BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

Estudio de los efectos del fitoquímico DATS sobre la expresión de factores de virulencia de *Brucella melitensis* y su capacidad antimicrobiana

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. Karen Jazmin Santamaria Gonzaga

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Laura Morales Lara

ASESOR EXTERNO

D.C. ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDAN

NOVIEMBRE 2021

Facultad de Ciencias Químicas BUAP

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, a mi mamá Carmen Gonzaga Sánchez que me brindó todo su apoyo incondicional alrededor de estos años, que me enseñó a no rendirme y a dar lo mejor de mí, a mi papá Jesús Ubaldo Santamaria Salazar por apoyarme, por creer siempre en mí, por ayudarme a llegar hasta donde estoy, a mi hermana Montse por enseñarme acerca de la constancia y el trabajo duro que sin ellos no estaría aquí.

Y finalmente a todos mis amigos porque la carrera se saca adelante rodeándote de compañeros que te levantan del bajón las veces que sea necesario, dispuestos a ayudarme siempre que los necesité, por todas las risas compartidas, todos aquellos que han llegado a mi vida y me han enseñado algo.

¡Gracias!

ÍNDICE

RESUMEN 1

1. ANTECEDENTES..... 2

1.1 Brucelosis..... 2

1.2 Especies del género *Brucella*..... 2

1.3 Patogenicidad de *Brucella* spp..... 3

1.4 Quorum sensing en *Brucella* spp. 5

1.5 DATS sus efectos y su actividad antimicrobiana..... 8

2. JUSTIFICACIÓN..... 11

3. OBJETIVOS..... 12

3.1. Objetivo General 12

3.2. Objetivos particulares..... 12

4. DIAGRAMA DE TRABAJO 13

5. MATERIAL Y MÉTODOS 14

5.1. Material 14

5.2. Material biológico 14

5.3. Equipos 14

5.4. Métodos 15

6. METODOLOGÍA..... 15

6.1. Conservación y mantenimiento de las cepas de *Brucella melitensis* 15

6.2. Caracterización microbiológica 15

6.3 Caracterización molecular de las cepas bacterianas 16

6.4 Elección de la concentración de DATS a evaluar en ensayos de expresión genética 17

6.5 Ensayos de sensibilidad antimicrobiana 17

6.5.1 Obtención del inóculo 17

6.5.2 Método de difusión en disco 17

6.6 Estudios de expresión genética 18

6.6.1 Extracción de RNA 18

6.6.2 Retrotranscripción 18

6.6.3 PCR punto final 20

6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa 21

6.6.5 Análisis de expresión relativa 21

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22

7.1 Caracterización microbiológica y molecular de las cepas de estudio 22

7.1.1. Mantenimiento y caracterización microbiológica de las cepas bacterianas 22

7.2 Caracterización molecular de género y especie 24

7.3 Análisis de los efectos de DATS en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana y factores de virulencia 24

7.3.1 Efectos de DATS sobre la sensibilidad antimicrobiana 25

7.3.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con QS en *B. melitensis* en presencia de DATS 29

8. CONCLUSIONES 39

9. BIBLIOGRAFÍA 40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Invasión de células de mamíferos y tráfico intracelular. 4
Figura 2. Esquema del Quorum sensing. 5
Figura 3. Estructura química del autoinductor de tipo AHL en Brucella spp. 6
Figura 5. Vía de síntesis de compuestos orgánicos de azúfre (OSC) en Allium. 9
Figura 6. Cultivo microbiológico de *Brucella melitensis*. 22
Figura 7. Tinción de Gram.. 23
Figura 8. Identificación de *Brucella melitensis* mediante Pruebas Bioquímicas.....23
Figura 9. Identificación de las cepas por PCR múltiple: Brucela ladder v2.0. 24
Figura 10. Estandarización del método de sensibilidad antimicrobiana.....27
Figura 11. Ensayo de sensibilidad antimicrobiana. 28
Figura 12. Curvas de crecimiento vegetativo de B. melitensis 16M y H18.....30
Figura 13. Integridad de RNA extraído de *B. melitensis*.....31
Figura 15. Efecto de DATS sobre la expresión relativa de vjbR, virB2 y fliC de *Brucella melitensis* 16M y H18. 36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los equipos 14
Tabla 2. Referencia de los métodos 15
Tabla 3. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR Brucella-ladder v2.0.....16
Tabla 4. Protocolo utilizado en la reacción de PCR Brucella-ladder v2.0 16
Tabla 5 Mezcla de reacción utilizada en el tratamiento con DNAsa 19
Tabla 6 Mezcla de reacción utilizada en la Retrotranscripción.....19
Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada en PCR punto final.....20
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la evaluación de la expresión genética de genes eucariontes y procariontes por PCR punto final. 20
Tabla 9. Protocolo empleado en la reacción de PCR punto final 21
Tabla 10 . Análisis de la pureza y cuantificación de RNA extraído de cultivos vegetativos. 31

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial donde *Brucella melitensis* es una de las especies más virulentas del género, su capacidad patógena se basa en utilizar una estrategia sigilosa para evadir los mecanismos de defensa del huésped, además de la expresión coordinada de factores de virulencia claves para lograr establecer un nicho replicativo seguro, esta modulación es fundamental para establecer el proceso infeccioso. El Quorum Sensing (QS) es un sistema de comunicación bacteriano que provoca una inducción o represión de genes blanco mediante la unión de una molécula autoinductora a un regulador transcripcional, actualmente se está explorando la capacidad de fitoquímicos como el dialiltrisulfuro (DATS) para modular este proceso mediante diversas estrategias entre las que destaca la modificación de la expresión de factores de virulencia. Estudios han demostrado que los compuestos organosulfurados del ajo han inactivado la trascripción de genes clave de sistemas de detección del QS en *Pseudomonas aeruginosa,* atenuando su virulencia, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del fitoquímico DATS sobre la expresión genética de factores de virulencia relacionados con el QS (*vjbR, virB2* y *fliC*) donde se identificaron los cambios inducidos en los patrones de expresión genética y además se evaluó su capacidad antimicrobiana, para lo cual se empleó una cepa de referencia *B. melitensis* 16M y también un aislamiento clínico de *Brucella melitensis* H18. Los ensayos de sensibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión en disco del CLSI 2014, para los ensayos de expresión genética se establecieron curvas de crecimiento para identificar la fase logarítmica tardía (13 h), se recolectaron alícuotas de los grupos de estudio y se realizó extracción de RNA total, RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y densitometría (normalizada con RNAm BMEI0861). Los resultados mostraron que DATS no inhibió el crecimiento microbiano de *B. melitensis* 16M y H18 en ninguna de las concentraciones evaluadas en cambio, DATS 10 µM disminuye la expresión de ARNm de *vjbR, fliC* y *virB2* en ambas cepas, por lo que DATS podría estar modulando negativamente la expresión de estos genes mismos que se han descrito como genes necesarios para la persistencia y cronicidad de la brucelosis, además de ser importantes factores de activación durante el desarrollo del QS.

1. ANTECEDENTES

1.1 Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial que es causada por bacterias del género *Brucella*, es transmitida a través de productos lácteos no pasteurizados, de la exposición y contacto del tejido y sangre de animales infectados, inhalación de aerosoles infecciosos, ingestión de agua o alimentos contaminados. *B. melitensis* causa los síntomas más graves y agudos (Moreno et al., 2020; Zang et al., 2020). Aunque la enfermedad presenta una mortalidad en humanos menor a 5%, el impacto es principalmente económico y social debido a los altos costos de su diagnóstico, tratamiento y las incapacidades provocadas a futuro (Shakir et al., 2021); la enfermedad en humanos tiende a desarrollar cronicidad y puede generar una amplia variedad de signos y síntomas dependiendo del estadio en que se encuentre y del sistema que afecte (Franc et al., 2018).

A comparación de los animales donde la brucelosis se presenta provocando abortos, metritis e infertilidad, en humanos los principales síntomas son fiebre alta, dolor muscular y articular (Figueiredo et al., 2015; Franc et al., 2018), y a medida que las bacterias se diseminan sistemáticamente la enfermedad se presenta con hepatoesplenomegalia e inflamación de ganglios linfáticos, provocando la formación de granulomas lo que conlleva a diversas complicaciones como artritis, orquitis, hepatitis, encefalomielitis y endocarditis en un estadio crónico, estas diversas manifestaciones de la enfermedad complican el diagnóstico (von Bargen et al., 2012).

1.2 Especies del género *Brucella*

Las especies del género *Brucella* pertenecen al grupo de las α-2 proteobacteria que miden de 0.5 a 1.5 µm, son cocobacilos Gram-negativos, inmóviles anaerobios facultativos, que no poseen cápsulas ni forman esporas (Flores Martínez, 2018; Suárez-Esquivel et al., 2020). En este momento se conocen al menos 12 especies de *Brucella* de las cuales cuatro de ellas son las que causan enfermedades en los seres humanos,

cada una de las cuales tiene un huésped animal diferente; siendo *B. melitensis* la causa más común de brucelosis humana cuyos huéspedes son las cabras y ovejas, también pueden causarla *B. abortus* (huésped principal: vacas), *B. suis* (huésped principal: cerdos) y *B. canis* (huésped principal: perros) (Wang et al., 2020; Chang et al., 2021; El-Sayed et al., 2018). Otras especies como *Brucella ovis*, (patógeno de los carneros), *Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis*, que infectan a mamíferos marinos, y *Brucella neotomae* y *Brucella microti*, que infectan a roedores son de menor relevancia zoonótica y, por lo tanto, no se consideran patógenos humanos peligrosos (Poester et al., 2013).
Aunque las especies de *Brucella* presentan una similitud del 97% a nivel genoma cada especie afecta a diferentes hospederos, en consecuencia, muestran características fenotípicas similares y poseen los mismos factores de virulencia necesarios para la infección y la vida intracelular (Suárez-Esquivel et al., 2020). Independientemente de la especie bacteriana que cause la brucelosis, los síntomas clínicos observados en los seres humanos infectados son los mismos, su capacidad de replicación intracelular, induciendo una leve formación de especies reactivas de oxígeno y promoviendo la muerte prematura de neutrófilos; esta capacidad de persistir periodos prolongados dentro de la célula huésped y resistir la respuesta inmunitaria directamente relacionado con su patogenicidad (von Bargen et al., 2012; Moreno et al., 2020).

1.3 Patogenicidad de *Brucella* spp.

La patogénesis de la brucelosis en humanos y animales es notablemente similar, debido a la interacción de la bacteria con las células susceptibles del huésped, su curso depende también de la cepa, virulencia, dosis y vía de inoculación, además de ciertos parámetros del hospedero (Zang et al., 2020), *Brucella* spp. utiliza una variedad de estrategias para penetrar en las células del hospedero, alterar y modular el tráfico intracelular, evitar la muerte en los lisosomas y evadir los mecanismos de defensa (Liu et al., 2015). Dado que sus factores de virulencia no son clásicos, ha desarrollado un método para lograr con éxito la infección, evadiendo la respuesta inmune del huésped y finalmente lograr diseminarse a otros tejidos (Figueiredo et al., 2015).

La patogenia de la brucelosis depende principalmente de macrófagos, células dendríticas y trofoblastos placentarios para su supervivencia y replicación ya que de esta manera controla el tráfico intracelular de sus vacuolas denominadas BCV (vacuola que contiene *Brucella*) para evitar su degradación y favorecer un nicho replicativo seguro, éstas se fusionan con elementos de la membrana como el retículo endoplásmico (RE) y de esta manera la BCV interactúa con aquellos endosomas/lisosomas tardíos que controlan la acidificación vacuolar y la transcripción de varios factores de *Brucella* spp. (Ahmed et al., 2016). El operón *virB* se encarga de codificar el sistema de secreción tipo IV (T4SS), que consta de 12 genes (virB1-12) ubicados en el cromosoma II, secreta moléculas efectoras que mantienen las interacciones de la BCV con el RE que controlan el estilo de vida intracelular del patógeno hasta lograr desarrollar su nicho replicativo (Liu.,2015).

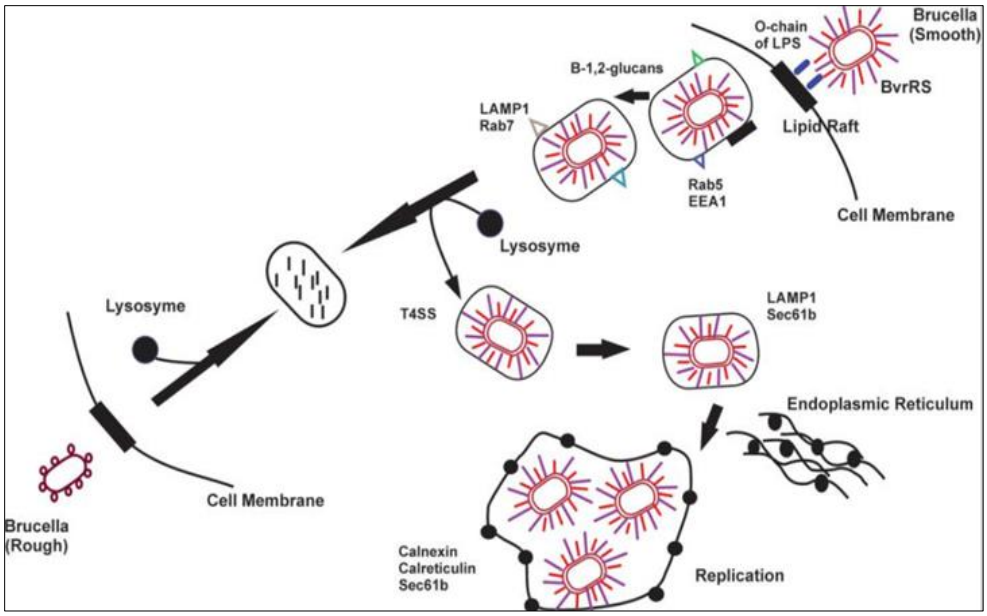


Figura 1. Invasión de células de mamíferos y tráfico intracelular. Durante la infección, una vez que *Brucella* logra penetrar la células del huésped, se aloja en una vacuola (BCV), adquiriendo marcadores endosomales tempranos, una vez que pasa por los lisosomas, activa el T4SS para regular el tráfico intracelular hacia el RE para poder replicarse. Tomado de Głowacka et al., 2018.

