



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTA DE CIENCIAS QUIMICAS



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO

**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***

PRESENTA

p.Q.F.B. ELIU FLORES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

D.C. LAURA MORALES LARA

CODIRECTOR

D.C. ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDAN

ASESOR TÉCNICO

D. C. VICTORINO GILBERTO SERAFIN ALATRISTE BUENO

Puebla, Pue. Noviembre 2018

INDICE

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Antecedentes históricos	3
2.2 Especies del género <i>Brucella</i> spp. y hospederos	3
2.3 Características microbiológicas del género <i>Brucella</i> spp.	3
2.4 Características de la envoltura celular de <i>Brucella</i> spp.	3
2.5 Manifestaciones clínicas de la brucelosis	6
2.6 Patogenicidad de <i>Brucella</i> spp.	7
2.7 Factores de virulencia y su relación con el QS	8
2.8 Respuesta inmune del hospedero	9
2.9 Modelo de estudio para la brucelosis	10
3. Justificación	12
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos particulares	13
5. Diagrama de trabajo	14
6. Material y métodos	15
6.1 Material	15
6.2 Material biológico	15
6.3 Equipos	15
6.4 Métodos	16
7. Metodología	17
7.1 Conservación y mantenimiento de las cepas de <i>B. melitensis</i> en fase lisa	17
7.2 Caracterización microbiológica	17
7.3 Caracterización molecular de las cepas bacterianas	17
7.3.1 Extracción de DNA	17
7.3.2 Identificación por PCR Múltiple Brucella-ladder v2.0	18
7.4 Ensayo de infección	18
7.4.1 Obtención de inóculo	18
7.4.2 Infección del modelo murino	19
7.5 Estudios de expresión genética	20
7.5.1 Extracción de RNA	20
7.5.2 Tratamiento del RNA con DNasa	21
7.5.3 Retrotranscripción	22
7.5.4 PCR punto final	23
7.5.5 Electroforesis en gel de agarosa	24
7.6 Histología	25
7.6.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina	25
8. Resultados y discusión	27
8.1 Conservación y mantenimiento de las cepas de <i>B. melitensis</i> en fase lisa	27
8.2 Caracterización microbiológica	27

8.3 Identificación molecular de género y especie mediante PCR múltiple Brucella-ladder v2.0	29
8.4 Estudio histopatológico en el modelo murino.	30
8.4.1 Hallazgos clínicos en el modelo murino infectado	30
8.4.2 Análisis histológico	31
8.5 Expresión genética de interleucinas relacionadas con el proceso infeccioso en el modelo murino	37
8.6 Expresión genética de genes procariontes relacionados con el QS	45
9. Conclusión	46
10. Recomendaciones	47
112. Bibliografía	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de <i>Brucella</i> spp	5
Figura 2. Estructura del LPS en <i>Brucella</i> spp	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Brucella</i> spp. dentro del hospedero	7
Figura 4. Histopatología de hígado y bazo de ratón infectados con <i>Brucella</i> spp.	11
Figura 5. Demostración de colonias lisas y rugosas por el método de tinción con cristal violeta.	27
Figura 6. Cultivo de <i>Brucella melitensis</i> en agar BrucellaBUAP después de 48 horas de incubación a 37°C con tensión parcial de CO ₂ al 5%.	28
Figura 7. Tinción de Gram	28
Figura 8. Identificación de <i>Brucella melitensis</i> mediante pruebas bioquímicas	29
Figura 9. Identificación de las cepas por PCR Múltiple Brucella-ladder v2.0.	30
Figura 10. Ratones infectados con <i>Brucella melitensis</i> 22 días post infección.	30
Figura 11. Cambios en los indicadores inflamatorios 5 días post infección.	31
Figura 12. Corte longitudinal de hígado 5 días post infección.	32
Figura 13. Corte longitudinal de bazo 5 días post infección.	32
Figura 14. Cambios en los indicadores inflamatorios 10 días post infección.	33
Figura 15. Corte longitudinal de hígado 10 días post infección.	34
Figura 16. Corte longitudinal de hígado 10 días post infección.	34
Figura 17. Cambios en los indicadores inflamatorios 22 días post infección.	36
Figura 18. Corte longitudinal de hígado 22 días post infección.	36
Figura 19. Corte longitudinal de bazo 22 días post infección.	37
Figura 20. Expresión de Factor de Necrosis Tumoral alfa (<i>Tnfa</i>) en hígado.	39
Figura 21. Expresión de Factor de Necrosis Tumoral alfa (<i>Tnfa</i>) en bazo.	40
Figura 22. Expresión de Interferón gama (<i>Infg</i>) en hígado.	40
Figura 23. Expresión genética de Interferon gama (<i>Infg</i>) en bazo.	41
Figura 24. Expresión genética de interleucina 2 (<i>Il2</i>) en hígado.	41
Figura 25. Expresión genética de interleucina 2 (<i>Il2</i>) en bazo.	42
Figura 26. Expresión genética de interleucina 4 (<i>Il4</i>) en hígado.	42
Figura 27. Expresión genética de interleucina 4 (<i>Il4</i>) en bazo.	43
Figura 28. Expresión genética de interleucina 6 (<i>Il6</i>) en hígado.	43
Figura 29. Expresión genética de interleucina 6 (<i>Il6</i>) en bazo.	44
Figura 30. Expresión genética de interleucina 10 (<i>Il10</i>) en hígado.	44
Figura 31. Expresión genética de interleucina 10 (<i>Il10</i>) en bazo.	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los equipos	15
Tabla 2. Referencia de los métodos	16
Tabla 3. Mezcla de reacción empleada en la técnica de PCR Brucella-ladder v2.0	18
Tabla 4. Protocolo empleado en la reacción de PCR Brucella-ladder v2.0	18
Tabla 5. Días de evaluación del desarrollo del proceso infeccioso	20
Tabla 6. Mezcla de reacción utilizada en el tratamiento con DNAsa	21
Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada en la Retrotranscripción	22
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la evaluación de la expresión genética de genes eucariontes y procariontes por PCR punto final	23
Tabla 9. Mezcla de reacción empleada en la PCR punto final	24
Tabla 10. Protocolo empleado en la reacción de PCR punto final	24
Tabla 11. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina	26

RESUMEN

Las bacterias del género *Brucella* spp. son los agentes etiológicos de la brucelosis, una enfermedad que afecta a mamíferos marinos y terrestres, y potencialmente puede ser transmitida al humano, lo cual genera más de 500 000 casos reportados cada año a nivel mundial. La patogenia de la brucelosis depende de la extraordinaria capacidad de la bacteria para invadir y replicarse dentro del retículo endoplásmico de las células epiteliales y fagocíticas. Aunque todavía se desconocen detalles del ciclo biológico y de los mecanismos de supervivencia ante un medio ambiente adverso, gracias a estudios realizados en el modelo murino y con cepas de referencia *B. melitensis* 16M se sabe que estas bacterias desarrollan estrategias importantes durante el establecimiento y persistencia del proceso infeccioso, de esta manera, cuando las bacterias invaden a una célula hospedadora eucariota pueden controlar la expresión de genes lo que les permite desarrollarse durante la fase intracelular de su ciclo de vida. En este trabajo se demostró que al comparar los perfiles de expresión de interleucinas y las características fisiopatológicas desarrolladas en el modelo murino la cepa de referencia de *B. melitensis* 16M indujo cambios fisiopatológicos notables al inicio de la etapa temprana de la infección, mientras que, la cepa de origen humano *B. melitensis* H18 indujo estos cambios en bazo hacia el final de la fase aguda de la infección, esto se sugiere que esta cepa podría desarrollar una mayor capacidad para modular la expresión de citocinas pro-inflamatorias y reprimir la expresión de las citocinas anti inflamatorias en comparación con la cepa de referencia.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la brucelosis es una de las zoonosis reemergentes con amplia distribución mundial y aunque en los países desarrollados se ha logrado su control, los países en vías de desarrollo aún se ven afectados ya que esta enfermedad repercute en la producción pecuaria y es un problema de salud pública. Mientras que los animales mamíferos son el hospedero natural los humanos son considerados como un hospedero accidental, los cuales enferman al estar en contacto directo con sangre o tejido de animales infectados y al consumir productos lácteos no pasteurizados (Pappas *et al.*,2006).

La patogenia de la brucelosis depende de la extraordinaria capacidad de la bacteria para invadir y replicarse dentro del retículo endoplásmico de las células epiteliales y fagocíticas. Aunque las bacterias del género *Brucella* spp. carecen de los factores de virulencia clásicos, en la actualidad se sabe que utilizan sistemas de señalización complejos para alcanzar su nicho de replicación en el retículo endoplásmico de las células huésped, aunque este mecanismo no está del todo claro, se conoce que dichos sistemas incluyen al sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado por el operón *virB*, del cual se destaca su importante papel en la supervivencia y persistencia intracelular. Los resultados recientes de los análisis proteómicos y transcriptómicos muestran que el sistema de dos componentes BvrR / BvrS de *Brucella* spp. es un regulador global capaz de interactuar con otros reguladores, mediante el control de la síntesis de los componentes de la envoltura celular y la membrana externa (Uzureau *et al.*, 2007). La detección del *Quorum sensing* (QS) en *Brucella* spp. permite a las bacterias coordinar la expresión génica de acuerdo con la densidad poblacional. Recientemente, se ha demostrado que la virulencia de la bacteria depende de la detección de quórum *Brucella* spp. utiliza la producción y detección del autoinductor N-acil homoserina lactona el cual se une al regulador transcripcional VjbR que regula la expresión del operon *virB* y genes flagelares, además que se ha demostrado que expresión de la proteína AibP disminuye la actividad del autoinductor en *B. melitensis*, lo que provoca que se incremente la capacidad virulenta de la bacteria mediante la expresión del T4SS y del aparato flagelar, importantes blancos del QS. De este modo, se propone que AibP sea un componente

importante del mecanismo que apaga el QS. De esta manera, cuando las bacterias invaden a una célula hospedadora eucariota pueden detectar y por lo tanto, controlar la expresión de un conjunto de genes lo que les permite desarrollarse durante esta fase intracelular de su ciclo de vida (Terwagne *eta al.*, 2013)

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes históricos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la brucelosis es una de las zoonosis con una amplia distribución mundial y es causada por bacterias del género *Brucella* spp. las cuales presentan una dosis infectiva de 10 – 100 UFC que, combinada con su alta capacidad de aerosolización se encuentran clasificadas dentro del grupo de patógenos categoría B de acuerdo al Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) (Pappas et al., 2006). Esta enfermedad también es conocida como Fiebre ondulante, Fiebre de Malta y Fiebre del Mediterráneo y ha sido descrita desde la antigüedad, Hipócrates describe una enfermedad con características clínicas similares a la brucelosis en pacientes del litoral Mediterráneo. En 1886, David Bruce y Themistokles Zammit concluyeron que la leche de cabra contaminada con la bacteria, a la cual llamaron *Micrococcus melitensis*, era la fuente de infección para los soldados de la isla de Malta (Seleem et al., 2010; de Figueiredo et al., 2015). En 1896, Bang aisló a la bacteria que generaba aborto en vacas y la nombró *Bacillus abortus*. Posteriormente en 1914, Traum aisló una bacteria de un aborto de cerdo que posteriormente se nombró como *B. suis*. En 1918, Alice Evans estableció una conexión entre *Micrococcus melitensis* y *Bacillus abortus*. Meyers y Shaw en 1920, nombraron al género *Brucella* spp. en honor a David Bruce (Moreno, 2014).

2.2 Especies del género *Brucella* spp. y hospederos

Los miembros del género *Brucella* spp. infectan una amplia variedad de mamíferos incluyendo el humano, siendo éste un hospedero accidental. En la actualidad existen 11 especies descritas sobre la base de especificidad del hospedero natural que infectan, *B. abortus*, ganado; *B. melitensis*, ovejas y cabras; *B. suis*, cerdos; *B. ovis*, ovejas; *B. canis*, perros; *B. neotomae*, ratas del desierto; *B. pinnipedialis* y *B. ceti*, mamíferos acuáticos; *B. microti*, ratón de campo; *B. inopinata* aislamiento de un implante mamario en humano, *B. papionis* aislado de babuinos (Oslen y Palmer, 2014). No obstante, aunque el género *Brucella* spp. es altamente homólogo, con más del 90% de identidad se ha considerado que es posible que se trate de una sola especie, y

diversas biovariedades, por razones históricas se ha preferido conservar la clasificación en especies de acuerdo a su hospedero natural (Whatmore et al., 2009; Wattam et al., 2009).

2.3 Características microbiológicas del género *Brucella* spp.

El género *Brucella* spp. está conformado por bacterias intracelulares que pertenecen al grupo α -2 proteobacteria, son bacilos cortos Gram-negativos organizadas en parejas o pequeños grupos, miden de 0.5-0.7 x 0.6-1.5 μm , son inmóviles, anaerobios facultativos, no poseen cápsula ni forman esporas. (Alton *et al.*,1976). Tienen un metabolismo oxidativo basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa, oxidasa y ureasa positivas, en general no fermentan los azúcares y no producen ácido ni gas en agar TSI, no utilizan el citrato como única fuente de carbono y no producen indol. Debido a sus características estructurales *Brucella* spp. 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 considerado un organismo fastidioso por sus requerimientos en el cultivo puede crecer en medios nutritivos mínimos en donde las colonias pueden ser transparentes, elevadas, convexas, con un borde completo y una superficie lisa y brillante (Corbel and Banai., 2005).

2.4 Características de la envoltura celular de *Brucella* spp.

Brucella spp. posee una envoltura celular clásica (Figura 1), semejante a las de las bacterias Gram negativas, sin embargo, en la membrana externa se encuentran fosfolípidos ricos en fosfatidilcolina, diversas proteínas y un tipo de lipopolisacárido (LPS) no endotóxico no convencional. Las proteínas de membrana externa (Omps, por sus siglas en inglés) participan en el proceso infeccioso y al ser las más abundantes se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus masas moleculares, el grupo 1 conformado por proteínas de 88 a 94 kDa, en el grupo 2 se encuentran las proteínas de 36-38 kDa y en el grupo 3 se encuentran las proteínas de 25-27 y 31-34 kDa.

