción 5'). La isoforma SNAP25A (línea roja continua), va del nucleótido 213 al 833 y consta de las regiones clásicas de la familia SNARE pertenecientes a una proteína Qb-Qc SNARE, donde, gracias a los dos dominios receptores al NSF, también llamados *t*-SNARE, se originan dos α -hélices (líneas inferiores color negro con flecha en dirección 5'), cada una con su capa 0 y el flanco de leucina. En la isoforma se encuentran dos regiones de fosforilación y 4 sitios que sufren modificación post-traducciona de tipo palmitoilación, correspondientes a los sitios de cisteína (barras negras inferiores). Número de referencia del NCBI: NP_003072.2.¹⁵⁸

La isoforma B (SNAP25B, número de referencia del NCBI: NP_570824.1), tiene las siguientes características: dos dominios receptores al factor NSF (o regiones *t*-SNARE), región conservada de la familia SNAP25, dos capas cero, dos flancos *zipper* de leucina, dos regiones de fosforilación y cuatro sitios de palmitoilación (85, 88, 90 y 92) (**Figura 10**).¹⁵⁹

2. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que algunos patógenos de vida intracelular tienen la capacidad de cambiar o regular la expresión de las proteínas de fusión asociadas a eventos de exocitosis, lo que les permite modificar el tránsito intracelular del fagosoma que las contiene y sobrevivir dentro de la célula huésped.^{160, 161, 162}

Así, Grinsten y col., mostraron que las proteínas SNARE son esenciales para que se lleve a cabo de manera óptima la fagocitosis en macrófagos, ya que desempeñan un papel crucial en la fusión de las membranas.^{74, 163} En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, se ha reportado que la vacuola que la contiene es capaz de inducir la degradación de VAMP3, alterando el tránsito intracelular del mismo.¹⁶¹ *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis* son capaces de expresar proteínas similares a las SNARE, las cuales emplean para modificar el tránsito del fagosoma que las contiene.^{160, 164}

También, se ha podido observar que en macrófagos estimulados con el LPS de *Salmonella* Minnesota, o con el de *E. coli*, hay una sobre expresión de las proteínas Sintaxina 4 y VAMP3, asociada al incremento en la secreción de ciertas citocinas que fungen como señales de alerta a células cercanas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).¹⁶⁵

Por otro lado, Murray y col., demostraron que las proteínas VAMP3 y sintaxina 4 participan en la secreción del TNF α en las balsas lipídicas durante la fagocitosis de *Candida albicans*. También, observaron que el LPS de *Salmonella entérica* modula la expresión de dichas proteínas y por consiguiente la cantidad TNF α que se secreta. De esta forma lograron demostrar que la secreción de esta citocina es un evento que está asociado con la fagocitosis de microorganismos, donde se acoplan los fenómenos de endocitosis y exocitosis.¹⁶⁶

Se sabe que las *t*-SNARE que participan en la fusión de la membrana plasmática con la membrana de los endosomas de reciclamiento, los cuales contienen al TNF α , son dos: Sintaxina 4, proteína transmembranal que aporta una hélice alfa, y SNAP23, proteína periférica que aporta dos alfa hélices al complejo de fusión; a su vez, la *v*-SNARE que participa en dicho complejo es VAMP3, proteína transmembranal de la vesícula que aporta una hélice alfa.¹⁶⁶

En experimentos realizados con *Brucella* spp. se ha observado que las vesículas COP II que derivan del RE son importantes en la fusión de la VCB con este organelo, además de que pueden interactuar con las proteínas SNARE.¹⁶⁷ Posteriormente, y en concordancia con los hallazgos previos, cuando se infectaron células con *B. abortus* y se interfirió con la expresión de la proteína de tránsito vesicular Sar1, se observó que la bacteria fue incapaz de establecerse en su nicho de replicación, lo que indica que esta GTPasa es esencial para la biogénesis de las VCB.¹⁶⁵ Sucedió lo mismo cuando se evaluó a la GTPasa Rab 2.¹⁶⁸ Estas observaciones sugieren que *Brucella* spp. modula proteínas que participan en el tránsito intracelular, sin embargo, hay pocos experimentos que evalúen si alguna proteína de fusión de la familia SNARE es alterada durante la infección. Además, dado que se ha comprobado que este microorganismo es capaz de disminuir la producción del TNF α ,¹⁶⁹ citocina que se secreta con la participación de las SNARE en las balsas lipídicas,¹⁶⁵ se propone que también estas proteínas podrían hallarse moduladas por la bacteria al momento de la infección, alterando así los eventos de tránsito intracelular en las etapas tempranas de la fagocitosis. Hay que resaltar que las balsas lipídicas son microdominios que, además de ser sitios donde se secretan citocinas, es la región donde se lleva a cabo de manera más frecuente la entrada de *Brucella* spp.^{72, 73}

De esta forma, estudios recientes realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, han evaluado algunas proteínas de la familia SNARE que forman parte del complejo Sintaxina4-VAMP3-SNAP25. Al evaluar a VAMP3, se determinó una sobre expresión significativa al infectar células J774.A1 con la cepa Bm133; sin embargo, una vez que se bloqueó su expresión con oligonucleótidos de ARN (*siRNA*, *small interfering ribonucleic acid*), la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis* no se encontró alterada significativamente, lo que sugiere que no es necesaria para su sobrevivencia.¹⁷⁰ Por otro lado, al cuantificar la expresión de Sintaxina 4 en células THP-1 durante la infección con *B. melitensis*, se observó una disminución significativa en su expresión, y posteriormente, al interferirla con *siRNA*, se denota una reducción significativa en la sobrevivencia de este microorganismo, lo que demuestra que esta proteína es importante para que se establezca en su nicho de replicación.¹⁷¹

Por lo tanto, es importante determinar si otras proteínas de la familia SNARE juegan un papel determinante en la fagocitosis y si estas pueden ser modificadas por el patógeno. La

función y las características estructurales de SNAP25 sugieren que también puede ser blanco de los mecanismos de virulencia de *B. melitensis* y que modificaciones en su estructura podrían estar relacionadas con el establecimiento de la bacteria en las células fagocitarias.

3. HIPÓTESIS

Si la proteína SNAP25 se expresa en macrófagos THP-1 entonces ésta se modificará durante la infección con *Brucella melitensis*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de la proteína SNAP25 en macrófagos THP-1 antes y durante la infección temprana con *Brucella melitensis*, mediante ensayos de inmunohistoquímica y expresión de genes.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de SNAP25 en macrófagos THP-1 mediante ensayos de inmunohistoquímica, *Western blot* y RT-PCR.
2. Determinar la expresión de SNAP25 durante la infección temprana de macrófagos THP-1 con *Brucella melitensis*, mediante ensayos de inmunohistoquímica, *Western blot* y RT-PCR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular.

Se utilizaron monocitos de origen humano de la línea THP-1 ATCC 9184™ para los ensayos de infección.¹⁷² Se mantuvieron en medio RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen®) suplementado con 0.45% de glucosa (BD Bioxon®), 25 mM de HEPES (USB®), 10% de suero fetal bovino (ByProductos®), 2 mM de L-glutamina (GIBCO-Invitrogen®), 1 mM de piruvato de sodio (GIBCO-Invitrogen®) y 0.05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®), a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

6.2 Cepas bacterianas.

Se utilizó la cepa Bm133 biotipo 1 de *Brucella melitensis* (cepa silvestre mexicana)¹⁷³ cultivada en caldo *Brucella* (BD GIBCO®) para los ensayos de infección. Se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas de citrato, urea, triple azúcar hierro y ácido sulfhídrico-motilida-indol para su identificación previo a los ensayos.^{37, 67} Tanto para las cinéticas como para las infecciones se sembraron seis colonias en 10 mL de caldo *Brucella* en un tubo cónico de 50 mL y se incubaron a 150 rpm durante 22 horas a 37.5°C. Posteriormente, se colocaron 500 uL del inóculo primario en 30 mL de caldo *Brucella* contenidos en un matraz de 125 mL y se dejó incubando a 150 rpm hasta obtener una DO_{625 nm} de 0.08-0.1. Su manejo se realizó en la Unidad de Bioseguridad 2 del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia y el conteo de las UFC's se realizó a las 3, 6, 9, 13, 18 y 22 h de incubación del inóculo secundario. Para la evaluación del índice de fagocitosis se utilizó la cepa *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC™ 49214, cultivada en caldo Luria Bertani, también llamado LB (10 g Bacto tripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, cbp 1 L, pH 7). Se sembraron 5 colonias en 10 mL de LB en un tubo cónico de 15 mL a 220 rpm por 16 h a 37°C. Posteriormente, se colocó 1 mL del inóculo en 50 mL de LB contenidos en un matraz de 250 mL hasta obtener una DO_{625nm} de 0.08-0.1. La cuantificación de las UFC's se realizó a la 1, 2 y 3 h de incubación del inóculo secundario. Cada cinética se realizó por duplicado.

6.3 Ensayos de Infección.

Las células THP-1 se crecieron en medio sin β-mercaptoetanol en placas de 6 pozos, donde en cada uno de ellos se colocaron 3 x 10⁶ células con phorbol 12-miristato 13-acetato

(PMA; Sigma-Aldrich®) a una concentración de 160 nM, durante 3 h, para alcanzar una confluencia del 80%; posteriormente, se dejaron con el PMA residual en RPMI 1640 fresco por 19 h más.^{174, 175} Las infecciones se llevaron a cabo en un cultivo de 2.5×10^6 células THP-1 por pozo, con una MOI 100:1 tanto para los ensayos de expresión con *B. melitensis* como para los ensayos de fagocitosis con *S. Enteritidis*. Asimismo, se utilizaron perlas de látex de poliestireno de 0.6 µm de diámetro (Sigma-Aldrich®) como control positivo. Una vez que se colocaron las bacterias o las perlas, las placas se centrifugaron a 2 000 rpm durante 10 min a 4°C para la sincronización, posteriormente se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 15, 30, 45 y 60 min. Al cabo de estos tiempos las placas se lavaron y se realizó el procedimiento correspondiente según la técnica a proseguir. Cada tiempo se evaluó por duplicado y se realizaron dos ensayos independientes.

6.4 Determinación del Índice de Fagocitosis.

Para conocer la capacidad fagocítica del cultivo celular, se determinó primero la viabilidad del mismo al momento del conteo celular mediante la técnica de exclusión de azul de Tripano,¹⁷⁶ y posteriormente, se siguió el protocolo reportado por Campbell, *et. al.*,¹⁷⁷ con algunas modificaciones. Brevemente, después de determinar la MOI 100:1 con *S. Enteritidis*, se colocó el inóculo correspondiente a cada pozo, se centrifugó la placa a 2 000 rpm por 10 min a 4°C y se incubó por 1 h a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂; se retiró el sobrenadante de cada pozo y se realizaron 4 lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7, *phosphate buffer solution*; 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.2 g de KH₂PO₄ en c.b.p 1 L, todos de J.T. Baker) a 4°C, se agregaron 200 uL de metanol absoluto a 4°C para fijar las células y se dejó secar el preparado por 2 a 3 minutos. Posteriormente, las células se tiñeron con 500 a 700 uL de colorante de Giemsa 1:10 durante 10 minutos, se retiró y se hicieron lavados con agua corriente. Se dejó secar la placa y se observó con objetivo de inmersión para la contabilización de 200 células. El índice de fagocitosis (IF) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$IF = \frac{\text{(Porcentaje de células que tienen por lo menos una bacteria en su interior)}}{\text{(Promedio de bacterias por célula positiva)}}$$

Si el número obtenido se encuentra dentro del rango de 500 a 1500, el cultivo celular tiene buena capacidad fagocítica, lo que significa que aproximadamente el 80% de las células son fagocíticas y cada una contienen de 10 a 20 bacterias por célula.¹⁷⁷ Se realizaron dos ensayos independientes, cada uno con dos repeticiones.

6.5 Extracción de ARN.

La extracción del ARN total a partir de los macrófagos se efectuó de acuerdo al protocolo del TRIzol (Ambion Life Technologies[®]),¹⁷⁸ en gabinete de bioseguridad clase II. Esto se realizó para todas las células, en cada uno de los tiempos de incubación y con los distintos tratamientos: sin diferenciar, diferenciadas sin infectar, diferenciadas con perlas de látex y diferenciadas e infectadas con *B. melitensis*. Brevemente, después de cada tiempo de incubación, se retiró el medio de cada uno de los pozos y se realizaron dos lavados con PBS pH 7 a 4°C, se retiró el excedente y se colocó 1 mL de TRIzol en cada pozo por 5 min a 4°C. Las muestras se colocaron en tubos cónicos de 1 mL y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso. Todo el procedimiento posterior se realizó a 4°C. Se colocaron 200 uL de cloroformo (J.T. Baker[®]), se homogenizó el contenido del tubo manualmente durante 15 s, se incubó por 2 min y se centrifugó (Centrifuge 5415R, Eppendorf[®]) a 12 000 rpm durante 15 min; después, se obtuvo la fase acuosa y se transfirió a otro tubo libre de RNAsas, se agregaron 200 uL de la mezcla alcohólica de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, con proporción 25:24:1 (J.T. Baker[®] y Merk KGaA[®]), se homogenizó gentilmente y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min; luego, se obtuvo nuevamente la fase acuosa y se transfirió a otro tubo, se agregaron 500 uL de 2-propanol (Merk KGaA[®]) y se homogenizó gentilmente, se incubó 10 min y se volvió a centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min; a continuación, se retiró el sobrenadante evitando desprender la pastilla de ARN del fondo del tubo y se agregó 1 mL de etanol al 75% (J.T. Baker[®]) con agua-DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma-Aldrich[®]), se centrifugó a 7 500 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se agregaron de 20 a 25 uL de agua-DEPEC al 0.1%, se homogenizó y congeló a -80°C hasta su uso.

6.6 Visualización y cuantificación de ARN.

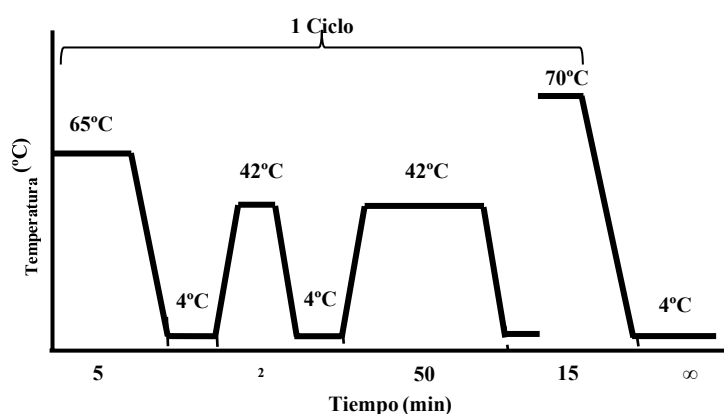
Las extracciones obtenidas se cuantificaron mediante espectrofotometría (ND-1000v3, ThermoScientific[®]). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total. La evaluación de la integridad de las bandas 28S, 18S y 5S del ARN ribosómico se realizó mediante el corrimiento de la muestra por electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure Invitrogen[®]) al 1.5% en solución de TAE (40 mM de Tris, USB[®]; 19 mM de ácido acético J.T. Baker[®], 2 mM de EDTA pH 8, USB[®]) y se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen[®]) como referencia. Por último, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio al 0.001% (Sigma-Aldrich[®]) para la visualización de

las bandas en el fotodocumentador (MiniLumi, Bio-Imaging Systems®; software Gelcapture® V.0.8.).

6.7 Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Una vez cuantificado el ARN total, se realizó la síntesis del ADNc con la enzima transcriptasa reversa II (SuperScript II, Invitrogen®) en el termociclador TC-512 (Techne®), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Las reacciones se realizaron en un gabinete de bioseguridad clase II (todos los reactivos fueron de Invitrogen®, a excepción del agua-DEPC) (Cuadro 2, Esquema 1).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (uL)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	0.5 ug/uL	1
ARN	1 ug/uL	1 – 5
dNTP's	10 mM	1
Agua-DEPC	-	9
Incubar a 65°C por 5 minutos. Después dar pulso y colocar a 4°C.		
Amortiguador de síntesis	5X	4
DTT	0.1 M	2
Incubar a 42°C por 2 minutos,		
Transcriptasa reversa II	200 U	1
Agua-DEPC	-	Cbp 20
Incubar a 42°C por 50 minutos; inactivar reacción a 70°C por 15 minutos.		



ESQUEMA 1. Condiciones de temperatura y tiempo para la síntesis del ADN complementario con la transcriptasa reversa II (SuperScript II, Invitrogen®).

CUADRO 2. Mezcla de reactivos para la síntesis de ADN complementario. Se muestran los tiempos de incubación así como las temperaturas de cada fase.

Una vez obtenido el ADNc, se llevó a cabo la PCR punto final con el uso de la polimerasa recombinante del producto comercial *Taq DNA Polymerase*, de Invitrogen®, en el termociclador TC-512, donde se sintetizó el ADNc. La reacción se preparó en un gabinete de seguridad clase II. Los iniciadores que se utilizaron para amplificar los fragmentos correspondientes a SNAP25 y β -actina se tomaron del reporte de Hawi Z, *et. al.*,¹⁵² y los correspondientes a la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), son los reportados por Castañeda-Ramírez A, *et. al.*¹⁷¹ Los tres pares fueron amablemente proporcionados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del Dr. Ricardo Oropeza Navarro. Los fragmentos de los genes que

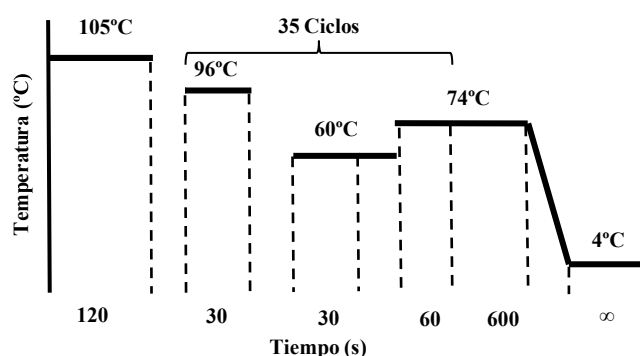
codifican para las enzimas G3PDH y β -actina se utilizaron como controles de reacción. Las características de los tres pares de iniciadores se describen en el **Cuadro 3**. Los reactivos empleados en la PCR y las condiciones de esta se describen en el **Cuadro 4** y en el **Esquema 2**, respectivamente. A excepción de los iniciadores y el ADNc, todos los reactivos fueron de Invitrogen®.

Nombre del gen	Tamaño de la secuencia	Secuencia 5'-3' de los iniciadores	Tm (°C)	% GC	No. de bases	Amplificado (pb)
SNAP25	2069	FW. ATG GAT GAA AAC CTA GAG CAG G	60	45.5	22	190
		RV. ACA CTT AAC CAC TTC CCA GC	60	50	20	
β -Actina	1852	F.W ACC ACA CCT TCT ACA ATG AGC	60	47.6	21	172
		RV. GCG TAC AGG GAT AGC ACA G	60	57.9	19	
G3PDH	1268	FW. AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT GGT	60	50	24	189
		RV. AAG CTT CCC GTT CTC AG CTT GA	60	52.2	23	

CUADRO 3. Características de los iniciadores que se ocuparon para la PCR punto final.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN (uL)
Amortiguador de síntesis, sin MgCl ₂	10X	5
MgCl ₂	25 mM	3
dNTP's	10 mM	1
Iniciador Forward	10 pmol/uL	1
Iniciador Reverse	10 pmol/uL	1
ADNc	1 ug/uL	3
Taq polimerasa	1.5 U	1.5
Agua inyectable	-	36

CUADRO 4. Mezcla de reactivos para la PCR punto final.



ESQUEMA 2. Condiciones de temperatura y tiempo para la PCR punto final con la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen®).