El tráfico intracelular es mediado por la interacción de *Brucella* con el endosoma temprano, el cual se caracteriza por los marcadores Rab5 (proteína de unión a GTP) y EEA1 (antígeno endosómico temprano 1). Después, la adición de β-1,2-glucanos regulará la maduración del BCV que activará al T4SS regulando el tráfico intracelular

desde el autofagosoma al retículo endoplásmico adquiriendo los marcadores LAMP1 y Sec61β (marcadores endosomales/lisosomales tardíos) en esta etapa del BCV tardío el paso final del tráfico intercelular de *Brucella* es la adquisición de los marcadores característicos del retículo endoplásmico: calnexina, calreticulina y Sec61β para que finalmente la bacteria será liberada de la célula promoviendo la propagación (Figura 1) (Głowacka et al., 2018).

1.4 Quorum sensing en *Brucella* spp.

La detección del Quorum o Quorum sensing (QS) es un proceso de comunicación donde un grupo de bacterias regulan la secreción y detección de señales químicas de moléculas autoinductoras (Fig 2), para iniciar cambios en la expresión génica de sus factores de virulencia (Jin et al., 2021). Este proceso se realiza a partir de una concentración umbral de estos moduladores de detección del Quórum que se unen a reguladores transcripcionales logrando una inducción o represión de los genes objetivo.

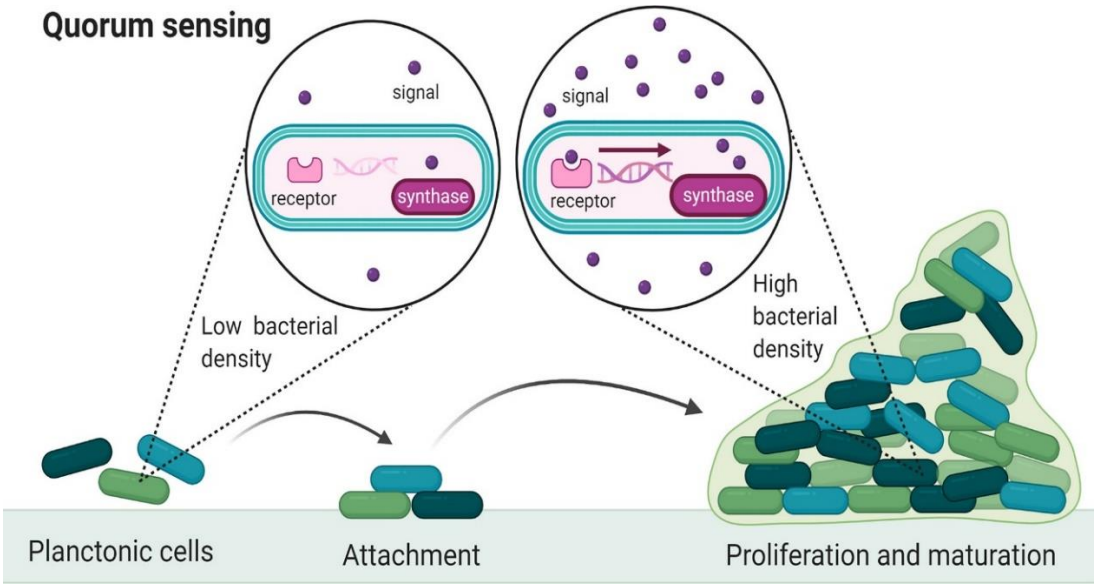


Figura 2. Esquema del Quorum sensing. El QS es un sistema de comunicación dependiente de la densidad celular que requiere la secreción de moléculas de señalización denominadas autoinductores representadas con círculos morados que son producidas por una sintasa y son detectados por un regulador específico, de esta manera se activa la transcripción de genes regulados por QS. Los moduladores de detección del QS aumentan en relación con el número de bacterias. Tomado de Muras et al., 2020.

Los QSM prevalentes para bacterias Gram-negativas incluyen a las *N*-acil homoserina lactonas (AHL) que son sintetizados por AHL-sintasas de tipo LuxI, que consisten en una cabeza polar de lactona de homoserina y una cola alifática no polar, esta naturaleza alifática les permite difundir a través de las membranas bacterianas y una vez que se alcanza un umbral de concentración se unen a regulador transcripcional de tipo LuxR para modular la expresión de diferentes genes (Whiteley et al., 2017).

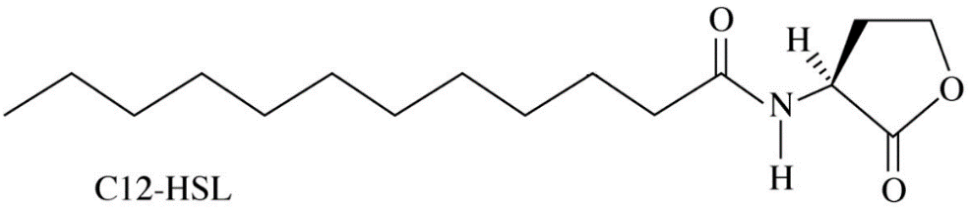


Figura 3. Estructura química del autoinductor de tipo AHL en *Brucella* spp. Tomado de Taminiau et al., 2002

A pesar de que no se ha identificado una AHL-sintasa clásica en el genoma de *B. melitensis,* se sabe que la molécula autoinductora es la N -dodecanoil-homoserina lactona (C12-HSL) (Figura 3) que se ha encontrado en cantidades bajas en sobrenadantes de cultivos (Taminiau et al., 2002), esto se atribuye por la localización intravacuolar de *Brucella* spp. en las células huésped por lo que su QS es un sistema no clásico y su activación no depende netamente de la densidad poblacional. Se han identificado dos reguladores conservados de tipo LuxR: VjbR y BabR que contienen un dominio de unión a AHL en la posición N-terminal, estos reguladores transcripcionales globales se encargan de controlar genes implicados en la virulencia, la respuesta al estrés y el metabolismo (Terwagne et al., 2013).

El regulador transcripcional VjbR modula la expresión del operón *virB* y otros genes asociados con la virulencia de *Brucella* como los componentes flagelares *fliF* y *fliC,* importantes para el establecimiento de la infección crónica, control de la maduración vacuolar y un nicho replicativo seguro (Kleinman et al., 2017; Barbier et al., 2018). El regulador VjbR conserva un dominio funcional que responde a la molécula autoinductora AHL y se ha demostrado que esta unión anula la expresión del operon *virB* y la regulación de múltiples genes, de esta manera C12-HSL modifica directamente la actividad transcripcional de VjbR disminuyendo su expresión y como consecuencia modula la

virulencia de la bacteria, lo cual se ha relacionado con la capacidad de la BCV para madurar a la cronicidad y replicarse. Por otra parte, se ha evidenciado una proteína que hidroliza a las AHL, denominada AibP (proteína de Brucella que inactiva AHL) encontrada en todos los genomas de *Brucella*, lo que provoca un incremento en la virulencia de la bacteria por la expresión del T4SS y genes flagelares como se ejemplifica en la Figura 4 (Terwagne et al., 2013).

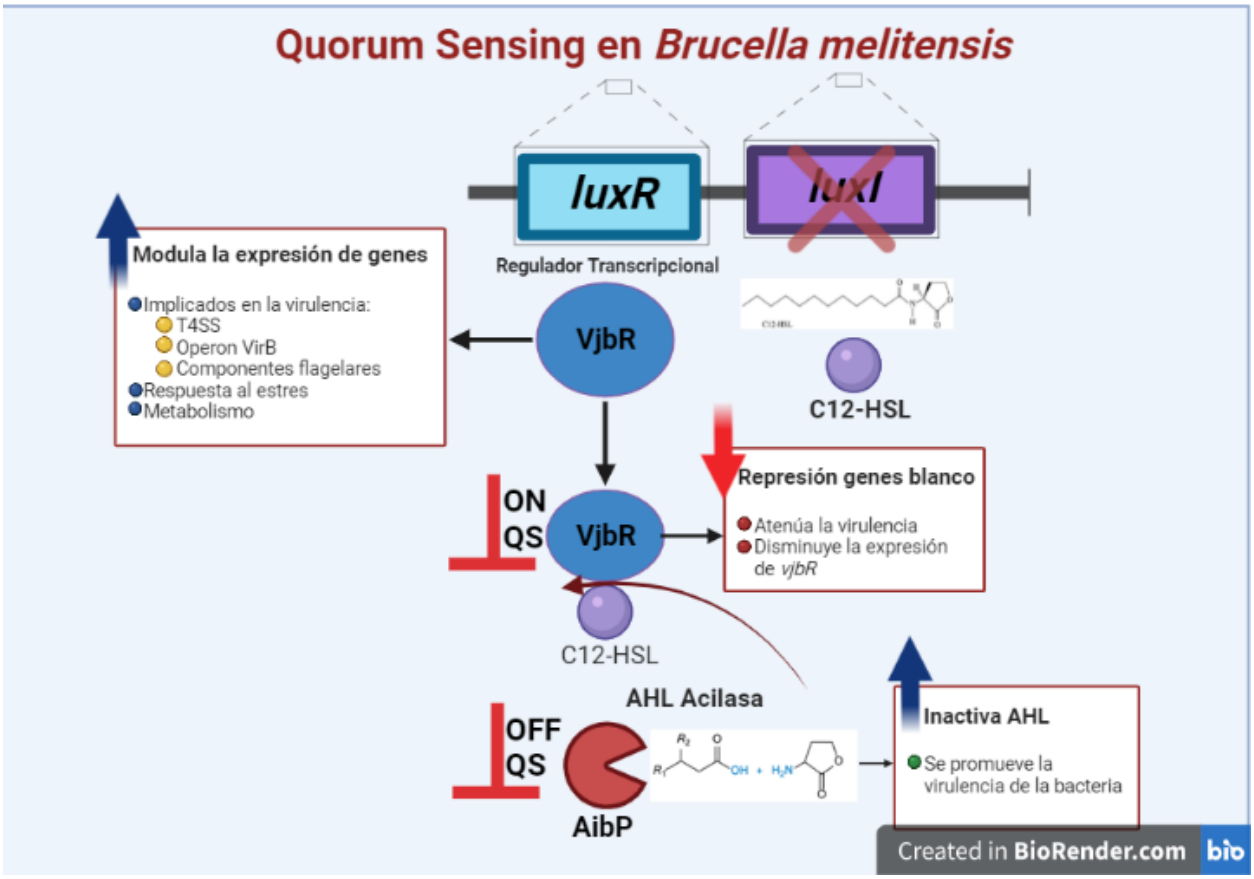


Figura 4. Esquema del Quorum sensing en *Brucella melitensis*. La molécula autoinductora en *Brucella melitensis* es la C12-HSL que disminuye la expresión de *VjbR* atenuando la virulencia de la bacteria, de igual forma se ha demostrado la existencia de la proteína Aibp que es una acilasa que inactiva AHL lo que provoca el apagado del QS promoviendo la virulencia. Creación propia en BioRender.com

Existen diversos estudios acerca de moduladores del Quorum Sensing que pueden atenuar la virulencia de la bacteria al modificar la expresión de genes blanco relacionados con los factores de virulencia, estos estudios han sido llevados en diversos modelos animales, donde combinan la terapia antimicrobiana y los moduladores del QS, logrando

un mejor control de la infección de manera más efectiva, presentando una alternativa como coadyuvantes de antibióticos convencionales (Chen et al., 2019).

En este sentido, el Quorum Sensing basado en N-acil homoserin lactonas (AHL) es importante para la regulación de los determinantes de virulencia de bacterias como *Brucella*. Así, la inhibición de las sintasas de las AHL´s ofrece un potencial terapéutico sin base en antibióticos en contra de las infecciones bacterianas mediadas por el QS.

1.5 DATS sus efectos y su actividad antimicrobiana

Una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo son las infecciones bacterianas y el uso desmedido de antibióticos convencionales ha causado la aparición de bacterias altamente resistentes, por lo que es necesario explorar nuevas estrategias de tratamiento que pudieran relacionarse con mecanismos bacterianos responsables implicados en el establecimiento del proceso infeccioso como el sistema Quorum Sensing (Santhakumari et al., 2019).

El estudio de este sistema de comunicación bacteriana ha mostrado resultados interesantes que han sugerido que el desarrollo de estrategias de interferencia en este mecanismo puede lograr la interrupción de las vías de señalización, mediante inhibidores del Quorum Sensing que modifican de manera importante el establecimiento exitoso del microorganismo en su huésped. De tal manera que esta información ha permitido crear nuevas estrategias antibacterianas para atenuar la producción de diversos factores de virulencia como la formación de biopelículas resistentes a los fármacos (Fong et al., 2018; Jakobsen et al., 2013).

Actualmente, se ha reportado que algunos compuestos bioactivos como los sulfuros de alilo derivados del ajo poseen actividad anti virulenta en patógenos oportunistas alterando estas vías de detección del Quorum, contribuyendo a la atenuación de su virulencia, pero sin inhibir el crecimiento microbiano disminuyendo la posibilidad de desarrollar resistencia (Li et al., 2018; Feng et al., 2014; Wu et al., 2014).

Diversos estudios han demostrado que el ajo (*Allium sativam*) tiene más de 100 metabolitos secundarios biológicamente activos, de los cuales destacan los compuestos orgánicos de azufre (OSC) los cuales comprenden a los sulfatos de alilo, y estos a su

vez engloban al sulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS) y dialil trisulfuro (DATS) como se observa en la figura 5 (Wang et al., 2012). Se ha postulado que el número de átomos de azufre explica la actividad biológica de estos fitoquímicos y al ser DATS el que contiene la mayor cantidad de átomos de azufre es el compuesto con mayor efectividad (Liu et al., 2015; de García Vargas, 2021). Además de que también se ha investigado como agente anticancerígeno, quimiopreventivo, y que regula múltiples vías distintivas del cáncer, incluido el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis, la invasión y la metástasis, también se ha registrado sus propiedades antimicrobianas, modificación redox, su modulación inmunitaria y su papel en la inflamación (Puccinelli et al., 2017; Nicastro et al., 2015).

