



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

EFFECTO DEL ERITRITOL EN LOS GENES *eryA* Y *eryCD* DE *Brucella canis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ADRIANA MARCELA GONZÁLEZ GUERRERO

TUTORA PRINCIPAL:

BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

ERIKA GABRIELA PALOMARES RESÉNDIZ

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRÍCOLAS Y
PECUARIAS

CD. UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mi mamá Elena Guerrero tu esfuerzo es impresionante y tu amor invaluable, tus enseñanzas las aplico día a día y tu bendición siempre me protege. Gracias por todo lo que haces por mí.

A mis compañeros Skarlet, Miguel, Adolfo, Itzel, Jacobo, los tres Omares, Laura, Josué y Lupita. Había días en que el solo hecho de saber que los vería era motivo para levantarme y continuar, gracias por hacer del laboratorio un lugar increíble son muchos los recuerdos bonitos que atesoro.

A Horacio Moreno gracias por no soltar mi mano, creer en mí, ayudarme en lo que está a tu alcance, cuidarme y traer música a mi vida.

A todas las personas que me han acompañado en este largo y tortuoso camino llamado maestría.

“No me juzgues por mis éxitos, júzgame por las veces que me caí y volví a levantarme”

Nelson Mandela

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso por confiar nuevamente en mí, brindarme lo necesario para poder realizar este trabajo y el tiempo compartido. Gracias por ayudarme a lograr esta meta tan difícil.

Al Dr. Miguel de la Rosa Ramos, tú le diste forma a todo esto cuando lo creí perdido. Gracias infinitas por brindarme tu amistad, la oportunidad de aprender de ti, las revisiones y acercarme a las personas indicadas cuando había que pedir ayuda. A la M en C Ilse Denise Alemán Estrada y el Dr. Juan Carlos Cancino Díaz de la ENCB del IPN por instruirme en la extracción de RNA; al Dr. Carlos Javier Sánchez Vallejo de la ENCB del IPN por asesorarme en el análisis *in silico* y explicarme pacientemente; y la M en C Anaid Ileri Hernández García por su ayuda con el análisis estadístico.

Al M en C Adolfo Ortiz Rico por la capacitación para trabajar dentro de la UNIBIOS, recordarme que siempre debo dar una solución a todo y por ser un amigo espectacular.

A la Dra. Erika Gabriela Palomares Reséndiz por guiarme en la realización de las cinéticas y las veces que se quedó toda la noche; y al Dr. Víctor Tenorio Gutiérrez por prestarnos su espectrofotómetro.

A la MVZ Skarlet Joselin Villaseñor Orozco por ofrecerme tu valiosa ayuda, eras la única a quien le confiaba mis brucellitas y gracias por todos los buenos momentos. Al M en C Jacobo Carrisoza Urbina que me orientó para obtener fotos bonitas de las electroforesis y por revisar este escrito.

A los miembros del jurado el Dr. Rigoberto Hernández Castro, la Dra. Ina Marcela Figueroa Ochoa, la Dra. Gabriela Barcenás Morales y el Dr. Lázaro Verdiguél Fernández, por el tiempo otorgado para la revisión de este trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada durante mi estancia en el programa, número de becario 786923.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA-PAPIIT “Desarrollo de mutantes como candidatos a vacuna y de proteínas recombinantes como antígenos, para el control integral de la brucelosis canina”, No. IT201017.

RESUMEN

Algunas especies del género *Brucella* tienen la capacidad de catabolizar el eritritol, un polialcohol o poliol que se encuentra en tejidos del aparato reproductor y en la placenta; esta característica se ha asociado con la virulencia y tropismo de la bacteria por estos tejidos. La cepa vacunal *B. abortus* S19 es incapaz de metabolizar el eritritol e incluso le resulta tóxico, reforzando el posible papel del eritritol en la virulencia. En el caso de *B. canis* RM6/66 se desconoce la importancia del eritritol en su metabolismo y esta cepa posee una delección puntual en el gen *eryA* originando un pseudogen.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del eritritol a través de las cepas mutantes de *B. canis* RM6/66. En *B. canis eryA+* se restituyó el gen *eryA* completo de *B. abortus* 2308 y en *B. canis ΔeryCD* se sustituyó el gen fusionado *eryCD* de *B. abortus* S19 con la finalidad de que confiera sensibilidad al eritritol, ambas fueron caracterizadas fenotípica y metabólicamente.

Los resultados indicaron que las mutaciones inducidas en *B. canis eryA+* y *B. canis ΔeryCD* no afectaron su crecimiento y no se observó diferencias con las cepas de referencia. En el ensayo de sensibilidad al eritritol *B. canis eryA+* no mostró diferencia significativa comparada con *B. canis* RM6/66, mientras que *B. canis ΔeryCD* fue sensible al disminuir su metabolismo y no se reprodujo. La expresión del mRNA de la cinasa putativa EryA se detectó a las 9 h en presencia o ausencia de eritritol en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+*. Mientras que la expresión del mRNA del regulador EryD se observó solo en *B. abortus* 2308 en presencia de eritritol a las 5 y 9 h. Las secuencias de aminoácidos de la cinasa putativa EryA de *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66 mantienen diferencias entre las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+*, como son *gaps*, sustitución de aminoácidos y diferencia en el tamaño de las proteínas. La superposición de las estructuras terciarias mostró cambios en ambas proteínas.

En conclusión, las mutaciones hechas en el operón *ery* indican que *B. canis* RM6/66 es capaz de crecer en un medio con eritritol y la mutante *B. canis ΔeryCD* podría ser candidata para emplearse como cepa vacunal para prevenir la brucelosis en perros.

Palabras clave: *Brucella canis*, *eryA*, *eryCD*, eritritol.

ABSTRACT

Some species of the genus *Brucella* have the ability to catabolize erythritol, a polyol found in tissues of the reproductive system and placenta; this characteristic has been associated with the virulence and tropism of the bacteria for these tissues. The vaccine strain *B. abortus* S19 is unable to metabolize erythritol and is even toxic to it, reinforcing the possible role of erythritol in virulence. In the case of *B. canis* RM6/66, the importance of erythritol in its metabolism is still and this strain has a specific deletion in the *eryA* gene, originating a pseudogene.

The objective of this study was to study the effect of erythritol through *B. canis* RM6/66 mutant strains. In *B. canis eryA+* the complete *eryA* gene of *B. abortus* 2308 was restored and in *B. canis ΔeryCD* the fused *eryCD* gene of *B. abortus* S19 was replaced in order to confer sensitivity to erythritol, both were characterized phenotypically and metabolically.

The results indicated that mutations induced in *B. canis eryA+* and *B. canis ΔeryCD* did not affect growth and no differences were observed with the reference strains. In the erythritol sensitivity assay, *B. canis eryA+* showed no significant difference compared to *B. canis* RM6/66, while *B. canis ΔeryCD* was sensitive by decreasing its metabolism and did not reproduce. The mRNA expression of the putative EryA kinase was detected at 9 h in presence or absence of erythritol in the strains *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 and *B. canis eryA+*. While the mRNA expression of the EryD regulator was observed only in *B. abortus* 2308 in presence of erythritol at 5 and 9 h. The amino acid sequences of the putative EryA kinase from *B. abortus* 2308 and *B. canis* RM6/66 maintain differences between *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 and *B. canis eryA+* strains, such as gaps, aminoacid substitution and difference protein size. The superposition of the tertiary structures showed changes in both proteins.

In conclusion, the mutations made in the *ery* operon indicate that *B. canis* RM6/66 is capable of growing in a medium with erythritol and the mutant *B. canis ΔeryCD* could be a candidate to be a vaccine strain to prevent brucellosis in dogs.

Keywords: *Brucella canis*, *eryA*, *eryCD*, erythritol.

CONTENIDO

	Página
Resumen.	. III
Abstract.	. IV
1. Introducción.	. 1
1.1 Generalidades de las bacterias del género <i>Brucella</i> .	. 1
1.2 Brucelosis canina.	. 2
1.3 Patogenia.	. 3
1.4 Tránsito intracelular.	. 3
1.5 Diagnóstico.	. 5
1.6 Vacunas para el control de la brucelosis en diferentes especies.	. 5
1.7 La cepa vacunal <i>B. abortus</i> S19.	. 6
1.8 Eritritol.	. 7
1.9 Operón <i>ery</i> .	. 9
1.10 Operón <i>eryEFG</i> .	. 9
1.11 Operón <i>eryABCD</i> .	. 10
1.12 Operón <i>eryRHI</i> .	. 11
1.13 Antecedentes.	. 14
2. Justificación.	. 15
3. Hipótesis.	. 16
4. Objetivos	
4.1 Objetivo general..	. 17
4.2 Objetivos específicos.	. 17

5. Material y métodos

5.1 Material biológico. 18
5.2 Cultivo microbiológico. 18
5.3 Estandarización de la PCR punto final. 19
5.4 Cinéticas de crecimiento. 23
5.5 Ensayo de sensibilidad a eritritol. 24
5.6 Extracción de mRNA y transcripción reversa. 25
5.7 Cuantificación de la expresión de los genes <i>eryA</i> y <i>eryD</i> mediante PCR tiempo real. 27
5.8 Análisis <i>in sillico</i> de la proteína putativa EryA de <i>B. canis</i> RM6/66. 30
5.9 Análisis estadístico. 33

6. Resultados

6.1 Extracción de DNA genómico de <i>Brucella</i> 34
6.2 PCR punto final de los genes <i>eryA</i> , <i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i> 35
6.3 Cinéticas de crecimiento. 37
6.4 Ensayo de sensibilidad a eritritol. 38
6.5 Cuantificación de la expresión de los genes <i>eryA</i> y <i>eryD</i> mediante PCR tiempo real. 40
6.6 Análisis <i>in sillico</i> de la proteína putativa EryA de <i>B. canis</i> RM6/66. 43

7. Discusión

7.1 PCR punto final de los genes <i>eryA</i> , <i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i> 64
7.2 Cinéticas de crecimiento. 65
7.3 Ensayo de sensibilidad a eritritol. 66

7.4 Cuantificación de la expresión de los genes <i>eryA</i> y <i>eryD</i> mediante	
PCR tiempo real.	. 67
7.5 Análisis <i>in silico</i> de la proteína EryA de <i>B. canis</i> RM6/66.	. 68
8. Conclusiones.	. 71
9. Perspectivas.	. 72
10. Bibliografía.	. 73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Contenido de eritritol de extractos de tejido de placenta de ungulados y no ungulados.	8
2	Cepas utilizadas en este estudio.	18
3	Secuencias de iniciadores de los genes <i>eryA</i> , <i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i> para la PCR punto final.	20
4	Reactivos empleados para las reacciones de la PCR punto final.	21
5	Condiciones de la PCR punto final para amplificar los genes <i>eryA</i> , <i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i> .	21
6	Mezclas de reacción para la retrotranscripción de cDNA.	26
7	Iniciadores empleados para la PCR tiempo real para detectar la expresión del mRNA del gen de interés <i>eryA</i> , <i>eryD</i> y como control de expresión endógeno el gen <i>16S</i> del género <i>Brucella</i> .	27
8	Reactivos empleados para las reacciones de la PCR tiempo real y concentración final.	28
9	Condiciones de la PCR tiempo real para amplificar los genes <i>eryA</i> , <i>eryD</i> y <i>16S</i> .	28
10	Dominios homólogos conservados encontrados en la proteína putativa eritritol cinasa EryA de <i>B. canis</i> RM6/66.	49
11	Proteínas involucradas en la red de interacción proteína-proteína de EryA.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura molecular del eritritol.	7
2	Operones <i>eryEFG</i> , <i>eryABCD</i> y <i>eryRHI</i> en las cepas <i>B. abortus</i> 2308, <i>B. canis</i> RM6/66 y <i>B. abortus</i> S19.	13
3	Catabolismo del eritritol de <i>Brucella</i> .	13
4	Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen <i>eryA</i> de <i>B. canis</i> RM6/66 y <i>B. abortus</i> 2308, donde se encuentra la deleción del nucleótido 1,420 que da origen al pseudogen en <i>B. canis</i> RM6/66.	14
5	Electroforesis de DNA genómico.	34
6	Electroforesis de los productos de la PCR para el gen <i>eryA</i> .	35
7	Electroforesis de los productos de la PCR para los genes <i>eryCD</i> y <i>eryC-eryD</i> .	36
8	Cinética de crecimiento de <i>B. canis</i> RM/666, <i>B. canis eryA+</i> y <i>B. canis ΔeryCD</i> .	37
9	Ensayos de sensibilidad a eritritol.	39
10	Cinética de la expresión del gen <i>eryA</i> por medio de RT-PCR en <i>B. abortus</i> 2308, <i>B. canis</i> RM6/66 y <i>B. canis eryA+</i> con eritritol y sin eritritol.	41
11	Cinética de la expresión del gen <i>eryD</i> por medio de RT-PCR en <i>B. abortus</i> 2308, <i>B. canis</i> RM6/66 y <i>B. canis eryA+</i> con eritritol y sin eritritol.	42
12	Secuencia de nucleótidos del operón <i>ery</i> de <i>B. abortus</i> 2308.	44

13	Secuencia de nucleótidos del operón <i>ery</i> de <i>B. canis</i> RM6/66.	45
14	Secuencia de aminoácidos de la proteína putativa eritritol cinasa EryA de <i>B. abortus</i> 2308.	47
15	Secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de <i>B. canis</i> RM6/66 propuesta con el servidor <i>ExpASy Translate Tool</i> .	47
16	Diagrama de la estructura secundaria de los aminoácidos de la proteína putativa eritritol cinasa EryA de <i>B. canis</i> RM6/66.	51
17	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. canis</i> RM6/66 realizada con el <i>Dali Protein Structure Comparison Server</i> .	53
18	Superposición de las estructuras terciarias de la cinasa EryA.	54
19	Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 64 al 69.	55
20	Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 176 al 181.	56
21	Visualización del aminoácido 195 de la cinasa EryA.	57
22	Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 321 al 331.	58
23	Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 459 al 502.	59
24	Visualización del cambio estructural en la parte final de la cinasa EryA.	60
25	Red de interacción proteína-proteína de EryA.	62

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso agudo o crónico, causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta a varias especies de animales domésticos, silvestres e inclusive al humano (Díaz-Aparicio *et al.*, 2001).

La brucelosis canina es causada por *Brucella canis* (*B. canis*), este padecimiento es considerado una zoonosis de tipo ocupacional; sin embargo, también se presenta en propietarios que tienen un estrecho contacto con los perros infectados (Wanke, 2004).

1.1 Generalidades de las bacterias del género *Brucella*

Las bacterias pertenecientes a este género son bacilos cortos Gram negativo, miden de 0.5-0.7 μm de ancho por 0.6-1.5 μm de largo; no presentan una agrupación definida y carecen de cápsula y flagelos, no forman esporas y tienen metabolismo aerobio. Son patógenos intracelulares facultativos ya que se multiplican en el interior de las células del hospedero (Díaz-Aparicio *et al.*, 2001).

Actualmente, el género *Brucella* comprende 13 especies que se clasifican por la naturaleza del lipopolisacárido (LPS) en especies de fenotipo liso y rugoso, y por su hospedero preferente. Las especies de fenotipo liso son: *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (cerdos), *B. melitensis* (caprinos), *B. neotomae* (rata del desierto) (Moreno, 2014), *B. pinnipedialis* (pinnípedos), *B. ceti* (cetáceos) (Foster *et al.*, 2007), *B. microti* (ratón de montaña) (Audic *et al.*, 2009), *B. inopinata* (aislada de una infección de un implante mamario) (Scholz *et al.*, 2010), *B. papionis* (babuinos) (Whatmore *et al.*, 2014) y *B. vulpis* (zorros rojos) (Scholz *et al.*, 2016). Mientras que las especies de fenotipo rugoso únicamente son *B. ovis* (ovinos) y *B. canis* (perros) (Moreno, 2014).

Otras cepas atípicas tipo *Brucella* no han recibido una designación específica; la cepa B13-0095 pertenece al grupo denominado *Brucella inopinata* cepa BO1 y *Brucella* de tipo *inopinata* BO2 que puede provocar neumonía crónica en humanos. El aislamiento de cepas de *Brucella* de hospederos no mamíferos es excepcional; aunque, se ha descrito recientemente el aislamiento de cepas de *Brucella* atípicas en anfibios: en una rana arbórea de ojos grandes (*Leptopelis verniculatus*), ranas africanas (*Pyxicephalus edulis*) y una rana arbórea de White (*Litoria caerulea*) (Soler-Llorens *et al.*, 2016).

1.2 Brucelosis canina

El agente etiológico de la brucelosis canina es *B. canis*, esta enfermedad es considerada una zoonosis de tipo ocupacional para las personas que tienen contacto directo con animales infectados, como son el personal que laboran en criaderos, los médicos veterinarios y el personal de laboratorio de diagnóstico (Carmichael and Joubert, 1987). Esta enfermedad representa un grave problema en los criaderos caninos por los abortos súbitos entre los días 45 y 55 de gestación además de causar infertilidad en los machos; aunque también se ha diagnosticado en perros de compañía y callejeros (Lucero *et al.*, 2005).

B. canis se elimina en fluidos y tejidos de los abortos, fluidos vaginales, semen y orina. Una vez que el microorganismo ingresa al hospedero se propaga vía hematológica y linfática, provocando bacteriemia a la semana uno a cuatro postinfección, manteniéndose persistente en intervalos de 6 a 64 meses (Briseño-González *et al.*, 2004); esta bacteria puede colonizar órganos como el hígado, articulaciones, nódulos linfáticos, bazo, útero, glándula mamaria, testículos, próstata, vesícula seminal y medula ósea (Wanke, 2004).

Hasta el momento no existe una vacuna contra *B. canis*, por lo que la medida de prevención es realizar muestreos serológicos a todos los animales reproductores y

a los que se introducirán en la crianza; en hembras, se deben realizar pruebas serológicas antes de que presenten el estro y repetirla al menos tres semanas después para comprobar si la prueba seropositiva indica una infección real o es un resultado falso-positivo (Makloski, 2011).

1.3 Patogenia

La bacteria se enfrenta a diferentes ambientes restrictivos para colonizar y multiplicarse en el hospedero dependiendo de la vía de entrada, esta restricción está dada por la presencia de factores limitantes como defensinas, lisozima y lactoferrina, pH estomacal, sales biliares, anticuerpos, barreras epiteliales, moco, la presencia de microbiota comensal y la respuesta inmune local (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013). Sin embargo, *Brucella* es capaz de atravesar membranas mucosas donde son fagocitadas y transportadas a linfonodos regionales donde se multiplicarán.

Alrededor del día cuatro al siete postinfección se da la respuesta inmune humoral con la producción de IgM e IgG (Díaz-Aparicio *et al.*, 2001). Entre la primera y sexta semana postinfección se presenta la bacteremia que puede persistir de seis a 64 meses, permitiéndole llegar a sus órganos blanco (Wanke, 2004).

1.4 Tránsito intracelular

La adherencia a las células del hospedero es el primer paso en el proceso infeccioso por medio de adhesinas, las cuales están ampliamente distribuidas en los patógenos microbianos y se unen a una extensa gama de moléculas de la célula huésped. En *Brucella* se han descrito varias adhesinas, por ejemplo, la SP41 que está implicada en la adhesión e invasión de células HeLa (Ferrero *et al.*, 2012); otra adhesina es BigA, identificada en *B. abortus* y es conservada en todas las especies de *Brucella*, una proteína que posee un dominio tipo inmunoglobulina (*Big-like*) (Czibener *et al.*, 2016).

Posteriormente, se activan varias vías de señalización para la internación del microorganismo como la activación de proteínas regulatorias del citoesqueleto de actina, llamadas pequeñas GTPasas, de la subfamilia Rho, incluyendo Ras, Rac1, Cdc42 y RhoA; además, mediadores de las vías de señalización tales como GMP cíclico y fosfoinositol 3 quinasa (PIK3), que actúa como segundo mensajero para señales de la GTPasa39. Este sistema de regulación permite a la célula epitelial inducir la entrada de la bacteria por macropinocitosis (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013).

La fusión lisosomal de la vacuola que contiene *Brucella* (BCV) es controlada por las bacterias mediante el β -1,2-glucano cíclico, un factor de virulencia, que disminuye la fusión lisosomal por el agotamiento de colesterol de la membrana de la BCV (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). También se expresan las proteínas HdeA y CydB para resistir el descenso del pH, el daño oxidativo y la producción de péptidos antimicrobianos (Roop *et al.*, 2009).

La acidificación del fagolisosoma permite la activación y expresión del SST4 que es crucial para el establecimiento de la vacuola de reproducción que contiene a *Brucella* spp (rBCV) cuya presencia y expresión está confirmada en *B. canis* (Di Russo Case and Samuel, 2016, Palomares-Resendiz *et al.*, 2012).

Se expresa la proteína unidora de pequeñas GTP-Rab5 y el antígeno endosomal temprano (EEA1) y se intercambian por los marcadores de la vía endosomal tardía Rab7, RILP y LAMP1 que son necesarias para el tráfico intracelular de *Brucella* spp (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2013). La rBCV adquiere la glicoproteína de membrana LAMP1 que es un marcador de endosoma tardío. La fusión de la rBCV con el retículo endoplásmico requiere la GTPasa Rab2, que es un complejo que regula el tráfico vesicular desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico. La BCV se fusionan progresivamente con el retículo endoplásmico y logran un pH neutro, siendo un nicho seguro para la reproducción (Di Russo Case and Samuel, 2016).

1.5 Diagnóstico

Existen diferentes formas de diagnosticar la brucelosis canina, en el caso del diagnóstico serológico se utiliza la prueba de aglutinación rápida en placa con 2 β -mercaptoetanol, cuyo antígeno es elaborado con la cepa de referencia de *B. canis* RM6/66 mucoide negativa (M-) teñida con rosa de bengala y con una concentración bacteriana del 6% (George and Carmichael, 1978) cuya sensibilidad es alrededor del 80% (González-Guerrero, 2015). Un inconveniente de esta prueba es que la cepa bacteriana (M-) pierde su característica fenotípica rápidamente, revirtiendo a una cepa mucoide que hace difícil la elaboración del antígeno e inclusive puede autoaglutinar proporcionando resultados falsos positivos (Carmichael *et al.*, 1984).

