



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS



TESIS:

Evaluación de los patrones de expresión de genes relacionados con factores de virulencia y quorum sensing en *Brucella melitensis* aislada de humano

Que presenta para obtener el título de Químico Farmacobiólogo
p.QFB. ITZEL ESTEPHANIA GUARNEROS LEÓN

DIRECTOR DE TESIS

D.C. LAURA MORALES LARA

ASESOR DE TESIS

D.C. ELSA IRACENA CASTAÑEDA
ROLDÁN

Diciembre 2016



MTRO. OMAR GERARDO AGUIRRE IBARRA
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 1 de Diciembre de 2016, signado por el Coordinador del Departamento de Bioquímica y Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

GUARNEROS LEON ITZEL ESTEPHANIA

JURADO

DC. IVONNE PEREZ XOCHIPA
MC. ARMANDO MENA CONTLA
D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA

Examen que se realizará el día 20 de Enero de 2017, a las 12:00 horas en el SALON 112 del Edificio FCQ9 de la Facultad

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 1 de Diciembre de dos mil dieciseis


DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR

60
AÑOS DE
AUTONOMÍA
UNIVERSITARIA



C.c.p. Archivo



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO **GUARNEROS LEON ITZEL ESTEPHANIA**

realizada en el area de Bioquímica y Alimentos, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

EVALUACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON FACTORES DE VIRULENCIA Y QUORUM SENSING EN *Brucella melitensis* AISLADA DE HUMANO

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 29 días del mes de Noviembre de 2016

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DC. IVONNE PEREZ XOCHIPA

MC. ARMANDO MENA CONTLA

D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA



C.c.p. Archivo

Vo.Bo.



Facultad de Ciencias Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244.31.06



BUAP

Puebla, Pue. a 25 de Noviembre de 2016

DC. IVONNE PEREZ XOCHIPA
MC. ARMANDO MENA CONTLA
D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

GUARNEROS LEON ITZEL ESTEPHANIA

cuyo título es :

**EVALUACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON FACTORES DE VIRULENCIA Y QUORUM
SENSING EN *Brucella melitensis* AISLADA DE HUMANO**

Realizada en el Area de Bioquímica y Alimentos;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ



DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244-31 06



BUAP

Asunto: **Distinción Académica**

MTRO. OMAR GERARDO AGUIRRE IBARRA
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Con toda atención le pido un **ACTA DE EXAMEN PROFESIONAL** con la distinción académica **Ad Honorem** para el alumno:

ITZEL ESTEPHANIA GUARNEROS LEÓN (201108786)

Ya que cubre los requisitos especificados en el artículo 62 referente a la titulación.

- a) Haber cursado la licenciatura en un período de 3 a 5 años
- b) No haber recurrido ninguna materia
- c) Haber obtenido un promedio mínimo de 9.32
- d) Presentar un trabajo de investigación relevante, calificado como tal por la academia correspondiente.

Sin más por el momento le reitero mis saludos.

ATENTAMENTE
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"
H. PUEBLA DE Z., A 30 DE NOVIEMBRE DE 2016


DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR



60
AÑOS DE
AUTONOMÍA
UNIVERSITARIA

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de patogenicidad del ICUAP, por permitir llevar a cabo este proyecto de investigación y facilitar las cepas utilizadas en el presente estudio.

A la VIEP por la beca otorgada mediante el Sub-programa para la consolidación de Investigadores Jóvenes.

A la D.C. Laura Morales Lara y D.C. Elsa Iracena Castañeda Roldán por su apoyo para la realización de este proyecto de investigación y la revisión de esta tesis de licenciatura.

DEDICATORIA

A la mujer y al hombre más importantes en mi vida:

A mi Mamá: Guadalupe León Chacón

A mi Papá: José Javier Guarneros Arenas

Por a verme dado la vida y estar a mi lado siempre tanto en los mejores como en los peores momentos de mi aun corta vida, por educarme y enseñarme que para empezar un gran proyecto, hace falta valentía y para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia y si quieres triunfar, no hay que quedarse mirando la escalera hay que empezar a subir, escalón por escalón y si tropezamos que mejor para aprender a levantarnos, hasta que llegemos arriba. Y comprender que la vida en evocaciones puede ser cruel pero también es muy hermosa y sin duda vale la pena el esfuerzo de vivirla.

A mi hermano:

Luis Xavier Guarneros León

Por el cariño, comprensión, regaño y compañía, gracias por estar aquí, que la vida sería aburrida sin un hermano.

A mis compañeros y profesores a lo largo de toda mi vida académica ya que sin su educación y conocimiento no pudiera estar donde estoy.

Con especial cariño a mis amigos por brindarme su amistad, las risas, las pláticas, las fiestas, las enseñanzas y por tenderme su mano cuando se los he pedido, muchas gracias.

Y finalmente a veces volteo al cielo, sonrío y digo, yo sé que fuiste tú, gracias Dios por permitirme vivir.

“Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles, sino más misteriosas”

Albert Schweitzer

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | i |
| ÍNDICE DE TABLAS | ii |
| RESUMEN | iii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 3. OBJETIVOS | |
| 3.1 Objetivo general | 4 |
| 3.2 Objetivos particulares | 4 |
| 4. MARCO TEÓRICO | |
| 4.1 Brucelosis | 5 |
| 4.2 Manifestaciones clínicas | 5 |
| 4.3 Epidemiología | 5 |
| 4.4 Diagnóstico de brucelosis | 7 |
| 4.5 Características microbiológicas de <i>Brucella</i> spp | 7 |
| 4.6 Estructura de la envoltura celular de <i>Brucella</i> spp | 7 |
| 4.7 Patogenicidad de <i>Brucella</i> spp | 9 |
| 4.7.1 Moléculas producidas por <i>Brucella</i> relacionadas con la patogénesis | 10 |
| 4.8 Generalidades del Quorum Sensing en las bacterias | 14 |
| 4.8.1 Generalidades del Quorum Sensing en las bacterias Gram-negativas | 15 |
| 4.9 Quorum Sensing en <i>B. melitensis</i> 16M | 17 |
| 5. DIAGRAMA DE TRABAJO | 20 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 6.1 Material | 21 |
| 6.2 Material biológico | 21 |
| 6.3 Equipos | 21 |
| 6.4 Métodos | 21 |
| 7. METODOLOGÍA | |
| 7.1 Aislamiento de <i>Brucella</i> de muestras de sangre. | 22 |
| 7.2 Activación de cepas | 22 |
| 7.3 Morfología colonial | 22 |
| 7.4 Tinción de Gram | 22 |
| 7.5 Tinción de Ziehl-Neelsen modificada | 23 |
| 7.6 Crecimiento en presencia de colorantes | 23 |
| 7.7 Pruebas bioquímicas | 24 |
| 7.8 Aislamiento de DNA | 24 |
| 7.9 Confirmación de cepas por PCR múltiple <i>Brucella</i> -ladder v2.0 | 24 |
| 7.10 Electroforesis en gel de agarosa | 25 |
| 7.11 Curva de crecimiento | 25 |
| 7.12 Aislamiento de RNA | 25 |
| 7.13 Retrotcripción | 26 |
| 7.14 PCR para la identificación de la expresión genética | 27 |
| 8. RESULTADOS | |
| 8.1 Mantenimiento y conservación de las cepas bacterianas | 29 |

| | |
|---|----|
| 8.2 Confirmación de la identidad de las cepas mediante estudios microbiológicos | 29 |
| 8.3 Identificación molecular de género y especie mediante PCR múltiple Brucella-ladder v2.0 | 34 |
| 8.4 Análisis de la expresión genes relacionados con la virulencia y QS | |
| 8.4.1 Estandarización de Tm para los oligonucleótidos empleados en el ensayo de PCR | 35 |
| 8.4.2 Evaluación de la expresión de genes involucrados con la virulencia y QS en <i>B. melitensis</i> | 38 |
| 9. DISCUSIÓN | 49 |
| 10. CONCLUSIONES | 57 |
| 11. SUGERENCIAS | 58 |
| 12. BIBLIOGRAFÍA | 59 |
| 13. ANEXOS | |
| 13.1 Anexo A. Evaluación y cuantificación de RNA. | 65 |
| 13.2 Anexo B. Electroforesis de gen constitutivo en las cepas empleadas | 66 |
| 13.3 Anexo C. Determinación de No. de generaciones en base a la curva de crecimiento | 66 |
| 13.4 Anexo D. Determinación de pH a lo largo de la curva de crecimiento | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa global de brucelosis humana. | 6 |
| Figura 2. Envoltura celular de <i>Brucella spp.</i> | 8 |
| Figura 3. Modelo de tráfico intracelular de <i>Brucella</i> en macrófagos. | 10 |
| Figura 4. Estructura del T4SS codificado por en operon <i>virB</i> . | 12 |
| Figura 5. Regulación del operon <i>virB</i> mediante el regulador transcripcional VjbR. | 12 |
| Figura 6. Internalización de <i>Brucella</i> en macrófagos. | 13 |
| Figura 7. Modelo básico de Quorum Sensing en las bacterias. | 15 |
| Figura 8. Mecanismo de Quorum Sensing de <i>Vibrio fischeri</i> en presencia de alta densidad poblacional. | 16 |
| Figura 9. Estructura química del autoinductor de tipo AHL, C12-HSL. | 18 |
| Figura 10. Siembra por estría en medio con colorantes. | 23 |
| Figura 11. Cultivo de <i>Brucella melitensis</i> en medio Agar BrucellaBUAP. Las bacterias fueron cultivadas a 37 °C en tensión de CO ₂ durante 48 h mediante estría cruzada. | 29 |
| Figura 12. Morfología colonial. A) Cepa <i>Brucella melitensis</i> 16M. B) Cepa de <i>Brucella melitensis</i> (H18) aislada de sangre completa de un paciente diagnosticado con brucelosis aguda. | 30 |
| Figura 13. Tinción de Gram. A) Cepa de referencia <i>Brucella melitensis</i> 16M. B) Cepa aislada de humano <i>Brucella melitensis</i> (H18). | 31 |
| Figura 14. Tinción de Ziehl-Neelsen modificada. A) Cepa de referencia <i>Brucella melitensis</i> 16M. B) Cepa aislada de humano <i>Brucella melitensis</i> (H18). | 31 |
| Figura 15. Identificación de <i>Brucella</i> mediante pruebas bioquímicas. | 32 |
| Figura 16. A. Identificación de <i>Brucella</i> mediante crecimiento en presencia de colorantes. | 33 |
| Figura 16. B. Identificación de <i>Brucella</i> mediante crecimiento en presencia de colorantes. | 34 |
| Figura 17. Identificación de las cepas por PCR múltiple: Brucella-ladder v2.0. | 35 |
| Figura 18. Evaluación del ensayo de PCR por modificación del valor de la Temperatura de alineamiento (T _m). | 37 |
| Figura 19. Curva de crecimiento de <i>B. melitensis</i> 16M y <i>B. melitensis</i> H18. | 39 |
| Figura 20. Expresión relativa de <i>vjbR</i> y <i>virB2</i> durante la fase logarítmica en las cepas <i>B. melitensis</i> 16M y <i>B. melitensis</i> H18. | 41 |
| Figura 21. Expresión relativa de <i>fliC</i> y <i>fliF</i> durante la fase logarítmica en las cepas <i>B. melitensis</i> 16M y <i>B. melitensis</i> H18. | 43 |
| Figura 22. Expresión relativa de <i>aibP</i> y <i>omp31</i> durante la fase logarítmica en las cepas <i>B. melitensis</i> 16M y <i>B. melitensis</i> H18. | 45 |
| Figura 23. Expresión relativa de <i>rbsB</i> y <i>ugpB</i> durante la fase logarítmica en las cepas <i>B. melitensis</i> 16M y <i>B. melitensis</i> H18. | 46 |
| Figura 24. Expresión de genes relacionados con la virulencia y el QS. | 47 |
| Figura 25. Expresión de genes relacionados con la virulencia y el QS | 48 |
| Figura 26. Asa de retroalimentación negativa regulada por VjbR, y asa de retroalimentación positiva regulada por BabR. | 54 |
| Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la integridad del RNA total. | 65 |
| Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar gen constitutivo. | 66 |
| Figura 29. Monitoreo de pH a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas. | 67 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características de los equipos. | 21 |
| Tabla 2. Referencia de los métodos. | 21 |
| Tabla 3. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR Brucella-ladder v2.0 | 24 |
| Tabla 4. Perfil térmico empleado en la técnica de PCR. | 25 |
| Tabla 6. Mezcla de reacción empleada en la retrotranscripción. | 27 |
| Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. | 28 |
| Tabla 8. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas empleadas. | 32 |

RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*, sin embargo, *B. melitensis* es una de las especies más virulentas. Su poder patógeno es activado en respuesta a la expresión organizada y coordinada en tiempo y espacio de factores de virulencia que participan en el encendido y apagado de Quorum Sensing (QS), que contribuyen al establecimiento de la enfermedad. Por lo que en este trabajo se identificó el patrón de expresión de mRNA de los genes *vjbR*, *virB2*, *fliC*, *fliF*, *aibP*, *omp31*, *rbsB* (SP29) y *ugpB* (SP41) y en *B. melitensis* aislada de humano (H18) y *B. melitensis* 16M durante la fase de crecimiento exponencial. Con este fin, se establecieron las curvas de crecimiento de ambas cepas en caldo BrucellaBUAP, 37 °C / 20 h. La expresión de mRNA se evaluó mediante RT-PCR a las 2, 6, 8 y 12 h (fase exponencial). Los amplicones obtenidos en cada punto de la curva fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La densitometría para cada mRNA fue normalizada con mRNA BMEI0861 y analizada con el software Digit1.2. Los resultados demostraron diferencias en la expresión de genes *vjbR* y *aibP*, y genes que codifican para factores de virulencia como *virB2*, *fliF* y *fliC*, así como, para el componente de membrana externa *ugpB*, en *B. melitensis* M16 y *B. melitensis* (H18) entre las fases temprana y tardía logarítmica, y una mayor expresión de la cepa aislada de humano en comparación con la cepa de referencia.

Los resultados obtenidos sugieren que los cambios que se presentan en el medio de cultivo a lo largo de la fase logarítmica pueden modular la expresión de genes involucrados en la virulencia y en el sistema QS. La fase logarítmica temprana se caracterizó por el incremento de factores de virulencia a diferencia del final de la fase logarítmica en la cual se identificó un efecto opuesto, marcado por el incremento de la expresión del gen *aibP*, que está relacionado con la disminución de la expresión de los genes *vjbR*, *virB2*, *fliF* y *fliC*. Así también, es posible que la cepa humana tenga una mayor capacidad para sobre-regular la expresión de estos genes, en comparación con la cepa de referencia, lo que podría influir en sus capacidades virulentas.

1. INTRODUCCIÓN

Brucella melitensis es una bacteria patógena intracelular, Gram-negativa, perteneciente al género *Brucella*, responsable de la brucelosis, es el principal agente causal de la brucelosis humana, comúnmente es de origen zoonótico, y afecta a animales de vida silvestre y domésticos [1,2]. La virulencia de esta bacteria se basa en su extraordinaria capacidad para adaptarse a diversos ambientes estresantes y modular la respuesta inmune innata del huésped [3,4].

Brucella cuenta con sistemas reguladores como el quorum sensing (QS) que le permiten activar una regulación fina de la expresión genética en tiempo y espacio específicos para responder a los desafíos del medio ambiente [5]. El QS es un sistema regulador que permite una reprogramación genética en respuesta a la señalización de pequeñas moléculas difusibles denominados autoinductores (AI) que son producidas y liberadas por las bacterias, en *Brucella* se ha identificado a la molécula autoinductora N-acil-homoseril-lactona (AHL), aunque se desconoce a la AHL-sintasa que la produce, se ha documentado en bacterias gram negativas a N-dodecanoil homoserina lactona (C12-HSL), la cual al alcanzar un nivel umbral de su concentración, durante el crecimiento *in vitro*, su efecto puede ser difundido mediante su unión a un regulador transcripcional de tipo LuxR como VjbR que forma parte del QS [6].

VjbR juega un papel importante en el desarrollo de los mecanismos de patogenicidad activados por *Brucella* para regular la respuesta al estrés, así como el metabolismo y la virulencia. Estos efectos pueden modularse mediante la transcripción de factores de virulencia como el operon *virB*, que codifica para el sistema de secreción de tipo cuatro (T4SS), cuya expresión es fundamental para la maduración de la vacuola que contienen *Brucella* (BCV) a su nicho replicativo [3].

El regulador VjbR ha sido estudiado *in vitro* e *in vivo*, principalmente en cepas de referencia, y se ha demostrado que de igual manera controla la expresión de genes flagelares como *fliF* y *fliC* en puntos específicos de la curva

de crecimiento principalmente en la fase logarítmica temprana y se ha descrito están relacionados con el proceso crónico de la infección [7].

VjbR también influye en la modificación de los componentes de la membrana externa como Omp31, Omp25 y Omp10 [8]. Omp31 destaca como potente factor de virulencia al prevenir la liberación del TNF α de macrófagos [9] y se ha mostrado que está involucrada en el transporte de polisacáridos durante la conformación de biopelículas en la parte final de la etapa estacionaria [7] mientras que su expresión en la fase logarítmica es constante.

De igual manera las proteínas de superficie SP41 (*ugpB*) y SP29 (*rbsB*) asociadas a la adherencia e invasión a células eucariontes [10] son considerados factores de virulencia en *Brucella*. Los antecedentes sugieren que SP29 está unida a membrana externa, también se ha encontrado como componente de vesícula de membrana externa (OMV's) liberadas por *B. melitensis* [11], estos hallazgos pueden relacionarse con la expresión constante del gen *rbsB* identificada en la fase logarítmica.

Adicionalmente, se ha descrito que la actividad transcripcional de VjbR es modificada por C12-HSL, el cual es capaz de reprimir la transcripción del operon *virB* y de genes flagelares como *fliF*. *In vitro*, la regulación del QS también es debido a la expresión de *aibP*, que codifica una proteína homóloga a las AHL-acilasas de varias especies bacterianas. Por lo tanto se propone que *Brucella melitensis* también es capaz de un auto "apagado de quorum" [6]. AibP al tener un papel de regulador negativo de la virulencia se expresa más en la etapa final de la fase logarítmica de crecimiento con un aumento casi exponencial en su expresión.

2. JUSTIFICACIÓN

Bacterias del género *Brucella* son los agentes etiológicos de la brucelosis, una enfermedad crónica que afecta a mamíferos marinos y terrestres, que potencialmente pueden transmitirla al humano. Aunque aún se desconocen detalles del ciclo biológico de este patógeno, así como los mecanismos mediante los cuales sobrevive ante un medio ambiente adverso, se sabe que *Brucella* desarrolla estrategias importantes que involucran la expresión de factores de virulencia y la activación del sistema quorum sensing, en condiciones específicas que se han descrito en cepas de referencia. De este modo, diversos reportes han evidenciado el papel de importantes moléculas como C12-HSL, VjbR, proteínas del sistema de secreción tipo IV y la expresión de genes flagelares durante el establecimiento y persistencia del proceso infeccioso. Sin embargo, debido a que la adaptación y establecimiento de *Brucella* requiere una compleja regulación y modificación de la expresión de factores de virulencia y sistemas de censado del medio en tiempo y espacio específicos, en este trabajo analizaremos los patrones de expresión del mRNA de estas proteínas en una cepa aislada de humano de *B. melitensis* contra una cepa de referencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar los patrones de expresión del mRNA de genes relacionados con factores de virulencia y quorum sensing en la bacteria *Brucella melitensis* aislada de humano y compararlos con la cepa de referencia *B. melitensis* 16M.

3.2 Objetivos particulares

- Realizar el aislamiento de *B. melitensis* de humano, corroborando su identificación especie-específica mediante análisis microbiológico (tinción de Gram, Tinción Ziehl-Neelsen, pruebas bioquímicas y crecimiento en medios con colorante) y por PCR múltiple *Brucella-ladder* v2.0.
- Establecer las curvas de crecimiento de las cepas de referencia y aislada de humano en caldo *Brucella*BUAP, identificando las distintas fases mediante espectrofotometría y estableciendo las unidades formadoras de colonias (UFC) a lo largo de la curva.
- Evaluar la expresión de los genes *vjbR*, *virB2*, *fliC*, *fliF*, *aibP*, *omp31*, *ugpB* (SP41) y *rbsB* (SP29), en la fase de crecimiento exponencial para la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* aislada de humano.
- Comparar los patrones de expresión del mRNA de los genes referidos previamente bajo las mismas condiciones de cultivo establecidas para ambas cepas (*B. melitensis* 16M y *B. melitensis* aislada de humano), durante la fase exponencial de crecimiento.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por especies del género *Brucella*, conocida también como fiebre de Malta, fiebre ondulante, fiebre del Río Grande y fiebre del Mediterráneo. Esta enfermedad afecta a animales mamíferos salvajes y domésticos, causándoles aborto y esterilidad, lo que produce enormes pérdidas económicas, además de ser una de las enfermedades zoonóticas bacterianas más comunes en todo el mundo [12-14].

El género está conformado por 11 especies reconocidas que infectan a diferentes tipos de animales estas son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. papionis*, [15,16]. Sin embargo, las primeras tres son las que se han identificado como principales causantes de la brucelosis humana.

4.2 Manifestaciones clínicas

Los síntomas clínicos de la brucelosis son inespecíficos, sin embargo, comúnmente incluyen fiebre ondulante, cansancio, sudoración nocturna, dolores de cabeza, escalofríos, malestar general, dolor de cabeza y debilidad. En algunas ocasiones se pueden presentar alteraciones gastrointestinales, nerviosas, hiperplasia de los ganglios linfáticos, bazo e hígado. Es importante considerar que se debe sospechar de brucelosis humana en aquellos individuos que sean originarios de zonas endémicas o hayan permanecido un tiempo en ellas, haber ingerido productos lácteos no pasteurizados, o hayan estado en contacto con animales portadores [2,17].

4.3 Epidemiología

La amplia distribución de las bacterias del género *Brucella* alrededor del mundo, se debe a su gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes. Se estima que ocasiona más de 500,000 nuevos casos humanos reportados por año

sin embargo, prevalece principalmente en los países en vías de desarrollo de Latino América, Medio Oriente, África y Oeste de Asia; afectando más a Siria y Mongolia [18,19].