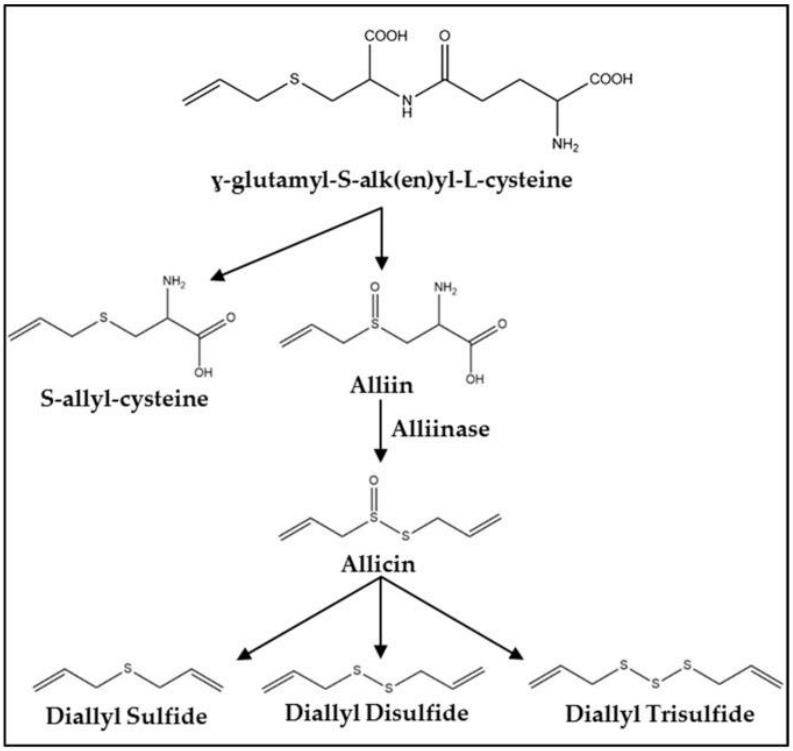


Figura 4. Vía de síntesis de compuestos orgánicos de azúfre (OSC) en Allium. Tomado de Puccinelli et al 2017.

En el 2019, Li et al., en estudios previos determinaron que DADS puede inhibir los factores patógenos al inactivar la transcripción de genes clave de tres sistemas de detección del QS de *Pseudomonas aeruginosa* (*las, rhl y pqs*) además de disminuir la motilidad bacteriana y la quimiotaxis. Sin embargo, aún se necesita más investigación

para determinar cómo los sistemas del QS regulan estas funciones, al no afectar la dinámica de crecimiento, en cambio inhibir la transcripción de estos genes de virulencia. Por ello es importante evaluar los efectos antimicrobianos del Dialil Trisulfuro (DATS) en la expresión genética de *Brucella melitensis*.

2. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos que causan brucelosis, una enfermedad que puede durar semanas o meses si no es tratada efectivamente. *Brucella melitensis* es el principal agente causal en humanos, y su particular estilo de vida intracelular le permite evadir la respuesta inmune de su hospedero mediante estrategias importantes que involucran la expresión de factores de virulencia como *vjbR*, sistema de secreción tipo IV, genes flagelares y modulación del sistema Quorum Sensing un sistema de comunicación utilizado por *Brucella* spp., además, el encendido y apagado del QS se ha relacionado con la expresión organizada y coordinada de múltiples genes.

Debido a la creciente incidencia de la brucelosis y la capacidad del patógeno para persistir y establecer una enfermedad crónica es esencial el uso de antibióticos durante un tiempo prolongado, hecho que pudiera provocar la resistencia de la bacteria ante el tratamiento convencional, por lo que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que eviten la resistencia a antibióticos es un desafío en la actualidad.

Actualmente, se ha reportado que algunos compuestos bioactivos como los sulfuros de alilo derivados del ajo poseen actividad anti virulenta en patógenos oportunistas, de modo que son capaces de alterar la expresión de factores de virulencia del patógeno para que de esta manera se logre eliminarlos. Estudios previos *in vitro* e *in vivo* revelaron una inhibición significativa del Quorum Sensing de *Pseudomonas aeruginosa*.

Así, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto del Dialil Trisulfuro (DATS) en la expresión genética de algunos factores de virulencia y su efecto antimicrobiano en cultivos de *B. melitensis*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar los efectos del fitoquímico Dialil Trisulfuro (DATS) sobre la expresión genética de factores de virulencia relacionados con el Quorum Sensing en cepas de referencia y un aislamiento clínico de *Brucella melitensis*, y su relación con su capacidad antimicrobiana.

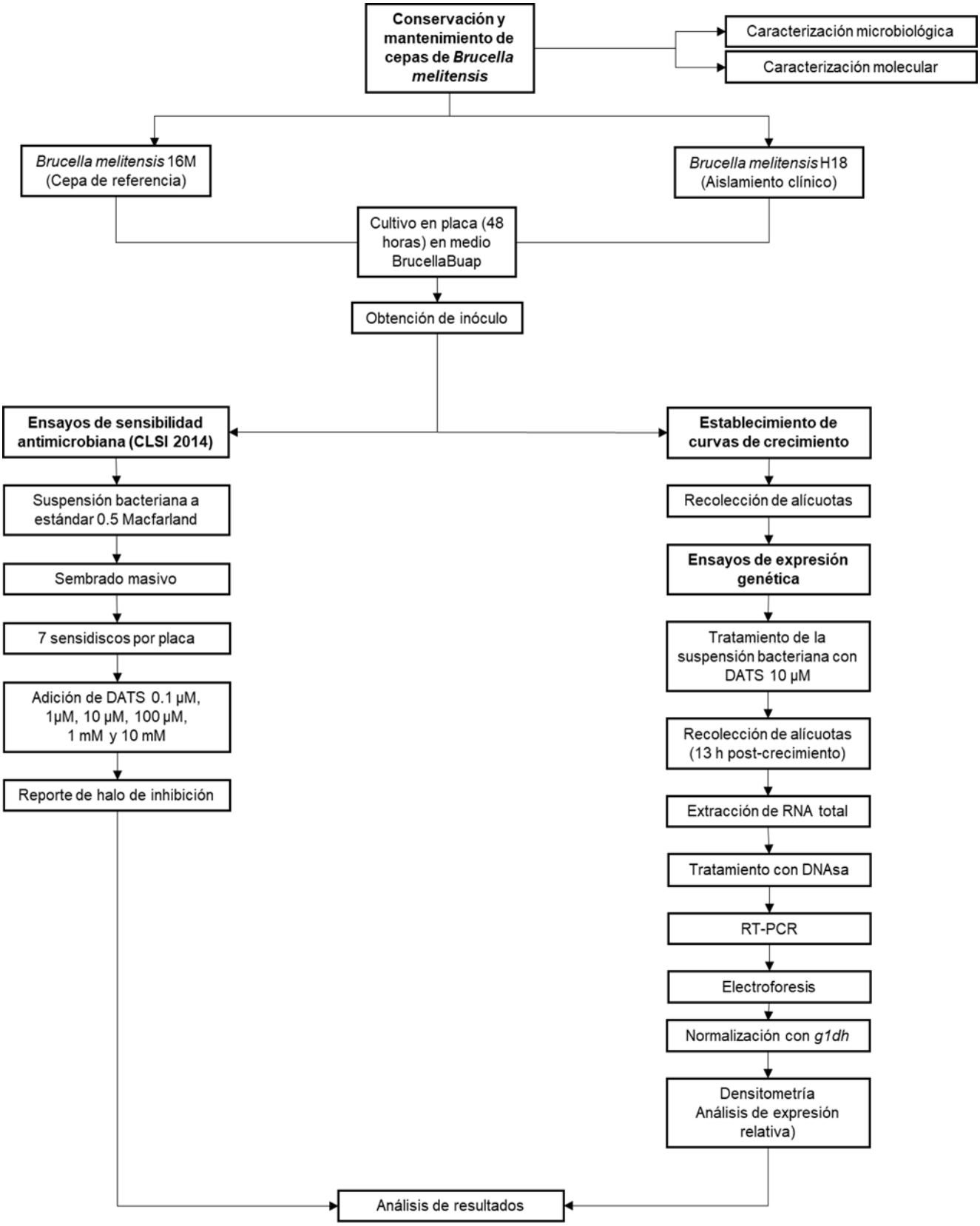
3.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto antimicrobiano de DATS mediante ensayos de sensibilidad antimicrobiana a las concentraciones de 0.1 µM, 1µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM con el método estandarizado de difusión en disco de acuerdo con la Guía CLSI 2014 contra *B. melitensis* 16 M, *B. melitensis* H18, *E. coli* y *S. aureus* como referencia de bacterias gram negativas y gram positivas.

- Identificar la fase logarítmica exponencial del crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M, y establecer las unidades formadoras de colonias (UFC) en esta fase de mayor capacidad virulenta.

- Identificar los cambios inducidos por DATS 10 µM en los patrones de expresión de *vjbR*, *virB2* y *fliC* en la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y el aislamiento clínico *B. melitensis* H18, mediante PCR punto final.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico o grado biología molecular según sea el caso para cada ensayo experimental.

5.2. Material biológico

Cepas bacterianas de *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18 aislada de humano conservadas en el laboratorio de patogenicidad microbiana (CICM-ICUAP).

5.3. Equipos

Tabla 1. Características de los equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO
Incubadora	Boekel Sientific	Dry Batch Incubator. Boekel.
Cámara De Electroforesis	Bluegel	Single
Gabinte De Bioseguridad	Nuaire. Biological Safety Cambinets	Class Ii Type A/B
Centrífuga	Eppendorf	5424r
Espectrofotómetro	Jenway	6405 Uv/Vis
Estufa	Lumiste Ii	Iec - 41
Incubadora Con Agitación	New Brunswick Scientific	Innova 4080. Incubator Shaker.
Termociclador	Techne	Tc - 412
Vortex	Scientific Industries.	Vortex –T. Genie 2
Campana De Bioseguridad	Nuaire. Biological Safety Cambinets	Class Ii Type A/B

5.4. Métodos

Tabla 2. Referencia de los métodos

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Obtención de RNA total	Método de TRIzol	Terwagne et al., 2013
Obtención de cDNA	Retrotranscripción	DNAsaI, RNAsa free Thermo Scientific.
Identificación molecular de la cepa	PCR múltiple Brucella-ladder v2.0	López-Goñi et al., 2011
Detección de los genes *vjbR, virB2, fliC* y *ftcR*	PCR punto final	Terwagne et al., 2013; Lei et al., 2016; Smith et al., 2013
Sensibilidad antimicrobiana	Método de difusión en disco	Guía CLSI 2014

6. METODOLOGÍA

6.1. Conservación y mantenimiento de las cepas de *Brucella melitensis*

Las cepas utilizadas en este estudio fueron reactivadas mediante el modelo murino (de Flores, 2018), las bacterias se aislaron y se conservaron en caldo BrucellaBUAP con glicerol al 30% posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su identificación microbiológica y molecular.

6.2. Caracterización microbiológica

Las cepas previamente almacenadas a –70ºC se descongelaron y se aislaron para realizar su caracterización microbiológica, se sembraron en agar BrucellaBUAP mediante estría cruzada, se incubaron a 37ºC con atmosfera de CO_2 al 5% durante 48 h. Una vez pasado el tiempo de incubación se observaron colonias puntiformes circulares, convexas, con bordes regulares y traslúcidas, a partir de una colonia aislada se realizó tinción de Gram y se realizaron pruebas bioquímicas en TSI, LIA, MIO, citrato de Simmons y urea de Christensen siguiendo la metodología de caracterización microbiológica de Flores, 2018.

6.3 Caracterización molecular de las cepas bacterianas

La caracterización molecular se realizó a partir de la extracción de ADN mediante la técnica de choque térmico, donde se realizó una suspensión bacteriana (OD600 =1.0) en un tubo para microcentrífuga con 300 µL de agua destilada estéril, posteriormente se sometió a ebullición en un baño seco durante 10 min y se tomó el líquido sobrenadante el cual se centrifugó a 8000rpm/15 min para separar el sobrenadante nuevamente, finalmente se sometió a PCR múltiple un microlitro de ADN extraído mediante el método Brucella-ladder v2.0 para confirmar la identidad de la cepa (López-Goñi et al., 2011) cuya mezcla de reacción se indica en la tabla 3.

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

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	0.5X	12.5
Mezcla de oligonucleótidos	0.5 µM	6
DNA	1 µg	-
Agua libre de nucleasas (c.b.p.25µL)		-

El protocolo de reacción de PCR se muestra en la tabla 4, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, sometidos a 110 V por 30 min para su corrimiento y empleando un marcador de peso de 100 pb Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder.

Tabla 4. Protocolo utilizado en la reacción de PCR Brucella-ladder v2.0

CICLOS	FASE	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	7 minutos
30	Desnaturalización	95	35 segundos
	Alineación	63	1 minuto
	Extensión	72	3 minutos

1	Extensión final	72	minutos

6.4 Elección de la concentración de DATS a evaluar en ensayos de expresión genética

La mayoría de los ensayos de DATS sobre la inhibición de factores de virulencia, la inactivación de la transcripción de genes del Quorum Sensing y sus efectos sobre el crecimiento han sido realizados en *Pseudomonas aeruginosa*. Li et al., en el 2018 establecieron y evaluaron el efecto de DATS a concentración de 0.64 mg/mL con resultados positivos en la inhibición de factores de virulencia. Feng et al., en el 2014 reportaron las respuestas de *Cronobacter sakazakii* a diferentes compuestos orgánicos de azufre a 3.88 mM disuelto en DMSO mostrando una regulación negativa de los genes relacionados con la motilidad. En el 2015, Liu et al., reportaron el efecto dosis respuesta de DATS sobre células tumorales de cáncer de mama utilizando diferentes concentraciones que iban de 2.5 µM, 5 µM, 10 µM hasta 20 µM utilizando como vehículo DMSO al 1% para solubilizar al fitoquímico, por lo que finalmente se decidió que en este estudio los ensayos de expresión genética se evaluaran a la concentración de 10 µM de DATS.

6.5 Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

6.5.1 Obtención del inóculo

A partir de un cultivo en placa de las cepas utilizadas (*B. melitensis* 16M y H18) se tomó un inoculo para realizar un cultivo *overnight* (O.N.) en caldo BrucellaBUAP a 37ºC/150 rpm/13h, para obtener una suspensión bacteriana de $1x10^7$ UFC en 200 µL de PBS pH 7.4 estéril siguiendo el método del CLSI 2014.

6.5.2 Método de difusión en disco

A partir de la obtención del inóculo se realizó un cultivo microbiológico a 37°C durante 48 h con atmosfera de CO_2 al 5% en medio BrucellaBUAP para obtener una suspensión bacteriana a estándar 0.5 de MacFarland que se ocupó para realizar un sembrado masivo, se utilizaron dos placas por cepa y se colocaron 7 sensidiscos de 100 mm de

diámetro por placa, a continuación, cada concentración de DATS se colocó por duplicado (0.1 µM, 1µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM) en volumen de 10 µl por sensidisco, además del vehículo (DMSO) en un sensidisco para quitar las interferencias que pudiera provocar, posteriormente se incubaron 37°C/24 h y 48 h finalmente se realizó el reporte del halo de inhibición.