6.8 Extracción de proteínas de las células THP-1.

Las células sin diferenciar, diferenciadas sin tratamientos y diferenciadas con los tratamientos correspondientes se lavaron con PBS a 4°C y se agregaron de 50 a 100 μ l de buffer de lisis (Tritón 100x al 1%; Tris 0.01 M pH 8.3 y EDTA 0.05M pH 8, ambos de USB®; preparar al momento y mantener a 4°C)¹⁷⁹ a cada pozo, se incubaron por 5 min a 4°C, se cosecharon y el extracto obtenido se filtró con membranas de 0.22 μ m (Millipore®) para eliminar las bacterias y las perlas que no fueron fagocitadas o que no se eliminaron con los lavados. Posteriormente, se conservaron las muestras a -70°C sólo por 24 h para su cuantificación. Se utilizó un extracto de proteínas totales de cerebro de ratón como control positivo para la detección de la SNAP25. El cerebro se obtuvo al momento en que se procesarían las muestras, se maceró y se retiró el sobrenadante, se centrifugó a 12 000 rpm

(Centrifuge 5415R, Eppendorf[®]) por 10 min a 4°C y nuevamente se retiró el sobrenadante, el cual se procesó como las muestras experimentales. Todo el procedimiento se realizó a 4°C hasta su cuantificación.

6.9 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas en cada muestra se determinó con el método de Bradford,¹⁸⁰ utilizando el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000[®]). Brevemente, se realizó una curva de referencia con albúmina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich[®]), a 1 µg/µL, y una vez que se alcanzó una linealidad mayor a 98% se cuantificaron las muestras agregando en una cubeta del espectrofotómetro 2 uL en 98 uL de agua miliQ más 1 mL de reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie G-250, Baker Analytical[®]; 50 mL de etanol al 95%, J.T. Baker[®]; 100 mL de ácido fosfórico al 85%, J.T. Baker[®] en c.b.p 1 L de agua miliQ; preparar en oscuridad, filtrar con filtro del no. 1 tipo Warthman[®] y almacenar en frasco ámbar), se incubaron por 5 minutos en oscuridad y se realizó la lectura. Como blanco se ocuparon 100 uL de agua miliQ más 1 mL de reactivo de Bradford en la cubeta del espectrofotómetro.

6.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 12% con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

Una vez cuantificadas las muestras, se llevó a cabo la electroforesis de las proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.¹⁸¹ Brevemente, primero se preparó el gel separador al 12% (3.35 mL de agua destilada; 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, USB[®]; 100 uL de SDS 10%, Sigma-Aldrich[®]; 4.0 mL de acrilamida 30%, Bio-Rad[®]; 300 uL de persulfato de amonio 10%, GibcoBRL[®] y 6 uL de TEMED, Sigma-Aldrich[®]), se colocó sello de agua y una vez polimerizado, se preparó el gel concentrador (3.05 mL de agua destilada, 1.25 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 50 uL de SDS 10%, 650 uL de acrilamida 30%, 30 uL de persulfato de amonio 10% y 5 uL de TEMED). La cámara Mini-PROTEAN II (Bio-Rad[®]) se ocupó para realizar la electroforesis y antes de colocar las muestras en los pozos se llenó con amortiguador de corrida (Tris 25 mM; glicina 192 mM Sigma-Aldrich[®] y SDS 0.1%, en c.b.p. 1 L). Las muestras se sometieron a ebullición por 5 min con el amortiguador Laemmli (25 mL de 0.5 M Tris-HC/0.4% SDS pH 6.8; 20 mL de glicerol, Sigma-Aldrich[®]; 4 g de SDS, 2 mL de 2β-mercaptoetanol, ProPure[®]; 1 mg de azul de bromofenol, Sigma-Aldrich[®] y agua destilada c.b.p. 100 mL) en una relación 1:1 y en cada carril. Las proteínas se separaron a 60 volts para el gel concentrador y a 70 volts para el gel

separador. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen[®]) y se prepararon dos geles a partir de cada tratamiento, uno para la inmunotransferencia y otro para teñirlo con azul de Coomasie (Baker[®]).

6.11 Transferencia de proteínas e inmunodetección (*Western Blot*).

Después de separar las proteínas por electroforesis, se utilizó uno de los geles para transferirlas a membranas de nitrocelulosa (Millipore[®]) en una cámara Mini-PROTEAN II[®] para *western blot*, la cual se llenó con amortiguador de transferencia (Tris 24 mM; glicina 192 mM y metanol al 20%, J.T. Baker[®], aforar a c.b.p 1 L) y se dejó a 25 volts durante 16 h, en cámara fría. Para corroborar que la transferencia se llevó a cabo, se tiñó la membrana con rojo de Ponceau durante 5 min y después se destiñó con dos enjuagues con TBS (Tris 100 mM y NaCl 150 mM en c.b.p 1 L). Posteriormente, se bloquearon las membranas con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0.05% en agitación de 95 rpm durante 2 h, se realizaron cuatro lavados en ciclos de 5 min cada uno intercalando las soluciones TBS-Tween 20 al 0.05% y TBS. Después, se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de origen murino anti-SNAP25 (Abcam[®]) durante 18 h en agitación de 95 rpm, a una dilución 1:500. Transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente cuatro lavados con TBS-Tween 20 al 0.05% y TBS por 5 min cada uno e incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de murino acoplado a peroxidasa (Invitrogen[®]) por 2 h en agitación de 95 rpm, a una dilución 1:1000 para el revelado con 4-cloro-naphtol, y 1:10 000 para el revelado con quimioluminiscencia. En seguida, se lavaron las membranas según el tipo de sustrato que se ocupó: dos de 5 min y dos de 10 min para el revelado con 4-cloro-naphtol, y cinco lavados de 10 min para el revelado con quimioluminiscencia, intercalando las soluciones antes mencionadas y terminando con TBS. Finalmente, para el revelado con 4-cloro-naphtol, se prepararon las soluciones A (20 mL de metanol, J.T. Baker[®] más 60 mg de 4-cloro-naphtol, Sigma-Aldrich[®]) y B (100 mL de TBS más 100 uL de peróxido de hidrógeno, J.T. Baker[®]), se mezclaron e inmediatamente se sumergieron las membranas, se mantuvieron en agitación hasta observar la marca y una vez que se llevó a cabo la reacción, se detuvo colocando agua destilada fría. Para el revelado con quimioluminiscencia se utilizó el producto *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit*, (Pierce[®]), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, en oscuridad se preparó la solución de revelado (luminol:sustrato:agua bidestilada) en una proporción 1:1:1, se homogenizó y se colocó la membrana en la solución, se dejó incubar por 3 min y se transfirió al cassette del fotodocumentador (Gel Logic 1500[®] Imaging

System) entre dos láminas de acetato y evitando burbujas. Posteriormente, con el uso del *software* Kodak Image[®], se establecieron los parámetros para capturar la señal, la cual se obtuvo con 3 exposiciones cada una de 30 s. El control positivo se procesó con los mismos anticuerpos primario y secundario y las mismas condiciones de técnica antes descrita.

6.12 Inmunohistoquímica.

6.12.1 Fijación y preparación de las células.

Los monocitos se concentraron por centrifugación a 750 rpm a 4°C por 5 min, se retiró el medio y se agregaron 5 mL de etanol al 70% (J.T.Baker[®]) por cada mL de botón celular, se suspendieron gentilmente y se incubaron 10 min a -20°C, se centrifugaron nuevamente y se retiró el sobrenadante, se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 frío y se mantuvieron a 4°C en la misma solución amortiguadora. Para su posterior procesamiento, los monocitos se colocaron en laminillas electrocargadas *Kling-on HIER* (BioCare Medical[®]) por citospin (Cytospin Centrifuge Shandon Southern[®]) agregando 20 uL de muestra en los adaptadores, los cuales se centrifugaron a 1000 rpm por 5 min y una vez terminado el ciclo se introdujeron las laminillas en etanol al 70% para su posterior procesamiento. Para evaluar a las células en el estadio de macrófagos, los monocitos se diferenciaron en cubreobjetos redondos de vidrio de borosilicato (Fisher[®]), de 12 mm de diámetro y 0.13 a 0.16 mm de grosor, previamente esterilizados a 121 lb durante 15 min, y colocados en el fondo de cada pozo antes de poner el cultivo celular. Se fijaron de se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se retiró el medio y se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 a 4°C, luego se agregaron 2 mL de etanol al 70% a -20°C y se incubaron a -20°C por 5 min, se retiró el etanol y se volvieron a lavar con PBS pH 7.4 a 4°C, finalmente se dejaron en una solución de PBS pH 7.4 a 4°C hasta su procesamiento.¹⁸² Como control positivo se ocupó una muestra de la región del hipocampo de cerebro humano, tanto de paleocorteza como del neocortex, fijada con formaldehído al 10% y embebida en parafina para su conservación. Estas muestras se cortaron en micrótopo y se colocaron en laminillas electrocargadas *Kling-on HIER*[®], se metieron en una incubadora bacteriológica (Blue M[®], Electric Company) a 60°C por 2-4 min para desparafinar y se lavaron con xilol al 100% (J.T. Baker[®]) para su posterior procesamiento.¹⁸² Los controles negativos consistieron en muestras de hipocampo y células sin diferenciar y diferenciadas que se procesaron sin el anticuerpo primario.

6.12.2 Inactivación de la peroxidasa endógena y recuperación antigénica.

Todas las muestras se sumergieron en una solución para inactivar la peroxidasa endógena (100 mL de metanol más peróxido de hidrógeno al 1%) durante 30 min a 24°C, después se realizó un lavado con agua corriente y luego dos con agua bidestilada, cada uno de 3 min. Posteriormente, se llevó a cabo la recuperación antigénica sólo de la muestra de hipocampo colocando las laminillas en un amortiguador de citratos (ácido cítrico 0.1 M y citrato de sodio 0.1 M, pH 6.0) e incubándolas a 95°C por 20 min en el PTLINK (Dako®), se bajó la temperatura a 60°C y se permitió que las laminillas alcanzaran la temperatura ambiente, se realizó un lavado con agua bidestilada y luego tres con amortiguador de Tris pH 7.4 de 3 min cada uno.¹⁸²

6.12.3 Inmunodetección

La inmunodetección se realizó con el método indirecto del polímero en cadena, el cual permite un incremento en la sensibilidad y especificidad de detección. Las muestras se procesaron con los reactivos del kit comercial *Mach 1 Universal HRP-Polymer Detection System* (BioCare Medical®) según las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Brevemente, se colocaron las laminillas en una cámara húmeda nivelada para el bloqueo de las proteínas inespecíficas con una solución de α -caseína durante 30 min, se retiró el excedente y se colocó el anticuerpo primario monoclonal de origen murino anti-SNAP25 (Abcam®) a una dilución 1:100 y se dejó incubando durante 18 h a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con amortiguador de Tris pH 7.4 cada uno de 3 min, se colocó la solución dos que contiene una proteína amplificadora y se dejó incubar por 30 min a 25°C. Después, se realizó otro ciclo de lavados con las condiciones antes mencionadas, se colocó el polímero que contiene al anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-peroxidasa y se incubó en cámara húmeda por 30 min. Una vez finalizado esto se realizó un ciclo de cinco lavados con el amortiguador de Tris y se procedió al revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 30 mg/100 mL de amortiguador para sustrato, se dejó por 3 a 5 minutos y se detuvo la reacción enjuagando con agua bidestilada. Finalmente, todas las muestras se contratiñeron con hematoxilina de Gill (Sigma-Aldrich®) para su análisis, de acuerdo a las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones: se sumergieron las laminillas o cubreobjetos en la solución de hematoxilina de Gill No.1 por 2 min, se enjuagaron con agua corriente, se colocaron en solución de Scott por 10 s, se enjuagaron con agua corriente y se deshidrataron pasándolas por etanol al 96% y etanol absoluto, cada uno por 2 a 3 s, luego se sumergieron en acetona y después en xilol, finalmente se colocó

la resina y se montaron los cubreobjetos para su observación.^{182, 183} Para corroborar que la integridad celular se mantuvo durante el procesamiento de la inmunohistoquímica, se designó una muestra de cada uno de los tratamientos para detectar vimentina y otras para procesarlas con la tinción de hematoxilina-eosina (H-E).^{184, 185}

6.12.4 Cuantificación y determinación del H-score.

Para el análisis semicuantitativo de la inmunoreactividad de SNAP25 se ocupó el método del H-score. Brevemente, con un microscopio óptico, en el objetivo seco fuerte con retícula (Zeiss[®]), se contaron más de 500 células de cada tratamiento, asignando el valor de 0 a las que no tuvieron marca, 1 a aquellas con marca tenue, 2 a las que tuvieron marca moderada y 3 a las que tuvieron marca intensa. Después, el H-score se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:¹⁸⁶

$$H\text{-score} = \sum P_i$$

donde,

$$i = 0, 1, 2 \text{ ó } 3$$

$$P = [\% \text{ células } 1*1]; [\% \text{ células } 2*2] \text{ y } [\% \text{ células } 3*3]$$

Las imágenes de las muestras procesadas por inmunohistoquímica se tomaron en un microscopio óptico (Modelo Primo Star, Zeiss[®]) con cámara Motic, en el *software* Motic Images Plus 2.0[®], cuidando la iluminación de Köhler, a una resolución de 2592 x 1944, en el Departamento de Morfología e Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

6.12.5 Análisis Estadístico.

El número de células positivas al marcaje con el anticuerpo anti-SNAP25 se determinó considerando los valores de $i=1 + 2 + 3$. Estos valores se utilizaron en porcentaje. Por otro lado, los datos del H-score se analizaron con los siguientes modelos matemáticos.

1. Para encontrar si existía alguna diferencia de la expresión de SNAP25 entre los monocitos y los macrófagos, se realizó una comparación entre medias para muestras independientes con la prueba *t* de Student. Se comprobó normalidad e igualdad de varianza, considerando siempre un $\alpha = 0.05$.

2. Para analizar el efecto de *B. melitensis* y las perlas de látex durante los diferentes tiempos post-infección (15, 30, 45, 60 min) en el H-score se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 4, empleando el procedimiento GLM (*General Lineal Model*) en el *software* SPSS 20. El modelo matemático es el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \Phi_i + \theta_j + (\Phi * \theta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde:

y_{ij} : es la variable respuesta modelada;

μ : es la media general;

Φ_i : es el efecto fijo del i-ésimo grupo ($i = B.melitensis$, perlas de látex);

θ_j : es el efecto fijo del j-ésimo grupo ($j = 15 \text{ min}, 30 \text{ min}, 45 \text{ min}, 60 \text{ min}$);

$(\Phi * \theta)_{ij}$: es la interacción entre los factores;

Se comprobaron los supuestos de homocedasticidad de los errores y de normalidad. Para la comparación entre medias se utilizó la prueba de Tukey. En todas las pruebas se utilizó una $\alpha = 0.05$.

7. RESULTADOS

Cultivo celular. Para acercarnos más al conocimiento de la patogénesis de la brucelosis en el ser humano, específicamente en células fagocíticas profesionales, se decidió utilizar monocitos de la línea THP-1.¹⁷² Éstos se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con una viabilidad del 94 al 98% (**Figura 12A**). Para realizar los ensayos de infección, los monocitos se diferenciaron a macrófagos con el mitógeno phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich®), a una concentración de 160 nM.^{174, 187} A esta concentración se obtuvo una confluencia de macrófagos adheridos del 80 al 85%. (**Figura 12B**).

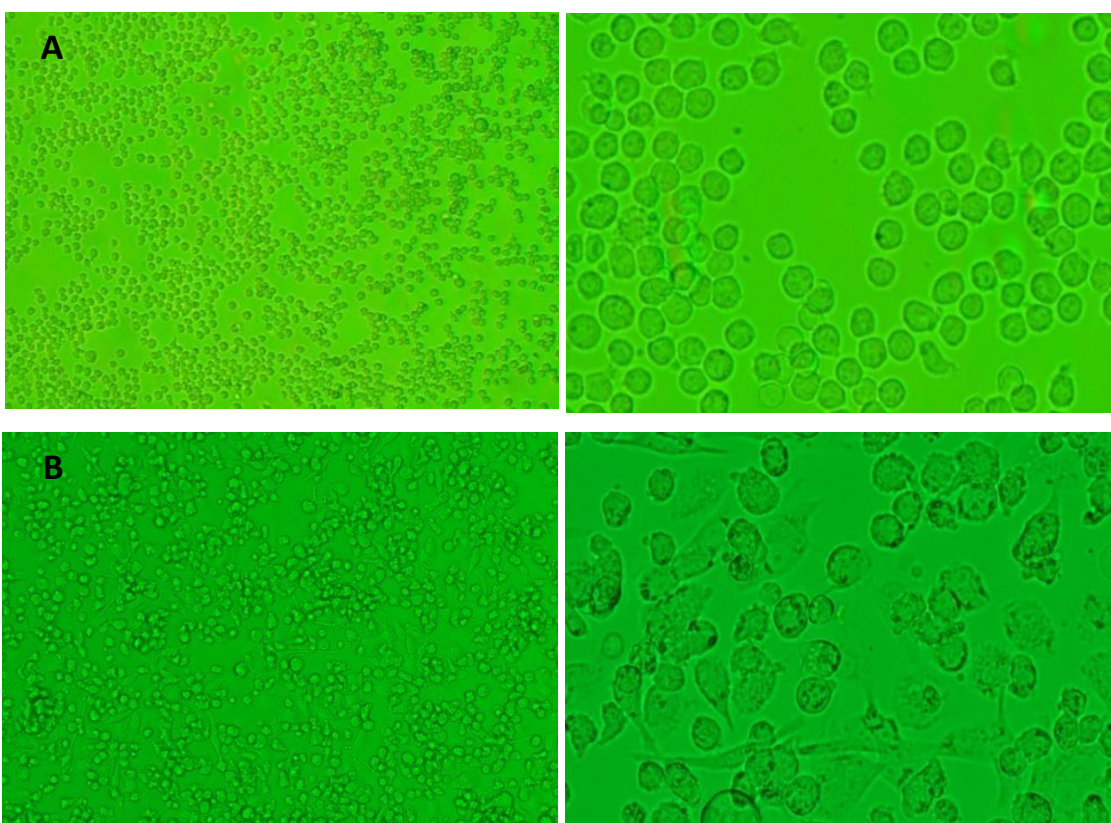


FIGURA 12. Monocitos y macrófagos de origen humano de la línea celular THP-1. A) Monocitos en suspensión en medio RPMI 1640 y 10% de SFB, a una atmósfera del 5% de CO₂. Nótese la morfología circular y con algunas proyecciones de la membrana, sin aglutinación y refringentes (izquierda, x10; derecha, x40). B) Macrófagos 19 h post-PMA adheridos a la superficie de la botella con cambios en su morfología. Se observan células fusiformes y redondas, con una confluencia del 80% (izquierda, x10; derecha, x40).

Aunque la morfología del monoestrato no fue totalmente fusiforme y se observaron células redondas, sí se nota pérdida de las prolongaciones finas de los monocitos, disminución de la relación núcleo:citoplasma e incremento en el número y tamaño de las vacuolas al evaluar a los macrófagos con H-E (**Figura 13**), lo cual es congruente con los reportes de Tsuchiya, *et. al.* (1982) cuando se trata de células en cultivo continuo.¹⁷⁴

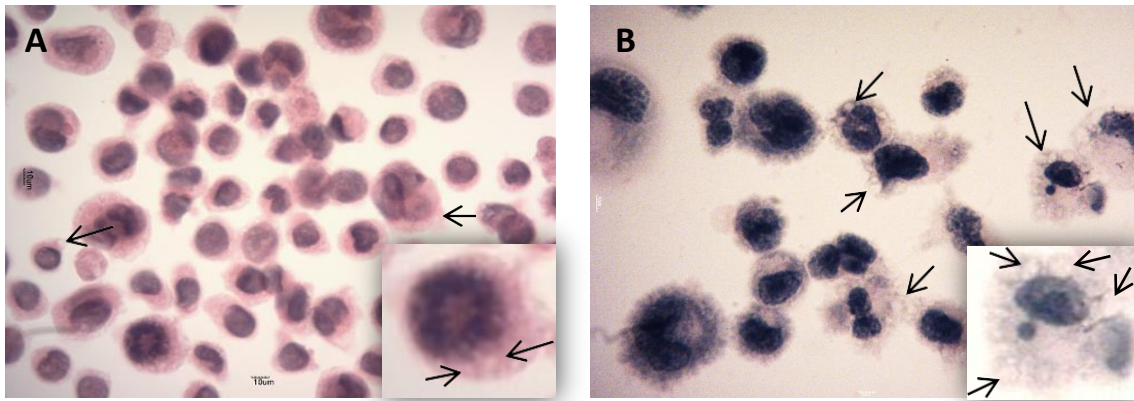


FIGURA 13. Morfología de los monocitos y macrófagos THP-1. Las células se fijaron con etanol al 70% y se tiñeron con HE para su observación. A) Monocitos con apariencia redonda en los cuales se observan vacuolas escasas y muy pequeñas (flechas negras, x100). B) Macrófagos con morfología fusiforme o redonda que corresponde a células en constante cultivo, con disminución en la relación núcleo:citoplasma y con vacuolas de mayor tamaño y número (flechas negras, x100).