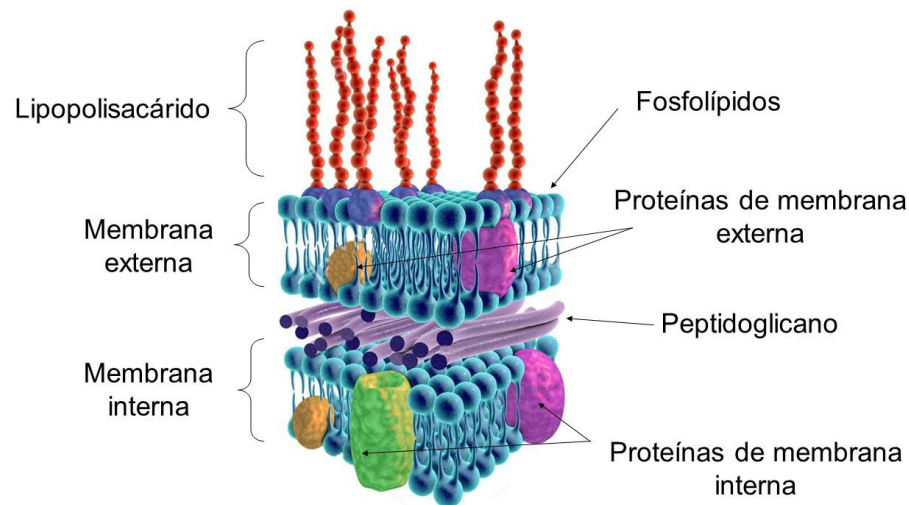


Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de *Brucella* spp. Adaptado del sitio web www.sciencephoto.com

El LPS está conformado por un lípido A, un núcleo oligosacárido y una cadena O (Figura 2). Este tipo de LPS ha sido ampliamente estudiado debido a que sirve para clasificar a las cepas en: Lisas (S-LPS) y Rugosas (R-LPS), siendo las cepas lisas las más virulentas ya que las Omfs que se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa están menos accesibles debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas. Las diferencias estructurales del LPS de *Brucella* spp. respecto a otras bacterias Gram-negativas como *Escheria coli*, le confieren resistencia a los ataques antimicrobianos y modulación de la respuesta inmune del huésped. Por lo tanto, el LPS es un importante factor de virulencia para la supervivencia y replicación (Lapaque *et al.*, 2005).

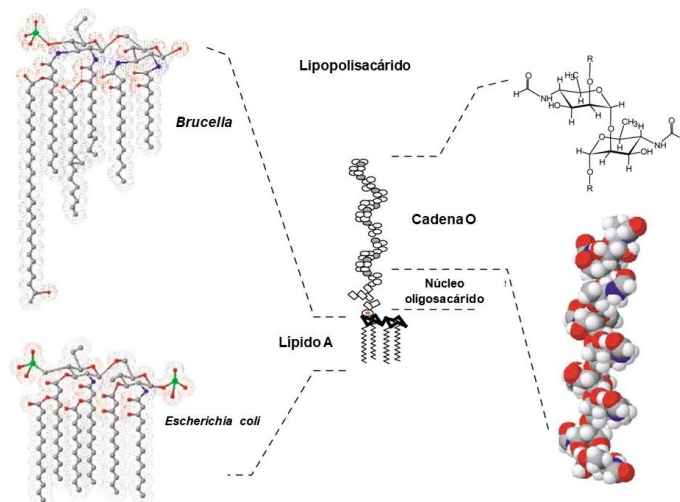


Figura 2. Estructura del LPS en *Brucella* spp. El lípido A posee un esqueleto de diaminoglucosa unido por enlaces amida a grupos acilo largos (C18-C19, C28). El núcleo oligosacárido está compuesto por ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico (Kdo), manosa y glucosamina. La cadena O (ausente en las cepas rugosas) está constituida por un homopolímero de *N*-formil-perosamina. Adaptado de Lapaque *et al.*, 2005.

2.5 Manifestaciones clínicas de la brucelosis

Las especies más patógenas para el humano son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, y las vías de entrada más frecuentes hacia su hospedero son la vía digestiva, tracto respiratorio o por lesiones en la piel (Atluri *et al.*, 2011). En México, los casos de brucelosis en humanos están asociados principalmente con el consumo de productos lácteos no pasteurizados, principalmente quesos frescos de origen caprino contaminados con *B. melitensis* biovar 1 (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016). A pesar de la diversidad de huéspedes, las manifestaciones clínicas y patológicas parecen conservarse dentro de cierto rango, siendo el tracto reproductivo el principal sitio de la infección. Mientras que en los animales la brucelosis provoca abortos, metritis e infertilidad, en los humanos se presenta con diferentes manifestaciones clínicas inespecíficas, incluyendo cuadros asintomáticos lo cual dificulta el diagnóstico, sin embargo, en la mayoría de los casos suele presentarse fiebre alta y ondulante, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, lo que conlleva a complicaciones osteoarticulares, orquitis, hepatitis, encefalomiелitis y endocarditis (Franco *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2014).

2.6 Patogenicidad de *Brucella* spp.

La patogenicidad de *Brucella* spp. está relacionada principalmente con la capacidad que tiene la bacteria para sobrevivir y replicarse dentro de las células del huésped mediante la expresión de los factores de virulencia que contribuyen al control del tráfico intracelular. Aunque no se conocen completamente los mecanismos por los cuales la bacteria logra infectar a sus hospederos, se sabe que *Brucella* spp. carece de los factores de virulencia clásicos, por lo que ha desarrollado una estrategia furtiva para lograr con éxito la infección, se cree que oculta, modifica o reduce la expresión de sus patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) para evitar su reconocimiento por el sistema inmune innato, y diseminarse a otros tejidos (trofoblastos placentarios, pulmón fetal, sistema reticuloendotelial y aparato reproductor) (de Figueiredo et al., 2015).

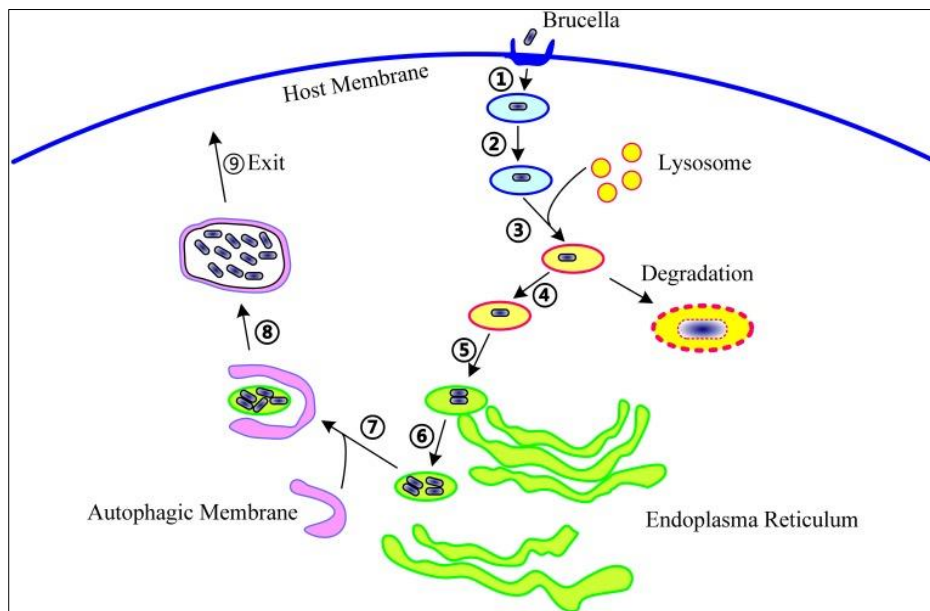


Figura 3. **Ciclo de vida de *Brucella* spp. dentro del huésped.** Durante la infección, *Brucella* spp. se aloja en una vacuola (BCV) a través de la cual regulará el tráfico intracelular hacia el retículo endoplásmico en donde establecerá su nicho replicativo, después de un tiempo la formación de una vacuola autofágica (aBCV) es indispensable para propagarse hacia otras células. Tomado de Ke et al., 2015.

Brucella spp. es capaz de interactuar con las células epiteliales de la mucosa mediante la unión a receptores de superficie (Castañeda-Roldan et al., 2004), lo cual genera una reorganización de la membrana y el citoesqueleto para posteriormente translocarse a través de la capa del epitelio mucoso, y posteriormente ser fagocitada por los macrófagos y células dendríticas residentes (Figura 2) (Rossetti et al., 2012; 2013). Una vez que la bacteria es fagocitada, se alojará en un compartimiento replicativo especial llamado BCV (Brucella-containing vacuole) en donde la bacteria sufre un proceso de adaptación ante la escasez de nutrientes y oxígeno (①②). Diversos estudios han revelado que *Brucella* spp. controla la conversión de la BCV de un estado endosómico (eBCV) a uno replicativo (rBCV) derivado del retículo endoplásmico, este mecanismo parece estar regulado por el T4SS, durante este proceso la BCV se acidificará y adquirirá marcadores endocíticos tempranos y tardíos, lo que sugiere que *Brucella* spp. regula la fusión con los lisosomas (③④⑤). Cuando la bacteria se ha replicado (⑥) se induce la formación de una vacuola autofágica (aBCV) que le permitirá a la bacteria salir de la célula huésped y propagarse hacia otras células (⑦⑧⑨) (Celli, 2015).

2.7 Factores de virulencia y su relación con el QS

El *Quorum sensing* (QS) en bacterias Gram-negativas es un sistema regulador que permite sincronizar la expresión genética en una población bacteriana. Las bacterias producen y liberan *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs) como moléculas de señalización difusibles llamados autoinductores, una vez que se alcanza el umbral de concentración, aún con una baja densidad celular y en entornos restringidos, los autoinductores se unen a sus reguladores transcripcionales de tipo LuxR y modulan la expresión de genes implicados en el metabolismo o la virulencia de las bacterias. Por lo tanto, las moléculas señal del QS permite a las bacterias detectar factores ambientales adversos, para así poder coordinar la expresión genética a nivel de toda la población de manera dependiente de la densidad celular (Rosselló y Bouza, 2013). El QS en *Brucella* spp. es un importante sistema regulador que controla los factores de virulencia cruciales como lo son el operon VirB, el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y genes flagelares (Terwagne et al., 2013). Sin embargo, aunque *Brucella* spp. produce una baja

concentración AHLs, se ha identificado a N-dodecanoil homoserina lactona (C12-HSL) como un importante autoinductor esencial para la virulencia, pero aún no se ha identificado a la AHL-sintasa que la produce.

Estudios *in vitro* demuestran que cuando se alcanza una determinada concentración de C12-HSL, éste se une al regulador transcripcional VjbR, el cual modula la expresión del operón VirB y genes flagelares como *fliF* y *fliC* (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2007; 2010; Brambila-Tapia y Pérez- Rueda, 2014). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de la proteína AibP disminuye la actividad de AHLs en *B. melitensis*, lo que provoca que se incremente la capacidad virulenta de la bacteria mediante la expresión del sistema de secreción tipo IV y el aparato flagelar, importantes blancos del QS. De este modo, se propone que AibP sea un componente importante del mecanismo que apaga el QS (Terwagne *et al.*, 2013).

Las bacterias que sobreviven al proceso de adaptación reanudan la expresión de genes relacionados con el metabolismo y los factores de virulencia. Estudios *in vitro* han demostrado que el sistema de secreción tipo IV (T4SS) codificado por el operón *virB*, es esencial para la supervivencia intracelular y la replicación dentro de las células fagocíticas (Yuehua *et al.*, 2015), sin embargo, estudios *in vivo* demuestran que el T4SS no es necesario para la invasión, la diseminación sistémica o el establecimiento de una infección inicial pero sí para la persistencia prolongada y que además la expresión de T4SS estimula una reacción inflamatoria, como un mecanismo para reclutar células que contribuyen a la persistencia (Roux *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009).

2.8 Respuesta inmune en el hospedero

Así como en otras enfermedades infecciosas, la respuesta inmune innata mediada por los órganos linfoides primarios y los macrófagos que residen en ellos son la primera línea de defensa contra la brucelosis. De manera normal, el hígado juega un papel importante de la respuesta inmune innata, ya que provee la primera línea de defensa contra microorganismos que cruzan la barrera intestinal, la participación de las células de Kupffer es crítica para un rápido aclaramiento de los microorganismos que se

encuentran en la circulación sistémica, el micro entorno inflamatorio recluta neutrófilos, monocitos y linfocitos ya que estos se encargarán de modular la respuesta inflamatoria en los hepatocitos (Delpino *et al.*, 2010) a través de la producción de citocinas y la presentación de antígeno, sin embargo, la respuesta inducida por *Brucella spp.* en la etapa temprana de la infección es menos severa en comparación con la inducida por otros patógenos como las enterobacterias.

Durante la etapa temprana de la infección *Brucella spp.* recurre a ciertas estrategias para evadir y modular la respuesta inmune del hospedero (Byndloss y Tsolis, 2016). En el modelo murino *Brucella spp.* induce una respuesta de tipo Th1 y citotóxica con la participación de linfocitos T CD4+ y CD8+, NK, linfocitos B y macrófagos, con la expresión de niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ y niveles altos de citocinas anti-inflamatorias como lo son IL-4 e IL-10 (Lei *et al.*, 2016). Todos estos mecanismos juntamente con la expresión de factores de virulencia bacterianos permiten la supervivencia de *Brucella spp.* en las células fagocíticas, lo que contribuye a la recurrencia de la enfermedad y a la cronicidad de la infección (Ahmed y Liu, 2016) dicha respuesta se ve reflejada en los tejidos blanco como pueden ser hígado y bazo (Oliveira *et al.*, 2008).

La respuesta inmune adaptativa contra *Brucella spp.* involucra la producción de anticuerpos, los cuales están dirigidos principalmente hacia el LPS. Los anticuerpos opsonizan a la bacteria permitiendo que los macrófagos las fagociten fácilmente, pero esto no es suficiente para evitar la enfermedad, sin embargo, la detección de estos anticuerpos es útil para el diagnóstico, pronóstico y curso de la infección.

2.9 Modelo de estudio para la brucelosis

Es común la infección de hospederos no naturales, y esto ha tomado gran importancia en el estudio de la brucelosis. Así pues, los aspectos más relevantes del proceso infeccioso se han elucidado gracias a los estudios *in vivo* que se han llevado a cabo con las cepas de referencia *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308 utilizando el modelo murino, con las cepas BALB/c, DBA2, C3H/He, C57BL/10 y C57BL/6, ampliamente usados para investigar factores de virulencia y evaluar la respuesta inmune del

hospedero, así como para indagar nuevas estrategias de vacunación y terapias antimicrobianas. También se han realizado estudios *in vitro* utilizando como modelo de estudio a la línea celular RAW 264.7 (Grilló et al., 2012).

Estos estudios han resultado de gran importancia, gracias a que la infección de ratones con cepas virulentas de *Brucella* spp. resulta en lesiones que imitan a las descritas en biopsias de la mayoría de los pacientes humanos con brucelosis crónica. Durante la infección con *Brucella* spp. en ratones, el bazo (Figura 4A) es el órgano más colonizado en el que se desarrollan infiltrados histiocíticos y microgranulomas. En el hígado (Figura 4B) también se presentan lesiones, y los ratones manifiestan hepatitis leve a moderada, que se caracteriza por el infiltrado neutrofílico en etapas tempranas de la infección, seguido por infiltrado histiocítico con células epitelioides, así como, microgranulomas en la fase crónica de la infección (Silva et al., 2011).