En México la brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de notificación obligatoria. En los últimos años se han registrado 12,200 casos de brucelosis con un promedio anual de 2,400 casos [20]. Sin embargo, Godfroid en el 2005 señala que estas cifras no reflejan el verdadero panorama de la enfermedad y se calcula que en muchos países en vías de desarrollo la incidencia puede ser hasta 25 veces mayor.

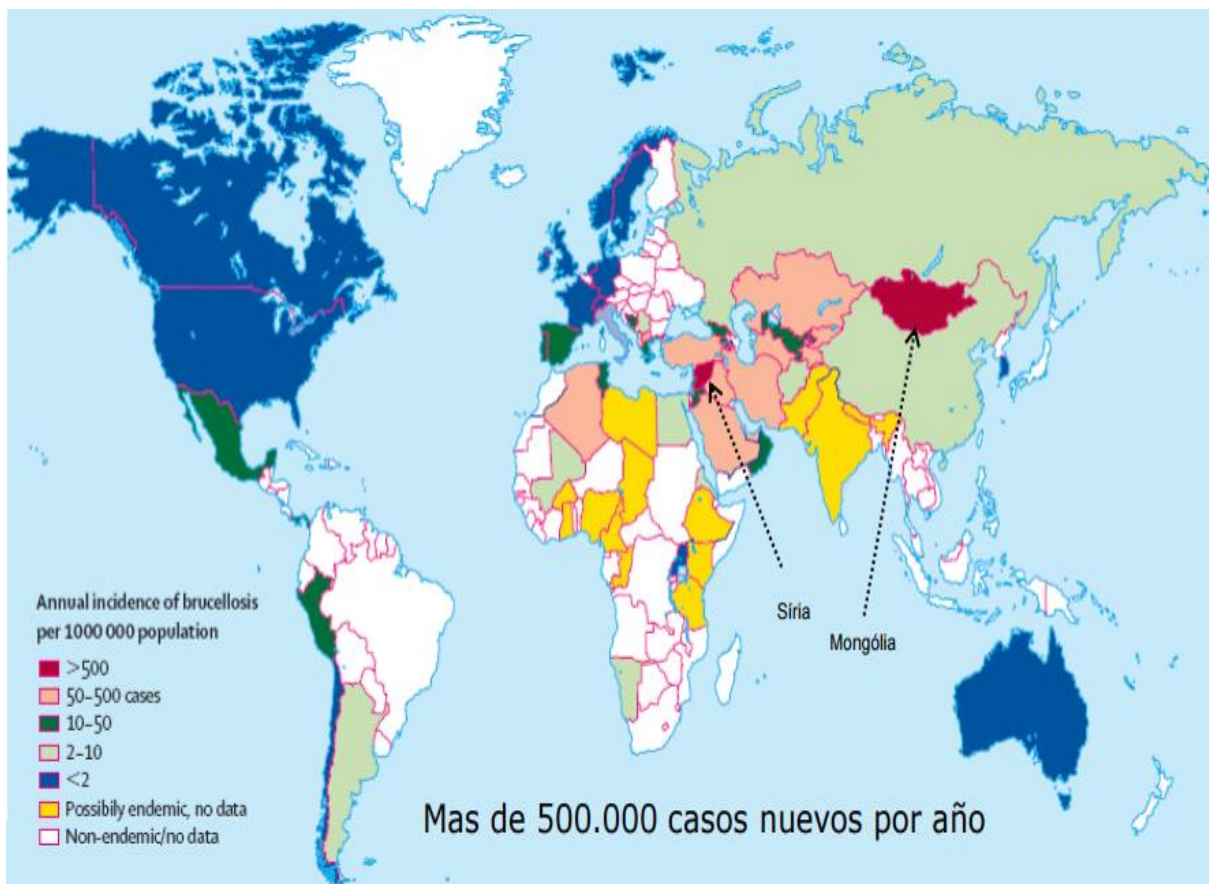


Figura 1. Mapa global de brucelosis humana [1].

4.4 Diagnóstico de brucelosis

Para diagnosticar la enfermedad se aplican varios criterios como es el historial clínico, la sintomatología, la detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente [21,22], para la identificación de especie se emplea la lisis por fagos que son específicos de *Brucella* [12]; igualmente para la confirmación microbiológica es necesario el aislamiento del microorganismo y su caracterización microscópica mediante morfología colonial, tinción de Gram y Ziehl-Neelsen, crecimiento en medios con colorantes y antibióticos [17] además de pruebas bioquímicas, como confirmación definitiva se tiene el análisis de muestra por técnicas moleculares como PCR y sus variantes como la PCR múltiple *Brucella-ladder* v2.0 [23,24].

4.5 Características microbiológicas de *Brucella* spp

El género *Brucella* está conformado por bacterias patógenas intracelulares que pertenecen al grupo α -2 proteobacteria, son bacilos Gram-negativos, miden de 0.5 a 1.5 μm de longitud, inmóviles, anaerobios facultativos, de crecimiento lento, no poseen cápsulas ni forman esporas. Tienen un metabolismo oxidativo basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones (reducen los nitratos a nitritos excepto *Brucella ovis*). Son catalasa, oxidasa y ureasa positivas, en general no fermentan los azúcares, no utilizan el citrato, no producen indol, no producen ácido ni gas en medio TSI [25]. Debido a las características estructurales de *Brucella* esta tiene la capacidad de crecer en medios sólidos con colorantes como fucsina básica, tionina, safranina y violeta de etilo dependiendo de la especie, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C en un pH de 6,6 a 7,4 y a pesar de ser considerada un organismo fastidioso por sus requerimientos en el cultivo puede crecer en medios nutritivos mínimos [17].

4.6 Estructura de la envoltura celular de *Brucella* spp

La envoltura celular de la bacteria está formada por membrana interna, espacio periplasmático y membrana externa responsable de la forma e integridad

osmótica de la bacteria (Figura 2). La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS) denominado también endotoxina, el cual es el componente más abundante y estudiado considerado el principal antígeno [26].

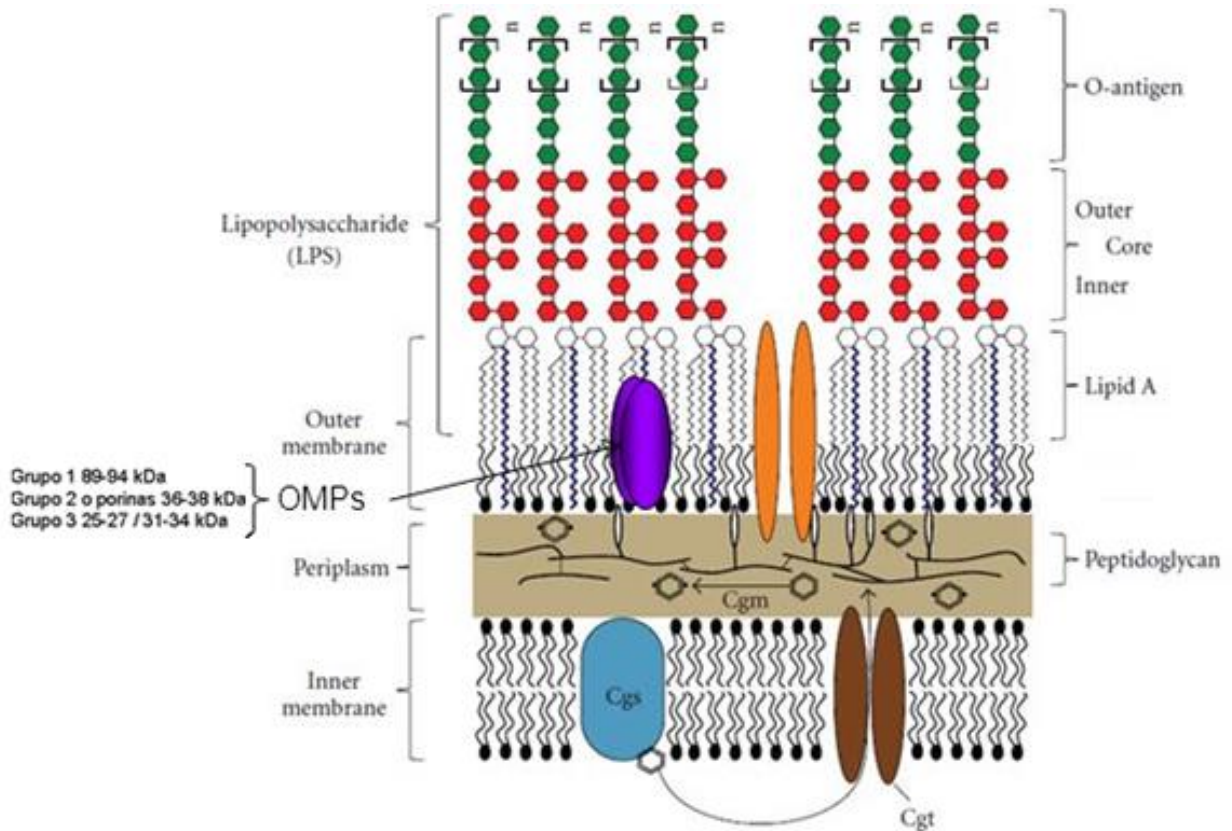


Figura 2. Envoltura celular de *Brucella spp* [27].

Las proteínas de membrana externa (OMP por sus siglas en inglés) de *Brucella* pueda estar en contacto con el LPS. Se han reconocido algunas OMPs que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus masas moleculares siendo el grupo 1 conformado por proteínas de 89-94 kDa, el grupo 2 o porinas conformado por proteínas de 36-38 kDa y en el grupo 3 se han descrito a las proteínas de 25-27 y 31-34 kDa. Las OMPs son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas debido al impedimento estérico de las cadena O del LPS de las primeras. Algunas son de expresión constitutiva, sin embargo, ciertas OMPs como Omp 25 se expresan en los procesos infecciosos [26,27].

4.7 Patogenicidad de *Brucella* spp

Si bien, no han sido completamente elucidados los mecanismos por los cuales *Brucella* causa daño a su huésped [28], se ha descrito que es capaz de adherirse y penetrar rápidamente las membranas mucosas como conjuntivas, o nasales, o la piel lesionada, para entrar al sistema linfático, llegar a los ganglios regionales correspondientes y entrar al torrente sanguíneo hasta alcanzar a células fagocíticas o no fagocíticas, a las que se adhiere gracias a las características particulares de su membrana como son la presencia de proteínas con función de adhesina [14,17]. La membrana plasmática se asocia a balsas lipídicas para que *Brucella* logre penetrar la célula. La interacción bacteria-célula huésped permite inducir una serie de señales intracelulares, para facilitar la invasión y replicación intracelular [29]. Si bien, los macrófagos son eficientes en matar de 80-90% de las bacterias en las primeras horas de la infección, aquellas que logran resistir la muerte son capaces de sobrevivir, replicarse y permanecer resguardadas de los mecanismos de defensa del huésped, lo que contribuye al desarrollo crónico del proceso infeccioso [3,30].

Después de invadir a la célula hospedera, *Brucella* se localizan dentro de un compartimento rodeado por una membrana, llamado vacuola que contiene *Brucella* (BCV), que se asocia con marcadores endosómicos tempranos y tardíos. El tráfico de la BCV es regulado por proteínas efectoras que se ha propuesto podrían ser secretadas por el sistema de secreción tipo 4 (T4SS), las BCVs no se fusionan con los lisosomas (catepsina) (Figura 3), pero adquiere el marcador proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1). Así el patógeno es capaz de replicarse en BCVs estrechas marcadas con calreticulina, un marcador de retículo endoplásmico, durante este tráfico las bacterias requieren la síntesis de varios factores de virulencia [29,30]. A las 48 a 72 h después de la infección, el patógeno se encuentra en una BCV autofágica (aBCV). Finalmente, la bacteria será liberada de la célula mediante un mecanismo posiblemente lítico [31].

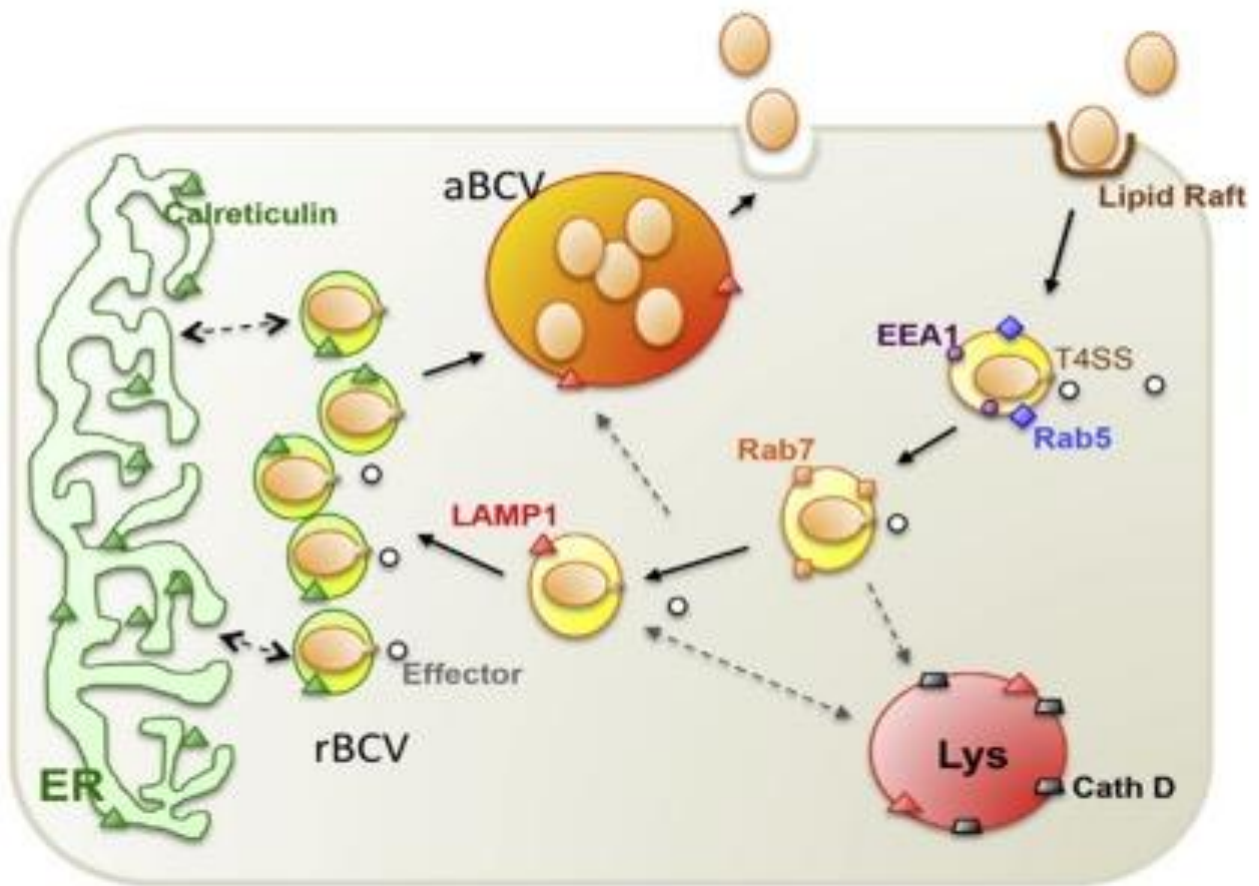


Figura 3. Modelo de tráfico intracelular de *Brucella* en macrófagos [31].

4.7.1 Moléculas producidas por *Brucella* relacionadas con la patogénesis

Diversos componentes de *Brucella* están involucrados con su virulencia, y están relacionados con su capacidad para entrar, sobrevivir y replicarse dentro de células como macrófagos y polimorfo nucleares y células epiteliales sin restringir las funciones celulares básicas o inducir la muerte celular programada, produciéndole al huésped complicaciones con tendencia a la cronicidad y dificultades en su tratamiento [32]. A diferencia de otros patógenos intracelulares, las especies de este género no poseen los factores de virulencia tradicionales como son los plásmidos, producción de exotoxinas o cápsula [3,33].

El esquema patogénico de *Brucella* es multivalente e involucra a diversos factores de virulencia que pueden ser componentes de la membrana externa (ME)

como el LPS y proteínas de ME, adhesinas/invasinas requeridas para la adhesión e internalización del huésped, también se han identificado sistemas involucrados en la respuesta de *Brucella* al medio ambiente, el sistema doble componente BvrR/BvrS, el T4SS, y genes flagelares [7] requeridos para la persistencia del patógeno dentro de su huésped [29,34].

El lipopolisacárido liso (sLPS) juega un papel importante en la virulencia de *Brucella*, pues las cepas lisas son más patógenas que las rugosas. Las características de su sLPS no son convencionales, es poco tóxico y pobre inductor de la respuesta inmune del huésped [29].

El sistema de regulación doble componente BvrR/BvrS (regulador de virulencia de *Brucella*) conformado por una proteína cinasa censora y un regulador de la respuesta [35] que controlan la expresión de múltiples determinantes moleculares importantes para el establecimiento intracelular como es la modulación de proteínas de ME [29,36].

VjbR es un regulador transcripcional que pertenece a la familia LuxR, importante factor de virulencia por su conocido papel en la regulación del operon *virB* y de la expresión de genes flagelares, importantes en el establecimiento de la infección. Contiene un dominio de unión a DNA y un dominio de unión a homoserina-lactona, por medio del cual es capaz de participar en la respuesta desarrollada por el sistema regulador quorum sensing [6]. De este modo, VjbR es un regulador que funciona en respuesta a los cambios de densidad celular [38].

Durante la infección *Brucella* produce el T4SS (Figura 4), cuya activación es crucial en la supervivencia y la replicación, por ejemplo, durante las interacciones y los eventos de fusión entre las BCVs y RE, previniendo la fusión con el lisosoma. Es capaz de transportar moléculas efectoras a través de la membrana de la BCV, es codificado por el operon *virB* (*virB1-12*) y su expresión está bajo control del regulador transcripcional VjbR (Figura 5) [31,37].

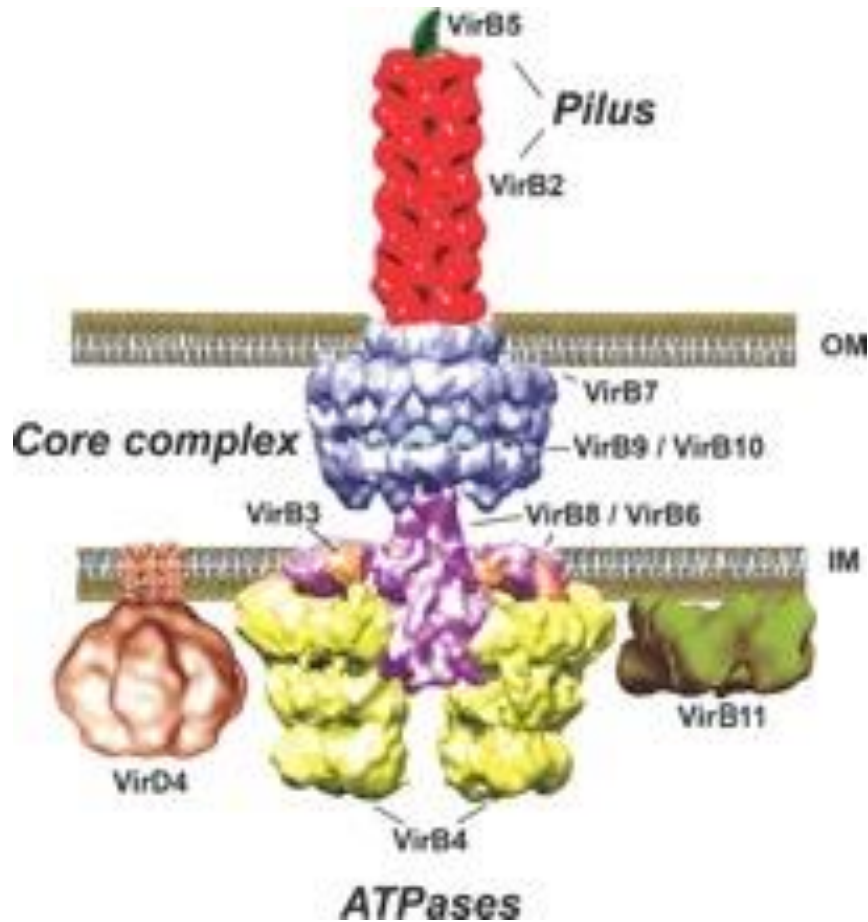


Figura 4. Estructura del T4SS codificado por en operon *virB*.

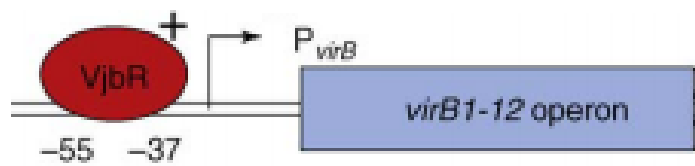


Figura 5. Regulación del operon *virB* mediante el regulador transcripcional VjbR.

Además del conocido papel del LPS en la interacción con la célula hospedera y la internalización, proteínas asociadas a la superficie como son las proteínas de 41 kDa (SP41) y 29 kDa (SP29), han llamado la atención por mediar la interacción de *Brucella* con células fagocíticas y no-fagocíticas. Estos hallazgos mostraron la importancia de SP41 (*ugpB*) y SP29 (*rbsB*) en la interacción con el ácido siálico presente en la superficie de células eucariontes, y se ha sugerido que

esta actividad podría facilitar la colonización e invasión, también hay que recordar que SP41 produce un transportador tipo ABC de ribosa (proteína periplásmica de unión de ribosa). Las dos proteínas antes mencionadas participan como factores de virulencia para la bacteria facilitando la infección (Figura 6) [10,11,39].