Para calcular la MOI de los ensayos de infección se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano, tanto de *Brucella melitensis* Bm 133 como de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (ATCC™ 49214). Se obtuvo una concentración bacteriana de 3.5×10^8 UFC/mL para *Brucella melitensis*, a las 13 h de incubación del inóculo secundario (**Gráfica 1, anexo**), y de 1×10^8 UFC/mL para *Salmonella* Enteritidis, a los 60 min de incubación del inóculo secundario (**Gráfica 2, anexo**), ambas a una $DO_{625 \text{ nm}}$ de 0.08-0.1. Hecho esto, se evaluó la capacidad fagocítica de las células en cultivo mediante un ensayo de infección con *Salmonella* Enteritidis dejando un tiempo de fagocitosis de 60 min. Se contaron 200 células totales, dentro de las cuales se cuantificaron aquellas con al menos una bacteria intracelular y se consideró el promedio de bacterias fagocitadas por cada célula positiva (**Figura 14**).¹⁷⁷ Con estos datos, se obtuvo un índice de fagocitosis de 1163, lo que indica que el cultivo tiene una capacidad fagocítica aceptable, ya que aproximadamente el 80% lleva a cabo este proceso, con un rango de 10 a 20 bacterias por célula.

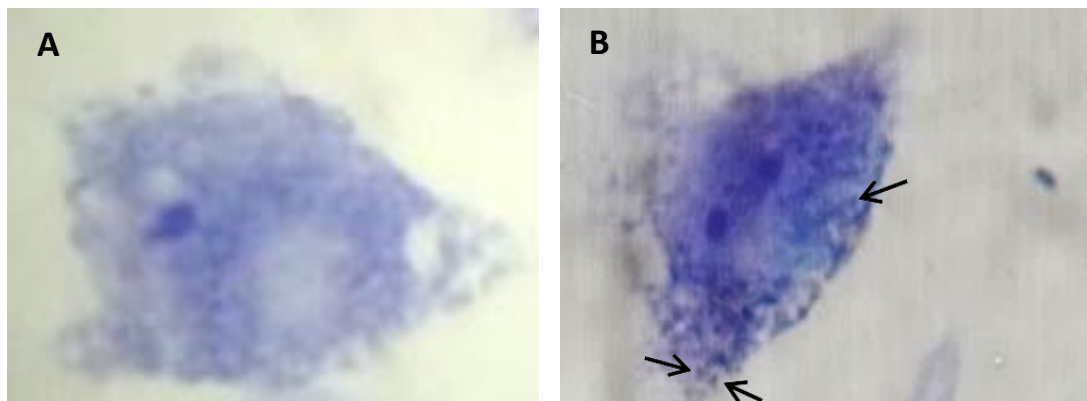


FIGURA 14. Índice de fagocitosis en macrófagos THP-1. A) Control negativo; B) Macrófagos infectados con *S. Enteritidis*, donde observamos las bacterias dentro de vacuolas en diferentes sitios del citoplasma (flechas). Se obtuvo un IF = 1163, lo cual indica que el cultivo tiene una buena capacidad fagocítica. Tinción de Giemsa 1:10, x100. La MOI fue de 100:1 y se llevó a cabo la fagocitosis por 1 h.

Ensayos de Infección. Una vez determinado el índice de fagocitosis de los macrófagos, se realizaron las infecciones experimentales con *B. melitensis* a una MOI 100:1. Asimismo, se utilizaron perlas de látex de 0.6 μm de diámetro (Sigma-Aldrich®) como control positivo, a la misma MOI. Antes de cada ensayo se corroboró que la bacteria correspondiera a *Brucella melitensis* mediante la observación de cocobacilos Gram negativos no móviles al teñirlos con Gram, las colonias crecidas en agar *Brucella* fueron translúcidas, de morfología convexa y diámetro de 0.1 a 0.2 μm , y se corrieron pruebas bioquímicas de citrato, ácido sulfhídrico-indol-motilidad y acetato de plomo con lecturas negativas, así como de urea y catalasa, con reacción positiva.^{37, 67}

Extracción y visualización del ARN. Para saber si se genera el transcrito de SNAP25 en esta línea celular se realizó primero la extracción del ARN total a partir de monocitos y macrófagos sin infectar e infectados. El ARN total obtenido se evaluó en un gel de agarosa al 1.5% después de su electroforesis y al digitalizar la imagen se pudo observar la integridad de las bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas 28S, 18S y 5S de todas las muestra. (**Figura 15**), lo que indica la integridad del ARN total extraído.

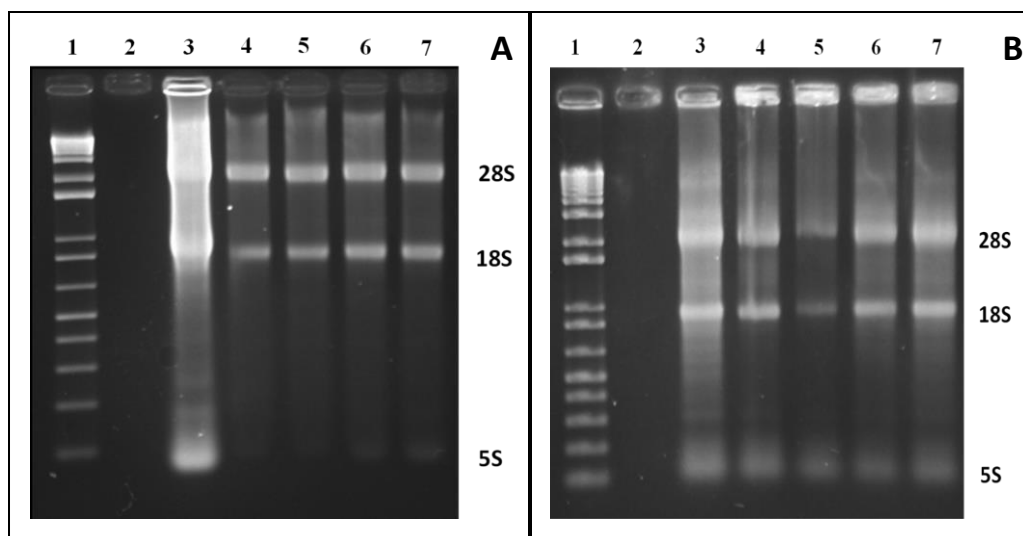


FIGURA 15. Extracción de ARN total de células THP-1. Fotografías de geles de agarosa al 1.5% con las extracciones de ARN total de A) células sin infectar y B) células infectadas con *Brucella melitensis*. **Carriles 1:** marcador de peso molecular 1 kb plus®; **carriles 2:** control negativo de extracción; **carriles 3:** monocitos; **carriles 4:** macrófagos a los 15 min; **carriles 5:** macrófagos a los 30 min; **carriles 6:** macrófagos a los 45; **carriles 7:** macrófagos a los 60 min. Se observan las fracciones del ARN ribosómico 28S, 18S y 5S íntegras.

La cantidad y calidad del ARN se determinó por espectrofotometría (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific), obteniendo valores de pureza 260/280 entre 1.82 y 2.02.

Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total con el uso de la transcriptasa reversa, siguiendo el protocolo que indica la ficha técnica de la enzima SSRT II (Invitrogen®). Al observar las muestras en el gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 0.001% se nota un barrido que corresponde a la generación de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (**Figura 16**).

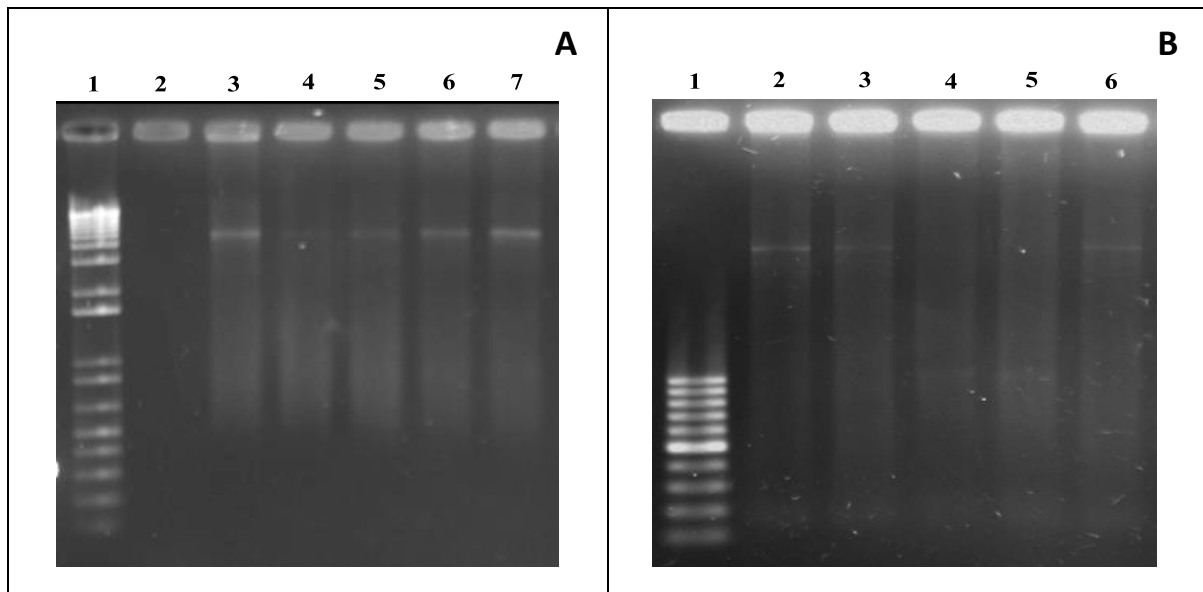


FIGURA 16. ADN complementario de células THP-1. Fotografías de geles de agarosa al 1.5% con el ADNc sintetizado a partir de 1 µg de ARN total. A) Células sin infectar, **1:** MPM 1 kb plus®; **2:** control negativo de síntesis; **3:** monocitos; **4:** macrófagos a los 15 min; **5:** macrófagos a los 30 min; **6:** macrófagos a los 45 min; **7:** macrófagos a los 60 min. B) Células infectadas con *Brucella melitensis*, **1:** MPM 100 pb; **2:** monocitos; **3:** macrófagos a los 15 min p.i.; **4:** macrófagos a los 30 min p.i.; **5:** macrófagos a los 45 min p.i.; **6:** macrófagos a los 60 min p.i.

Una vez obtenido el ADNc, se realizó la PCR punto final, utilizando como controles a los genes que codifican para las proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)¹⁷¹ y β-actina.¹⁵² A continuación, se presenta la localización de los iniciadores para SNAP25 en el ARNm, los cuales hacen blanco en una región con homología del 100% entre ambas variantes (**Figura 17**).

Posteriormente, se realizó la PCR de las muestras provenientes de células infectadas con *B. melitensis* a los diferentes tiempos post-infección y de aquellas tratadas con perlas de látex. Al análisis de los geles sólo se observa la amplificación de los fragmentos correspondientes a los controles positivos, como se muestra en la **Figura 19**. Estos ensayos de infección se realizaron por triplicado.

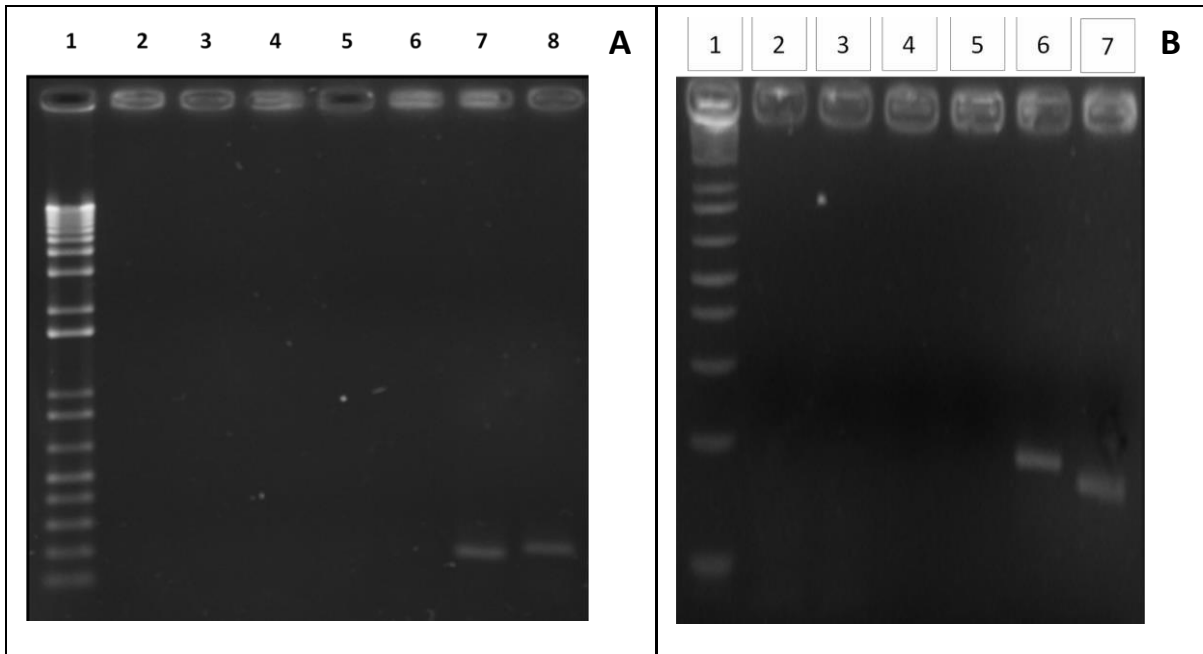


FIGURA 19. Productos de la PCR de macrófagos infectados con *B. melitensis* o tratados con perlas de látex. Fotografías de los geles de agarosa al 1.5% con los productos de la PCR donde únicamente se observan los amplificadores de los controles. A) Macrófagos infectados con *B. melitensis*; **1:** MPM 1 kb plus[®], **2:** control negativo de reacción; **3, 4, 5 y 6:** macrófagos a los 15, 30, 45 y 60 min post-infección, respectivamente; **7:** β -actina y **8:** G3PDH. B) Macrófagos tratados con perlas de látex; **1:** MPM 1 kb plus[®]; **2, 3, 4 y 5:** macrófagos a los 15, 30, 45 y 60 min post-incubación con las perlas de látex, respectivamente; **6:** G3PDH y **7:** β -actina. La MOI utilizada para los ensayos fue de 100:1.

Inmunodetección mediante Western blot. Para determinar si la línea celular expresa a la proteína SNAP25 se realizó la extracción de proteínas totales a partir de monocitos, macrófagos sin infectar, infectados con *B. melitensis* y tratados con perlas de látex.¹⁷⁹ Las proteínas totales se colectaron a los 15, 30, 45 y 60 min y como control positivo se utilizó un extracto de proteínas totales a partir de cerebro de ratón fresco. Las muestras se cuantificaron por el método de Bradford utilizando la curva patrón de BSA mostrada en la **Gráfica 3** del anexo, donde se observa una linealidad del 98.9%. Se llevó a cabo la electroforesis desnaturizante de las muestras en gel de poliacrilamida al 12% corriendo geles gemelos. Uno de ellos se tiñó con azul de Coomassie (**Figuras 20, 21 y 22**) y el otro se ocupó para la transferencia en membranas de nitrocelulosa.

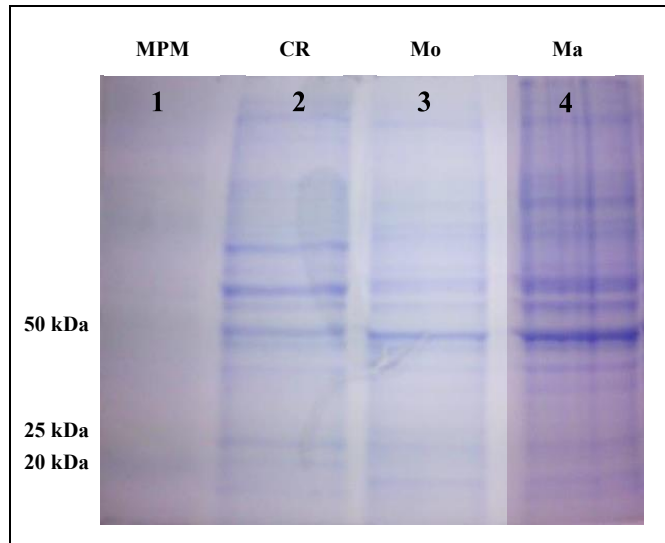


FIGURA 20. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) con proteínas totales de cerebro de ratón (CR) y células THP-1 teñido con azul de Coomassie. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2: CR; 3: monocitos (Mo) y 4: macrófagos 19 h post-PMA (Ma).

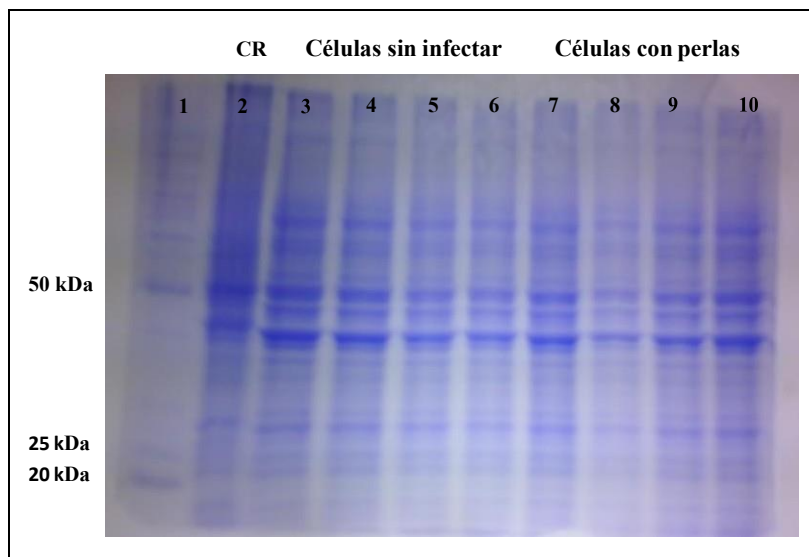


FIGURA 21. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) con proteínas totales de cerebro de ratón (CR), macrófagos sin infectar y macrófagos con perlas de látex, teñido con azul de Coomassie. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2: CR; 3 al 6: macrófagos cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min (controles negativos); 7 al 10: macrófagos con perlas de látex a los 15, 30, 45 y 60 min post-tratamiento, MOI 100:1.