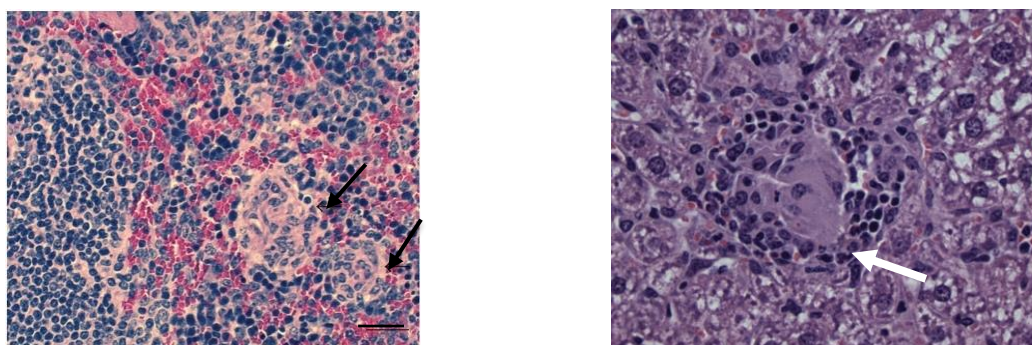


Figura 4. Histopatología de hígado y bazo de ratón infectados con *Brucella* spp. A. Bazo de ratón BALB/c infectado con *B. melitensis* 16 M. Microgranulomas en pulpa roja (flechas). Tinción hematoxilina y eosina (H&E). Barra de 100 μ m. B. Microgranuloma en hígado de ratón infectado con *Brucella* spp. Macrófagos epitelioides (flecha) rodeadas por linfocitos. Tinción hematoxilina y eosina (H&E) 400X. Tomado de Silva et al., 2011; Atluri et al., 2011.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del género *Brucella* spp. son los agentes etiológicos de la brucelosis, una enfermedad que afecta a mamíferos marinos y terrestres, y potencialmente puede ser transmitida al humano al estar en contacto con alimentos o animales infectados, lo cual genera más de 500 000 casos reportados cada año a nivel mundial. Aunque todavía se desconocen detalles del ciclo biológico y de los mecanismos de supervivencia ante un medio ambiente adverso, gracias a estudios realizados en cepas de referencia como *B. melitensis* 16M se sabe que estas bacterias desarrollan estrategias importantes durante el establecimiento y persistencia del proceso infeccioso lo que involucra la expresión de factores de virulencia como *vjbR*, sistema de secreción tipo IV, genes flagelares y modulación del sistema *quorum sensing*. En la mayoría de los estudios, las investigaciones realizadas para el entendimiento de los mecanismos fundamentales de las interacciones huésped-patógeno se realizan en cepas de referencia como modelos canónicos, sin embargo, recientemente se han identificado diferencias genómicas significativas entre cepas de referencia. Actualmente se plantea que pudieran influir en la obtención de diferentes resultados en las investigaciones realizadas, incluyendo aquellas en modelos murinos. Así, en el presente trabajo se propone evaluar y comparar los perfiles de expresión genética de factores de virulencia relacionados con el quorum sensing y las características fisiopatológicas del hospedero desarrolladas por una cepa de referencia y un aislamiento humano de *B. melitensis* en un modelo murino de infección para identificar posibles diferencias en su potencial virulento.

4. OBJETIVOS

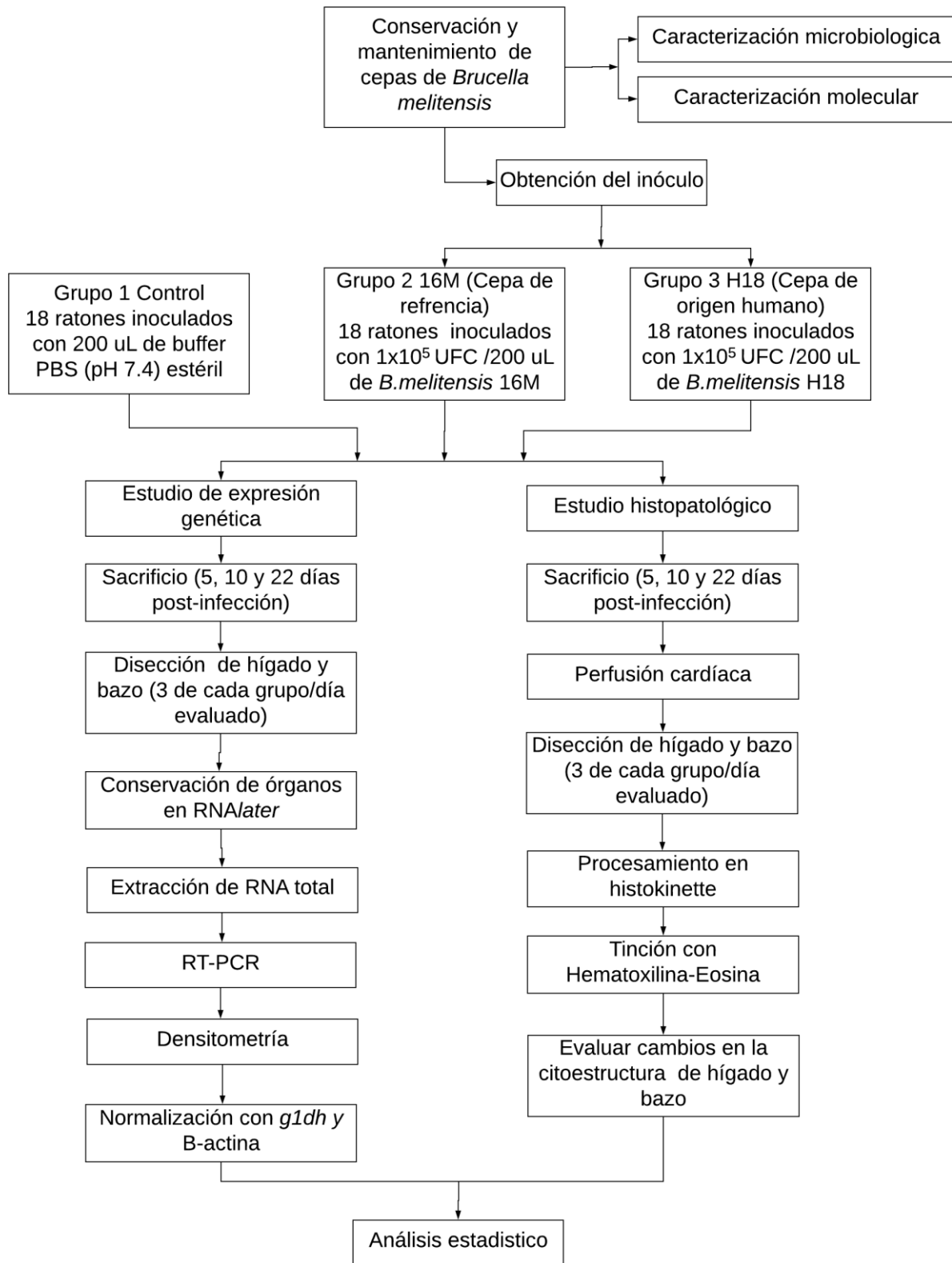
4.1 Objetivo General

Evaluar patrones de expresión genética de factores de virulencia relacionados con el quorum sensing y características fisiopatológicas desarrolladas por la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y un aislamiento humano durante el proceso infeccioso en el modelo murino.

4.2 Objetivos particulares

- Conservar y mantener las condiciones en fase lisa de las cepas en estudio.
- Inducir el proceso infeccioso en ratones hembra de la cepa BALB/c.
- Evaluar la expresión de los genes bacterianos *aibP*, *vjbR*, *virB2*, *fliC*, *fliF*, *ugpB* y los genes eucariontes *Ifn γ* , *Tnfa*, *Il2*, *Il4*, *Il6* e *Il10* a los 5, 10 y 22 días post-infección.
- Identificar características histopatológicas de la respuesta inflamatoria en hígado y bazo, mediante tinción Hematoxilina-Eosina.
- Comparar los patrones de expresión genética del patógeno y del hospedero, así como los perfiles histopatológicos en hígado y bazo identificados en la cepa de referencia y el aislamiento humano.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material

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

6.2 Material biológico

- Cepas bacterianas de *Brucella melitensis* 16M (cepa de referencia) y *Brucella melitensis* H18 (aislamiento humano) obtenidas del laboratorio de patogenicidad microbiana (CICM-ICUAP).
- Ratones hembra cepa BALB/c de 9 semanas de edad con un peso de 20 a 23 gramos, proporcionados por el bioterio "Claude Bernard" de la BUAP.

6.3 Equipos

Tabla 1. Características de los equipos

EQUIPO	MARCA	MODELO
Incubadora	BOEKEL SIENTIFIC	DRY BATCH INCUBATOR. BOEKEL.
Cámara de electroforesis	LABNET INTERNATIONAL, INC.	ENDURO
Gabinete de bioseguridad	NUAIRE. BIOLOGICAL SAFETY CAMBINETS	CLASS II TYPE A/B
Centrifuga	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
Vórtex	SCIENTIFIC INDUSTRIES.	VORTEX –T. GENIE 2
Transiluminador	FOTODYNE	FOTO/UV 21
Histokinette	LEICA	TREN 510
micrótomo	LEICA	TRASLACIONAL 357
microscopio	LEICA	DM-1000

6.4 Métodos

Tabla 2. Referencia de los métodos

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Detección de cepas bacterianas en fase lisa	Tinción con Cristal violeta	Alton <i>et al.</i> , 1976
Caracterización microbiológica	Morfología colonial, tinción de Gram, pruebas bioquímicas	Alton <i>et al.</i> , 1976
Identificación molecular de las cepas bacterianas	PCR múltiple Brucella-ladder v2.0	López-Goñi <i>et al.</i> , 2011
Ensayo de infección	Inoculación intraperitoneal	Grillo <i>et al.</i> , 2012
Obtención de mRNA	Extracción con TRI Reagent	Lei <i>et al.</i> , 2016
Obtención de cDNA	Retrotranscripción	Lei <i>et al.</i> , 2016
Detección de los genes procariontes y eucariontes	PCR punto final	Terwagne <i>et al.</i> , 2013; Lei <i>et al.</i> , 2016; Smith <i>et al.</i> , 2013., Xavier <i>et al.</i> , 2013
Histología	Tinción con Hematoxilina-Eosina	Prophet <i>et al.</i> , 1995

7. METODOLOGÍA

7.1 Conservación y mantenimiento de las cepas de *B. melitensis* en fase lisa

Las bacterias aisladas a partir del proceso de reactivación en el modelo murino se cultivaron en agar BrucellaBUAP por estría cruzada y se incubaron a 37°C/48 h con atmosfera de CO₂ al 5%, seguido a esto, se agregó 1 mL de colorante Cristal violeta directamente sobre el cultivo en la placa y se dejó reposar durante 20 segundos a temperatura ambiente, las colonias lisas no retienen el colorante mientras que las cepas rugosas se tiñen de color violeta. Finalmente, las cepas se conservaron en caldo BrucellaBUAP con glicerol al 30% y se almacenaron a -70°C hasta su identificación microbiológica y molecular.

7.2 Caracterización microbiológica

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se descongelaron de -70°C para sembrarlas en agar BrucellaBUAP por estría cruzada incubándolas a 37°C/48 h con atmosfera de CO₂ al 5%, posteriormente se observó que hubiera crecimiento característico en las placas de agar. A continuación, a partir de una colonia aislada se realizó tinción de Gram y se realizaron pruebas bioquímicas en los siguientes medios: TSI, LIA, MIO, citrato de Simmons y urea de Christensen.

7.3 Caracterización molecular de las cepas bacterianas

7.3.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó por la técnica de choque térmico, realizando una suspensión bacteriana (OD₆₀₀ =1.0) en un tubo para microcentrífuga con 200 µL de agua destilada estéril, en seguida se sometió a ebullición en un baño seco durante 10 min. Posteriormente se tomó el líquido sobrenadante el cual se centrifugó a 8 000 rpm/15 min y separando el sobrenadante nuevamente, un microlitro de éste fue utilizado para para realizar PCR múltiple.

7.3.2 Identificación por PCR Múltiple Brucella-ladder v2.0

La técnica de PCR se realizó empleando una mezcla de reacción indicada en la tabla 3. Los oligonucleótidos que se emplearon son los referidos por Lopez-Goñi *et al.*, 2011. El protocolo de reacción de PCR se muestra en la tabla 4. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

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)	0.5 X	12.5
Mezcla de oligonucleótidos	0.5 µM	6
DNA	1 µg	-
Agua libre de nucleasas (c.b.p. 25 µL)		-

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

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

7.4 Ensayo de infección

7.4.1 Obtención de inóculo

Las cepas de *B. melitensis* 16M y H18 se cultivaron en agar BrucellaBUAP a 37°C/48 h con atmósfera de CO₂ al 5%, posteriormente a partir del cultivo en placa se tomó un inóculo para realizar un cultivo *overnight* (O.N.) en caldo BrucellaBUAP a 37°C/150 rpm/13h, para obtener una suspensión bacteriana de 1x10⁵ UFC en 200 µL de PBS (pH 7.4) estéril.

7.4.2 Infección del modelo murino

Se utilizaron 54 animales hembra de la cepa BALB/c proporcionados por el bioterio Claude Bernard de la BUAP, los procedimientos de manejo y disección de los animales estuvieron sujetos a protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (MOLL-UALVIEP-18/1).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos como se muestra en la tabla 5, dos de ellos fueron inoculados por vía intraperitoneal (IP) con las cepas bacterianas y uno se utilizó como grupo control inoculado de la misma manera, pero únicamente con PBS estéril pH 7.4. Cada grupo estuvo conformado por 18 animales cuya expresión proteica (análisis mediante RT-PCR) fue evaluada a los 5, 10 y 22 días post infección. En cada tiempo de evaluación 6 animales fueron sacrificados por dislocación cervical, para la obtención de bazo e hígado, 3 ratones fueron destinados a estudios de expresión genética (mediante RT-PCR) y 3 ratones a estudios histopatológicos, para llevar a cabo los análisis por triplicado. Los ratones se mantuvieron en jaulas microaisladoras, en condiciones de agua y alimento *ad libitum* a una temperatura de 24°C, con 50% de humedad y ciclos de luz-oscuridad 12-12 horas, éstas condiciones fueron provistas por el bioterio Claude Bernard, el cuidado y mantenimiento de dichos animales estuvo a cargo solo por personal capacitado.

Tabla 5. Días de evaluación del desarrollo del proceso infeccioso

TIEMPO	RATONES INOCULADOS CON <i>B. melitensis</i> 16M	RATONES INOCULADOS CON <i>B. melitensis</i> H18	RATONES CONTROL
5 días	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)
	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)
10 días	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)
	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)
22 días	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)	3 ratones (RT-PCR)
	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)	3 ratones (Histología)
Número total de ratones por	18	18	18
Número total de ratones		54	

7.5 Estudios de expresión genética

7.5.1 Extracción de RNA

El hígado y bazo fueron diseccionados bajo condiciones asépticas y de bioseguridad, dichos órganos fueron pesados y medidos para posteriormente ser preservados en RNAlater® (SIGMA-ALDRICH®) siguiendo las indicaciones del fabricante, posteriormente las muestras almacenadas fueron procesadas para la obtención de RNA total (Lei *et al.*, 2016) siguiendo el protocolo descrito a continuación, cabe destacar que todos los reactivos utilizados en la extracción se mantuvieron en baño de hielo durante su uso.