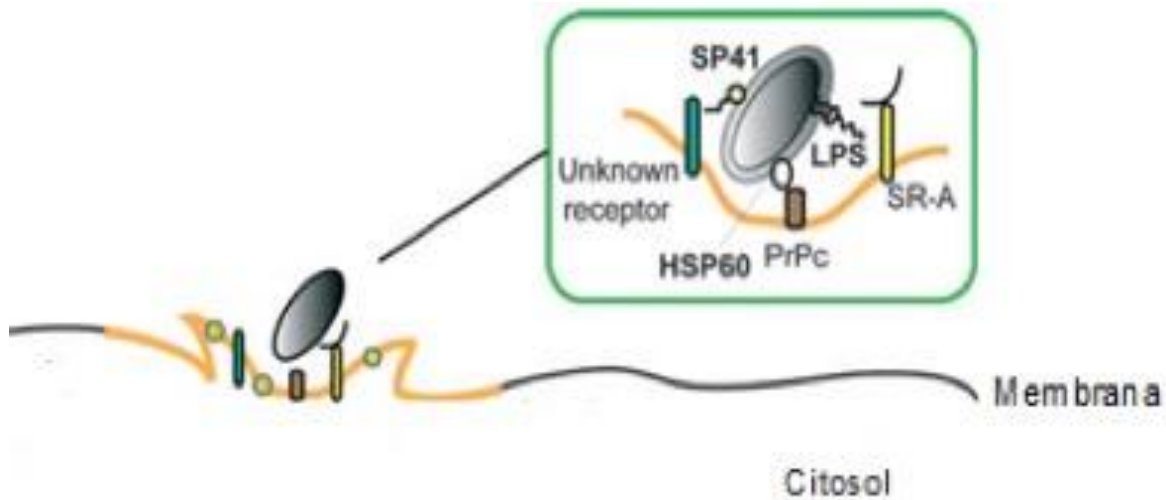


Figura 6. Internalización de *Brucella* en macrófagos [40]

Omp31, importante proteína estructural de ME. Destaca como potente factor de virulencia al prevenir la liberación del TNF α de macrófagos [9] se ha mostrado que está involucrada en el exporte de polisacáridos durante la conformación de biopelículas, estrategia que en ambientes extracelulares puede estar relacionada con mecanismos de resistencia [38,41].

La expresión de genes flagelares en *Brucella* ha sido de gran interés debido a que hasta 2002, *Brucella* era conocida por no presentar movilidad [42], pero poco después se reportó que bajo condiciones de crecimiento específicas *in vitro*, durante la fase exponencial temprana, era capaz de ensamblar todo el aparato flagelar y que su expresión también era inducida en el proceso infeccioso en ratones, en donde se demostró que mutantes de varios genes flagelares presentaron virulencia disminuida y no eran capaces de desarrollar el proceso crónico, lo que ha llevado a reconocer al flagelo como otro factor de virulencia importante para *Brucella* [5,7].

También se ha reportado que los genes que codifican para los componentes basales *fliF* (anillo MS) y distales *fliC* (flagelina) del aparato flagelar de *B. melitensis* son inducidos en un medio enriquecido en la etapa logarítmica temprana de crecimiento de la bacteria. En esta condición experimental puntual se observó por microscopía electrónica una estructura semejante a un flagelo polar [7].

4.8 Generalidades del Quorum Sensing en las bacterias

Los seres vivos tienen sistemas de comunicación intercelular que les permiten relacionarse entre sí y con el medio ambiente. Durante mucho tiempo se pensó que estos sistemas de comunicación eran propios de los organismos pluricelulares, y que no existían en los microorganismos. En el año 1977, estudiando el fenómeno de la bioluminiscencia en bacterias del género *Vibrio* spp., define el término autoinducción [43], que en 1994 es modificado por el de “Quorum Sensing” (QS) [44,45]. Quedando definido como: “El mecanismo bacteriano de comunicación intercelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular”.

Desde el año 1994 hasta la actualidad, se han descrito numerosos procesos fisiológicos regulados por quorum sensing [46], tales como bioluminiscencia, biofilms, metabolismo, inducción del proceso de esporulación, producción de exopolisacáridos, movilidad y principalmente producción de factores de virulencia por microorganismos patógenos en humanos, animales y vegetales.

Las bacterias desarrollan el QS para liberar moléculas que actúan como señales químicas, las cuales son conocidas como autoinductoras (AI) cuya concentración externa aumenta en función del aumento de la densidad poblacional de células. Las bacterias detectan la acumulación de una concentración umbral mínima de estos AI y alteran su expresión génica, por lo tanto, su comportamiento. Utilizando estos sistemas de respuesta a la señal, las bacterias sincronizan comportamientos particulares en toda la población.

Existen diferencias en los sistemas del QS en las bacterias, debido a que cada microorganismo ha optimizado sus capacidades para promover su supervivencia en el nicho especializado en que cada especie particular de bacteria reside. Así, los tipos de señales, receptores de traducción de señal y genes blancos de cada sistema de QS reflejan la biología única de cada especie bacteriana en particular.

4.8.1 Generalidades del Quorum Sensing en las bacterias Gram-negativas

El primer sistema de detección de quorum descrito es el de la bacteria *Vibrio fischeri*, y se considera el modelo clásico de QS en la mayoría de bacterias Gram-negativas. *V. fischeri* coloniza el órgano luminoso del calamar hawaiano *Euprymna scolopes*, en este órgano, las bacterias crecen a altas densidad para inducir la expresión de genes necesarios para la bioluminiscencia. El calamar utiliza la luz producida por las bacterias para enmascarar su sombra y evitar la depredación, existe una simbiosis entre parásito-huésped [47].

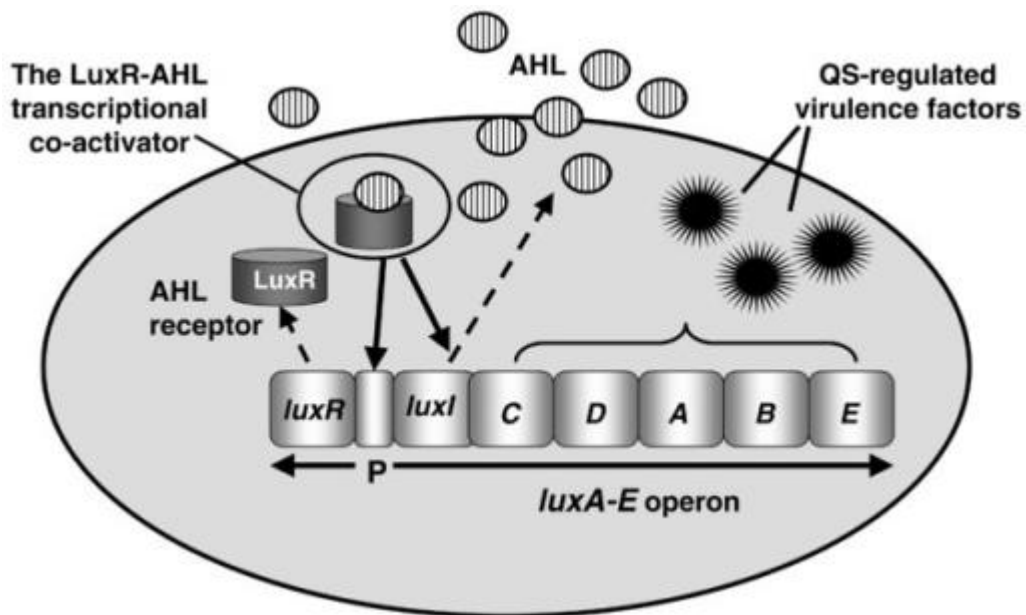


Figura 7. Modelo básico de Quorum Sensing en las bacteria.

Dos proteínas, LuxI y LuxR (reguladores transcripcionales) controlan la expresión del operón luciferasa (*luxICDABE*) requerido para la producción de luz. LuxI es la sintasa de AI, que produce el autoinductor acil-Homoserina lactona (AHL) (Figura 7) (Engebrecht y Silverman 1984), y LuxR es activador del receptor citoplásmico que induce la transcripción de genes blanco. Después de la producción del AI, el AHL difunde libremente dentro y fuera de la célula y aumenta su concentración en base al crecimiento de la densidad bacteriana [49]. Cuando la molécula señal alcanza una concentración umbral crítica, el complejo LuxR-AHL activa la transcripción del operón que codifica para la luciferasa [50]. Adicionalmente, el complejo LuxR-AHL también induce la expresión de *luxI*, presente en el operón (Figura 8). Esta configuración reguladora inunda el ambiente con la señal, esto crea una asa reguladora positiva para toda la población que favorece la producción de luz. Un gran número de otras bacterias de la familia α 2-proteobacteria Gram-negativas poseen proteínas de tipo LuxR y se comunican con señales AHL.

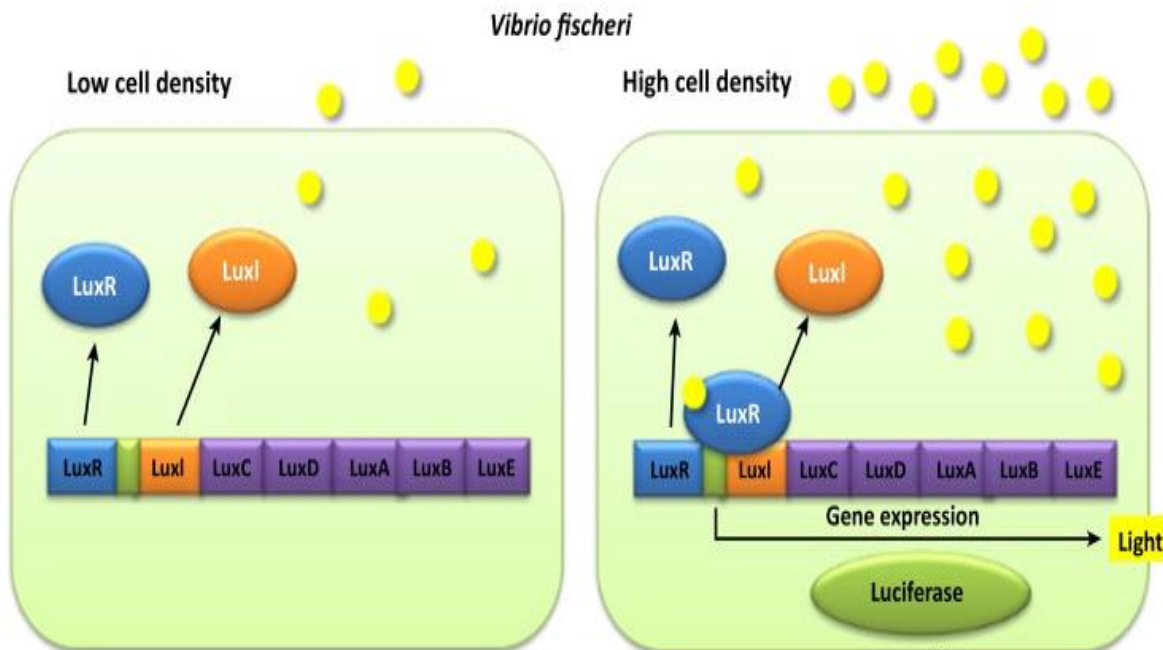


Figura 8. Mecanismo de Quorum Sensing de *Vibrio fischeri* en presencia de alta densidad poblacional [48].

4.9 Quorum Sensing en *B. melitensis* 16M

Durante la infección, *Brucella* spp. se enfrenta a una amplia diversidad de ambientes y mecanismos de defensa del huésped, ya sea en el ambiente intra o extracelular el éxito de su establecimiento depende de la regulación fina de la expresión genética en respuesta a estímulos específicos del entorno bacteriano, lo que es posible mediante la activación de sistemas reguladores que permiten realizar una reprogramación genética, sincronizando la expresión de genes para controlar y activar respuestas dentro de una población bacteriana, un ejemplo de estos sistemas es el quorum sensing antes mencionado que es capaz de inducir estos efectos ante la presencia de moléculas pequeñas de señalización llamadas autoinductores (N-acil-homoserina lactonas, AHLs), los cuales son producidas y liberadas por la propia bacteria. Para el género *Brucella*, el QS ha sido documentado en las cepas de referencia *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308, y se ha destacado su participación importante en la virulencia [8].

Sin embargo, es importante señalar que el QS en *Brucella* conforma un sistema no clásico, ya que QS fue descrito primero como un sistema de control dependiente de la densidad poblacional. Sin embargo, las concentraciones del autoinductor pueden ser afectados por numerosos parámetros como la difusión, distribución y en espacial la degradación. Estos últimos factores son especialmente relevantes dada la localización intravacuolar de *Brucella* spp. en células del huésped y la activación de QS en *Brucella* no depende netamente de la densidad poblacional además de se ha identificado que la concentración de AHL es muy baja a comparación de otras bacterias, por esto se dice que el QS en *Brucella* es no clásico [6].

Aún cuando *Brucella* produce una baja concentración de AHLs, se ha identificado a N-dodecanoil homoserina lactona (C12-HSL) (Figura 9) que se encuentra en la bacteria en concentración de 1 nM. Cuando se alcanza un nivel umbral de su concentración durante el crecimiento *in vitro*, C12-HSL se une al regulador transcripcional y proteína de censado del QS, VjbR [6].

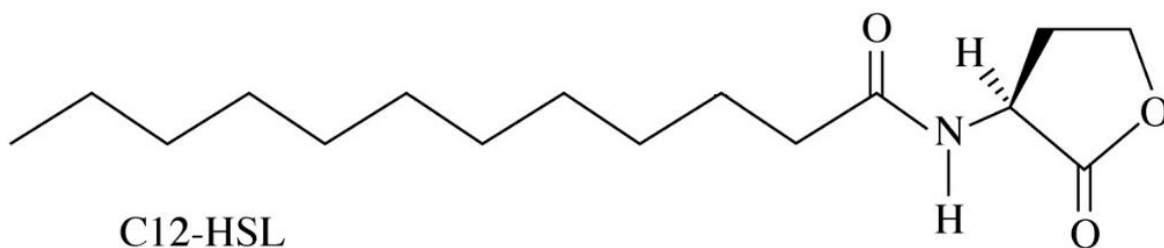


Figura 9. Estructura química del autoinductor de tipo AHL, C12-HSL.

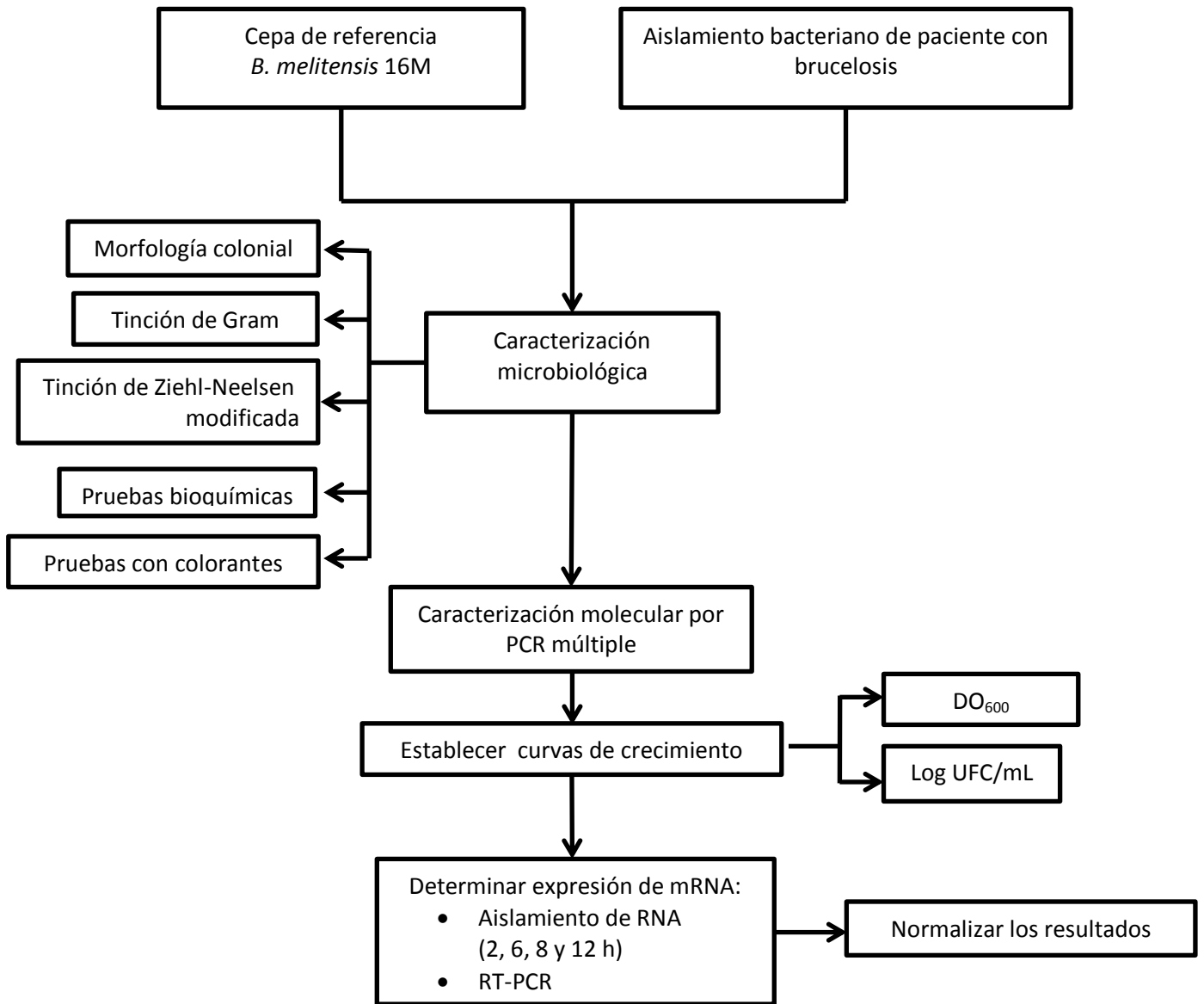
VjbR actúa como regulador de la respuesta al estrés, metabolismo y virulencia, que a su vez modifica la transcripción de factores de virulencia como el operon *virB* y genes flagelares como *flgE*, *fliF* y *fliC*, así como del regulador maestro flagelar FtcR y es capaz de inducir modificaciones drásticas en la superficie de *B. melitensis* 16M, como se ha demostrado para Omp31, Omp25 y Omp36 [8,38,52].

Llama la atención que hasta la fecha, no ha sido posible identificar a la AHL-sintasa productora del AI, en *Brucella*, por lo que la ruta para su síntesis se mantiene sin identificar. Sin embargo, se ha demostrado que la producción de AHL es disminuida en *B. melitensis*, mediante la expresión de la proteína AibP, que hidroliza el enlace amida entre el homoserina lactona (HSL) y la cadena lateral de acilo de AHL a través de un ataque nucleofílico, lo que resulta en la liberación de HSL y de ácidos grasos; lo que induce cambios en la expresión de importantes blancos del quorum sensing, modificando la capacidad virulenta de la bacteria mediante. De este modo, se propone que AibP sea un componente importante del mecanismo regulador del QS [6].

La evidencia experimental sugiere que VjbR media su efecto en la transcripción de *virB2* mediante la unión a una secuencia palindrómica de 18 pb en el promotor de *virB*., lo que sugiere que este regulador desempeña un papel crucial en la expresión de las propiedades superficiales de *B. melitensis* 16 M [8]. Adicionalmente, se ha descrito que la actividad transcripcional de VjbR es modificada por C12-HSL el cual es capaz de reprimir la transcripción del operon *virB* y de genes flagelares como *fliF* [6].

Por lo que en este proyecto proponemos evaluar los patrones de expresión del mRNA de genes involucrados con el sistema quorum sensing como son *aibP*, *vjbR*, y su relación con la expresión de factores de virulencia *virB2*, *fliC*, *fliF*, *omp31*, *ugpB* y *rbsB* en cepas de *B. melitensis* de diferente origen con el objetivo de identificar si el ambiente al que ha sido sometida la bacteria aislada de humano, le ha conferido capacidad de presentar un patrón de expresión de genes relacionados con la modulación de sus mecanismos de virulencia, en comparación con el perfil de expresión que presenta una cepa de referencia como es *B. melitensis* 16M durante el crecimiento *in vitro*.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico para cada determinación.

6.2 Material biológico

Cepas empleadas: *B. melitensis* M16 y *B. melitensis* aislada de humano (H18).

6.3 Equipos

Tabla 1. Características de los equipos.

| EQUIPO | MARCA | MODELO |
|---|---|--|
| INCUBADORA | BOEKEL SIENTIFIC | DRY BATCH INCUBATOR. BOEKEL. |
| CÁMARA DE ELECTROFORESIS CAMPANA DE BIOSEGURIDAD | LABNER INTERNATIONAL, INC. | ENDURO |
| CENTRIFUGA ESPECTROFOTÓMETRO | NUAIRE. BIOLOGICAL SAFETY CABINETS DUPONT JENWAY | CLASS II TYPE A/B SORVALL MC 12V 6405 UV/VIS |
| ESTUFA INCUBADORA CON AGITACIÓN | LUMISTE II NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC | IEC - 41 INNOVA 4080. |
| TERMOCICLADOR VORTEX | TECHNE SCIENTIFIC INDUSTRIES. | INCUBATOR SHAKER. TC - 412 VORTEX -T |
| TRASILUMINADOR | FOTODYNE | GENIE 2 FOTO/UV 21 |

6.4 Métodos

Tabla 2. Referencia de los métodos

| DETERMINACIÓN | MÉTODO | REFERENCIA |
|--|--|--|
| Obtención de RNA total Obtención de cDNA | Método de Trizol Retrotranscripción | [8] Im Prom II Reverse Transcription System PROMEGA |
| Identificación molecular de la cepa | PCR múltiple Brucella-ladder v2.0 | [23] |
| Detección de los genes <i>aibP</i> , <i>vjbR</i> , <i>virB2</i> , <i>fliC</i> , <i>fliF</i> , <i>omp31</i> , <i>ugpb</i> y <i>rbsB</i> | PCR punto final | [6] |

7. METOLOGÍA

7.1 Aislamiento de *Brucella* de muestras de sangre

Las pruebas iniciales a las que se somete la muestra se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de la NOM-022-SSA2-2012, para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano. Después de confirmar la serología positiva de la muestra, en relación con el diagnóstico clínico, se procedió a realizar el aislamiento bacteriano a partir de sangre total, inoculándola en caldo BrucellaBUAP por 48-72 h con tensión parcial de CO₂ a 37 °C, con el cual se inoculó agar de BrucellaBUAP y Violeta de etilo incubándolas por 48 h a 37 °C con tensión parcial de CO₂. Las bacterias aisladas se conservaron en caldo BrucellaBUAP con glicerol al 30% y se almacenaron a -70 °C hasta su identificación microbiológica y molecular.