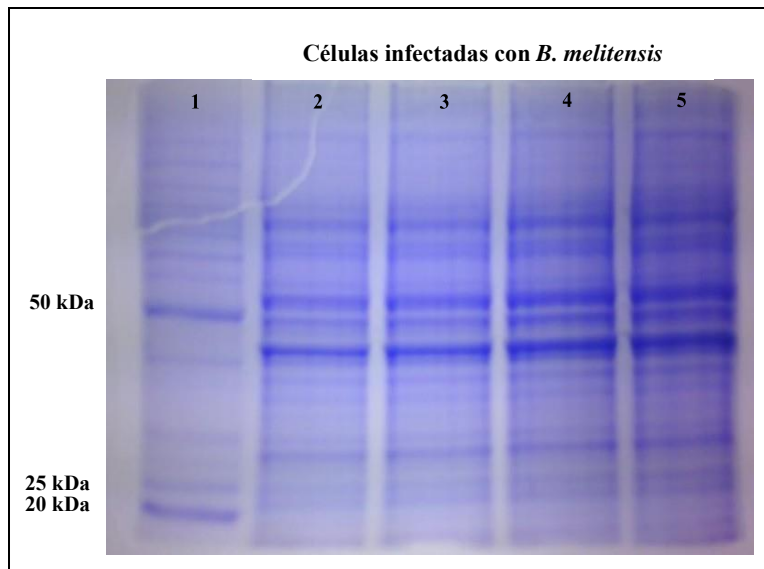


FIGURA 22. Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) con proteínas totales de macrófagos infectados con *B. melitensis*, teñido con azul de Coomassie. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2 al 5: macrófagos a los 15, 30, 45 y 60 min post-infección, respectivamente. MOI 100:1.

Para corroborar que la transferencia se llevó a cabo, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceau durante 5 min y se destiñó con agua destilada. Posteriormente, se llevó a cabo la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal anti-SNAP25 utilizando una dilución 1:500 y se reveló con 4-cloro-naphtol (**Figura 23, 24 y 25**).

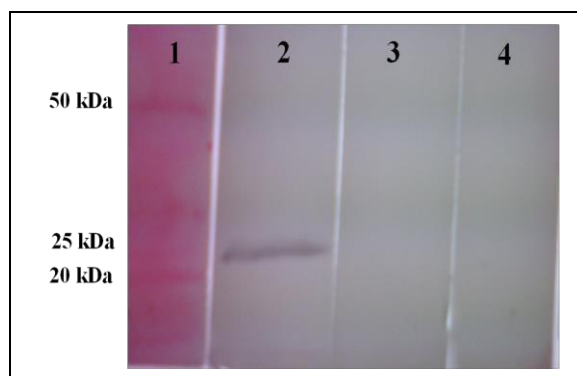


FIGURA 23. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa con inmunodetección de SNAP25 en monocitos, macrófagos 19 h post-PMA y cerebro de ratón. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2: CR; 3: monocitos y 4: macrófagos 19 h post-PMA.

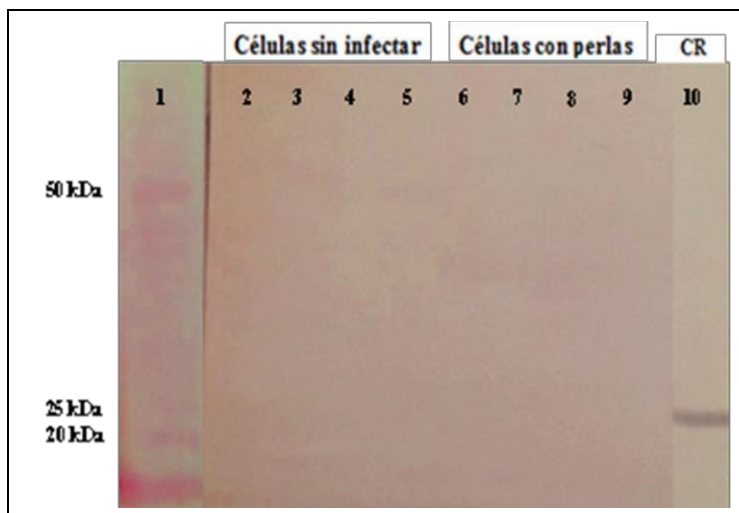


FIGURA 24. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa con inmunodetección de SNAP25 en macrófagos sin infectar y macrófagos tratados con perlas de látex. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2 al 5: macrófagos sin infectar cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min, respectivamente (control negativo); 6 al 9: macrófagos con perlas de látex a una MOI de 100:1, cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min, respectivamente; 10: cerebro de ratón (control positivo).

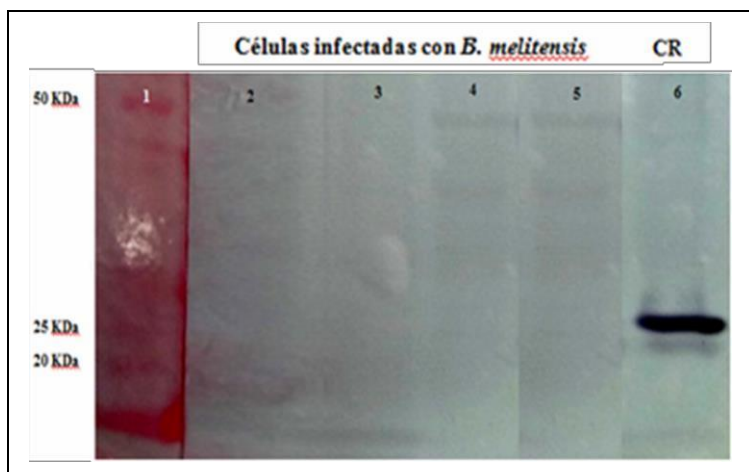


FIGURA 25. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa con inmunodetección de SNAP25 en macrófagos infectados con *B. melitensis*. 1: MPM Proteín Ladder[®]; 2 al 5: macrófagos infectados con *B. melitensis* cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min, respectivamente; 6: CR (control positivo). MOI 100:1. Revelado con 4-cloro-naphtol.

En el control positivo, correspondiente a cerebro de ratón donde la proteína se considera abundante, la expresión de la proteína SNAP25 fue constante, observando señal en el peso molecular esperado (23.3 kDa). En los monocitos, en macrófagos sin infectar y en los tratados con perlas de látex no se observa expresión en ninguno de los tiempos de cosecha. En cuanto a las células infectadas con *B. melitensis*, se detecta expresión de la proteína a los 45 y 60 min post-infección, constante en ambos tiempos y con un peso de 50 kDa.

Después de este experimento, surgió la necesidad de utilizar un sistema más sensible para la detección de proteínas, por lo que se ocupó un sistema de quimioluminiscencia para el revelado que detectara hasta femtogramos (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit*, de Pierce®).

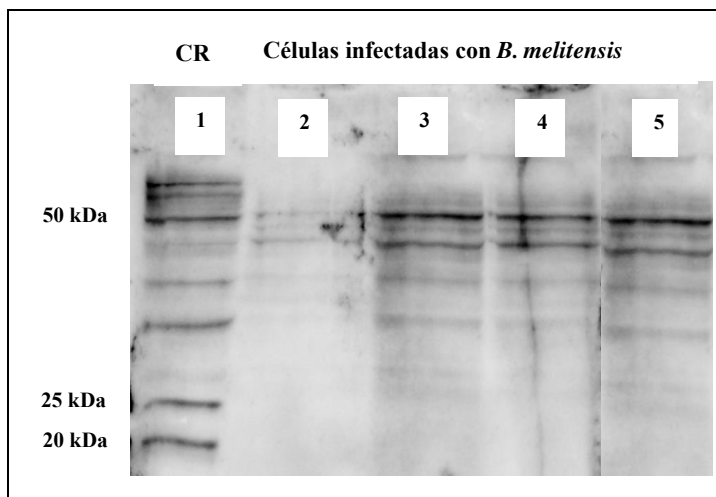


FIGURA 26. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa con inmunodetección de SNAP25 en macrófagos infectados con *B. melitensis*. 1: CR, utilizado como control positivo; 2 al 5: macrófagos infectados con *B. melitensis* cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min, respectivamente MOI 100:1. Revelado con quimioluminiscencia.

Al evaluar la expresión de la proteína SNAP25 en células infectadas con *B. melitensis* se obtuvo señal positiva en todos los tiempos post-infección, con un incremento evidente de la expresión de los 15 min a los 30, 45 y 60 min. Esta señal se encuentra en diferentes pesos moleculares, principalmente a los 50 kDa, más no en el esperado (23.3 kDa). En el control positivo, la expresión de la proteína SNAP25 también es evidente, con señal en diferentes pesos incluyendo en el esperado (23.3 kDa).

Inmunodetección mediante inmunohistoquímica. Para determinar la expresión de la proteína SNAP25 *in situ* y poder evaluarla semicuantitativamente, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en los diferentes estadios de las células THP-1 así como en los distintos tratamientos. Como control positivo de expresión se ocupó una muestra de la región del hipocampo de cerebro humano, en la cual se obtuvo que más del 80% del tejido tiene reacción positiva a SNAP25 (**Figura 27**). Los controles negativos consistieron en muestras de hipocampo y células THP-1 de los diferentes tratamientos y estadios que se procesaron sin el anticuerpo primario. La inmunodetección se realizó con el método

indirecto del polímero en cadena y la dilución utilizada para el anticuerpo primario anti-SNAP25 fue de 1:100.

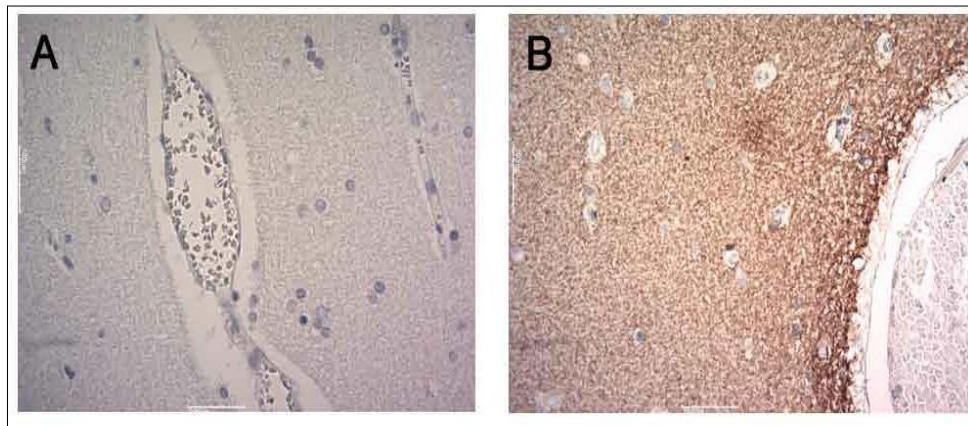


FIGURA 27. Expresión de SNAP25 en corteza cerebral humana detectada por inmunohistoquímica. (A) Sección de neocorteza de hipocampo como control negativo de técnica donde se observa únicamente la coloración gris azulada característica de la hematoxilina. (B) Neocorteza de hipocampo en donde se muestra una expresión abundante de SNAP25. La reacción positiva al marcaje se observa en más del 80% del tejido, con una coloración café que en este caso se categoriza como intensa ($i = 3$), gracias a la reacción de la peroxidasa con la DAB. Microscopía óptica, X100.

Se detectó reacción positiva en las células THP-1 con una localización membranal, la cual fue ligera a moderada ($i = 1$ ó 2) en la mayoría de los monocitos y de los macrófagos sin infectar (**Figura 28**), y moderada a intensa ($i = 2$ ó 3) en las células infectadas con *B.melitensis* (**Figura 29**) o tratadas con perlas de látex (**Figura 30**).

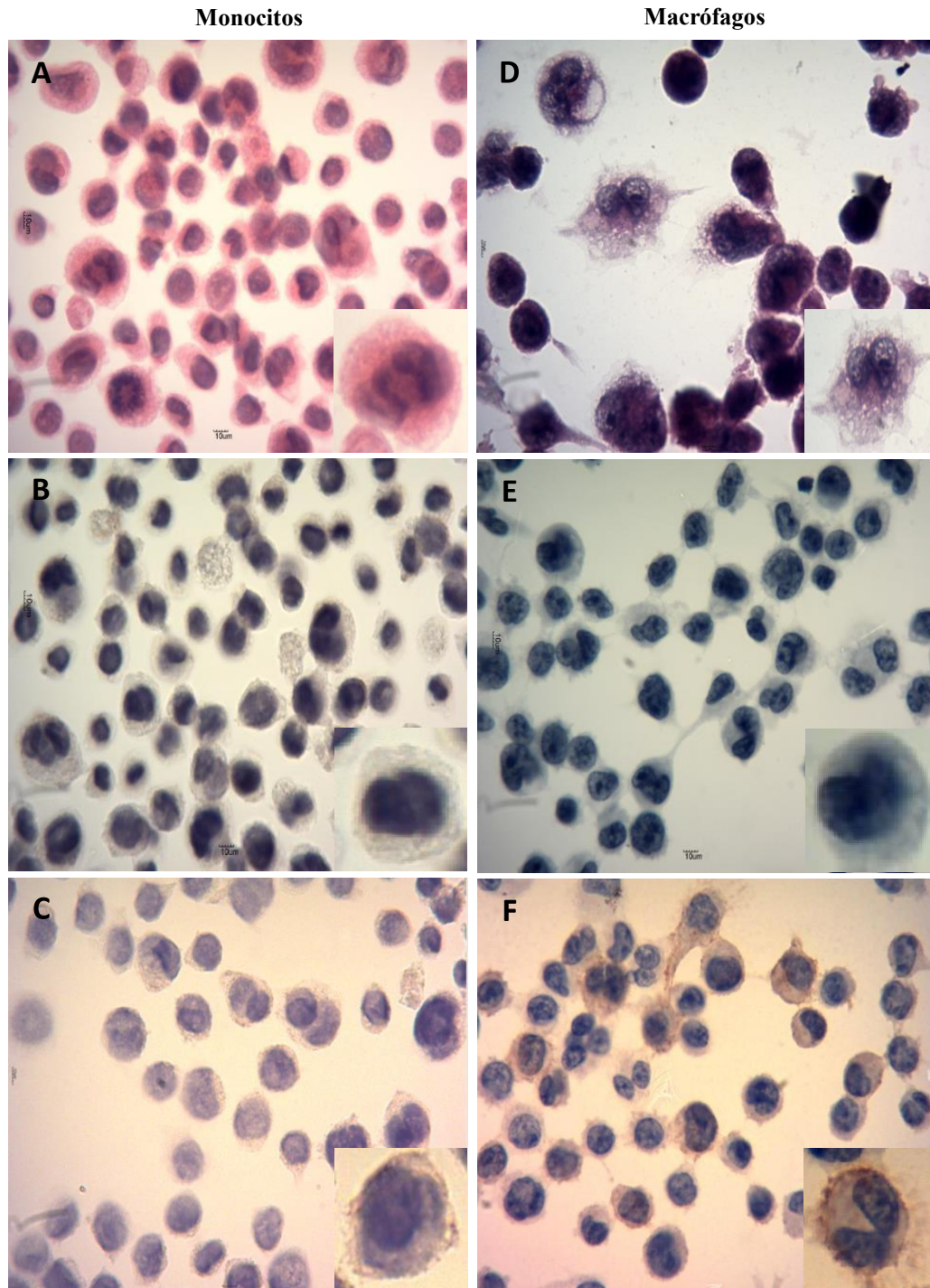


FIGURA 28. Expresión de SNAP25 en monocitos y macrófagos THP-1 detectada por inmunohistoquímica. (A y D) Células fijadas con etanol al 70% y teñidas con HE para la observación de su integridad. (B y E) Controles negativos contrateñidos con hematoxilina después de la inmunohistoquímica, en los cuales se observa ausencia de la marca y con la membrana en tonalidades grisáceas a azuladas. (C y F) Monocitos y macrófagos 19 h post-PMA procesados por inmunohistoquímica, en los cuales se observan reacción positiva al marcaje en la membrana, mostrando una coloración café por reacción de la peroxidasa con la DAB. Microscopía óptica, X100.

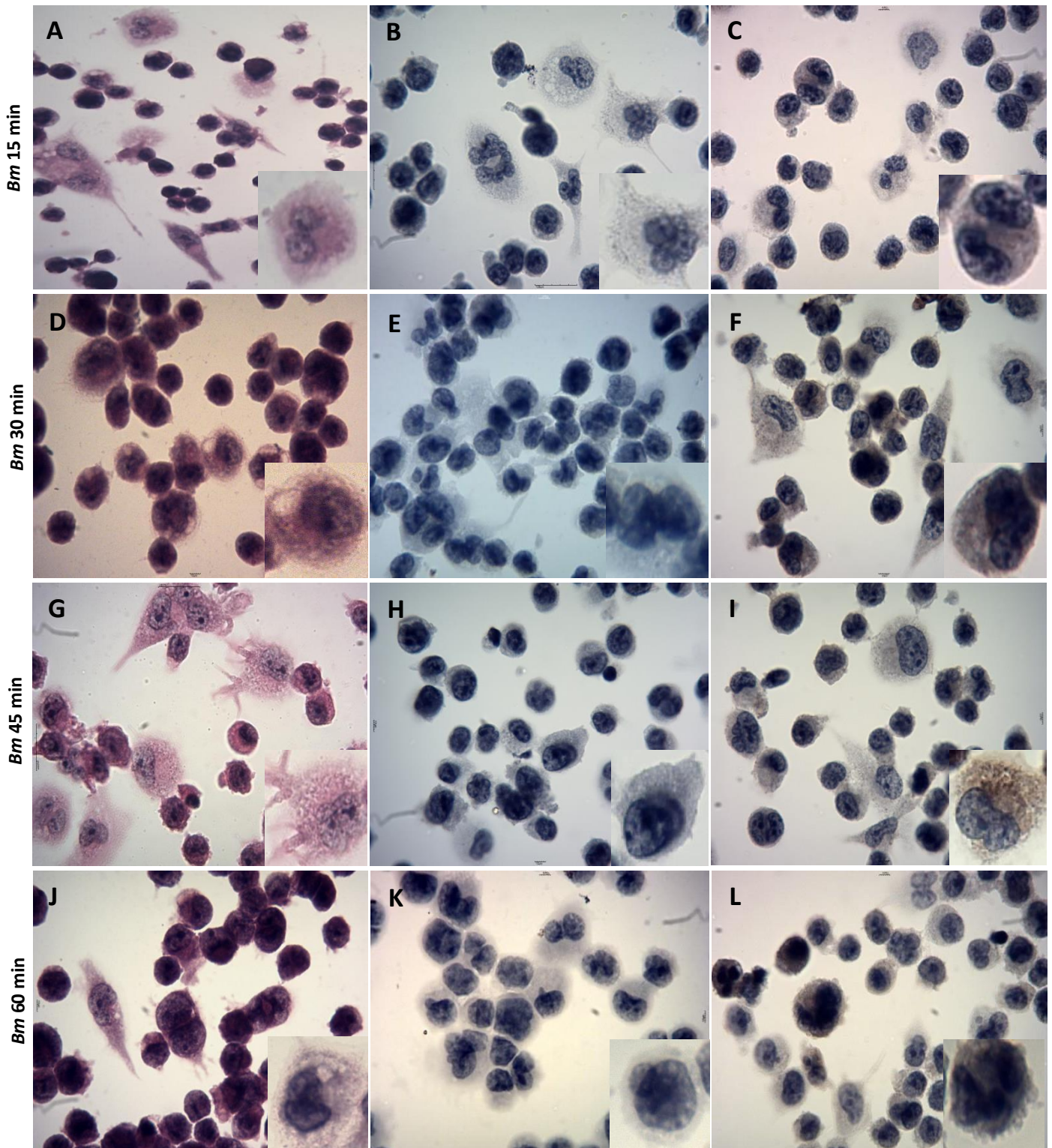


FIGURA 29. Expresión de SNAP25 en macrófagos humanos infectados con *B. melitensis*. Células fijadas con etanol al 70% y teñidas con HE para la observación de su integridad (A, D, G y J). Controles negativos contrateñidos con hematoxilina después de la inmunohistoquímica (B, E, H y K), donde se observa la membrana en tonalidades grisáceas a azuladas. Finalmente, los macrófagos con reacción positiva al marcaje muestran una coloración café (C, F, I y L). En éstos se obtuvo que, a los 15 min post-infección, el 12.14% fueron inmunopositivas, con un H-score de 16.30 ± 4.13 (C); a los 30 min, el 21.05% fueron positivas, con un H-score de 27.28 ± 8.25 (F); a los 45 min el 20.57% fueron positivas, con H-score de 27.02 ± 8.81 (I) y a los 60 min el 26.94% fueron células positivas, con valores de H-score de 33.36 ± 9.18 (L). Microscopía óptica, x100. Software Motic Images Plus 2.0[®], resolución de 2592 x 1944.