Cada órgano fue macerado en un mortero estéril empleando nitrógeno líquido, 100 mg de tejido macerado fueron depositados en un tubo para microcentrífuga, posteriormente se agregó 1 mL de TRI Reagent® (SIGMA-ALDRICH®), se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), posteriormente se centrifugo a 12 000 xg por 10 minutos a 4°C, seguidamente se agregó 200 µL de cloroformo grado biología molecular (GBM) se mezcló vigorosamente durante 15 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, las muestras fueron centrifugadas a 12,000xg por 15

minutos a 4°C, posteriormente se tomaron 200 µL de la fase acuosa a la cual se le agregaron 500 µL de 2-propanol GBM dejando incubar a T.A por 5 minutos, a continuación se centrifugaron a 12,000xg por 10 minutos a 4°C, al pellet resultante se le realizaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 75% GBM y centrifugación 7,500 xg por 5 minutos a 4°C. El RNA total fue resuspendido en 100 µL de agua libre de nucleasas.

La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X y la concentración del RNA total obtenido se determinó 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 a la relación: A₂₆₀/A₂₈₀ ≥ 1.7

$$[\text{RNA}] = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * \text{Abs}_{260} * \text{Factor de dilución}$$

7.5.2 Tratamiento del RNA con DNAsa

El RNA total fue tratado con DNAsa (DNase I, RNase-free, Thermo Scientific) para eliminar el gDNA remanente, la mezcla de reacción se muestra en la tabla 6. El tratamiento con DNAsa se llevó a cabo sometiendo la reacción a 37°C durante 30 minutos, posteriormente la reacción se detuvo inactivando a la enzima Dnasa I agregando 1 µL de EDTA 50 mM e incubando 65°C por 10 minutos.

Tabla 6. Mezcla de reacción utilizada en el tratamiento con DNAsa

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
Buffer de reacción con MgCl ₂	1X	1
DNase I, RNase-free	0.1 U	1
RNA	1 µg	1
Agua libre de nucleasas (c.b.p. 10 µL)		-
EDTA	5 mM	1

7.5.3 Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se realizó mediante el uso de un sistema de transcripción inversa (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se muestra en la tabla 7. La reacción fue sometida a preincubación a 25°C durante 5 minutos seguido de incubación a 42°C durante 60 minutos, finalmente se detuvo la reacción calentando a 70°C durante 5 minutos.

Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada en la Retrotranscripción

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
RNA libre de gDNA	1 µg	10
Random Hexamer Primer	5 µM	1
Buffer de reacción 5X	1X	4
Inhibidor de RNAasa RiboLock	1 U	1
Mix dNTP	0.5 mM	2
RevertAid M-MuLV RT	10 U	1
Agua libre de nucleasas		1
Volumen final		20

De igual manera se utilizó un control negativo de transcripción inversa (RT-) que contiene todos los reactivos para la reacción de transcripción inversa, excepto la enzima RT, para detectar si las muestras de RNA pudieran estar contaminadas con gDNA. También se utilizó un control negativo, el cual contiene todos los componentes de la reacción de transcripción inversa, excepto la plantilla de RNA, esto fue indispensable para corroborar si algún reactivo pudiera estar contaminado. Como control positivo se utilizó 100 ng de RNA de GAPDH humano (1.3 kb, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific). Dichos controles fueron sometidos a PCR punto final siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.5.4 PCR punto final

El cDNA obtenido de cada una de las muestras fue utilizado para amplificar los genes eucariontes y procarionte de interés (Tabla 8), la mezcla de reacción para PCR se indica en la tabla 9 y el protocolo de reacción de PCR se muestra en la tabla 10.

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

Gen diana	Accession number	Secuencia del oligonucleótido 5' - 3'	Tm °C	Tamaño del amplicón pb	Referencia
<i>Il2</i>	NM_008366.3	F CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA	66	141	Lei <i>et al.</i> , 2016
		R TCCAGAACATGCCGCAGAG			
<i>Il4</i>	NM_021283.2	F ACAGGAGAAGGGACGCCAT	58	95	Lei <i>et al.</i> , 2016
		R GAAGCCCTACAGACGAGCTCA			
<i>Il6</i>	NM_001314054.1	F ACGATGATGCACTTGCAGA	54	134	Smith <i>et al.</i> , 2013
		R GTAGCTATGGTACTCCAGAAGAC			
<i>Il10</i>	NM_010548.2	F GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	63	191	Lei <i>et al.</i> , 2016
		R ACCTGCTCCACTGCCTTGCT			
<i>Ifng</i>	NM_008337.4	F TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	63	92	Lei <i>et al.</i> , 2016
		R TGGCTCTGCAGGATTTTCATG3			
<i>Tnfa</i>	NM_013693.3	F CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	56	175	Xavier <i>et al.</i> , 2013
		R TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC			
β -actina	NM_007393.5	F AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	64	138	Lei <i>et al.</i> , 2016
		R CAATAGTGATGACCTGGCCGT			
<i>ugpB</i>	BMEI10625	F CCTTGTAACCGGAACGATCT	58	81	Uzureau <i>et al.</i> , 2010
		R CCAACAACGAAATGGTCAATG			
<i>vjbR</i>	BMEI1116	F CGGGTCAATGGCAAAGTAGT	57	139	Uzureau <i>et al.</i> , 2010
		R CCGCTACGTAACGCATACCT			
<i>virB2</i>	BMEI10026	F GCAAAAAGTGCTGGACTTGCTA	62	80	Terwagne <i>et al.</i> , 2013
		R CCATCTTGTAACCGACCAGAT			
<i>fliC</i>	BMEI10150	F CTTGCTACAATCGTTCCGGT	60	81	Terwagne <i>et al.</i> , 2013
		R CCATGGTCTTCGCATCAGT			
<i>fliF</i>	BMEI10151	F CCTACGAGACGCTCTATGTGCG	66	82	Terwagne <i>et al.</i> , 2013
		R AAGGGAATGCCAGCTTCAC			
<i>aibP</i>	BAB2_1048	F AATTCATAGGCCTGATGC	54	81	Terwagne <i>et al.</i> , 2013
		R AACAAATGGGCGGTGGA			
<i>gl dh</i>	BMEI0861	F ACTTGCCGACATGGCTATG	54	82	Uzureau <i>et al.</i> , 2010
		R AAATACGCCATCGACCAGAT			

Tabla 9. Mezcla de reacción empleada en la PCR punto final

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN (µL)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	0.5 X	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

Para la reacción de PCR punto final se eligieron las temperaturas de alineamiento (T_m) óptimas para cada gen, como se indica en la tabla 8, en base a esto el perfil térmico para la amplificación de genes eucariontes y procariontes se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Protocolo empleado en la reacción de PCR punto final

GENES EUKARIOTES				GENES PROCARIONTES			
CICLOS	FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS	FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1	Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos
40	Desnaturalización	95°C	1 minuto	30	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Alineación	Ver tabla 8	1 minuto		Alineación	Ver tabla 8	1 minuto
	Extensión	72°C	1 minuto		Extensión	72°C	1 minuto
1	Extensión final	72°C	10 minutos	1	Extensión final	72°C	10 minutos

7.5.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % en buffer TAE 1X, el corrimiento electroforético se realizó a 90 V durante 60 minutos. El gel de agarosa fue teñido con Bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para visualizar los productos de PCR en un transiluminador de UV y finalmente fotodocumentarlos. La longitud de los amplicones fue corroborada con ayuda del marcador de 100bp DNA Ladder, PROMEGA.

Los resultados de cada mRNA amplificado tanto procarionte y eucarionte se normalizaron con mRNA de *g1dh* y *β-actina* respectivamente. Posteriormente, los resultados se analizaron por densitometría con ayuda del software DGIT3 para ser evaluados mediante un análisis estadístico t de Student.

7.6 Histología

Una vez que los animales fueron sacrificados en los días especificados (Tabla 3), se realizó perfusión intracardiaca para después proceder con la disección del hígado y bazo. Dichos órganos fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS, seguidamente fueron sometidos a un proceso de deshidratación (Alcohol 80%, Alcohol 96%, Alcohol 100%, Xilol y Parafina) en un Histokinette, finalmente fueron incluidos en bloques de parafina para realizar cortes longitudinales de 3 μm de espesor en hígado y bazo, dichos cortes se realizaron rebajando cada 100 μm para muestrear la zona superior, media e inferior de los respectivos órganos, así como utilizar el diámetro de la vena centro lobulillar y el número de sinusoides hepáticos como indicadores cuantitativos del proceso inflamatorio.

7.6.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Los cortes fueron colocados en laminillas y posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina (Tabla 11) a continuación se observaron en un microscopio de luz de campo claro a 10X y se tomaron fotografías con una cámara acoplada. Las fotografías se analizaron en el programa ImageJ de NIH, para finalmente realizar el análisis histológico y detectar cambios en la citoestructura que sean indicativos del proceso inflamatorio en cada órgano. En el hígado se midió el diámetro de la vena centro lobulillar y se contó el número de sinusoides hepáticos, mientras que en el bazo se determinaron cambios en la citoestructura de la pulpa blanca y roja. Los resultados obtenidos serán evaluados mediante un análisis estadístico t de Student.

Tabla 11. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina

Paso	Reactivo	Tiempo	Paso	Reactivo	Tiempo
1	Xilol	10 minutos	12	Carbonato de litio	10 lavados
2	Xilol	3 minutos	13	Agua destilada	5 lavados
3	Alcohol- Xilol	1 minuto	14	Eosina	3 minutos
4	Alcohol absoluto	1 minuto	15	Agua destilada	5 lavados
5	Alcohol absoluto	1 minuto	16	Alcohol 96%	1 minuto
6	Alcohol 96%	1 minuto	17	Alcohol 96%	1 minuto
7	Alcohol 96%	1 minuto	18	Alcohol absoluto	1 minuto
8	Agua destilada	5 lavados	19	Alcohol absoluto	1 minuto
9	Hematoxilina férrica	4 minutos	20	Alcohol- Xilol	1 minuto
10	Agua corriente	5 lavados	21	Xilol	1 minuto
11	Alcohol acido	5 lavados	22	Xilol	1 minuto

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Conservación y mantenimiento de las cepas de *B. melitensis* en fase lisa

Con la prueba de tinción con Cristal violeta (Figura 5), se observó que las colonias de *Brucella melitensis* al estar en fase lisa no retuvieron el colorante, dando un resultado negativo a la prueba de tinción.

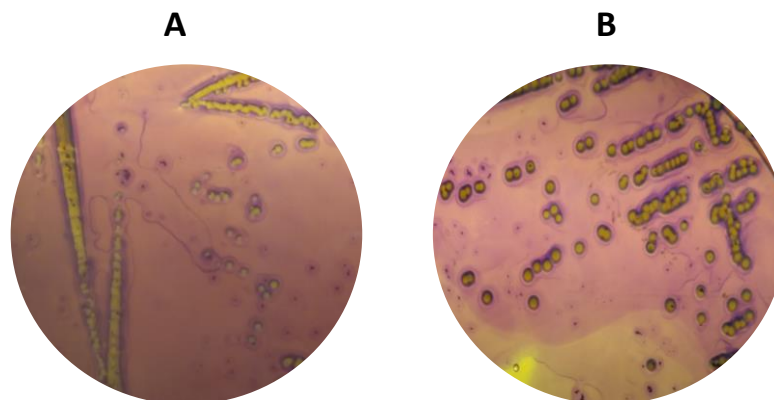


Figura 5. Demostración de colonias lisas por el método de tinción con Cristal violeta. A. *Brucella melitensis* H18 y B. *Brucella melitensis* 16M.

8.2 Caracterización microbiológica

La identidad de las cepas previamente almacenadas fue confirmada para evaluar su pureza, así como su género y especie. La identificación de las 2 cepas empleadas en este estudio se determinó inicialmente mediante la morfología colonial (Figura 6), *Brucella* spp. se caracteriza por presentar colonias color amarillento, circulares, convexas, translúcidas y con bordes regulares en agar BrucellaBUAP. Se puede observar que las cepas presentan diferencias morfológicas en cuanto al tamaño, las colonias aisladas de *B. melitensis* H18 (Figura 6A) son más pequeñas que las de *B. melitensis* 16M (Figura 6B), sin embargo, no se observaron diferencias morfológicas en la tinción de Gram (Figura 7).

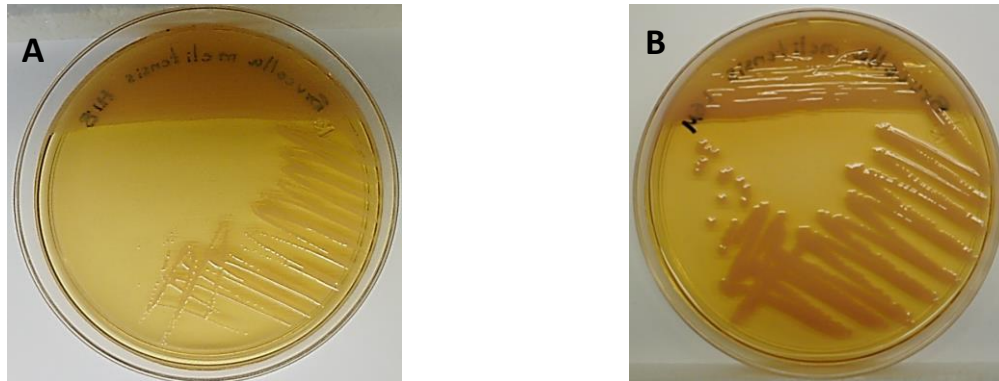


Figura 6. Cultivo de *Brucella melitensis* en agar BrucellaBUAP después de 48 horas de incubación a 37°C con tensión parcial de CO₂ al 5%. A. Morfología colonial de *Brucella melitensis* H18. B. Morfología colonial de *Brucella melitensis* 16M.

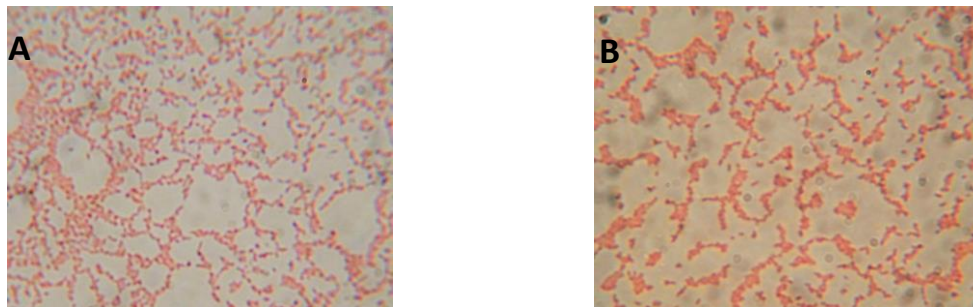


Figura 7. Tinción de Gram. A. *Brucella melitensis* H18. B. *Brucella melitensis* 16M. Se muestran bacilos cortos Gram-negativos característicos del género *Brucella* spp.

A partir de una colonia aislada en medio BrucellaBUAP, se realizaron las pruebas bioquímicas inoculando los siguientes medios TSI, LIA, MIO, Citrato de Simons y UREA (Figura 8), estos resultados mostraron que las bacterias del género *Brucella* no fermentan azúcares como glucosa, lactosa o sacarosa ni tampoco producen ácido sulfhídrico o gas en agar TSI, no descarboxilan lisina en agar LIA, son inmóviles pues aún cuando tienen genes que codifican para flagelo, no lo expresan constitutivamente, la prueba de indol es negativa y no descarboxilan ornitina en agar MIO y no pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono, sin embargo, pueden hidrolizar la urea al contar con la enzima Ureasa (Alton *et al.*, 1976).