7.2 Activación de cepas

Las cepas empleadas en este estudio (*B. melitensis* M16 y *B. melitensis* aislada de humano H18) se descongelaron de -70 °C lentamente, para sembrarlas en agar BrucellaBUAP mediante estría cruzada incubándolas a 37 °C, en tensión parcial de CO₂ durante 48 h.

7.3 Morfología colonial

Las cepas del género *Brucella* se caracterizan por presentar colonias puntiformes circulares, convexas, con bordes regulares y traslucidos en medio BrucellaBUAP (medio enriquecido, patente en trámite).

7.4 Tinción de Gram

En un portaobjetos se colocó una gota de agua destilada con una asada de crecimiento bacteriano, se deja secar y se fija por calor. Se tiñó 1 minuto en cristal violeta de Hucker, se lavó con agua, 1 min en lugol, se decolora con alcohol al 95%, se lava con agua, 1 min en fucsina básica, se lava con agua, se seca, y se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

7.5 Tinción de Ziehl-Neelsen modificada

Se preparó, seco y fijo el frotis sobre la flama. Teñir por 10 minutos con una dilución 1:10 de una solución stock de Ziehl-Neelsen de fucshina fenicada (Solución de stock= disolver 1g de fucshina básica en 10 ml de etanol absoluto y agregar a esta disolución 90ml de una solución de fenol al 5%), se lavó con agua, se decoloró con una solución 0.5% de ácido acético, posteriormente se lavó con agua. Se contrastó con azul de metileno al 1% por 20 segundos, se secó, y se observó al microscopio con objetivo de inmersión.

7.6 Crecimiento en presencia de colorantes

A partir de un aislamiento primario obtenido de un medio enriquecido se tomaron varias colonias características de *Brucella*, y se suspendieron en un tubo con caldo BrucellaBUAP estéril hasta obtener turbidez equivalente a 4 en el nefelometro de MacFarland. Se utilizaron medios sólidos con los siguientes colorantes: Tionina 1:25 000, 1:50 000, Fucsina básica 1:50 000, Safranina 1:10 000 y violeta de etilo 10mL/L.

La placa se inoculó con cinco estrías por muestra (Figura 10). Se incubaron a 37 °C con tensión parcial de CO₂, durante 4 a 5 días. La prueba es positiva cuando el crecimiento aparece en tres o más estrías.

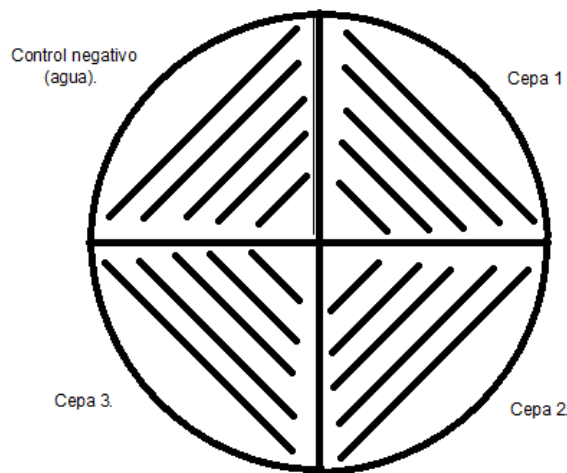


Figura 10. Siembra por estría en medio con colorantes.

7.7 Pruebas bioquímicas

A partir de la misma suspensión antes descrita, se sembró en los siguientes medios: medio citrato de Simmons, medio TSI, medio urea de Chistensen y medio MIO.

7.8 Aislamiento de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo por la técnica de calor; primero se realizó una suspensión bacteriana $OD_{600} = 1$ en tubos eppendorf en 200 μ L con agua destilada estéril, se llevó a ebullición en baño maría durante 8-10 min. Posteriormente se tomó con cuidado el líquido de la superficie y se centrifugó a 8 000 rpm por 15 min y se separó el sobrenadante. Un micro litro de este se sometió a PCR múltiple.

7.9 Confirmación de cepas por PCR múltiple Brucella-ladder v2.0

Los oligonucleótidos que se emplearon están referidos en [23,24]. Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis. La técnica de PCR se realizó empleando una mezcla de reacción indicada en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR Brucella-ladder v2.0

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN FINAL | VOLUMEN (μ L) |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| GoTaq® Green Master Mix | 1X | 12.5 |
| dNTP mix | 1 mM | 3 |
| Mezcla de oligos | 0.4 μ M | 8 |
| DNA | | 1 |
| Agua libre de nucleasas | | 0.5 |
| Volumen final | | 25 |

El perfil térmico de la reacción será como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Perfil térmico empleado en la técnica de PCR

| CICLOS | FASE | TEMPERATURA °C | TIEMPO |
|--------|---------------------------|----------------|--------|
| 1 | Desnaturalización inicial | 95 | 7 min |
| 30 | Desnaturalización | 95 | 35 s |
| | Alineación | 62.5 | 60 s |
| | Extensión | 72 | 180 s |
| 1 | Extensión final | 72 | 6 min |

7.10 Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó al 1 %, disolviendo 0.3 g en 30 mL de TAE 1X. Posteriormente la solución se vertió sobre el soporte nivelado, colocando el peine en la posición deseada y dejando que solidifique durante 30 min. Se cargaron las muestras en su correspondiente pozo y se sometieron a 110 V por 30 min para su corrimiento. Los corrimientos electroforéticos fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) [54], se visualizaron con luz ultravioleta, en un transiluminador UV y se fotodocumentaron. La longitud de los fragmentos se corroboró empleando un marcador de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder.

7.11 Curva de crecimiento

Las muestras de *B. melitensis* 16 M y *B. melitensis* aislada de humano H18 se sembraron en masivo en placas de agar BrucellaBUAP incubándolas por 48 h a 37 °C con tensión parcial de CO₂. Posteriormente, con el cultivo fresco se inoculó caldo BrucellaBUAP con una DO₆₀₀ de 0.35 a 37 °C con agitación de 150 rpm. El crecimiento se evaluó mediante la lectura a una DO₆₀₀. Las UFC/mL se determinaron mediante la técnica de extendido en placa; realizada cada hora durante 20 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado. De igual manera se determinó el tiempo de generación y número de generaciones.

7.12 Aislamiento de RNA

Para el análisis de la expresión de los genes *opm31*, *sp41*, *sp29*, *fliC*, *fliF*, *virB2*, *aiBP* y *vjbR*, se obtuvieron alícuotas de la curva de crecimiento a las 2, 6, 8

y 12 h, que corresponden a la etapa temprana y tardía de la fase exponencial de crecimiento.

RNA total se extrajo a partir de 35 mL de cultivo en las fases de crecimiento indicadas, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100 µl de TE y lisozima (0.4 mg/mL), posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 5 mL de TRIzol, agitando vigorosamente. Después se incubó 10 min a 65°C, se adicionó 1 mL de cloroformo y se agitó, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación se adicionaron 2 mL de 2-propanol a la fase acuosa y las muestras se almacenaron durante 30-60 min a -70°C. Después se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C, el botón se lavó con etanol al 75%. El sobrenadante obtenido se descartó y el botón se secó a temperatura ambiente por 10-15 min. El RNA se resuspendió en 100 µL de agua libre de RNasa [8]. La calidad e integridad de las muestras de RNA se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría $DO_{280/260}$.

La cuantificación del RNA total se realizó por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda 260 nm y 280 nm. Para determinar la concentración se consideró $1DO_{260}: 40 \mu\text{g/ml}$ [54].

7.13 Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se realizó en un tubo de eppendorf de PCR donde se mezcló 1µg de RNA con el oligo de T (dT) y el Random Primers, se calentó a 70 °C durante 5 min. Se hizo un enfriamiento rápido en hielo por 5 min.

Se corrieron de igual manera un control negativo en el que se incubó solamente oligonucleótidos hexámeros aleatorios y oligonucleótidos dT con agua libre RNAasa y otro control positivo en el cual se incubó 1 µg de 1.2Kb Kanan positiv con oligonucleótidos dT según las recomendaciones del fabricante.

La mezcla para la retrotranscripción se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción empleada en la retrotranscripción

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN FINAL | VOLUMEN (μL) |
|----------------------------------|---------------------|---------------------------|
| ImProm-II™ Reaction Buffer | 1X | 1 |
| MgCl ₂ | 25 mM | 0,5 |
| dNTP mix | 1 mM | 1 |
| Oligo (dT) | 0.5 μM | 0,5 |
| ImProm-II™ Reverse Transcriptase | 5 U | 1 |
| RNAsa inhibidor | 1.6 U | 0.4 |
| Random Primers | 0.5 μM | 0,5 |
| RNA | 1 μg | 8 |
| Agua libre de nucleasas | | 7.1 |
| Volumen final | | 20 |

La síntesis de cDNA se llevó a cabo sometiendo la reacción a 25 °C por 5 min y luego 42 °C por 60 min. La reacción terminada se almacenó a -70 °C para su posterior uso.

7.14 PCR para la identificación de la expresión genética

Las reacciones de PCR se realizaron con una mezcla de reacción de 25 μl que contiene 1 μL de cDNA y 1 μL de cada uno de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados para el ensayo de PCR se enumeran en la Tabla 7. Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min, y la extensión a 72 °C durante 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 10 min.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| No. de Entrada (GenBank) | Gen diana | Sentido 5´-3´ | Amplicon pb | Referencia |
|-----------------------------|--------------------------------|--|----------------|-------------------------------|
| BMEII0625 | <i>ugpB</i> (SP41) | F ATGTTACCCGTCTGATCAC R TATTGAGCTGCGGCGATTGCT | 1,301 | Este trabajo |
| DK63_2141 | <i>vjbR</i> | F CCGCTACGTAACGCATACCT R CGGGTCAATGGCAAAGTAGT | 139 | Uzureau <i>et al.</i> , 2010 |
| DK63_2093 | <i>virB2</i> | F GCAAAAAGTGCTGGACTTGCTA R CCATCTTGTAACCGGACCAGAT | 80 | Terwagne <i>et al.</i> , 2013 |
| BMEII0150 | <i>fliC</i> | F CTTCGTACAATCGTTCCGGT R CCATGGTCTTCGCATCAGT | 81 | Terwagne <i>et al.</i> , 2013 |
| DK63_3094 | <i>fliF</i> | F CCTACGAGACGCTCTATGTCTG R AAGGGAATGCCAGCTTCAC | 82 | Terwagne <i>et al.</i> , 2013 |
| BMEII0844 | <i>omp31</i> | F GCTTTGACAAGGAAGACAACG R CAGGTTGAACGCAGACTTGA | 317 | Ratushna |
| DK63_2805 | <i>rbsB</i> (SP29) | F GGTCTGGGTTATAAGGCTGT R TACTGTTCCAGAACGAACGG | 778 | Este trabajo |
| DK63_3044 | <i>aibP</i> | F AACAATTGGGCGGTGGA R AATTCATAGGCCTGATGC | 81 | Terwagne <i>et al.</i> , 2013 |
| BMEII0861 | <i>glucose 1-dehydrogenase</i> | F AAATACGCCATCGACCAGAT R ACTTGCCGACATGGCTATG | 82 | Uzureau <i>et al.</i> , 2010 |

8. RESULTADOS

8.1. Mantenimiento y conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas que se emplearon en este estudio fueron activadas de -70 °C y mantenidas en cultivos puros en agar BrucellaBUAP, para su posterior utilización.



Figura 11. Cultivo de *Brucella melitensis* en medio Agar BrucellaBUAP. Las bacterias fueron cultivadas a 37 °C en tensión de CO₂ durante 48 h mediante estría cruzada.

8.2 Confirmación de la identidad de las cepas mediante estudios microbiológicos

Fue necesario confirmar la identidad de las cepas previamente almacenadas, para evaluar su pureza, así como su género y especie. La identificación de las 2 cepas empleadas del género *Brucella* en este estudio se determinó inicialmente mediante la morfología colonial, *Brucella* se caracteriza

por presentar colonias puntiformes circulares, convexas, con bordes regulares y traslucidos amarillentos en medio BrucellaBUAP (Figura 12).

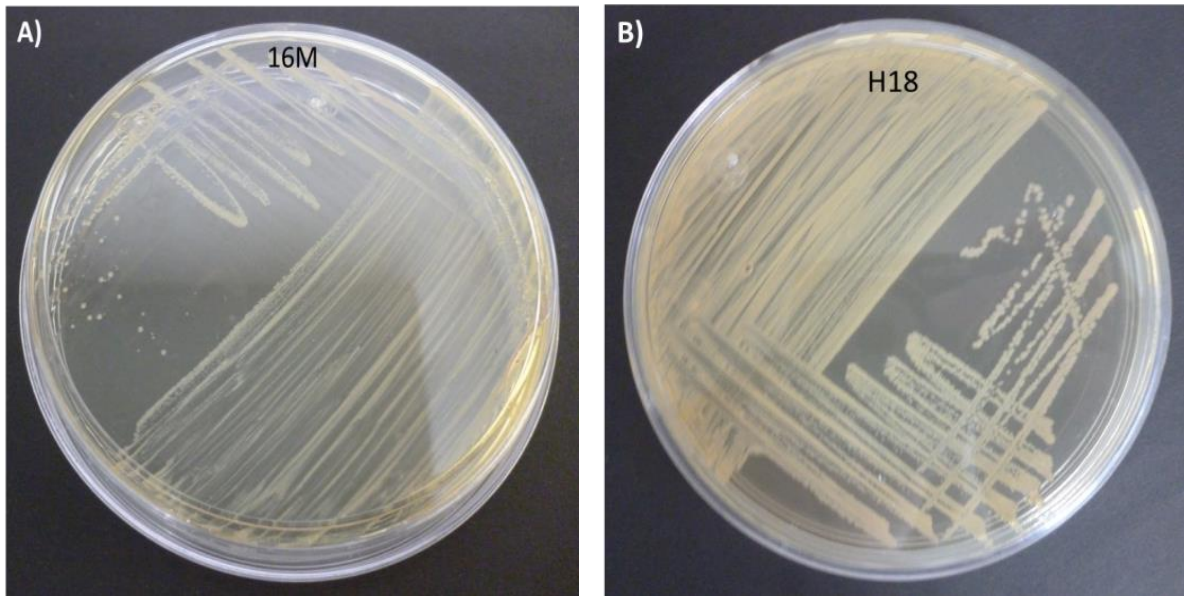


Figura 12. Morfología colonial. A) Cepa *Brucella melitensis* 16M. B) Cepa de *Brucella melitensis* (H18) aislada de sangre completa de un paciente diagnosticado con brucelosis aguda.

También se realizaron tinciones de Gram mediante la cual se observaron bacilos cortos gram negativos (Figura 13), característicos del género *Brucella*. Mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada se observó que estas bacterias resisten la decoloración con ácido acético glacial al 0.5%. (Figura 14).

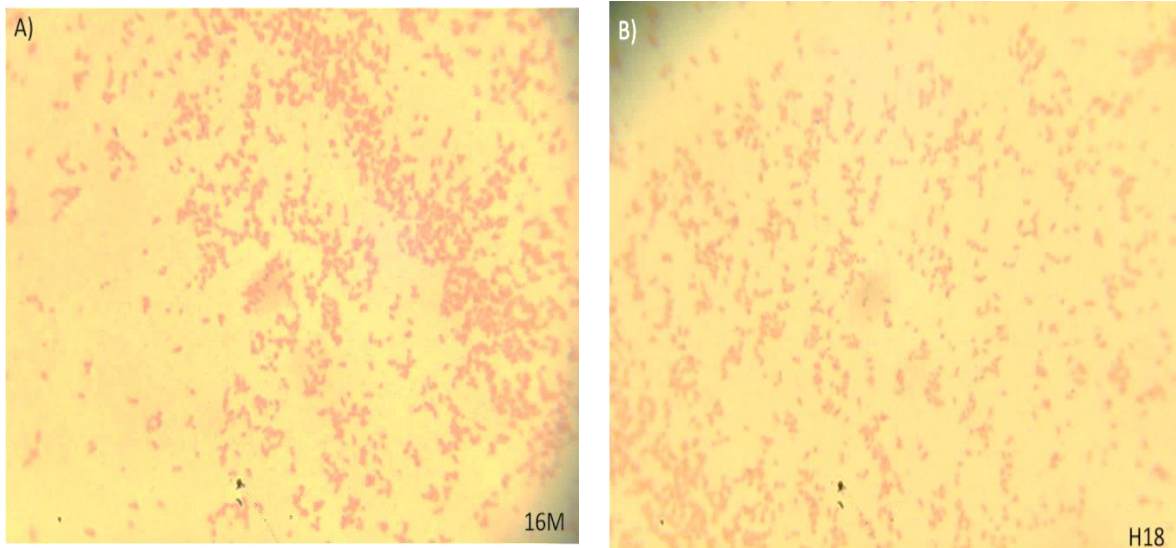


Figura 13. Tinción de Gram. **A)** Cepa de referencia *Brucella melitensis* 16M. **B)** Cepa aislada de humano *Brucella melitensis* (H18).

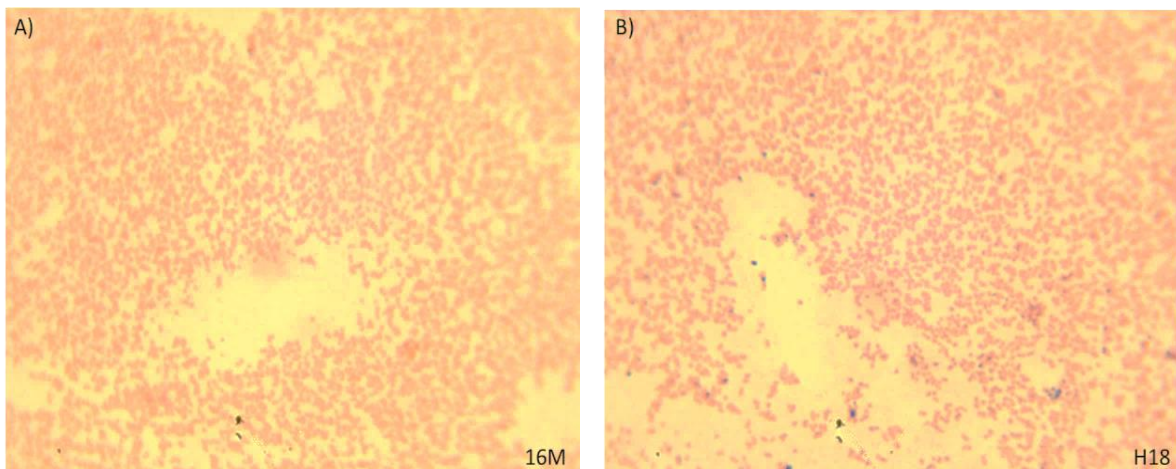


Figura 14. Tinción de Ziehl-Neelsen modificada. **A)** Cepa de referencia *Brucella melitensis* 16M. **B)** Cepa aislada de humano *Brucella melitensis* (H18).

Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas, en las que se obtuvieron los resultados resumidos en la Tabla 8, estos resultados mostraron que las bacterias del género *Brucella* son inmóviles aun cuando tienen genes que codifican para flagelo, no lo expresan libremente, la prueba de indol es negativa, no descarboxilan ornitina (Movilidad Indol Ornitina, MIO); ni descarboxila lisina (Agar Lisina Hierro, LIA), no producen ácido, gas o ácido sulfhídrico, no fermentan

azúcares como glucosa, lactosa o sacarosa (Triple Azúcar Hierro, TSI), (Figura 15).

Tabla 8. Resultados de pruebas bioquímicas de las cepas empleadas

| Cepas de <i>Brucella</i> | Prueba bioquímica | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|---|---|----|-----|------------------|-----|-----|---|------|---------|
| | MIO | | | | TSI | | | LIA | | Urea | Citrato |
| | M | I | O | S | F | H ₂ S | Gas | S | F | | |
| <i>B. melitensis</i> 16M | - | - | + | SN | SN | - | - | K | A | + | - |
| <i>B. melitensis</i> H18 | - | - | + | SN | SN | - | - | K | A | + | - |

Resultados positivos de pruebas bioquímicas para identificar *B. melitensis*. Movilidad (M), Indol (I), Ornitina (O), Superficie (S), Fondo (F), Alcalino (K), Ácido (A), Sin cambio (SN) .

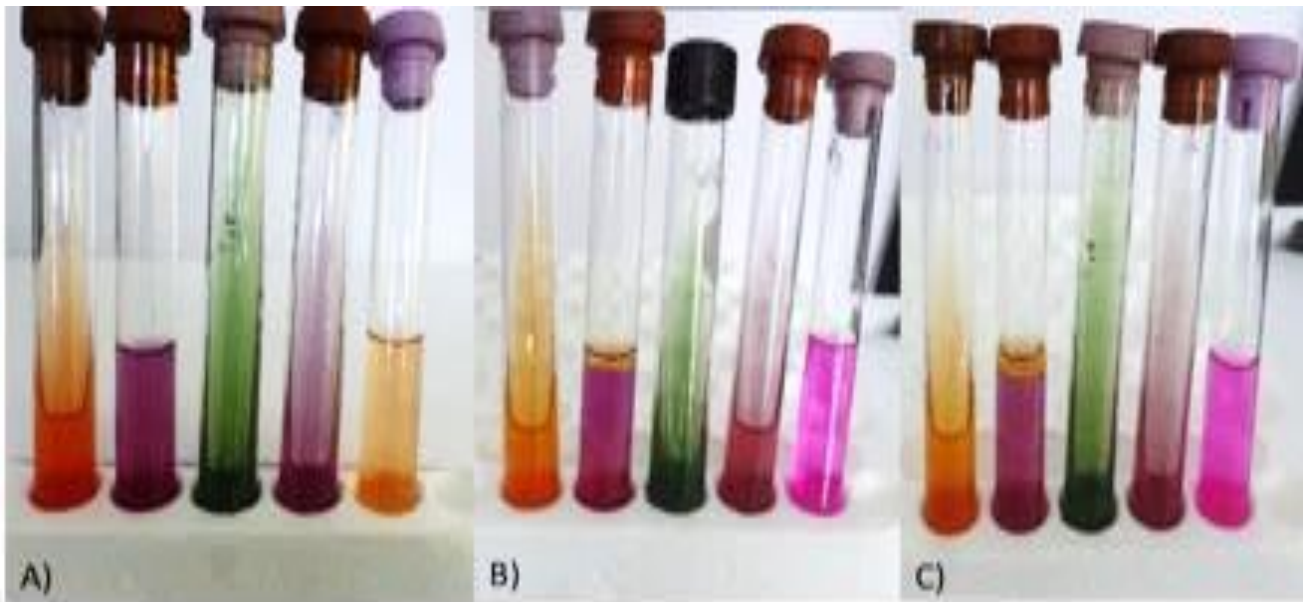


Figura 15. Identificación de *Brucella* mediante Pruebas Bioquímicas. A) Pruebas bioquímicas sin inocular (TSI, MIO, Citrato LIA y Urea de Chistensen). **B)** Resultados positivos de pruebas bioquímicas para *Brucella melitensis* 16M. **C)** Resultados positivos de pruebas bioquímicas para *Brucella melitensis* (H18).