6.6 Estudios de expresión genética

6.6.1 Extracción de RNA

Se obtuvo una suspensión bacteriana de 1x107 UFC en SSI, a una Absorbancia=0.01 a λ= 600 nm con el propósito de evaluar la expresión genética en la fase más virulenta del crecimiento vegetativo de las cepas en estudio. Así, se recolectaron alícuotas bacterianas después de 13 h a 150 rpm/37°C por triplicado, en los siguientes grupos de estudio: *B. melitensis* 16M y *B. melitensis* H18 en medio BrucellaBuap (control), medio de cultivo BrucellaBuap/DMSO 5% (vehículo) y medio de cultivo BrucellaBuap/DMSO 5%/DATS 10 µM. Estas alícuotas se centrifugaron 5000 rpm/50 min/4 °C y se conservarán en RNA later. Posteriormente se realizó la extracción de RNA de cada muestra mediante el método TRIzol, y será conservado a -70°C para su posterior análisis. Se examinó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% mientras que la concentración del RNA total obtenido se analizó espectrofotométricamente a 260 nm donde 1 unidad de absorbancia (A260) equivale a 40 µg de una cadena de RNA/mL. La pureza se determinó de acuerdo con las relaciones; A260/A280 =1.7 - 2.1 y A260/A230 = 1.8 – 2.1 (Petrov et al., 2013).

6.6.2 Retrotranscripción

El RNA total fue tratado con DNAsa para eliminar el DNA genómico mediante el kit DNasa I, libre de ARNasa de ThermoFisher siguiendo las instrucciones del fabricante, cuya reacción se realizó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente el tratamiento se detuvo y de esta manera se inactivó a la enzima DnasaI; se agregó 1 µL de EDTA 50 mM y se incubó a 65°C por 10 minutos la mezcla de rección se observa en la tabla 5.

Una vez removido en su totalidad el DNA genómico, se procedió a la síntesis de cDNA mediante el Kit Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA synthesis mediante las instrucciones del fabricante, la mezcla de reacción se muestra en la tabla 6.

Tabla 5 Mezcla de reacción utilizada en el tratamiento con DNAsa

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
Buffer de reacción 10 x con $MgCl_2$	1X	1
DNase I, RNase-free	0.5 µM	1
RNA	1 µg	1
Agua libre de nucleasas (c.b.p.10 µL)		-
EDTA	5mM	1

Tabla 6 Mezcla de reacción utilizada en la Retrotranscripción

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
RNA libre de gDNA	0.1 ng a 5 µg	10
Random Primer	5µM	1
Buffer de reacción 5X	1X	4
Inhibidor Riboblock RNAasa	1U	1
Mezcla dNTP 10 mM	0.5 mM	2
Enzima RT	10U	0.3
Agua libre de nucleasas		cbp 20
Volumen final		20

6.6.3 PCR punto final

La mezcla de reacción para PCR punto final se realizó con GoTaq® Green Master Mix, utilizando una concentración de 12.5 pmol/µL de cada primer y 1 µL (<250 ng) de cDNA para un volumen final de 25 µL como se muestra en la tabñla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada en PCR punto final

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	0.5X	12.5
Oligo Forward	0.5 µM	1
Oligo Reverse	0.5 µM	1
cDNA	1 µg	1
Agua libre de nucleasas		9.5
Volumen final		25

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de interés se muestran en la Tabla 8. Se muestra el protocolo de reacción de PCR en la Tabla 9, las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: la desnaturalización inicial 95°C se llevó a cabo durante 20 segundos, después 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos, alineamiento 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 60 segundos, finalmente posterior al último ciclo, se realizó una extensión final a 72 °C durante 300 segundos.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la evaluación de la expresión genética de genes eucariontes y procariontes por PCR punto final.

Gen diana	Número de Acceso	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón	Referencia
vjbR	BMEII1116	F 5´ - CCGCTACGTAACGCATACCT - 3´	139 pb	Uzureau et al., 2010
		R 5´- CGGGTCAATGGCAAAGTAGT - 3´		
virB2	BMEII0026	F 5´- GCAAAAAGTGCTGGACTTGCTA - 3´	80 pb	Terwagne et al., 2013

		R 5´- CCATCTTGTAACCGGACCAGAT - 3´		
fliC	BMEII0150	F 5´- CTTCGTACAATCGTTCCGGT - 3´	81 pb	Terwagne et al., 2013
		R 5´- CCATGGTCTTCGCATCAGT - 3´		
g1dh	BMEI0861	R 5´- AAATACGCCATCGACCAGAT - 3´	82 pb	Uzureau et al., 2010
		R5´-ACTTGCCGACATGGCTATG -3´		

Tabla 9. Protocolo empleado en la reacción de PCR punto final (Terwagne et al., 2013)

CICLOS	FASE	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	20 segundos
40	Desnaturalización	95	5 segundos
	Alineación	58	30 segundos
	Extensión	72	60 segundos
1	Extensión final	72	300 segundos

6.6.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en buffer TBE 1X, el corrimiento electroforético se realizó a 90 V durante 50 minutos, se utilizó un marcador de 50 pb Thermo Fisher Scientific GeneRuler 50 pb DNA Ladder. Finalmente el cDNA amplificado fue normalizado con respecto a la expresión del gen constitutivo *g1dh* para el análisis mediante densitometría.

6.6.5 Análisis de expresión relativa

Este análisis se realizó mediante densitometría, estableciendo una relación entre las densitometrías obtenidas de los genes en estudio con el gen constitutivo, analizadas mediante el empleo del software DGIT3.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización microbiológica y molecular de las cepas de estudio

7.1.1. Mantenimiento y caracterización microbiológica de las cepas bacterianas

La pureza de las cepas de *Brucella melitensis* 16M y *Brucella melitensis* H18 se analizó mediante ensayos microbiológicos de esta manera se confirmó su género y especie. La identificación de las cepas utilizadas fue a partir de su morfología colonial (Figura 6) donde *Brucella melitensis* presenta colonias circulares, convexas de bordes regulares, translúcidas de coloración ámbar, en la figura 6A las colonias de *Brucella melitensis* H18 presentan una morfología colonial más pequeña y puntiforme que *B melitensis* 16M (Figura 6B), a pesar de esto no se observan diferencias en la tinción de Gram, como se aprecia en la Figura 7, en donde se identifican bacilos cortos gram negativos.

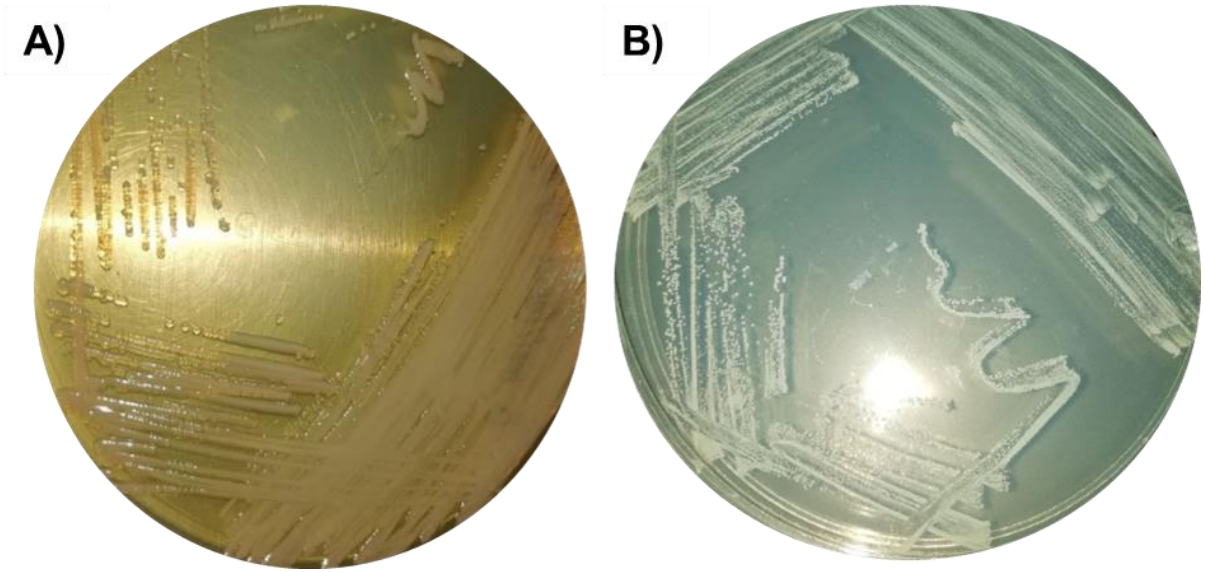


Figura 5. Cultivo microbiológico de *Brucella melitensis* en medio Agar BrucellaBUAP después de 48 horas de incubación a 37°C con tensión parcial de CO_2 al 5%. **A)** Morfología colonial de *Brucella metinensis* 16 M. **B)** Morfología colonial de *Brucella melitensis* H18.

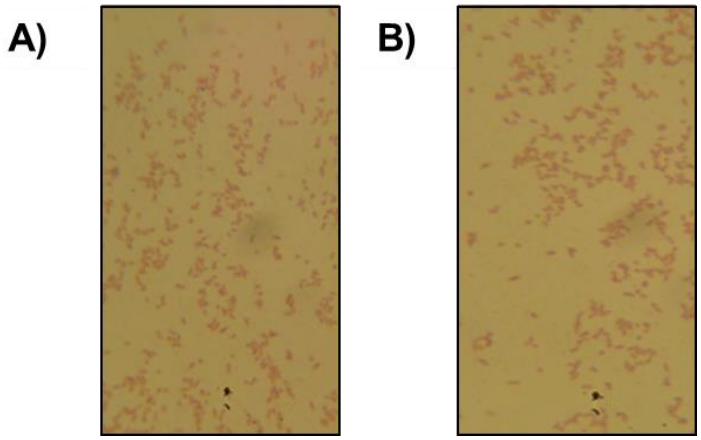


Figura 6. Tinción de Gram. A) *Brucella melitensis* 16 M. **B)** *Brucella melitensis* H18. Se muestran bacilos cortos Gram-negativos característicos del género *Brucella* spp.

Después se realizaron pruebas bioquímicas a partir de una colonia aislada inoculando los medios TSI, LIA, MIO, Citrato de Simmons y UREA (Figura 8), éstas demostraron que *Brucella* spp., no fermenta azúcares como glucosa, sacarosa o lactosa y no producen ácido sulfúrico en el medio TSI, no descarboxilan la lisina en LIA, no utilizan el citrato como única fuente de carbono pero al contar con la enzima ureasa pueden hidrolizar la urea, en el medio MIO no descarboxilan la ornitina, son indol negativas y aunque tienen genes que codifican para flagelo son inmóviles pues no lo expresan constitutivamente.

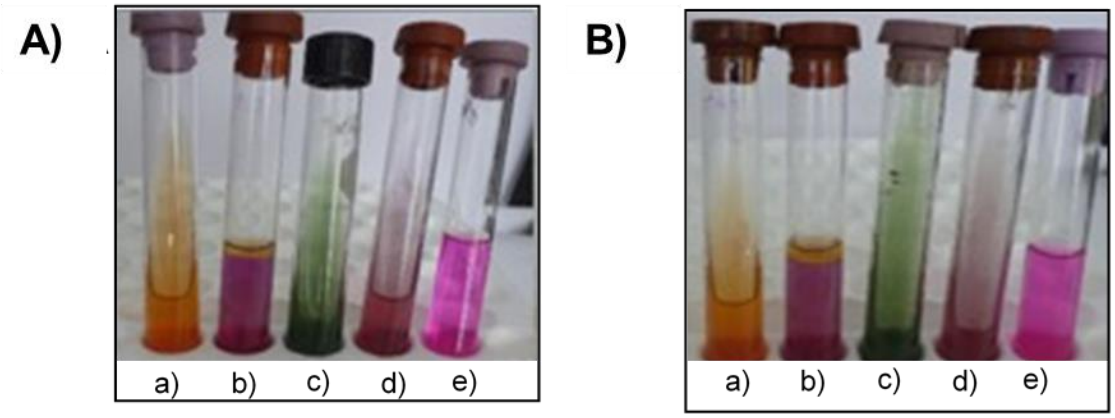


Figura 7. Identificación de *Brucella* mediante Pruebas Bioquímicas. a) Agar TSI Hierro Triple Azúcar b) Agar MIO Movilidad Indol Ornitina c) Agar Citrato de Simmons d) Agar LIA Hierro Lisina e) Agar Urea. **A)** Pruebas bioquímicas para *Brucella melitensis* 16M. **B)** Pruebas bioquímicas para *Brucella melitensis* (H18).

7.2 Caracterización molecular de género y especie

La caracterización molecular se realizó mediante mediante PCR múltiple de punto final, en la cual las especies de *Brucella melitensis* se caracterizan por presentar un patrón típico de la amplificación de seis fragmentos de 1,682, 1,071, 794, 587, 450 y 152 (pb) (López Goñi *et al*., 2011), los cuales fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % como se muestra en la Figura 9.

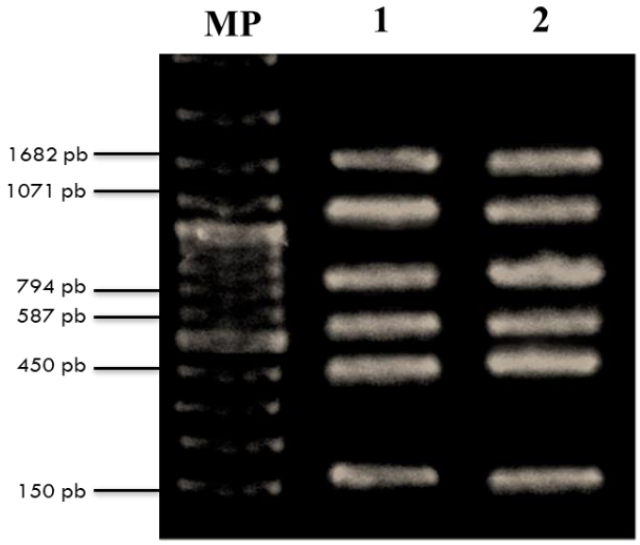


Figura 8. Identificación de las cepas por PCR múltiple: Brucela ladder v2.0. Carril 1: Marcador de peso Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder. Carril 2: B. *melitensis* 16M Carril 3: *B. melitensis* H18.