La prueba de oro sigue siendo el aislamiento y la identificación de *B. canis* a partir de exudado vaginal, fetos abortados, placenta, semen y sangre; esta última resulta ser la muestra bacteriológica por excelencia debido a que los perros padecen periodos de bacteriemia, aunque, la desventaja es que la presencia de bacterias en sangre no es constante y es de duración variable, por lo que es necesario hacer hemocultivos repetidos y aun así puede haber casos en que no sea posible su aislamiento (Barrouin-Melo *et al.*, 2007).

1.6 Vacunas para el control de la brucelosis en diferentes especies

Además de representar un riesgo para la salud pública, en el sector ganadero la brucelosis es una enfermedad de gran impacto, por lo que la vacunación es una práctica primordial para el control de esta enfermedad (Díaz-Aparicio *et al.*, 2001).

Las vacunas vivas atenuadas con las cepa rugosa *B. abortus* RB51 o *B. abortus* S19 se han utilizado en todo el mundo para prevenir la brucelosis en bovinos; mientras que en pequeños rumiantes se aplica *B. melitensis* Rev 1 (Goodwin and Pascual, 2016), actualmente no se dispone de vacunas para otras especies animales o seres humanos.

Las características ideales de un inmunógeno contra *Brucella* son que la cepa sea viva atenuada, que posea cierta virulencia residual, que sea capaz de despertar una inmunidad de tipo celular y que no provoque abortos (Goodwin and Pascual, 2016).

1.7 La cepa vacunal *B. abortus* S19

B. abortus S19 es una cepa atenuada espontáneamente, descubierta por John Buck en 1923. Los mecanismos moleculares o fisiológicos que causan la pérdida de virulencia aún no están bien descritos (Crasta *et al.*, 2008).

El genoma de *B. abortus* S19 es de 3.2 Mb dividido en dos cromosomas circulares, el primero de 2,122,487 pb y el segundo de 1,161,449 pb. El contenido de G-C es de 57%. La secuencia del genoma de esta bacteria muestra más del 99,5% de similitud en comparación con el genoma de *B. abortus* 2308 (Crasta *et al.*, 2008).

Una de las principales diferencias entre la cepa vacunal S19 y la cepa virulenta 2308 es un reordenamiento en los operones de transporte y catabolismo del eritritol. En el operón *eryABCD* de *B. abortus* S19 tiene una deleción de 703 nucleótidos que interrumpe las regiones codificantes de los genes *eryC* y *eryD*. Esta deleción afecta el extremo C-terminal de la proteína *eryC* y la parte N-terminal de la proteína *eryD*. En consecuencia, esta cepa es incapaz de metabolizar el eritritol e incluso le resulta tóxico, reforzando el posible papel de este operón en la virulencia (Sangari and Agüero, 1994, Crasta *et al.*, 2008).

La vacuna S19 se elabora con una cepa de *Brucella abortus* viva empleada en el ganado bovino. Se ha utilizado en México desde 1951, la desventaja es que hay dificultades de carácter diagnóstico, debido a que las pruebas serológicas de rutina no logran discernir entre animales vacunados de infectados ya que induce la formación de anticuerpos aglutinantes contra el polisacárido O (Bustamante-Sánchez *et al.*, 2000).

1.8 Eritritol

El eritritol es un carbohidrato considerado polialcohol o polioliol ya que contiene más grupos hidroxilos que el azúcar al cual está asociado. Fue descrito en 1848 por el químico escocés John Stenhouse. Su nombre IUPAC es (2R,3S)-butano 1,2,3,4-tetraol y su fórmula molecular condensada es $C_4H_{10}O_4$. Molecularmente, es una estructura de cuatro carbonos cada uno con un grupo hidroxilo (**Figura 1**). Su peso molecular es de 122.12 g/mol. Forma cristales anhidros de sabor moderadamente dulce; es de baja solubilidad y tiene baja estabilidad al calor y a pH ácido (Kim *et al.*, 2016).



Figura 1. Estructura molecular del eritritol (Kim *et al.*, 2016)

El eritritol se encuentra en bajas cantidades en algunas frutas, los tejidos del aparato reproductor y en alta concentración en el tejido fetal de los rumiantes (Jain *et al.*, 2012). Se ha cuantificado el contenido de eritritol de extractos de tejido de la placenta de ungulados y no ungulados (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Contenido de eritritol de extractos de tejido de placenta de ungulados y no ungulados.

Especie	µg/mL de eritritol
Vaca	60
Borrega	42
Cabra	27
Cerda	22
Perra	3 - 11
Mujer	<2
Rata	<2
Coneja	<2
Cobaya	<2

Modificado de (Lowrie and Kennedy, 1972, Keppie *et al.*, 1965).

El eritritol es utilizado por *Brucella* para promover su crecimiento y se considera una característica patogénica, ya que el metabolismo preferencial por este azúcar se ha relacionado con su tropismo hacia el tracto genital (Sangari *et al.*, 2010, Sangari and Aguero, 1994, Petersen *et al.*, 2013)

Para que este compuesto sea aprovechado por las bacterias del género *Brucella*, estas deben de contar con las enzimas, reguladores y transportadores necesarios para el catabolismo codificados en su genoma. Se ha descrito el operón *ery* principalmente en *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19 (Sangari *et al.*, 2000).

1.9 Operón *ery*

Como se mencionó anteriormente, para metabolizar el eritritol las bacterias han desarrollado una serie de genes agrupados en operones que no solo se limita a *Brucella* ni a su estilo de vida intracelular, sino que lo comparten con otros miembros de la familia *Rhizobiales*, como la bacteria medioambiental *Ochrobactrum anthropi*, o los simbioses de plantas *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti* (Barbier *et al.*, 2014).

Cabe destacar que en el genoma de *B. abortus* 2308 se han descrito dos operones implicados en el transporte y el catabolismo del eritritol, por lo que en esta cepa se considera que están completos y funcionales (**Figura 2A**) (Sangari *et al.*, 2000).

1.10 Operón *eryEFG*

Se encuentra en la cadena complementaria del Cromosoma II flanqueando al operón *eryABCD* y consta de tres marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frame*, ORF). El gen *eryE* (BAB2_0375) codifica para una fosforibulocinasa transportador ABC ATPasa, el gen *eryF* (BAB2_0376) traduce un translocador de membrana interna y el gen *eryG* (BAB2_0377) codifica a una proteína periplásmica/regulador transcripcional Lacl. En conjunto forman el transportador ABC de eritritol que se regula en respuesta a la presencia de este polialcohol en el medio (Barbier *et al.*, 2017). Por otro lado, *B. abortus* S19 tiene una deleción de 68 nucleótidos en *eryF* (BAbS19_II03540) dando como resultado un gen de 741 nucleótidos que conduce a un truncamiento terminal de 114 aminoácidos, esta mutación suprime la captación de eritritol (**Figura 2C**) (Crasta *et al.*, 2008).

1.11 Operón *eryABCD*

Se encuentra corriente abajo del operón *eryEFG*, consta de 7,714 pb y cuatro ORFs (**Figura 2A**) (García-Lobo *et al.*, 2012). Los genes que integran al operón son los siguientes:

- ***eryA*** (BAB2_0372)

Codifica a una eritritol cinasa putativa de 519 aminoácidos con un peso molecular de 54.4 kDa (Lillo *et al.*, 2003), pertenece a la familia de carbohidrato cinasas FGGY que llevan a cabo la fosforilación dependiente de ATP, tiene homología con xilulosa cinasa y glicerol cinasa de origen bacteriano (Zhang *et al.*, 2011).

Mientras que *B. canis* RM6/66 posee una mutación puntual en el gen *eryA* (BCAN_B0882) donde el nucleótido 1,420 está deletado, conduciendo a un cambio en el ORF de la proteína eritritol cinasa y genera un pseudogen (trabajo aun no publicado) (**Figura 2B**).

El metabolismo del eritritol comienza con su fosforilación dependiente de ATP por EryA para producir L-eritritol-4-P (**Figura 3**) (Barbier *et al.*, 2014).

- ***eryB*** (BAB2_0371)

Codifica a la eritritol fosfato deshidrogenasa de 502 aminoácidos con un peso molecular de 56.2 kDa y tiene homología con la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Sangari *et al.*, 2000).

El segundo paso del metabolismo del eritritol consiste en que la eritritol fosfato deshidrogenasa cataliza la oxidación con una molécula de FAD a FADH₂ sobre el L-eritritol-4-P obteniendo L-3-tetrolosa-4-P (**Figura 3**) (Barbier *et al.*, 2014).

- ***eryC*** (BAB2_0370)

Codifica a la proteína de la superfamilia xilosa isomerasa, la tetrolosa-4-fosfato racemasa de 309 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa (Sangari *et al.*,

2000). Originalmente se había descrito como una deshidrogenasa, hasta 2014 cuando se determinó que es racemasa (Barbier *et al.*, 2014).

En el tercer paso se lleva a cabo una reacción de isomerización en la que EryC actúa sobre L-3-tetrolosa-4-fosfato sin mover la posición de la función oxo obteniendo D-3-tetrolosa-4-fosfato (**Figura 3**) (Barbier *et al.*, 2014).

Por otro lado, *B. abortus* S19 tiene una delección de 703 nucleótidos que interrumpe las regiones codificantes de los genes *eryC* y *eryD*, esto conduce al gen fusionado *eryCD* (BAbS19_I103470) de 1,206 nucleótidos. Esta delección afecta el extremo C-terminal de la proteína *eryC* y la parte N-terminal de la proteína *eryD* que no es funcional (**Figura 2C**) (Crasta *et al.*, 2008).

- ***eryD*** (BAB2_0369)

Codifica al regulador transcripcional del operón *ery*, es una proteína de 316 aminoácidos con un peso molecular de 33.5 kDa y regula la unión al DNA (**Figura 3**) (Sangari *et al.*, 2000).

1.12 Operón *eryRHI*

Hay un segundo operón conservado que se localiza río abajo del operón *eryABCD*, trabajan en conjunto y contiene tres ORFs (Barbier *et al.*, 2014).

- ***eryR*** (BAB2_0368)

Antes denominado *deoR*, codifica una proteína reguladora putativa DeoR. Su expresión incrementa en la fase logarítmica y su función exacta sigue siendo desconocida. Al ser un miembro de la familia DeoR, se une a un éster de fosfato y podría participar junto con EryD en la regulación de la expresión de las enzimas involucradas en el catabolismo del eritritol (Barbier *et al.*, 2014).

- ***eryH*** (BAB2_0367)

Antes denominado *tpiA2*, codifica una D-3-tetrolosa-4-fosfato isomerasa. El cuarto paso es una reacción de isomerización donde EryH actúa sobre D-3-tetrolosa-4-fosfato obteniendo D-eritrolosa-4-fosfato (**Figura 3**) (Barbier *et al.*, 2014).

- ***eryl*** (BAB2_0366)

Antes denominado *rpiB*, codifica una ribosa-5-fosfato isomerasa B. El quinto paso es una reacción de isomerización donde EryI actúa sobre D-eritrolosa-4-fosfato obteniendo D-eritrosa-4-fosfato que es el producto final del catabolismo del eritritol (**Figura 3**) (Barbier *et al.*, 2014).

La D-eritrosa-4-fosfato con ayuda de dos genes transcritos en la cadena opuesta que codifican a dos enzimas involucradas en la glucólisis/gluconeogénesis. El gen *fbaA* (BAB2_0365), generan fructosa-1,6-bifosfato aldosa que participa en la glucólisis donde origina dihidroxiacetona fosfato que por acción de la enzima triosa-fosfato isomerasa (Tpi) genera gliceraldehido-3-fosfato que se incorpora a la vía colateral de las pentosas. Mientras que cuando la D-eritrosa-4-fosfato se acopla a *fbp* (BAB2_0364), codifica a la fructosa-1,6-bifosfatasa que participa en la gluconeogénesis donde convierte fructosa-6-bifosfato en fructosa-6-fosfato y también se incorpora a la vía colateral de las pentosas (Barbier *et al.*, 2014).

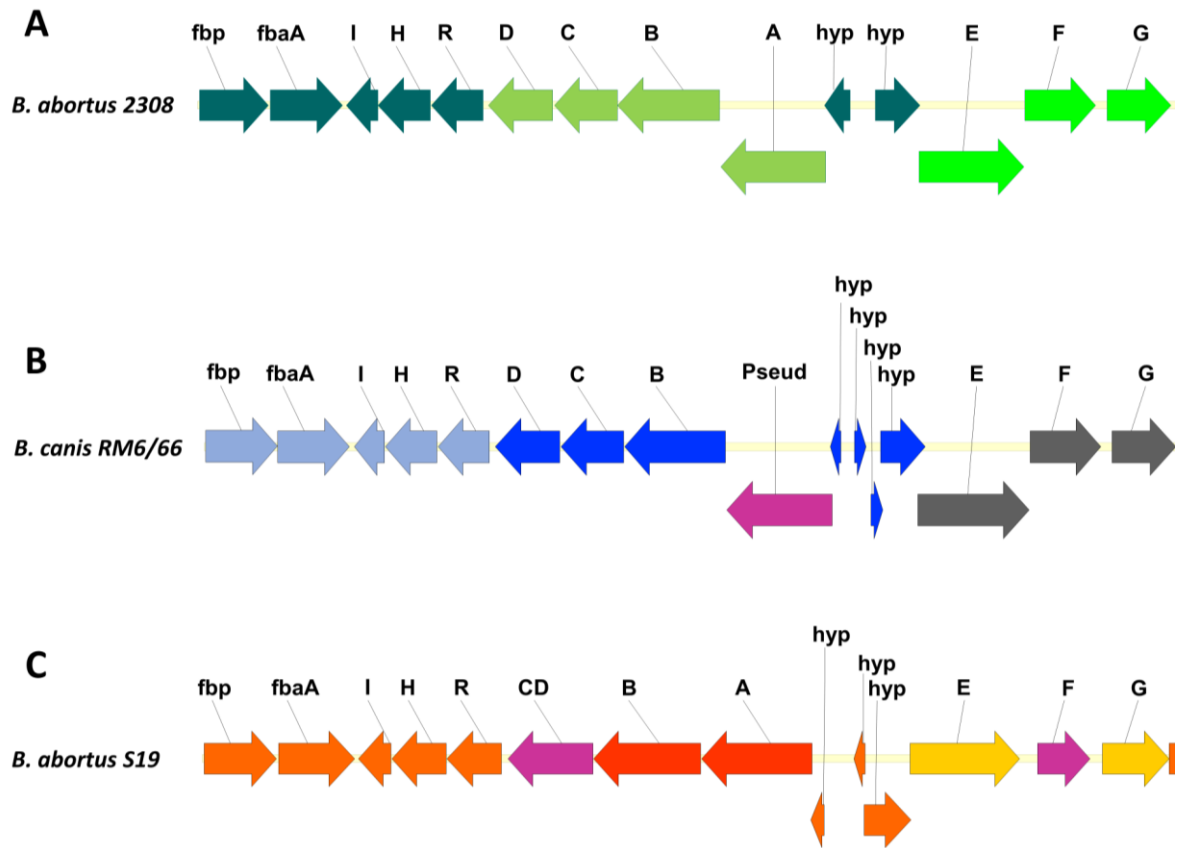


Figura 2. Operones *eryEFG*, *eryABCD* y *eryRHI* en las cepas (A) *B. abortus* 2308, (B) *B. canis* RM6/66 y (C) *B. abortus* S19. Esquema obtenido mediante el software Vector NTI.

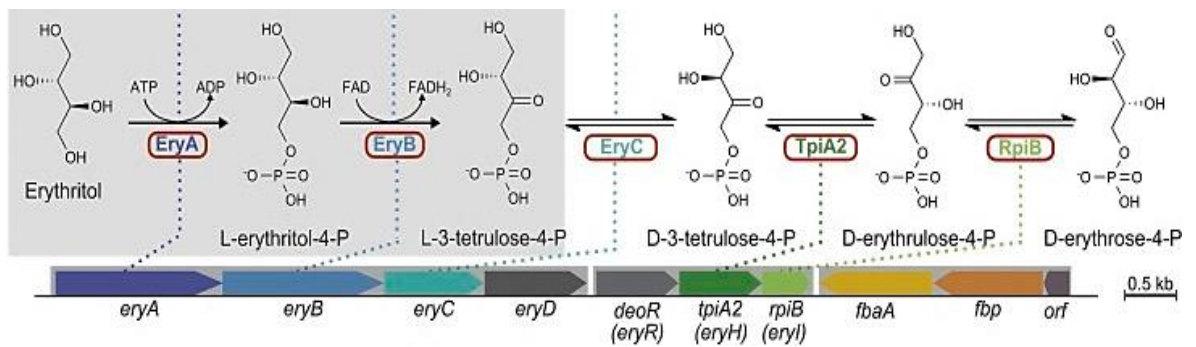


Figura 3. Catabolismo del eritritol de *Brucella*. Tomada de (Barbier *et al.*, 2014)

1.13 Antecedentes

El presente trabajo es la continuación de un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación en colaboración con investigadores del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC, Santander, España).

El objetivo de dicho trabajo fue construir una cepa mutante *B. canis* Δ eryCD por la sustitución alélica del gen de *Brucella abortus* S19, con el propósito de obtener una cepa atenuada. Al realizar el análisis bioinformático del genoma de *B. canis* RM6/66 para realizar la mutación, se observó que posee una mutación puntual en el gen *eryA*, la cual conduce a un cambio en el ORF de la proteína eritritol cinasa, generando un pseudogen; el alineamiento nucleotídico local de *B. canis* RM6/66 con *B. abortus* 2308 se muestra en la **Figura 4**, donde se señala el cambio en la posición 1,420. Como se mencionó anteriormente esta enzima actúa en el primer paso del catabolismo del eritritol (Barbier *et al.*, 2014).

Con la intención de conocer la importancia del gen *eryA* de *B. canis* RM6/66 se construyó una segunda mutante, la *B. canis* *eryA*+ por medio de sustitución alélica del gen *eryA* de *B. abortus* 2308 que codifica para una cinasa funcional.

Ambas mutaciones fueron corroboradas por medio de secuenciación para verificar la correcta inserción de los genes y se desconoce si la mutación en *eryA* afecta la capacidad de *B. canis* RM6/66 de utilizar al eritritol como fuente de carbono, o bien si existen otras enzimas que sean capaces de sustituir la función de la eritritol cinasa.

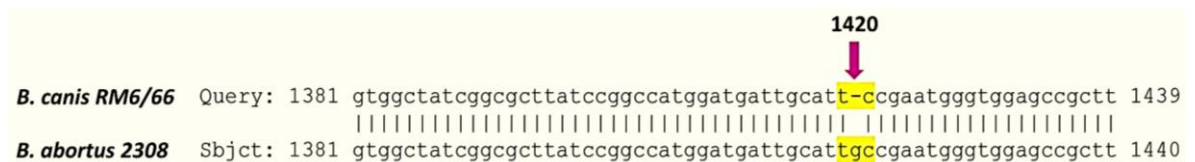


Figura 4. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *eryA* de *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308, donde se encuentra la delección del nucleótido 1,420 que da origen al pseudogen en *B. canis* RM6/66.

2. JUSTIFICACIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa, zoonótica y de distribución mundial, que causa pérdidas económicas en criaderos caninos principalmente y es un riesgo potencial en la salud pública.

Para el desarrollo de herramientas preventivas como la vacunación contra la brucelosis canina, ya que actualmente no se cuenta con alguna contra *B. canis* es crucial hacer estudios donde se describan los mecanismos de patogenicidad en otras cepas del género *Brucella*, como la cepa vacunal *B. abortus* S19 que presenta toxicidad al eritritol.

El desarrollo de nuevas vacunas se ha descrito en múltiples estudios a partir de cepas que previamente deben de ser caracterizadas para describir su fenotipo por medio de herramientas moleculares y bioinformáticas antes de probar su capacidad protectora en modelos *in vitro* o *in vivo*.

Por lo anterior, este trabajo se centró en el estudio de dos cepas de *B. canis* RM6/66 obtenidas previamente. *B. canis eryA+*, en la que se restituyó el gen *eryA* completo de *B. abortus* 2308; y *B. canis ΔeryCD*, en la que se sustituyó el gen fusionado *eryCD* de *Brucella abortus* S19 con la finalidad de que confiera sensibilidad al eritritol.

Por lo que se propuso estudiar dos cepas mutantes de *B. canis* RM6/66 que tienen alteraciones metabólicas similares a *Brucella abortus* S19 utilizada como cepa vacunal en bovinos, dando la posibilidad de que en un futuro se puedan postular como candidatos vacunales en perros.

3. HIPÓTESIS

Las cepas con mutaciones en el operón *ery* de *B. canis* RM6/66 se manifiesta con cambios fenotípicos y metabólicos, tales como diferencias en el crecimiento bacteriano, utilización del eritritol como fuente de carbono, diferencia en la expresión del mRNA de la cinasa EryA. Así como, en la estructura secundaria y terciaria de la proteína putativa de *B. canis* RM6/66 con respecto a la de *B. abortus* 2308 debido a las sustituciones de los genes *eryA* o *eryCD*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del eritritol en las cepas mutantes *eryA+* y Δ *eryCD* de *B. canis* RM6/66 por medio de la caracterización fenotípica y metabólica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las cinéticas de crecimiento de las cepas mutantes de *B. canis*, *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19.
2. Comprobar la tolerancia o toxicidad al eritritol de las cepas mutantes de *B. canis* RM6/66.
3. Observar la expresión del mRNA de *eryA* y el regulador *eryD* en *B. canis* RM6/66.
4. Analizar *in silico* la estructura de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepas		
Nombre	Características	Origen
<i>B. canis</i> RM6/66	Cepa de referencia, rugosa y virulenta. ATCC®* 23365™	ATCC®*
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa de referencia, virulenta y lisa	Cepario del LIBT**
<i>B. abortus</i> S19	Cepa vacunal y lisa	Cepario del LIBT**
<i>B. canis</i> Δ eryCD	Cepa con la sustitución del gen <i>eryCD</i> de <i>B. abortus</i> S19	Trabajo previo, datos no publicados
<i>B. canis</i> <i>eryA</i> +	Cepa con la sustitución del gen <i>eryA</i> de <i>B. abortus</i> 2308	Trabajo previo, datos no publicados

*ATCC: American Type Culture Collection. **LIBT: Laboratorio de investigación de brucelosis y tuberculosis.