Durante el proceso de confirmación de las especies del género *Brucella* es ampliamente recomendado evaluar su capacidad para crecer en presencia de los colorantes tionina, fuscina, safranina y violeta de etilo a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que *B. melitensis* crece en presencia de los colorantes tionina a las concentraciones de 1:25 000 y 1:50 000, fuscina 1:50 000, safranina 1:10 000 y violeta de etilo (Figura 16). El crecimiento positivo se toma en cuenta a partir de la tercera línea del cultivo sembrado.

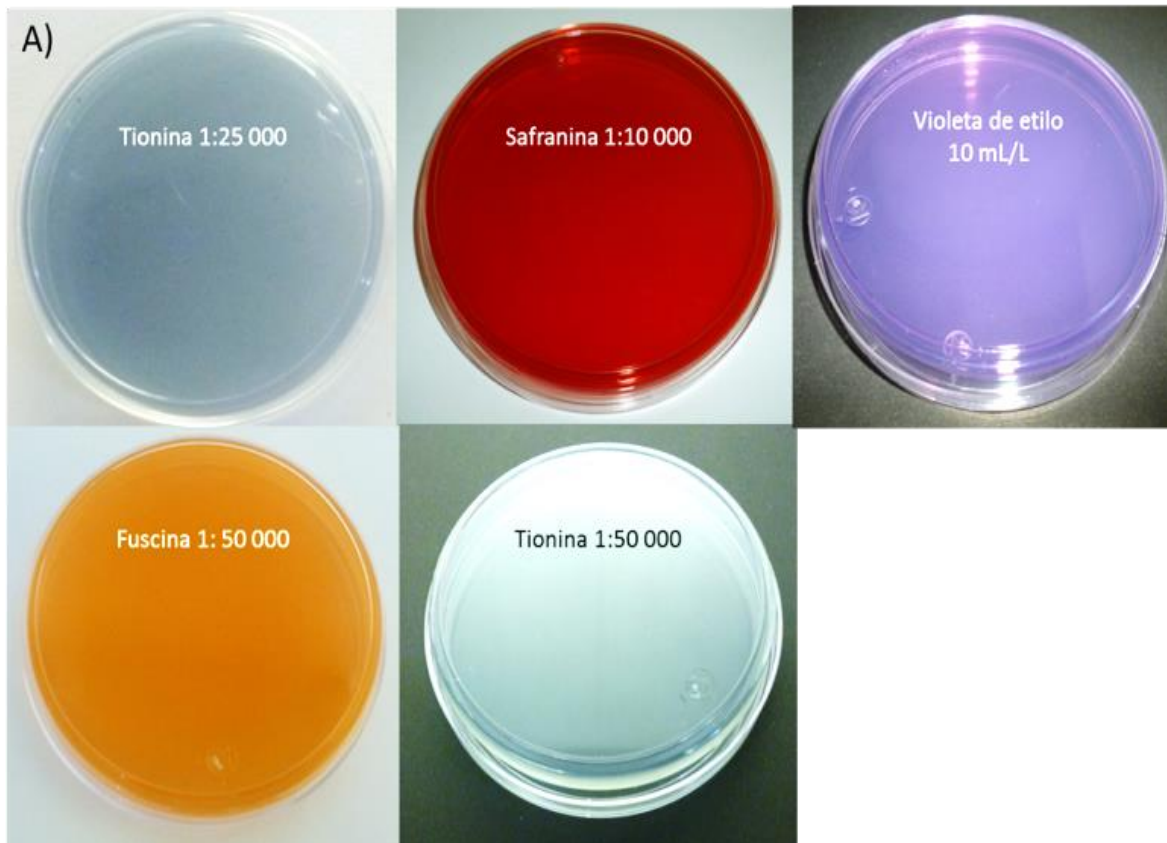


Figura 16. A. Identificación de *Brucella* mediante crecimiento en presencia de colorantes.

Medios sin inocular preparados con colorantes a diferentes concentraciones. Tionina (1:25 000 y 1:50 000), en fuscina (1: 50 000), safranina (1:10 000) y violeta de etilo.

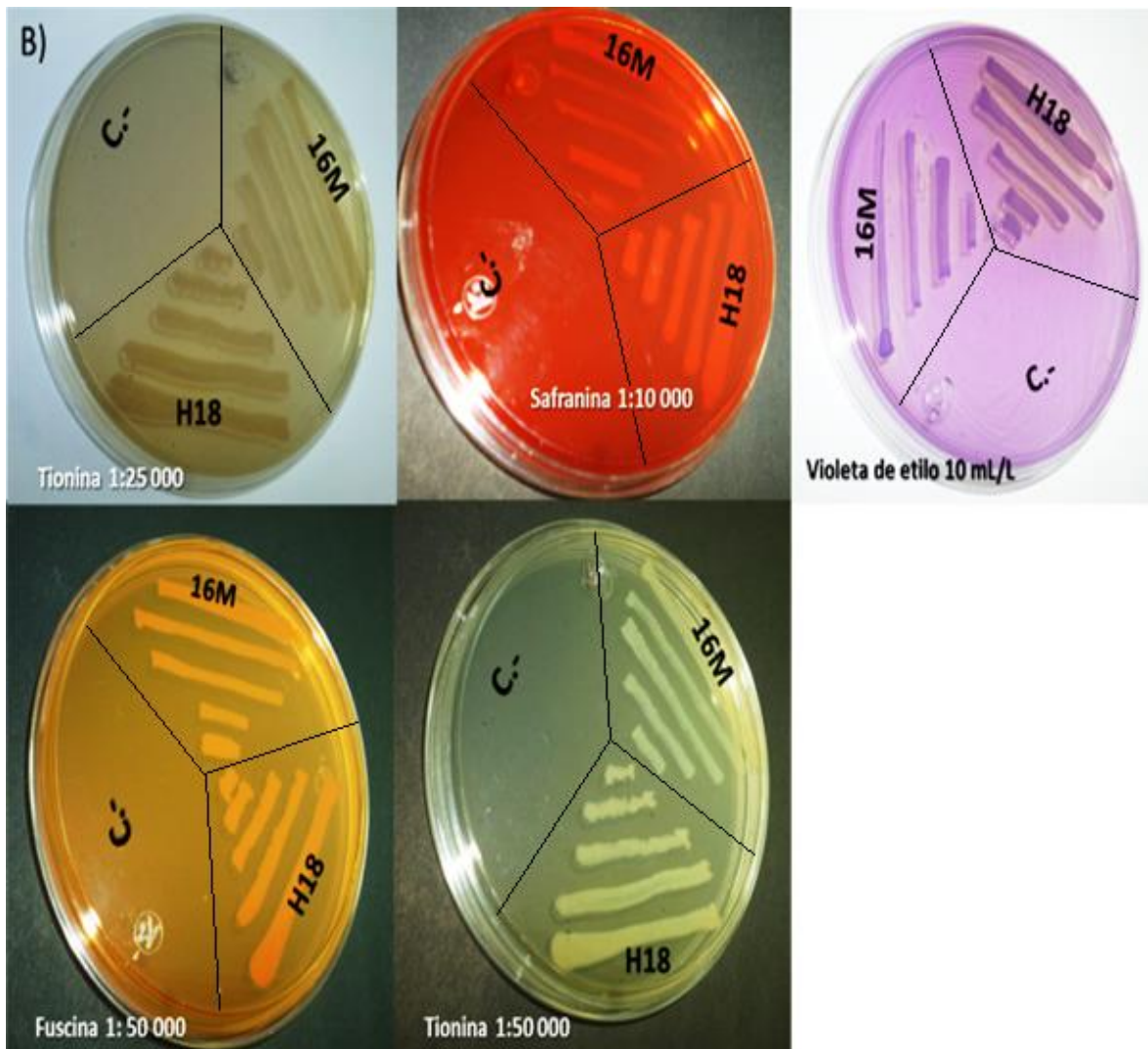


Figura 16. B. Identificación de *Brucella* mediante crecimiento en presencia de colorantes. Medios inoculados, se inocula primero el Control negativo (C.-) con agua esteril realizando 5 estrias desendentes consecutivas, seguido de la cepa *B. melitensis* 16M realizando de igual manera 5 estrias con una suspensión bacteriana realizada con agua esteril con 1 DO, finalmente la cepa *B. melitensis* H18 se inocula de la misma manera que la cepa *B. melitensis* 16M.

8.3 Identificación molecular de género y especie mediante PCR múltiple *Brucella*-ladder v2.0

Finalmente, las cepas estudiadas fueron identificadas mediante un ensayo de PCR múltiple, el cual permite diferenciar a las especies del género *Brucella* en base al patrón de bandas generado por su capacidad para amplificarlas en presencia de 9 pares de oligonucleótidos, de acuerdo a la técnica descrita por

López Goñi *et al.*, en el 2011 [23]. *B. melitensis* presenta un patrón típico caracterizado por la amplificación de 6 fragmentos detectados de 1,682 pb, 1,071 pb, 794 pb, 587 pb, 450 pb y 150 pb, los cuales fueron identificados mediante la separación de los amplicones obtenidos del ensayo de PCR, por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 17, en base a esto se determinó la especie-especifica de ambas cepas como *Brucella melitensis*.

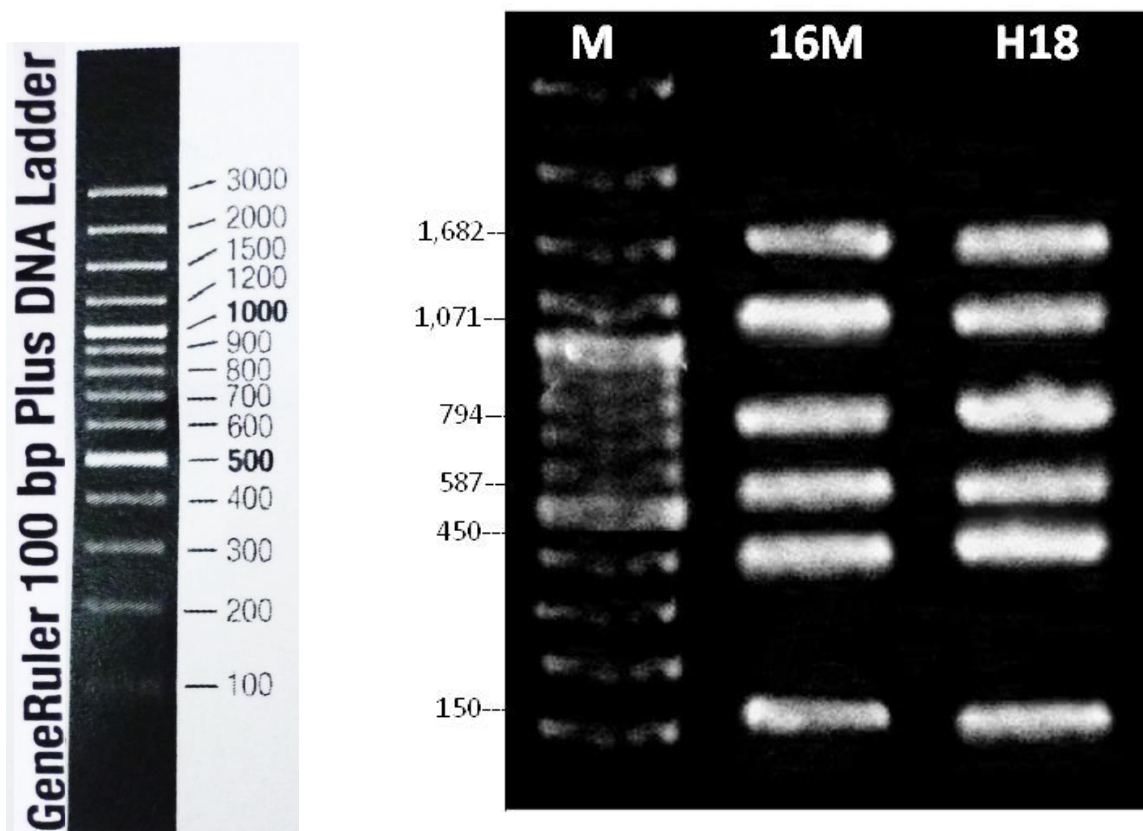


Figura 17. Identificación de las cepas por PCR múltiple: Brucella-ladder v2.0. Del lado izquierdo se muestra el Marcador de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder. En el lado derecho se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1%, se muestra el carril M: marcador y se muestran los amplicones obtenidos a partir de ADN de *B. melitensis* 16M (carril 16M) y *B. melitensis* H18 (carril H18). Fragmentos observados: 1 682, 1 071, 794, 587, 450 y 150pb.

8.4 Análisis de la expresión genes relacionados con la virulencia y QS

8.4.1 Estandarización de T_m para los oligonucleótidos empleados en el ensayo de PCR

Con el objetivo de realizar el ensayo de PCR para determinar la expresión genética, se evaluó el valor de T_m óptimo a emplear en esta determinación. Debido a que la temperatura de alineamiento (T_m) es la temperatura a la cual los cebadores se alinean con el cDNA para unirse a una región específica y producir fragmentos de reacción específicos, y su valor está en función contenido de G-C y la longitud de los oligonucleótidos, se realizaron ensayos de PCR con T_m de 55 °C, 58 °C y 60 °C.

Los resultados mostraron una mejor amplificación de los genes *vjbR*, *virB2*, *fliC*, *fliF*, *aibP*, *omp31*, *ugpB* (SP41), *rbsB* (SP29) y *glucose 1-dehydrogenase* cuando se empleó la T_m de 58°C (Figura 18, B), a diferencia de los resultados obtenidos al emplear como T_m de 55 °C en donde se amplificó *rbsB* (SP29) con un fragmento de 778 pb, pero no se identificaron los otros fragmentos (Figura 18, A), y cuando el ensayo se realizó con la T_m de 60 °C se identificó inespecificidad en la amplificación (Figura 18, C).

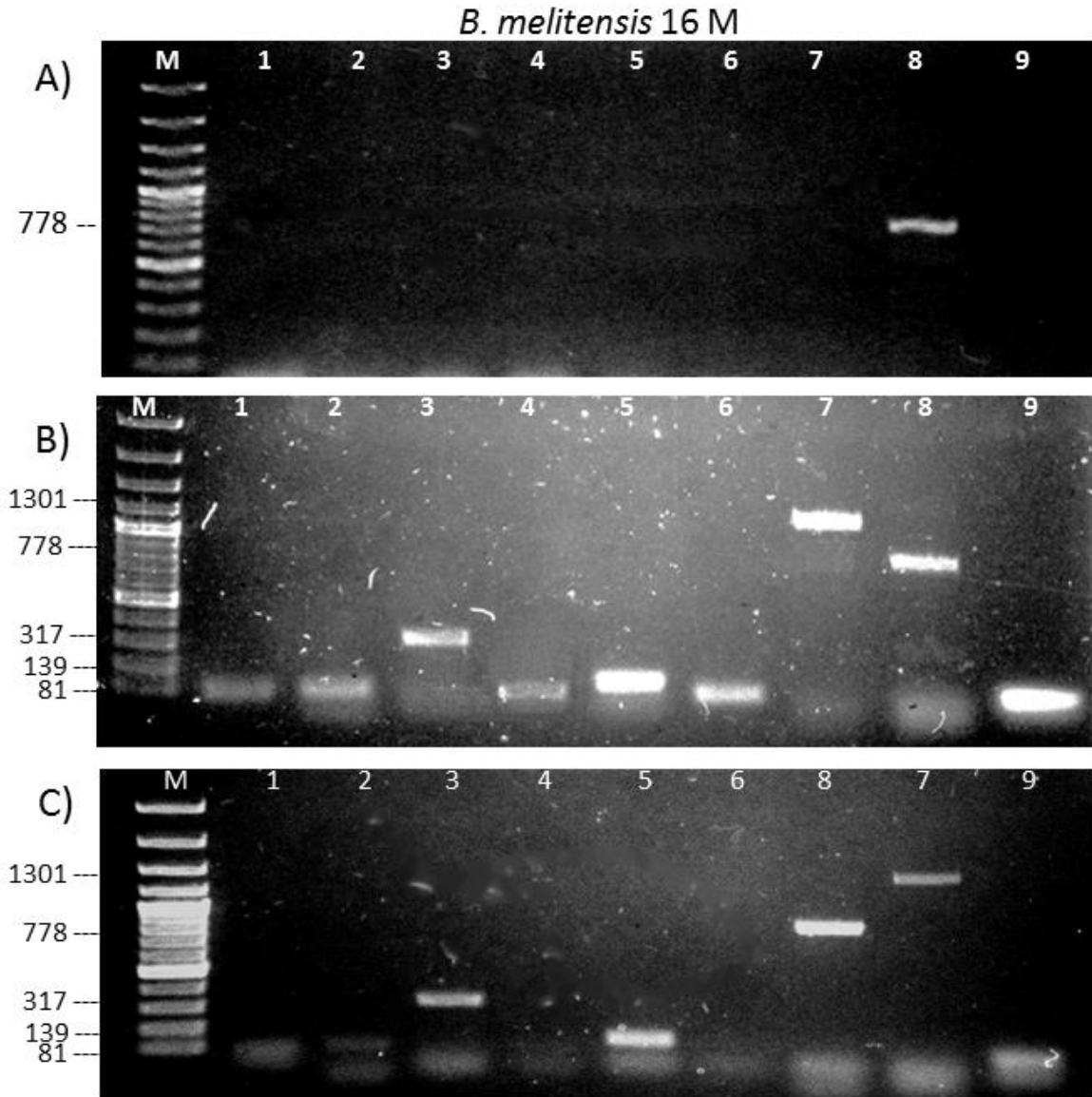


Figura 18. Evaluación del ensayo de PCR por modificación del valor de la Temperatura de alineamiento (Tm). **A)** Corrimiento electroforético del ensayo de PCR realizado con Tm= 55 °C. **B)** Corrimiento electroforético del ensayo de PCR realizado con Tm= 58 °C. **C)** Corrimiento electroforético del ensayo de PCR realizado con Tm=60 °C. Para los tres ensayos se empleó DNA de la cepa *B. melitensis* 16M. En todas las figuras: Línea M, marcador de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder, Línea 1, *fliC* (81 pb); Línea 2, *fliF* (82 pb); Línea 3, *omp31*(317 pb); Línea 4, *aibP* (81 pb); Línea 5, *vjbR* (139 pb); Línea 6, *ugpB* (1,301 pb); Línea 7, *rbsB* (778 pb); Línea 8, *virB2* (80 pb); carril 9: *glucosa 1-deshidrogenasa* (82).

8.4.2 Evaluación de la expresión de genes involucrados con la virulencia y QS en *B. melitensis*

Debido a que se ha demostrado que el QS participa en el control de la expresión de genes relacionados con la virulencia de *Brucella* se estudió la expresión de algunos de estos genes en la curva de crecimiento, particularmente a lo largo de la fase exponencial donde se ha referido la activación de QS y genes relacionados [8].

Inicialmente se determinó la curva de crecimiento para la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y la cepa aislada de humano *B. melitensis* H18, cultivando las cepas en caldo BrucellaBUAP a lo largo de 20 h. La curva de crecimiento bacteriano se estableció en base al registro de la densidad bacteriana mediante espectrofotometría a una DO_{600} , obteniéndose el gráfico que se muestra en la Figura 19 A, en donde se identificaron las fases de crecimiento bacteriano: a) etapa temprana de la fase exponencial de las 2-4 h, b) etapa media de la fase exponencial de 5-9 h, c) etapa tardía de la fase exponencial de las 10-12 h y d) fase estacionaria de las 14-17 h. El desarrollo bacteriano lo largo de la curva de crecimiento, también se estableció mediante la determinación de las UFC/mL (Figura 19 B), en la cual se señalan las diferentes fases. No se presentaron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de ambas cepas, de acuerdo al análisis estadístico realizado mediante la prueba T de student.

Posteriormente, se determinaron los patrones de expresión genética a lo largo de la fase logarítmica de la curva de crecimiento, las figuras correspondientes al corrimiento de los amplicones obtenidos se muestran al final de los resultados (Figuras 24 y 25, A-D), la densitometría obtenida de las bandas identificadas se normalizó con respecto a la expresión del gen constitutivo, el cual fue amplificado en las mismas condiciones que los amplicones de los genes seleccionados, y separado en el mismo gel de corrimiento electroforético en que

eran separados los productos de RT-PCR. Los resultados se muestran en las gráficas que se describen a continuación.