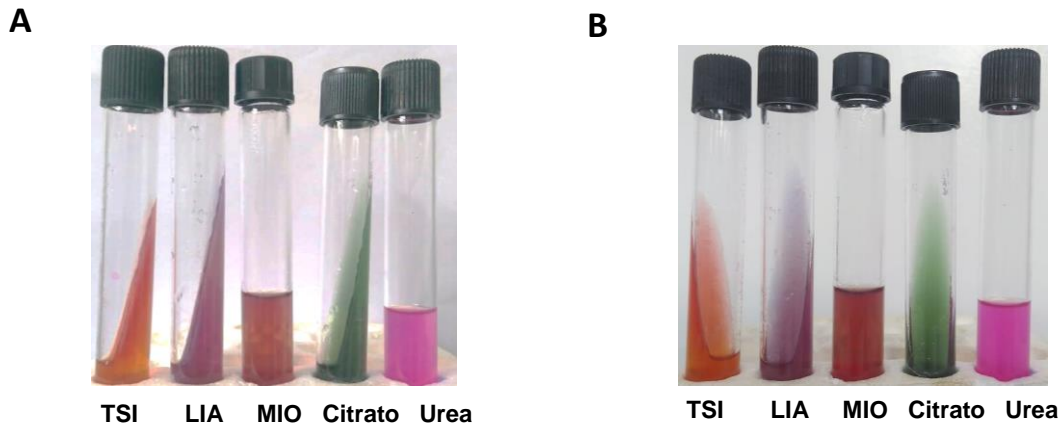


Figura 8. Identificación de *Brucella melitensis* mediante pruebas bioquímicas. Agar TSI (Agar Hierro Triple Azúcar), Agar LIA (Agar Hierro Lisina), Agar MIO (Movilidad Indol Ornitina) Agar Citrato (Citrato de Simons) Agar urea (Urea). **A.** Pruebas bioquímicas para *B. melitensis* H18. **B.** Pruebas bioquímicas para *B. melitensis* 16M.

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

Las cepas estudiadas fueron identificadas mediante un ensayo de PCR múltiple *B. melitensis* presenta un patrón típico caracterizado por la amplificación de 6 fragmentos de 1,682 pb, 1,071 pb, 794 pb, 587 pb, 450 pb y 152 pb, los cuales fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.7% en buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 9 (Lopez-Goñi *et al.*, 2011).

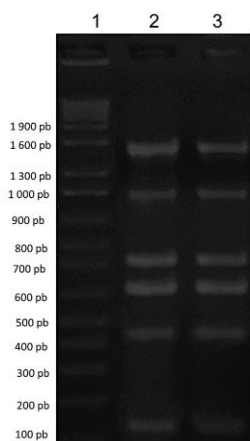


Figura 9. Identificación de las cepas por PCR Múltiple Brucella-ladder v2.0. Carril 1. Marcador de peso GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific. Carril 2. *Brucella melitensis* 16M. Carril 3. *Brucella melitensis* H18.

8.4 Estudio histopatológico en el modelo murino

8.4.1 Hallazgos clínicos en el modelo murino infectado

Los ratones se mantuvieron en jaulas micro aisladoras y fueron monitoreados durante todo el proceso infeccioso, registrándose piloerección y aletargamiento hacia después del mediodía (Figura 10) durante los 22 días post infección, similar a los episodios febriles en la brucelosis humana. Los hallazgos macroscópicos observados durante la disección se caracterizaron por ligeras lesiones hepáticas, esplenomegalia y ganglios linfáticos inflamados, siendo más evidentes en ratones infectados con *B. melitensis* H18 respecto a los infectados con *B. melitensis* 16M.



Figura 10. Ratones infectados con *Brucella melitensis* 22 días post infección. A. Ratones infectados con *B. melitensis* 16M. B. Ratones infectados *B. melitensis* H18.

8.4.2 Análisis histológico

Los cambios en los indicadores del proceso inflamatorio evaluados en el análisis histológico son un reflejo de la ruta de diseminación de la bacteria a través del hígado y sugieren que *B. melitensis* 16M podría inducir estos cambios de manera temprana respecto a *B. melitensis* H18, como se muestra a continuación. A los 5 días post infección (Figura 11) se observa mayor vasoconstricción y aumento en la vascularización del lobulillo hepático en la zona superior y media del hígado en tejidos infectados con *B. melitensis* 16M respecto a los infectados con *B. melitensis* H18 ($p < 0.05$). Por otra parte, en la zona inferior se observa vasodilatación en los tejidos infectados con *B. melitensis* 16M respecto a los infectados con *B. melitensis* H18 ($p < 0.05$). Los cambios morfológicos en hígado y bazo se caracterizaron por infiltrado celular (Figura 12) y citoestructura difusa en la pulpa blanca y roja (Figura 13), respectivamente.

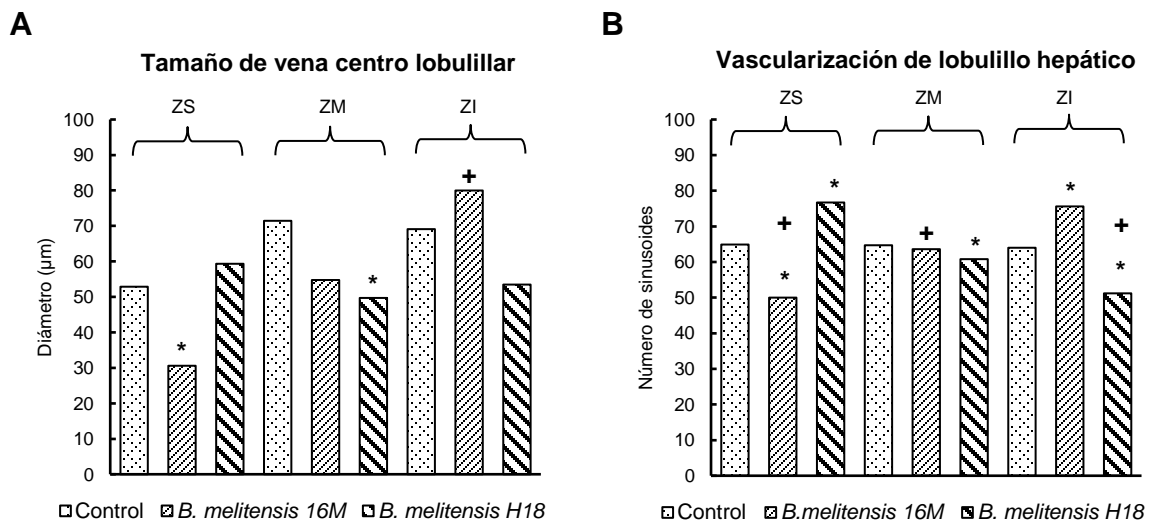


Figura 11. Cambios en los indicadores inflamatorios 5 días post infección. A. Tamaño de vena centro lobulillar. B. Vascularización del lobulillo hepático. ZS: zona superior, ZM: zona media, ZI: zona inferior. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+).

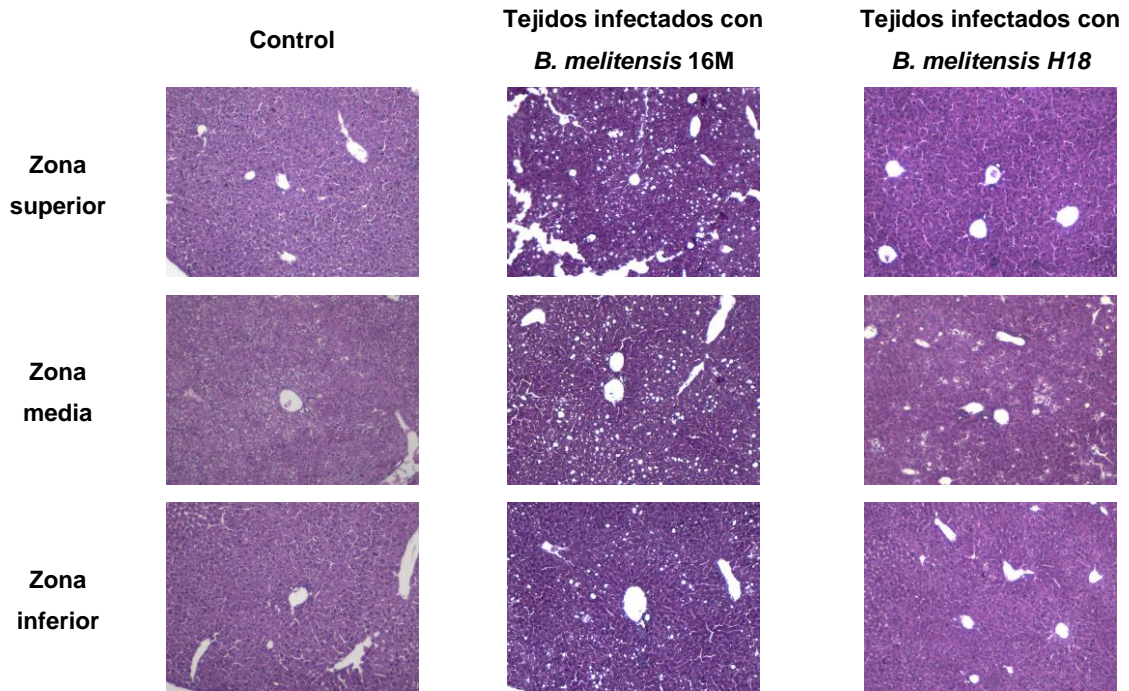


Figura 12. Corte longitudinal de hígado 5 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

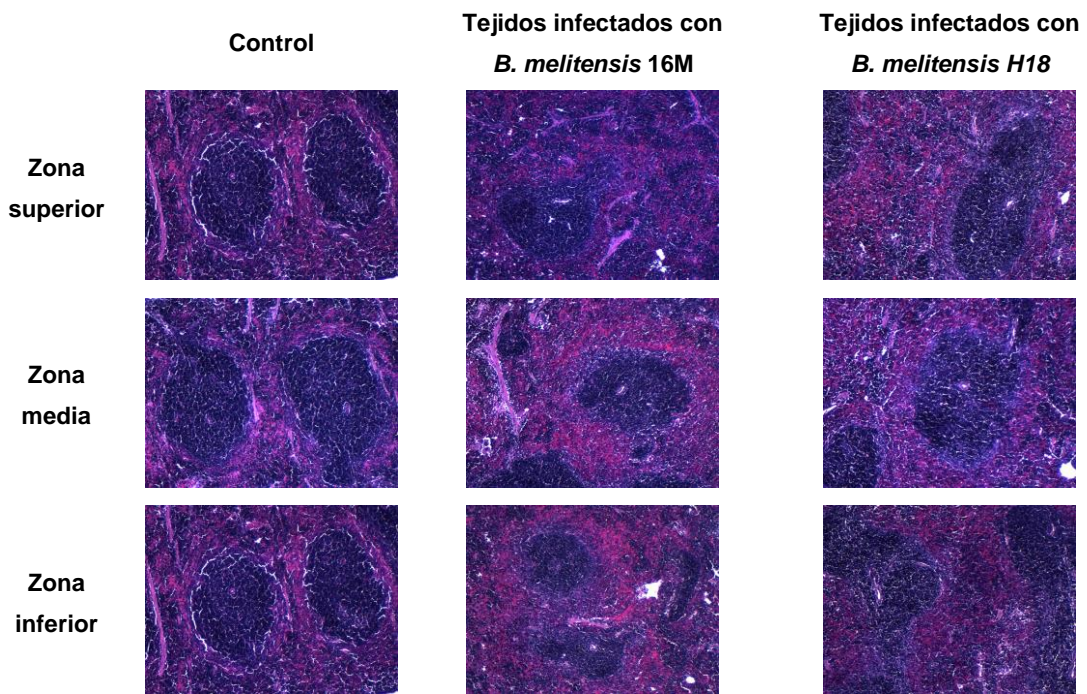


Figura 13. Corte longitudinal de bazo 5 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

Después de 10 días post infección se aprecian cambios en el diámetro de la vena centro lobulillar en los tejidos de los grupos infectados respecto al grupo control (Figura 14A), si bien los cambios anteriores no fueron significativamente estadísticos hay un aumento en la vascularización del lobulillo hepático en la zona superior e inferior entre los grupos infectados y el grupo control ($p < 0.05$), mientras que en la zona media se presentan diferencias significativas en el número de sinusoides entre los grupos infectados respecto al control (Figura 14B). Al igual que el día 5 post infección los cambios morfológicos observados en hígado y bazo se caracterizaron por infiltrado celular (Figura 15) y cito estructura difusa en la pulpa blanca y roja (Figura 16) respectivamente.

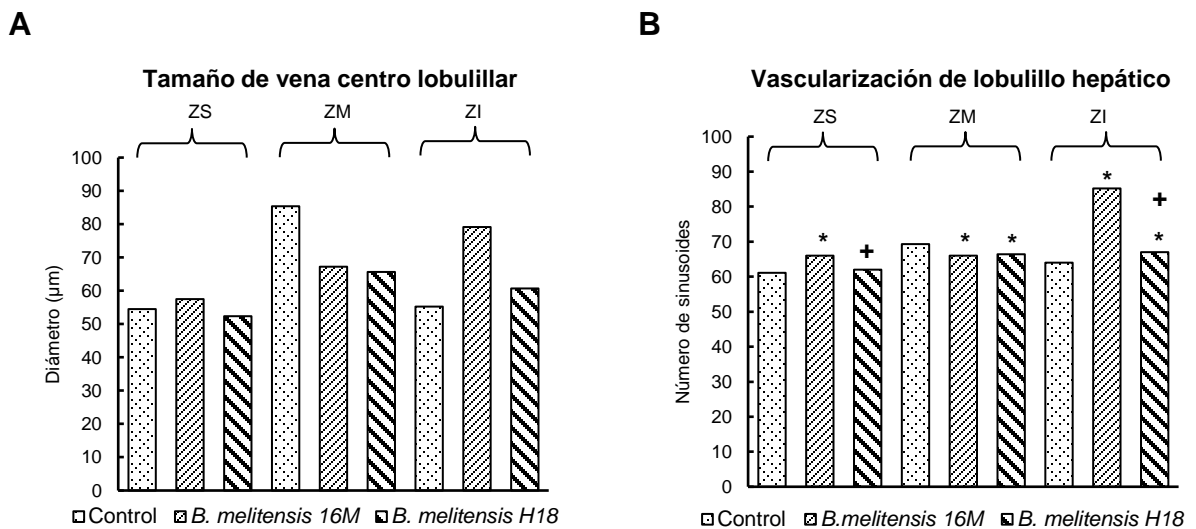


Figura 14. Cambios en los indicadores inflamatorios 10 días post infección. **A.** Tamaño de vena centro lobulillar. **B.** Vascularización del lobulillo hepático. ZS: zona superior, ZM: zona media, ZI: zona inferior. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+).