5.2 Cultivo microbiológico

Las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* S19, *B. canis* RM6/66, *B. canis* Δ eryCD y *B. canis* *eryA*+

 se cultivaron en agar triptonsoya (TSA, por sus siglas en inglés) (MCD LAB, México) a 37 °C por 48 h; y en caldo triptonsoya (TSB, por sus siglas en inglés) (MCD LAB, México) a 37 °C, 22 h en agitación a 150 rpm.

Todas las cepas fueron conservadas utilizando como crioprotector glicerol al 30% y almacenadas a -80 °C.

5.3 Estandarización de la PCR punto final

Con la finalidad de demostrar la presencia de los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD* se estandarizó la PCR punto final.

Se obtuvo biomasa de las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* S19, *B. canis* RM6/66, *B. canis* Δ *eryCD* y *B. canis* *eryA*+, en 10 mL de TSB como se describió anteriormente, posterior a su incubación se hizo un lavado y se resuspendió en 1 mL de PBS estéril, para inactivarlas en baño maría a 80 °C por 50 min. La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de tiocianato de guanidina (Pitcher *et al.*, 1989). La concentración y pureza del DNA se evaluó por espectrofotometría ($DO_{260/280nm}$) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*), se verificó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% durante 70 min a 80 Volts (V) y se ajustó el volumen a una concentración final de 50 ng/ μ L. Se congeló a -20 °C hasta su uso como templete para las reacciones de PCR.

Se diseñaron los iniciadores para amplificar los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD* mediante el servidor *Prime-BLAST* que propone iniciadores basándose en las características termodinámicas, verificando secuencias repetidas y las composiciones de las bases (Ye *et al.*, 2012). Una vez seleccionados los iniciadores (**Cuadro 3**) se probaron en el software *SnapGene* (versión 4.2.1).

Cuadro 3. Secuencias de iniciadores de los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD* para la PCR punto final.

Gen	Iniciadores
<i>eryA</i>	Fw 5' GTTTCATCGGCCTTTCCAG 3' Rv 5' CCGATAGGCAACGAAAAGTT 3'
<i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i>	Fw 5' GACCTCCAGCTTACCCATGA 3' Rv 5' GCCATTGGCATTGAAGAAAT 3'

El producto de amplificación del gen *eryA* tiene un tamaño de 373 pb en *B. abortus* 2308 y *B. canis eryA+*. El amplicón del gen fusionado *eryCD* tiene 906 pb en *B. canis ΔeryCD* y en *B. abortus* S19, mientras que en los genes *eryC-eryD* se obtiene un producto de 1,611 pb en las cepas que no contengan la delección de 703 pb que son *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66.

Se preparó la mezcla de reacción en un volumen final de 50 µL empleando el kit *ReadyMix™ redtaq™ PCR reaction mix with MgCl₂* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) como se indica en el **Cuadro 4** para después llevar a cabo las reacciones de amplificación en un termociclador *Axygen® MaxyGene™ II Thermal Cycler* (Axygen, Nueva York, USA).

Cuadro 4. Reactivos empleados para las reacciones de la PCR punto final.

Reactivo	Concentración final	Volumen
<i>ReadyMix™ redtaq™ PCR reaction mix with MgCl₂</i> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	0.06 u/μL	25 μL
Iniciador Fw	50 nM	0.25 μL
Iniciador Rv	50 nM	0.25 μL
DNA	50 ng	1 μL
Agua	--	23.5 μL

Se estandarizaron por medio de un gradiente de 50 a 60 °C las condiciones de reacción para cada ensayo de PCR punto final de cada de los genes a probar, eligiendo las mostradas en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Condiciones de la PCR punto final para amplificar los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD*.

Etapas	Gen <i>eryA</i>	Gen <i>eryC-eryD</i> y <i>eryCD</i>
Desnaturalización inicial	5 min a 94 °C	5 min a 94 °C
Ciclos	30	30
<ul style="list-style-type: none">• Desnaturalización• Alineación• Extensión	30 s a 94 °C 30 s a 58 °C 30 s a 72 °C	30 s a 94 °C 30 s a 58 °C 1 min y 40 s a 72 °C
Extensión final	7 min a 72 °C	7 min a 72 °C

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante 70 min a 80 V para ser visualizados.

5.4 Cinéticas de crecimiento

Con la finalidad de determinar las fases de crecimiento bacteriano se hicieron cinéticas de las dos cepas mutantes de *B. canis* y se compararon con la cepa de referencia *B. canis* RM6/66. Se realizó mediante la medición de la turbidez del medio por medio de espectrofotometría.

A partir de un cultivo en TSA a 37 °C por 48 h de cada una de las cepas se hizo el primocultivo tomando 10 colonias para inocular en 20 mL de TSB y se incubó a 150 rpm a 37 °C en agitación a 150 rpm hasta que alcanzó la DO_{600nm} de 0.6 empleando el *Bacharach Coleman® Model 35 Spectrophotometer* (Bacharach Inc, Pittsburg, USA).

El cultivo secundario se hizo con una dilución 1:50 del primocultivo en 50 mL de TSB y fue incubado a 37 °C por 72 h en agitación a 150 rpm. Se realizaron las lecturas de DO_{600nm} a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 48 y 72 h. Al finalizar cada experimento se sembraron 10 µL de cada matraz en TSA para verificar la pureza y la viabilidad de cada cepa. El experimento se realizó por triplicado.

5.5 Ensayo de sensibilidad a eritritol

Se ha descrito que la cepa vacunal de *B. abortus* S19 no tiene la capacidad de metabolizar el eritritol e incluso, éste es tóxico para dicha cepa bacteriana, mientras que la cepa 2308 si utiliza este compuesto (Crasta *et al.*, 2008). Con el objetivo de evaluar si las cepas mutantes y la cepa parental de *B. canis* son capaces de sobrevivir en presencia de eritritol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fueron cultivadas en TSB suplementado con eritritol a 37 °C. Como control negativo se empleó *B. abortus* S19 y como control positivo a *B. abortus* 2308.

Las cepas anteriormente mencionadas se sembraron en TSA y se incubaron a 37 °C por 48 h. El primocultivo se hizo tomando 10 colonias que fueron inoculadas en 20 mL de TSB incubando a 37°C en agitación a 150 rpm hasta que alcanzó la DO_{600nm} de 0.6. Se prepararon tres matraces con TSB con una dilución 1:50 del cultivo primario, el primero sin eritritol que fue el control, el segundo con 2 mg/mL (17 mM) de eritritol y el tercero con 10 mg/mL (80 mM) de eritritol (Zhang *et al.*, 2014) en un volumen final de 50 mL, incubando a 37°C por 30 h en agitación a 150 rpm. Se realizaron las lecturas de DO_{600nm} a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 h. Al finalizar cada experimento se sembraron 10 µL de cada matraz en TSA para verificar la pureza y la viabilidad de cada cepa al ser expuestas al medio con eritritol a las concentraciones descritas. El ensayo se realizó por triplicado.

5.6 Extracción de RNA y transcripción reversa

Con el objetivo de saber si la expresión del mRNA de los genes *eryA* que codifica a la eritritol cinasa y *eryD* que es el regulador dependiente de eritritol se ve afectada por la mutación puntual de *B. canis* RM6/66, se hizo una cinética de *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+* en presencia o ausencia del eritritol.

Se obtuvo la biomasa a partir de un cultivo primario de las tres cepas como se ha descrito anteriormente. Seguido de un cultivo secundario haciendo una dilución 1/50 del cultivo primario en 50 mL de TSB, teniendo un cultivo sin eritritol y un cultivo con 2 mg/mL (17 mM) de eritritol. Se tomaron 13 mL del cultivo a las 0 h (T0), 5 h (fase lag), 9 h (fase log) y 24 h (fase estacionaria), cada volumen se centrifugó a 2,000 xg por 10 min a 24°C, se retiró el sobrenadante y el paquete celular fue lavado con agua libre de nucleasas, y se resuspendió en 300 μ L de Trizol (Invitrogen, California, USA) para lisar las bacterias y cada mezcla se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Se descongeló paulatinamente la mezcla de Trizol y bacterias, se agregaron 40 μ L de cloroformo por cada 200 μ L de Trizol y se homogenizó por inversión, se centrifugó a 14,200 xg por 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 300 μ L de Isopropanol frío dejando precipitar por 2.5 h a -20 °C, al concluir el tiempo se centrifugó a 14,200 xg por 15 min a 4 °C. Se decantó el isopropanol y se agregaron 200 μ L de etanol frío al 70%, se centrifugó a 7,500 xg por 5 min a 4 °C, se decantó el total del líquido y se dejó secar por 2 h, el RNA se resuspendió en 20 μ L de agua libre de nucleasas y se cuantificó por espectrofotometría. Se usó *DNAset / Set* (Zymo Research, California, USA) para eliminar el DNA genómico contaminante siguiendo el protocolo del fabricante.

El cDNA se sintetizó en dos pasos; para el primero se preparó una mezcla de reacción como indica en el **Cuadro 6** y se incubó a 65 °C por 5 min. Terminando este paso la mezcla fue incubada a 4 °C por 5 min y se prosiguió con el segundo paso adicionando una segunda mezcla descrita en el **Cuadro 6** y se incubó a 37 °C por 60 min seguida de 10 min a 65 °C.

Cuadro 6. Mezclas de reacción para la retrotranscripción de cDNA.

Reactivo y concentración final		Volumen
1°	100 ng/μL de RNA	10 μL
	160 ng/μL de <i>Random Primers</i> (Invitrogen, California, USA)	1 μL
	10 mM DNTP Mix (Invitrogen, California, USA)	1 μL
2°	60 U de Retrotranscriptasa <i>Super Scrip</i> ® III (Invitrogen, California, USA)	0.3 μL
	0.2 M de DTT (Dithiothreitol) (Invitrogen, California, USA)	2 μL
	20 U de <i>RNaseOUT</i> ™ <i>Recombinant RNase Inhibitor</i> (Invitrogen, California, USA)	0.5 μL
	5X <i>First-Strand Buffer</i> [250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂] (Invitrogen, California, USA)	4 μL
	Agua libre de nucleasas	1.2 μL

La concentración y pureza del cDNA se evaluó por espectrofotometría ($DO_{260/280nm}$) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*) y se ajustó el volumen a una concentración final de 250 ng/μL. El cDNA se almaceno a -20 °C hasta su uso.

5.7 Cuantificación de la expresión de los genes *eryA* y *eryD* mediante PCR tiempo real

Para cuantificar la expresión del mRNA de los genes de interés *eryA* y *eryD*, se diseñaron los siguientes iniciadores indicados en el **Cuadro 7** y se empleó como control de expresión endógeno el gen *16S rRNA* del género *Brucella*.

Cuadro 7. Iniciadores empleados para la PCR tiempo real para detectar la expresión del mRNA del gen de interés *eryA*, *eryD* y como control de expresión endógeno el gen *16S* del género *Brucella*.

Gen	Iniciadores
<i>eryA</i>	Fw 5' CATATGGACACAATCGCGCC 3' Rv 5' AGGTGAAGCTTGCTTCCGAG 3'
<i>eryD</i>	Fw 5' TGATGGCCGACCTTACCGAT 3' Rv 5' CAGCTTGTGCCAATCCAGAA 3'
16S	Fw 5' CGTGGGAACGTACCATTTGC 3' Rv 5' CAGCTATGGATCGTCGCCTT 3'

Se realizó la mezcla de reacción detallada en el **Cuadro 8**, se colocaron 10 µL de mezcla por pozo en una *LightCycler® 480 Multiwell Plate 96* (Alemania, Roche), la placa fue cubierta con una membrana óptica adhesiva.

Cuadro 8. Reactivos empleados para las reacciones de la PCR tiempo real y concentración final.

Reactivo	Concentración final	Volumen
<i>Master Mix</i> (Promega, Wisconsin, USA)	0.25 U	5 μ L
Iniciador Fw	20 nM	0.25 μ L
Iniciador Rv	20 nM	0.25 μ L
<i>Eva Green® Dye 20X</i> (25 μ M) (Biotium, California, USA)	0.4 μ M	0.15 μ L
<i>Dream Taq Polymerase</i> (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)	0.5 U	0.1 μ L
cDNA	500 ng	2 μ L
Agua	--	2.95 μ L

Posteriormente se procesaron las muestras en el termociclador *LightCycler® 480* (Alemania, Roche) para la reacción de PCR tiempo real bajo las condiciones indicadas en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Condiciones de la PCR tiempo real para amplificar los genes *eryA*, *eryD* y *16S*.

Desnaturalización inicial	7 min a 94 °C
Ciclos	40
<ul style="list-style-type: none">• Desnaturalización• Alineación• Extensión	30 s a 94 °C 30 s a 59 °C 30 s a 72 °C
Extensión final	7 min a 72 °C

Para medir la expresión de los genes de interés se utilizó el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_t$), que consiste en comparar el C_t (*threshold cycle* o ciclo umbral) de

la muestra de interés, con una muestra de calibración como referencia fisiológica (gen endógeno). Todas las cuantificaciones se normalizaron con el gen 16S *rRNA* como control de expresión endógeno y con el tiempo 0 (T0). Todas las reacciones se corrieron por triplicado.

5.8 Análisis *in silico* de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66

Con la finalidad de detectar diferencias en la estructura de la eritritol cinasa EryA de *B. abortus* 2308 que se sabe que es funcional y la proteína putativa de *B. canis* RM6/66, la cual está reportada como un pseudogen. Se realizó un análisis *in silico* de la estructura de ambas proteínas, por lo cual, se usaron las siguientes herramientas bioinformáticas:

El servidor *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine* (Sayers *et al.*, 2019). Es la base de datos de secuencias de DNA disponibles del NIH, donde se buscaron las secuencias de nucleótidos de los genes *eryA* de *B. abortus* 2308 (BAB2_0372) y de *B. canis* RM6/66 (BCAN_B0882) y la secuencia aminoacídica de la proteína EryA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes que conforman el operón *ery* para hacer el análisis *in silico* de las proteínas que son codificadas por el gen *eryA*.

Al no estar disponible la secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66 en el *GenBank*, se recurrió al servidor *ExpASY Translate Tool* (Artimo *et al.*, 2012) del Instituto Suizo de Biotecnología (*Swees Institute of Bioinformatics*), que permite la traducción de una secuencia de nucleótidos a una secuencia de aminoácidos dando los posibles ORF de la proteína putativa (<https://web.expasy.org/translate/>).

Para corroborar que la secuencia obtenida a partir de *ExpASY* es compatible con las características descritas para la cinasa EryA de *B. abortus* 2308, se usó el servidor CELLO v.2.5.: *subCELLular LOcalization predictor* (Yu *et al.*, 2006) del Centro Nacional de Bioinformática Molecular de la Universidad Nacional Chiao Tung (*Molecular Bioinformatics Center of National Chiao Tung University*) que permite predecir la ubicación subcelular de una proteína utilizando cuatro tipos de esquemas de codificación de secuencia: la composición de aminoácidos, la composición de

dipéptidos, la composición de aminoácidos divididos y la composición de secuencia basada en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>).

Posteriormente se empleó el servidor *Phyre2 Server Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0* (Kelley *et al.*, 2015) que predice la estructura de las proteínas enviando una secuencia de aminoácidos utilizando los principios y técnicas por homología, también evalúa el efecto que tienen las variantes de los aminoácidos en su predicción. El sistema genera información resumida y la estructura prevista en formato PDB, aporta un cuadro con los posibles dominios de la proteína y alinea entre la secuencia del usuario y la secuencia de la estructura tridimensional conocida (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Una vez obtenido el archivo en formato PDB de la estructura de la proteína EryA de las cepas de *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308 con ayuda del *software ChimeraX* versión 0.91 (Goddard *et al.*, 2018) se visualizaron las estructuras terciarias de ambas proteínas, para detectar cambios estructurales y se compararon con los cambios que se observaron en la alineación realizada con *Dali Protein Structure Comparison Server* (Holm, 2019) de la Universidad de Helsinki; éste permite comparar una secuencia y estructura de consulta con la de interés del usuario (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>).

Finalmente se empleó el servidor *STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)* (Szklarczyk *et al.*, 2017), que es una base de datos de interacciones proteína-proteína conocidas y predichas con la finalidad de conocer con que proteínas interactúa la cinasa putativa EryA de *B. abortus* 2308 (BAB2_0372), ya que para *B. canis* RM6/66 no está disponible. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales); se basa en la predicción computacional, de la transferencia de conocimiento entre organismos y de interacciones agregadas de otras bases de datos. La base de datos de *STRING*

actualmente cubre 24,584,628 proteínas de 5,090 organismos (<https://string-db.org/cgi/input.pl>).

5.9 Análisis estadístico

Para determinar la diferencia estadística entre el crecimiento de las cepas mutante de *B. canis* se evaluaron los datos mediante ANOVA de una vía, considerando un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$).

Para el análisis de la expresión de los genes *eryA* y *eryD*, la significancia estadística de las diferencias de los valores de expresión transcripcional se evaluó mediante un análisis factorial, considerando un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$).

Los niveles de significancia se determinaron mediante un análisis multifactorial, para hacer la comparación entre las bacterias tratadas con eritritol y sin tratamiento y se consideró significancia estadística de $p < 0.05$.

Se utilizaron los softwares estadísticos IBM® SPSS® *Statistics* versión 21 y *GraphPad Prism* versión 7.00 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1 Extracción de DNA genómico de *Brucella*

Se realizó la extracción de DNA genómico de las cepas de *B. canis*, en la **Figura 5** se muestra la integridad del DNA, se midió pureza y concentración para emplearlo como templado de PCR en los experimentos siguientes.

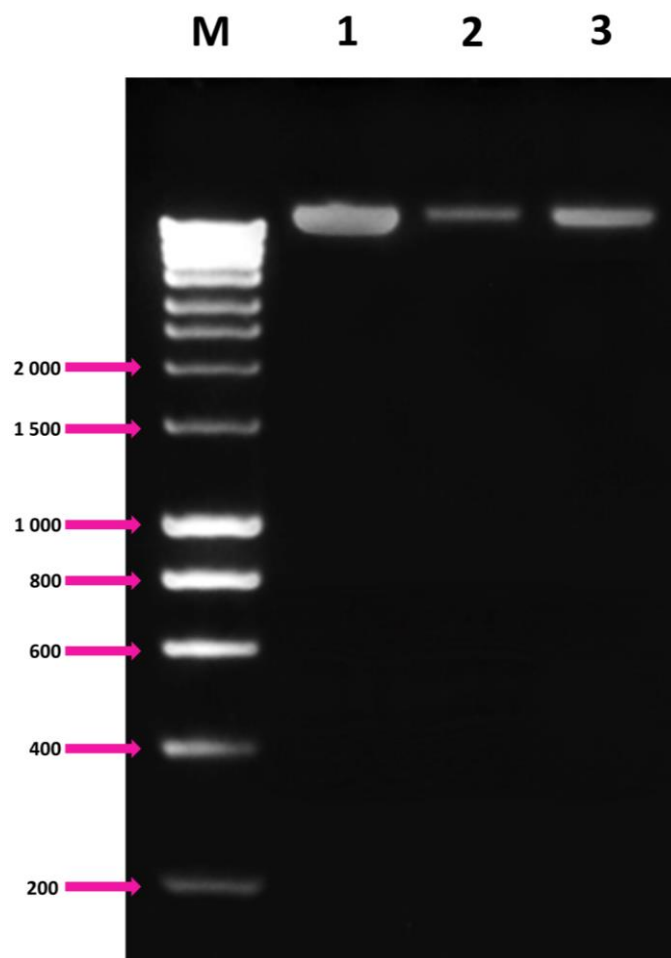


Figura 5. Electroforesis de DNA genómico. Gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, California, USA). **M:** Marcador de tamaño molecular *HyperLadder*TM 1 kb (*Bioline*, Londres, UK). **1:** DNA de *B. canis* RM6/66. **2:** DNA de *B. canis* *eryA*+. **3:** DNA de *B. canis* Δ *eryCD*.

6.2 PCR punto final de los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD*

Mediante PCR se amplificaron los genes *eryA*, *eryCD* y *eryC-eryD*. La **Figura 6** muestra la electroforesis de los productos de amplificación del gen *eryA* en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+*, con un tamaño de 373 pb. La **Figura 7** muestra la electroforesis de los productos amplificados del gen *eryC-eryD* de tamaño de 1,611 pb en *B. canis* RM6/66 y el gen *eryCD* de *B. abortus* S19 y *B. canis* Δ *eryCD* de 906 pb.