7.3 Análisis de los efectos de DATS en los ensayos de sensibilidad antimicrobiana y factores de virulencia

Al ser DATS uno de los compuestos organosulfurados más abundantes del aceite de ajo con una variedad de efectos benéficos que van desde antioxidantes, anticancerígenos y quimiopreventivos (Puccinelli et al., 2017). Diferentes investigadores han documentado el efecto antimicrobiano de los componentes del ajo; la alicina tiene un amplio espectro de dianas celulares, eficaz contra bacterias y hongos, y se ha documentado su actividad contra patógenos pulmonares (Reiter et al., 2017).

La alicina se descompone rápidamente en compuestos ricos en azufre incluidos el dialil sulfuro (DAS), el dialil disulfuro (DADS) y el dialil trisulfuro (DATS), derivados que recientemente han tomado gran importancia por su capacidad antimicrobiana y cuyo número de azufres determina esta capacidad (Tang et al., 2021). Uzun y colaboradores en el 2019 evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite de ajo y los sulfuros de alilo, contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* microorganismos responsables de la otitis media externa y encontraron que el compuesto más eficaz era el dialil trisulfuro, sin embargo, aunque exhibió actividad microbiostática, este efecto estuvo por debajo de los antibióticos convencionales.

Por otra parte, no hay ensayos de la evaluación del efecto de DATS sobre los factores de virulencia o las vías de detección del QS en bacterias a pesar de ello Li et al., durante el 2018 evaluaron el efecto del disulfuro de dialilo DADS sobre el crecimiento, factores de virulencia y transcripción de genes implicados en el QS de *Pseudomonas aeruginosa,* donde DADS inhibió efectivamente los factores de virulencia al inactivar la transcripción de genes de los sistemas de detección del QS, en el 2019 también demostraron que la motilidad bacteriana y la quimiotaxis también fueron inhibidos por DADS, finalmente Li y colaboradores en el 2021 demostraron que el dialil sulfuro (DAS) inhibió de igual manera la transcripción de la mayoría de genes relacionados al QS y además mejoró la expresión de ciertos genes implicados en la biosíntesis de factores nutricionales beneficiosos para *Pseudomonas aeruginosa.*

7.3.1 Efectos de DATS sobre la sensibilidad antimicrobiana

El crecimiento de *Brucella melitensis* 16M y *Brucella melitensis* H18 no fue inhibido en presencia de ninguna de las concentraciones evaluadas de DATS (1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM), como se observa en la figura 10. Inicialmente se exploró el efecto inhibitorio del fitoquímico, y se evaluaron las condiciones de desarrollo del método de difusión en disco, realizando los ensayos por duplicado con cada sensidisco, considerando el desarrollo del ensayo en presencia de un control con agua destilada y otro con el vehículo DMSO para eliminar interferencias. Posteriormente, se decidió evaluar 5 concentraciones de DATS 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM y el efecto de los tres antibióticos para reportar su concentración mínima inhibitoria. En la Figura 11 se

observa que DATS no desarrolló la presencia del halo de inhibición de *B. melitensis* por lo que no hubo inhibición del crecimiento del patógeno. En cambio, se observa que los antibióticos considerados como un control positivo de inhibición del crecimiento de este patógeno, Ampicilina, Ácido Nalidíxico y Sulfametoxasol/Trimetoprima, sí inhibieron el crecimiento. De igual forma se muestran las placas de crecimiento de *S. aureaus* y *E. coli* como cepas de referencia de bacterias gram positivas y gram negativas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), los antibióticos doxiciclina y estreptomicina, rifampicina, gentamicina o sulfametoxazol/trimetoprima son empleados en el tratamiento de la brucelosis. Es recomendable el uso de 100 mg de doxiciclina cada 12 horas durante 45 días, además de 1 g de estreptomicina al día durante 15 días, pero la principal terapia alternativa es de 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 45 días, más 15 mg de rifampicina por kilo y día (600-900 mg) durante 45 días. Asimismo, se establece que la estreptomicina puede sustituirse por 5 mg de gentamicina por kilo y día, durante 7 a 10 días. El tratamiento óptimo para las embarazadas, los recién nacidos y los niños menores de 8 años aún no se ha determinado, en el caso de los niños, las opciones incluyen la trimetoprima/sulfametoxazol (cotrimoxazol) combinada con un aminoglucósido (estreptomicina, gentamicina) o rifampicina (Organización Mundial de la Salud, 2020). Aun así, los tratamientos requieren su aplicación por más de una semana y debe evitarse el tratamiento con un solo antibiótico, ya que existe una alta tasa de recaída cuando no se usa un régimen combinado y durante el tiempo indicado. Además, la falta de atención para terminar estos tratamientos puede provocar riesgo de generar resistencia (Yang et al., 2021).

Si bien la actividad antimicrobiana asociada a los compuestos hidrofóbicos del ajo como alicina, vinilditiinas, ajoenos y polisulfuros de dialilo ha sido reportada en múltiples estudios, no se había reportado en contra de *Brucella* spp.

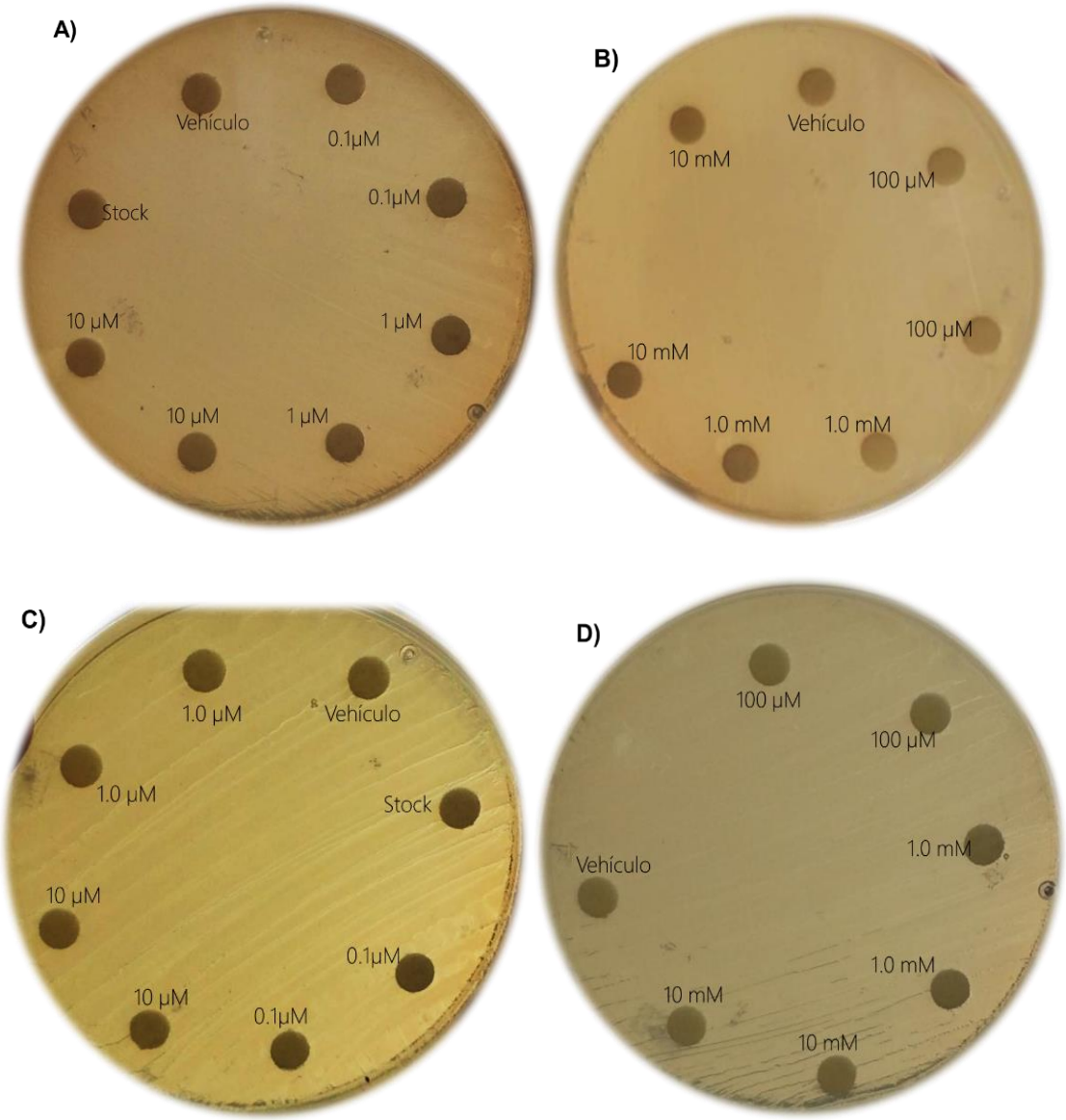


Figura 9. Estandarización del método de sensibilidad antimicrobiana. Crecimiento de *Brucella melitensis* 16 M frente a sensidiscos en presencia de **A)** DATS 0.1 µM, 1µM, 10 µM **B)** DATS 100 µM, 1 mM y 10 mM y Crecimiento de *Brucella melitensis* H18 frente a **C)** DATS 0.1 µM, 1µM, 10 µM **D)** DATS 100 µM, 1 mM y 10 mM**,** además de un sensidisco con agua destilada (Control) y DMSO (Vehículo).

La mayoría de los estudios atribuyen la capacidad antimicrobiana del ajo a la alicina la cual es capaz de inhibir la formación de biopelículas de bacterias el cual es un factor de virulencia importante y una de las principales causas de resistencia bacteriana al tratamiento con antibióticos (Nakamoto et al., 2020), los otros compuestos como los sulfuros de alilo pueden ser buenos candidatos en concentraciones más altas para interrumpir el crecimiento bacteriano. DATS ha demostrado mejor actividad

antimicrobiana que los otros sulfuros de alilo como DADS, ya que DATS presenta una actividad química y biológica más compleja y además al presentar una cadena más larga de sulfuros son más estables (Münchberg et al., 2007).

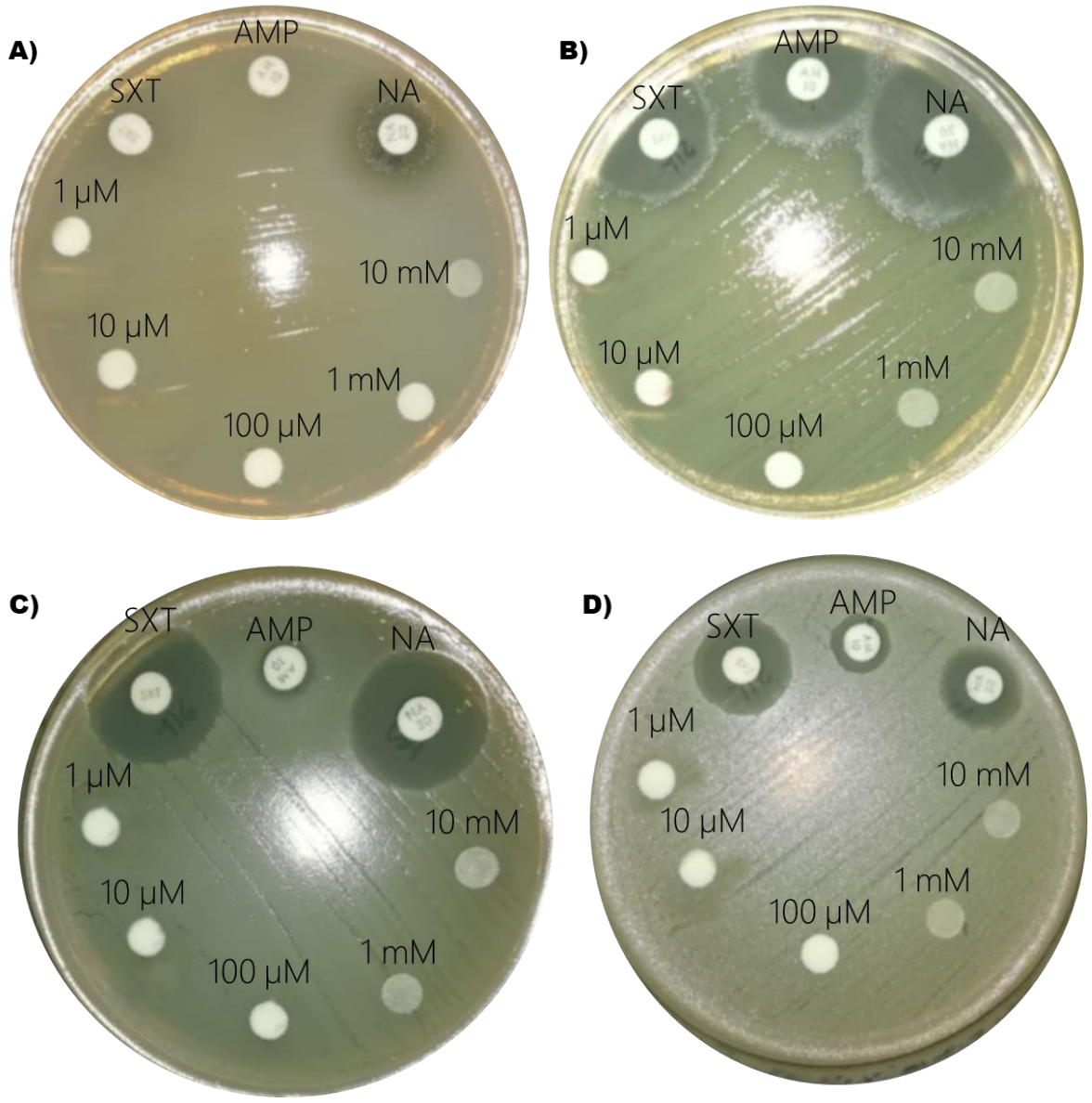


Figura 10. Ensayo de sensibilidad antimicrobiana. A) Crecimiento de *Brucella melitensis* 16 M **B)** Crecimiento de *Brucella melitensis* H18 **C)** Crecimiento de *Escherichia coli* **D)** Crecimiento de *Staphylococcus aureus.* Frente a DATS 1µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM y antibióticos AMP: Ampicilina, NA: Ácido Nalidíxico y SXT: Sulfametoxasol/Trimetoprima.

Oosthuizen y colaboradores demostraron en el 2017 que, al evaluar diferentes mezclas de sulfuros de alilo, la mezcla con mayor concentración de DATS fue la que presentó mayor actividad antimicrobiana, identificando una concentración inhibitoria mínima de 2.5 µg/mL en contra de *M. tuberculosis,* y aquella mezcla con menor cantidad de DATS no inhibió el crecimiento de manera importante, finalmente una mezcla con mayor cantidad de tetrasulfuro de alilo no incrementó la inhibición. Por lo que será interesante desarrollar más estudios aumentando la concentración evaluada e identificar su potencial para alterar el crecimiento bacteriano.