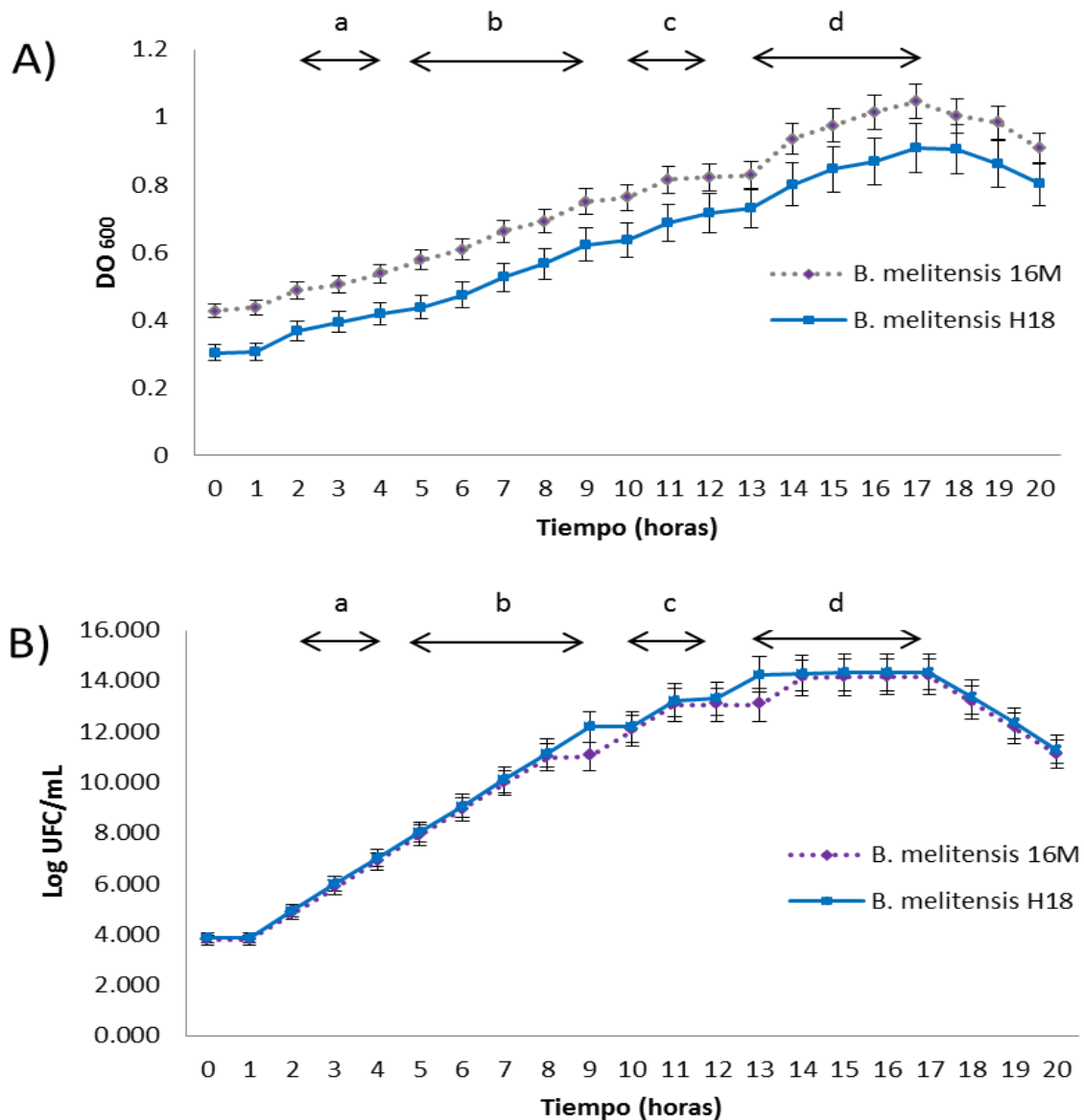


Figura 19. Curva de crecimiento de *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18. Las cepas fueron cultivadas en caldo BrucellaBUAP, se identifican cuatro fases distintas en la curva de crecimiento señaladas: a) etapa temprana de la fase exponencial, b) etapa media de la fase exponencial, c) etapa tardía de la fase exponencial y d) fase estacionaria. **A)** Determinación de la densidad óptica a 600 nm registrada a lo largo de la curva de crecimiento a intervalos de 1 h. **B)** Determinación de UFC/mL a lo largo de la curva de crecimiento a intervalos de 1 h. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El gen *vjbR* se expresó en la fase exponencial en ambas cepas, sin embargo, disminuyó drásticamente al final de esta fase (12 h) en la cepa de referencia (16M), a diferencia de la cepa aislada de humano (H18) ($P < 0.05$ en la prueba t de student), la cual presentó una ligera disminución la expresión de este gen (Figura 20). La elevada expresión de este gen, también ha sido reportada por otros autores, durante el crecimiento exponencial, así como su disminución hacia la entrada de la fase estacionaria [5, 7, 51, 55, 56].

Debido al conocido papel del regulador transcripcional VjbR sobre la expresión del operon *virB*, el cual está conformado por 12 genes involucrados en la producción del T4SS, en este trabajo se evaluó la expresión de *virB2*, el patrón de expresión en ambas cepas fue similar con respecto al pico máximo de expresión que se presentó a las 8 h (etapa media de la fase exponencial), que desciende totalmente al final de la fase logarítmica en la cepa de referencia a diferencia de la cepa aislada de humano, en donde el descenso es muy ligero ($p < 0.05$). También destaca que la expresión de *virB2* fue mayor en la cepa aislada de humano que en la de referencia (2, 6 y 8 h, $p < 0.05$) (Figura 20).

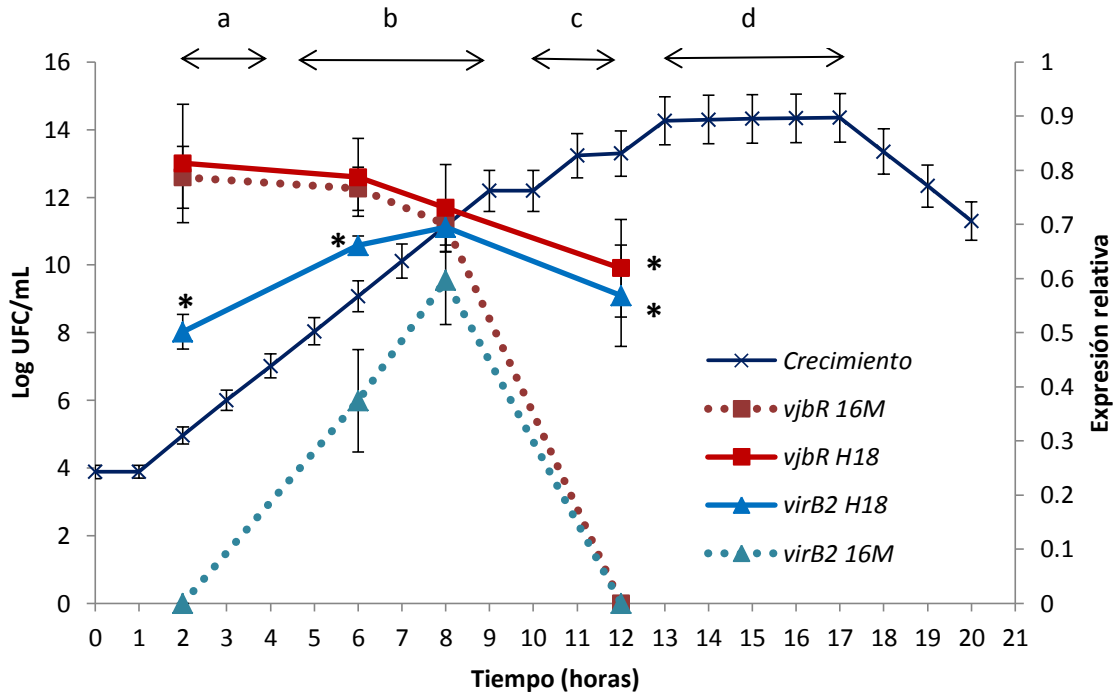


Figura 20. Expresión relativa de *vjbR* y *virB2* durante la fase logarítmica en las cepas *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18. Expresión relativa de mRNA de los genes *vjbR* (cuadrado) y *virB2* (triángulo) durante el crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M (línea punteada) y *B. melitensis* H18 (línea continua) determinada mediante RT-PCR. Las barras de error representan la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado. Se muestra la curva de crecimiento vegetativo de *B. melitensis* H18 (cruz, línea continua) en medio enriquecido, se indican las etapas de la curva de crecimiento: a) etapa temprana de la fase exponencial, b) etapa media de la fase exponencial, c) etapa tardía de la fase exponencial y d) fase estacionaria. Las diferencias significativas entre la expresión de la cepa de referencia y la cepa aislada de humano se indican: * $P < 0.05$.

Estos resultados muestran que la expresión de *vjbR* se podría relacionar con el estímulo de la expresión de *virB2*, lo que sugiere que la presencia del regulador transcripcional VjbR, sugerida por su elevada expresión durante este periodo de la curva de crecimiento, podría influir positivamente la expresión del gen *virB2*, como lo han demostrado previos reportes [51, 57].

Aunque el género *Brucella* es descrito como no móvil, su genoma posee todos los componentes necesarios para producir el aparato flagelar el cual se ha detectado por microscopía electrónica de barrido y se ha reportado como un factor de virulencia importante en la fase exponencial [7]. En este trabajo se analizaron dos genes del aparato flagelar *fliF* que codifica para el anillo MS y *fliC* responsable de producir flagelina, los resultados mostraron que ambos genes se expresan en la fase exponencial, observándose un pico máximo de producción para estos dos genes a las 6 h en ambas cepas, y de modo similar al patrón de expresión que se identificó para los genes *vjbR* y *virB2*, también se aprecia que la expresión de ambos genes flagelares disminuye hacia el final de la fase logarítmica (Figura 21), sin embargo, esta disminución es total para la cepa de referencia y ligera para la cepa aislada de humano ($p < 0.05$), además, se aprecia que esta cepa tiene mayor capacidad para expresar a estos genes, por la abundancia identificada en los productos de RT-PCR en la cepa aislada de humano, en comparación con la de referencia a las 8 y 12 h ($p < 0.05$).

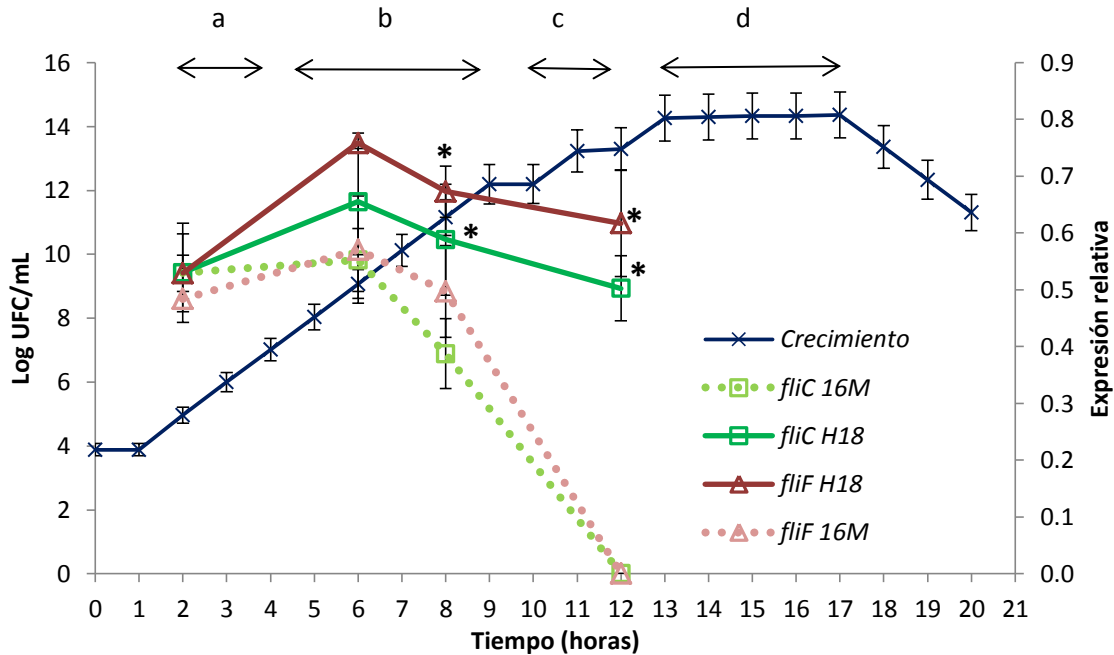


Figura 21. Expresión relativa de *fliC* y *fliF* durante la fase logarítmica en las cepas *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18. Expresión relativa de mRNA de los genes *fliC* (cuadrado) y *fliF* (triángulo) durante el crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M (línea punteada) y *B. melitensis* H18 (línea continua) determinada mediante RT-PCR. Las barras de error representan la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado. Se muestra la curva de crecimiento vegetativo de *B. melitensis* H18 (cruz) en medio enriquecido, se indican las etapas de la curva de crecimiento: a) etapa temprana de la fase exponencial, b) etapa media de la fase exponencial, c) etapa tardía de la fase exponencial y d) fase estacionaria. Las diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa aislada de humano se indican: * $P \leq 0.05$.

La expresión de *aibP* ha sido relacionada con la disminución de la abundancia de la molécula señal AHL, la cual se conoce como un importante activador del sistema QS, los resultados muestran que en ambas cepas, su expresión tiende a incrementar hacia el final de la fase logarítmica (Figura 22), este efecto se ve relacionado con la tendencia a la disminución de la expresión de *vjbR* y *virB2* (Figura 20). Fue interesante apreciar, que si bien, en ambas cepas la expresión de *aibP* es nula al inicio de la fase logarítmica (2 h), la activación de su

expresión es más temprana en la cepa de referencia que en la cepa aislada de humano (6 h) ($p < 0.05$), lo cual sugiere que el apagado del switch del sistema QS, pudiera presentarse más tardíamente en la cepa humana, posiblemente con el objetivo de mantener la expresión de factores de virulencia durante un tiempo más prolongado. Así también, el incremento de expresión de *aibP* hacia la parte final de la fase logarítmica, observado en la cepa aislada de humano sugiere que la disminución ligera observada en esta fase, con respecto a los genes *vjbR* y *virB2*, (Figura 20), probablemente continúe acentuándose en tiempos posteriores al evaluado (12 h), sin embargo, estos resultados deberán comprobarse en estudios posteriores.

También, se evaluó la expresión de genes cuyos productos proteicos han sido relacionados con el mantenimiento de la integridad de la membrana, y con procesos de adherencia e invasión, como *omp31*, *ugpB* y *rbsB*. La expresión de *omp31* se mantuvo constante en los tiempos evaluados durante la fase exponencial (Figura 22), y fue similar en ambas cepas, lo que señala que *Brucella*, en las condiciones evaluadas, en presencia del medio enriquecido empleado, requiere esta expresión, probablemente en función de las necesidades de la producción de Omp31 como proteína importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana [56]. El patrón de expresión del gen *rbsB* fue similar a la del gen *omp31*, debido a que no se identificaron variaciones importantes en los tiempos evaluados de la fase exponencial, en ambas cepas (Figura 23). Es posible que las condiciones de cultivo que se utilizaron en este estudio, no estimulen cambios en la expresión de estos genes, pues en condiciones estresantes, al menos para *omp31*, se ha identificado que puede tener un papel en la producción y/o exporte de exopolisacárido, y su expresión es parcialmente promovida por VjbR y el operon *virB*, de este modo, podemos considerar que ambos genes no son de expresión constitutiva [38], no obstante, su expresión deberá ser explorada en condiciones estresantes y en distintas fases del cultivo.

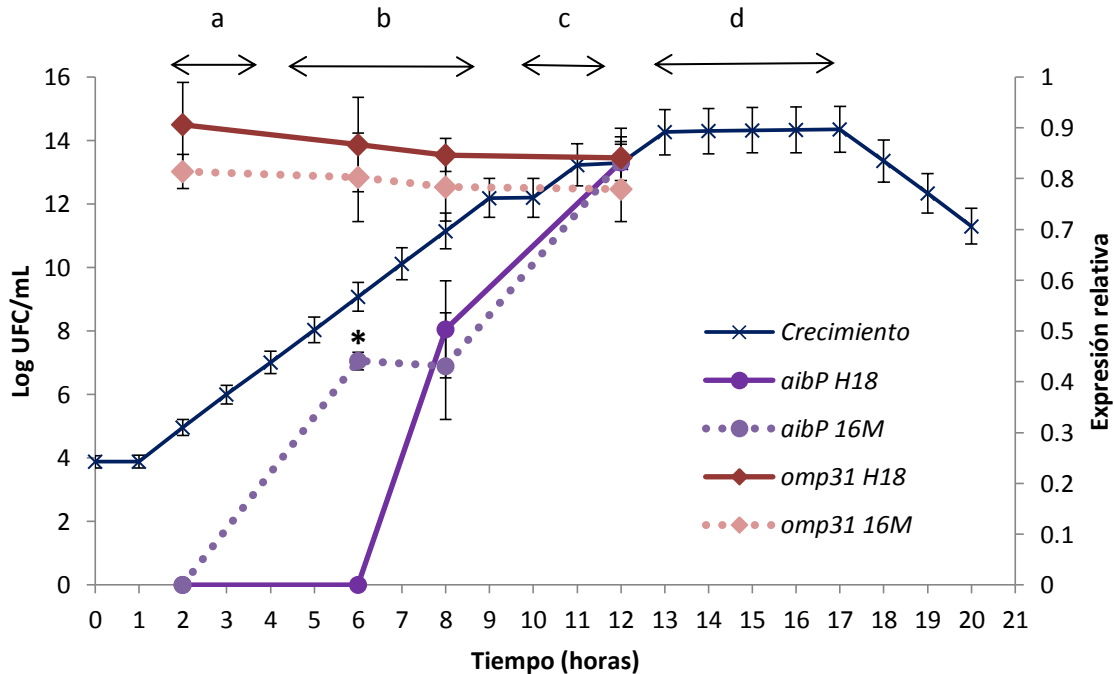


Figura 22. Expresión relativa de *aibP* y *omp31* durante la fase logarítmica en las cepas *B. melitensis* 16M *B. melitensis* H18. Expresión relativa de mRNA de los genes *aibP* (círculo) y *omp31* (rombo) durante el crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M (línea punteada) y *B. melitensis* H18 (línea continua) determinada mediante RT-PCR. Las barras de error representan la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado. Se muestra la curva de crecimiento vegetativo de *B. melitensis* H18 (cruz, línea continua) en medio enriquecido, se indican las etapas de la curva de crecimiento: a) etapa temprana de la fase exponencial, b) etapa media de la fase exponencial, c) etapa tardía de la fase exponencial y d) fase estacionaria. Las diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa aislada de humano se indican: * $P < 0.05$.

La expresión del gen *ugpB* fue variable en la fase logarítmica, como se identificó en ambas cepas por la presencia de dos picos máximos de expresión a las 2 y 8 h, y un marcado descenso a las 6 y 12 h, siendo más ligero en la de referencia a las 6 h ($p \leq 0.05$) (Figura 23). Estos resultados, nos sugieren una modulación de su expresión probablemente en función de su producto proteico relacionado con la conformación de un sistema de transporte de membrana de tipo ABC que une glicerol fosfato, de acuerdo a la información de la secuencia

predicha, lo que señala que podría expresarse diferencialmente de acuerdo a la disponibilidad de algún sustrato específico, hasta la fecha no identificado.

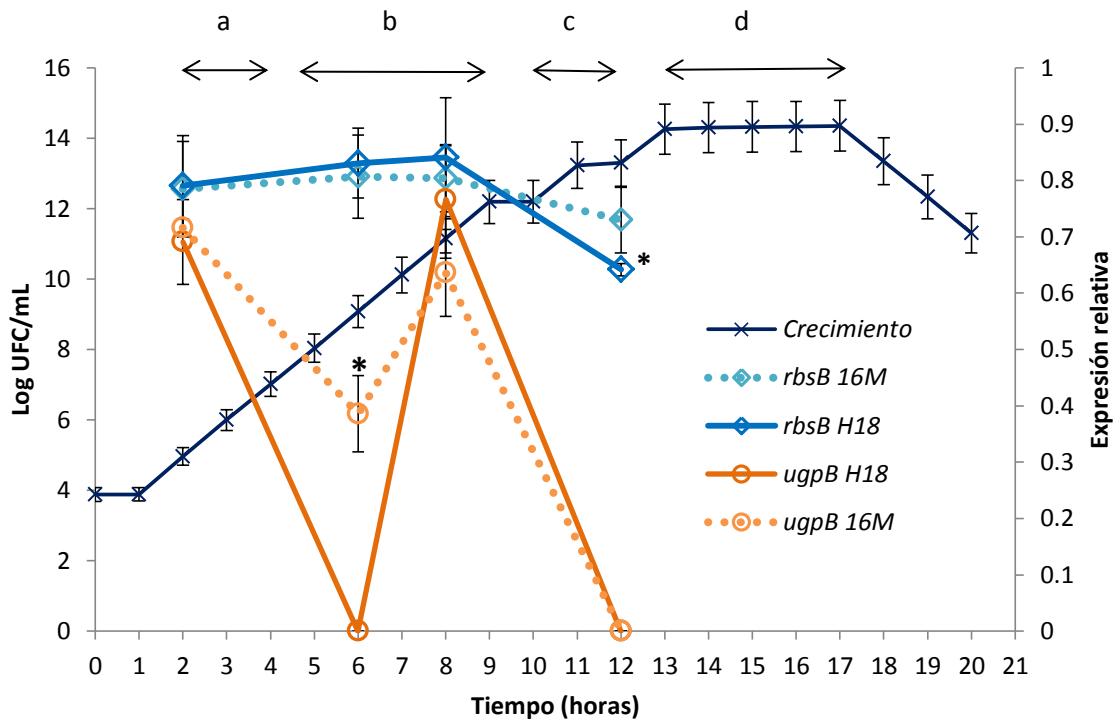


Figura 23. Expresión relativa de *rbsB* (SP29) y *ugpB* (SP41) durante la fase logarítmica en las cepas *B. melitensis* 16M *B. melitensis* H18. Expresión relativa de mRNA de los genes *rbsB* (rombo) y *ugpB* (círculo) durante el crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M (línea punteada) y *B. melitensis* H18 (línea continua) determinada mediante RT-PCR. Las barras de error representan la desviación estándar de los ensayos realizados por triplicado. Se muestra la curva de crecimiento vegetativo de *B. melitensis* H18 (cruz) en medio enriquecido, se indican las etapas de la curva de crecimiento: a) etapa temprana de la fase exponencial, b) etapa media de la fase exponencial, c) etapa tardía de la fase exponencial y d) fase estacionaria. Las diferencias significativas entre la cepa de referencia y la cepa aislada de humano se indican: * $P \leq 0.05$.

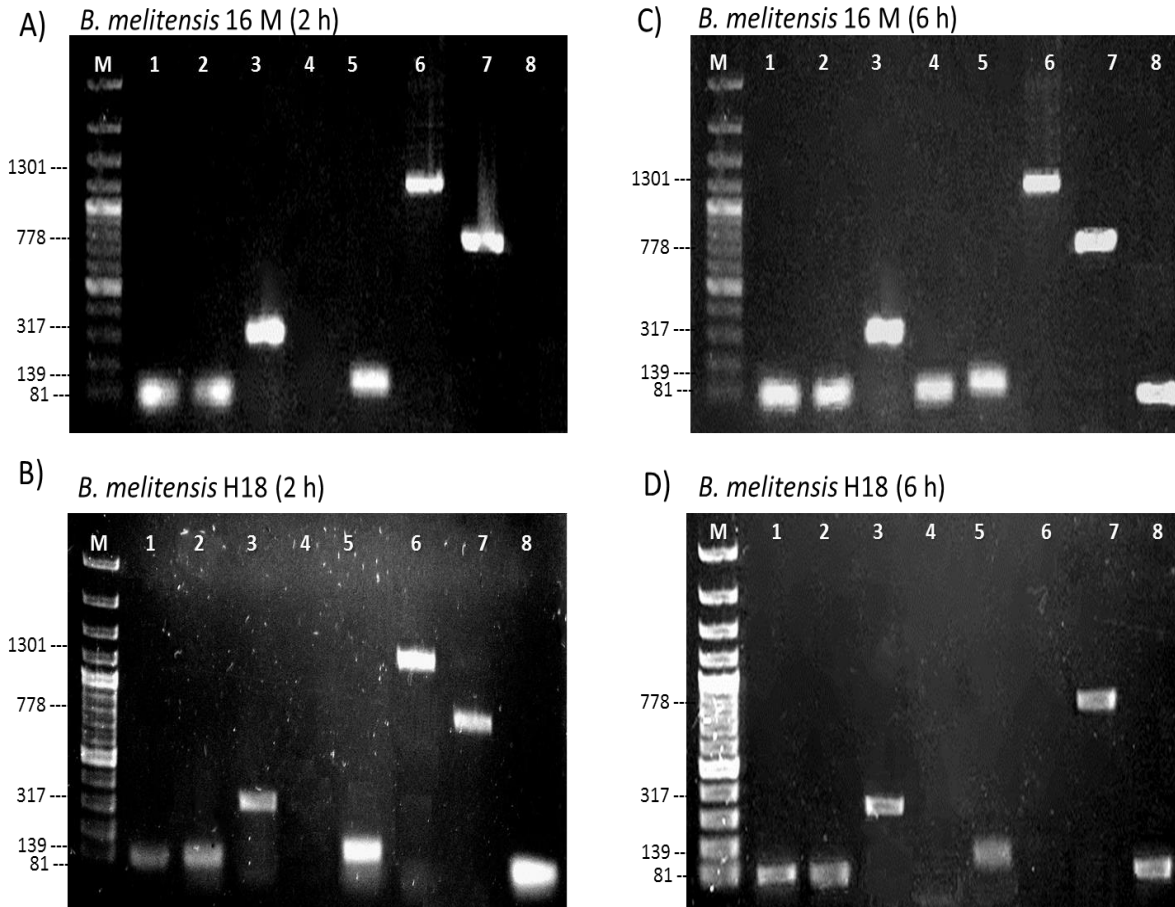


Figura 24. Expresión de genes relacionados con la virulencia y el QS. En todas las figuras: Línea M: marcador de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder; Línea 1, *fliC* (81 pb); Línea 2, *fliF* (82 pb); Línea 3, *omp31* (317 pb); Línea 4, *aibP* (81 pb); Línea 5, *vjbR* (139 pb); Línea 6, *ugpB* (1301 pb); Línea 7, *rbsB* (778 pb); Línea 8, *virB2* (80 pb). **A)** Expresión genética de *B. melitensis* 16M a las 2 h de la curva de crecimiento (etapa inicial de la fase exponencial). **B)** Expresión genética de *B. melitensis* H18 a las 2 h (etapa inicial de la fase exponencial). **C)** Expresión genética de *B. melitensis* 16M a las 6 h de la curva de crecimiento (etapa media de la fase exponencial). **D)** Expresión genética de *B. melitensis* H18 a las 6 h de la curva de crecimiento (etapa media de la fase exponencial).

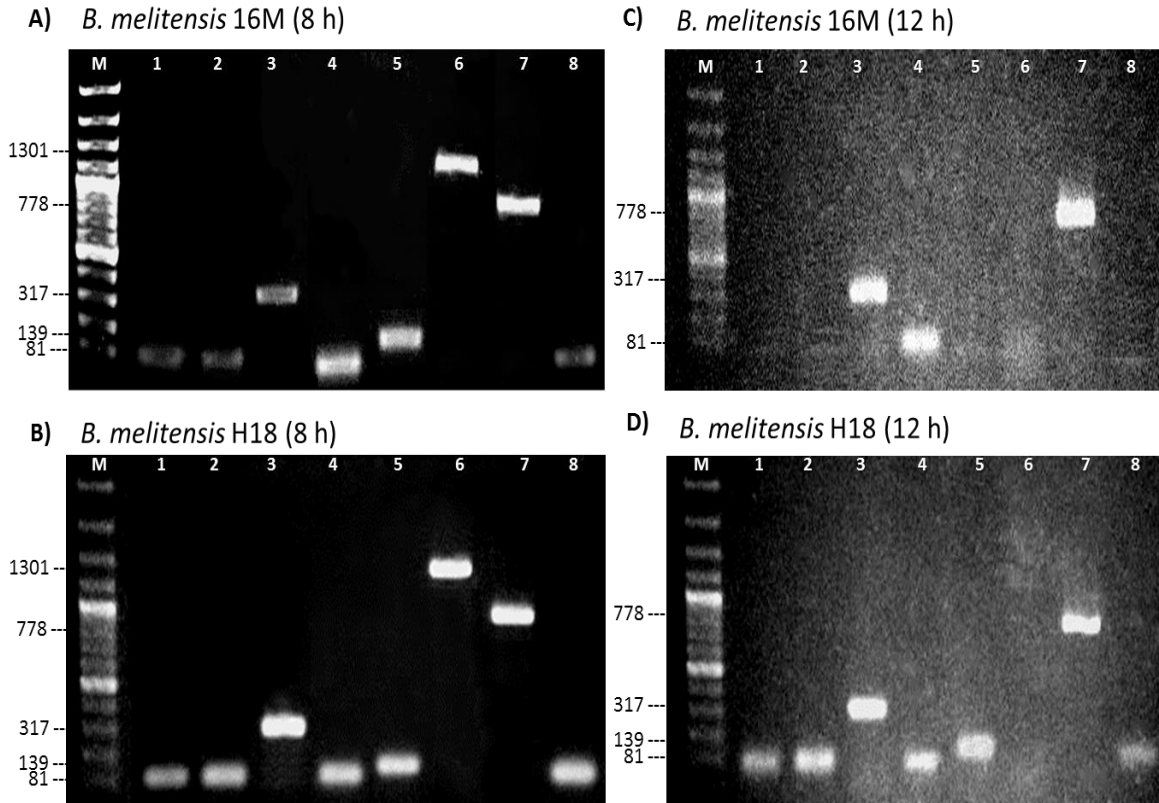


Figura 25. Expresión de genes relacionados con la virulencia y el QS. En todas las figuras: Línea M: marcador de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder; Línea 1, *fliC* (81 pb); Línea 2, *fliF* (82 pb); Línea 3, *omp31* (317 pb); Línea 4, *aibP* (81 pb); Línea 5, *vjbR* (139 pb); Línea 6, *ugpB* (1301 pb); Línea 7, *rbsB* (778 pb); Línea 8, *virB2* (80 pb). **A)** Expresión genética de *B. melitensis* 16M a las 8 h de la curva de crecimiento (etapa media de la fase exponencial). **B)** Expresión genética de *B. melitensis* H18 a las 8 h (etapa media de la fase exponencial). **C)** Expresión genética de *B. melitensis* 16M a las 12 h de la curva de crecimiento (etapa final de la fase exponencial). **D)** Expresión genética de *B. melitensis* H18 a las 12 h de la curva de crecimiento (etapa final de la fase exponencial).

9. DISCUSIÓN

En este trabajo, se describe el perfil de expresión de componentes del sistema QS como son los genes *vjbR* y *aibP*, y genes que codifican para factores de virulencia como *virB2*, *fliF* y *fliC*, así como, para componentes de membrana externa como *omp31*, *rbsb* y *ugpB*, identificando las diferentes capacidades de las cepas *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* (H18) aislada de humano con brucelosis aguda, para modular su expresión genética durante la fase de crecimiento exponencial en un medio enriquecido.

Los resultados mostraron cambios en la expresión genética de *vjbR* y *virB2* durante la fase logarítmica en ambas cepas, sin embargo, en la cepa humana estos genes se expresaron más. Particularmente, *vjbR* se expresó más en la cepa aislada de humano que en la de referencia al final de la fase exponencial, y para *virB2* este incremento también fue mayor en la cepa aislada de humano que en la de referencia a las 2, 6 y 12 h, pero en ambas cepas se observó un pico máximo de expresión a las 8 h. Los resultados sugieren que el incremento de expresión de *virB2* a las 8 h, puede estar relacionado con el estímulo positivo del regulador transcripcional VjbR, cuyo gen se expresó desde la etapa temprana y media de la fase logarítmica. Cabe señalar, que *vjbR* presentó mayor intensidad de expresión en comparación a la que mostraron genes cuya expresión es conocida que puede ser regulada por VjbR como *virB2*, *fliF* y *fliC*, como se ha reportado por otros autores [5, 7, 51], lo cual podría estar relacionado con su papel primordial en la regulación de la expresión de mecanismos de virulencia que controlan la capacidad de la bacteria para sobrevivir dentro de la célula hospedera, mediante su efecto en la regulación genética de un número diverso de genes [57], en los que se ha demostrado que VjbR es capaz de unirse a una secuencia cercana al sitio de inicio de la transcripción que contiene un motivo palindrómico de 18-pb presente en el promotor *virB* y en promotores de los genes efectores tipo IV *vceA* y *vceC*, entre otros como *fliC* [58], que conforman la red del sensado del quorum y son regulados directamente por la unión de VjbR [59].

Por otro lado, se ha reportado que cultivos de *B. melitensis* 16M (crecidos en cultivo celular F12K, suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (HI-FBS) al 10%) obtenidos de la fase exponencial presentan mayor capacidad para invadir células hospederas no fagocíticas, que aquellos obtenidos de la etapa temprana de la fase exponencial y de la fase estacionaria, los cuales presentaron una menor capacidad de invasión. La capacidad de cultivos de fase logarítmica, se debe a que en estas condiciones *Brucella* activa mecanismos que le permiten promover la infección, como interacción con la célula hospedera, invasión y adaptación al estrés de la vacuola, en donde es de gran importancia la expresión de *vjbR* y su función como regulador transcripcional positivo de la expresión del operon *virB* [60]. La importancia de estos reconocidos factores de virulencia en la patogenicidad de *Brucella* ha sido ampliamente demostrada mediante el empleo de mutantes de *vjbR* y *virB* las cuales presentan virulencia altamente atenuada tanto en modelos de infección celulares como en ratones [5,6,61], lo que ha destacado la importancia de la producción del T4SS en la maduración de la BCV durante la etapa temprana de la infección. El empleo de estas mutantes también ha evidenciado que la expresión de genes del operón *virB* es sobre-regulada por VjbR. Adicionalmente, se sabe que cultivos en fase logarítmica tardía presentan un estado de desregulación de la expresión de un conjunto de genes que codifican para el metabolismo basal como glucólisis, ciclo de Krebs, transcripción, producción de energía y replicación. Procesos que igualmente se ven reprimidos durante la maduración de la BCV, así como la producción del aparato flagelar, el cual no es requerido para penetración de la bacteria a su célula hospedera [8].

De este modo, la disminución de la expresión de *vjbR*, *virB2*, *fliF* y *fliC*, observada hacia el final de la fase logarítmica en los resultados presentados, coincide con diversos reportes en donde se encuentra que la expresión del operón *virB* decae conforme la bacteria alcanza la fase estacionaria, en la cual se disminuye la expresión de factores de virulencia, así como su capacidad para invadir a células hospederas y se re-establece la expresión de genes relacionados con el metabolismo basal [8, 69, 62, 63].

Es importante señalar que en ambas cepas, el pico máximo de expresión para los genes *fliF* y *fliC* se presenta a las 6 h, en cambio el pico máximo de expresión para *virB2* se presenta a las 8 h, lo que está relacionado con reportes previos acerca la expresión temprana de genes flagelares como *fliF* y *fliC*, en los cuales se ha demostrado que la expresión del promotor de *fliF* es previa a la actividad del promotor *virB*, y que en ésta etapa VjbR ya se encuentra presente por lo que puede sobre-regular la expresión de *fliF* [5, 51]. Ambos promotores *virB* y *fliF* tienen un denominador común, son activados por VjbR y reprimidos por C12-HSL [7]. Estos antecedentes apoyan los resultados presentados en este trabajo en relación con la elevada expresión de *vjbR* en la etapa temprana de la fase logarítmica en ambas cepas estudiadas, lo cual sugiere que su expresión podría influir positivamente en la expresión de *fliF* y *fliC* observada en las etapas temprana y media de la fase exponencial [64, 65], a diferencia de la etapa tardía de la fase logarítmica en donde se observa la desregulación de la expresión de *fliF*, que podría relacionarse con investigaciones reportadas previamente en donde se demuestra el efecto represor de C12HSL, cuya producción presenta un pico máximo durante la etapa media exponencial y reprime la expresión de genes de virulencia en esta fase de la curva de crecimiento vegetativo [6, 64].

Los antecedentes destacan la importancia de la modulación de la expresión genética para la adaptación de la bacteria durante las distintas etapas de la fase logarítmica del crecimiento vegetativo, como lo han demostrado ensayos de microarreglos y RT-PCR [8, 57, 60]. Fue interesante identificar que *B. melitensis* H18 es capaz de mantener una mayor expresión de *vjbR*, *virB2*, *fliF*, y *fliC* en comparación con 16M, principalmente al final de la fase logarítmica, lo que sugiere que la cepa aislada de humano podría tener mayor capacidad virulenta que la cepa de referencia.

Las variaciones que se presentan en las condiciones del medio ambiente bacteriano a lo largo de la curva de crecimiento vegetativo, como la concentración de nutrientes y concentración de la población bacteriana, provocan que *Brucella* desarrolle capacidades diferentes para activar distintos metabolismos, consumo

y/o producción de energía, así como su capacidad virulenta. Tales cambios, fundamentales para su sobrevivencia, son promovidos mediante la modulación de múltiples genes, como se aprecia en la fase logarítmica, cuando la población se prepara para entrar a la fase estacionaria [8]. Así, otro factor importante en la modulación de la expresión durante esta fase es AibP, los resultados aquí presentados muestran de manera importante la desregulación de factores de virulencia y el incremento de la expresión de *aibP*, en ambas cepas, al final de la fase exponencial. Estos resultados se pueden explicar por la actividad reportada para AibP, descrita como una AHL acilasa, la cual podría hidrolizar C12HSL, disminuir su concentración y por tanto, su efecto como molécula señal poderosa del QS, antecedentes que han llevado a proponer que AibP es capaz de apagar el QS mediante el daño que provoca a la acumulación de AHL. De este modo, se ha propuesto que en *Brucella* coexisten el encendido del quorum sensing dependiente de AHL y el apagado del quorum mediado por AibP, y que ambos pueden actuar en caminos opuestos para regular genes que contribuyen a su virulencia [8].

Si bien, en este trabajo no se determinó la presencia de C12-HSL, el incremento de la expresión del gen *aibP* al final de la fase exponencial, señala que la producción de C12-HSL pudo inducirse en etapas previas, tal como ha sido reportado por Uzureau *et al.*, en el 2010, quienes muestran que su máxima producción se presenta en la etapa media de la fase logarítmica, y coincide con el incremento de la expresión de *aibP* al final de esta fase.

De este modo, se ha propuesto que C12HSL conforma un nivel de regulación entre dos sistemas reguladores de la transcripción, con capacidad de desactivar VjbR y activar potencialmente a BabR durante la transición a la fase estacionaria [38, 57, 66, 67]. Así, mientras VjbR es un activador transcripcional de dos factores de virulencia como los genes flagelares *fliF* y el operon *virB* [5, 66], la feromona C12-HSL actúa como un represor global de genes de la virulencia vía interacción con VjbR por medio de Asp82, que está involucrado en la unión al autoinductor [38]. Sin embargo, durante el crecimiento vegetativo, C12-HSL

también puede activar la expresión de otros loci independientes de VjbR [38, 57], como *babR* que es sobre-regulado en la etapa tardía de la fase logarítmica del crecimiento [60].

Investigaciones previas realizadas a cultivos de *B. melitensis* 16M en fase media logarítmica demuestran que, según sea el gen blanco, el efecto activador de C12-HSL puede depender de BabR, VjbR o de ambos reguladores, los cuales pueden inducir efectos diferentes en la expresión genética ya sea por sí mismos o en respuesta a C12-HSL. Es de particular interés, con respecto a la expresión de *ugpB*, el efecto positivo en la regulación de su expresión genética, inducido por C12-HSL sólo, y/o a consecuencia de la respuesta de VjbR y BabR a esta feromona [8]. En este sentido, la disminución de la expresión registrada en la etapa temprana de la fase logarítmica (6 h) (más severo para H18 que para 16M) podría estar bajo control de VjbR, y el incremento observado al final de la fase logarítmica (8 h) podría ser mediado por C12HSL, y/o su interacción con VjbR y BabR [8].

Debido a que C12-HSL reprime la expresión de *vjbR*, y VjbR puede activar la expresión de *babR*, la cual también es estimulada por C12HSL, así como por el mismo regulador transcripcional BabR, se ha propuesto que VjbR regula su propia asa de retroalimentación negativa y que BabR regula su asa de retroalimentación positiva [8, 52] (Ver Figura 26).

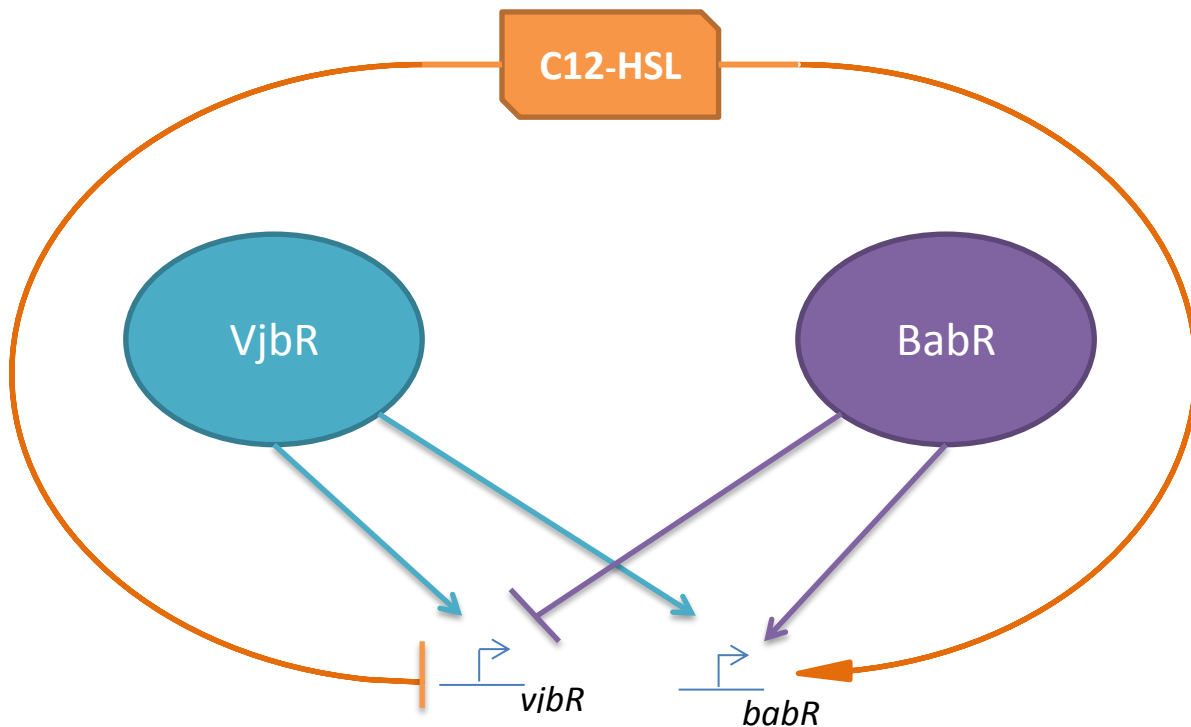


Figura 26. Asa de retroalimentación negativa regulada por VjbR, y asa de retroalimentación positiva regulada por BabR.

De esta manera, la expresión temprana de *aibP* observada en la cepa de referencia podría reflejar su capacidad para desregular severamente a factores de virulencia como *vjbR*, *virB2*, *fliF* y *fliC*, en cambio, en la cepa aislada de humano esta expresión se mantiene por un tiempo más prolongado, y el efecto desregulador se presenta más atenuado, probablemente hacia el inicio de la fase estacionaria, lo cual deberá ser analizado más adelante.

Finalmente, se evaluó la expresión genes de proteínas presentes en la membrana como *omp31*, *rbsB* y *ugpB*. La expresión de *omp31* y *rbsB* fue prácticamente constante y elevada en los tiempos evaluados de la fase logarítmica, y fue similar en las dos cepas. La expresión de *omp31* podría responder a los requerimientos de su producto proteico, debido a que Omp31 pertenece al grupo 3, cuyos integrantes conforman a las proteínas de membrana externa (OMP's) más abundantes, las cuales juegan un papel importante en el

mantenimiento de la integridad y permeabilidad selectiva de la membrana bacteriana de *Brucella* [68], su capacidad inmunogénica ha sido ampliamente demostrada y se ha sugerido su utilidad potencial en el diagnóstico de brucelosis humana y animal, en los que se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-Omp31 [56, 69]. También ha sido identificada como una de las proteínas abundantes en las OMV's de *B. melitensis* 16M [70-74], y productos con diferente peso molecular y pI de Omp31 y Omp25 han sido identificados en fracciones de membrana externa [75]. Por otro lado, se ha demostrado que su expresión puede estar regulada por *virB* en *B. melitensis* [75, 76], sin embargo, no es el único regulador de la expresión de *omp31*, VjbR y C12HSL pueden influir positivamente en la producción de Omp31 [38], lo que indica que la regulación de su expresión es compleja y podría estar influenciada aún por la concentración de C12-HSL, ya que se ha planteado la posibilidad de que los dos reguladores tengan una afinidad diferente por ésta molécula autoinductora [8]. Estos antecedentes, aunados a los resultados presentados sugieren que la regulación de la expresión de Omp31 es compleja.

La expresión de *rbsB* fue similar a la de *omp31*, por tanto, la bacteria mantiene su expresión en la fase logarítmica, lo cual que sugiere que para *Brucella* es importante la presencia de su producto proteico, llamado SP29 (Rib o proteína precursora periplásmica de unión a D-Ribosa). De hecho, se ha sugerido su producción constitutiva en varias especies de *Brucella*, y se le ha identificado en un grupo de proteínas periplásmicas, liberadas en sobrenadantes de *B. suis* 1330, tras su incubación en medio ácido [74]. Por otro lado, del C Rocha *et al.*, en el 2002 demostraron sus propiedades aglutinantes en eritrocitos, identificándose más tarde que estos pueden ser invadidos por *B. melitensis* durante el proceso infeccioso [77], y se sugiere que la proteína puede tener un papel en la adherencia a las células eucariontes [11], además de que es uno de los componentes de OMV's liberadas por *B. melitensis* [73]. Estos requerimientos podrían estar relacionados con la expresión invariable de *rbsB* en la fase logarítmica.

En cambio, el gen que codifica para el producto predicho del locus *ugpB*, presentó expresión transitoria en la fase logarítmica, será necesario evaluar si este perfil de expresión está involucrado con las propiedades de adherencia e invasión a células hospederas, que caracteriza a las diferentes fases de la curva de crecimiento [60], debido al papel importante de la presencia de su producto proteico en la superficie de la membrana externa, en los procesos de adherencia e invasión a células no fagocíticas en *B. suis* 1330. Así mismo, la proteína también se detectó en sobrenadantes de *B. abortus* S19, *B. abortus* AO1 (aislada de feto bovino abortado) y *B. melitensis* 16M, obtenidos mediante extracción por calor en buffer salino de fosfatos (PBS) [10], y se le ha identificado en sobrenadantes de *B. suis* 1330 obtenidos de cultivos en fase temprana estacionaria incubados a pH 4, en medio mínimo [74]. Estos antecedentes han sugerido que su expresión es necesaria en etapas tempranas de infección [10].

10. CONCLUSIONES

La expresión de genes del sistema QS como *vjbR* y *aibP*, y genes que codifican para factores de virulencia como *virB2*, *fliF* y *fliC*, así como, para el componente de membrana externa *ugpB*, en *B. melitensis* M16 y *B. melitensis* H18 mostró diferencias entre las fases temprana y tardía logarítmica, lo que refleja que cambios importantes en la modulación de la expresión en cultivos vegetativos durante la fase exponencial, pueden estar regulados por variaciones de las condiciones de cultivo característicos del crecimiento bacteriano logarítmico. Así también, los patrones de expresión a lo largo de la fase exponencial fueron similares entre las dos cepas, sin embargo, destaca que la cepa humana mostró tendencia para sobre-regular la expresión de estos genes con mayor intensidad predominantemente hacia el final de la fase logarítmica, en comparación con la cepa de referencia. Efectos opuestos en la expresión de *vjbR* y *aibP*, sugieren la participación del sistema quorum sensing en esta fase del crecimiento. Estos resultados señalan que el efecto inducido por la interacción entre huésped-hospedero de la cepa aislada de humano, podría influir en su eficiente capacidad para mantener la expresión de genes de virulencia a diferencia de la cepa de referencia.

11. SUGERENCIAS

- Para comprender mejor la activación del QS y la expresión genética se sugiere monitorear todas las fases de la curva de crecimiento de la bacteria, además se puede estudiar el comportamiento de *Brucella* al incorporar los autoinductores como C12-HSL de manera exógena.
- Evaluar la expresión en modelos celulares y animales.
- Será de interés evaluar la expresión de otros genes de importancia en el desarrollo de las capacidades virulentas de la bacteria tanto en etapas tempranas como tardías del crecimiento vegetativo, así como en procesos agudos y crónicos.

12. BIBLIOGRAFIA

- [1] Pappas G, Papadimitriou N, Akritidis, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect.* (2006): 6, 91–99.
- [2] Godfroid J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *INRA EDP Sciences Vet. Res.* (2005): 36, 313–32.
- [3] Celli J. Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol.* (2006): 157, 93-8.
- [4] Barquero CE, Chaves OE, Weiss DS, Guzman VC, Chacon DC, Rucavado A, Moriyon I, Moreno E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One.* (2007): 2, 631.
- [5] Delrue RM, Deschamps C, Leonard S, Nijskens C, Danese I, Schaus JM, Bonnot S, Ferooz J, Tibor A. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol.* (2005): 7, 1151-61.
- [6] Terwagne M, Mirabella A, Lemaire J, Deschamps C, De Bolle X, Letesson JJ. Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One.* (2013): 8, 82514.
- [7] Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Vandenhautte J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell. Microbiol.* (2005): 7, 687-98.
- [8] Uzureau S, Lemaire J, Delaive E, Dieu M, Gaigneaux A, Raes M, De Bolle X, Letesson JJ. Global Analysis of Quorum Sensing Targets in the Intracellular Pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res.* (2010): 9, 3200-17.
- [9] Ghasemi A, Zarnani AH, Ghoojani A, Rezaia S, Salari MH, Jeddi-Tehrani M. Identification of a new immunogenic candidate conferring protection against *Brucella melitensis* infection in Mice. *Mol Immunol.* (2014): 62, 142–149.
- [10] Castañeda-Roldán EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol.* (2006): 8, 1877-87.
- [11] del C Rocha-Gracia R, Castañeda-Roldán EI, Giono-Cerezo S, Girón JA. *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiol Lett.* (2002): 213, 219-24.
- [12] Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.* (1997): 3, 213–221.
- [13] Pappas G, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA. Invasive fungal infections

among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). Clin. Infect. (2010): 50, 1101–1111.

[14] Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis – new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology. (2005): 98, 1270-81.

[15] Whatmore AM, Dale EJ, Stubberfield E, Muchowski J, Koylass M, Dawson C, Gopaul KK, Perrett LL, Jones M, Lawrie A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). DOI (2015): 10, 1099.

[16] Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. (2010): 60, 801-8.

[17] Pappas G, Akritidis N, Tsianos E. Brucellosis. Engl J Med (2005): 352, 2325-36. (b).

[18] Gomez G, Adams LG, Rice-Ficht A, Ficht TA. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. Front Cell Infect Microbiol. (2013): 16, 17.

[19] Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. Public Health Threat of New, Reemerging, and Neglected Zoonoses in the Industrialized World. Emerg Infect (2010): 16, 1-7.

[20] Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis; Secretaría de Salud, 2012.

[21] NORMA Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-2012, Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano

[22] Pellicer T, Ariza J, Foz A, Pallarés R, Gudiol F. Specific antibodies detected during relapses of human brucellosis. J Infect. (1988): 157, 918-24.

[23] Lopez-Goñi I, Yoldi D, Marín C, de Miguel M, Calvo E, Verri C, Albert D, Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. Veterinary Microbiology. (2011): 154, 152–155.

[24] Lopez-Goñi I, Yoldi D, Marín C, de Miguel M, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckaert A, Ferreira AC. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. J Clin Microbiol. (2008): 46, 3484–3487

[25] Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan, Ramuz M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. J Bacteriol. (1997): 179, 3244–49.

[26] Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin Diagn Lab Immunol. (1999): 6, 627.

[27] Haag AF, Myka KK, Arnold MF, Caro-Hernández P, Ferguson GP. Importance of

Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in *Brucella*-Mammalian Infections. *Int J Microbiol.* (2010): 10, 1155-4.

[28] Moreno E, Cloeckaert A, Moriyo'n I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology.* (2002): 90, 209–227.

[29] Fugier E, Pappas G, Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert Rev Mol Med.* (2007): 9, 1-10.

[30] Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med.* (2003): 198, 545-56.

[31] de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA and Adams L. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis. Review of *Brucellae* Host Interactions. *The American Journal of Pathology.* (2015): 185, 6.

[32] Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: The Ioannina recommendations. *PLoS Med.* (2007): 4, 1872-1878.

[33] Gorvel JP; and Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* (2002): 90, 281–297.

[34] Rajashekara G, Eskra L, Mathison A, Petersen E, Yu Q, Harms J, Splitter G. *Brucella*: functional genomics and host-pathogen interactions. *Anim Health Res.* (2007): 7, 1-11.

[35] Guzmán V, Manterola C, Sola- Landa, Parra A. The two-component system BvrR/Bvrs essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer. (2002): 6,1519-1529.

[36] Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grillo M J, Moreno E. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology.* (1998): 29, 125-138.

[37] Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: The VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol.* (2012): 16, 45–51.

[38] Uzureau S, Godefroid M, Deschamps C, Lemaire J, De Bolle X, Letesson JJ. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol.* (2007): 189, 6035-6047.

[39] Castañeda-Roldan EI, Avelino F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Giron JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol.* (2004): 6, 435-45.

[40] von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol.* (2012): 36, 533-62.

[41] Vizcaíno N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other

species-specific markers. *Microbiology*. (1997): 143, 2913–2921.

[42] Del Vecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpidis N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002): 99, 443–48.

[43] Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*. (1979): 43, 496-518.

[44] Fuqua C, Greenberg EP. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. (2006): 3, 685-695.

[45] Fuqua C, Stephen C, Winans, Greenberg EP. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*. (176): 2, 269-275.

[46] Diggle SP, Cruz SA, Cámara M. Quorum sensing. *Current Biology*. (2007): 17, 907-910.

[47] Visick KL. An intricate network of regulators controls biofilm formation and colonization by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*. (2009): 74, 782–789.

[48] Kaplan HB, Greenberg EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol*. (1985): 163, 1210-9.

[49] Stevens AM, Dolan KM, and Greenberg EP. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994): 91, 12619–12623.

[50] Bellezza I, Peirce MJ, Minelli A. Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends in Molecular Medicine*. (2014): 20, 551-558.

[51] Léonard S, Ferooz J, Haine V, Danese I, Fretin D, Tibor A, de Walque S, De Bolle X, Letesson JJ. FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. *J Bacteriol*. (2007): 189, 131-41.

[52] Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, Splitter G. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J. Bacteriol*. (2008): 190, 3274–3282.

[53] NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

[54] Sambrock, Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning. A laboratory manual / Second edition*.

[55] Rossetti CA, Galindo CL, Everts RE, Lewin HA, Garner HR, Adams LG. Comparative analysis of the early transcriptome of *Brucella abortus* – Infected monocyte-derived

macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Research in Veterinary* (2011): 91, 40–51.

[56] Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough Brucellae. *Clin Diagn Lab Immunol.* (2004): 11, 111-4.

[57] Weeks JN, Galindo CL, Drake KL, Adams GL, Garner HR, Ficht TA. *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol.* (2010): 10, 167.

[58] de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijk JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol.* (2008): 70, 1378-96.

[59] Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA. *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Trends Microbiol.* (2009): 17, 371-7.

[60] Rossetti CA, Galindo CL, Lawhon SD, Garner HR, Adams LG. *Brucella melitensis* global gene expression study provides novel information on growth phase-specific gene regulation with potential insights for understanding *Brucella*: host initial interactions. *BMC Microbiol.* (2009): 9, 81.

[61] Zygmunt MS, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. Identification of *Brucella melitensis* 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect.* (2006): 8, 2849–2854.

[62] Boschirolì ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieuille C, Lavigne JP, Liautard J-P, Ramuz M, O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol.* (2002): 90, 341-348.

[63] Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA: Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Mol Microbiol.* (2004): 54, 08-822.

[64] Ferooz J, Lemaire J, Letesson JJ. Role of FlbT in flagellin production in *Brucella melitensis*. *Microbiology.* (2011): 157, 1253-62.

[65] Ferooz J, Lemaire J, Delory M, De Bolle X, Letesson JJ. RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology.* (2011): 157, 1263-8.

[66] Taminiau B, Daykin M, Swift S, Boschirolì ML, Tibor A, Lestrade P, De Bolle X, O'Callaghan D, Williams P, Letesson JJ. Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* (2002): 70, 3004–3011.

[67] Arocena GM, Sieira R, Comerci DJ, Ugalde RA. Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-Acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus virB* promoter. *J Bacteriol* (2010): 192, 3434–3440.

[68] Moriyon I, Lopez-Goni I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* (1998): 1, 19–26.

- [69] Estein SM, Cheves PC, Fiorentino MA, Cassataro J, Paolicchi FA, Bowden RA. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet Microbiol.* (2004): 102, 203-13.
- [70] Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckert A, Rouot B. Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun.* (2003): 71, 4326-32.
- [71] Gamazo C, Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* (1987): 55, 609–615.
- [72] Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Diaz R. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* (1989): 57, 1419–1426.
- [73] Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, Boyle SM, Witonsky S, Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol.* (2012): 35, 2493.
- [74] Boigegrain RA, Salhi I, Alvarez-Martinez MT, Machold J, Fedon Y, Arpagaus M, Weise C, Rittig M, Rouot B. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun.* (2004): 72, 5693-703.
- [75] Wang Y, Chen Z, Qiao F, Zhong Z, Xu J, Wang Z, Du X, Qu Q, Yuan J, Jia L, Song H, Sun Y, Huang L. The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS Microbiol Lett.* (2010): 303, 92-100.
- [76] Wang Y, Chen Z, Qiao F. Comparative proteomics analyses reveal the *virB* of *B. melitensis* affects expression of intracellular survival related proteins. *PLoS One.* (2009): 4.
- [77] Vitry MA, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, Machelart A, Lhomme F, Vanderwinden JM, Vermeersch M, De Trez C, Pérez-Morga D, Letesson JJ, Muraille E. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during infection. *Infect Immun.* (2014): 82, 3927-38.

13. ANEXOS

13.1 Anexo A. Evaluación y cuantificación de RNA.

Cada muestra de RNA total fue sometido a electroforesis, para corroborar si integridad. La separación del RNA en sus diferentes tamaños indica una extracción correcta. Los resultados obtenidos en gel indicaron una correcta extracción de RNA. Las muestras que tuvieron una correcta separación de RNA fueron sometidos a RT-PCR (Figura 27).

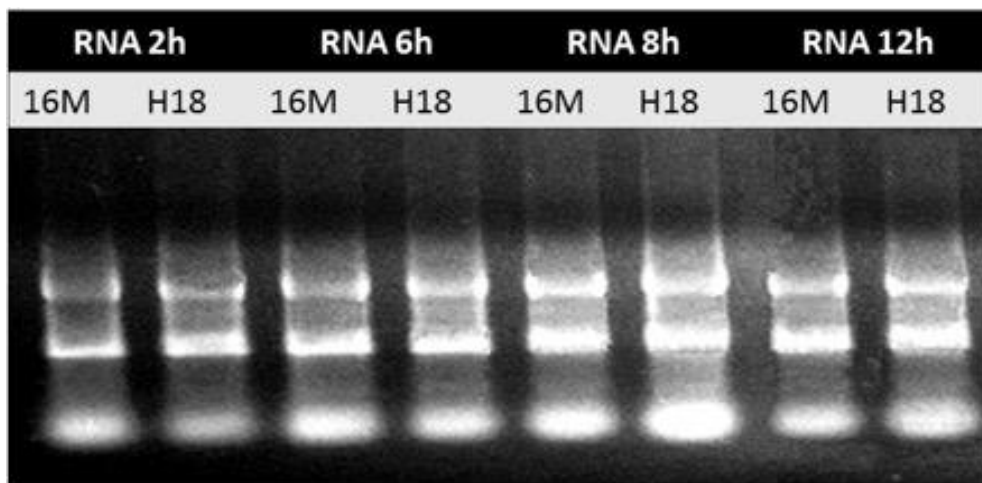


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la integridad del RNA total.

Para la cuantificación de la concentración de RNA total se realizaron lecturas por espectrofotometría UV-Visible a 260 y 280 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro 6405 UV/VIS (JENWAY). La lectura de longitud de onda a 260 nm permitió calcular la concentración de RNA total.

Se puede considerarse 1 DO_{260} : 40 $\mu\text{g/ml}$.

Para determinar la pureza las muestras de RNA total con una relación 260/280 mayor a 1.5 y menor a 2.2, con una relación óptima de 2, son fueron aceptas.

13.2 Anexo B. Electroforesis de gen constitutivo en las cepas empleadas

Para determinar la expresión relativa se realizó una normalización empleando el gen constitutivo *glucosa 1-deshidrogenasa* determinando su expresión para cada cepa en las diferentes etapas de la fase logarítmica analizada (Figura 28).

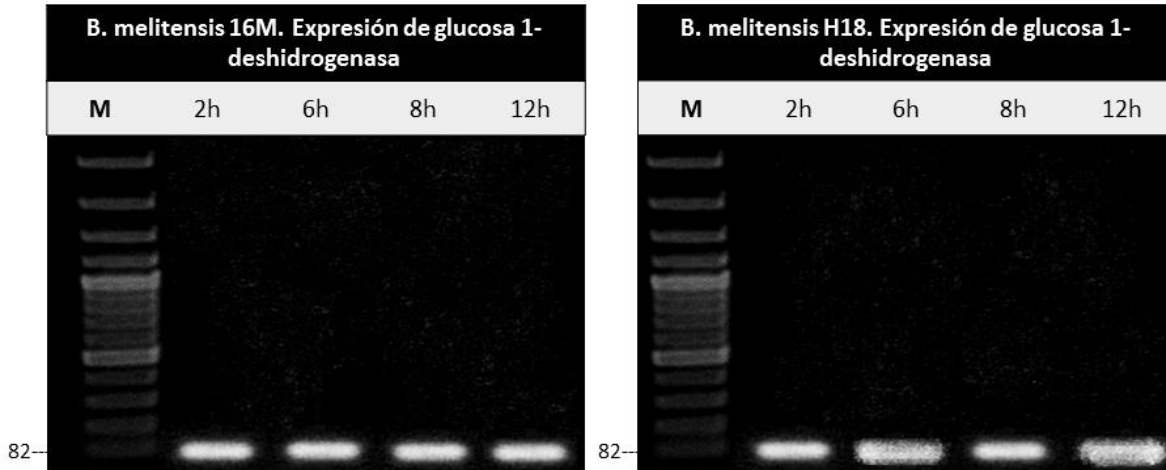


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar gen constitutivo.

13.3 Anexo C. Determinación de No. de generaciones en base a la curva de crecimiento

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación (g).

| DETERMINACIÓN | FORMULA | <i>B. melitensis</i> 16M | <i>B. melitensis</i> (H18) |
|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Número de generaciones: | $n = \frac{t - t_0}{g}$ | 16 | 15 |
| Tiempo de generación: | $g = \frac{\ln(N - N_0)}{t - t_0}$ | 1h 16min | 1h 18min |

13.4 Anexo D. Determinación de pH a lo largo de la curva de crecimiento

Se analizó las variaciones de pH a lo largo de la curva de crecimiento para ambas cepas y descartar que este se modificara y estresara a la bacteria (Figura 28).

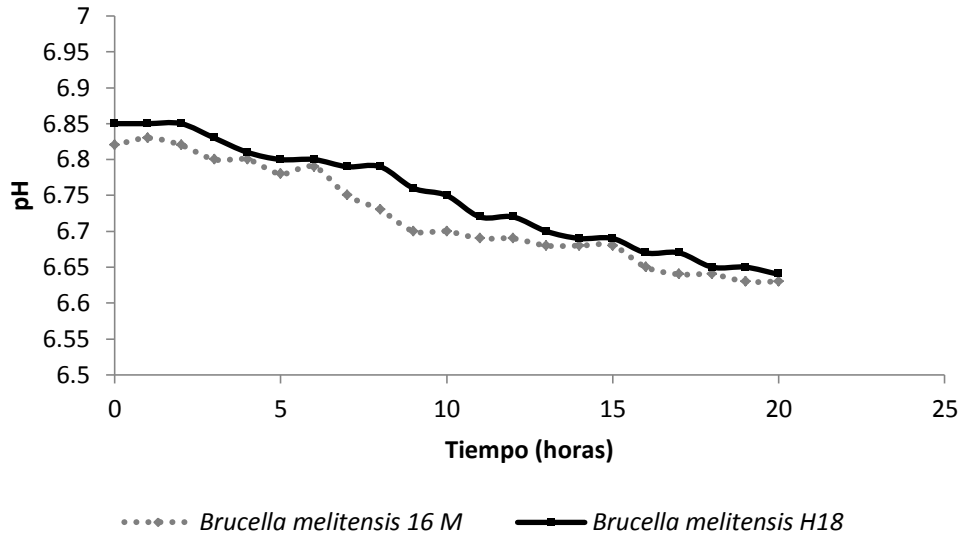
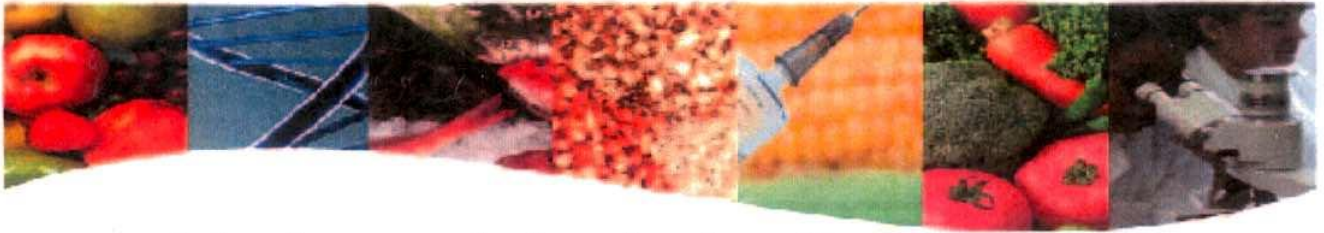


Figura 29. Monitoreo de pH a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas. Se muestra el cambio de pH presente por las cepas empleadas a lo largo de las 20 h de la curva de crecimiento.



Universidad de Sonora

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos

Extienden la presente

Constancia a:

Itzel Estephania Guarneros León

por haber participado como Ponente en el **Congreso Internacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología** llevado a cabo en la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

con el trabajo:

Expresión de genes vjbR, virB2, fliC y aibP relacionados con la virulencia del patógeno intracelular *Brucella melitensis* aislado de humanos

Colaboradores: Castañeda-Roldan EI, Peña-Moreno RD y Morales-Lara L

Dr. Francisco Javier Wong Corral
Presidente del Congreso



CICAB

Hermosillo, Sonora, México

14 al 18
Noviembre
2016