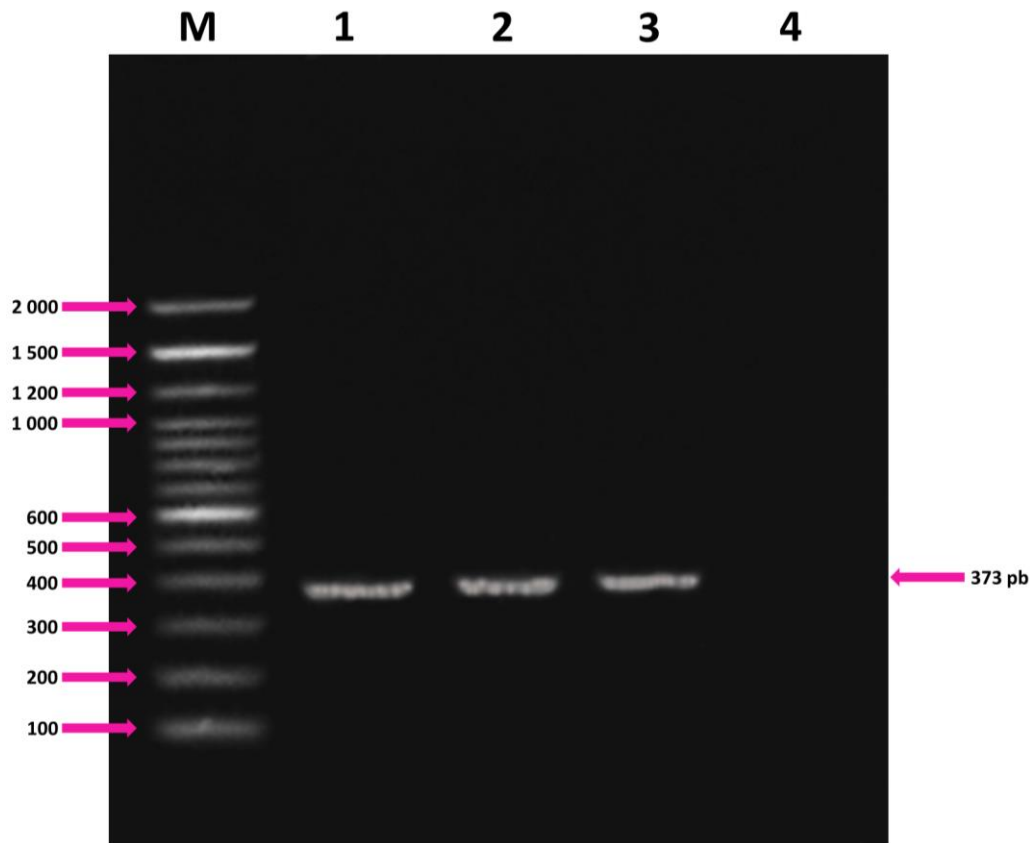


Figura 6. Electroforesis de los productos de la PCR para el gen *eryA*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. **M:** Marcador de tamaño molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, California, USA). **1:** Gen *eryA* de *B. abortus* 2308. **2:** Gen *eryA* de *B. canis* RM6/66. **3:** Gen *eryA* de *B. canis eryA+*. **4:** Control negativo de la reacción de PCR (agua).

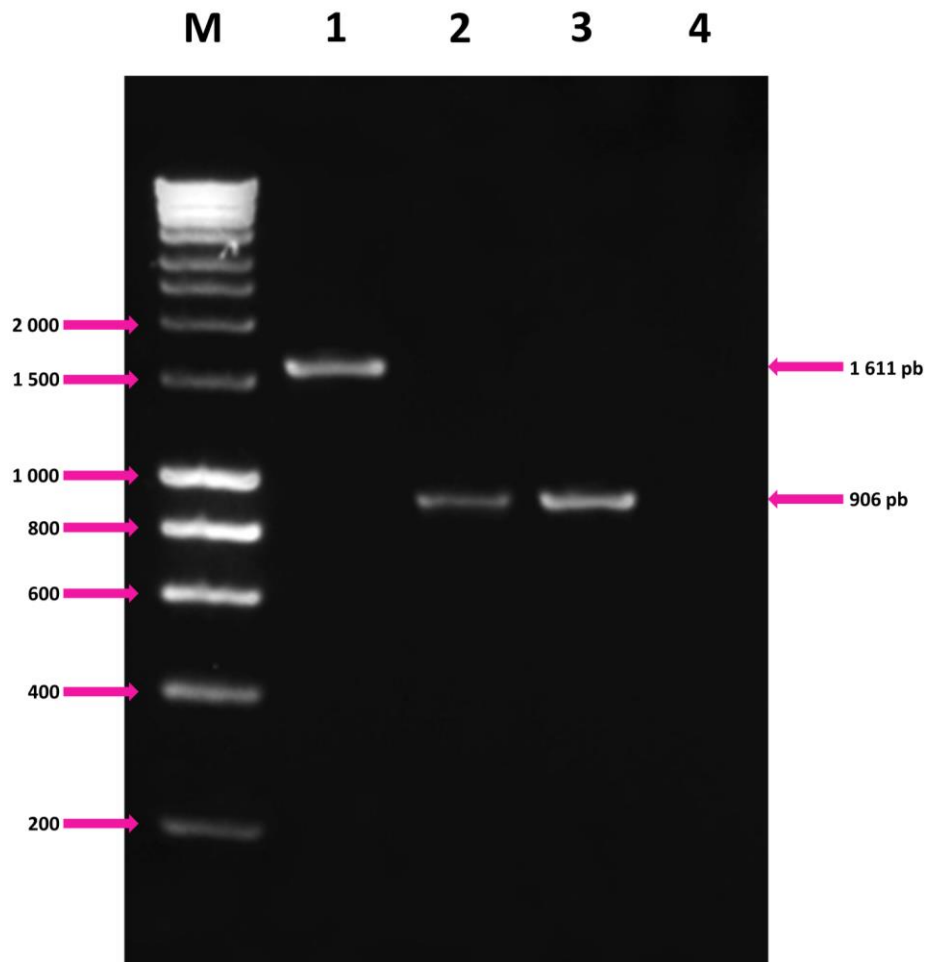


Figura 7. Electroforesis de los productos de la PCR para los genes *eryCD* y *eryC-eryD*. Gel de agarosa al 1.5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain. **M:** Marcador de tamaño molecular *HyperLadder™* 1 kb. **1:** Gen *eryC-eryD* de *B. canis* RM6/66. **2:** Gen *eryCD* de *B. canis* Δ *eryCD*. **3:** Gen *eryCD* de *B. abortus* S19. **4:** Control negativo de la reacción de PCR (agua).

6.3 Cinéticas de crecimiento

Para determinar si las mutaciones en el operón *ery* tienen efecto sobre el crecimiento de las cepas mutantes de *B. canis*, se realizó la cinética de crecimiento.

Se observó que no hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) durante el crecimiento entre las cepas mutantes y la de referencia, por lo tanto, las mutaciones en el operón *ery* no interfieren en la reproducción bacteriana.

Se determinaron las fases de la curva de crecimiento para caracterizar cada una de las cepas probadas, por lo que la fase Lag fue de 0 a 6 h, la fase Log de las 6 h a la 18 h y la fase estacionaria desde las 18 h a la 72 h (**Figura 8**).

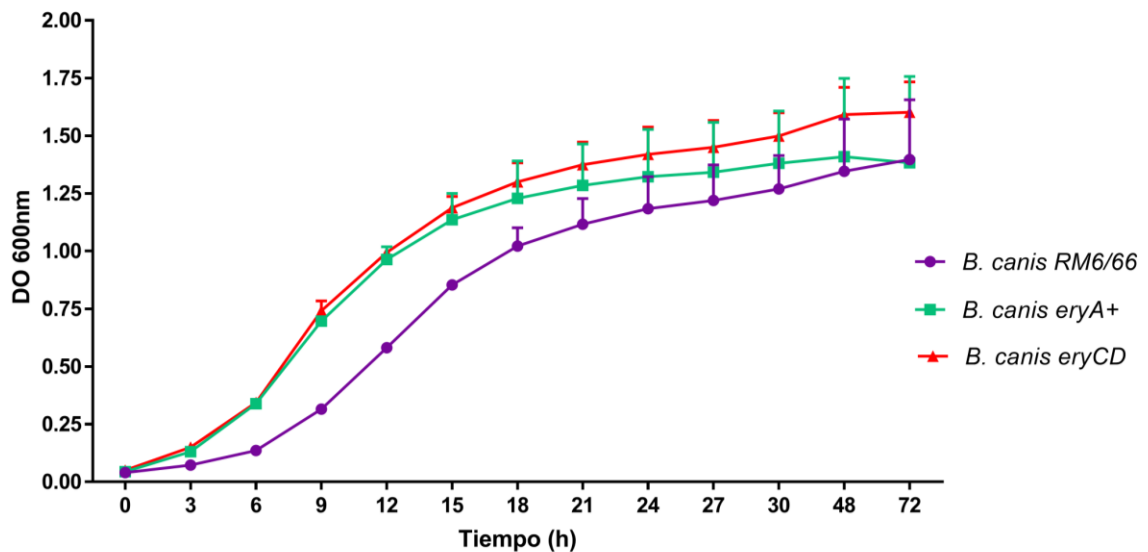


Figura 8. Cinética de crecimiento de *B. canis* RM/666, *B. canis* eryA+ y *B. canis* Δ eryCD. Los resultados se expresan como las medias \pm DE ($n=3$) de la absorbancia en cada punto de tiempo ($p < 0.05$).

6.4 Ensayo de sensibilidad a eritritol

Con la finalidad de probar si las cepas son sensibles a eritritol, se midió el crecimiento bacteriano en presencia de este compuesto. Se observó que en *B. abortus* 2308 (control) y en *B. canis* RM6/66 cultivada con 2 mg/mL (17 mM) de eritritol, no repercutió significativamente de manera negativa en su reproducción; mientras que con 10 mg/mL (80 mM) de eritritol fueron sensibles, ya que su crecimiento disminuyó significativamente a partir de las 6 h y las bacterias permanecieron viables al final del experimento (**Figura 9 A y C**).

Las cepas de *B. abortus* S19 (control) y *B. canis* Δ eryCD mostraron sensibilidad a ambas concentraciones de eritritol, la única diferencia fue que *B. abortus* S19 no sobrevivió a las 30 h de incubación con eritritol, mientras que *B. canis* Δ eryCD si permaneció viable (**Figura 9 B y E**).

Por otro lado, *B. canis* eryA+, con 2 mg/mL (17 mM) de eritritol mantiene su crecimiento hasta las 12 h de manera similar a las bacterias que no contenían eritritol y su crecimiento fue decreciendo; mientras que con 10 mg/mL (80 mM) mostró sensibilidad significativa a partir de las 9 h (**Figura 9 D**).

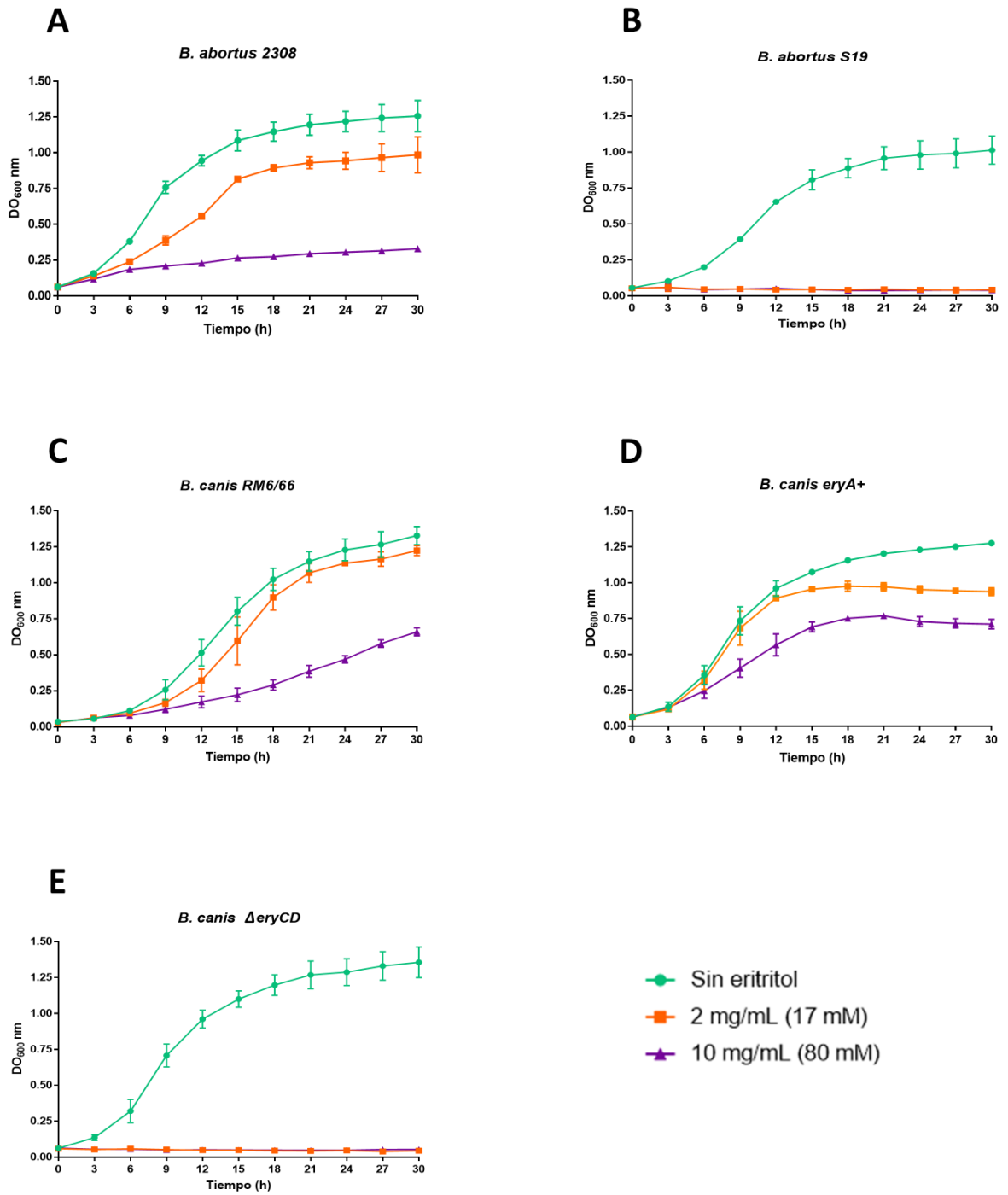


Figura 9. Ensayos de sensibilidad a eritritol. Los resultados se expresan como medias \pm DE (n=3) de la absorbancia en cada punto de tiempo ($p < 0.05$). **A)** *B. abortus* 2308, **B)** *B. abortus* S19, **C)** *B. canis* RM6/66, **D)** *B. canis* eryA+ y **E)** *B. canis* ΔeryCD.

6.5 Cuantificación de la expresión de los genes *eryA* y *eryD* mediante PCR tiempo real.

Se cuantificó la expresión de los genes *eryA* y *eryD* en tres tiempos en presencia y ausencia de eritritol, se empleó como control de expresión endógena el gen de la subunidad ribosomal 16S *rRNA* del género *Brucella*.

En el caso del mRNA del gen *eryA* a las 5 h hubo subexpresión en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+* en presencia y ausencia de eritritol; mientras que a las 9 h se observó expresión significativa del mRNA de interés en las tres cepas, tanto en ausencia como en presencia de eritritol. Por otro lado, a las 24 h todas las cepas mostraron nuevamente subexpresión del mRNA *eryA* (**Figura 10**).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la expresión del mRNA de *eryA* de las tres cepas bacterianas cultivadas con o sin eritritol.

De manera general, el mRNA de *eryA* se expresó a las 9 h en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+* en presencia y ausencia de eritritol.

Mientras que el mRNA de *eryD* que codifica al regulador de la expresión del operón *ery*, solo mostró sobreexpresión significativa en la cepa *B. abortus* 2308 en presencia de eritritol a las 5 y 9 h. En el resto de los casos se observa subexpresión del mRNA del regulador *eryD* (**Figura 11**).

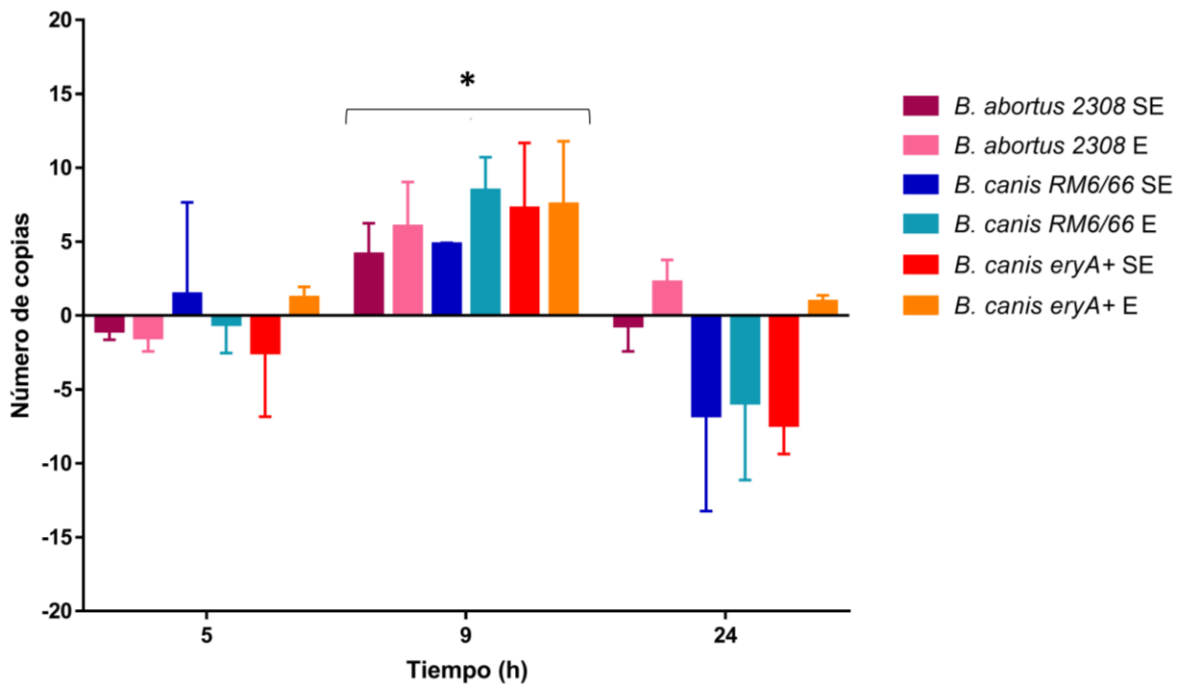


Figura 10. Cinética de la expresión del gen *eryA* por medio de RT-PCR en *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis* eryA+ con eritritol (E) y sin eritritol (SE). Para medir la expresión del mRNA de interés se utilizó el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_t$), se normalizó con el gen 16S rRNA como control de expresión endógeno. Los datos se expresaron como número de copias \pm DE, el experimento se realizó tres veces independientes y el análisis estadístico se hizo mediante un análisis factorial, * $p < 0.05$ representa diferencia significativa.

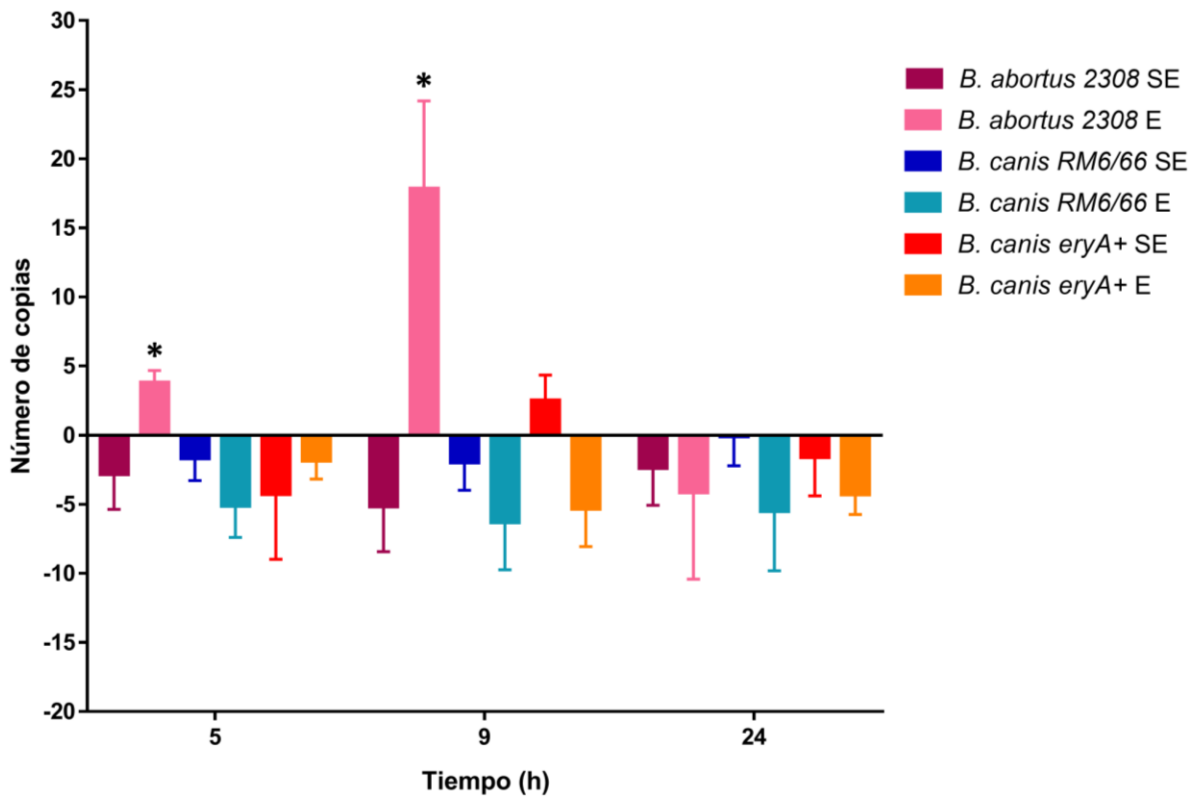


Figura 11. Cinética de la expresión del gen *eryD* por medio de RT-PCR en *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis* eryA+ con eritritol (E) y sin eritritol (SE). Para medir la expresión del mRNA de interés se utilizó el método de cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_t$), se normalizó con el gen 16S rRNA como control de expresión endógeno. Los datos se expresaron como número de copias \pm DE, el experimento se realizó tres veces independientes y el análisis estadístico se hizo mediante un análisis factorial, * $p < 0.05$ representa diferencia significativa.