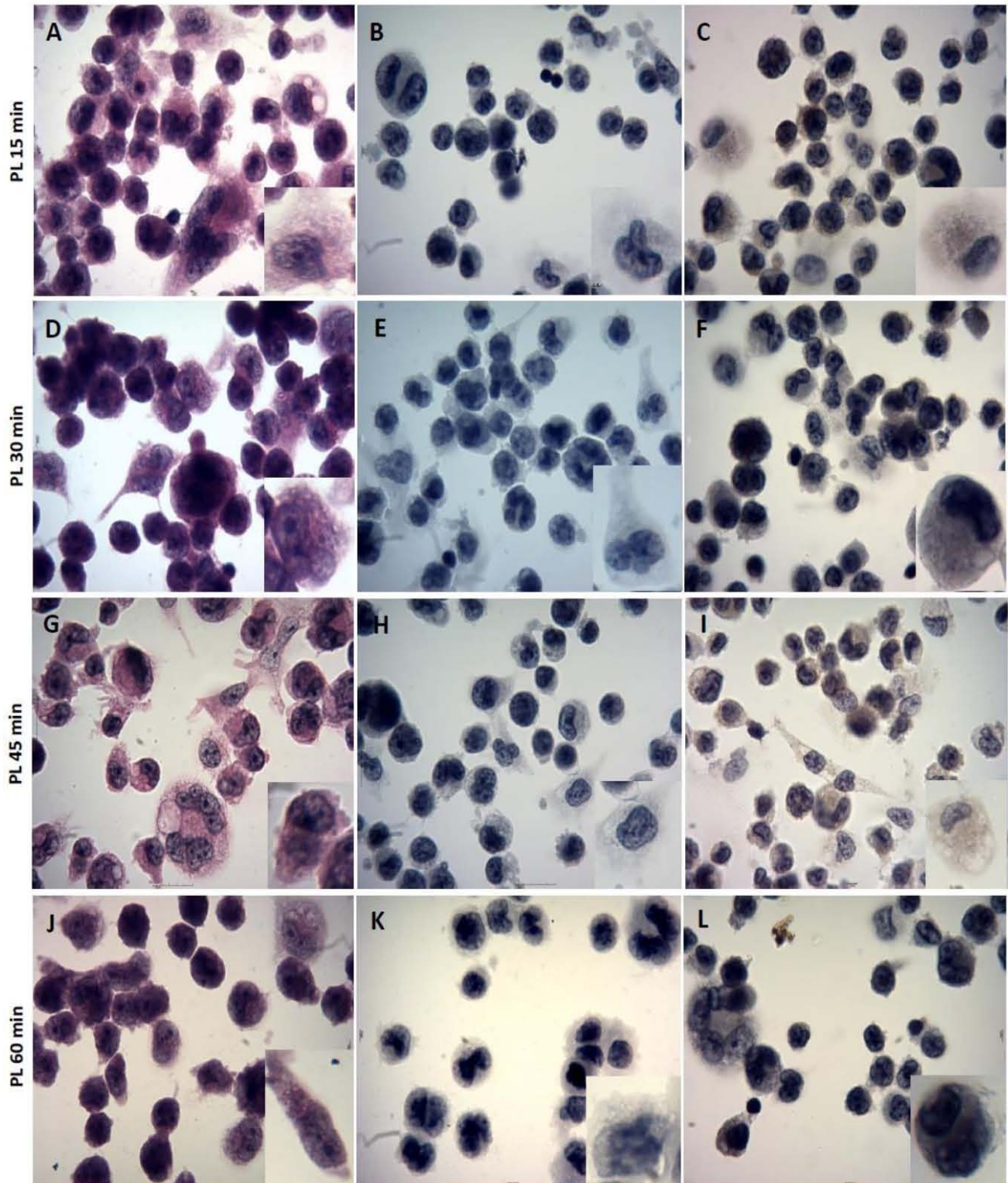
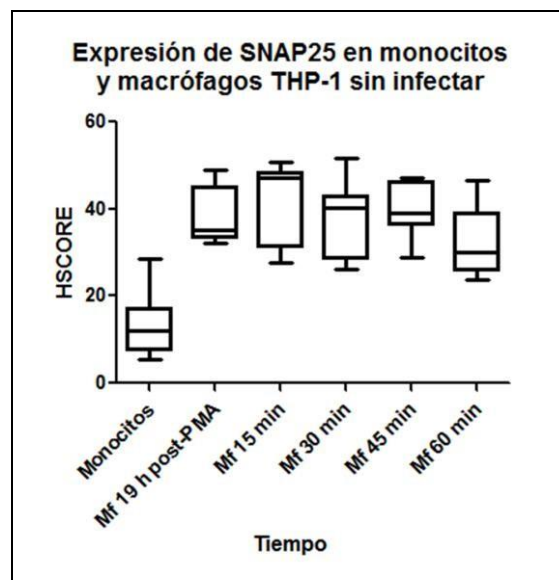


FIGURA 30. Expresión de SNAP25 en macrófagos humanos tratados con perlas de látex (PL). (A, D, G y J) Células teñidas con HE para la observación de su integridad. (B, E, H y K) Controles negativos contrateñidos con hematoxilina después de la inmunohistoquímica, con la membrana en tonalidades grisáceas a azuladas. (C, F, I y L) Macrófagos positivos a la marca, donde se observa la membrana con una coloración café. Se obtuvo que, a los 15 min, el 16.73% fueron inmunopositivas, con un H-score de 20.56 ± 6.6 (C); a los 30 min, el 10.09% fueron positivas, con un H-score de 11.80 ± 4.67 (F); a los 45 min el 38.55% fueron positivas, con H-score de 66.87 ± 8.65 (I), y a los 60 min el 18.71% fueron células positivas, con valores de H-score de 23.45 ± 9.47 (L). Microscopía óptica, x100. Software Motic Images Plus 2.0®, resolución de 2592 x 1944.

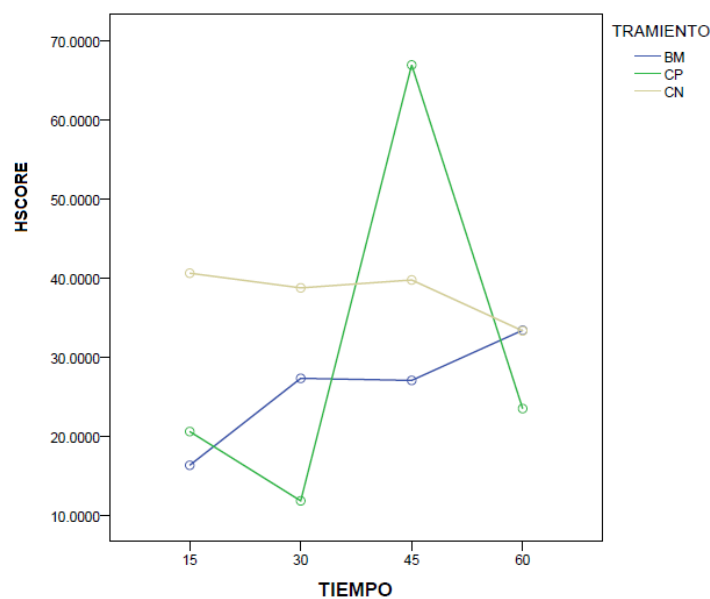
El número de células positivas (representado en porcentaje) y los valores del H-score (media \pm desviación estándar) obtenidos para cada grupo experimental fueron los siguientes:

1. Al evaluar la expresión en los monocitos y en los macrófagos a las 19 h post-PMA, se obtuvo que en los primeros el 10.44% de las células fueron positivas, con un H-score de 13.29 ± 8.03 , y en los segundos se obtuvo el 31.1% de células positivas, con un H-score de 37.89 ± 12.00 . Se comprobaron los supuestos de normalidad e igualdad de varianza para los datos ($p > 0.05$) y se encontró suficiente evidencia estadística ($p = 0.001$) para afirmar que las medias de estos grupos son diferentes, donde los macrófagos 19 h post-PMA muestran valores de H-score 2.8 veces mayores con respecto a los monocitos (**Gráfica 4; Cuadro 5, Anexo**). A su vez, al evaluar la expresión de SNAP25 en macrófagos sin tratamiento alguno y cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min, se observó que no hay diferencia significativa con respecto a los macrófagos 19 h post-PMA. Así, a los 15 min el 33.65% son positivas, con H-score de 40.61 ± 9.93 ; a los 30 min el 31.6% son positivas, con H-score de 38.65 ± 8.74 ; a los 45 min el 29.7% son positivas, con H-score de 39.81 ± 6.3 y a los 60 min el 25.8% son positivas, con un H-score de 33.13 ± 8.13 (**Gráfica 4**).



GRÁFICA 4. Expresión de SNAP25 en monocitos y macrófagos THP-1 mediante inmunohistoquímica. El gráfico representa, en el eje de las ordenadas, la expresión de la proteína SNAP25 en células THP-1, en diferentes estadios y a diferentes tiempos post-PMA (eje de las abscisas). Así, se observa que la expresión incrementa 2.8 veces cuando se induce la diferenciación de los monocitos (H-score: 13.29 ± 8.03) a macrófagos (Mf) con el PMA por 19 h (H-score: 37.89 ± 12), $p = 0.001$. En los macrófagos sin infectar cosechados a los 15, 30, 45 y 60 min no hubo diferencia significativa de la expresión con respecto a la obtenida en los macrófagos a las 19 h post-PMA, donde se tienen valores de H-score de 40.6 ± 9.9 , 38.65 ± 8.7 , 39.81 ± 6.3 y 33.13 ± 8.13 , respectivamente. GraphPad Prism®.

2. En los macrófagos infectados con *B. melitensis* se obtuvo que, a los 15, 30, 45 y 60 min post-infección, el 12.14%, 21.05%, 20.57% y 26.94% fueron células positivas, con valores de H-score de 16.30 ± 4.13 , 27.28 ± 8.25 , 27.02 ± 8.81 y 33.36 ± 9.18 , respectivamente. En los macrófagos tratados con perlas de látex durante 15, 30, 45 y 60 min se obtuvo que el 16.73%, 10.09%, 38.55% y 18.71% fueron células positivas, con valores de H-score de 20.56 ± 6.6 , 11.80 ± 4.67 , 66.87 ± 8.65 y 23.45 ± 9.47 , respectivamente (**Cuadro 6, anexo**). Después de comprobar los supuestos de homocedasticidad de los errores (prueba de Levene: $p = 0.094$) y de normalidad (prueba de Shapiro Wilks: $p = 0.083$), se analizó si existía algún efecto en el H-score por la infección de *B. melitensis* y las perlas de látex a través de los diferentes tiempos evaluados (diseño aleatorio factorial 3 x 4), con lo cual se encontró evidencia estadística suficiente para afirmar que la expresión de SNAP25 sí cambia por efecto de los tratamientos ($p = 0.000$) (**Gráfica 5; Cuadro 7, anexo**).



Gráfica 5. Comportamiento de la expresión de SNAP25 en los diferentes tiempos evaluados durante la infección con *B. melitensis* y tratados con perlas de látex. El gráfico representa la interacción que hay entre los factores “tratamiento” y “tiempo”. Durante la infección con *B. melitensis* (BM, azul), la expresión de SNAP25 muestra los valores más bajos a los 15 min (H-score: 16.30 ± 4.13) y valores mayores a partir de los 30 min post-infección, sin encontrar diferencia significativa entre los 30, 45 y 60 min (27.28 ± 8.25 , 27.02 ± 8.81 y 33.36 ± 9.18). Por otro lado, en el tratamiento con perlas de látex (CP, verde), se observa una diferencia significativa a los 45 min con respecto a los demás tiempos y es en este momento donde se obtiene la mayor expresión de la proteína (H-score: 66.87 ± 8.65). A su vez, no hay diferencia en la expresión entre los 15 y 60 min (H-score: 20.56 ± 6.6 y 23.45 ± 9.47) pero sí entre los 15 y 30 min (H-score: 20.56 ± 6.6 y 11.80 ± 4.67), donde el valor más bajo se detecta en este último tiempo. Finalmente, se observa que la expresión de la proteína es significativamente menor en los macrófagos infectados con *B. melitensis* si se comparan con los macrófagos sin tratamiento (CN, beige), durante los 15, 30 y 45 min post-infección. SPSS 20[®]

De esta forma, al analizar la expresión de SNAP25 durante la infección con *B. melitensis*, se observa que la menor expresión se obtuvo a los 15 min post-infección (H-score: 16.30 ± 4.13), y después se incrementa a los 30, 45 y 60 min, manteniéndose constante y sin diferencias significativas entre estos últimos tiempos (H-score: 27.28 ± 8.25 , 27.02 ± 8.81 y 33.36 ± 9.18 , respectivamente).

Por otro lado, al evaluar la expresión de SNAP25 en los macrófagos con perlas de látex se observó que la menor expresión de la proteína fue a los 30 min (H-score: 11.80 ± 4.67) para después incrementar significativamente a los 45 min (H-score: 66.87 ± 8.65). Es en este tiempo donde se detectó la mayor expresión de SNAP25, ya que después disminuyó de manera importante hasta llegar a valores similares a los iniciales (H-score: 20.56 ± 6.6 a los 15 min y 23.45 ± 9.47 a los 60 min).

Al comparar los valores de expresión obtenidos en la infección con *B. melitensis* con aquellos de los macrófagos sin infectar y sin perlas, se observa que la expresión es significativamente menor en las células infectadas con la bacteria a los 15, 30 y 45 min (H-score: 16.30 ± 4.13 , 27.28 ± 8.25 y 27.02 ± 8.81 vs 40.61 ± 9.93 , 38.65 ± 8.74 y 39.81 ± 6.3) para después incrementar a valores similares a los macrófagos sin tratamiento a los 60 min (H-score: 33.36 ± 9.18 vs 33.13 ± 8.13). En cuanto a los macrófagos tratados con perlas de látex y los no tratados, nuevamente se observa que la expresión de SNAP25 es menor a los 15, 30 y 60 min (H-score: 20.56 ± 6.6 , 11.80 ± 4.67 y 23.45 ± 9.47 vs 40.61 ± 9.93 , 38.65 ± 8.74 y 33.13 ± 8.13 , respectivamente) más a los 45 min incrementa 1.67 veces con respecto a los macrófagos sin tratamiento (H-score: 66.87 ± 8.65 vs 39.81 ± 6.3) ($p < 0.05$) (Cuadro 8, anexo).

Finalmente, se obtuvo la proporción entre los valores de la expresión de SNAP25 en las células infectadas con *B. melitensis* y las tratadas con perlas de látex para conocer cuántas veces disminuyó o aumentó en cada tiempo. A los 15 min la expresión de SNAP25 fue 0.79 veces más en las células tratadas con perlas que en las infectadas con *B. melitensis*; a los 30 min la expresión disminuyó 2.3 veces en las células tratadas con perlas de látex; a los 45 min hubo un incremento de 2.47 veces en las células tratadas con perlas y por último, a los 60 min la expresión disminuyó 1.4 veces con respecto a las células infectadas con *B. melitensis*.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinó la expresión de la proteína SNAP25 en la línea celular THP-1, tanto en los estadios de monocito-macrófago como durante la infección con *B. melitensis*. Los resultados obtenidos indican que dicha proteína de fusión de membranas, ligada casi exclusivamente a la exocitosis de neurotransmisores,^{140, 142,144} se encuentra en el 10.44% de las células en estadio de monocito, con una marca predominantemente débil al evaluarla con la técnica del *H-score*. A su vez, en el estadio de macrófago se detecta que el 31.1% de las células son positivas, con una marca moderada (**Figura 28**). En contraste, estos porcentajes se encuentran considerablemente bajos al momento de compararlos con la expresión detectada en la corteza cerebral humana, donde se reporta como constitutiva,^{137,140,142,143,152,153} y en la cual sobrepasa el 80% (**Figura 27**).

De acuerdo con la base de datos del Proyecto *The human protein atlas*,¹⁸⁸ SNAP25 se expresa en el 25.5% de esta línea celular (rango: 23–28%), con una intensidad de categoría 1 en el *H-score* (o bien, de baja intensidad), y aunque no se especifica en qué estadio la detectan, los datos obtenidos en el presente estudio no difieren significativamente de los registrados en el atlas en cuanto al estadio de macrófago se refiere. Cabe resaltar que los datos contenidos en el atlas son el único reporte donde se registra la presencia de SNAP25 en células monocíticas, ya que se sabe que la proteína Qb,c-SNARE que se encuentra de manera constitutiva en estas células es SNAP23, homóloga de SNAP25.^{132,189,190}

Por otro lado, la proteína SNAP25 también se ha encontrado en otros tejidos no-neuronales en respuesta a estímulos específicos, mediando la liberación de sustancias como algunas hormonas esteroideas,¹⁴⁷ de insulina¹⁹¹ y el contenido de algunos gránulos en los neutrófilos.¹⁴⁶ Esto confirma el hecho de que las proteínas de la familia SNARE son de localización ubicua, pero también específicas en su función.^{107,109,111} La presencia de SNAP25 en el modelo empelado en este estudio es coherente con la ubicuidad, sin embargo, se desconoce su función en estas células.

Al analizar con qué otras proteínas forma complejo SNAP25, se sabe que además de Sintaxina 1A y VAMP 2 en el tejido nervioso, también se asocia con Sintaxina 2, 3, 4 y 11, y VAMP 2 y 8, en otros tejidos.^{136,189} Así, el único reporte que se tiene de SNAP25 en células de la respuesta inmune es en los neutrófilos, mediando la movilización diferencial de los gránulos específicos y terciarios, al formar complejo con VAMP 2 y Sintaxina 4. Aunque en estos granulocitos también se reporta la presencia de SNAP23 formando

complejo con las mismas proteínas con las que se asocia SNAP25, ésta promueve la liberación de gránulos distintos a los peroxidasa-negativos,^{190,192} lo que denota que la presencia de una no excluye la expresión de la otra, sino que, al contrario, median la exocitosis de sustancias diversas según el estímulo que la célula reciba y la cascada intracelular que se active.^{193,194}

De esta manera, las proteínas SNARE reportadas hasta ahora que participan en funciones inmunológicas en los macrófagos son Sintaxina 2, 3, 4, 6 y 7, así como SNAP23, VAMP 2, 3 y 7 y Vti1b.^{189,195,196} Otras proteínas involucradas en estos procesos son Sec22b, Sintaxina 13 y 18, pero aún se desconocen las Qb,c-SNARE y R-SNARE con las que forman complejo,^{163,166,189,190} pudiendo ser SNAP25 una de ellas.

Por otro lado, se conoce que algunas proteínas que participan en la fusión de membranas y en el tráfico intracelular son reguladas o modificadas por diversos microorganismos para poder sobrevivir y replicarse en la célula que infectan.^{161,162,164,166,167} Varios estudios muestran que la expresión de Sintaxina 4, VAMP 3, Stx 6 y Vti1b incrementa considerablemente al incubar a los macrófagos con LPS de enterobacterias, o bien, con las bacterias mismas,^{163,165, 166,197} a diferencia de lo observado con el género *Brucella* spp.¹⁶⁹

Particularmente, Castañeda-Ramírez *et. al.* encontraron una disminución significativa en la expresión de Sintaxina 4 durante la infección temprana con *B. melitensis*, a diferencia de lo que se observó con *Salmonella* Enteritidis, donde dicha expresión aumenta principalmente a los 30 min post-infección. A su vez, se demostró que el bloqueo con oligonucleótidos de ARN para Sintaxina 4 disminuyó la sobrevivencia intracelular de *B. melitensis*.¹⁷¹ Por otro lado, al evaluar a VAMP3, hubo un incremento de su expresión tanto al momento de incubar a los macrófagos J774.A1 con el LPS de *B. melitensis* y de *S. Enteritidis*, como durante la infección con las bacterias, sin embargo, su interferencia no influyó en la sobrevivencia de *Brucella* spp.¹⁷⁰

De igual forma, Zhang, *et. al.* evaluaron el perfil transcripcional de las células THP-1 durante la infección con *Ehrlichia chaffeensis* y encontraron que algunas moléculas que median la fusión vesicular fueron inhibidas por la bacteria. Dentro de éstas, reportan a SNAP23, Rab5A y Sintaxina 16.¹⁹⁸ Hay que mencionar que el género *Ehrlichia* spp. pertenece al grupo de las α -Proteobacterias al igual que *Brucella* spp.,⁴⁹ por lo que es factible que compartan ciertas características en la regulación de la respuesta inmune, como la capacidad de desviar la ruta fagocítica de la vacuola que las contiene así como la

inhibición de la secreción de algunas citocinas que propician la respuesta Th1 (TNF α y la IL-12).^{50,71,162}

Considerando lo anterior y que algunas de las proteínas con las que forma complejo SNAP23 también se reportan en complejos donde participa SNAP25, principalmente Sintaxina 4, en este trabajo se evaluó la expresión de SNAP25 durante la infección con *B. melitensis*. Los resultados muestran una disminución de la expresión de SNAP25 al compararla con las células sin infectar durante los primeros tiempos post-infección (15, 30 y 45 min), para posteriormente incrementar a valores similares a los de las células sin infectar en el último tiempo (60 min) (**Figura 29; gráfica 5**). Esta disminución en la expresión de SNAP25 sugiere la posibilidad de que la bacteria esté ejerciendo cierto efecto modulador sobre ella, incluso sin que esta tuviera alguna función en la respuesta inmune.

No existen reportes previos que indiquen un efecto regulador sobre SNAP25 por algún microorganismo en macrófagos, sin embargo, Eletto *et. al.*, demostraron que la expresión de esta proteína es inhibida por el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) gracias a la sobreexpresión del microARN mir-128 en las neuronas. Este microARN es sobre regulado por el factor Tat que posee el virus para su replicación.¹⁹⁹ Por su parte, Sandberg y Löw demostraron que la proteína priónica Scrapie (PrP^{Sc}) disminuye el número de complejos en los que participa SNAP25, pero incrementa la expresión de los monómeros que forman parte de los mismos de manera independiente. La sobreexpresión de cada hélice *alfa* se correlaciona con la cantidad de proteína priónica detectada.²⁰⁰ Estos resultados coinciden con lo obtenido en este estudio, ya que también se observa que la expresión de SNAP25 disminuyó durante los primeros tiempos post-infección (**Gráfica 5**).

Hay que resaltar que si bien las proteínas SNARE dotan de especificidad a la ruta secretora y a la fusión de membranas, su ubicuidad también provee de un “mecanismo de seguridad” que permite la preservación de la dinámica intracelular mediante la participación de otras SNARE, si las que principalmente están funcionando llegaran a “fallar”. Este fenómeno se ha evidenciado en diferentes trabajos, por ejemplo, Okayama *et. al.* demostraron mediante silenciamiento genético que al inhibir la expresión de SNAP23 en al menos del 10% en células HeLa, la secreción de fosfatasa alcalina no se altera. Este resultado permaneció constante incluso con una doble inhibición en la expresión de SNAP23 y Sintaxina 4,²⁰¹ Sadoul *et. al.* comprobaron que SNAP23 puede suplir a SNAP25 en el proceso de exocitosis de insulina;²⁰² y Sørensen *et. al.* demostraron que SNAP23 también permite la

fusión vesicular en la sinapsis neuronal, aunque el poro dure menos tiempo y sea Ca^{2+} independiente.¹⁹⁴ Esto sucede incluso aunque la estabilidad del “complejo suplente” sea menor que el constitutivo, tal como demostraron Yang, *et. al.* en sus ensayos *in vitro*.²⁰³

Todos estos resultados muestran que dichos “complejos alternos” son capaces de participar en la función de aquellos que se encuentran en una ruta intracelular específica de manera continua. Así, es posible que *B. melitensis* también tenga cierto efecto modulador sobre SNAP25, aunque jugara un papel alterno o inducido en los macrófagos.

Por otro lado, para evaluar la expresión de SNAP25 de tal forma que se aislaran los mecanismos de virulencia que *B. melitensis* emplea para poder sobrevivir dentro de las células,^{8,33,50,66,68,71,76,77,83} se realizaron los ensayos de expresión con perlas de látex del mismo tamaño que el microorganismo. Los resultados muestran fluctuaciones a lo largo de los tiempos evaluados, sin embargo, de manera general los valores de la expresión de SNAP25 son muy parecidos a lo que sucede con las células infectadas con *B. melitensis*, a excepción del incremento significativo que se observa a los 45 min, el cual, incluso, sobrepasa los valores de las células sin infectar (**Figura 30; gráfica 5**).

Se sabe que una de las funciones básicas que llevan a cabo los macrófagos es la de eliminar partículas extrañas del organismo mediante el proceso de fagocitosis.¹¹⁰ Este proceso implica la secreción de citocinas proinflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$, sin embargo, la ruta intracelular y la maquinaria responsable para su tráfico en vesículas secretoras continúa esclareciéndose. Lo que se conoce hasta ahora es que el $\text{TNF}\alpha$ es secretado en sitios ricos en colesterol llamados balsas lipídicas gracias a la presencia de varias proteínas que participan en la fusión de membranas, como *sec1/Munc13-1*, *Rab37* y *Rab11*, así como receptores de la familia SNARE, como *VAMP 3*, *Stx 6*, *7*, *4*, *Vti1b* y *SNAP23*.^{131,165,166,197} Varios grupos de trabajo han demostrado que la expresión de estas proteínas incrementa al tratar a las células con LPS o enterobacterias, como ya se ha mencionado previamente.^{130,131,164,166} Así, específicamente en el trabajo realizado por Castañeda-Ramírez, *et. al.* se observa que la expresión de *Stx 4* incrementa 8.2 veces a los 30 min post-infección con *S. Enteritidis*, y 2.57 veces a los 45 min., con respecto a las células infectadas con *B. melitensis*.¹⁷¹ Estos datos coinciden con lo obtenido en este trabajo en cuanto al tratamiento con perlas de látex, donde a los 45 min se observó un incremento de la expresión de SNAP25 de 2.47 veces con respecto a aquellas infectadas con *B. melitensis*.

Aunque las perlas de látex no tienen una estructura altamente antigénica como el LPS, se ha observado que pueden desencadenar una respuesta proinflamatoria y microbicida, incluso sin haber sido opsonizadas, gracias a la presencia de diferentes moléculas de adhesión en la membrana de los macrófagos, las cuales están involucradas en un reconocimiento inespecífico (como el receptor CD64)²⁰⁴ o incluso indirecto (al fungir como moléculas de co-estimulación para los TLR's).^{205,206,207} Si bien es conocido que la respuesta proinflamatoria y microbicida será más eficiente si las perlas de látex son opsonizadas con *gamma* globulinas o proteína del complemento, al analizar el fagosoma que contiene perlas sin opsonizar, se observaron proteínas propias de un fagolisosoma maduro como hidrolasas, la bomba de protones ATPasa, la flotilina 1 y la molécula antimicrobiana lactoferrina, entre otras.²⁰⁸ En el presente estudio, aunque las perlas de látex no fueron opsonizadas, se llevó a cabo una adsorción pasiva en el medio de cultivo rico en suero fetal bovino, de tal forma que se pudieran fagocitar mediante estos sitios no específicos o incluso mediante endocitosis caveolar dependiente de dinamina II.²⁰⁴

En cuanto a los ensayos de *Western blot*, se pudo confirmar de manera cualitativa el comportamiento de la expresión de SNAP25 durante la infección con *B.melitensis*. En éstos, se observa que la expresión más baja de SNAP25 sucede a los 15 min para posteriormente incrementarse de manera significativa a los 30 min post-infección y mantenerse sin diferencia entre los últimos tiempos (**Figura 26**). Estos resultados son congruentes con lo obtenido en los ensayos de inmunohistoquímica, sin embargo, a pesar de que se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-SNAP25 que detecta un péptido de 23 a 25 kDa, se observan varias bandas en pesos diferentes al esperado. Esto puede deberse a que la proteína pudiera encontrarse en complejo con otras proteínas de la familia SNARE que suelen ser muy estables, tanto en la forma de 4 α -hélices como en complejos “huérfanos”¹²⁵. Estos complejos resisten diferentes condiciones como la desnaturalización con SDS, la digestión por proteasas y temperaturas mayores a 90°C.¹¹¹ De esta manera, los componentes que se emplearon en los geles desnaturalizantes de estos ensayos pudieron no haber sido suficientes para lograr la separación de los mismos. Para que se lleve a cabo el desensamble total de los complejos *SNARE* y pueda detectarse cada proteína de manera independiente,¹¹² se requiere de la presencia del factor soluble a la N-etilmaleimida unido a ATP (*NSF-ATPasa*) y su cofactor α -SNAP (*soluble NSF-attachmente protein α*).¹¹² Así, es probable que SNAP25 se encontrara unida a alguna Sintaxina, como Sintaxina 4 en los macrófagos (dando un peso total aproximado de 57.3 kDa), y Sintaxina 1A en el cerebro

de ratón (con peso total aproximado de 54.99 kDa), así como con alguna VAMP, como VAMP 3 en macrófagos (peso total aproximado de 34.6 kDa) y VAMP 2 en cerebro de ratón (36 kDa de peso total). O bien, en un complejo de 4 α -hélices, que representa un peso aún mayor (por ejemplo, SNAP25-Stx4-VAMP3 tiene un peso aproximado de 68.6 kDa).¹³⁶ No fue posible detectar a la proteína SNAP25 en las células sin infectar ni en aquellas tratadas con perlas de látex mediante *Western blot* debido a que la cantidad de muestra colocada en cada pozo (58-60 ug) pudo no haber sido suficiente para el método de detección que se ocupó en estos ensayos (revelado con 4-coro-naphtol), el cual fue menos sensible que el que se ocupó para las muestras de las células infectadas con *B. melitensis* (quimioluminiscencia). Únicamente se detectó a SNAP25 en las muestras del cerebro de ratón debido a que ésta se encuentra por lo menos 30 veces más que en los leucocitos reportados (**Figura 24 y 25**).¹⁴⁶

Hay que mencionar que, en cuanto a los ensayos de RT-PCR realizados en el presente estudio, no se logró determinar la expresión de SNAP25 de manera constante probablemente a fallas en la técnica (**Figura 19**), donde alguno de los factores que se mencionan a continuación pudo haber influido: 1) el tipo de polimerasa empleada, donde las exonucleasas 3'-5' se prefieren porque proveen de correcciones en la secuencia de nucleótidos una vez hecha la reacción; 2) el uso de ADNc o ADN genómico, ya que el ADNc es más susceptible de tener un alineamiento inespecífico de los iniciadores; 3) el uso adecuado del amortiguador de reacción, especialmente en la RT-PCR; 4) la concentración de cationes, principalmente el Mg^{2+} ; 5) la especificidad del alineamiento en los iniciadores para evitar la presencia de dímeros, la cual es influida por la temperatura de alineamiento y el amortiguador de reacción; 6) el uso de aditivos o mejoradores de reacción, ya que tienen la capacidad de deshacer dímeros, favorecer la actividad de la polimerasa y prevenir su adherencia a las paredes del tubo; entre otras.²⁰⁹

Finalmente, debido a que se ha reportado que algunas proteínas de la familia SNARE como VAMP 3 no influyen en la sobrevivencia del microorganismo a pesar de detectar un incremento en su expresión,¹⁷⁰ y que los resultados de este trabajo en cuanto a la participación de SNAP25 en la respuesta inmunológica no son contundentes, se vuelve necesario realizar su seguimiento a lo largo de la ruta intracelular mediante ensayos de microscopía confocal, de tal forma que se pueda determinar si existe interacción de esta proteína con la VCB y el fagosoma contenedor de las perlas de látex. A su vez, sería interesante realizar ensayos de expresión y silenciamiento genético de la proteína SNAP25

durante la infección con *B. melitensis*, tanto bacterias vivas como inactivadas, además de *S. Enteritidis*, si es que la proteína co-localiza en la VCB y que se pueda determinar si ésta afecta la sobrevivencia del microorganismo. Se propone también realizar ensayos de detección de citocinas, principalmente del TNF α , durante las infecciones con los diferentes microorganismos en las células tratadas con silenciamiento genético para SNAP25 y sin él, de tal forma que complementen la comprensión de la participación de esta proteína.

Por otro lado, no se debe descartar la posibilidad de detectar con qué otras proteínas de la familia SNARE se encuentra formando complejo en los macrófagos, ya que no existen reportes en estas células.

9. CONCLUSIONES

1. La proteína SNAP25 se expresa en el 10.44% de los monocitos y en el 31.1% de los macrófagos de la línea celular THP-1, con un incremento significativo después de diferenciar a las células con el PMA.
2. *Brucella melitensis* es capaz de disminuir la expresión de SNAP25 durante la infección temprana en macrófagos de la línea THP-1.
3. El tratamiento con perlas de látex en los macrófagos THP-1 provocó valores fluctuantes en la expresión de SNAP25, mostrando un incremento significativo a los 45 min post-tratamiento a diferencia de las células infectadas con *B. melitensis*.

10. PROSPECTIVA

Es necesario complementar este trabajo con ensayos de expresión de genes mediante qRT-PCR que permitan dilucidar mejor la expresión de SNAP25 en las células THP-1 durante la infección con *B. melitensis*, tanto con bacterias vivas como inactivadas. Además, es importante detectarla con ensayos de microscopía confocal con la finalidad de evaluar *in situ* si la proteína se encuentra en las VCB. También se sugiere realizar ensayos de silenciamiento genético para evaluar si la disminución de la proteína es debido a que *B. melitensis* la regula para su sobrevivencia.

Debido a que la participación de SNAP25 en las funciones inmunológicas de los macrófagos es cuestionable, se recomienda realizar la detección de las proteínas con las que forma complejos SNARE y evaluar sus funciones. Asimismo, se sugiere realizar ensayos de detección de citocinas de la respuesta Th1 utilizando la técnica de ELISA antes y durante el silenciamiento genético, para complementar el conocimiento de las funciones de SNAP25 en los macrófagos.

11. LITERATURA CITADA

-
- ¹ **Corbel MJ, (2006).** “*Brucellosis in Humans and Animals*”. FAO, OIE, WHO. [En línea]. Génova, disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf> [Accesado el día 11 de Julio del 2015].
- ² **Foster G, et. al., (2007).** “*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.* 57, pp. 2688-93.
- ³ **El-Tras WF, et. al., (2010).** “*Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*”. *Vet Microbiol.* 141, pp. 321-5.
- ⁴ **Eisenberg T, et. al., (2012).** “Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs”. *Appl Environ Microbiol.* pp. 3753-55.
- ⁵ **Whatmore AM, et. al., (2015).** “Isolation of *Brucella* from a White’s tree frog (*Litoria caerulea*)”. *JJM Case Rep.* pp. 1-5.
- ⁶ **Cantas L and Suer K, (2014).** “Review: the important bacterial zoonoses in “One Health” concept”. *Front Public Health.* 2(144), pp. 1-8.
- ⁷ **World Health Organization, (2015).** “Zoonoses and the Human-Animal-Ecosystems Interface” en *Zoonoses.* [En línea]. Génova, disponible en: <http://www.who.int/zoonoses/en/> [Accesado el día 30 de Julio del 2015].
- ⁸ **Corbel MJ, (1997).** “Brucellosis: an overview”. *Emerg Infect Dis,* 3(2), pp. 213-221.
- ⁹ **Moreno E, (2014).** “Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis”. *Front Microbiol.* 5(213), pp. 1-18.
- ¹⁰ **Spink WW, (1956).** *The nature of Brucellosis.* The University of Minnesota Press. Minneapolis.
- ¹¹ **Organización Mundial de Salud Animal, (2015).** “Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2015” en *Enfermedades de la Lista de la OIE 2015, Sanidad Animal en el Mundo.* [En línea]. París, disponible en:

<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/> [Accesado el día 10 de Agosto del 2015].

¹² **Fensterbank R., (1986).** “Brucelosis bovina, ovina y caprina: diagnóstico, control, vacunación”. *Rev sci tech Off int Epiz.* 5(3), 619-633.

¹³ **World Health Organization, (2010).** “Algunas enfermedades infecciosas y parasitarias: Enfermedades zoonóticas de origen bacteriano” en *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision (ICD-10)*. [En línea]. Génova, disponible en: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/A20-A28> [Accesado el día 15 de Septiembre del 2015].

¹⁴ **Pappas G, et. al., (2006).** “The new global map of human brucellosis”. *Lancet Infect Dis.* 6, pp. 91-99.

¹⁵ **Plumb GE, Olsen SC and Buttke D, (2013).** “Brucellosis: “One Health” challenges and opportunities”. *Rev. Sci tech Off. Int. Epiz.* 32(1), pp. 271-278.

¹⁶ **Dean AS, et. al., (2012).** “Global Burden of Human Brucellosis: A systematic review of disease frequency”. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(10), pp. 1-9.

¹⁷ **The Center for Food Security and Public Health, (2009).** “Información sobre las enfermedades de los animales. Brucelosis. [En línea]. pp 1-15, 2009. Iowa State University. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucelosis.pdf> [Accesado el día 10 de Septiembre del 2015].

¹⁸ **Sbriglio JL, Sbriglio H y Sainz S, (2007).** “Brucelosis, una patología generalmente subdiagnosticada en humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y el desarrollo de nuestros países”. *Bioanálisis.* Enero-Febrero 2007, pp. 18-22.

¹⁹ **Meltzer E, et. al., (2010).** “Sexually transmitted Brucellosis in humans”. *Clin Infect Dis,* 51(2), pp. e12-e15.

²⁰ **Ertem M, et. al., (2000).** “Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation.” *Bone Marrow Tanspl.* 26, pp. 225-226.

²¹ **Secretaría de Salud, (2012).** NORMA Oficial Mexicana. “NOM-022-SSA2-2012, Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano”. *Diario Oficial de la Federación.* [En línea]. México, DF; disponible en: http://www.dofiscal.net/pdf/Dof/D120711_salud.pdf [Accesado el día 25 de Agosto del 2015].

²² **Secretaría de Salud, (2004).** NORMA Oficial Mexicana. “NOM-041-ZOO-1995, Campaña nacional contra la Brucelosis en los animales”. *Diario Oficial de la Federación*. [En línea]. México, disponible en: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/CDAgropecuaria/pdf/40NOM.pdf> [Accesado el día 25 de Agosto del 2015].

²³ **Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (2014).** “Casos por entidad federativa de Zoonosis hasta la semana epidemiológica 52 del 2014”. *Boletín Epidemiológico 2014*. Sistema Único de Información Epidemiológica. [En línea]. México, disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/sem53.pdf> [Accesado el día 30 de Enero del 2015].

²⁴ **Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, (2015).** “Casos por entidad federativa de Zoonosis hasta la semana epidemiológica 7 del 2016”. *Boletín Epidemiológico 2016*. Sistema Único de Información Epidemiológica. [En línea]. México, disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE07.pdf> [Accesado el día 07 de Marzo del 2016].

²⁵ **Dirección General de Epidemiología, (2012).** “Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Brucelosis”. *Dirección General de Epidemiología*. Secretaría de Salud [En línea]. México, disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf [Accesado el día 20 de enero del 2015].

²⁶ **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (2015).** “Datos de frecuencias por especie en base a las cuarentenas y hatos identificados como positivos a brucelosis”. *Brucelosis de los animales. Indicadores de desempeño. Frecuencia en brucelosis, 1er semestre 2015*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea]. México, disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4415> [Accesado el día 07 de Marzo del 2016].

²⁷ **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (2015).** “Situación actual de la brucelosis en los animales en los Estados Unidos Mexicanos”. *Brucelosis de los animales. Situación actual*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea]. México, disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414> [Accesado el día 26 de Agosto del 2015].

²⁸ **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (2015).** “Datos de vacunación contra la brucelosis”. *Brucelosis de los animales. Indicadores de desempeño. Vacunación en brucelosis, 1er semestre 2015*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea]. México, disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4415> [Accesado el día 26 de Agosto del 2015].

²⁹ **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, (2015).** “Datos de vigilancia en brucelosis mediante pruebas de tarjeta en ganado caprino”. *Brucelosis de los animales. Indicadores de desempeño. Vigilancia de caprinos en brucelosis, 1er semestre 2015*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [En línea]. México, disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4415> [Accesado el día 26 de Agosto del 2015].

³⁰ **Padrón TO, et. al., (2011).** “Historia de la Brucelosis” en Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. [En línea]. 24(2), Mayo-Agosto 2011. Disponible en: <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/brucelosis/> [Accesado el día 10 de Septiembre del 2015].

³¹ **Díaz AE, (2013).** “Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*”. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 28(2), pp. 1-20.

³² **Adone R and Pasquali, (2013).** “Epidemiosurveillance of brucellosis”. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 32(1), 199-205.

³³ **Ko J and Splitter GA, (2003).** “Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans”. *Clin Microbiol Rev*, 16(1), pp. 65-78.

³⁴ **Moreno E and Moriyón I, (2006).** “The genus *Brucella*” en Dworkin M, et. al., (ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of the bacteria*. 3rd ed., Springer Science. Minneapolis, USA.

³⁵ **Franco MP, et. al., (2007).** “Human Brucellosis”. *Lancet Infect Dis*, 7, pp. 775-786.

³⁶ **Yagupsky P, (1999).** “Detection of Brucellae in blood cultures”. *J Clin Microbiol*, 37(11), pp. 3437-3442.

³⁷ **Alton GG, et. al., (1988).** *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique. París, Francia.

-
- ³⁸ **Leal HM, et. al.** “Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active brucellosis, with presence of atypical humoral response”. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 28, pp. 63-70.
- ³⁹ **Aguilar RF, et. al., (2011).** *Prevención de Brucelosis en rumiantes. Manual de capacitación*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (INIFAP – CENID), Folleto Técnico No. 2. México, DF.
- ⁴⁰ **Trant CGMC, et. al., (2010).** “The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine Strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice”. *Infect Immun.* 78(5), pp. 2283-2291.
- ⁴¹ **Rivers R, et. al., (2006).** “*Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos”. *Arch Med Vet.* 38(1), pp. 7-18.
- ⁴² **Al-Mariri A and Abbady AQ, (2013).** “Evaluation of the immunogenicity and the protective efficacy in mice of a DNA vaccine encoding SP41 from *Brucella melitensis*”. *J Infect Dev Ctries.* 7(4), pp. 329-337.
- ⁴³ **Lecároz C, et. al., (2006).** “Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin”. *J Antimicrob Chemother.* 58, pp. 549-556.
- ⁴⁴ **Alton GG and Forsyth JRL, (1996).** *Medical Microbiology.* Chapter 28. 4th edition. Baron S (ed.). University of Texas, Galveston. USA.
- ⁴⁵ **Moreno E, Cloeckert A and Moriyón I, (2002).** “*Brucella* evolution and taxonomy”. *Vet Microbiol.* 90, pp. 209-227.
- ⁴⁶ **Quinn PJ, et. al., (1999).** *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby-Elsiever. United Kingdom.
- ⁴⁷ **Brooks GF, Butel JS and Morse SA, (2011).** *Microbiología Médica.* 18° edición. El Manual Moderno. México, DF.
- ⁴⁸ **Boussau B, et. al. (2004).** “Computational inference of scenarios for proteobacterial genome evolution”. *PNAS.* 1, pp. 9722–9727.
- ⁴⁹ **Tsolis RM, (2002).** “Comparative genome analysis of the proteobacteria: Relationships between plant and animal pathogens and host specificity”. *PNAS.* 99, pp. 12503–12505.
- ⁵⁰ **Gorvel JP and Moreno E, (2002).** “*Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication”. *Vet Microbiol.* 90, pp. 281-297.
- ⁵¹ **Fretin D, et. al., (2005).** “The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection”. *Cell Microbiol.* 7(5), pp. 687-698.

-
- ⁵² **Petersen E, et. al., (2013).** “Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*”. *Microbes Infect.* 15, pp. 440-449.
- ⁵³ **Michaux S, et. al., (1993).** “Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome”. *J Bacteriol.* 175(3), pp. 701-705.
- ⁵⁴ **Minogue TD, et. al., (2014).** “Whole-genome sequences of 24 *Brucella* strains”. *Genome Announc.* 2(5), pp. 1-3.
- ⁵⁵ **Verger JM, et. al. (1985).** “*Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization”. *Int J Syst Bacteriol.* 35(3), pp. 292-295.
- ⁵⁶ **Hoyer BH and McCullough NB, (1968).** “Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids”. *J Bacteriol.* 95(2), pp. 444-448.
- ⁵⁷ **Osterman BS, (2008).** International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 10-13 September 2008. [En línea]. United Kingdom, disponible en: <http://icsp.org/subcommittee/brucella/> [Accesado el día 10 de Octubre del 2015].
- ⁵⁸ **Gwida M, et. al., (2012).** “Brucellosis in camels”. *Res. Vet. Sci.* 92, pp. 351-355.
- ⁵⁹ **Moreno E, Cloeckert A and Moriyón I, (2002).** “*Brucella* evolution and taxonomy”. *Vet. Microbiol.* 90, pp. 209–227.
- ⁶⁰ **Foster G, et. al., (2007).** “*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.* 57, pp. 2688–2693.
- ⁶¹ **Hubálek Z, et. al., (2007).** “Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*)”. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7(4), pp. 679-687.
- ⁶² **Audic S, et. al., (2009).** “*Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen”. *BMC Genom.* 10, pp. 1-18.
- ⁶³ **Scholz HC, et. al. (2010).** “*Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection”. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60, pp. 801-808.
- ⁶⁴ **Adams LG and Schutta CJ, (2010).** “Natural Resistance against Brucellosis: A Review”. *Open Vet Sci J.* 4, pp. 61-71.
- ⁶⁵ **Salcedo SP, et. al, (2012).** “Pathogenic *Brucellae* replicate in human trophoblasts”. *J Infect Dis.* Major Article, pp. 1-9.
- ⁶⁶ **Barbier T, Nicolas C and Letesson JJ, (2011).** “*Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence”. *FEBS Letters.* 585, pp. 2929-2934.

-
- ⁶⁷ **Brenner DJ, et. al., (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. Third section.* 2nd edition. Springer. USA.
- ⁶⁸ **von Bargen K, Gorvel JP and Salcedo SP, (2012).** “Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle”. *FEMS Microbiol Rev.* 36, pp. 533-562.
- ⁶⁹ **Centers for Disease Control and Prevention, (2008).** “Category A and B biological agents. Appendix 6”. [En línea]. United States of America, disponible en: <http://www.cdc.gov/phpr/publications/2008/Appendix6.pdf> [Accesado el día 26 de Agosto del 2015].
- ⁷⁰ **Kortepeter MG and Parker GW, (1999).** “Potential biological weapons threats”. *Emerg Infect Dis.* 5(4), pp. 523-527.
- ⁷¹ **Xavier MN, et. al., (2010).** “Pathogenesis of *Brucella* spp.” *Open V et Sci J.* 4, pp. 109-118.
- ⁷² **Perrone L and Zurzolo C, (2003).** “Lipid rafts and host cell-pathogen interactions” en Gorvel JP (ed.) *Intracellular Pathogens in Membrane Interactions.* Centre d'Immunologie INSERM-CNRS, Université de la Méditerranée. France.
- ⁷³ **Watari M, et. al., (2002).** “Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication”. *Cell Microbiol.* 4(6), pp. 341-355.
- ⁷⁴ **Braun V and Niedergang F, (2006).** “Linking exocytosis and endocytosis during phagocytosis”. *Biol Cell.* 98, pp. 195–201.
- ⁷⁵ **Martín-Martín AI, Vizcaíno N and Lago F, (2010).** “Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages”. *Microb Infect.* 12, pp. 246-251.
- ⁷⁶ **Campbell GA, Adams LG and Sowa BA, (1994).** “Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis”. *Vet Immunol Immunopathol.* 41(3-4), pp. 295-306.
- ⁷⁷ **Sengupta D, et. al., (2010).** “Subversion of innate immune response by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL”. *J Immunol.* 184(2), pp. 956-964.
- ⁷⁸ **Alaidarous M, et. al., (2014).** “Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by *Brucella* Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB”. *J Biol Chem.* 289(2), pp. 654-668.
- ⁷⁹ **Castañeda RE, et al, (2004).** “Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues”. *Cell Microbiol.* 6(5), pp. 435-445.

-
- ⁸⁰ **Castañeda RE, et al. (2006).** “Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasión of host epithelial cells”. *Cell Microbiol.* 8(12), pp. 1877-1887.
- ⁸¹ **Morales L, et al. (2007).** “Estudio bioinformático de la molécula proteica UgpB de las bacterias del género *Brucella*”. *Internet Electron J Nanoc Moletrón.* 5(1), pp. 921-940.
- ⁸² **Czibener C and Ugalde JE, (2012).** “Identification of a unique gene cluster of *Brucella* spp. that mediates adhesión to host cells”. *Microbes Infect.* 14, pp. 79-85.
- ⁸³ **Roop II RM, et al., (2009).** “Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracelular niche in the host”. *Med Microbiol Immunol.* 198, pp. 221-238.
- ⁸⁴ **Billard E, Dornand J and Gross A, (2007).** “*Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of Tumor Necrosis Factor- α secretion”. *Infect Immun.* 75(10), pp. 4980-4989.
- ⁸⁵ **Pappas G, et al., (2005).** “Brucellosis”. *N Engl J Med.* 352, pp. 2325-2336.
- ⁸⁶ **Khan MY, Mah MW and Memish ZA, (2001).** “Brucellosis in pregnant women”. *Clin Infec Dis.* 32, pp. 1172-1177.
- ⁸⁷ **Turhan V, et al., (2013).** “Orchiectomy performed in two patients with *Brucella* orchitis mimicking testicular tumour”. *West Indian Med J.* 62(6), pp. 557-560.
- ⁸⁸ **Gomes CP, et al., (2006).** “*Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system”. *Microbial Cell Fact.* 5(13), pp. 1-11.
- ⁸⁹ **Lapaque N, et al., (2005).** “*Brucella* lipopolysaccharide acts a virulence factor”. *Curr Opin Microbiol.* 8, pp. 60-66.
- ⁹⁰ **Martirosyan A, et al., (2012).** “*Brucella* β -1,2 cyclic glucan is an activator of human and mouse dendritic cells”. *PLoS Pathog.* 8(11), pp. 1-17.
- ⁹¹ **Arellano RB, et al., (2005).** “Cyclic β -1,2 glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracelular survival”. *Nature Immunol.* 6, pp. 618-625.
- ⁹² **Lacerda S, et al., (2012).** “*Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells.” *Curr Op Microbiol.* 16, pp. 1-7.
- ⁹³ **O’Callaghan D, et al., (1999).** “A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracelular survival of *Brucella suis*”. *Mol Microbiol,* 33(6), pp. 1210-1220.
- ⁹⁴ **Rouot B, et al., (2003).** “Production of the Type IV Secretion System differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8- specific antisera”. *Infect Immun.* 71(3), pp. 1075-1082.

-
- ⁹⁵ **de Jong, et. al., (2010).** “Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*”. *Cell Microbiol.* 12(9), pp. 1195-1202.
- ⁹⁶ **de Jong MF, et. al., (2008).** “Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system”. *Mol Microbiol.* 70(6), pp. 1378-1396.
- ⁹⁷ **de Barsy M, et. al., (2011).** “Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2”. *Cell Microbiol.* 13 (7), pp. 1044-1058.
- ⁹⁸ **Marchesini MI, et. al., (2011).** “In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system”. *Cell Microbiol.* 13(8), pp. 1261-1274.
- ⁹⁹ **Myeni S, et. al., (2013).** “*Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins”. *PLoS Pathog.* 9(8), pp. 1-18.
- ¹⁰⁰ **Salcedo SP, et. al., (2013).** “BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions”. *Frontj Cell Infect Microbiol.* 3(28), pp. 1-13.
- ¹⁰¹ **Beier D and Gross R, (2006).** “Regulation of bacterial virulence by two-component systems”. *Curr Opin Microbiol.* 9, pp. 143-152.
- ¹⁰² **López-Goñi I, et. al., (2002).** “Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system, BvrR/BvrS”. *Vet Microbiol.* 90(1-4), pp. 329–339.
- ¹⁰³ **Caro-Hernández P, et. al., (2007).** “Role of the Omp25/Omp31 family in Outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*”. *Infect Immun.* 75(8), pp. 4050-4061.
- ¹⁰⁴ **Cross AS, (2008).** “What is a virulence factor?”. *Crit Care.* 12(6), pp. 1-2.
- ¹⁰⁵ **Celli J, (2006).** “Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*”. *Res Microbiol.* 157(2), pp. 93-98.
- ¹⁰⁶ **Arenas GN, et. al., (2000).** “Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages”. *Infec Immun.* 68, pp. 4255-4263.
- ¹⁰⁷ **Leabu M, (2006).** “Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanism”. *J Cell Mol Med.* 10(2), pp. 423-427.
- ¹⁰⁸ **Becker T, Volchuk A and Rothman JE, (2005).** “Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774”. *PNAS.* 102(11), pp. 4022-4026.
- ¹⁰⁹ **Chen YA and Scheller RH, (2001).** “SNARE-mediated membrane fusion”. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, pp. 98-105.

-
- ¹¹⁰ **Gagnon E, et. al. (2002).** “Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages”. *Cell*. 110, pp. 119-131.
- ¹¹¹ **Harbury PA, (1998).** “Springs and zippers: coiled coils in SNARE-mediated membrane fusion”. *Structure*. 6(2), pp. 1487-1491.
- ¹¹² **Bar-On D, et. al., (2008).** “Imaging the assembly and disassembly kinetics fo *cis*-SNARE complexes on native plasma membranes”. *FEBS Letters*. 582, pp. 3563-3568.
- ¹¹³ **Snyder DA, Kelly ML and Woodbury DJ, (2006).** “SNARE complex regulation by phosphorylation”. *Cell Biochem Biophys*. 45(1), pp. 111-123.
- ¹¹⁴ **Degtyar V, et. al., (2013).** “Dance of the SNAREs: Assembly and rearrangements detected with FRET at neuronal synapses”. *J Neurosci*. 33(13), pp. 5507-5523.
- ¹¹⁵ **Grosshans BL, Ortiz D and Novick P, (2006).** “Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane trafficking”. *PNAS*. 103(32), pp. 11821-11827.
- ¹¹⁶ **Clague MJ, (1998).** “Molecular aspects of the endocytic pathway”. *Biochem J*. 336, pp. 271-282.
- ¹¹⁷ **Barlowe C, (2000).** “Traffic COPs of the early secretory pathway”. 1, pp. 371-377.
- ¹¹⁸ **Lane SR and Liu Y, (1997).** “Characterization of the palmitoylation domain of SNAP25”. *J Neurochem*. 69(5), pp. 1864-1869.
- ¹¹⁹ **Chamberlain LH, Burgoyne RD and Gould GW, (2001).** “SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis”. *PNAS*. 98(10), pp. 5619-5624.
- ¹²⁰ **Brown D, (2002).** “Structure and function of membrane rafts”. *Int J Med Microbiol*. 291(6-7), pp. 433-437.
- ¹²¹ **Salaün C, Gould GW and Chamberlain LH, (2005).** “Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells”. *J Biol Chem*. 280(20), pp. 19449-19453.
- ¹²² **Martínez AS, et. al., (2003).** “A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic *v*-SNAREs”. *PNAS*. 100, pp. 9011-9016.
- ¹²³ **Fasshauer D, et. al, (1998).** “Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 15781-15786.

-
- ¹²⁴ **Sutton RB, et. al., (1998).** “Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution”. *Nature*. 385 (6700), pp. 347-353.
- ¹²⁵ **Takahashi N, et. al., (2010).** “SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis”. *Cell Metab.* 12, pp. 19-29.
- ¹²⁶ **Jahn R, Lang T and Südhof TC, (2003).** “Membrane fusión”. *Cell*. 112, pp. 519-533.
- ¹²⁷ **Fasshauer D and Margittai MA, (2004).** “Transient N-terminal interaction of SNAP25 and syntaxin nucleates SNARE assembly”. *J Biol Chem*. 279(9), pp. 7613-7621.
- ¹²⁸ **Südhof TC, (2013).** “A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond”. *Nat Med*. 19(10), pp. 1227-1231.
- ¹²⁹ **Mellman I, (2000).** “*Quo vadis*: Polarized membrane recycling in motility and phagocytosis”. *J Cell Biol*. 149(3), pp. 529-530.
- ¹³⁰ **Haas A, (2007).** “The phagosome: compartment with a license to kill”. *Traffic*. 8, pp. 311-330.
- ¹³¹ **Hackman DJ, et. al., (1998).** “v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis”. *PNAS*. 95, pp. 11691-11696.
- ¹³² **Sakurai C, et. al., (2012).** “SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages”. *Mol Biol Cell*. 23: 4849-4863.
- ¹³³ **Gerald K, (2002).** “*Cell and Molecular Biology*”, 4th edition. *John Wiley & Sons, Inc.*
- ¹³⁴ **Hong W and Lev S, (2014).** “Tethering the assembly of SNARE complexes”. *Trends Cell Biol* 24(1), pp., 35–43.
- ¹³⁵ **Hong W, (2005).** “SNAREs and traffic”. *Biochim Biophys Acta* 174, pp. 120-144.
- ¹³⁶ **Weizmann Institute of Science, (2014).** “The Human Gene Compendium” en GeneCards. [En Línea]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SNAP25#expression> [Accesado el día 17 de enero del 2014].
- ¹³⁷ **Oyler GA, et. al., (1989).** “The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP25, differentially expressed by neuronal subpopulations”. *J Cell Biol*. 109(6), pp. 3039-3052.
- ¹³⁸ **Zhao N, et. al., (1994).** “Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA”. *Gene*. 145, pp. 313-314.

-
- ¹³⁹ **Washbourne P, et. al., (2001).** “Cysteine residues of SNAP25 are required for SNARE disassembly and exocytosis, but not for membrane targeting”. *Biochem J.* 357, pp. 625-634.
- ¹⁴⁰ **Bark IC, et. al., (1995).** “Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development”. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, pp. 1510-1514.
- ¹⁴¹ **Greaves J, et. al., (2010).** “Regulation of SNAP-25 trafficking and function by palmitoylation”. *Biochem Soc Trans.* 38, pp. 163-166.
- ¹⁴² **Tafoya LCR, et., al., (2006).** “Expression and function of SNAP25 as a universal SNARE component in GABAergic neurons”. *J Neurosci.* 26(30), pp. 7826-7838.
- ¹⁴³ **Prescott GR and Chamberlain LH, (2011).** “Regional and developmental brain expression patterns of SNAP25 splice variants”. *BMC Neurosci.* 12(35), pp. 1-9.
- ¹⁴⁴ **Höhne-Zell B, et. al., (1997).** “Functional importance of Synaptobrevin and SNAP-25 during exocytosis of histamine by rat gastric enterochromaffin-like cells”. *Endo.* 138(12), pp. 5518-5526.
- ¹⁴⁵ **Zhao Y, et. al., (2013).** “Rapid structural change in synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25) precedes the fusion of single vesicles with the plasma membrane in live chromaffin cells”. *PNAS.* 110(35), pp. 14249-14254.
- ¹⁴⁶ **Nabokina S, et., al., (1997).** “Intracellular location of SNAP25 in human neutrophils”. *Biochem Biophys Res Commun.* 239(RC977515), pp. 592- 597.
- ¹⁴⁷ **Grosse J, et. al., (2000).** “Synaptosome-associated protein of 25 kilodalton in oocytes and steroid-producing cells of rat and human ovary: Molecular analysis and regulation by gonadotropins”. *Biol Reprod.* 63, pp. 643-650.
- ¹⁴⁸ **Sik SS, et. al., (2013).** “Expression and regulation of SNAP25 and synaptotagmin VII in developing mouse ovarian follicles via the FSH receptor”. *J Mol Hist.* 44, pp. 47-54.
- ¹⁴⁹ **Lu B, (2015).** “The destructive effect of botulinum neurotoxins on the SNARE protein: SNAP-25 and synaptic membrane fusion”. *PeerJ.* 3, pp. 1-13.
- ¹⁵⁰ **Barr CL, et. al., (2000).** “Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder”. *Mol Psych.* 5, pp. 405-409.
- ¹⁵¹ **Feng Y, et. al., (2005).** “The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder”. *Mol Psych.* 10, pp. 998-1005.