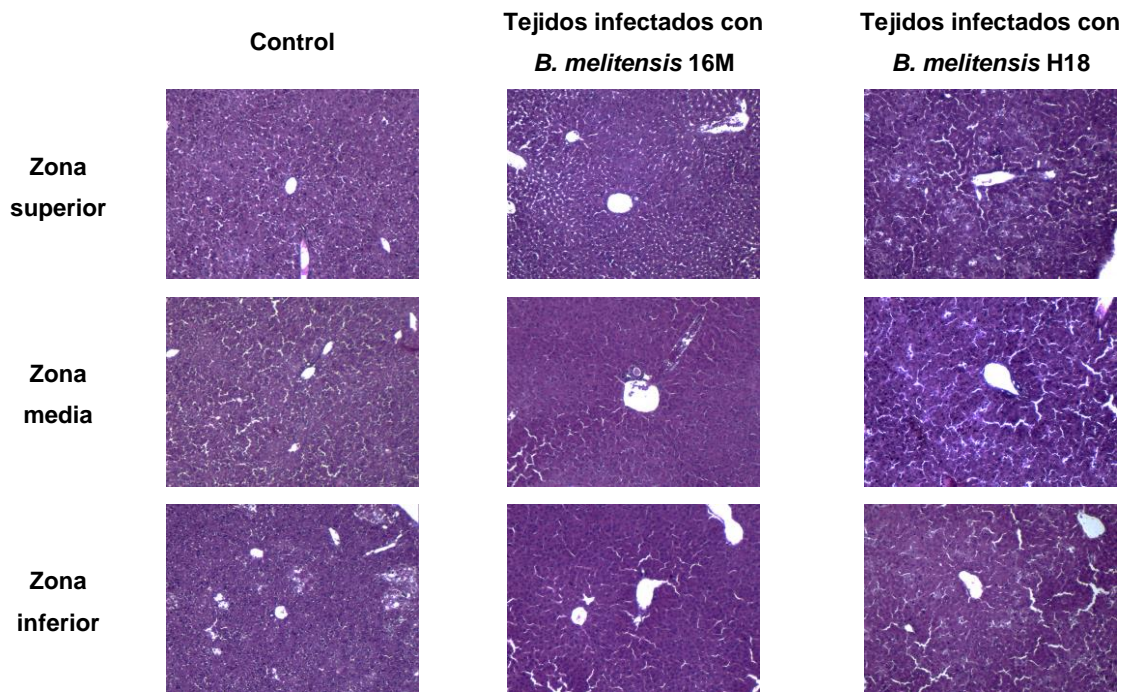


Figura 15. Corte longitudinal de hígado 10 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

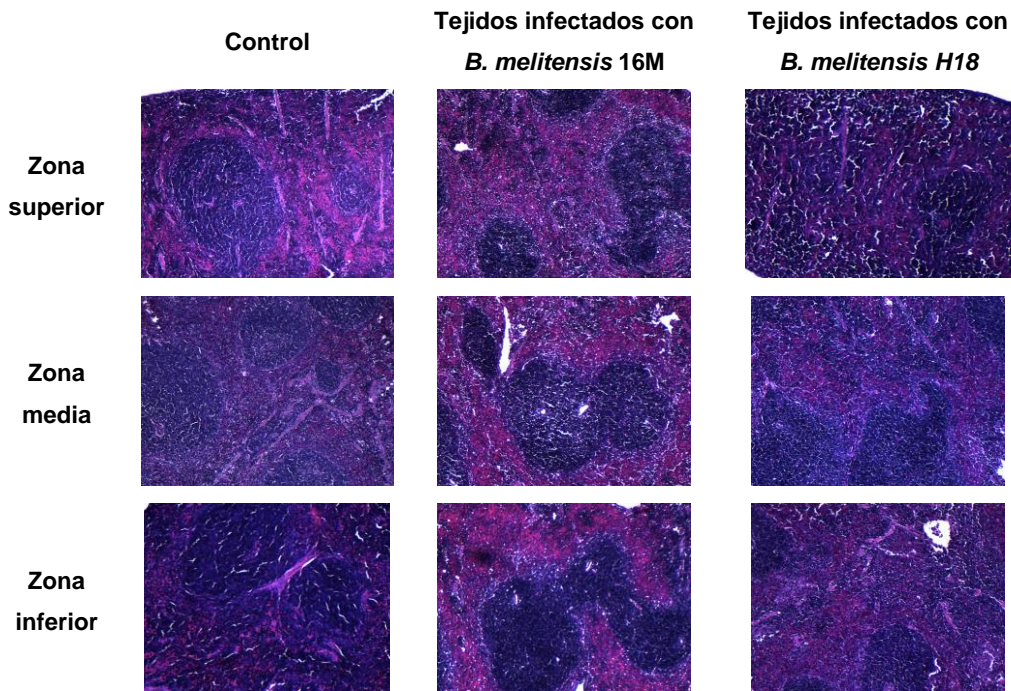


Figura 16. Corte longitudinal de hígado 10 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

En el día 22 post infección, hacia el final de la fase aguda y principios de la fase crónica, el análisis histológico reveló que en la zona superior del hígado se presenta vasodilatación en tejidos infectados con *B. melitensis* 16M y vasoconstricción en el grupo de tejidos infectados con *B. melitensis* H18, con diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de tejidos infectados y entre los infectados con la cepa de origen humano respecto al control (Figura 17A). En este punto de la infección los resultados muestran que el proceso de angiogénesis ocurren de manera heterogénea y retardada por parte de la cepa de origen humano respecto a la cepa de referencia, el aumento en la vascularización del lobulillo hepático presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) en la zona superior y la zona media entre los grupos de tejidos infectados y con respecto al control, en la zona inferior solo hay diferencias significativas entre los grupos de tejidos infectados respecto al control (Figura 17B). En hígado se observa infiltrado celular con la formación de pequeños granulomas (Figura 18) mientras que, en el bazo, los cambios más evidentes se caracterizaron por la distribución difusa de la pulpa blanca y roja, con hiperplasia linfocítica observada en el tejido infectado con *B. melitensis* H18 respecto a aquellos infectados con *B. melitensis* 16M (Figura 19), como se ha descrito previamente por Ravichankav et al., 2014, quienes reportan que *Brucella* es capaz de desorganizar los macrófagos de la zona marginal de la pulpa blanca, lo cual desequilibra el control temprano de la infección.

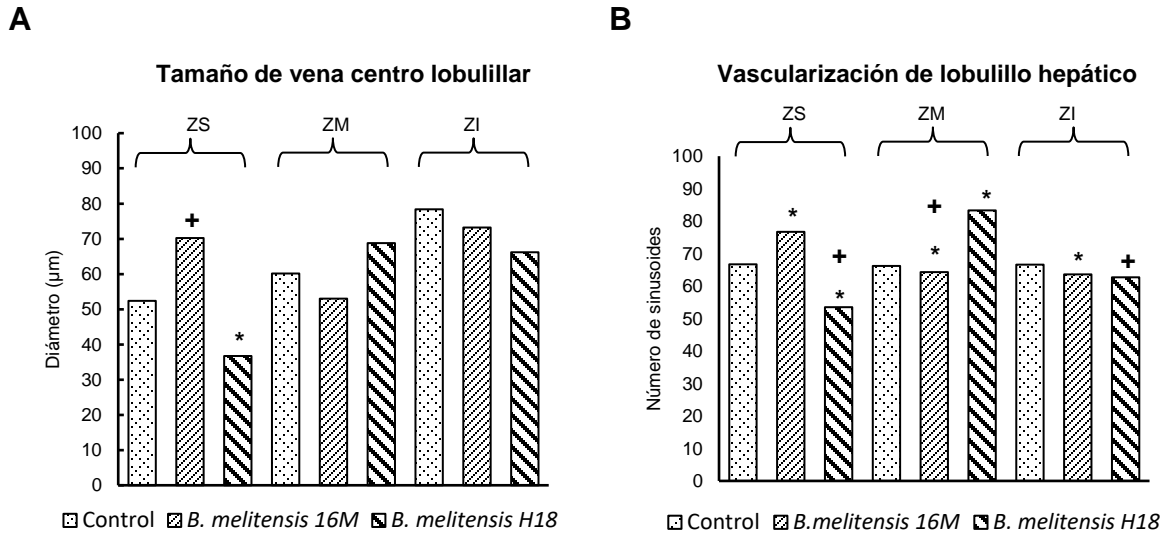


Figura 17. Cambios en los indicadores inflamatorios 22 días post infección. **A.** Tamaño de vena centro lobulillar. **B.** Vascularización del lobulillo hepático. ZS: zona superior, ZM: zona media, ZI: zona inferior. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+)

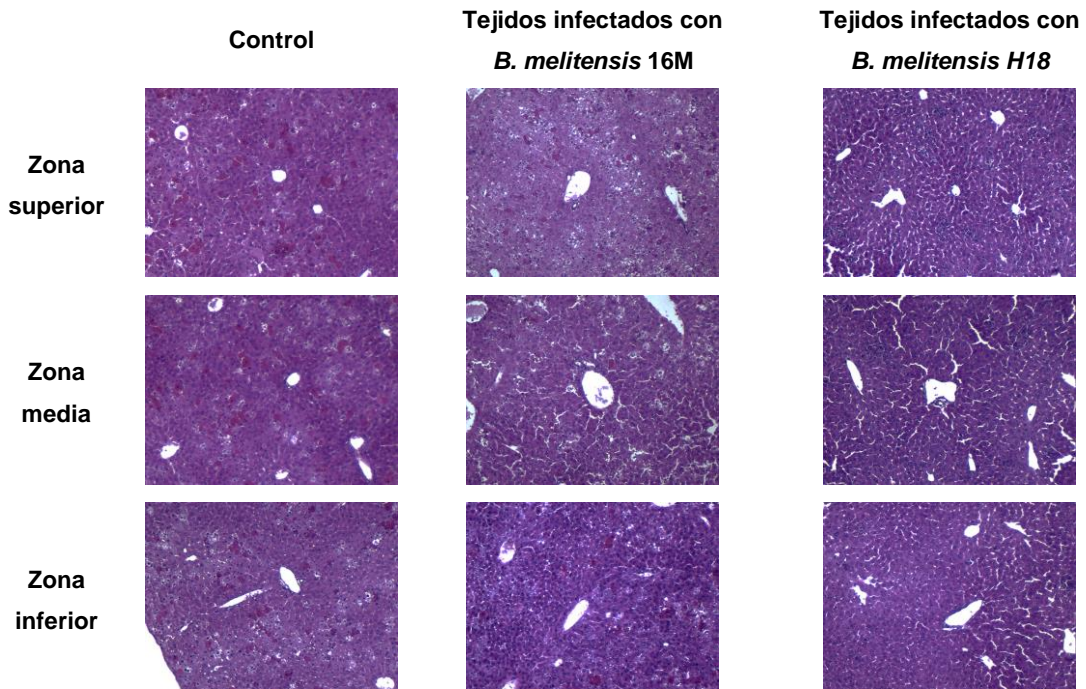


Figura 18. Corte longitudinal de hígado 22 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

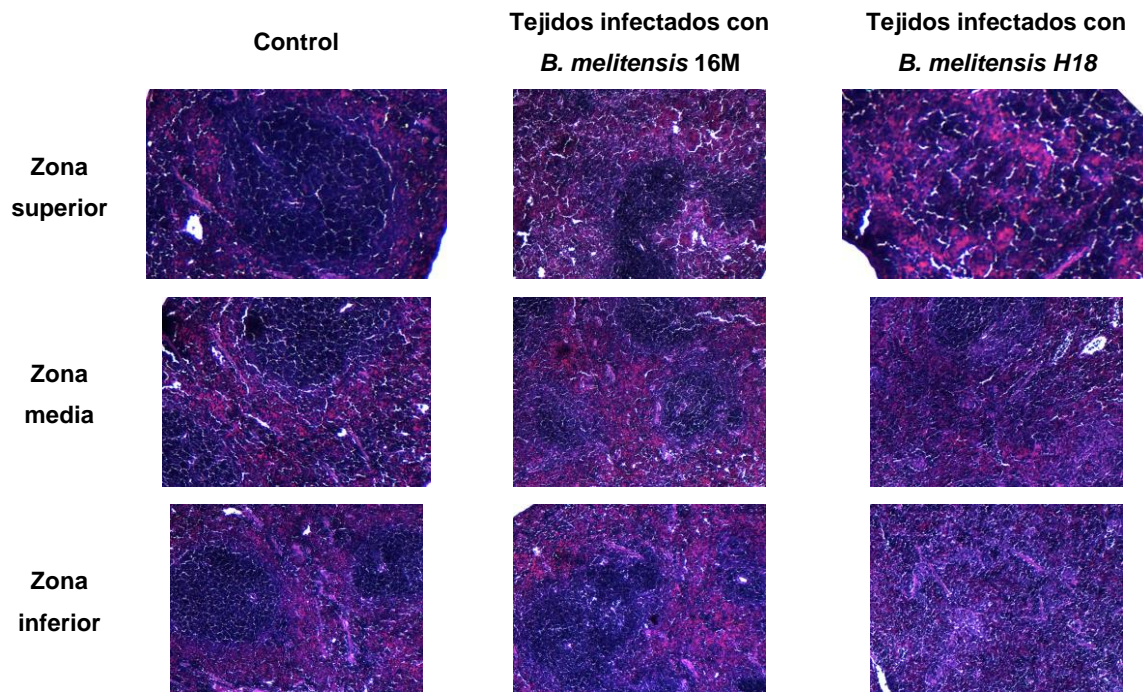


Figura 19. Corte longitudinal de bazo 22 días post infección. Magnificación 100X, tinción Hematoxilina-Eosina.

Los resultados obtenidos del análisis histológico muestran que ambas cepas patógenas inducen cambios fisiopatológicos en el modelo murino, destacando que las cepas desarrollan cambios heterogéneos, siendo más severos aquellos inducidos por *B. melitensis* H18, característicos del proceso crónico.

8.5 Expresión genética de interleucinas relacionadas con el proceso infeccioso en el modelo murino

Como se mencionó anteriormente los resultados del análisis histológico sugieren que el proceso inflamatorio es inducido de manera temprana por la cepa de referencia. Posteriormente, se muestran los resultados obtenidos de la expresión genética de las interleucinas estudiadas.

Los resultados mostrados a continuación serán descritos de acuerdo al día de infección, por lo que se discuten inicialmente aquellos identificados a los 5 días post-infección. En hígado y bazo la expresión de *Tnfa* presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) en los grupos infectados respecto al control en ambos órganos (Fig. 20). La expresión de *Il2* e *Il6* presentan diferencias significativas en ambos grupos infectados respecto al control sólo en bazo ($p < 0.05$), mientras que la expresión de *Infg* en hígado sólo presenta diferencias significativas en los grupos infectados respecto al grupo control.

Por otra parte, la expresión de interleucinas anti inflamatorias (*Il4* e *Il10*) se encuentra disminuida en bazo con diferencias significativas entre grupos infectados, mientras que en hígado se encuentran ligeramente aumentadas presentando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo infectado con la cepa aislada de humano respecto al grupo control, pero aumentada en hígado en H18 ($p < 0.05$) (Figura 26-27 y 30-31).