6.6 Análisis *in silico* de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66

Se obtuvo la secuencia nucleotídica del operón *ery* de *B. abortus* 2308 del *GenBank* (U57100.2), el cual consta de 7,717 pb, ubicado en la cadena complementaria del cromosoma II; el gen *eryA* (BAB2_0372) es de un tamaño de 1,563 pb; la secuencia esta resaltada en color azul, y fue con la que se trabajó. La secuencia del operón completo, que está formado por los genes *eryA* (azul), *eryB* (rojo), *eryC* (verde) y *eryD* (morado) (Figura 12).

Grupo de genes para el catabolismo del eritritol de *Brucella abortus*, genes completos *eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*.

GenBank: U57100.2

```
GTGTCAGCCATGCGTGAAAAAGGTGACATCATCATCGGCATCGACGCGGGCACATCCGTGCTCAAGGCCGT
CGCTTTCGATTTTCAGCGGACGCCAGATCGAATCTGCCGCCGTTTCGCAACACATATGTCACTGGCGATCATG
GCGCCGTACACAAATCGCTTGCCCAAACATGGCAGGACTGCGCGCGCGCCTTGCGCGATCTTGGCGCCAAG
CTGCCGGGCCCTTGCCCAACGCACCCGCCGCGATTGCGGTCACCGGACAGGGCGACGGAACATGGCTTGTTCGG
CAAGGATAATCGCCCAGTAGGTGATGCCTGGATCTGGCTTGTATGCCCGCGCTGCCTCAACCGTGACACGGC
TTGCCCGAGGCCCGATGAACCGCGCGCGTTTTGAAGCGACCGGCACCGGGCTCAACACCTGCCAGCAGGGC
GCGCAGATGGCGCATATGGACACAATCGCGCCAGAGCTTCTGGACAATGCCGAAGCGGGCGCTCCATTGCAA
GGACTGGCTCTATCTCAATCTCACTGGCGTTTCGCGCCACCGATCCCTCGGAAGCAAGCTTACCTTCGGCA
ATTTCCGCACACGCCAGTATGATGATGTGGTCATCGAGGCGCTGGGGCTTCAGAAACGGCGCAATCTCCTT
CCTGAAATCATCGACGGGTGCGAGTCACAGCATCCGCTTTCTGCGGAAGCTGCGGCAGCGACCGGCCCTTCT
TGCCGGAACGCCGGTTCAGCCTCGGCATATGTCGATATGGCCATGACCGCGCTTGGCGCAGGCGTATGCGGGC
GCACGGCGGGGGCCGGATGCTCCACCATCGGTTGACCGGTTGTCATATGCGCGCCAAGCCGGTTGCCGAT
ATTATCTGAACAAGGAAGGCACAGGCTACGTATCGCGCTGCCCATTCGCCGCATCGTCACGCAGGTGCA
GACCAATATGGGCGCGACAATCAATATAGACTGGATATTGCAGGTGCGAGCCGACCTCATGTCCACGCCGG
AAAAGCCGGTTTCGCTTGGCGATCTCATTCCCCGCCTTGACGACTGGTTCAACGCCAGCCGTCTTGGCGCG
ATCCTCTATCACCTTATATTTTCGGAAGCTGGCGAGCGCGGCCCTTTGTGAATGCCAATGCGCGCGCCGG
TTTTATCGGCCTTTCCAGCCGCGACCGTTTTCCCGGAAGTGGTGCCTCGGTGCTGGAGGGCTTCGGCATGG
CAACGCGCGATTGCTACGCCGCCATGGGGGAAATGCCCGCCGAAGTGCATCACCGGTGGTGTGCGCGC
TCGAAGGCGCTGCGCGGCACGCTTTTCGGCGGGTCAATGCGCCGGTGCAGCTTTTCGGCCCGGAGGAAGC
GGGCGCTGCCGGTGCCTGATGATGGCGGGTGGCTATCGGCGCTTATCCGGCCATGGATGATTGCATTG
CCGAATGGGTGGAGCCGCTTTTGGGCGCAAGCGAAGCCCCGGATGCGGGCGGGGCGACCAATATGAAGAA
CTTTTCGTTGCCATCGGGGAAGCGCGGCTGGCTCTTGCGCCAGTCTGGGACAAACTCGCTTCCGGCAAATA
AGGAAACATTTGAAATGGCTGAACCGGAAACCTGCGACCTGTTTGTAAATGGCGGGCGGCATCAACGGTGGCG
GCGTGGCCCGCGACGCGGGCCGGGCGCGGCTCAAGGTGGTGTGGCAGAAAAGGACGATCTGGCGCAAGGC
ACATCATCGGCTTCCGGCAAGCTGGTGCATGGCGGTTTTGCGCTATCTCGAATATTATGAGTTCCGCCTTGT
GCGCGAAGCGCTGATCGAGCGCGAAGTGTCTTTGAATGCGGCACCCCATATCATCTGGCCGATGCGCTTCG
TGCTGCCCGCACAGCCCGCAGATACGCCCGGCTGGCTGGTGCAGCTTGGCCTGTTTCTCTATGACCATCTG
GGCGGGCGCAAAAAACTTCCCGGCACGCGTACGCTCGATCTGAAGCGCGACCCGGAAGGCACGCCGATCCT
CGACCAGTACACCAAGGGTTTTGAATATTCCGATTGCTGGGTGGACGATGCGCGCCTCGTGGCGCTCAATG
```

```

CGGTGGGTGCCCGCCGAAAAGGCTCGACCATTCTCACCCGTACACCGGTTCGTCTCCGCACGCCGCGAAAAT
GGCGGCTGGATCGTGGAAACCAGAAACAGCGATACCGGGCGAAACCCGCACCTTCCGCGCCCGCTGCATCGT
CAATTGCGCCGGACCATGGGTACGGACGTATCCACAATGTCGCTGCCTCCACCTCGTCGCGCAATGTGC
GCCTCGTCAAGGGCAGCCACATCATCGTTCCGAAATTCTGGTTCGGGCGCAAACGCCTATCTCGTTTCAAGAC
CACGACAAGCGCGTGATCTTCATCAATCCATATGAAGGTGACAAGGCGCTGATCGGCACCACCGACATTGC
CTATGAAGGCCGGGCGGAAGACGTTGCGGGCGGATGAGAAGGAAAATCGACTATCTCATCACCGCGGTAAACC
GCTATTTCAAGGAAAAGCTCCGGCGCGAAGACGTGCTGCACCTCTTCTCCGGCGTGCGCCCGCTGTTTGC
GACGGCAAGGGCAATCCTTCCGCCGTACCCCGGATTACGTGTTTCGATCTGGACGAAACCGGGCGGTGCACC
GCTGCTCAACGCTCTTGGCGGCAAGATCACCACCTTCCGCGAACTGGCGGAGCGCGGGATGCATCGGCTCA
AGCACATTTTCCCGCAAATGGGCGGCGACTGGACCCACGACGCGCCGCTGCCCGGGCGGAGATTGCCAAT
GCCGATTATGAAACCTTCGCCAATACCTTACGCGACACCTATCCATGGATGCCGCGCACACTCGTTCATCA
TTATGGACGGCTCTATGGTGCGCGCACAAAGGATGTGGTGGCTGGCGCGCAGAACCTCGAAGGGCTTGCC
GTCACTTCGGCGGCGATTTCATGAGGCGGAAGTGCCTATCTGGTGGCCAGAGAATGGGCAAAGACGGCA
GAAGACATTCCTATCGCCCGACCAAGCATTACCTGCATTTGACCGAAGCCGACGCGCCGCTTTCGTGGA
ATGGTTCGACAACGCCAATCTAGTTGCTTGAAGGACGATATGGCCCTGACGCTTTCGCTCAACACCAATCCG
CTGGTCAACCGCTTTCGCCGAGCCGGACGACCTGATCGAAACGGTTGCCCGGACCTGCGCCTGCGTGACCT
CCAGCTTACCCATGAGTTTATCAATCCAAGCTGGCAGGCCTCGACCATCCGCCGCCCTCACCCGCGACATGG
ACAGGGCCTTGCAGCGCACCGGTGTCCGCGTCACCTCCGGCATGACCGGCCCTATGGCCGCCCTCAACCAT
TTTGGCCATCCCAGCCGGGACGTGCGCCGCTATTATGTGGACTGGTTCAAGACCTTTCGCCGATATTATCGC
GGATCTTGGCGGCAAGTCCGTCCGTACGCAGTTTGAATCTTACCTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGC
GCCGCGAAGAACTTATCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAGGTGCGGGC
CTCGACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGGAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATGCATGAA
GCTTCAGGATCGGCTCACCGCCGCTAACATGGCGATCCCATGTGGATGATGGCCGATATCGACCATGGTG
ACGTGACATCCGCTAACCCGGACGACTACGATCCTTACGCATGGGCCCGCACCGTGGCGAAAGTCTCGCCC
ATCATCCATATCAAGCAAAGCCTGATGGACAAGGGCGGGCATCGTCTTTTACAGCCGCGTTCAATGCCAA
GGGCCGATCCAGCCGGAACCGCTTTTGAAGCCTTTTCGCCGACGGCGCGGTGGATAATGAAATCTGTCTTG
AATTTTCGTTCAAGGAGCGCGAGCCGAACGACCGTGAAGTCATTCACAGATTGCAGAAAGTGTGGCTTTC
TGGGCGCCGCACATTGACACCGGCGCTAAGGACTTGAAGATATAGGAAATTTCCAGAACCAGGACCGCGTTC
AATGGCAGATGCAGACGATTCCTGCGGCTTCGCGCCGCCCTGGCTTCATTTTCGTCGCGCGCATGACTCAGT
CTGCCGTTGCCAAGCGCCTTGGCCTGCCTTCGGTGAAGCGCATCGTCTCATCGCCAAGGCCGTTGCCGAC
GGCGCGTGAAAGTGACCATCGACGGTGACATCACCGAATGCATCGATCTGAAAACCGTCTGGCCGATCT
TTACGGCTCGATTATTGCGAGGTGCGACCCGATATTGGCGAGGAAGGCCGTCGCTGATGGCGCTTGCC
ATGCGGGCGCGAATTTTCATGCGCCGCGAAATCGAACATGGCGATCATGAGGTCATCGGCATCGGCCATGGC
CGCACACTTTCGGCAGCGGTTGGTTATATGCCGCGTGTGATGGCCAATGATCTGCGTTTTTCGCTCTCGCTTCT
GGGCGGCCCTCACGCGCAATTTTTCGCCCAACCCGATGACGTGATGCACCGCATCGCGGAAAAAACCGGAA
TGCCCGCTTATGTGATGCCGGTGCCTTCTTCGCCAATACGGCGGAAGACCGCGAAGTGTGCTGGCCAA
CGCGGTGTACCACGGTTTTTCGACATGGGTTGCCGTGCGGAACTGAAGATCGTCGGCATTTGGAACGGTCGA
TGCGCAGGCGCAGCTTGTACATCCGGCATGATAGAATTTGGCGAAGTGAAGAGATCGCCAACCTCGGGC
GCGTCGGCGAAATGCTCGGCCATTTCTTCAATGCCAATGGCCAATGGCTGGAAACCGCGCTGACGGGCCG
ACCATCGCGGCTTCCGTGGAAAACGCCGATATGAGCCGTATCGTGGCGCTTGCAGGCGGTCTTTCCAAGGT
GGACGCCATTCGCGCCGTGCTGAAAAGCGGGCGTCTTTACGGCCTCATCACCGACGAACGGACAGCAAAGG
CCCTTATCGGCCAGCCGAATGGAAAATAA

```

Figura 12. Secuencia de nucleótidos del operón *ery* de *B. abortus* 2308. El gen *eryA* (azul); el gen *eryB* (rojo); el gen *eryC* (verde); el gen *eryD* (morado) y en negro se muestran las regiones no codificantes. Secuencia obtenida de *GenBank*.

La secuencia nucleotídica del operón *ery* de *B. canis* RM6/66 se encuentra en la cadena complementaria del cromosoma II (CP000873.1), el pseudogen *eryA* (BCAN_B0882) de un tamaño de 1,562 pb. La **Figura 13** muestra la secuencia del operón completo, que está formada por los genes *eryA* (azul), *eryB* (rojo), *eryC* (verde) y *eryD* (morado).

Grupo de genes para el catabolismo del eritritol de *Brucella canis* ATCC 23365, genes completos *eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*.

GenBank: CP000873.1

```

GTGTCAGCCATGCGTGAAAAAGGTGACATCATCATCGGCATCGACGCGGGCACATCCGTGCTCAAGGCCGT
CGCTTTTCGATTTTCAGCGGACGCCAGATCGAATCTGCCGCCGTTTCGCAACACATATGTCACCTGGCGATCATG
GCGCCGTCACACAATCGCTTGCCCAAACATGGCAGGACTGCGCGCGCGCCTTGCGCGATCTTGGCGCCAAG
CTGCCGGGCTTGCCCAACGCACCGCCGCGATTGCCGGTACCAGGACAGGGCGACGGAACATGGCTTGTTCGG
CAAGGATAATCGCCCGGTAGGTGATGCCCTGGATCTGGCTTGATGCCCGCGCTGCCTCAACCGTGACACGGC
TTGCCGCAGGCCCGATGAACCGCGCGCGTTTTGAAGCGACCGGCCACCGGGCTCAACACCTGCCAGCAGGGC
GCGCAGATGGCGCATATGGACACAATCGCGCCAGAGCTTCTGGACAATGCCGAAGCGGCGCTCCATTGCAA
GGACTGGCTCTATCTCAATCTCACTGGCGTTTCGCGCCACCGATCCCTCGGAAGCAAGCTTCCACTTCGGCA
ATTTCCGCACACGCCAGTATGATGATGTGGTTCATCAAGGCGCTGGGGCTTCAGAAACGGCGCAATCTCCTT
CCCGAAATCATCGACGGGTGCGAGTCACAGCATCCGCTTTCTGCGGAAGCTGCGGCAGCGACCGGCTTCT
TGCCGGAACGCCGGTTCAGCCTCGGCTATGTCGATATGGCCATGACCGCGCTTGGCGCAGGCGTATGCGGGC
GCACGGCGGGGGCCGGATGCTCCACCATCGGTTTCGACCGGTGTGCATATGCGCGCAAGCCGGTTGCCGAT
ATTCATCTGAACAAGGAAGGCACAGGCTACGTATCGCGCTGCCATTCGCCGGCATCGTCACGCAGGTGCA
GACCAATATGGGCGCGACAATCAATATAGACTGGATATTCAGGTGCGAGCCGACCTCATGTCCACGCCGG
AAAAGCCGGTTTTCGCTTGGCGATCTCATTCCCCGCTTGACGACTGGTTCAACGCCAGCCGCTCTGGCGCG
ATCCTCTATCACCCTTATATTTTCGGAAGCTGGCGAGCGCGGCCCTTTGTGAATGCCAATGCGCGCGCCGG
TTTCATCGGCCTTTCCAGCCGCGACCGTTTTCCCGGAAGCTGGTGCCTCGGTCGTGGAGGGCTTCGGCATGG
CAACGCGCGATTGCTACGCGCCATGGGGGAAATGCCCGCCGAAC'TGCGCATCACCGGTGGTGC'TGCGCGC
TCGAAGGCGCTGCGCGGCACGCTTTCCGGCGCGGTCAATGCGCCGGTGC'CGCTTTCCGGCCCGGAGGAAGC
GGGCGCTGCCGGTGC'CGCTATGATGGCGCGGTGGCTATCGGCGCTTATCCGGCCATGGATGATTGCATTC
CGAATGGGTGGAGCCGCTTTTGGGCGCAAGCGAAGCCCCGGATGCGGCGCGGGCGCACCAATATGAAGAAC
TTTTCGTTGCCTATCGGGAAGCGCGGCTGGCTCTTGCGCCAGTCTGGGACAAACTCGCTTCCGGCAAATAA
GGAACATTGAAATGGCTGAACCGGAAACCTGCGACCTGTTTGTAAATGGCGGCGGCATCAACGGTGC'GGC
GTGGCCCGCGACCGCGCCGGCGCGGCTCAAGGTGGTGC'TGGCAGAAAAGGACGATCTGGCGCAAGGCAC
ATCATCGCGCTCCGGCAAGCTGGTGCATGGCGGTTTTGCGCTATCTCGAATATTATGAGTTC'CGCCTTGTGC
GCGAAGCGCTGATCGAGCGCGAAGTGC'TTTCGAATGCGGCACCCCATATCATCTGGCCGATGCGCTTCGTG
CTGCCGCACAGCCCGCAGGATCGCCCGGCTGGCTGGTGC'GGCTTGGCCTGTTTCTCTATGACCATCTGGG
CGGGCGCAAAAAACTTCCCGGCACGCGTACGCTCGATCTGAAGCGCGACCCGGAAGGCACGCCGATCCTCG
ACCAGTACACCAAGGGTTTTGAATATTCCGATTGCTGGGTGGACGATGCGCGCCTCGTGGCGCTCAATGCG
GTGGGTGCCGCCGAAAAGGGCGCGACCATTTCTACCCGTACACCGGTGCTCTCCGCACGCCGCGAAAATGG
CGGCTGGATCGTGGAAACCAGAAACAGCGATACCGGCGAAACCCGCACCTTCCGCGCCCGCTGCATCGTCA
ATTGCGCCGGACCATGGGTACGGACGTATCCACAATGTCGCTGCCTCCACCTCGTCGCGCAATGTGCGC
CTCGTCAAGGGCAGCCACATCATCGTTCCGAAATTTCTGGTTCGGGCGCAAACGCCTATCTCGTTTCAGAACCA

```

CGACAAGCGCGTGATCTTCATCAATCCATATGAAGGTGACAAGGCGCTGATCGGCACCACCGACATTGCCT
 ATGAAGGCCGGGCGGAAGACGTTGCGGCGGATGAGAAGGAAATCGACTATCTCATCACCGCGGTAAACCGC
 TATTTCAAGGAAAAGCTCCGGCGCGAAGACGTGCTGCACTCCTTCTCCGGCGTGCGCCCGCTGTTTTGACGA
 CGGCAAGGGCAATCCTTCCGCCGTACCCCGGATTACGTGTTGATCTGGACGAAACCGGCGGTGCACCGC
 TGCTCAACGTCTTTGGCGGCAAGATCACCACCTTCCGCGAACTGGCGGAGCGCGGGATGCATCGGCTCAAG
 CACATTTTCCCGCAAATGGGCGGCGACTGGACCCACGACGCGCCGCTGCCCGGCGGCGAGATTGCCAATGC
 CGATTATGAAACCTTCGCCAATACCTTACGCGACATCTATCCATGGATGCCGCGCACACTCGTTCATCATT
 ATGGACGGCTCTATGGTGCGCGCACAAAGGATGTGGTGGCTGGCGCGCAGAACCCTCGAAGGGCTTGGCTGT
 CACTTCGGCGGCGATTTCCATGAGGCGGAAGTGCCTATCTGGTGGCCAGAGAATGGGCAAAGACGGCAGA
 AGACATTCTCTATCGCCGCACCAAGCATTACCTGCATTTGACCGAAGCCGAACGCGCCGCTTTTCGTGGAAT
 GGTTCGACAACGCCAATCTAGTTGCTTGA^{GGACGAT}ATGGCCCTGACGCTTTTCGCTCAACACCAATCCGCT
 GGTCAACCGCTTTGCCGAGCCGGACGACCTGATCGAAACGGTTGCCCGGACCTGCGCTGCGTACCTCC
 AGCTTACCCATGAGTTTCATCAATCCAAGCTGGCAGGCCCTGACCATCCGCCGCTCACCCGCGACATGGAC
 AGGGCTTGCAGCGCACCCGGTGTCCGCGTCACTCCGGCATGACCGGCCCTATGGCCGCTTCAACCATTT
 TGGCCATCCCGACCGGGACGTGCGCCGCTATTATGTGGACTGGTTCAAGACCTTTGCCGATATTATCGGCG
 ATCTTGGCGGCAAGTCCGTCCGTACGCAGTTTGAATCTTACCCTATAAGGATTTTCGATGATCCGGCGCGC
 CGCGAAGAACTTATCAAGATCGCCATCGACTGCTGGGCCGAGGTGGCCGAACATGCGGCAGGTGCGGGCCT
 CGACTATGTGTTCTGGGAGCCGATGAGCATCGGGCGCGAATTTGGCGAGACGATTGCCGAATGCATGAAGC
 TTCAGGATCGGCTCACCGCCGTAACATGGCGATCCCCATGTGGATGATGGCCGATATCGACCATGGTGC
 GTGACATCCGCTAACCCGGACGACTACGATCCTTACGCATGGGCCCGCACCCGTGCCGAAAGTCTCGCCAT
 CATCCATATCAAGCAAAGCCTGATGGACAAGGGCGGGCATCGTCTTTTACAGCCGCGTTCAATGCCAAGG
 GCCGCATCCAGCCGGAACCGCTTTTGAAGCCTTTGCCGAAGGCGGCGGGTGGATAATGAAATCTGCCTT
 GAACTTTTCGTTCAAGGAGCGCGAGCCGAACGACCGTGAAGTCATTCCACAGATTGCAGAAAGTGTGGCTTT
 CTGGGCGCCGCACATTGACACCGGCGCTAAGGACTTGAAGATATAG^{GAAATTTCCAGA}ACCGGACCGCGTT
 CAATGGCAGATGCAGACGATTCTCTGGCGCTTCGCGCCGCTGGCTTCATTTTCGTCGCCGGCATGACTCAG
 TCTGCCGTTGCCAAGCGCCTTGGCCTGCCCTCCGTTGAAGGCGCATCGTCTCATCGCCAAGGCCGTTGCCGA
 CGGCGCGGTGAAAGTGACCATCGACGGTGCATCACCGAATGCATCGATCTGGAAAACCGTCTGGCCGATC
 TTTACGGCCTCGATTATTGCGAGGTGCGACCCGATATTGGCGAGGAAGGCCGTCGCTGATGGCGCTTGGC
 CATGCGGGCTCGAATTTTCATGCGCCGCGAAATCGAACATGGCGATCATGAGGTATCGGCATCGGCCATGG
 CCGCACACTTTCCGGCAGCGGTTGGTTATATGCCGCGTGTATGGCCAATGATCTGCGTTTCGTTCTCGCTGC
 TGGCCGGCCTCACGCGCAATTTTCCCGCCAACCCGCATGACGTGATGCACCGCATCGCGGAAAAAACCGGA
 ATGCCCGCTTATGTGATGCCGGTGCCTTCTTCCGCAATACGGCGGAAGACCGGAAAGTGTGTTGCCCA
 ACGCGGTGTCACCACGTTTTTCGACATGGGTTGCCGTGCGGAACTGAAGATCGTCGGCATTGGAACGGTGC
 ATGCGCAGGCGCAGCTTGTACATCCGGCATGATAGAACTTGGCGAAGTGAAGAGATCGCCAACCTCGGC
 GCGTTCGGCGAAATGCTCGGCCATTTCTTCAATGCCAATGGCCAATGGCTGGAAACCGCGTGCAGGGCCG
 CACCATCGCGGCTTCCGTGGAAAACGCCGATATGAGCCGATCGTGGCGCTTGCAGGCGGTCTTTCCAAGG
 TGGACGCCATTGCGCCGCTGCTGAAAAGCGGGCTTTTACGGCCTCATCACCGACGAACGGACAGCAAAG
 GCCCTTATCGGCCAGCCGAATGGAAAATAA

Figura 13. Secuencia de nucleótidos del operón *ery* de *B. canis* RM6/66. El gen *eryA* (azul); el gen *eryB* (rojo); el gen *eryC* (verde); el gen *eryD* (morado) y en negro se muestran las regiones no codificantes. Secuencia obtenida de *GenBank*.

La secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de *B. abortus* 2308 (AAD11519.2) de 520 aminoácidos, se obtuvo del *GenBank* (**Figura 14**), mientras que la secuencia de *B. canis* RM6/66 no está disponible en y se denota como un pseudogen.

```

/product="erythritol kinase"
/protein_id="AAD11519.2"
/translation="MSAMREKGDIIIGIDAGTSVLKAVAFDFSGRQIESAAVRNTYVT
GDHGAVTQSLAQTWQDCARALRDLGAKLPGLAQRRTAAIAVTTGGDGTWLVGKDNRPVG
DAWIWLDARAASVTRLAAGPMNRARFEATGTGLNTCQQGAQMAHMDTIAPELLDNEAE
AALHCKDWLYLNLTGVRATDPSEASFTFGNFRTRQYDDVVIEALGLQKRRNLLPEIID
GSQSQHPLSAEAAAATGLLAGTPVSLGYVDMAMTALGAGVCGGTAGAGCSTIGSTGVH
MRAKPVADIHLNKEGTGYVIALPIPGIVTQVQTNMGATINIDWILQVAADLMSTPEKP
VSLGDLIPRLDDWFNARPGAILYHPYISEAGERGPFVNANARAGFIGLSSRDRFPEL
VRSVVEGLGMATRDCYAAMGEMPAELRITGGAARSKALRGTLSAAVNAPVRSAREEA
GAAGAAMMAAVAIGAYPAMDDCIAEWVEPLLGASEAPDAARAHQYEELFVAYREARLA
LAPVWDKLASGK"

```

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de la proteína putativa eritritol cinasa EryA de *B. abortus* 2308. Secuencia obtenida de *GenBank*.

Con el servidor *ExpASY Translate Tool* se realizó la traducción de la secuencia de nucleótidos reportada en el *GenBank* de *B. canis* RM6/66. Se obtuvieron seis posibles secuencias de aminoácidos, mismos que se alinearon con la secuencia de la proteína putativa de *B. abortus* 2308, se seleccionó la secuencia de mayor identidad, por lo que la traducción de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66 seleccionada es de 517 aminoácidos (**Figura 15**).

```

-5'3' Frame 1
VSAMREKGDIIIGIDAGTSVLKAVAFDFSGRQIESAAVRNTYVTGDHGAVTQSLAQTWQDCARALRDLGAKLPGLAQRRTAAIAVTTGGDGTWLVGKDNRPVGDAWI
WLDARAASVTRLAAGPMNRARFEATGTGLNTCQQGAQMAHMDTIAPELLDNEAEALHCKDWLYLNLTGVRATDPSEASFTFGNFRTRQYDDVVIEALGLQKRRNLL
LPEIIDGSQSQHPLSAEAAAATGLLAGTPVSLGYVDMAMTALGAGVCGGTAGAGCSTIGSTGVHMRAKPVADIHLNKEGTGYVIALPIPGIVTQVQTNMGATINID
WILQVAADLMSTPEKPVSLGDLIPRLDDWFNARPGAILYHPYISEAGERGPFVNANARAGFIGLSSRDRFPELVRSVVEGLGMATRDCYAAMGEMPAELRITGGA
ARSKALRGTLSAAVNAPVRSAREEAGAGAAMMAAVAIGAYPAMDDCIAEWVEPLLGASEAPDAARAHQYEELFVAYREARLA

```

Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de *B. canis* RM6/66 propuesta con el servidor *ExpASY Translate Tool*.

La compatibilidad de características descritas para la eritritol cinasa EryA de *B. abortus* 2308 con la secuencia propuesta con *ExPASy Translate Tool* para *B. canis* RM6/66, se comparó y según la predicción su localización subcelular con el servidor CELLO v.2.5. se trata de una proteína citoplásmica para ambas cepas.

El modelamiento de la proteína se realizó con el servidor *Phyre2*, en el **Cuadro 10** se muestran los primeros 15 resultados del modelamiento por homología, entre los que se destacan proteínas descritas como cinasas, xilulocinasa y ribulocinasa en otros géneros bacterianos, debido al alto porcentaje de identidad que corresponde a la coincidencia en los residuos de aminoácidos entre las secuencias de *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66.

En la **Figura 16** se observa la predicción de la conformación secundaria de la proteína modelada; se observa que hay regiones con alfa hélices en un 39% sobre la beta plegada con un 21%; además, posee un 9% de dominios compatibles a hélices transmembranales y el 8% de la estructura se consideró en desorden, lo que significa que esas secuencias aún no han sido reportadas.

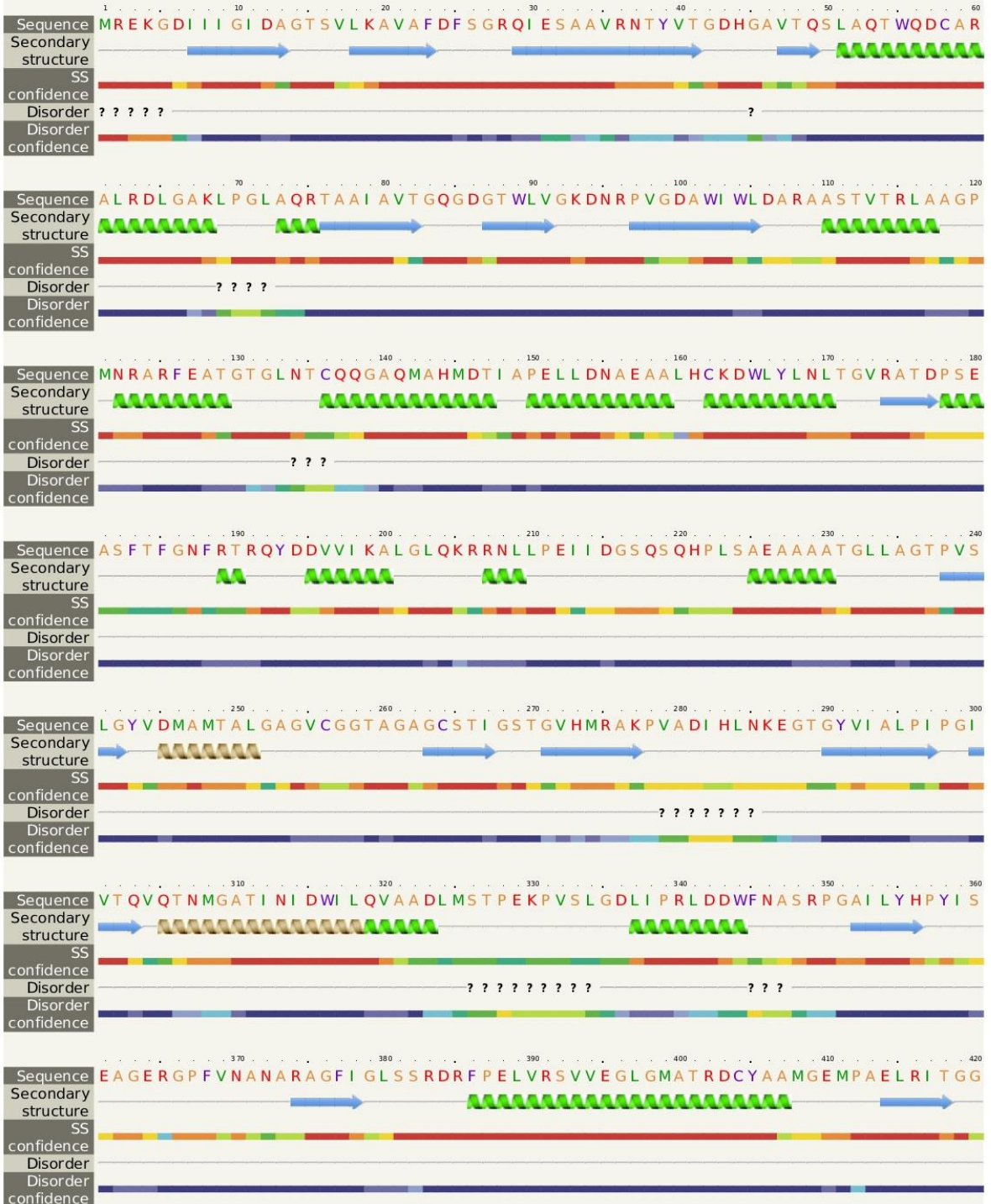
Cuadro 10. Dominios homólogos conservados encontrados en la proteína putativa eritritol cinasa EryA de *B. canis* RM6/66. Obtenido mediante el servidor *Phyre2*.

Rango	Acceso	Molécula y bacteria procedente	%Confidencia/ %Identidad
1	c3gbtA_	Gluconato cinasa de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	100/22
2	c3hz6A_	Xilulocinasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>	100/22
3	c2d4wA_	Glicerol cinasa de <i>Cellulomonas</i> sp.2 nt3060	100/21
4	c3flcX_	Glicerol cinasa de <i>Enterococcus casseliflavus</i>	100/19
5	c5vm1A_	Xilulocinasa de <i>Brucella ovis</i>	100/24
6	c2zf5O_	Glicerol cinasa de <i>Hyperthermophilic archaeon</i>	100/22
7	c3ifrB_	Carbohidrato cinasa FGGY de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	100/23
8	c3jvpA_	Ribulocinasa de <i>Bacillus halodurans</i>	100/20
9	c3g25B_	Glicerol cinasa de <i>Staphylococcus aureus</i>	100/21
10	c3gg4B_	Glicerol cinasa de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	100/19
11	c6udeB_	Glicerol cinasa de <i>Elizabethkingia anophelis</i>	100/21
12	c3wxiB_	Glicerol cinasa de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	100/20
13	c2w40C_	Glicerol cinasa putativa de <i>Plasmodium falciparum</i>	100/21
14	c2nlxA_	Xilulosa cinasa de <i>Escherichia coli</i>	100/26
15	c2dpnB_	Glicerol cinasa de <i>Thermus thermophilus</i> hb8	100/25

Phyre2

Email: blablabla_1590@hotmail.com
Description: eryABcRM_
Date: Fri Nov 22 02:29:09 GMT 2019
Unique Job ID: ee2b896080be0e90

Secondary structure and disorder prediction



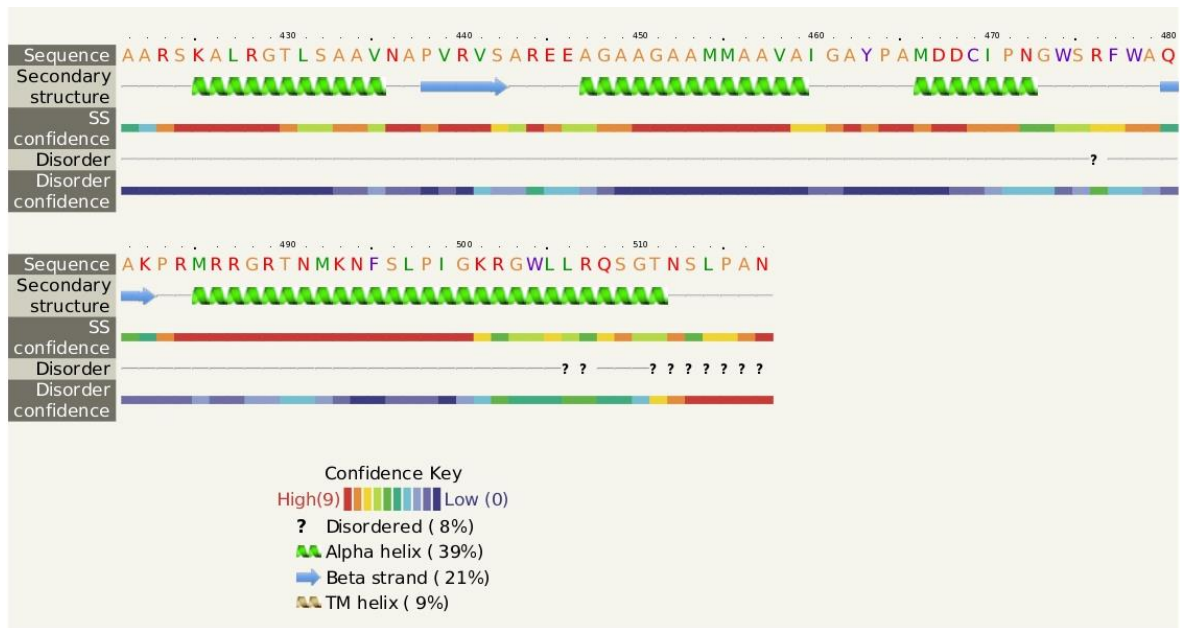


Figura 16. Diagrama de la estructura secundaria de los aminoácidos de la proteína putativa eritritol cinasa EryA de *B. canis* RM6/66. Modelo obtenido mediante el servidor *Phyre2*.

A partir de los modelos estructurales de las proteínas de las cepas *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308 generados en formato PDB mediante el software *ChimeraX* (versión 0.91), se realizó la comparación mediante superposición para detectar los cambios estructurales, esa comparación se contrapuso con en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos realizadas con el *Dali Protein Structure Comparison Server*. El alineamiento marca como DSSP la definición de la estructura secundaria en tres estados donde H es hélice, E es lámina y L es bucle; los residuos estructuralmente no equivalentes (por ejemplo, los bucles) están en minúsculas y la identidad de los aminoácidos está indicada con barras verticales.

En el alineamiento local se observaron diferencias en la secuencia de aminoácidos de EryA de *B. canis* RM6/66 con respecto a *B. abortus* 2308; en las posiciones 64 a la 69, de la 176 al 181 y de la 321 al 331; también se observaron *gaps* ocasionando que se recorra el alineamiento. En el aminoácido 195, *B. abortus* 2308 tiene ácido glutámico (aminoácido ácido), mientras que en *B. canis* RM6/66 se sustituye por lisina (aminoácido básico) (Glu195Lys). Y en la parte terminal de la proteína, a partir del aminoácido 459 se observaron *gaps*, falta de identidad, baja similitud y sustitución de la mayoría de los aminoácidos. Por último, la estructura de la proteína de *B. abortus* 2308 está constituida por 509 aminoácidos y la estructura que proponemos para *B. canis* RM6/66 por 502 aminoácidos (**Figura 17**).


```

DSSP LEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLLLLLLLLEELHHHHHHHHHHHHH
B. abortus 2308 Query DIIIGIDAGTSLKAVAFDFSGRQIESAAVRNTYVTGDHGAVTQSLAQTWQDCARALRDL 60
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct DIIIGIDAGTSLKAVAFDFSGRQIESAAVRNTYVTGDHGAVTQSLAQTWQDCARALRDL 60
DSSP LEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLLLEEEEEEEELLLLLLLLLLLEELHHHHHHHHHHHHH

                        64-69 aa
DSSP HHHhHHLL-LEEEEEEEELLLLLLEEEELLLLLLLLLLEELLLLLLHHHHHHHHHHLLHHH
B. abortus 2308 Query GAKLPGLA-QRTAAIAVTTGGDGTWLVGKDNRVPVGDAMIWLDARAASVTRLAAGPMNRA 119
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct GAK-LPGLaQRTAAIAVTTGGDGTWLVGKDNRVPVGDAMIWLDARAASVTRLAAGPMNRA 119
DSSP HHH-LHHH1LEEEEEEEELLLLLLLLLLLLLLLLLLEELLLLLLHHHHHHHHHHLLHHH

                                                                    176-181 aa
DSSP HHHHLLLLLLLLHHHHHHHHHHLHHHHHLLLEELHHHHHHHHHLLLEELLLhHHL
B. abortus 2308 Query RFEATGTGLNLTQQGAQMAHMDTIAPELLDNAEALHCKDWLYLNLGTGRATDPSEASF 179
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct RFEATGTGLNLTQQGAQMAHMDTIAPELLDNAEALHCKDWLYLNLGTGRATDPSE-ASF 178
DSSP HHHHLLLLLLLLHHHHHHHHHHLHHHHHLLLLLLHHHHHHHHHLLLEELLL-LLL

                        195 aa
DSSP L-LLLLLLLHHHHHHLHLLLLLLLLLEELLLLLEELLLHHHHHHLHLLLLLEELLE
B. abortus 2308 Query F-GNFRTROYDDVVIKALGLQKRRNLLPEIIDGSQSHPHLSAEAAAAATGLLAGTVPVSLGY 238
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct TfGNFRTROYDDVVIKALGLQKRRNLLPEIIDGSQSHPHLSAEAAAAATGLLAGTVPVSLGY 238
DSSP LlLLLLLLLHHHHHHLHLLLLLLLLLEELLLLLEELLLHHHHHHLHLLLLLEELLE

                                                                    321-331 aa
DSSP EEEEELHHHHHHHHHHHLhHHHHH-h1hhHHHHHHHHHLLHLLLEEEELLLL
B. abortus 2308 Query VQTNMGATINIDWILQVAADLMS-TPEKp-vs1gDLIPRLDDWFNASRPGAILYHPYISEA 357
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct VQTNMGATINIDWILQVAADLMS-TPEKp-vs1gDLIPRLDDWFNASRPGAILYHPYISEA 357
DSSP EEEEELHHHHHHHHHHHL-HHHHhh111LLLLHHHHHHHLLHLLLEEEELLLL

DSSP LLLLLLLLLLEEEELLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHLLLEEEELHHH
B. abortus 2308 Query GERGFVFNANARAGFIGLSRDRPELVRSVVEGLGMATRDCYAAAGEMPaelrITGGAA 417
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct GERGFVFNANARAGFIGLSRDRPELVRSVVEGLGMATRDCYAAAGEMPaelrITGGAA 417
DSSP LLLLLLLLLLEEEELLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHLLLEEEELHHH

DSSP LLHHHHHHHHHLLLEELLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHLLHLL- -HHHHLLL111LLL
B. abortus 2308 Query RSKALRGTLAAVNAPVRVSAREEAGAAGAMMAAVALIGAYPA- -MDDCIAEWVep1LGA 475
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct RSKALRGTLAAVNAPVRVSAREEAGAAGAMMAAVALIGAYPAmDCIPNGWSR- -FWA 474
DSSP LLHHHHHHHHHLLLEEEELLLLLLHHHHHHHHHHHHHHHLLHLL111LHHHLL- - -EE

DSSP EELLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHhHHhh1
B. abortus 2308 Query SEAPDAARAHQYEEELFVAYREARLALAPvwdkla 509 459-509 aa
                ident | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
B. canis RM6/66 Sbjct QAKPRMRGRRTNMKNFSLPIGKRWLLR- - - - - 502 459-502 aa
DSSP EELLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLL- - - - -

```

Figura 17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína putativa EryA de *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66 realizada con el *Dali Protein Structure Comparison Server*.

En los recuadros rojos se señala las diferencias y la posición donde se encuentra.

En cuanto a la superposición de las estructuras terciarias se observó que las diferencias señaladas en el alineamiento previo coinciden con los cambios de las estructuras terciarias de ambas proteínas, se identificaron sitios donde había diferencias en su estructura (**Figura 18**), mismas que se describen a continuación.



Figura 18. Superposición de las estructuras terciarias de la cinasa EryA. En blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa *B. canis* RM6/66. Modelo obtenido mediante el software ChimeraX.

Del aminoácido 64 al 69 se ubicaron dos *gaps* que generan cambios en la disposición que no alteró el patrón de la estructura secundaria (**Figura 19**).



Figura 19. Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 64 al 69. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha azul señala el aminoácido 64 y la flecha amarilla señala el aminoácido 69.

Modelo obtenido mediante el *software ChimeraX*.

Del aminoácido 176 al 181 hubo dos *gaps*, generando que el patrón de la estructura de *B. canis* RM6/66 presentara una α hélice continua, mientras que *B. abortus* 2308 mostró una lámina β ; este cambio estructural se presentó a pesar de que la secuencia de aminoácidos es la misma (**Figura 20**).

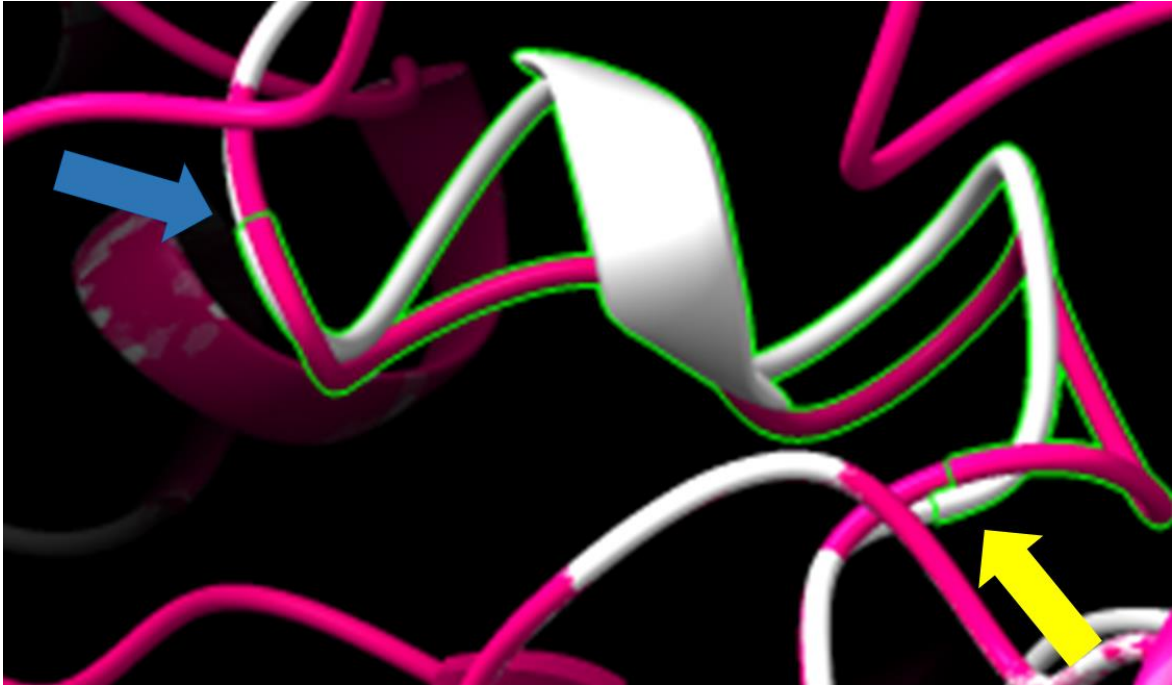


Figura 20. Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 176 al 181. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha azul señala el aminoácido 176 y la flecha amarilla señala el aminoácido 181.

Modelo obtenido mediante el software *ChimeraX*.

En el aminoácido 195 donde se ubicó una sustitución ya que *B. abortus* 2308 tiene ácido glutámico, mientras que en *B. canis* RM6/66 tiene una lisina; se detectó que a pesar de que son aminoácidos con características diferentes, el patrón de la estructura terciaria no se vio afectado y esta se mantuvo igual en ambas cepas (**Figura 21**).

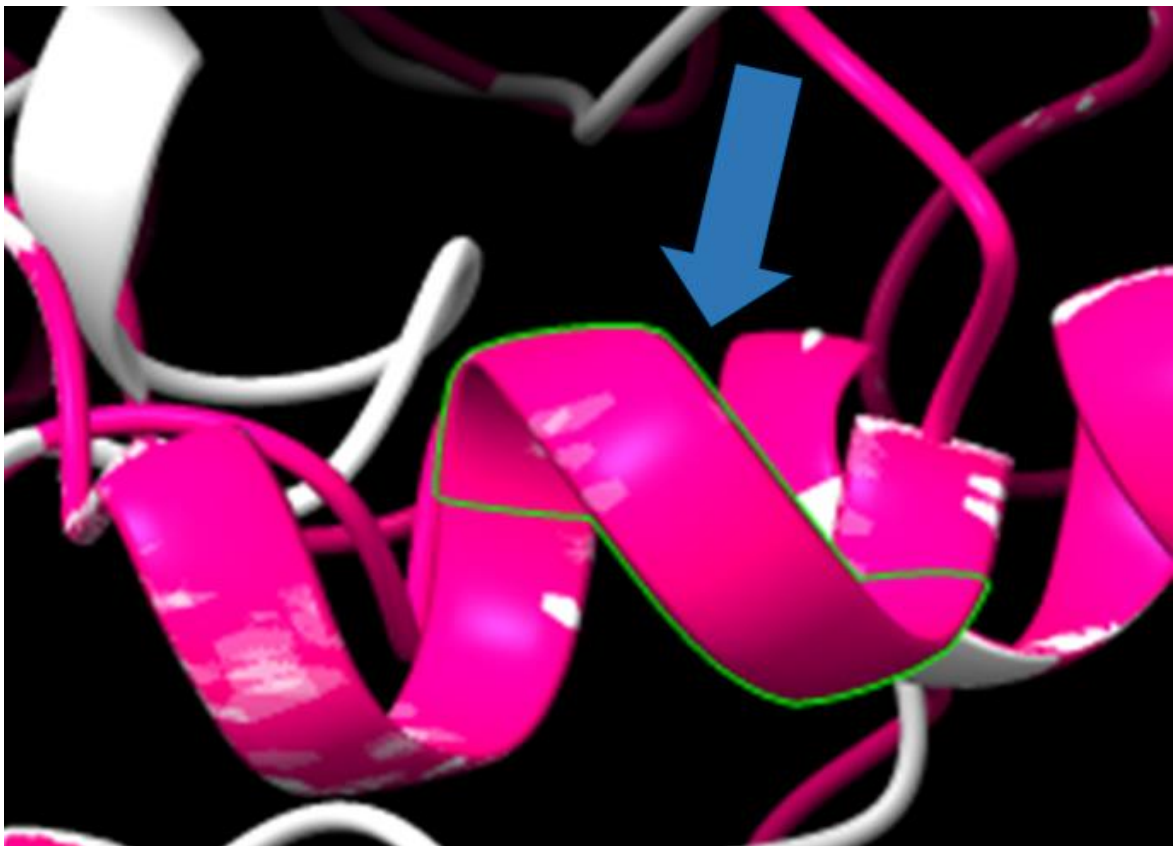


Figura 21. Visualización del aminoácido 195 de la cinasa EryA. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha azul señala el aminoácido 195. Modelo obtenido mediante el software *ChimeraX*.

Del aminoácido 321 al 331 hubo dos *gaps*, dando como resultado cambios en la disposición y el patrón de la estructura. *B. abortus* 2308 mostró un patrón de cuatro láminas β intercaladas con α hélice, mientras que *B. canis* RM6/66 mostró una lámina β y una α hélice prolongada hasta que la identidad de las secuencias se reanuda (**Figura 22**).



Figura 22. Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 321 al 331. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha azul señala el aminoácido 321 y la flecha amarilla señala el aminoácido 331.

Modelo obtenido mediante el software *ChimeraX*.

Finalmente, en parte terminal de la proteína, a partir del aminoácido 459, se observó falta de identidad, baja similitud que puede originar cambios en las características fisicoquímicas y sustitución de la mayoría de los aminoácidos también repercutió en el plegamiento de la estructura ya que en *B. abortus* 2308 son básicamente una α hélice seguida de una lámina β y finaliza con una α hélice; mientras que en *B. canis* RM6/66 la lámina β y α hélice se intercalan varias veces y la estructura es más corta (**Figura 23 y 24**).



Figura 23. Visualización del cambio estructural de la cinasa EryA en los aminoácidos 459 al 502. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha azul señala el aminoácido 459 y la flecha amarilla señala el aminoácido 502.

Modelo obtenido mediante el software *ChimeraX*.

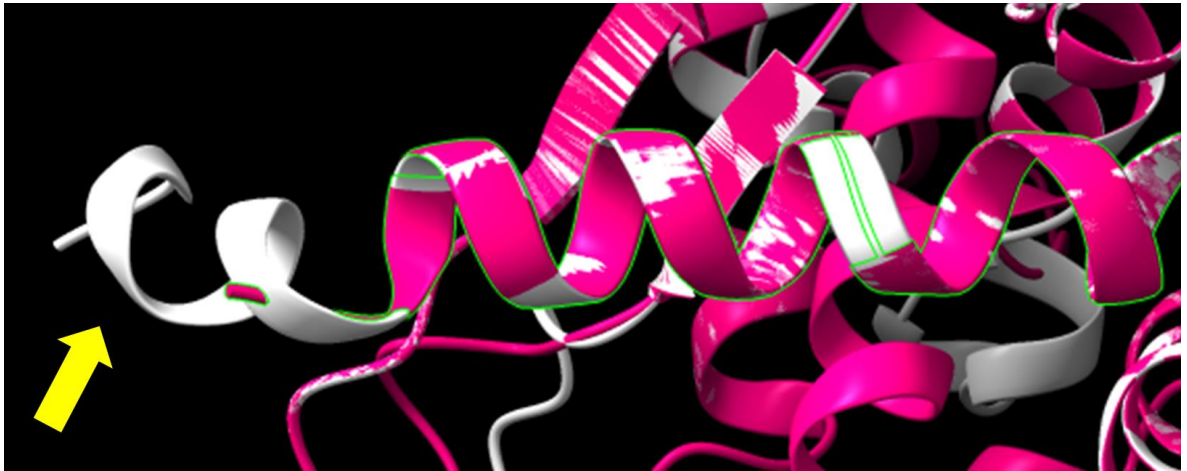


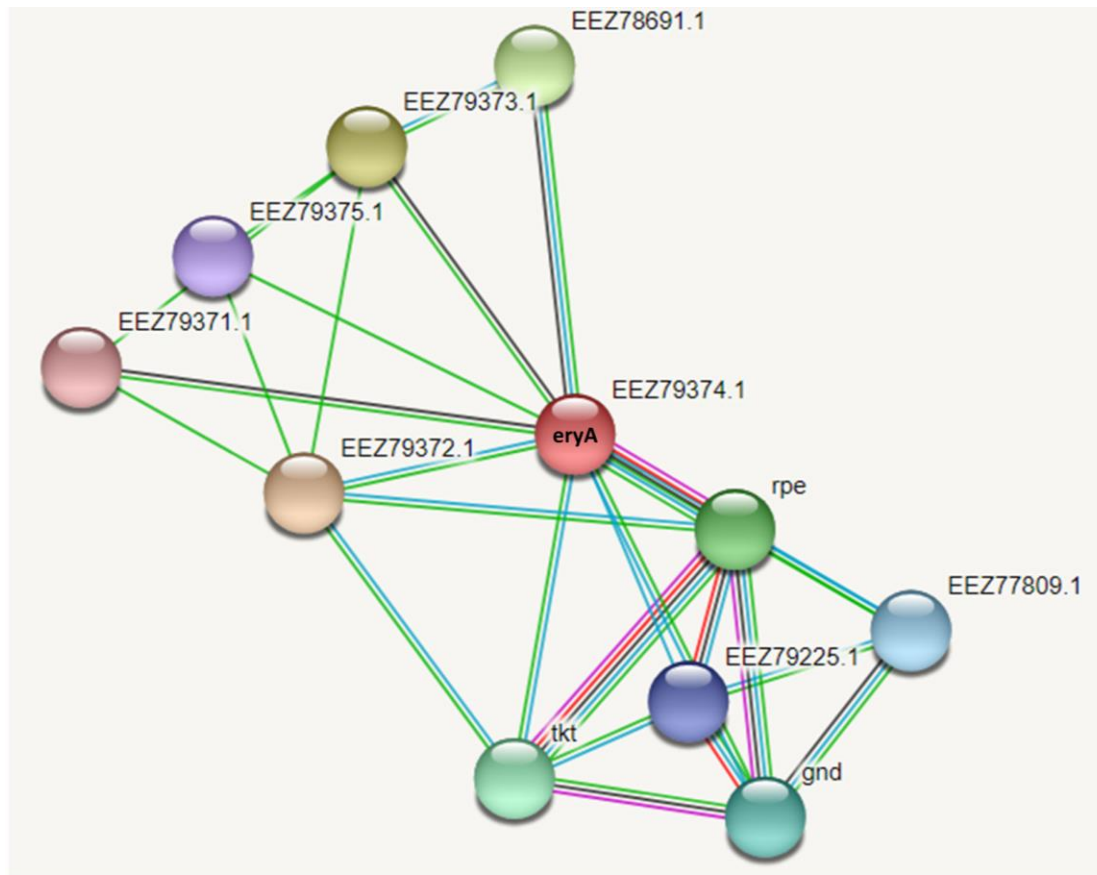
Figura 24. Visualización del cambio estructural en la parte final de la cinasa EryA. Dicha porción está seleccionada en verde, en blanco: *B. abortus* 2308 y en rosa: *B. canis* RM6/66. La flecha amarilla señala la diferencia de tamaño de las proteínas, siendo más grande en *B. abortus* 2308 con 509 aminoácidos y más pequeña en *B. canis* RM6/66 con 502 aminoácidos. Modelo obtenido mediante el software *ChimeraX*.

Por último, se determinaron por medio del servidor *STRING* (*Search Tool for the Retrieval of Intereacting Genes/Proteins*) las proteínas con las que interactúa la cinasa putativa EryA de *B. abortus* 2308. La red de interacciones proteína-proteína se muestra en la **Figura 25** y resultó estar compuesta por diez nodos y cinco canales; en el **Cuadro 11** se muestran las claves de los genes con que interactúa EryA, así como la proteína a la que codifican, su función, la vía metabólica en la que participan y el puntaje de confianza obtenido.

El puntaje de confianza, indica la probabilidad de que una interacción sea biológicamente significativa y reproducible y va de cero a uno. Las proteínas que tuvieron un puntaje de confianza más alto fueron EEZ79372.1 (Epimerasa putativa L-ribulosa-5-fosfato 4), EEZ79373.1 (mlr7269) y EEZ78691.1 (D-lactato deshidrogenasa); la primera forma parte de la vía colateral de las pentosas fosfato, la segunda interviene en el metabolismo del carbono y la tercera se desconoce aún su función biológica, respectivamente.

Las proteínas con más canales de interacción tanto directos como indirectos fueron rpe (Ribulosa-fosfato 3-epimerasa), tkt (Transcetolasa) y gnd (Gluconocinasa); las tres son enzimas que participan en la vía colateral de las pentosas fosfato.

También interactúa con EEZ79375.1 (DeoR) que es una proteína putativa reguladora, aunque se marca como desconocida su función, cabe mencionar que dentro del operón *ery* se encuentra el gen *eryR* que codifica a un regulador DeoR que puede ser el que está interactuando con EryA.



Interacciones conocidas

Interacciones predichas

Otras

De las bases de datos

Genes vecinos












Co-expresión

Determinado experimentalmente

Genes fusionados

Figura 25. Red de interacción proteína-proteína de EryA. Se observan las 10 distintas proteínas con que interacciona EryA para llevar a cabo su función y cinco canales de interacción. Obtenido mediante el servidor *STRING*.

Cuadro 11. Proteínas involucradas en la red de interacción proteína-proteína de EryA donde de muestra su función y la vía metabólica en que están involucradas. Adaptado del cuadro obtenido mediante el servidor *STRING*.

Gen	Proteína	Función	Vía metabólica	Puntaje
 EEZ79374.1	eryA	Carbohidrato cinasa FGGY	Degradación del eritritol	----
 EEZ79372.1	Epimerasa putativa L-ribulosa-5-fosfato 4	Aldosa putativa	Vía de las pentosas fosfato	0.875
 EEZ79373.1	mlr7269	Fosfoglicerato deshidrogenasa	Metabolismo del carbono	0.854
 EEZ78691.1	D-lactato deshidrogenasa	Proteína de función desconocida	---	0.735
 rpe	Ribulosa-fosfato 3- epimerasa	Fijación de carbono	Vía de las pentosas fosfato	0.692
 tkt	Transcetolasa	Transcetolasa bacteriana	Vía de las pentosas fosfato	0.585
 gnd	6-fosfogluconato dehidrogenasa	Descarboxilación	Vía de las pentosas fosfato	0.585
 EEZ77809.1	Oxidoreductasa putativa	Deshidrogenasa/ reductasa	Desconocida	0.568
 EEZ79225.1	gntK	Gluconocinasa	Vía de las pentosas fosfato	0.565
 EEZ79375.1	DeoR	Regulador transcripcional de la familia DeoR	Desconocida	0.497
 EEZ79371.1	Cgl0889	Glicosidasa	Procesos metabólicos de carbohidratos	0.470

7. DISCUSIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica que causa pérdidas económicas en criaderos caninos y es un riesgo potencial para la población humana debido al contacto estrecho entre mascotas y propietarios; por lo que es indispensable implementar medidas preventivas y de bioseguridad, complementadas con el diagnóstico oportuno y en última instancia el tratamiento, para evitar pérdidas económicas causadas por aborto de las camadas e infertilidad dentro de las unidades de reproducción además del riesgo de salud pública.

Se conoce que la presencia de eritritol en placenta y testículo se relaciona con el tropismo de *Brucella* hacia estos tejidos, por lo tanto se le considera a la capacidad de metabolizar este polialcohol como uno de los principales factores de virulencia, aunque *B. abortus* S19 presenta toxicidad ante este compuesto (Sangari and Agüero, 1994).

El uso de bacterias modificadas genéticamente se ha convertido en una herramienta para descubrir la función de los genes asociados con el metabolismo o factores de virulencia, tal es el caso de la utilización del eritritol como fuente importante de carbono (Barbier *et al.*, 2014). Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se elaboraron dos mutantes a partir de la cepa de referencia *B. canis* RM6/66, en una se reemplazó el pseudogen *eryA* por el gen completo y funcional de *B. abortus* 2308 nombrada *B. canis eryA+* y en la otra mutante se sustituyó con la región *eryCD* de *B. abortus* S19 con la finalidad de conferirle la sensibilidad al eritritol (datos no publicados).

7.1 PCR punto final de los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD*

El primer objetivo de este trabajo fue estandarizar la PCR punto final para amplificar los genes *eryA*, *eryCD* y *eryC-eryD*, demostrando su presencia en las cepas probadas. Los resultados demostraron que el gen *eryA* se mantiene en la cepa de referencia de *B. canis* y sus mutantes; este gen codifica para la proteína EryA que

participa en el catabolismo del eritritol al fosforilarlo y se mantiene en *B. canis* RM6/66 a pesar de que posee una mutación puntual (delección) en el nucleótido 1,420 lo que conduce a un cambio en el ORF de la proteína eritritol cinasa, como consecuencia el gen *eryA* es catalogado como un pseudogen (resultados no publicados). Por otra parte, se reafirma la diferencia entre *B. abortus* S19 y *B. canis* RM6/66 particularmente para los genes *eryCD* y *eryC-eryD*, ya que la cepa *B. abortus* S19 tiene una delección de 703 pb causando una fusión de los genes *eryC-eryD* que dan origen al gen *eryCD*, el responsable de que esta cepa sea sensible al eritritol (Crasta *et al.*, 2008), mientras que *B. canis* RM6/66 porta los genes *eryC-eryD*.

El operón *ery* está presente en otras bacterias y tiene la misma función, por ejemplo en *Sinorhizobium meliloti* también cuenta con cinco unidades transcripcionales: *eryA*, *eryB*, *eryC*, *eryD*, *TpiB*, así como un transportador de tipo ABC, donde las funciones identificadas fueron el transporte y el catabolismo del eritritol (Geddes *et al.*, 2010). En el caso de otros microorganismos como *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, que está caracterizada por la presencia de grandes plásmidos, en los que además de representar hasta el 40% del tamaño total de su genoma contiene los genes para el transporte y catabolismo del eritritol en el plásmido pRleVF39f; también la evidencia filogenética sugiere que los genes implicados en el metabolismo del eritritol han sido sometidos a transferencia horizontal entre estas bacterias y *Brucella* spp, por lo que basados en la similitud entre sus secuencias del operón del transportador ABC y del operón *ery* que han sido descritos en los genomas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* (Yost *et al.*, 2006).

7.2 Cinéticas de crecimiento

En este estudio mostraron que el comportamiento es similar entre la cepa de referencia de *B. canis* y sus mutantes, esto debido que son capaces de asimilar otros azúcares como la ribosa y la xilosa que también son capaces de incorporarse

a la vía de las pentosas fosfato (Barbier *et al.*, 2017), de manera indirecta se observa que las mutaciones realizadas en el operón *ery* no afectan rutas metabólicas vitales.

7.3 Ensayo de sensibilidad a eritritol

Con respecto a los resultados sobre el ensayo de sensibilidad a eritritol, se observó que *B. canis* RM6/66 y *B. abortus* 2308 tienen un comportamiento similar y que en un medio adicionado con 80 mM de eritritol se inhibe notoriamente el crecimiento de ambas cepas. *B. abortus* S19 y *B. canis* Δ *eryCD*, mostraron un comportamiento similar al reportado por Zhang y cols. (2014), donde una cepa mutante de *B. abortus* 2308 con delección del operón *ery* que fue expuesta a un medio con 80 mM de eritritol, reprimía el crecimiento de la mutante *B. abortus* 2308 Δ *ery*, y que el crecimiento de éstas fue significativamente reducido en cultivo de macrófagos RAW 264.7; además, en ratones hembras BALB/c indujo una respuesta inmune protectora detectando IFN- γ , una citocina requerida para la actividad bactericida de los esplenocitos e IL-4 una citocina mediadora de CD4/CD8 que desencadena el desarrollo de la inmunidad contra una infección patógena; y por lo tanto concluyen que *B. abortus* 2308 Δ *ery* es un candidato potencial para ser una vacuna viva atenuada contra la brucelosis (Zhang *et al.*, 2014).

Debido a que *B. canis* Δ *eryCD* se mantuvo viable después del ensayo con eritritol a 17 y 80 mM se sugiere que la bacteria disminuye su metabolismo y no permite su reproducción, pero no se compromete la supervivencia de la mutante, contrario a lo que ocurrió con *B. abortus* S19 que no sobrevivió hasta el final del experimento. Este fenómeno podría deberse a que *B. abortus* S19 posee una delección adicional de 68 pb en *eryF* lo que ocasiona un truncamiento terminal de 144 aminoácidos, esto es importante porque este gen codifica a la proteína translocadora de membrana interna que forma parte del transportador ABC de eritritol y que se regula en respuesta a la presencia de este poliol en el medio, por lo que esta mutación suprime la captación de eritritol. Existe la hipótesis de que las delecciones de 703 pb en el gen *eryCD* y de 68 pb en *eryF* contribuyen aún más a la incapacidad de *B.*

abortus S19 para metabolizar el eritritol, aunque en el caso de *B. canis* RM6/66 no se cuenta con estudios sobre este tema (Crasta *et al.*, 2008).

7.4 Cuantificación de la expresión de los genes *eryA* y *eryD* mediante PCR tiempo real

Además, los resultados de la cinética de la expresión del mRNA en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+* en presencia y ausencia del eritritol, mostraron que *eryA* se expresa en las tres cepas a las 9 h independiente de la presencia o ausencia de eritritol, esto coincide con los resultados de las cinéticas en los momentos en que las bacterias se encuentran en Fase Log ya que es cuando requieren de más nutrientes y fuentes de carbono para la síntesis de estructuras bacterianas (Maier *et al.*, 2009).

En cuanto a la expresión del regulador *eryD* sólo se observó en *B. abortus* 2308 en presencia de eritritol a las 5 y 9 h esto puede deberse a que hay factores de transcripción responsables de la expresión de distintos genes que actúan por reconocimiento de posiciones en *cis* que forman parte de los promotores, por lo que no se puede descartar que haya otros factores de transcripción interviniendo en la expresión del mRNA de *eryA* aunque el del mRNA de *eryD* no se esté expresando (Guasconi *et al.*, 2020).

Se ha reportado que *B. ovis* no cataboliza el eritritol, pero tampoco se inhibe su crecimiento en presencia de este compuesto en el medio de cultivo; esto se debe a la presencia de un codón de paro en el gen *eryA* (BOV_A0811) y a un cambio en el ORF del regulador *eryD* (BOV_A0814) que los convierte en pseudogenes, lo que origina que el eritritol no se fosforile. Además, dos genes del supuesto sistema de transporte de eritritol ABC *eryF* y *eryG* (BOV_A805 y BOV_A806) también presentan mutaciones que los convierten en pseudogenes debido a una delección de 2 pb, lo que produce un codón de paro prematuro, causando bloqueo en la entrada de eritritol. El conjunto de estas mutaciones evita que se acumulen metabolitos tóxicos al interior de la bacteria y el agotamiento de ATP, hecho que se observa en la cepa

vacunal *B. abortus* S19. Esto se relaciona con la menor incidencia de abortos en rebaños infectados con *B. ovis* en comparación con la infección producida por *B. melitensis* (Tsolis *et al.*, 2009).

Zhang y cols (2011), describieron por medio de árboles filogenéticos que las carbohidrato cinasas de la familia FGGY provienen de tres ancestros en común: GlpK (glicerol cinasa), AraB (L-ribulocinasa) y XylB (xilulosa cinasa), de los cuales EryA pertenece a esta última al igual que FucK (L-fuculocinasa), LyxK (L-xilulosa cinasa) y RhaB (ramnulocinasa) (Zhang *et al.*, 2011), y al existir especificidad mixta a los sustratos de dicha familia de enzimas; se podría sugerir que la expresión de EryA por parte de *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66 en presencia o ausencia de eritritol se expresó a las 9 h debido a la inespecificidad de la cinasa EryA.

Se ha descrito la presencia y actividad de *eryA* en *Sinorhizobium meliloti* una bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*, con la existencia de genes para el transporte, catabolismo y regulación del eritritol. En este microorganismo la enzima EryA puede usar como sustrato eritritol, pero también adonitol y L-arabitol que también son polialcoholes que poseen características estereoquímicas idéntica sobre tres carbonos y pueden utilizar un transportador en común (Geddes and Oresnik, 2012).

7.5 Análisis *in silico* de la proteína EryA de *B. canis* RM6/66

Los resultados del estudio *in silico* muestran que la proteína putativa de *B. abortus* 2308 y la que se propone de *B. canis* RM6/66 corresponden a proteínas citoplasmáticas. En el alineamiento realizado se encontraron algunas diferencias debido a la delección de la base en la posición 1,420, lo que causa que se recorra el ORF dando lugar a la diferencia en algunos aminoácidos que cambian la estructura tridimensional de la proteína putativa de *B. canis* RM6/66 y como se ha mencionado anteriormente, estos cambios estructurales pueden cambiar la funcionalidad de una proteína.

Se obtuvieron altos puntajes de confianza e identidad al momento de analizar la secuencia de la proteína con el servidor *Phyre2* y se logró modelar la estructura terciaria con muy alta precisión, lo que da validez a la estructura de la cinasa EryA de *B. canis* RM6/66 que se propone en este estudio, a pesar de que se obtuvo el 8% de desorden, que equivale a 41 residuos de 527 aminoácidos que componen a la cinasa EryA.

Estructuralmente en algunas partes se observaron cambios debido a *gaps* que modifican la dirección del plegamiento de la proteína a pesar de que ese fragmento de la secuencia sea la misma. En otras regiones si se observó cambio en el patrón de la estructura terciaria. Si bien el objetivo de este trabajo no era corroborar si estas diferencias estructurales de EryA de *B. canis* RM6/66 afecta el acoplamiento del sustrato a su sitio activo de la enzima, por lo que se propone continuar con el estudio *in sillico* mediante con *Docking* o acoplamiento molecular.

En el aminoácido 195 donde se ubicó una sustitución ya que *B. abortus* 2308 tiene ácido glutámico, mientras que en *B. canis* RM6/66 tiene una lisina; se detectó que a pesar de que son aminoácidos con características diferentes, el patrón de la estructura terciaria no se vio afectado y esta se mantuvo igual en ambas.

Aunque se haya llevado a cabo la sustitución de estos genes en *B. canis* RM6/66, el motivo por el cual *B. canis eryA+* no metaboliza el eritritol como se planteó hipotéticamente podría deberse a que hay más genes participando cuando activa la vía de catabolismo del eritritol. Esto se puede justificar por las redes de interacción proteína-proteína obtenidos en con el servidor *STRING*, donde se observó que hay más proteínas que influyen y es necesaria la interacción con diversas proteínas del proceso al que el producto final del catabolismo del eritritol está destinado: la vía colateral de las pentosas. Para que una proteína lleve a cabo su función es común que se asocien con algunas otras proteínas interactuando con otras rutas o procesos biológicos. Este resultado concuerda con el ensayo de sensibilidad a eritritol y el RT-PCR de *eryA* ya que también se observó que la restitución del gen

eryA en *B. canis eryA+* no fue suficiente para se viera favorecido su crecimiento y la expresión el mRNA de *eryA* en medio con eritritol.

8. CONCLUSIONES

- I. Las condiciones establecidas para realizar la PCR punto final amplifican de manera óptima los productos de los genes *eryA*, *eryC-eryD* y *eryCD* de las cepas de *Brucella*.
- II. Las mutaciones puntuales efectuadas en las cepas *B. canis eryA+* y *B. canis ΔeryCD* no afectaron el crecimiento y no se observó diferencias entre las cepas mutantes y la cepa de referencia.
- III. En el ensayo de sensibilidad al eritritol *B. canis eryA+* no mostró diferencia significativa comparada con *B. canis* RM6/66, mientras que *B. canis ΔeryCD* mostró ser sensible disminuyendo su metabolismo e inhibiendo su crecimiento.
- IV. La expresión del mRNA de la cinasa putativa EryA se detectó con y sin el eritritol en las cepas *B. abortus* 2308, *B. canis* RM6/66 y *B. canis eryA+*; mientras que la expresión del mRNA del regulador EryD se observó en *B. abortus* 2308 en presencia de eritritol.
- V. La secuencia aminoacídica propuesta de la cinasa putativa EryA de *B. canis* RM6/66 tuvo homología y características similares a la secuencia reportada para la cinasa EryA funcional de *B. abortus* 2308.
- VI. Las secuencias de aminoácidos de las cinasas putativas EryA de *B. abortus* 2308 y *B. canis* RM6/66 presentan diferencias entre ellas que van desde *gaps*, sustitución de aminoácidos y diferencia en el tamaño de las proteínas.
- VII. La superposición de las estructuras terciarias mostró que las diferencias señaladas en el alineamiento previo coinciden con los cambios de las estructuras terciarias de ambas proteínas.

9. PERSPECTIVAS

- Continuar con un análisis *in sillico* más exhaustivo con el fin de determinar si los cambios estructurales del modelo teórico de la estructura terciaria de la cinasa EryA de *B. canis* RM6/66 afectan en el sitio activo y en consecuencia la unión a su sustrato.
- Ya que el propósito de la elaboración de las cepas mutantes con las que se trabajó es proponer un candidato de vacuna, se propone la evaluación de las cepas para determinar si son atenuadas en un modelo celular enriquecido con eritritol.
- Probar las cepas mutantes en modelo murino o de ser posible en caninos para evaluar la supervivencia de las cepas mutantes de *B. canis* RM6/66 comparando con *B. abortus* 2308 y *B. abortus* S19.

10. BIBLIOGRAFÍA

- ARELLANO-REYNOSO, B., LAPAQUE, N., SALCEDO, S., BRIONES, G., CIOCCHINI, A. E., UGALDE, R., MORENO, E., MORIYON, I. & GORVEL, J. P. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol*, 6, 618-25.
- ARTIMO, P., JONNALAGEDDA, M., ARNOLD, K., BARATIN, D., CSARDI, G., DE CASTRO, E., DUVAUD, S., FLEGEL, V., FORTIER, A., GASTEIGER, E., GROSDIDIER, A., HERNANDEZ, C., IOANNIDIS, V., KUZNETSOV, D., LIECHTI, R., MORETTI, S., MOSTAGUIR, K., REDASCHI, N., ROSSIER, G., XENARIOS, I. & STOCKINGER, H. 2012. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*, 40, W597-603.
- AUDIC, S., LESCOT, M., CLAVERIE, J. M. & SCHOLZ, H. C. 2009. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics*, 10, 352.
- BARBIER, T., COLLARD, F., ZUNIGA-RIPA, A., MORIYON, I., GODARD, T., BECKER, J., WITTMANN, C., VAN SCHAFTINGEN, E. & LETESSON, J. J. 2014. Erythritol feeds the pentose phosphate pathway via three new isomerases leading to D-erythrose-4-phosphate in *Brucella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 17815-20.
- BARBIER, T., ZUNIGA-RIPA, A., MOUSSA, S., PLOVIER, H., STERNON, J. F., LAZARO-ANTON, L., CONDE-ALVAREZ, R., DE BOLLE, X., IRIARTE, M., MORIYON, I. & LETESSON, J. J. 2017. *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Crit Rev Microbiol*, 1-30.
- BARROUIN-MELO, S. M., POESTER, F. P., RIBEIRO, M. B., DE ALCANTARA, A. C., AGUIAR, P. H., NASCIMENTO, I. L., SCHAER, R. E., NASCIMENTO, R.

- M. & FREIRE, S. M. 2007. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. *Res Vet Sci*, 83, 340-6.
- BRISEÑO-GONZÁLEZ, H., PÁRAMO-RAMÍREZ, R. M., FLORES-CASTRO, R. & SUÁREZ-GÜEMES, F. 2004. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Veterinaria México*, 35, 121-128.
- BUSTAMANTE-SÁNCHEZ, J., SALAZAR-HERNÁNDEZ, F. I., DÍAZ-APARICIO, E., MANZANO-CAÑAS, C., PÉREZ-GONZÁLEZ, R. & HERNÁNDEZ-ANDRADE, L. 2000. Estudio bacteriológico y serológico de brucelosis en vacas revacunadas con dosis reducida de cepa 19 de *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria en México*, 38, 35-42.
- CARMICHAEL, L. E. & JOUBERT, J. C. 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet*, 77, 3-12.
- CARMICHAEL, L. E., ZOHA, S. J. & FLORES-CASTRO, R. 1984. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. *Dev Biol Stand*, 56, 371-83.
- CRASTA, O. R., FOLKERTS, O., FEI, Z., MANE, S. P., EVANS, C., MARTINO-CATT, S., BRICKER, B., YU, G., DU, L. & SOBRAL, B. W. 2008. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS One*, 3, e2193.
- CZIBENER, C., MERWAISS, F., GUAIMAS, F., DEL GIUDICE, M. G., SERANTES, D. A., SPERA, J. M. & UGALDE, J. E. 2016. BigA is a novel adhesin of *Brucella* that mediates adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol*, 18, 500-13.

- DI RUSSO CASE, E. & SAMUEL, J. E. 2016. Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol Spectr*, 4.
- DÍAZ-APARICIO, E., HERNÁNDEZ, L., VALERO-ELIZONDO, G. & ARELLANO-REYNOSO, B. 2001. *Diagnóstico de Brucelosis Animal*, México, INIFAP, IICA, OPS.
- FERRERO, M. C., FOSSATI, C. A., RUMBO, M. & BALDI, P. C. 2012. *Brucella* invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66, 45-57.
- FOSTER, G., OSTERMAN, B. S., GODFROID, J., JACQUES, I. & CLOECKAERT, A. 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, 2688-93.
- GARCÍA-LOBO, J. M., RODRÍGUEZ, M. C., SEOANE, A., SANGARI, F. J. & LÓPEZ-GOÑI, I. 2012. The exploration of *Brucella* transcriptome: From the ORFeome to RNAseq. In: LÓPEZ-GOÑI, I. & O'CALLAGHAN, D. (eds.) *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- GEDDES, B. A. & ORESNIK, I. J. 2012. Genetic characterization of a complex locus necessary for the transport and catabolism of erythritol, adonitol and L-arabitol in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 158, 2180-2191.
- GEDDES, B. A., PICKERING, B. S., POYSTI, N. J., COLLINS, H., YUDISTIRA, H. & ORESNIK, I. J. 2010. A locus necessary for the transport and catabolism of erythritol in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 156, 2970-2981.

- GEORGE, L. W. & CARMICHAEL, L. E. 1978. Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet*, 68, 530-43.
- GODDARD, T. D., HUANG, C. C., MENG, E. C., PETTERSEN, E. F., COUCH, G. S., MORRIS, J. H. & FERRIN, T. E. 2018. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci*, 27, 14-25.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, A. M. 2015. *Comparación de las pruebas de ELISA indirecta, inmunodifusión doble y aglutinación rápida en placa para el diagnóstico de Brucelosis canina*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- GOODWIN, Z. I. & PASCUAL, D. W. 2016. Brucellosis vaccines for livestock. *Vet Immunol Immunopathol*, 181, 51-58.
- GUASCONI, V., YAHY, H. & AIT-SI-ALI, S. 2020. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [Online]. Francia. Available: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/TFactorsSpID30020SS.html> [Accessed 16 junio 2020].
- HOLM, L. 2019. Benchmarking Fold Detection by DaliLite v.5. *Bioinformatics*.
- JAIN, N., BOYLE, S. M. & SRIRANGANATHAN, N. 2012. Effect of exogenous erythritol on growth and survival of *Brucella*. *Vet Microbiol*, 160, 513-6.
- KELLEY, L. A., MEZULIS, S., YATES, C. M., WASS, M. N. & STERNBERG, M. J. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10, 845-58.

- KEPPIE, J., WILLIAMS, A. E., WITT, K. & SMITH, H. 1965. The Role of Erythritol in the Tissue Localization of the Brucellae. *Br J Exp Pathol*, 46, 104-8.
- KIM, S., THIESSEN, P. A., BOLTON, E. E., CHEN, J., FU, G., GINDULYTE, A., HAN, L., HE, J., HE, S., SHOEMAKER, B. A., WANG, J., YU, B., ZHANG, J. & BRYANT, S. H. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 44, D1202-13.
- LILLO, A. M., TETZLAFF, C. N., SANGARI, F. J. & CANE, D. E. 2003. Functional expression and characterization of EryA, the erythritol kinase of *Brucella abortus*, and enzymatic synthesis of L-erythritol-4-phosphate. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 737-9.
- LOWRIE, D. B. & KENNEDY, J. F. 1972. Erythritol and threitol in canine placenta: possible implication in canine brucellosis. *FEBS Lett*, 23, 69-72.
- LUCERO, N. E., ESCOBAR, G. I., AYALA, S. M. & JACOB, N. 2005. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. *J Med Microbiol*, 54, 457-61.
- MAIER, R., PEPPER, I. & GERBA, C. 2009. *Environmental Microbiology*, San Diego, California. USA, Elsevier.
- MAKLOSKI, C. L. 2011. Canine brucellosis management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 41, 1209-19.
- MORENO, E. 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol*, 5, 213.
- PALOMARES-RESENDIZ, E., ARELLANO-REYNOSO, B., HERNANDEZ-CASTRO, R., TENORIO-GUTIERREZ, V., SALAS-TELLEZ, E., SUAREZ-GUEMES, F. & DIAZ-APARICIO, E. 2012. Immunogenic response of *Brucella*

- canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 35.
- PETERSEN, E., RAJASHEKARA, G., SANAKKAYALA, N., ESKRA, L., HARMS, J. & SPLITTER, G. 2013. Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*. *Microbes Infect*, 15, 440-9.
- PITCHER, D. G., SAUNDERS, N. A. & OWEN, R. J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*, 8, 151-156.
- ROOP, R. M., 2ND, GAINES, J. M., ANDERSON, E. S., CASWELL, C. C. & MARTIN, D. W. 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol*, 198, 221-38.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, M. M., GIRALDO-ECHEVERRI, C. A. & OLIVERA-ANGEL, M. 2013. Infección por *Brucella canis* en humanos: propuesta de un modelo teórico de infección a través de la ruta oral. *Infectio*, 17, 193-200.
- SANGARI, F. J. & AGUERO, J. 1994. Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus. *Vaccine*, 12, 435-8.
- SANGARI, F. J., AGUERO, J. & GARCI, A. L. J. M. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology*, 146 (Pt 2), 487-495.
- SANGARI, F. J., CAYON, A. M., SEOANE, A. & GARCIA-LOBO, J. M. 2010. *Brucella abortus* ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol*, 10, 107.

- SAYERS, E. W., CAVANAUGH, M., CLARK, K., OSTELL, J., PRUITT, K. D. & KARSCH-MIZRACHI, I. 2019. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 47, D94-D99.
- SCHOLZ, H. C., NOCKLER, K., GOLLNER, C., BAHN, P., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., KAMPFER, P., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M. S., WHATMORE, A. M., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H. J. & DE, B. K. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 801-8.
- SCHOLZ, H. C., REVILLA-FERNANDEZ, S., AL DAHOUK, S., HAMMERL, J. A., ZYGMUNT, M. S., CLOECKAERT, A., KOYLASS, M., WHATMORE, A. M., BLOM, J., VERGNAUD, G., WITTE, A., AISTLEITNER, K. & HOFER, E. 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 2090-8.
- SOLER-LLORENS, P. F., QUANCE, C. R., LAWHON, S. D., STUBER, T. P., EDWARDS, J. F., FICHT, T. A., ROBBE-AUSTERMAN, S., O'CALLAGHAN, D. & KERIEL, A. 2016. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 116.
- SZKLARCZYK, D., MORRIS, J. H., COOK, H., KUHN, M., WYDER, S., SIMONOVIC, M., SANTOS, A., DONCHEVA, N. T., ROTH, A., BORK, P., JENSEN, L. J. & VON MERING, C. 2017. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*, 45, D362-D368.
- TSOLIS, R. M., SESHADRI, R., SANTOS, R. L., SANGARI, F. J., LOBO, J. M., DE JONG, M. F., REN, Q., MYERS, G., BRINKAC, L. M., NELSON, W. C., DEBOY, R. T., ANGIUOLI, S., KHOURI, H., DIMITROV, G., ROBINSON, J. R., MULLIGAN, S., WALKER, R. L., ELZER, P. E., HASSAN, K. A. &

- PAULSEN, I. T. 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One*, 4, e5519.
- WANKE, M. M. 2004. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 195-207.
- WHATMORE, A. M., DAVISON, N., CLOECKAERT, A., AL DAHOUK, S., ZYGMUNT, M. S., BREW, S. D., PERRETT, L. L., KOYLASS, M. S., VERGNAUD, G., QUANCE, C., SCHOLZ, H. C., DICK, E. J., JR., HUBBARD, G. & SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 4120-8.
- YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S. & MADDEN, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- YOST, C. K., RATH, A. M., NOEL, T. C. & HYNES, M. F. 2006. Characterization of genes involved in erythritol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology*, 152, 2061-74.
- YU, C. S., CHEN, Y. C., LU, C. H. & HWANG, J. K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins*, 64, 643-51.
- ZHANG, J., YIN, S., GUO, F., MENG, R., CHEN, C., ZHANG, H., LI, Z., FU, Q., SHI, H., HU, S., NI, W., LI, T. & ZHANG, K. 2014. A potent *Brucella abortus* 2308 Deltaery live vaccine allows for the differentiation between natural and vaccinated infection. *J Microbiol*, 52, 681-8.
- ZHANG, Y., ZAGNITKO, O., RODIONOVA, I., OSTERMAN, A. & GODZIK, A. 2011. The FGGY carbohydrate kinase family: insights into the evolution of functional specificities. *PLoS Comput Biol*, 7, e1002318.