7.3.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con QS en *B. melitensis* en presencia de DATS

Para evaluar los efectos de DATS sobre los genes relacionados al quorum sensing en *Brucella melitensis* primero se identificó la etapa logarítmica tardía, en la curva de crecimiento, por ser la etapa con mayor capacidad de virulencia y en la que se ha identificado una regulación importante del quorum sensing (Terwagne., 2013, Kleinman et al., 2017). La curva de crecimiento de *B. melintesis* 16M y *B. melintesis* H18 se evaluó por 20 horas (Figura 12), monitoreando el desarrollo poblacional a una λ=600 nm (OD_{600} nm), cada hora (Gráfica A). Las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) fueron evaluadas a lo largo del crecimiento bacteriano, y se identificaron las fases exponenciales, estacionaria y de muerte (Gráfica B).

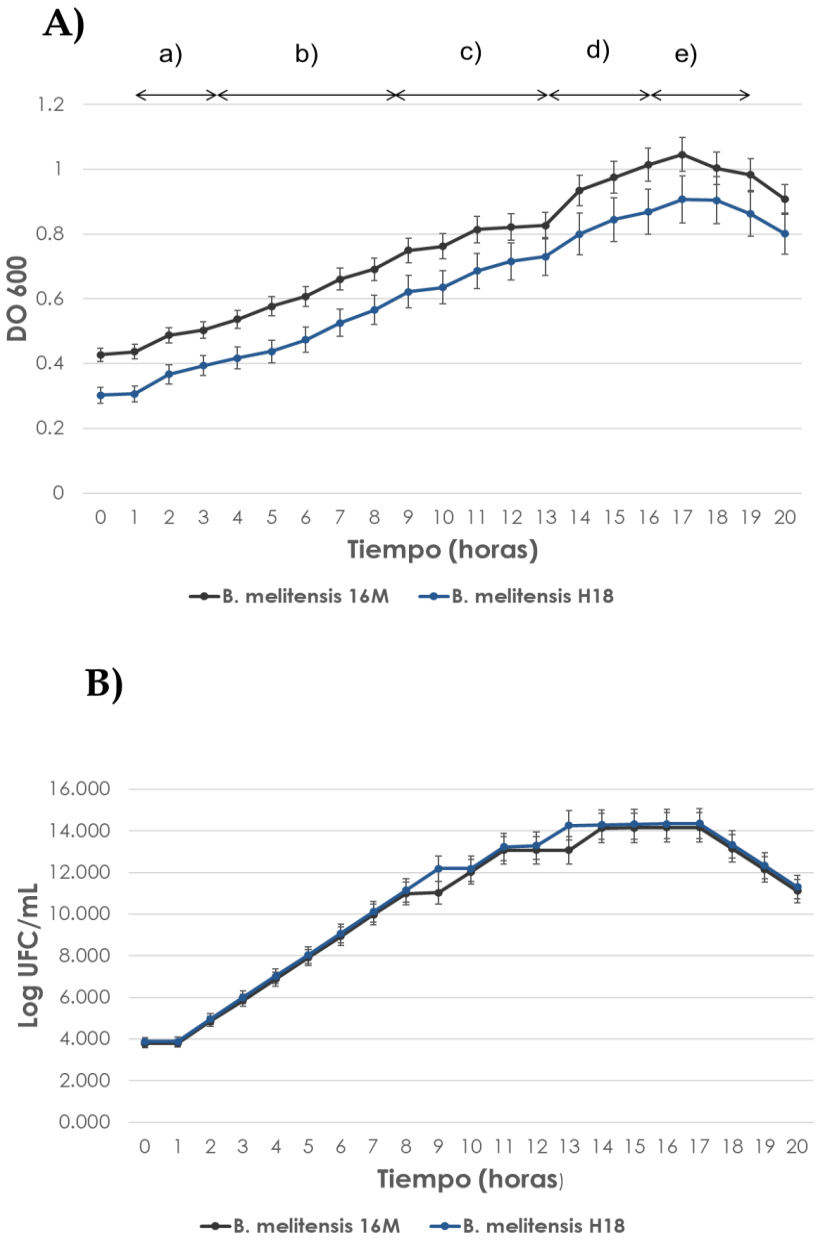


Figura 11. Curvas de crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M y H18. Las cepas fueron cultivadas en caldo BrucellaBUAP, 150 rpm a 37°C. A) Evaluación del desarrollo bacteriano respecto a la absorbancia evaluada a λ=600 nm, monitoreada durante 20 horas. B) Evaluación del desarrollo bacteriano respecto a las UFC/mL, durante 20 h. En los gráficos se muestra la fase exponencial (a-c), estacionaria (d) y de muerte (e). En ambos casos cada punto corresponde a la media de tres repeticiones independientes, las barras de error corresponden al error estándar.

Después de identificar la fase logarítmica tardía, se evaluó la expresión de factores de virulencia relacionados con el QS, para lo cual se recolectaron alicuotas por triplicado del

crecimiento vegetativo de *B. melitensis* 16M y H18 de los tres grupos de estudio Grupo 1: Medio de cultivo BrucellaBUAP (grupo control), Grupo 2: Medio de cultivo BrucellaBUAP adicionado con DMSO 5% para discriminar el efecto del vehículo (grupo vehículo) y Grupo 3: Medio de cultivo BrucellaBUAP adicionado con DATS 10 µM. El RNA total extraído mediante el método TRIzol (adaptado de Terwagne et al., 2013) se cuantificó mediante espectrofotometría y se determinó la pureza por medio de las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, la integridad se identificó mediante electroforesis en gel de agarosa, los resultados se muestran en la Tabla 10 y Figura 13, respectivamente.

Tabla 10 . Análisis de la pureza y cuantificación de RNA extraído de cultivos vegetativos.

MUESTRA	RELACIÓN 260/230	RELACIÓN 260/280	CONCENTRACIÓN (µg/ µL)
Control	1.849	1.939	0.312
Vehículo	1.340	1.914	0.131
Bacteria tratada con DATS 10 µM	1.255	1.903	0.231

La concentración, pureza e integridad fueron óptimas, por lo que la calidad del RNA extraído fue adecuada para continuar con los ensayos posteriores.

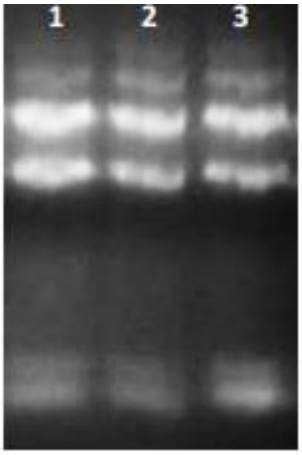
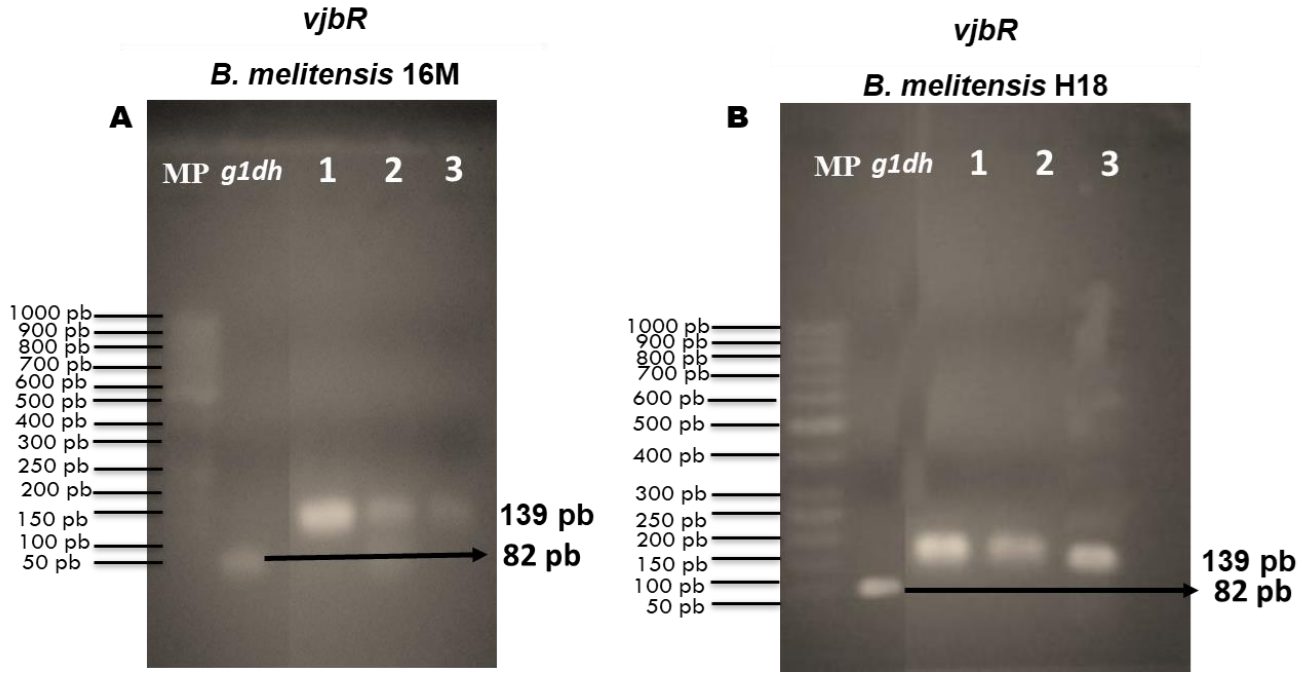


Figura 12. Integridad de RNA extraído de *B. melitensis*. Electroforesis en gel de agarosa 1.8%, buffer TBE 1X /48 V /40 minutos. Carril 1: Control, Carril 2: vehículo, Carril 3: RNA de bacteria tratada con DATS 10 µM.

La determinación de los perfiles de expresión genética de *vjbR, virB2* y *fliC* se observan en la Figura 14, estos perfiles se identificaron a partir de ensayos de RT-PCR para cada grupo evaluado, los que se indican a continuación. Grupo 1: Control, Grupo 2: Vehículo DMSO 5%, Grupo 3: DATS 10 µM +DMSO 5%, los resultados de los amplicones obtenidos se muestran en la Figura 14 A-F. La densitometría de las bandas amplificadas correspondiente a los productos de RT-PCR de los genes en estudio se normalizó con respecto al gen constitutivo *g1dh,* como se muestra en la Figura 15 A, B y C.



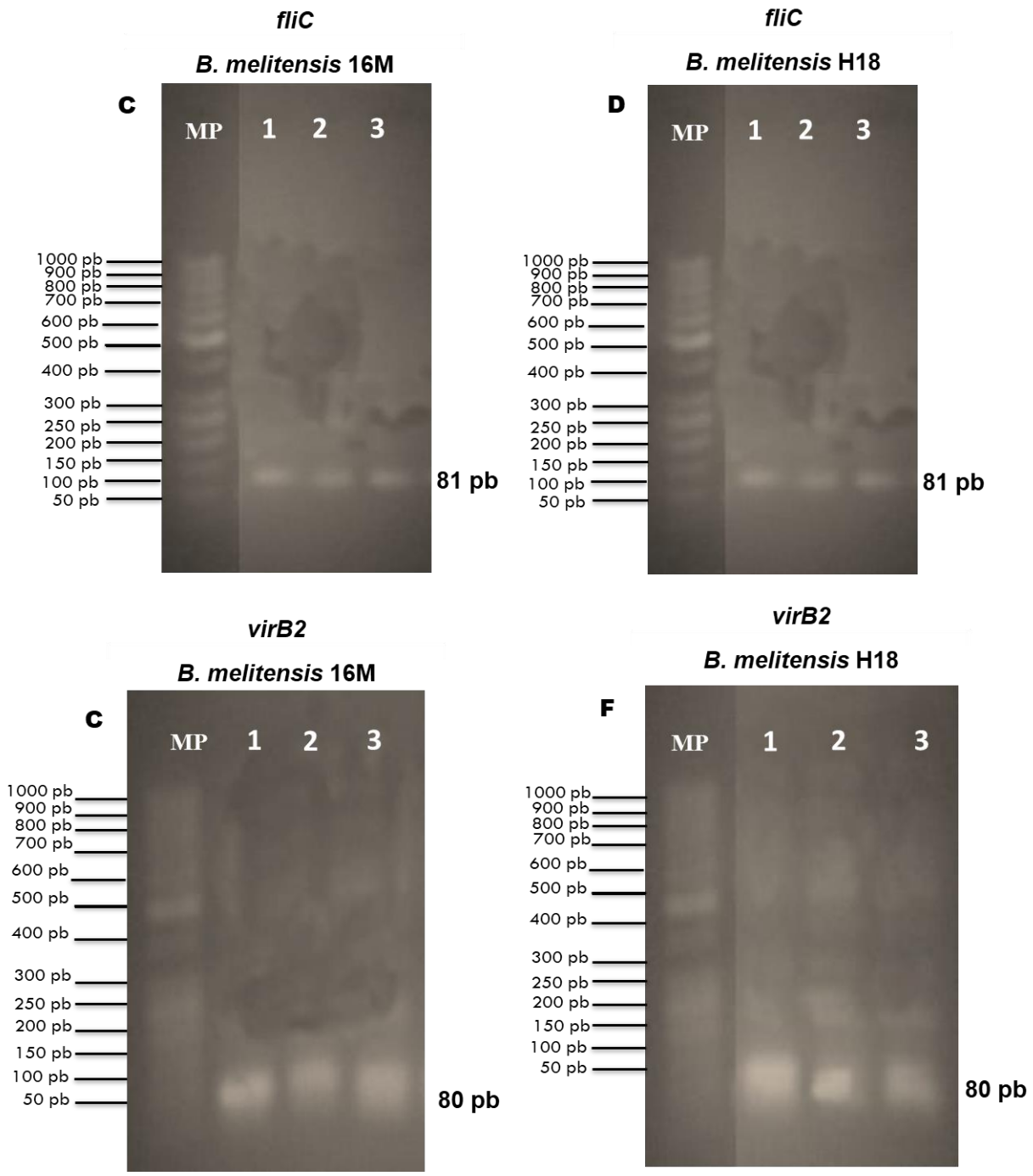


Figura 14. Perfiles de expresión genética de *vjbR, virB2* y *fliC* de *Brucella melitensis* 16M y H18. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2.5%, TBE 1X, 90 V, Línea MP: marcador de 50 pb Thermo Fisher Scientific GeneRuler 50 pb DNA Ladder. Línea 1 (Figuras A y B): Expresión del gen constitutivo *g1dh*. En todas las imágenes Línea 1: grupo control, Línea 2: grupo vehículo, Línea 3: grupo tratado con DATS 10 µM. Se indica el tamaño de amplicón de cada gen amplificado.

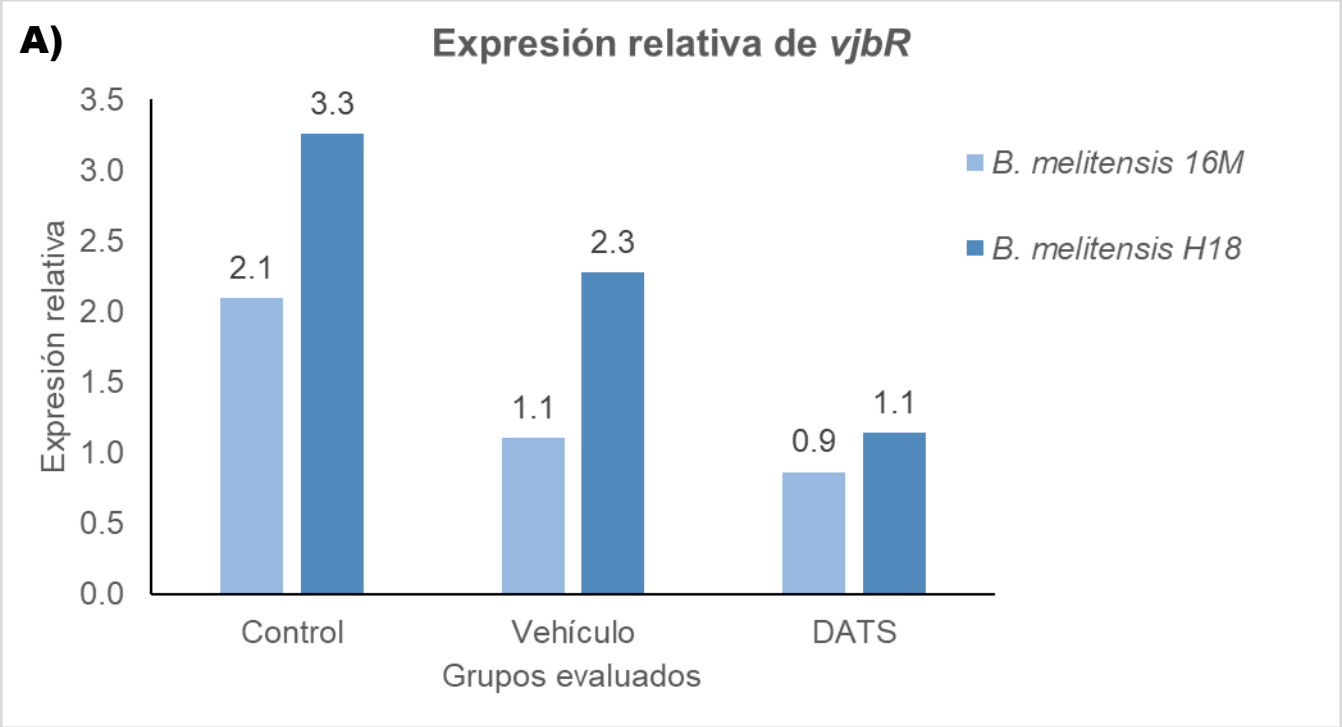
Ambas cepas, *Brucella melitensis* 16M y el aislamiento clínico *Brucella melitensis* H18 empleadas en este estudio, fueron previamente activadas y recuperadas del modelo murino (De Flores Martínez, 2018) en donde se demostró su capacidad para inducir cambios fisiopatológicos en bazo e hígado, los cuales fueron más severos al infectar a los ratones con la cepa H18.

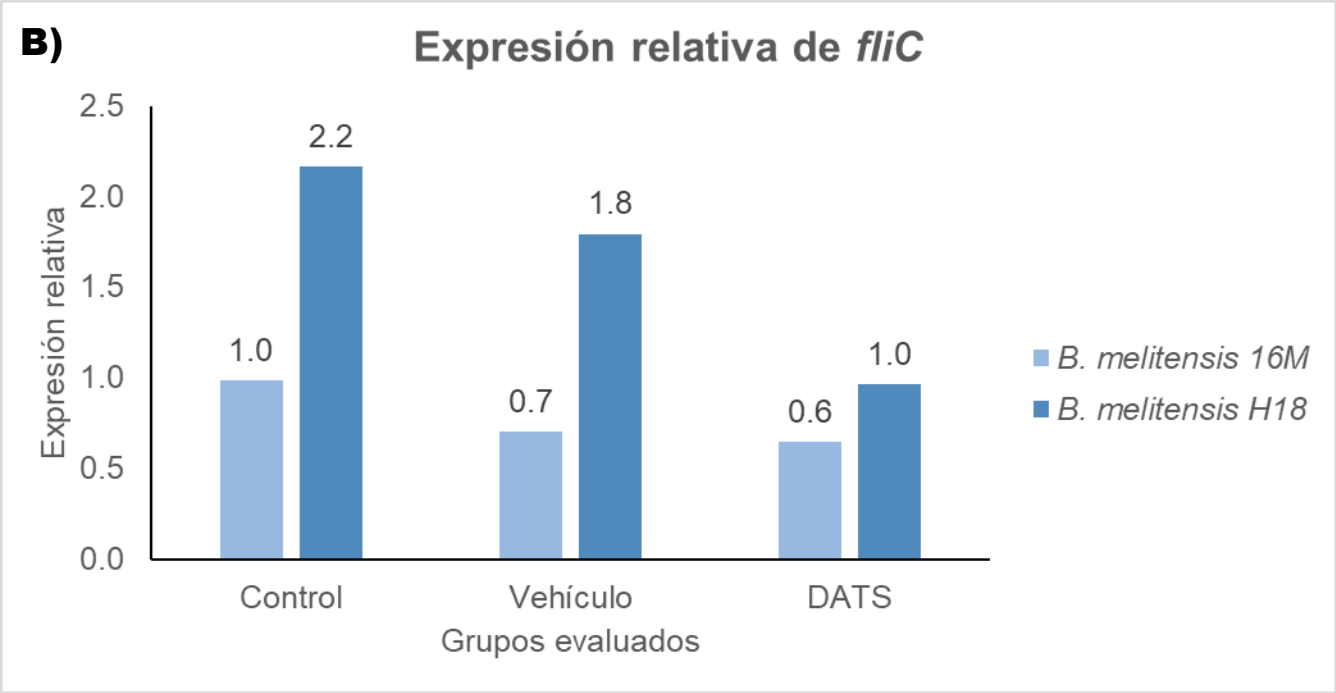
En este estudio, ambas cepas mostraron cambios en los patrones de expresión de *vjbR, virB2* y *fliC* en presencia del fitoquímico DATS, respecto al grupo control. En la Figura 15 se observa que la expresión de *vjbR, fliC* y *virB2* del aislamiento clínico *Brucella melitensis* H18 es mayor al 50% que la expresión mostrada por la cepa de referencia *Brucella melitensis* 16M, lo que sugiere que el aislamiento bacteriano de humano podría presentar mayor capacidad para desarrollar sus características virulentas que la cepa de referencia, debido a que estos 3 genes se expresan con mayor intensidad y están relacionados con el establecimiento del proceso infeccioso.

La presencia del fitoquímico DATS disminuyó severamente la expresión genética de *vjbR* y *fliC* respecto al grupo control. La expresión de *vjbR* disminuyó hasta 66.67% en *Brucella melitensis* H18 y un 57.14% en *Brucella melitensis* 16M. El vehículo también mostró disminución de la expresión de estos genes a la concentración de DMSO empleada para solubilizar al fitoquímico, aunque en el aislamiento clínico la disminución fue menor que en la cepa de referencia, estos resultados señalan que en estudios posteriores será necesario adecuar la concentración empleada para solubilizar al compuesto, cabe señalar que la concentración elegida fue identificada en la literatura consultada en donde no hay evidencias de su empleo en medios de cultivo bacterianos, solamente en líneas celulares humanas y en modelos murinos, por lo que en ensayos futuros será interesante evaluar diferentes concentraciones de DMSO (Liu et al., 2015). Sin embargo, fue interesante identificar que la presencia de DATS promueve la disminución de la expresión de *vjbR*, aún más en el aislamiento clínico, que en la cepa de referencia (Figura 15A). Un patrón similar también se observa en la disminución de la expresión de *fliC,* mucho mayor en *Brucella melitensis* H18 (54.55 %) que en *Brucella melitensis* 16M (40 %) (Figura 15B). La expresión de estos genes es importante para establecer un proceso infeccioso exitoso por lo que están relacionados con la capacidad virulenta de la bacteria, y su expresión es limitada debido a que este patógeno evita la activación del sistema

inmune del huésped, mediante C12-HSL molécula importante en el desarrollo del QS y que influye negativamente en la virulencia de *Brucella*, de esta manera provoca una represión de genes disminuyendo la expresión de *vjbR* provocando una atenuación de la virulencia necesaria para evitar una respuesta inmune del huésped y así lograr un nicho replicativo seguro (Terwagne et al., 2013). Por lo que el efecto de DATS en la disminución de la expresión de estos genes en la fase logarítmica tardía podría estar relacionado con la modulación del sistema de comunicación QS.

El efecto de DATS en el patrón de expresión de *virB2* (Figura 15C) destaca, ya que en comparación con *vjbR* y *fliC,* la disminución de la expresión de *virB2* fue del 15% en *Brucella melitensis* H18, lo que sugiere que el fitoquímico puede modular negativamente la expresión de genes clave de factores de virulencia que se conoce que están relación con el QS.





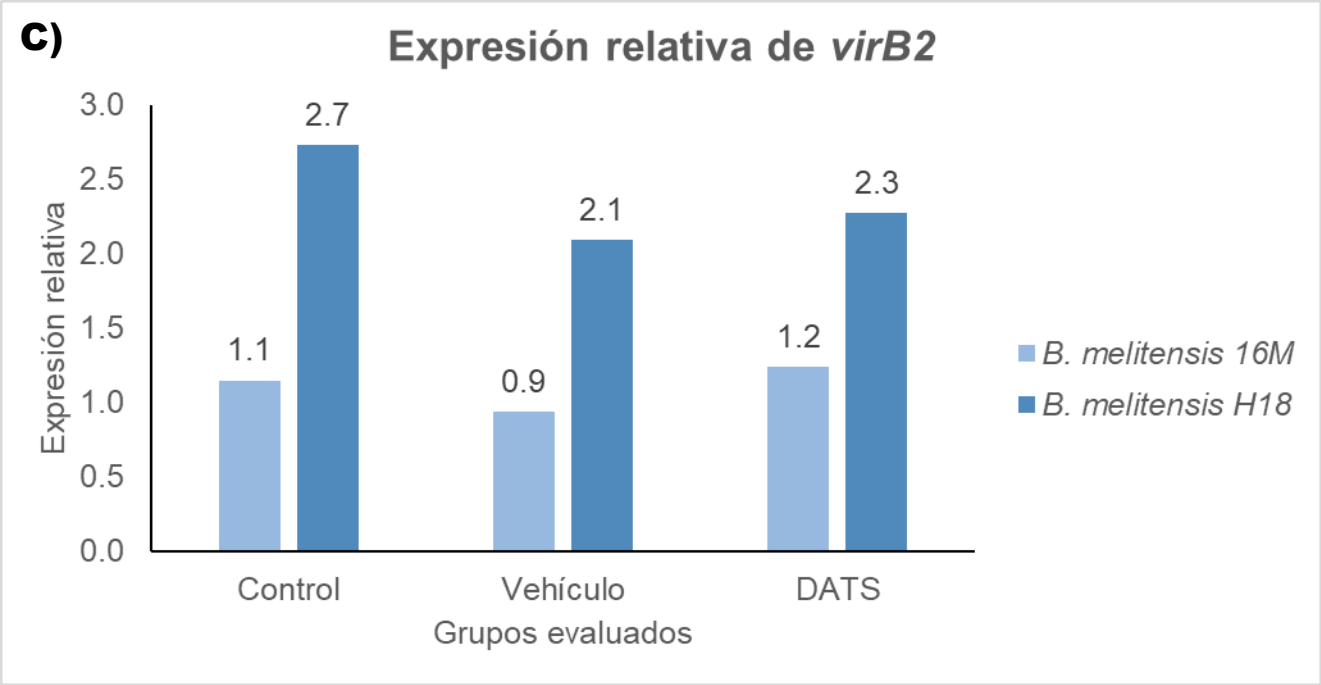


Figura 13. Efecto de DATS sobre la expresión relativa de *vjbR*, *virB2* y *fliC* de *Brucella melitensis* 16M y H18. Análisis de la expresión genética relativa de *vjbR*, *virB2* y *fliC,* del grupo control, grupo vehículo

y grupo tratado con DATS 10 µM de los corrimientos electroforéticos evaluados 13 h postratamiento mediante densitometría con el software DGIT3.

La disminución de la expresión de *vjbR* inducida por DATS puede estar relacionada con la disminución de la expresión de *virB2*, debido a que el regulador transcripcional VjbR promueve la expresión de *virB2*, así como de todo el sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Ke et al., 2015; Ahmed et al., 2016). Se espera que la disminución de la expresión de *vjbR* esté relacionada con la disminución de sus efectos como regulador transcripcional del operon *virB*, lo cual en este trabajo se reflejó en la disminución de *virB2*, como se aprecia en la cepa H18.

La expresión de factores de virulencia como el T4SS es importante porque durante el proceso infeccioso permite al patógeno liberar efectores a la célula hospedera, los cuales van a modular el tráfico vacuolar para establecerse en su nicho y lograr una replicación exitosa (Rambow et al., 2008; Li et al., 2017; Liu et al., 2020). Así, identificar el efecto de dialil trisulfuro como modulador negativo de estos importantes factores de virulencia (Figura 15), así como su efecto negativo al inhibir crecimiento microbiano, es interesante, debido a que al no presentar actividad antimicrobiana contra las cepas estudiadas, podría ser de interés al no inducir a largo plazo resistencia al agente químico DATS, sin embargo, es de gran interés su función como modulador negativo de la expresión de importantes factores de virulencia que también son modulados por el sistema QS.