¹⁵² **Hawi Z, et. al., (2013).** “DNA variation in the SNAP25 gene confers risk to ADHD and is associated with reduced expression in prefrontal cortex”. *PLoS ONE*. 8(4), pp. 1-8.

¹⁵³ **Wang Q, et. al., (2015).** “SNAP25 is associated with schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population”. *J Clin Psychiatry*. 76(1), pp. 76-82.

¹⁵⁴ **Guerini FR, et. al., (2014).** “Possible association between SNAP-25 single nucleotide polymorphisms and alterations of categorical fluency and functional MRI parameters in Alzheimer’s disease”. *J Alzh Dis*. 42(3), pp. 1015-1028.

¹⁵⁵ **National Center for Biotechnology Information, (2015).** “*Homo sapiens* chromosome 20, GRCh38.p2 Primary Assembly” en NCBI GenBank, U.S. National Library of Medicine. USA. [En Línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/568815578?report=graph&from=10205539&to=10320708>. [Accesado el día 10 de Noviembre del 2015].

¹⁵⁶ **National Center for Biotechnology Information, (2015).** “*Homo sapiens* synaptosomal-associated protein, 25kDa (SNAP25), transcript varinant 1, mRNA” en NCBI GenBank, U.S. National Library of Medicine. USA. [En Línea]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_003081.3[Accesado el día 10 de Noviembre del 2015].

¹⁵⁷ **National Center for Biotechnology Information, (2015).** “*Homo sapiens* synaptosomal-associated protein, 25kDa (SNAP25), transcript varinant 2, mRNA” en NCBI GenBank, U.S. National Library of Medicine. USA. [En Línea]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_130811.2[Accesado el día 10 de Noviembre del 2015].

¹⁵⁸ **National Center for Biotechnology Information, (2015).** “Synaptosomal-associated protein 25 isoform SNAP25A [*Homo sapiens*]” en NCBI GenBank, U.S. National Library of Medicine. USA. [En Línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/18765733> [Accesado el día 10 de Noviembre del 2015].

¹⁵⁹ **National Center for Biotechnology Information, (2015).** “Synaptosomal-associated protein 25 isoform SNAP25B [*Homo sapiens*]” en NCBI GenBank, U.S. National Library of Medicine. USA. [En Línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/18765735> [Accesado el día 10 de Noviembre del 2015].

¹⁶⁰ **Álvarez-Domínguez C and Prada-Delgado A, (2003).** “Endosome-Phagosome interactions in pathogenesis”. en Gorvel JP (ed.) *Intracellular Pathogens in Membrane Interactions*. Centre d’Immunologie INSERM-CNRS, Université de la Méditerranée. France.

-
- ¹⁶¹ **Fratti RA, Chua J and Deretic V, (2002).** “Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest”. *J Biol Chem.* 277(19), pp. 17320-17326.
- ¹⁶² **Celli J, Salcedo SP and Gorvel JP, (2005).** “*Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication”. *PNAS.* 102, pp. 1673-1678.
- ¹⁶³ **Pagan JK, et. al., (2003).** “The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion”. *Curr Biol.* 13(2), pp. 156-160.
- ¹⁶⁴ **Paumet F, et al., (2009).** “Intracellular bacteria encode inhibitory SNARE-like proteins”. *PLoS One.* 4(10), pp. 73-75.
- ¹⁶⁵ **Kay JG, et. al., (2006).** “Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup”. *J Biol Chem.* 28(17), pp. 11949-11954.
- ¹⁶⁶ **Murray RZ, et. al., (2005).** “A role for the phagosome in cytokine secretion”. *Science.* 310, pp. 1492-1495.
- ¹⁶⁷ **Gruenberg J and van der Goot FG, (2006).** “Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments”. *Mol Cell Biol.* 7, pp. 495-504.
- ¹⁶⁸ **Fugier E, et. al., (2009).** “The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab2 are crucial for *Brucella* replication”. *PLoS Patho.* 5(6), pp. 1-13.
- ¹⁶⁹ **Caron E, et. al., (1994).** “Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes”. *Infec. Immun.* 62, pp. 6267-5274.
- ¹⁷⁰ **Castañeda-Ramírez A, et. al. (2012).** “Silencing of VAMP3 expression does not affect *Brucella melitensis* infection in mouse macrophages”. *Virulence.* 3(5), 434-439.
- ¹⁷¹ **Castañeda-Ramírez A, et. al., (2015).** “Blocking the expression of syntaxin 4 interferes with the initial phagocytosis of *Brucella melitensis* in macrophages”. *Can J Vet Res.* 79, pp. 39-45.
- ¹⁷² **Tsuchiya S, et. al., (1980).** “Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)”. *Int J Cancer.* 26, pp. 171-176.
- ¹⁷³ **Hernández CR, et. al., (2008).** “The BME10216 gene of *Brucella melitensis* is required for internalization in HeLa cells”. *Microbial Pathog.* 44, pp. 28-33.
- ¹⁷⁴ **Tsuchiya S, et. al., (1982).** “Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester”. *Cancer Res.* 42, pp. 1530-1536.

¹⁷⁵ **Park EK, et. al., (2007).** “Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli”. *Inflamm Res.* 56, pp. 45-50.

¹⁷⁶ **Strober W, (2001).** “Trypan blue exclusion test of cell viability”. *Curr Protoc Immunol.* A:3 – A:3B.

¹⁷⁷ **Campbell PA, Canono BP and Drevets DA, (2001).** “Measurement of bacterial ingestión and killing by macrophages” en *Current Protocols of Immunology.* Chapter 14, Unit 14.6, Basic Protocol 1, pp. 14.6.2 y 14.6.3.

¹⁷⁸ **Chomczynski P and Sacchi N, (1987).** “Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”. *Anal Biochem.* 162(1), pp. 156-159.

¹⁷⁹ **Scopes RK and Smith JA, (1998).** “Analysis of Proteins” en Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et. al. (ed.) *Current Protocols in Molecular Biology.* Chapter 10, 10.0.1-10.0.20. John Wiley & Sons, Inc.

¹⁸⁰ **Bradford MM, (1976).** “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding”. *Anal Biochem.* 72, pp. 248-254.

¹⁸¹ **Gallagher SR, (1999).** “Electrophoretic separation of proteins”. en Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et. al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology.* Chapter 10, 10.2A.1-10.2A.34. John Wiley & Sons, Inc.

¹⁸² **Hofman F, (2002).** “Immunohistochemistry” en *Current Protocols of Immunology.* Chapter 21, Unit 21.4, pp. 21.4.1- 21.4.23. John Wiley & Sons, Inc.

¹⁸³ **Schacht V and Kern JS, (2015).** “Basics of Immunohistochemistry”. *J Investig Dermatol.* 135, pp. 1-4.

¹⁸⁴ **Martínez PJM y Martínez RJM (2010).** “Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas”. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 4(2), pp. 1-11.

¹⁸⁵ **Fonseca IB, et. al., (2010).** "Immunohistochemistry expression of vimentin, CD34 and c-Kit (CD117) in gastrointestinal stromal tumors”. *Int J Morphol.* 28(2), pp. 453-459.

¹⁸⁶ **Ishibashi H, et. al., (2003).** “Sex steroid hormone receptors in human thymoma”. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(5), pp. 2309-2317

¹⁸⁷ **Ortiz AR, (2011).** “Evaluación de la expresión de las proteínas Rab5 y Rab7 durante el tránsito vesicular de *Brucella melitensis* en la infección de macrófagos THP-1. Tesis de maestría. DF. México: FMVZ-UNAM.

-
- ¹⁸⁸ **The Human Protein Atlas, (2015).** *SNAP25. Cell line atlas.* Knut & Alice Wallenberg Foundation. [En línea]. Suiza, disponible en: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000132639-SNAP25/cell/HPA001830>. [Accesado el día 2 de Febrero del 2016].
- ¹⁸⁹ **Stow JL, Manderson AP and Murray RZ, (2006).** “SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system”. *Nature Rev Immunol.* 6, pp. 919-929.
- ¹⁹⁰ **Stow JL, et. al., (2008).** “Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators”. *Immunobiol.* 214, PP. 601-612.
- ¹⁹¹ **Jacobsson G, et. al., (1994).** “Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells”. *Proc Natl Acad Sci.* 91, pp. 12487-12491.
- ¹⁹² **Mollinedo F, et. al., (2006).** “Combinatorial SNARE complexes modulate the secretion of cytoplasmic granules in human neutrophils”. *J Immunol.* 177, pp. 2831-2841.
- ¹⁹³ **Takahashi N, et. al., (2004).** “Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25”. *J Cell Biol.* 165(2), pp. 255-262.
- ¹⁹⁴ **Sørensen JB, et. al., (2003).** “Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP25 splice variants and SNAP23.” *Cell.* 114, pp. 75-86.
- ¹⁹⁵ **Hackman DJ, et. al., (1996).** “Characterization and subcellular localization of target membrane soluble NSF attachment protein receptors (t-SNAREs) in macrophages. Syntaxins 2, 3 and 4 are present on phagosomal membranes.” *J Immunol,* pp. 4377-4383.
- ¹⁹⁶ **McVey DW, et. al., (2000).** “Syntaxin 7 and VAMP 7 are soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors required for late endosome-lysosome and homotypic lysosome fusion in alveolar macrophages”. *Mol Biol Cell.* 11, pp. 2327-2333.
- ¹⁹⁷ **Murray RZ, et. l., (2005).** “Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis factor- α ”. *J Biol Chem.* 280(11), pp. 10478-10483.
- ¹⁹⁸ **Zhang JZ, et. al., (2004).** “Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune responses and host cell cycles”. *Infect Immun.* 72(1), pp. 498-507.
- ¹⁹⁹ **Eletto D, et. al., (2008).** “Inhibition of SNAP25 expression by HIV-1 Tat involves the activity of mir-128a”. *J Cell Physiol.* 216(3), pp. 764-770.

²⁰⁰ **Sandberg MK and Löw P, (2005).** “Altered interaction and expression of proteins involved in neurosecretion in Scrapie-infected GT1-1 cells”. *J Biol Chem.* 280(2), pp. 1264-1271.

²⁰¹ **Okayama M, et. al., (2007).** “SNAP23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells.”. *FEBS Letters.* 581, pp. 4583–4588.

²⁰² **Sadoul K, et. al.,(1997).** “SNAP23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and can replace SNAP25 in the process of insulin secretion”. *J Biol Chem.* 272(52), pp. 33023-33027.

²⁰³ **Yang B, et. al., (1998).** “SNARE interactions are not selective”. *J Biol Chem.* 274(9), pp. 5649-5653.

²⁰⁴ **Lunov O, et. al., (2011).** “Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line”. *ACS Nano.* 5(3), 1657-1669.

²⁰⁵ **Benoliel AM, et. al., (1980).** “Non-specific binding by macrophages: existence of different adhesive mechanisms and modulation by metabolic inhibitors.” *Immunol.* 41, pp. 547-560.

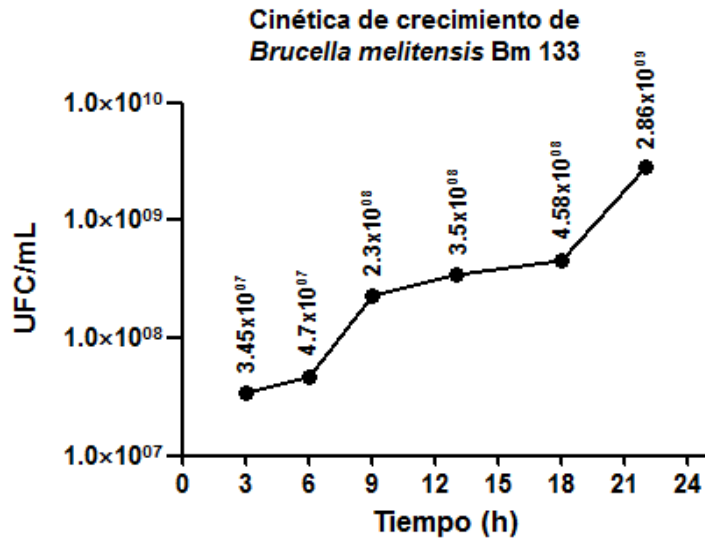
²⁰⁶ **Schroit AJ and Gallily R, (1977).** ”Macrophage phagocytic recognition sites”. *Immunol.* 33, pp. 121-127.

²⁰⁷ **Pratten MK and Lloyd JB, (1986).** “Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages”. *Biochim Biophys Acta.* 881(3), pp. 307-313.

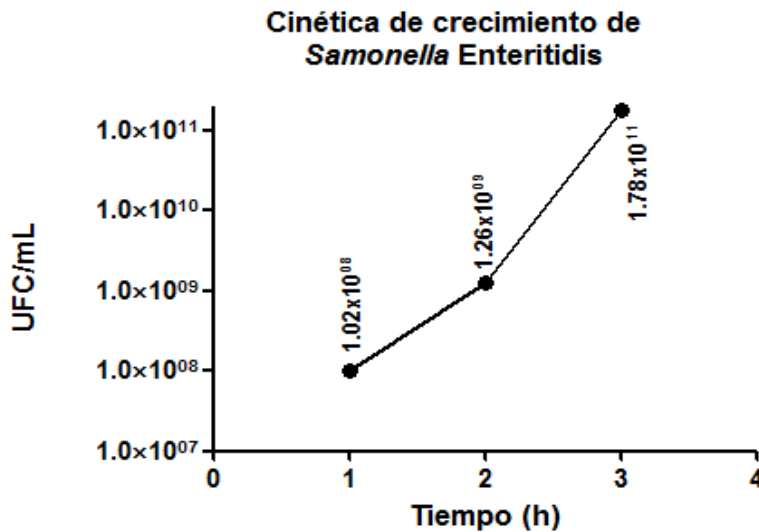
²⁰⁸ **Garin J, et. al., (2001).** “The phagosome proteome: Insight into phagosome functions”. *J Cell Biol.* 152(1), pp. 165-180.

²⁰⁹ **Qiagen, Sample & Assay Technologies, (2001).** “Maximizing PCR and RT-PCR success. Addressing critical factors and new solutions.” 2nd edition.

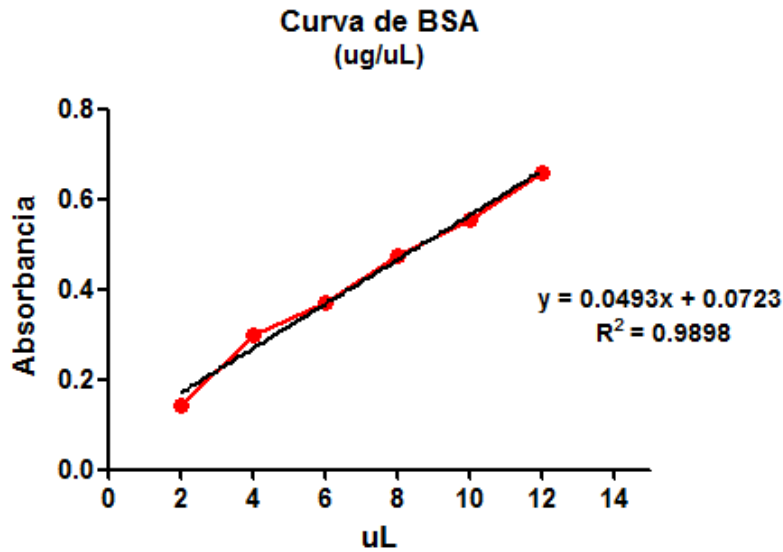
ANEXO



GRÁFICA 1. Cinética de crecimiento de *B. melitensis* Bm 133 . En el eje de las abscisas se representan los tiempos de medición de las UFC's después de realizar el pase del inóculo primario. En el eje de las ordenadas se representa el promedio de las UFC's obtenido a partir de las dos repeticiones de cada cinética. Para los ensayos de infección se dejó incubando el inóculo secundario por 13 h para obtener un promedio de 3.5×10^8 UFC/mL. Las lecturas se realizaron por espectrofotometría, $DO_{625 \text{ nm}} = 0.08-0.1$.



GRÁFICA 2. Cinética de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis. En el eje de las abscisas se representan los tiempos de medición de las UFC's después de realizar el pase del inóculo primario. En el eje de las ordenadas se representa el promedio de las UFC's obtenido a partir de las dos repeticiones de cada cinética. Para los ensayos de infección se dejó incubando el inóculo secundario por 1 h para obtener un promedio de 1×10^8 UFC/mL. Las lecturas se realizaron por espectrofotometría, $DO_{625 \text{ nm}} = 0.08-0.1$.



GRÁFICA 3. Curva patrón de BSA para cuantificación de proteínas por el método de Bradford. En el eje de las abscisas tenemos la cantidad de uL que se colocaron para realizar la dilución de BSA y en el eje de las ordenadas los valores de absorbancia obtenidos en la lectura por espectrofotometría. Se observa una linealidad del 98.9%.

Cuadro 5. A) Descripción estadística de la variable respuesta *H-score* al evaluar por inmunohistoquímica la expresión de SNAP25 en monocitos (1) y macrófagos 19 h post-PMA (2). B) Prueba *t* de Student para la comparación de medias independientes.

A

Group Statistics

	Observ.	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HSCORE	1	6	13.293333	8.0356522	3.2805413
	2	14	37.898571	12.0023510	3.2077632

B

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
HSCORE	Equal variances assumed	.000	-24.6052381	5.3890837
	Equal variances not assumed	.000	-24.6052381	4.5882127

Cuadros 6 y 7. Descripción estadística (A) y ANOVA (B) de la variable respuesta (H-score) en los macrófagos infectados con *B. melitensis* (BM), en los tratados con perlas de látex (CP) y en los macrófagos sin tratamiento (CN) a los diferentes tiempos.

TRAMIENTO * TIEMPO

A

Dependent Variable: HSCORE

TRAMIENTO	TIEMPO	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
BM	15	16.304	2.273	11.799	20.808
	30	27.284	2.273	22.779	31.788
	45	27.025	2.273	22.521	31.529
	60	33.361	2.273	28.857	37.866
CP	15	20.565	2.273	16.061	25.069
	30	11.808	2.273	7.303	16.312
	45	66.878	2.273	62.374	71.382
	60	23.467	2.273	18.962	27.971
CN	15	40.571	2.976	34.674	46.469
	30	38.714	2.976	32.817	44.612
	45	39.714	2.976	33.817	45.612
	60	33.286	2.976	27.388	39.183

B

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26467.746 ^a	11	2406.159	38.799	.000
Intercept	116003.373	1	116003.373	1870.562	.000
TRAMIENTO	2581.374	2	1290.687	20.812	.000
TIEMPO	6845.677	3	2281.892	36.796	.000
TRAMIENTO * TIEMPO	14141.103	6	2356.851	38.004	.000
Error	6945.707	112	62.015		
Total	149026.292	124			
Corrected Total	33413.453	123			

a. R Squared = .792 (Adjusted R Squared = .772)

Cuadro 8. Comparación de medias entre las combinaciones de los tres factores. SPSS 20[®]

Niveles	Literales	Promedio
CP-45	A	66.88
CN-15	B	40.61
CN-45	B	39.81
CN-30	B C	38.65
BM-60	B C D	33.36
CN-60	B C D	33.13
BM-30	C D E	27.28
BM-45	C D E F	27.03
CP-60	D E F	23.47
CP-15	E F G	20.57
BM-15	F G	16.30
CP,30	G	11.81

Niveles no conectados por la misma literal son estadísticamente diferentes con una alfa <0.05.