Los resultados revelan que a los 10 días post infección la expresión de interleucinas pro inflamatorias no presentan diferencias significativas entre los grupos infectados ($p < 0.05$), aunque H18 indujo cambios en la expresión de *Il6* e *Il2* en el bazo infectado (Figura 25-29). Para el caso de las citocinas anti inflamatorias, de manera interesante, se identificó que *Il10* es expresada con mayor intensidad en el tejido infectado con la cepa de referencia, en comparación con la expresión del tejido infectado con H18, lo cual está correlacionado con los resultados obtenidos del proceso inflamatorio identificado en el estudio histológico de bazo (Fig. 16) que sugiere una mayor eficiencia en el control de la infección frente a *B. melitensis* 16M.

En el día 22 post infección la expresión de *Il6* en bazo es mayor en el grupo infectado con H18 que en aquel infectado con 16M, sin embargo, sólo se presenta diferencia significativa en el tejido infectado con la cepa de referencia ($p < 0.05$), observando una disminución en la expresión de ésta interleucina, lo que está relacionado con la mayor capacidad de H18 para modular la respuesta inmune del huésped y de esta manera, favorecer la diseminación del patógeno, a diferencia de 16M. En cambio, en bazo infectado con H18, la expresión de las citocinas anti inflamatorias *Il4* e *Il10* fue menor respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Figura 26-27).

Estos resultados ponen de manifiesto que la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias se ve favorecida con la disminución de la expresión de citocinas anti-inflamatorias en el grupo infectado con H18, lo que sugiere que particularmente, la cepa aislada de humano estimula la expresión de citocinas que pueden favorecer la infiltración celular descrita en el análisis histológico IL-2, IL-6, y TNF- α (Oliveira et al., 2008).

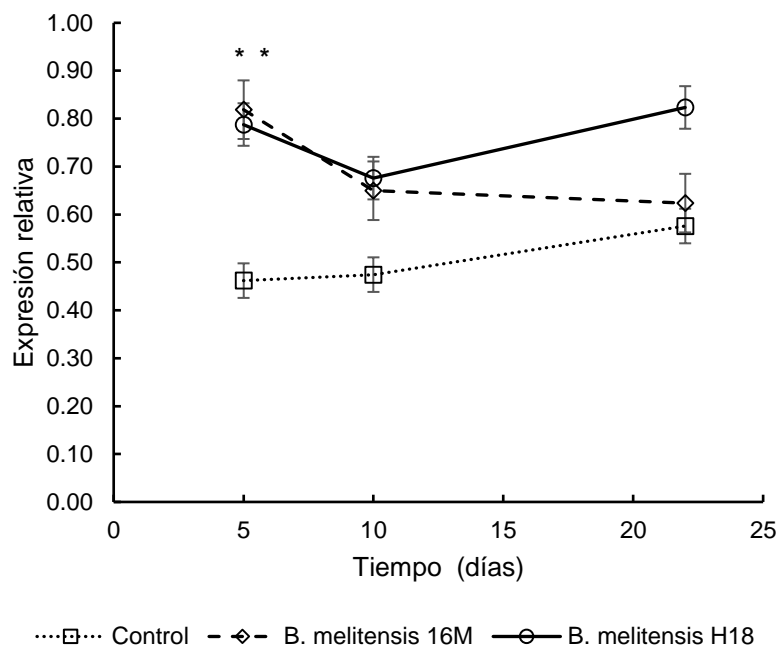


Figura 20. Expresión de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) en hígado. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*).

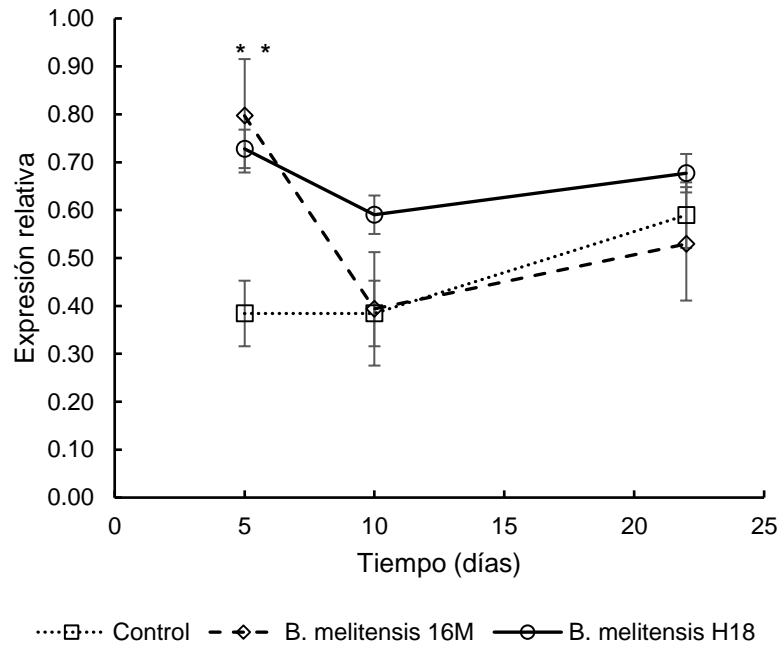


Figura 21. Expresión de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) en bazo. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*).

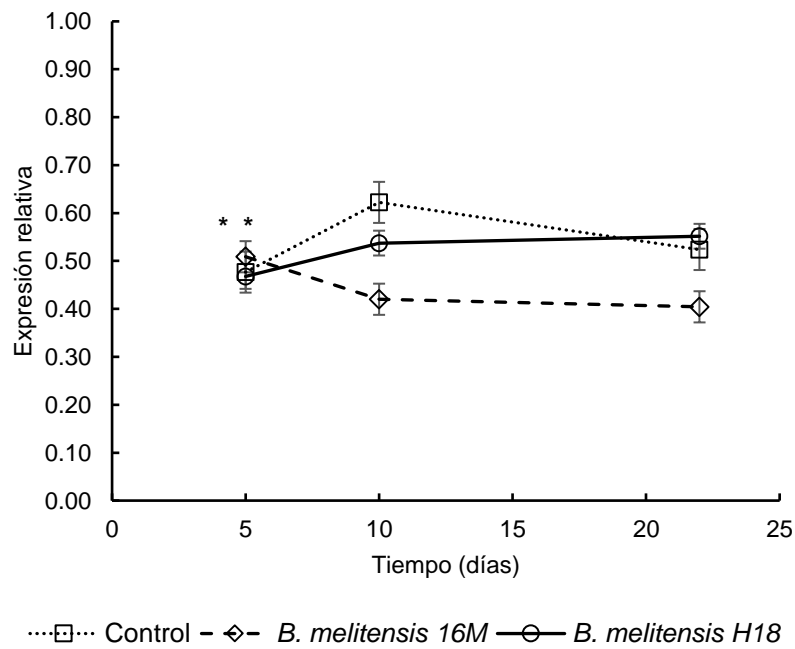


Figura 22. Expresión de Interferón gamma (INF γ) en hígado. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*).

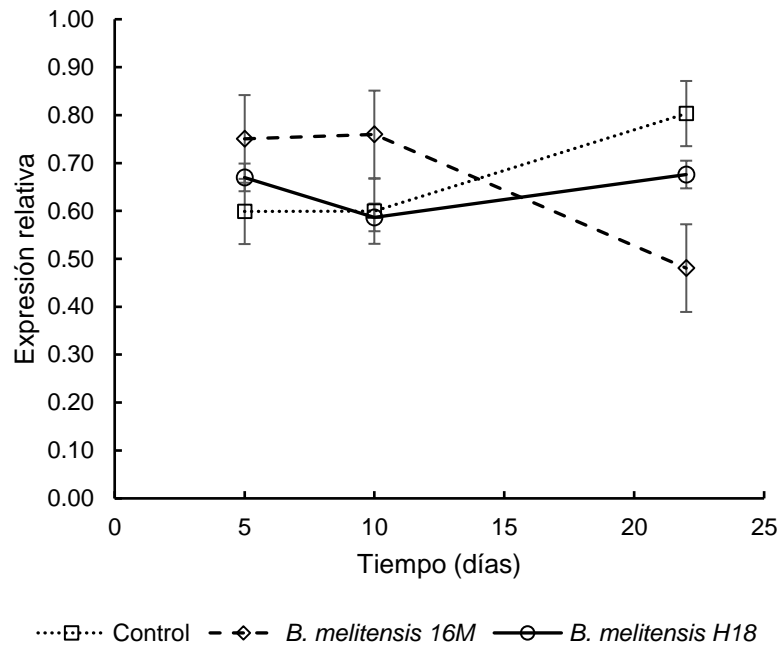


Figura 23. Expresión genética de Interferon gama (INFγ) en bazo.

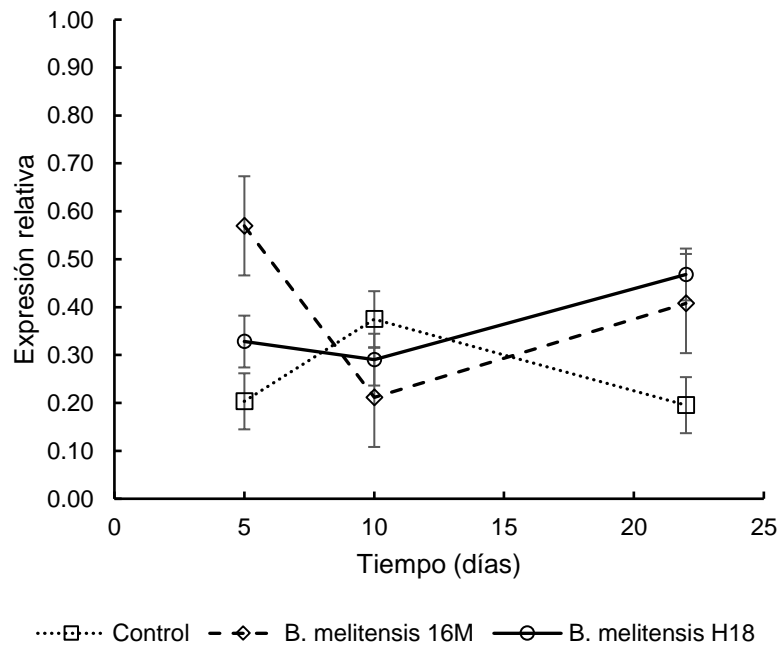


Figura 24. Expresión genética de interleucina 2 (IL2) en hígado.

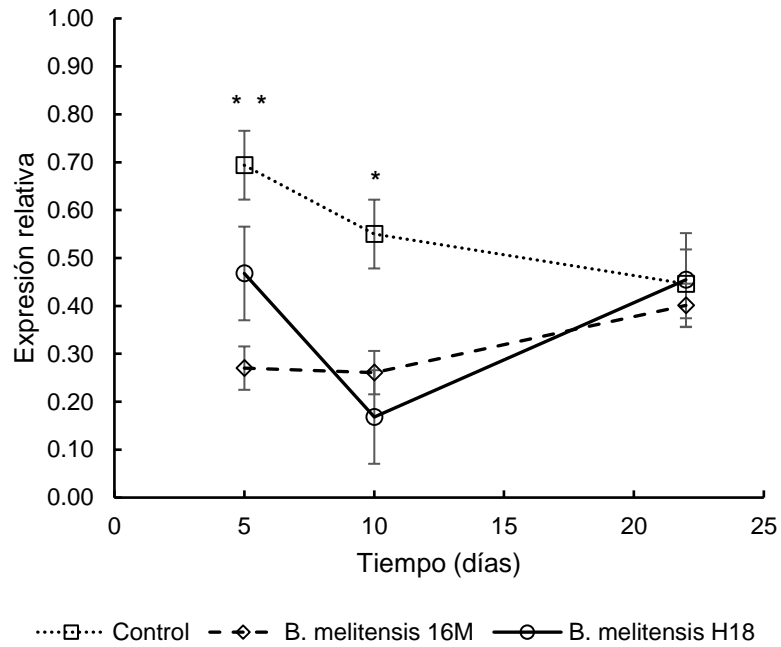


Figura 25. Expresión genética de interleucina 2 (IL2) en bazo. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*).

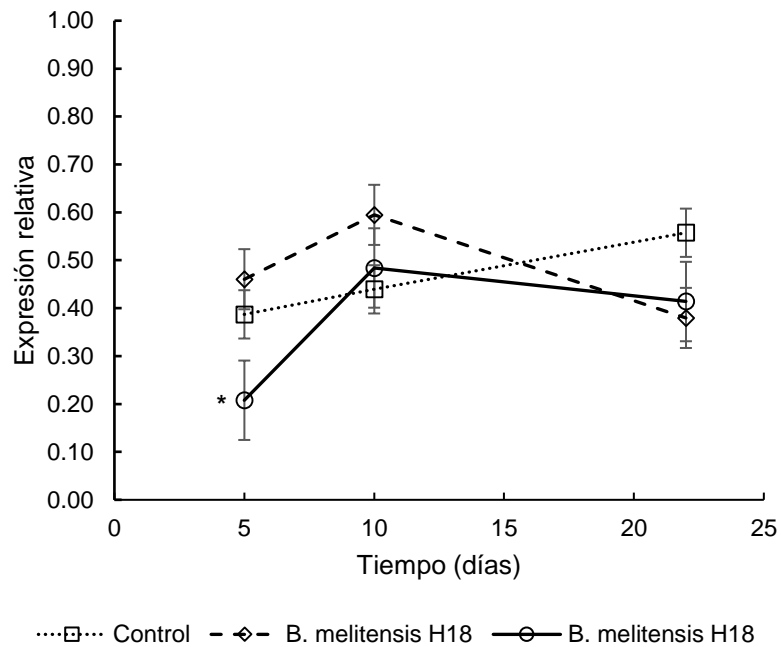


Figura 26. Expresión genética de interleucina 4 (IL4) en hígado. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*).

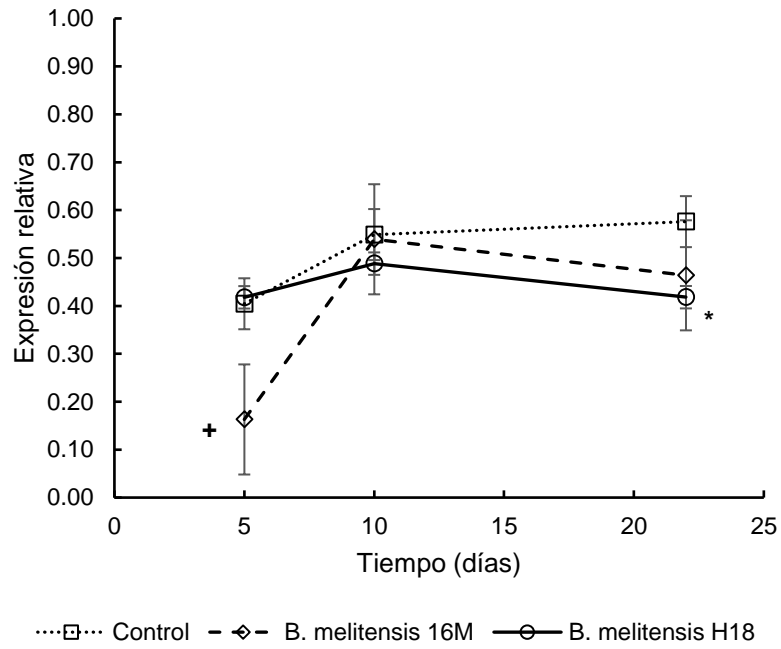


Figura 27. Expresión genética de interleucina 4 (IL4) en bazo. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+).