Persson y colaboradores en el 2005 realizaron un estudio con diferentes compuestos organosulfurados y sus efectos en la inhibición competitiva de los reguladores transcripcionales del QS del complejo LasR en *Pseudomonas*. Se sabe que el uso de inhibidores de detección del QS para controlar la virulencia bacteriana podría tener un gran potencial y desarrollarse como un coadyuvante para la administración de antibióticos en bacterias multirestistentes con tratamientos crónicos o como una medida alternativa de tratamiento a antibióticos (Cady et al., 2012, Santhakumari et al., 2019).

Aunque no existen actualmente estudios de los efectos de DATS sobre los factores de virulencia en *Brucella melitensis*, diversos análisis de Li y colaboradores en el 2018 y en el 2019 evidenciaron que DADS inhibía los factores de virulencia de *Pseudomonas*

aeruginosa al inactivar la transcripción de genes clave en los tres sistemas de detección del QS, además de modular la motilidad bacteriana y la quimiotaxis. En el 2020 determinaron que DAS de igual manera suprimía la producción de algunos factores de virulencia (aunque en menor cantidad que DADS) atribuyendo estos resultados al grupo tioéter del compuesto, por lo que identifican que DADS al tener dos grupos tioéter tiene una actividad inhibidora del QS más fuerte que DAS que sólo tiene uno, además se ha informado que los sulfuros de alilo del ajo podrían tener una actividad importante en la quelación de metales libres unidos a proteínas, provocando también tiolación de proteínas (Filomeni et al., 2008).

El número de átomos de azufre explica la importancia de la actividad biológica de los compuestos organosulfurados del ajo y DATS al contener la mayor cantidad de éstos es el compuesto con mayor efectividad, además de que se ha reportado en múltiples estudios como agente anticancerígeno, quimiopreventivo, antioxidante y antiapoptótico (Filomeni et al., 2008; Puccinelli et al., 2017; Liu et al., 2015).

8. CONCLUSIONES

El fitoquímico DATS a las concentraciones 100 µM, 1 mM y 10 mM no inhibió el crecimiento microbiano de *B. melitensis* 16M y H18, en cambio se mostró que, durante la fase exponencial del cultivo vegetativo, el efecto de DATS disminuye la expresión de los genes relacionados con factores de virulencia y quorum sensing como son *vjbR*, *virB2* y *fliC*, principalmente en el aislamiento clínico *B. melitensis* H18. En este estudio, se identificó que el fitoquímico DATS no mostró efectos antimicrobianos, sin embargo, podría modular la capacidad virulenta del patógeno mediante la disminución de la expresión genética de importantes factores de virulencia. Por lo que será de gran interés que en estudios posteriores se evalúe el efecto de DATS sobre la expresión de diferentes factores de virulencia, mediante qRT-PCR, así como su potencial para limitar el proceso infeccioso en un modelo de estudio o líneas celulares.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, W., Zheng, K., & Liu, Z. F. (2016). Establishment of chronic infection: Brucella's stealth strategy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*, 30.
2. Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Moussa, S., Plovier, H., Sternon, J. F., Lázaro-Antón, L., Conde-Álvarez, R., De Bolle, X., Iriarte, M., Moriyón, I., & Letesson, J. J. (2018). Brucella central carbon metabolism: an update. *Critical reviews in microbiology*, *44*(2), 182–211.
3. Cady, N. C., McKean, K. A., Behnke, J., Kubec, R., Mosier, A. P., Kasper, S. H., Burz, D. S., & Musah, R. A. (2012). Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in Pseudomonas aeruginosa by natural products-inspired organosulfur compounds. *PloS one*, 7(6), e38492.
4. Chang, C., Beutler, B. D., Ulanja, M. B., Uche, C., & Zdrnja, M. (2021). Brucellosis Presenting with Febrile Pancytopenia: An Atypical Presentation of a Common Disease and Review of Brucellosis. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2021*.
5. Chen, J., Wang, B., Lu, Y., Guo, Y., Sun, J., Wei, B., Zhang, H., & Wang, H. (2019). Quorum Sensing Inhibitors from Marine Microorganisms and Their Synthetic Derivatives. *Marine drugs*, 17(2), 80.
6. El-Sayed, A. & Awad, W. (2018). Brucelosis: Evolución y reaparición esperada. *Revista internacional de ciencia y medicina veterinaria*, *6* (Suppl), S31 – S35.
7. Feng, S., Eucker, T. P., Holly, M. K., Konkel, M. E., Lu, X., & Wang, S. (2014). Investigating the responses of Cronobacter sakazakii to garlic-drived organosulfur compounds: a systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-raman spectroscopy. *Applied and environmental microbiology*, *80*(3), 959-971.
8. Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella–Host Interactions. *The American journal of pathology*, *185*(6), 1505-1517.
9. Flores, M. (2018). Patrones de expresión de factores de virulencia y quorum sensing y características fisiopatológicas en el modelo murino desarrolladas por cepas de referencia y de origen humano de *B. melitensis* [Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional BUAP https://hdl.handle.net/20.500.12371/8328
10. Filomeni, G., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2008). Molecular transduction mechanisms of the redox network underlying the antiproliferative effects of allyl compounds from garlic. *The Journal of nutrition*, 138(11), 2053–2057.
11. Fong, J., Zhang, C., Yang, R., Boo, Z. Z., Tan, S. K., Nielsen, T. E., Givskov, M., Liu, X. W., Bin, W., Su, H., & Yang, L. (2018). Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of P. aeruginosa. *Scientific reports*, *8*(1), 1155.
12. Franc, K. A., Krecek, R. C., Häsler, B. N., & Arenas-Gamboa, A. M. (2018). Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC public health*, *18*(1), 1-9.
13. Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish journal of microbiology*, *67*(2), 151–161.
14. Jakobsen, T. H., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Targeting quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms: current and emerging inhibitors. *Future microbiology*, *8*(7), 901–921.
15. Jin, T., Patel, S. J., & Van Lehn, R. C. (2021). Molecular simulations of lipid membrane partitioning and translocation by bacterial quorum sensing modulators. *Plos one*, *16*(2), e0246187.
16. Ke, Y., Wang, Y., Li, W., & Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of Brucella spp. and its effectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 72.
17. Kleinman, C. L., Sycz, G., Bonomi, H. R., Rodríguez, R. M., Zorreguieta, A., & Sieira, R. (2017).

ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the Brucella virulence gene expression network. *Nucleic acids research*, *45*(10), 5757–5769.

18. Lei, S., Zhong, Z., Ke, Y., Yang, M., Xu, X., Ren, H., An, C., Yuan, J., Yu, J., Xu, J., Qiu, Y., Shi, Y., Wang, Y., Peng, G., & Chen, Z. (2016). Deletion of the Small RNA Chaperone Protein Hfq down Regulates Genes Related to Virulence and Confers Protection against Wild-Type Brucella Challenge in Mice. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1570.
19. Li, P., Tian, M., Bao, Y., Hu, H., Liu, J., Yin, Y., Ding, C., Wang, S., & Yu, S. (2017). Brucella Rough Mutant Induce Macrophage Death via Activating IRE1α Pathway of Endoplasmic Reticulum Stress by Enhanced T4SS Secretion. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 422.
20. Li, W. R., Ma, Y. K., Shi, Q. S., Xie, X. B., Sun, T. L., Peng, H., & Huang, X. M. (2018). Diallyl disulfide from garlic oil inhibits Pseudomonas aeruginosa virulence factors by inactivating key quorum sensing genes. *Applied microbiology and biotechnology*, *102*(17), 7555–7564.
21. Li, W. R., Ma, Y. K., Xie, X. B., Shi, Q. S., Wen, X., Sun, T. L., & Peng, H. (2019). Diallyl Disulfide From Garlic Oil Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems and Corresponding Virulence Factors. *Frontiers in microbiology*, *9*, 3222.
22. Liu, D. (2015). Brucella. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1781-1788). Academic Press.
23. Liu, Y., Sun, J., Peng, X., Dong, H., Qin, Y., Shen, Q., Jiang, H., Xu, G., Feng, Y., Sun, S., Ding, J., & Chen, R. (2020). Deletion of the LuxR-type regulator VjbR in Brucella canis affects expression of type IV secretion system and bacterial virulence, and the mutant strain confers protection against Brucella canis challenge in mice. *Microbial pathogenesis*, 139, 103865.
24. Liu, Y., Zhu, P., Wang, Y., Wei, Z., Tao, L., Zhu, Z., ... & Lu, Y. (2015). Antimetastatic therapies of the polysulfide diallyl trisulfide against triple-negative breast cancer (TNBC) via suppressing MMP2/9 by blocking NF-κB and ERK/MAPK signaling pathways. *PloS one*, *10*(4), e0123781.
25. López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D., & Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of Brucella suis and the discrimination of Brucella suis and Brucella canis. *Veterinary microbiology*, *154*(1-2), 152–155.
26. Moreno, E., & Barquero-Calvo, E. (2020). The Role of Neutrophils in Brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *84*(4).
27. Münchberg, U., Anwar, A., Mecklenburg, S., & Jacob, C. (2007). Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. *Organic & biomolecular chemistry*, 5(10), 1505-1518.
28. Muras, A., Otero-Casal, P., Blanc, V., & Otero, A. (2020). Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in the oral cavity: a paradigm revisited. *Scientific report*s, 10(1), 9800.
29. Nakamoto, M., Kunimura, K., Suzuki, J. I., & Kodera, Y. (2020). Antimicrobial properties of hydrophobic compounds in garlic: Allicin, vinyldithiin, ajoene and diallyl polysulfides. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(2), 1550–1553.
30. Nicastro, H. L., Ross, S. A., & Milner, J. A. (2015). Garlic and onions: their cancer prevention properties. *Cancer prevention research*, *8*(3), 181-189.
31. Olsen, S. C., & Palmer, M. V. (2014). Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. *Veterinary pathology*, *51*(6), 1076-1089.
32. Oosthuizen, C., Arbach, M., Meyer, D., Hamilton, C., & Lall, N. (2017). Diallyl Polysulfides from Allium sativum as Immunomodulators, Hepatoprotectors, and Antimycobacterial Agents. *Journal of medicinal food*, 20(7), 685–690
33. Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skindersø, M. E., Givskov, M., & Nielsen, J. (2005). Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(2), 253–262.
34. Petrov, A., Wu, T., Puglisi, E. V., & Puglisi, J. D. (2013). RNA purification by preparative polyacrylamide gel electrophoresis. Methods in enzymology, 530, 315–330.

35. Poester, F. P., Samartino, L. E., & Santos, R. L. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev Sci Tech*, *32*(1), 105-15.
36. Puccinelli, M. T., & Stan, S. D. (2017). Dietary bioactive diallyl trisulfide in cancer prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*, *18*(8), 1645.
37. Puccinelli, M. T., & Stan, S. D. (2017). Dietary bioactive diallyl trisulfide in cancer prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1645.
38. Rambow, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E., and Splitter, G. (2008). Putative Quorum-Sensing Regulator BlxR of Brucella melitensis Regulates Virulence Factors Including the Type IV Secretion System and Flagella. *Journal of Bacteriology*, 190 (9), 3274–3282.
39. Reiter, J., Levina, N., van der Linden, M., Gruhlke, M., Martin, C., & Slusarenko, A. J. (2017). Diallylthiosulfinate (Allicin), a Volatile Antimicrobial from Garlic (Allium sativum), Kills Human Lung Pathogenic Bacteria, Including MDR Strains, as a Vapor. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(10), 1711.
40. Santhakumari, S., & Ravi, A. V. (2019). Targeting quorum sensing mechanism: an alternative anti-virulent strategy for the treatment of bacterial infections. *South African Journal of Botany*, *120*, 81-86.
41. Shakir R. (2021). Brucellosis. *Journal of the neurological sciences*, *420*, 117280.
42. Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K., Liu, Y. P., & Splitter, G. A. (2013). Brucella induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS pathogens*, *9*(12), e1003785.
43. Suárez-Esquivel, M., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., & Guzmán-Verri, C. (2020). *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *International journal of molecular sciences*, *21*(20), 7749.
44. Suárez-Esquivel, M., Chaves-Olarte, E., Moreno, E., & Guzmán-Verri, C. (2020). *Brucella* Genomics: Macro and Micro Evolution. *International journal of molecular sciences*, *21*(20), 7749.
45. Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M. L., Tibor, A., Lestrate, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P., & Letesson, J. J. (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. Infection and immunity, 70(6), 3004–3011.
46. Tang, Y., Li, F., Gu, D., Wang, W., Huang, J., & Jiao, X. (2021). Antimicrobial Effect and the Mechanism of Diallyl Trisulfide against *Campylobacter jejuni*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(3), 246
47. Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., & Letesson, J. J. (2013). Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PloS one*, 8(12), e82514.
48. Utari, P. D., Vogel, J., & Quax, W. J. (2017). Deciphering physiological functions of AHL quorum quenching acylases. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1123.
49. Uzun, L., Dal, T., Kalcıoğlu, M. T., Yürek, M., Açıkgöz, Z. C., & Durmaz, R. (2019). Antimicrobial Activity of Garlic Derivatives on Common Causative Microorganisms of the External Ear Canal and Chronic Middle Ear Infections. *Turkish archives of otorhinolaryngology*, 57(4), 161–165.
50. Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X., & Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen Brucella melitensis 16 M. *Journal of proteome research*, *9*(6), 3200–3217.
51. von Bargen, K., Gorvel, J. P., & Salcedo, S. P. (2012). Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle. *FEMS microbiology reviews*, *36*(3), 533-562.
52. Wang, H. C., Pao, J., Lin, S. Y., & Sheen, L. Y. (2012). Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1271*(1), 44.

53. Wang, X. H., & Jiang, H. (2020). Global prevalence of human brucellosis. *Zhonghua liu Xing Bing xue za zhi= Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*, *41*(10), 1717-1722.
54. Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Bacterial quorum sensing: the progress and promise of an emerging research area. *Nature*, *551*(7680), 313.
55. Wu, D., Huang, W., Duan, Q., Li, F., & Cheng, H. (2014). Sodium houttuyfonate affects production of N-acyl homoserine lactone and quorum sensing-regulated genes expression in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in microbiology*, *5*, 635.
56. Yang, X., Piao, D., Mao, L., Pang, B., Zhao, H., Tian, G., Jiang, H., & Kan, B. (2020). Whole-genome sequencing of rough Brucella melitensis in China provides insights into its genetic features. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2147–2156.
57. Zhang, Y., & Yang, L. (2020). Intracellular Brucella melitensis in the bone marrow. *British journal of haematology*, *189*(2), 209.