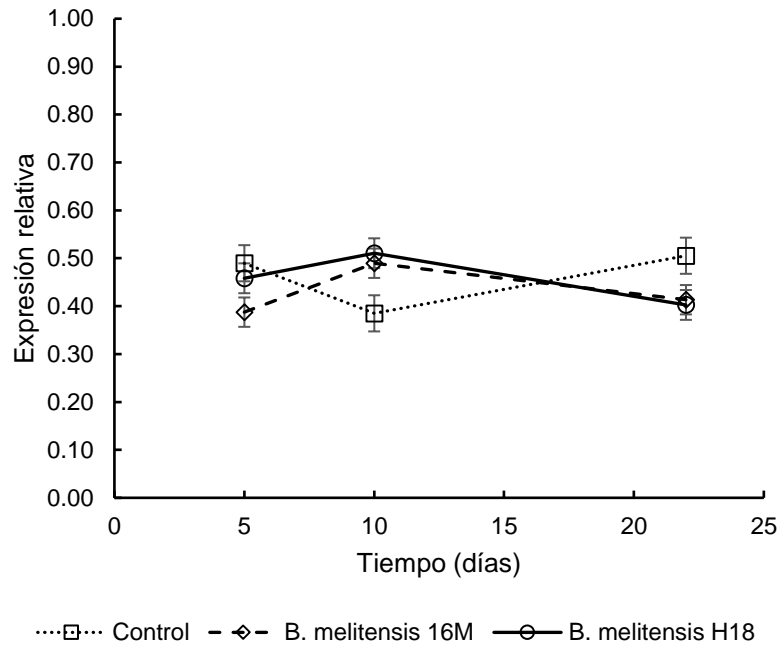


Figura 28. Expresión genética de interleucina 6 (IL6) en hígado.

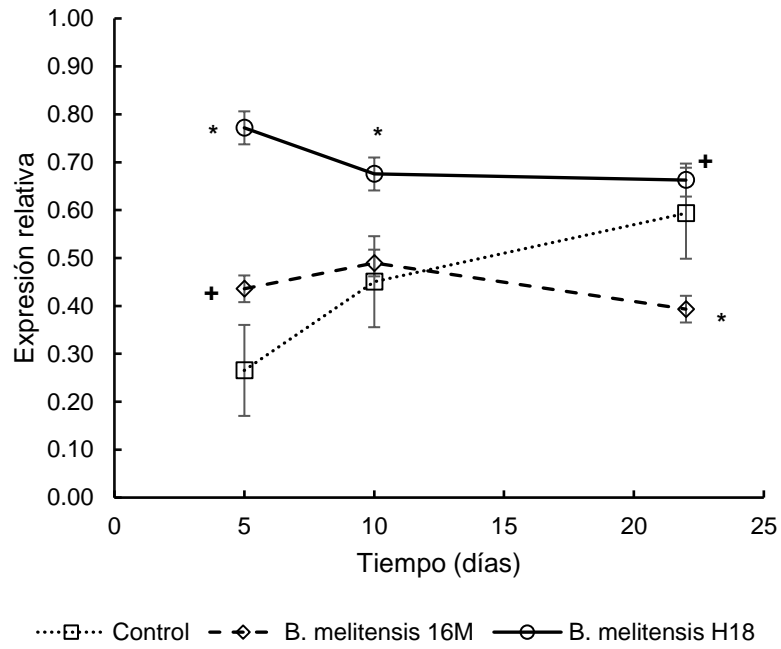


Figura 29. Expresión genética de interleucina 6 (IL6) en bazo. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+).

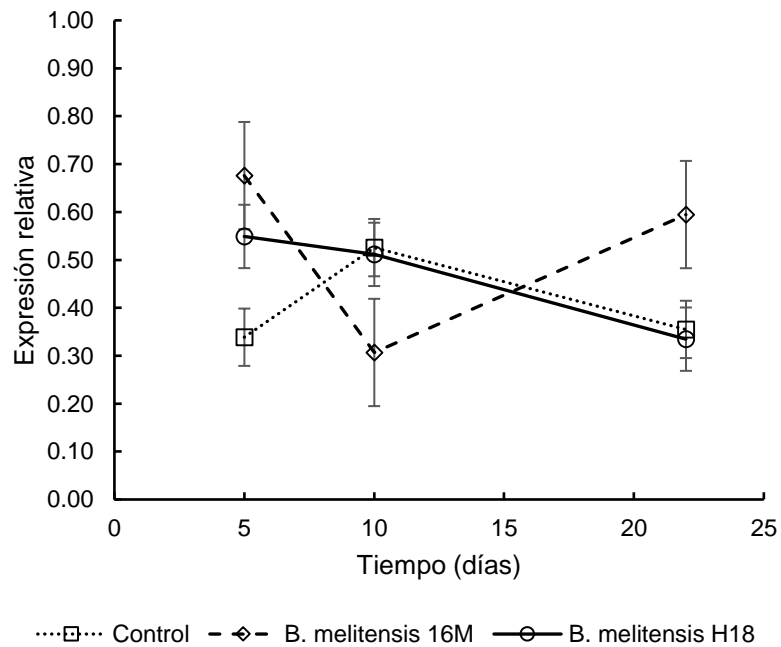


Figura 30. Expresión genética de interleucina 10 (IL10) en hígado.

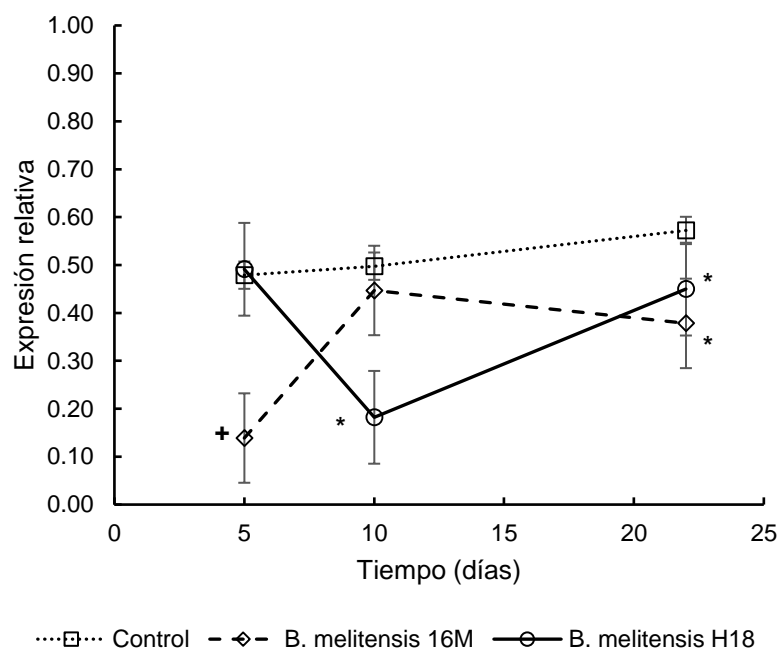


Figura 31. Expresión genética de interleucina 10 (IL10) en bazo. Se indican las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo infectado respecto al grupo control (*) y entre grupos infectados (+).

8.6 Expresión genética de genes procariontes relacionados con el QS

No se logró realizar el análisis de la expresión genética de genes procariontes relacionados con el QS, debido que la dosis infectiva utilizada (1×10^5 UFC) no fue suficiente para poder realizar el aislamiento de RNA bacteriano de los órganos infectados, posiblemente esto se atribuya al modelo utilizado, ya que diversos estudios se han realizado en líneas celulares como modelo de infección (Smith *et al.*, 2013).

9. CONCLUSIÓN

El análisis histológico revela que las cepas patógenas de diferente origen inducen un proceso inflamatorio caracterizado por vasoconstricción de la vena centrolobulillar e incremento en el número de sinusoides hepáticos, cuyos cambios fueron notoriamente diferentes a los 5 días post-infección en los tejidos infectados con 16M respecto al grupo control, no obstante, las variaciones en estos indicadores fueron perceptibles hasta los 10 días post infección en los tejidos infectados con H18. Estos hallazgos están correlacionados con la capacidad diferencial de las cepas estudiadas para modificar la expresión de genes relacionados con la modulación de la respuesta inmune. En este sentido, la cepa H18 presentó mayor capacidad para favorecer la expresión de citocinas pro-inflamatorias y reprimir la expresión de las citocinas anti inflamatorias en bazo a los 22 días post-infección, inicio de la etapa crónica, la cual se caracterizó por la desorganización de la citoestructura del bazo que conlleva a una falla en la capacidad del mismo para realizar el aclarado del patógeno resultando en su diseminación a hígado apreciado por la infiltración celular característica de los sitios de persistencia de *Brucella*.

10. RECOMENDACIONES

- Desarrollar el proceso de infección en una línea celular de macrófagos, para así aumentar la dosis infectiva y poder evaluar la expresión de los genes bacterianos relacionados con el *quorum sensing*.
- Evaluar la expresión de los genes relacionados con el *quorum sensing* y la respuesta inmune del huésped después 30 días post infección.
- Realizar inmunohistoquímica para poder detectar si la bacteria se está alojando en regiones específicas de los órganos en estudio.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Pappas, G., Papadimitriou P., Akritidis, N., Christou, L, and Tsianos, E. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 6 (2), 91-99.
2. Guzmán, R.L., Contreras, R. A., Ávila, E. D., and Morales, M. R. (2016). Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Revista chilena de infectología*, 33(6), 656-662.
3. de Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice, F. A., Rossetti, C. A., and Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis: Review of *Brucella*–Host Interactions. *The American Journal of Pathology*, 185 (6), 1505–1517.
4. Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 213.
5. Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., and Smits, H. L. (2007) Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7 (12), 775-786.
6. Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Hattendorf, J., Schelling, E., and Zinsstag, J. (2012). Clinical Manifestations of Human Brucellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), 1929.
7. Young, E.J., Hasanjani, M.R., Shafae, S., Genta, R.M., and Taylor S.L. (2014). Liver histology of acute brucellosis caused by *Brucella melitensis*. *Human Pathology*, 45 (10), 2023-2028.
8. Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L., and Akritidis, N. (2006) *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (19-20), 2229-2236.
9. Oslen, S. C., and Palmer, M. V. (2014) Advancement of Knowledge of *Brucella* Over the Past 50 Years. *Veterinary Pathology*, 51(6), 1076 – 1089.
10. Whatmore, A. M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (6), 1168-1184.
11. Wattam, A. R., Williams, K. P., Snyder, E. E., Almeida, N. F., Shukla, M., Dickerman, A. W.,... and Setubal, J. C. (2009). Analysis of Ten *Brucella* Genomes Reveals Evidence for Horizontal Gene Transfer Despite a Preferred Intracellular Lifestyle. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3569–3579.
12. Alton, G. G, Jones, Lois M, Pietz, D. E, (1976). World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Laboratory techniques in brucellosis / G. G. Alton, Lois M. Jones & D. E. Pietz, 2nd ed. Geneva. World Health Organization.
13. Corbel, M.J., and Banai, M., (2005). Genus, I., *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds). *Berger's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York.
14. Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., Gorverl, J.P., (2015) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 8(1), 60-66.
15. Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., and Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model?. *Veterinary Research*, 43(1), 29.

16. Silva, T. M. A., Costa, E. A., Paixão, T. A., Tsolis, R. M., and Santos, R. L. (2011). Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 518323.
17. Atluri, V. L., Xavier, M. N., De Jong, M. F., Den Hartigh, A. B., and Tsolis, R. M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annual Review of Microbiology*, 65, 523-541.
18. Castaneda, E.I., Avelino, F. F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J., and Girón, J.A. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues (2004). *Cellular Microbiology*, 6 (5), 435-445.
19. Rossetti, C. A., Drake, K. L., and Adams, L. G. (2012). Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes and Infection*, 14 (9), 756-767.
20. Rossetti, C.A., Drake, K.L., Siddavatam, P., Lawhon, S.D., Nunes, J.E.S, Gull, T., Khare, S., Everts, R.E., Lewin, H.A., Adams, L. G. (2013) Systems Biology Analysis of *Brucella* Infected Peyer's Patch Reveals Rapid Invasion with Modest Transient Perturbations of the Host Transcriptome. *PLoS ONE*, 8(12), 81719.
21. Celli, J. (2015). The changing nature of the *Brucella*-Containing Vacuole. *Cellular Microbiology*, 17(7), 951–958.
22. Rossello, G. A. M. y Bouza, J. M. E (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clinica*, 141 (8), 353-357.
23. Ke, Y., Wang, Y., Li, W., and Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 72.
24. Roux, C.M., Rolan, H.G., Santos, R. L., Beremand, P.D., Thomas, T.L., Adams, L. G., and Tsolis, R. M. (2007). *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cellular Microbiology*, 9 (7), 1851-1869.
25. Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Ying, T., Yuan, J., Zhong, Z. and Huang, L. (2009). Comparative Proteomics Analyses Reveal the *virB* of *B. melitensis* Affects Expression of Intracellular Survival Related Proteins. *PLoS ONE*, 4(4), 5368.
26. 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.
27. Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2007). Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 189 (16), 6035–6047.
28. Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., 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.

29. Brambila, A.J.L. and Pérez, R. E. (2014). A Functional and Phylogenetic Comparison of Quorum Sensing Related Genes in *Brucella melitensis* 16. *Journal of Microbiology*, 52 (8), 709–715.
30. Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2013). Quorum Sensing and Self-Quorum Quenching in the Intracellular Pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS ONE*, 8 (12), 82514.
31. Byndloss, M. X and Tsolis, R. M. (2016). *Brucella* Spp. Virulence Factors and Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 111-127.
32. Oliveira, S. C., De Oliveira, F. S., Macedo, G. C., De Almeida, L. A., and Carvalho, N. V. (2008). The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes and Infection*, 10 (9), 1005-1009.
33. Dorneles, E. M. S., Carvalho, A. T., Araújo, M. S. S., Sriranganathan, N., and Lagea, A. P. (2015). Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*, 33 (31), 3659-3666.
34. Ahmed, W., Zheng, K., and Liu, Z. F. (2016). Establishment of Chronic Infection: *Brucella's* Stealth Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 30.
35. Goñi, L. I., Yoldi, G. D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., and Garin, B. B. (2008). Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (10), 3484–3487.
36. Lei, S., Zhong, Z., Ke, Y., Yang, M., Xu, X., Ren, H.,...and Chen, Z. (2015). 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.
37. Smith, J. A., Khan, M., Magnani, D. D., Harms, J. S., Durward, M., Radhakrishnan, G. K.,...and Splitter, G. A. (2013). *Brucella* Induces an Unfolded Protein Response via TcpB That Supports Intracellular Replication in Macrophages. *PLoS Pathogens*, 9 (12), 1003785.
38. Prophet, E. (1ª Ed). (1995). *Métodos histotecnológicos*. Washington, USA: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP).